

PREUČEVANJE SOČASNE UPORABE ENTOMOPATOGENIH OGORČIC (Rhabditida: Steinernematidae in Heterorhabditidae) IN AKARICIDOV V LABORATORIJSKIH RAZMERAH

Žiga LAZNIK¹, Stanislav TRDAN²

Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana

IZVLEČEK

Entomopatogene ogorčice (EO) so organizmi, ki se uporabljajo v programih biotičnega varstva rastlin. Z željo po razširitvi znanja o združljivosti EO s fitofarmaceutskimi sredstvi (FFS), smo preučili združljivost infektivnih ličink (IL) EO s petimi akaricidi v laboratorijskih pogojih. Učinke posameznih akaricidov na IL smo preučili v petrijevkah pri 15, 20 in 25 °C. Čas izpostavljenosti posameznemu akaricidu je bil 1, 4 in 24 ur. V raziskavo smo vključili 4 vrste EO: *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. kraussei* in *Heterorhabditis bacteriophora*. Rezultati naše laboratorijske raziskave so pokazali, da je vrsta *H. bacteriophora* najbolj tolerantna med vsemi preučevanimi vrstami in jo lahko mešamo s skoraj vsemi akaricidi. Najbolj občutljiva vrsta EO na delovanje akaricidov se je v našem poskusu izkazala *S. feltiae*, katero lahko mešamo samo z dvema pripravkoma. Aktivna snov (a.s.), ki je najbolj primerna za mešanje z EO je fenpiroksimat, ki je pri 25 °C povzročila smrtnost le IL vrste *S. feltiae* (44 %). A.s. abamektin in piretrin imata zelo negativen učinek na preživetje EO. Rezultati so pokazali, da je združljivost EO s FFS vrstno specifična lastnost. Poleg tega na preživetje IL vplivata tudi čas izpostavljenosti a.s. in temperatura. Sočasni nanos EO in akaricidov bi lahko predstavljal prednost v integriranem varstvu rastlin. Kombinacije EO in akaricida bi lahko prihranile čas in denar pri hkratnem obvladovanju različnih škodljivih organizmov (žuželke, pršice).

Ključne besede: skladnost, entomopatogene ogorčice, akaricidi, integrirano varstvo rastlin

ABSTRACT

RESEARCH ON COMPATIBILITY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) AND ACARICIDES UNDER LABORATORY CONDITIONS

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are organisms that can be used in biological control of plants. In order to expand our knowledge about the compatibility of the EPNs to phytopharmaceuticals, we studied the compatibility of EPNs infective juveniles (IJs) to five acaricides under laboratory conditions. The direct exposure of acaricides to

¹ doc. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: ziga.laznik@bf.uni-lj.si

² prof. dr., prav tam

EPNs was studied in Petri dishes at 15, 20, and 25 °C. EPNs were exposed to acaricides for 1, 4, and 24 hours. Four EPNs species were included in our investigation; *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. krausseii*, and *H. bacteriophora*. The results of our laboratory investigation have shown that *H. bacteriophora* was the most tolerant EPN species. *H. bacteriophora* can be mixed with almost all tested acaricides. On the other hand, the most sensitive EPN species was *S. feltiae*. Our observation showed that *S. feltiae* can be mixed only with two acaricides. Active ingredient fenpyroximate proved to be the most suitable for mixing with EPNs. Our results showed that fenpyroximate was at 25 °C lethal only to *S. feltiae* (44 % mortality). The mortality of EPNs was highest in active ingredients abamectin and pyrethrin. Our results have confirmed, that compatibility of EPNs to acaricides is a species specific characteristic. The mortality of EPNs was influenced also by the exposure time, active ingredient, and temperature. The combined use of EPNs and acaricides could represent an advantage in integrated plant management. Combinations of EPNs and acaricides could save time and money in the simultaneous control of various pests (insects, mites).

Key words: compatibility, entomopathogenic nematodes, acaricides, integrated plant management

1 UVOD

339

Entomopatogene ogorčice (EO) so talni organizmi, ki živijo v simbiozi z bakterijami in so naravni sovražniki žuželk. Pomen EO v biotičnem varstvu so odkrili v 30. letih prejšnjega stoletja v ZDA. Nato je bila uporaba EO za varstvo pred škodljivimi žuželkami pozabljena do 60. let prejšnjega stoletja zaradi intenzivne rabe kemičnih sredstev za varstvo rastlin (Laznik in Trdan, 2011). V zadnjih letih je bilo narejenih kar nekaj raziskav, kjer so proučevali souporabo (skladnost) EO s fitofarmaceutskimi sredstvi (FFS). Raziskovalci so ugotovili, da lahko nekatere vrste EO prenesejo krajšo izpostavljenost FFS (do 24 h) (Laznik in Trdan, 2014). Vendar je potrebno upoštevati, da na uspeh mešanja EO in FFS vpliva mnogo dejavnikov. Ti dejavniki so sestava FFS, odmere FFS, rasa EO in vrsta EO (Laznik in sod., 2012; Laznik in Trdan, 2014).

EO lahko uporabljamo za zatiranje različnih vrst škodljivih žuželk. Njihova uporaba je bila do pred nekaj leti vezana le na zatiranje talnih škodljivcev (Koppenhöfer in Grewal, 2005). Zadnji dve desetletji pa se kaže potencial v uporabi EO tudi za zatiranje nadzemskih škodljivcev (Laznik in Trdan, 2011). Omejujoči dejavniki, ki vplivajo na uspešnost uporabe EO pri zatiranju nadzemnih škodljivcev, so vlaga, temperatura in ultravijolično sevanje (Laznik in Trdan, 2011). EO lahko nanašamo na rastline v krajših časovnih intervalih s FFS (najprej nanese FFS, kasneje še EO) ali nanese kar sočasno (Koppenhöfer in Grewal, 2005). Zaradi možne sočasne uporabe EO in akaricidov prihranimo tako na času kot tudi na denarju (porabimo manj goriva, saj opravimo le en hod s škropilnico) poleg tega istočasno zatremo pršice in druge škodljive organizme (žuželke). Pred pripravo škropilne mešanice z EO in akaricidom je dobro vedeti, ali so EO združljive z izbranim akaricidom.

Cilj naše raziskave je bil ugotoviti, kako neposredno izpostavljanje infektivnih ličink (IL) EO *Steinernema feltiae* (Filipjev), *S. carpocapsae* (Weiser), *S. kraussei* (Steiner) in *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) različnim akaricidom deluje na njihovo sposobnost preživetja pri različnih temperaturah v laboratorijskih razmerah. Da bi pridobili informacije, ki so koristne za Slovenijo, smo izbrali nekaj najpogosteje uporabljenih akaricidov pri nas. Uporabljenih je bilo šest aktivnih snovi (a.s.) za zatiranje pršic; klofentezin (Apollo 50 SC), spirodiklofen (Envidor SC 240), tebufenpirad (Masai), fenpiroksimat (Ortus 5 SC), abamektin in piretrin (Triathlon sprej). Ugotavljali smo združljivost izbranih akaricidov z EO.

2 MATERIALI IN METODE DELA

2.1 Akaricidi

V naši raziskavi smo preučili kompatibilnost 6 akaricidov: Apollo 50 SC, Envidor SC 240, Masai, Ortus 5 SC in Triathlon sprej.

2.2 Entomopatogene ogorčice

V poskus smo vključili 4 komercialne rase EO: *Steinernema feltiae* (Filipjev), *S. carpocapsae* (Weiser), *S. kraussei* (Steiner) in *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar), ki smo jih dobili pri podjetju Metrob d.o.o. Vse EO smo laboratorijsko namnoževali s t.i. »in vivo« metodo. V poskusu smo uporabili le infektivne ličinke (IL) EO, ki so bile stare manj kot 2 tedna. IL so bile shranjene v hladilniku pri 4 °C in koncentraciji 3000 IL ml⁻¹ (Laznik in Trdan, 2014).

2.3 Test kompatibilnosti

Vodi (30 ml) smo dodali 120 % priporočene koncentracije akaricida in 6 ml suspenzije EO s koncentracijo 3000 IL/ml. S pipeto smo odpipetirali 5 ml pripravljene suspenzije in jo v petih ponovitvah nanесли na plastične petrijevke (40x10 mm; Kemomed d.o.o., Slovenija). V vsaki petrijevki je bilo 2500 IL. Vsako obravnavanje je bilo ponovljeno petkrat, celotni poskus pa je bil ponovljen trikrat. Plastične petrijevke smo dali v gojitveno komoro (tip: RK-900 CH, proizvajalec: Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija) brez osvetlitve in preučevali smrtnost IL pri 15, 20, and 25 °C in 70 % relativni zračni vlagi. Preživetveno sposobnost IL smo preverjali 6 in 24 ur po nastavitvi poskusa tako, da smo iz vsakega vzorca odpipetirali 3x50 µl podvzorca in s pomočjo lupe prešteli žive in mrtve IL. Kontrolni vzorec je predstavljala suspenzija IL z vodo.

2.4 Statistična analiza

Za več informacij glej Laznik in Trdan (2014).

3 REZULTATI

Generalna analiza je pokazala, da na smrtnost EO vplivajo različni dejavniki (preglednici 1 in 2).

Preglednica 1: Analiza variance po 4 urah.

	<i>Df</i>	<i>F-porazdelitev</i>	<i>P-vrednost</i>
Dejavniki			
A: temperatura	2	21,61	0,0000
B: akaricidi	5	7,01	0,0000
C: vrsta EO	3	6,63	0,0002
D: ponovitev	4	0,92	0,4501
Interakcije			
AB	10	1,74	0,0723
AC	6	4,16	0,0005
BC	15	1,91	0,0219
ABC	30	3,02	0,0000
Skupaj	359		

Preglednica 2: Analiza variance po 24 urah.

	<i>Df</i>	<i>F-porazdelitev</i>	<i>P-vrednost</i>
Dejavniki			
A: temperatura	2	7,66	0,0006
B: akaricidi	5	29,45	0,0000
C: vrsta EO	3	24,68	0,0000
D: ponovitev	4	1,57	0,1827
Interakcije			
AB	10	3,54	0,0002
AC	6	11,46	0,0000
BC	15	4,82	0,0000
ABC	30	2,95	0,0000
Skupaj	359		

3.1 Vpliv temperature na smrtnost EO

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je bila smrtnost EO pri temperaturi 15 °C statistično značilno najvišja, medtem ko je bila pri 20 °C statistično značilno najnižja. Na smrtnost EO v poskusu je vplivala tudi dolžina izpostavitve EO preučevanim akaricidom. Rezultati analize so pokazali, da je bila najnižja smrtnost EO ugotovljena po 4-urni izpostavljenosti pri temperaturi 20 °C ($15,01 \pm 1,22$ %) in 25 °C ($15,5 \pm 1,58$ %) in najvišja pri temperaturi 15 °C ($25,4 \pm 1,66$ %). Po 24-urni izpostavljenosti se je smrtnost IL povečala. Tudi po 24-urni izpostavljenosti smo potrdili najnižjo

smrtnost EO pri 20 °C ($29,7 \pm 1,95$ %), medtem ko je bila smrtnost pri 25 °C ($34,51 \pm 2,35$ %) in 15 °C ($37,52 \pm 1,97$ %) višja.

3.2 Vpliv vrste na smrtnost EO

Smrtnost EO je odvisna od vrste ogorčic. Nekatere vrste EO so bolj občutljive tako na FFS, kot tudi na izpostavljenost različno visokim temperaturam. Opazili smo, da sta bili v našem poskusu najmanj občutljivi vrsti na izpostavljenost akaricidom *H. bacteriophora* in *S. carpocapsae*. Med obema vrstama tako po 4-urni kot tudi 24-urni izpostavljenosti preučevanim akaricidom ni bilo razlik v smrtnosti IL. Pri vseh vrstah smo potrdili, da se s povečanjem časa izpostavljenosti akaricidom poveča smrtnost IL v suspenziji. Najvišja smrtnost IL je bila ugotovljena pri vrstah *S. feltiae* ($41,06 \pm 2,34$ %) in *S. kraussei* ($40,79 \pm 2,92$ %) po 24-urni izpostavljenosti preučevanim akaricidom.

3.3 Vpliv akaricidov na smrtnost EO

Zelo pomemben dejavnik, ki je vplival na smrtnost EO v našem poskusu, je bila vrsta preučevanega akaricida. Vsi preučevani akaricidi so vplivali na višjo smrtnost EO v primerjavi s kontrolo. Pripravka Ortus in Envidor sta po 4-urni izpostavljenosti vplivala na statistično značilno manjšo smrtnost EO v primerjavi z ostalimi preučevanimi akaricidi. Po 24-urni izpostavitvi je med preučevanimi akaricidi Ortus vplival na najmanjšo smrtnost EO. Tako po 4- kot tudi po 24-urni izpostavljenosti je pripravek Triathlon sprej vplival na najvišjo smrtnost EO v našem poskusu.

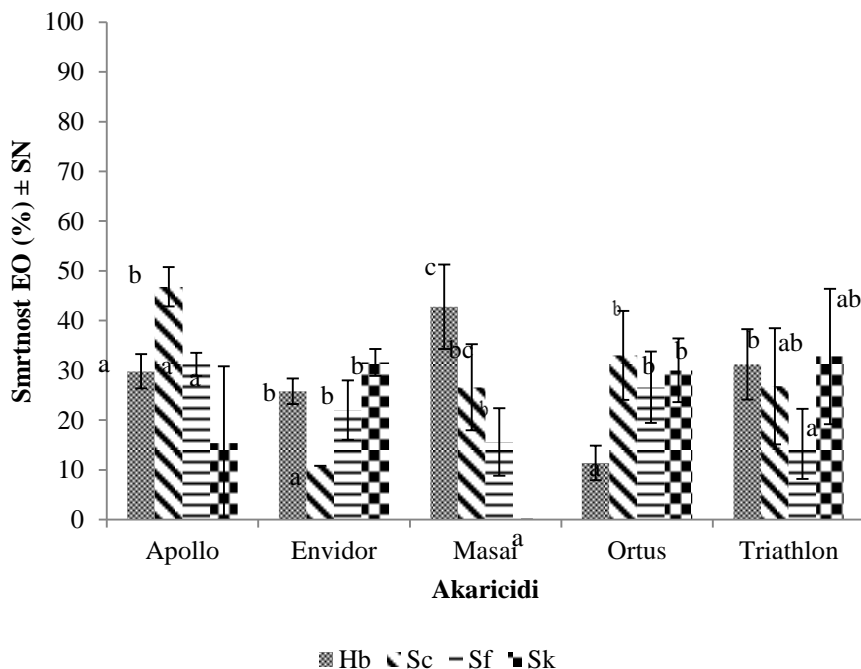
3.4 Vpliv akaricidov po 24 urah pri 15 °C

Rezultati raziskave so pokazali, da so akaracidi po 24 urah in pri 15 °C vplivali na preživetje EO različnih vrst (slika 1). Akaricid Apollo je vplival le na smrtnost vrste *S. carpocapsae* ($46,8 \pm 3,9$ %) medtem ko je bila umrljivost ostalih preučevanih vrst primerljiva s kontrolo. Akaricid Envidor je vplival na smrtnost vseh preučevanih vrst razen *S. carpocapsae* ($10,8 \pm 10,8$ %), kjer je bila umrljivost IL primerljiva s kontrolo. EO vrste *S. kraussei* se je izkazala kot edina tolerantna v mešanici suspenzije, ki je vsebovala akaricid Masai. Vrsta *H. bacteriophora* je bila tolerantna na akaricid Ortus, medtem ko je bila vrsta *H. bacteriophora* kot edina občutljiva na akaricid Triathlon spray (slika 1).

3.5 Vpliv akaricidov po 24 urah pri 20 °C

Rezultati raziskave so pokazali, da so akaracidi po 24 urah in pri 20 °C vplivali na preživetje EO različnih vrst (slika 2). Akaricid Apollo je vplival na smrtnost vseh vrst EO razen *S. carpocapsae* (0 ± 0 %) in *H. bacteriophora* (0 ± 0 %), kjer je bila umrljivost IL primerljiva s kontrolo. Akaricid Envidor je vplival na smrtnost vseh vrst EO razen *S. feltiae* (0 ± 0 %), kjer je bila umrljivost IL primerljiva s kontrolo. Vrsti *H.*

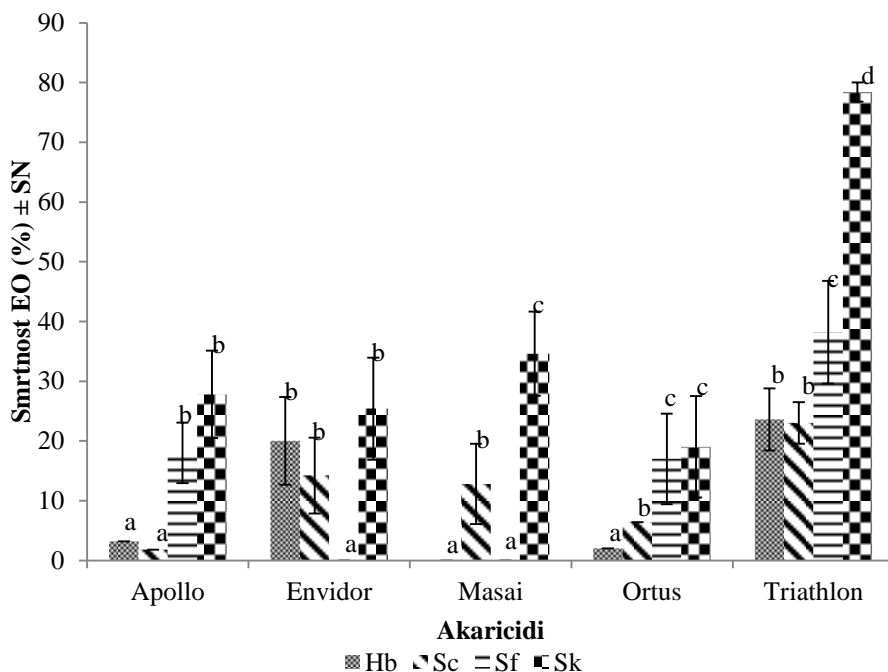
bacteriophora in *S. feltiae* sta se izkazali kot tolerantni na akaricid Masai. Vrsta *H. bacteriophora* se je izkazala kot edina tolerantna na akaricid Ortus. Akaricid Triathlon spray je vplival na smrtnost vseh preučevanih vrst EO (slika 2).



Slika 1: Korigirana smrtnost IL EO (% ± SN) po 24 urih izpostavljenosti akaricidom pri T = 15 °C. Vrednosti, ki jim sledijo različne črke so statistično različne (P < 0,05). Vrednosti z oznako a se statistično značilno ne razlikujejo s kontrolo; Sf – *Steinernema feltiae*; Sc – *Steinernema carpocapsae*; Sk – *Steinernema kraussei*; Hb – *Heterorhabditis bacteriophora*.

3.6 Vpliv akaricidov po 24 urah pri 25 °C

Rezultati raziskave so pokazali, da so akaracidi po 24 urah in pri 25 °C vplivali na preživetje EO različnih vrst (slika 3). Akaricida Apollo in Envidor sta vplivala na smrtnost vseh preučevanih vrst EO. Akaricid Masai je vplival na smrtnost vseh vrst EO, razen *S. carpocapsae* (0 ± 0 %), kjer je bila umrljivost IL primerljiva s kontrolo. Vrsta *S. feltiae* se je izkazala kot edina občutljiva na akaricid Ortus. Akaricid Triathlon spray je vplival na smrtnost vseh preučevanih vrst EO, razen *S. carpocapsae* (0 ± 0 %), kjer je bila umrljivost IL primerljiva s kontrolo (slika 3).



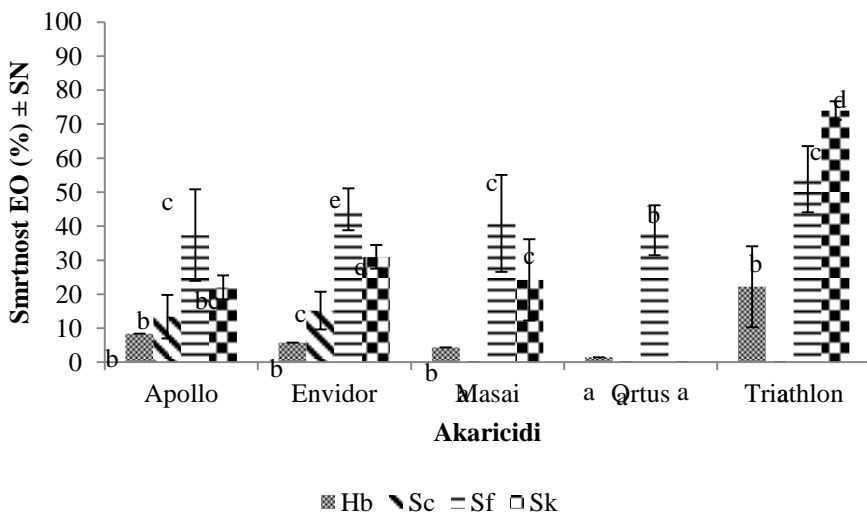
Slika 2: Korigirana smrtnost IL EO (% ± SN) po 24 urah izpostavljenosti akaricidom pri T = 20 °C. Vrednosti, ki jim sledijo različne črke so statistično različne (P < 0,05). Vrednosti z oznako a se statistično značilno ne razlikujejo s kontrolo; Sf – *Steinernema feltiae*; Sc – *Steinernema carpocapsae*; Sk – *Steinernema kraussei*; Hb – *Heterorhabditis bacteriophora*.

4 RAZPRAVA

EO lahko uporabljamo za zatiranje različnih vrst škodljivcev. Njihova uporaba je bila dolga leta vezana le na talne škodljivce, zadnji dve desetletji pa se kaže potencial tudi v uporabi za zatiranje nadzemskih škodljivcev. Za uspešno zatiranje nadzemskih škodljivcev z uporabo EO morajo biti ustrezna vlaga, temperatura in čim krajša izpostavitve ultravijoličnemu sevanju (Laznik in Trdan, 2011).

V naši raziskavi smo želeli preučiti združljivost različnih akaricidov s štirimi vrstami EO (*H. bacteriophora*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae* in *S. kraussei*). Rezultati naše raziskave, kot tudi že nekaterih predhodnih raziskav (Rovesti in Deseč, 1990; Laznik in Trdan, 2014), so potrdili, da je združljivost EO s FFS mogoča, vendar je odvisna od interakcije med vrsto EO, aktivno snovjo in tudi temperaturo. Laznik in Trdan (2014) poročata, da je smrtnost EO pri mešanju z insekticidi in herbicidi manjša pri nižji temperaturi, s povečevanjem temperature pa se smrtnost EO povečuje. Rezultati naše raziskave so v nasprotju s predhodnimi, saj smo pri najnižji preučevani temperaturi dosegli največjo smrtnost EO. Ta fenomen lahko pojasnimo z raziskavo, ki so jo opravili v ZDA. Grewal in sod. (1994) namreč poročajo o možnosti izgube naravnih

lastnosti EO pri njihovem gojenju *in vitro*. Vse ogorčice, ki smo jih uporabili v našem poskusu so bile namreč gojene na gojiščih in niso bile izolirane iz tal. Do podobnih zaključkov so prišli tudi raziskovalci v Novi Zelandiji (Wilson in sod., 2012).



345

Slika 3: Korigirana smrtnost IL EO (% ± SN) po 24 urih izpostavljenosti akaricidom pri T = 25 °C. Vrednosti, ki jim sledijo različne črke so statistično različne (P < 0,05). Vrednosti z oznako a se statistično značilno ne razlikujejo s kontrolo; Sf – *Steinernema feltiae*; Sc – *Steinernema carpocapsae*; Sk – *Steinernema kraussei*; Hb – *Heterorhabditis bacteriophora*.

Naša raziskava je pokazala, da je najbolj tolerantna vrsta *H. bacteriophora* in najbolj občutljiva *S. feltiae*. Vendar se ti rezultati razlikujejo glede na aktivno snov, čas izpostavljenosti in temperaturo. Tako smo prišli do ugotovitev, da lahko vrsto *H. bacteriophora* mešamo z aktivno snovjo fenpiroksimat pri vseh temperaturah, z a.s. klofentezin in fenpiroksimat pri 20 in 25 °C, z a.s. tebufenpirad pri 20 °C ter z a.s. spirodiklofen pri 25 °C. Vrsto *S. carpocapsae* lahko mešamo z a.s. fenpiroksimat pri 20 in 25 °C, z a.s. klofentezin pri 20 °C ter a.s. tebufenpirad pri 25 °C. Vrsto *S. feltiae* lahko mešamo le z a.s. spirodiklofen in tebufenpirad pri 20 °C. Vrsto *S. kraussei* lahko mešamo z a.s. fenpiroksimat pri 20 in 25 °C in z a.s. klofentezin pri 15 °C. Akaricid Triathlon sprej z a.s. abamektin in piretrin ni primeren za sočasno uporabo z EO. Ta rezultat smo pričakovali, saj sta že Laznik in Trdan (2014) ugotovila, da snov abamektin slabo vpliva na življenje IL EO. Komercialni pripravek Ortus z a.s. fenpiroksimat pa se je izkazal kot najbolj ustrezen za mešanje z EO, saj ga lahko mešamo z vrstami *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* in tudi *S. kraussei* pri 20 in 25 °C.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je EO mogoče hkrati aplicirati z nekaterimi insekticidnimi a. s. in s tem pripomoremo k učinkovitejšim, cenejšim in časovno hitrejšim zatiranju škodljivih organizmov na rastlinah.

5 ZAHVALA

Raziskava je nastala v sklopu programske skupine Hortikultura (P4-0013-0481), ki jo financira agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS). Del raziskave je bil financiran v okviru strokovnih nalog s področja varstva rastlin, ki ga financira Ministrstvo za kmetijstvo in gozdarstvo v sklopu Fitosanitarne uprave Republike Slovenije. Posebna zahvala za pomoč pri izvedbi poskusa gre Urški Držaji.

6 LITERATURA

- Grewal PS, Selvan S, Gaugler R (1994) Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19: 245-253
- Koppenhöfer A.M., Grewal, P.S. 2005. Compatibility and interactions with agrochemicals and other biocontrol agents. Nematodes as biocontrol agents, Grewal, P.S., Ehlers, R.-U. in Shapiro-Ilan, D.I. (ur.) (eds.). Wallingford, CABI: 363-381
- Laznik Ž., Trdan S. 2011. Entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) in Slovenia: from *tabula rasa* to implementation into crop production systems. *Insecticides – pest engineering*. Peervern F. (ed.). Intech, Rijeka, Croatia: 627-656
- Laznik Ž., Vidrih M., Trdan S. 2012. Effect of different fungicides on viability of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* (Filipjev), *S. carpocapsae* Weiser and *Heterorhabditis downesi* Stock, Griffin & Burnell (Nematoda: Rhabditida) under laboratory conditions. *Chilean journal of agricultural research*, 72: 62–67
- Laznik Ž., Trdan S. 2014. The influence of insecticides on the viability of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under laboratory conditions. *Pest Management Science*, 70: 784-789
- Rovesti L., Deseo K.V. 1990. Compatibility of chemical pesticides with entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica*, 36: 237–245
- Wilson M. J., Ehlers R. U., Glazer I. 2012 Entomopathogenic nematode foraging strategies – is *Steinernema carpocapsae* really an ambush forager? *Nematology* 14:389-394