

**PREDSTAVITEV RAZISKOVALNEGA PROJEKTA: POMEN HLAPNIH  
IZLOČKOV IZBRANIH VRTNIN PRI POSREDNI OBRAMBI RASTLIN  
PRED POLŽI (J4-50135)**

Žiga LAZNIK<sup>1</sup>, Andreja URBANEK KRAJNC<sup>2</sup>, Mitja KRIŽMAN<sup>3</sup>, Stanislav  
TRDAN<sup>4</sup>

<sup>1,4</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana

<sup>2</sup> Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Maribor

<sup>3</sup> Kemijski inštitut, Ljubljana

**IZVLEČEK**

Polži predstavljajo gospodarsko pomembne škodljivce v kmetijstvu. Številne rastlinske vrste ob napadu škodljivega organizma začno sproščati hlapljive snovi, ki privabljajo naravne sovražnike herbivorov. Hlapljive snovi imajo pomembno vlogo v multitrofičnem sistemu, ki ga sestavljajo rastlina, herbivor in njegov naravni sovražnik. Delujejo kot neke vrste kemični signali, ki neposredno vplivajo tako na herbivora kot tudi na njegovega naravnega sovražnika. Zaradi rastlinskih poškodb se v nadzemnih in podzemnih organih vzpodbudijo kvantitativne in kvalitativne spremembe v določenih metabolitih. Med številnimi obrambnimi odzivi sta pomembni sinteza antioksidantov in aktivacija antioksidativnih encimov. V projektu želimo ugotoviti ali nadzemski deli rastlin solate (*Lactuca sativa*) in zelja (*Brassica oleracea* var. *capitata*), ki jih poškodujejo različne vrste polžev; španski lazar (*Arion vulgaris*) in mrežasti slinar (*Deroceras reticulatum*) inducirajo izločanje hlapljivih snovi v koreninskem sistemu, in kakšno vlogo imajo te snovi na usmerjenost gibanja parazitskih ogorčic polžev (*Phasmarhabditis papillosa*, *Oscheius myriophila*). Predpostavljamo, da mukus polžev in poškodbe nadzemnih delov zaradi obžrtja inducirajo askorbatno-glutationski cikel in z žveplom prodobljeno odpornost (SIR). Ugotoviti želimo ali imajo povišane vsebnosti glutaciona v rastlinah vpliv na kemotaksično gibanje ogorčic in odvrčilen učinek na polže. V ta namen bomo v rastlinah vzpodbudili SIR s predhodnim tretiranjem rastlin s sulfatom. Cilji projekta: (1) z našo raziskavo želimo obogatiti obstoječe znanje iz področja multitrofičnega komuniciranja med organizmi; (2) glavni namen raziskave je predvsem ugotoviti kdo je glavni komunikator s parazitskimi ogorčicami polžev (POP) – rastlina ali polž; (3) v primeru potrditve teze, da rastlina ali polž proizvajata semiokemikalije, ki delujejo privabilno na POP bo mogoče v prihodnje razviti feromonske kapsule na podlagi glavne aktivne snovi, ki bi privabile POP h koreninam rastlin v večjem številu in s tem bi poskrbeli za njihovo večjo zaščito; (4) optimizacija načinov biotičnega varstva rastlin pred škodljivimi organizmi in njihova

557

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

<sup>2</sup> dr., Pivola 10, SI-2311 Hoče

<sup>3</sup> dr., Hajdrihova 19, SI-1001 Ljubljana

<sup>4</sup> Prof. dr., Jamnikarjeva ulica 101, SI-Ljubljana

implementacija v pridelavo živeža; (5) razvoj optimiziranih postopkov za vzorčenje in analizo semiokemikalij na izbranih organizmih. Poznavanje komunikacije med rastlinami, herbivori in njihovimi naravnimi sovražniki je ključnega pomena pri učinkovitejši implementaciji in optimizaciji biotičnega varstva v sisteme pridelave živeža.

**Ključne besede:** raziskovalni projekt, J4-50135, ARIS

#### ABSTRACT

##### THE SIGNIFICANCE OF VOLATILE COMPOUNDS OF SELECTED VEGETABLES IN THE INDIRECT DEFENCE OF PLANTS AGAINST SLUGS (J4-50135)

Slugs represent economically significant pests in agriculture. Many plant species, upon being attacked by harmful organisms, begin emitting volatile substances that attract natural enemies of herbivores. These volatile substances play a crucial role in a multitrophic system consisting of plants, herbivores, and their natural enemies. They act as a form of chemical signals that directly impact both the herbivore and its natural enemy. Plant injuries trigger quantitative and qualitative changes in specific metabolites in both aboveground and underground plant organs. Among various defense responses, the synthesis of antioxidants and activation of antioxidative enzymes are crucial. In this project, we aim to determine whether aboveground parts of lettuce (*Lactuca sativa*) and cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), damaged by different species of slugs—Spanish slug (*Arion vulgaris*) and field slug (*Deroceras reticulatum*)—induce the secretion of volatile substances in the root system and what role these substances play in directing the movement of parasitic nematodes of slugs (*Phasmarhabditis papillosa*, *Oscheius myriophila*). We hypothesize that slug mucus and damage to aboveground parts induced by feeding stimulate the ascorbate-glutathione cycle and sulfur-induced resistance (SIR). We aim to determine whether elevated levels of glutathione in plants affect the chemotactic movement of nematodes and act as a repellent to slugs. To achieve this, we will induce SIR in plants by pre-treating them with sulfate. Project objectives: (1) to enrich existing knowledge on multitrophic communication among organisms through our research; (2) to primarily determine the main communicator with parasitic nematodes of slugs – whether it is the plant or the slug; (3) if the hypothesis that the plant or the slug produces semiochemicals that attract slug parasitic nematodes is confirmed, it may lead to future development of pheromone capsules based on the main active substance, attracting slug parasitic nematodes to plant roots in larger numbers for enhanced protection; (4) optimization of methods for biological control against harmful organisms and their implementation in food production; (5) development of optimized procedures for sampling and analyzing semiochemicals in selected organisms. Understanding communication between plants, herbivores, and their natural enemies is crucial for more effective implementation and optimization of biotic protection in food production systems.

**Key words:** research project, J4-50135, ARIS

## 1 VSEBINA PROJEKTA

Rastline imajo edinstveno vlogo v prehranjevalnih verigah na Zemlji. Njihovo vitalnost zmanjšujejo nekateri organizmi, ki se z njimi hranijo in na njih razmnožujejo (Capinera, 2001). Vsak organizem v naravi ima svojevrstno vlogo in edinstven pomen. Noben ni škodljiv sam po sebi. V naravnih biotopih navadno ne razlikujemo med škodljivimi in koristnimi vrstami. To razlikovanje je značilno za agrarne biotope, kjer se organizmi prereznožijo in s prehranjevanjem na gojenih rastlinah povzročajo škodo. Rastlinam škodljive vrste uvrščamo med biotične dejavnike, ki povzročajo gospodarsko škodo v kmetijstvu in gozdarstvu (Capinera, 2001). Med gospodarsko pomembne škodljive organizme v kmetijstvu uvrščamo tudi polže (Laznik in sod., 2020, 2023). Limacidi na podlagi dveh aktivnih snovi metaldehid in železov (III) fosfat se večinoma uporabljajo pri zatiranju polžev (Laznik in sod., 2023). Fitofarmacevtska sredstva na podlagi omenjenih aktivnih snovi predstavljajo veliko okoljsko tveganje za deževnike, domače živali in ljudi (Laznik in sod., 2023). Ker se metaldehid šteje za nastajajoče onesnaževalo, ki povzroča skrb, bo uporaba metaldehida na prostem v Združenem kraljestvu prepovedana od marca 2022 (Laznik in sod., 2023). Podobne smernice ima tudi EU, katere članica je Slovenija. Zaradi toksikoloških težav, ki nastajajo pri zatiranju polžev, predstavlja biotično zatiranje alternativo kemičnemu (Laznik in sod., 2023).

559

Biotično varstvo rastlin je način obvladovanja škodljivih organizmov v kmetijstvu in gozdarstvu, ki uporablja žive naravne sovražnike (koristne organizme) (Wajnberg et al., 2001; Heinz et al., 2004). Usmerjeno je v varovanje in vzpodbujanje koristnih organizmov v naravi in na ciljno vnašanje organizmov na prosto ali v prostore ločene od narave (Wajnberg et al., 2001). Uporaba biotičnih pripravkov zahteva več znanja uporabnikov in tudi njihovo večjo ekološko osveščenost. Pripravki, izdelani na biotični podlagi, so ekološko ustrežnejši, njihovo delovanje je bolj specifično, pomembna je njihova formulacija in aplikacija ter natančnost rokov tretiranja (Wajnberg et al., 2001; Heinz et al., 2004). Po drugi strani pa je njihova učinkovitost večkrat manjša od tiste pri kemičnih pripravkih in tovrstni pripravki so tudi cenovno dražji (Wajnberg et al., 2001). Razlika v ceni je predvsem posledica relativno majhnega trga z biotičnimi pripravki, ki na celotnem trgu s sredstvi za varstvo rastlin trenutno obsega okrog 6 % (po podatkih BCC Research), do leta 2025 pa naj bi se povečal na vsaj 10 %. Biotično zatiranje polžev temelji na rabi parazitskih ogorčic polžev (*Phasmarhabditis hermaphrodita*) (Laznik in sod., 2023).

Številne rastlinske vrste ob napadu škodljivega organizma začno sproščati hlapljive snovi, ki privabljajo naravne sovražnike herbivorov (Laznik in Trdan, 2016ab). Hlapljive snovi (HS) imajo pomembno vlogo v multitrofičnem sistemu, ki ga sestavljajo rastlina, herbivor in njegov naravni sovražnik. Delujejo kot neke vrste kemični signali (semiokemikalije), ki neposredno vplivajo tako na herbivora kot tudi na njegovega naravnega sovražnika. Nekatere od teh snovi nastanejo v poškodovanih kot tudi v nepoškodovanih rastlinah (Laznik in Trdan, 2016ab). Druge snovi se izločajo ob mehanskih poškodbah ali pa le ob prehranjevanju točno določene vrste herbivora (Laznik in Trdan, 2016ab). Danner in sod. (2015) so kot prvi poročali, da herbivorne

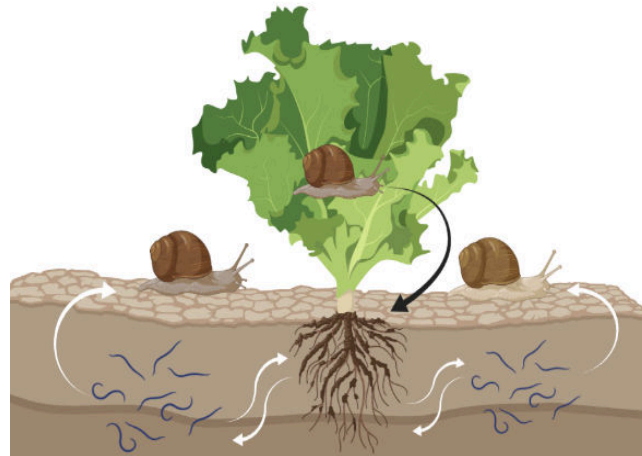
poškodbe nadzemskih delov rastlin vplivajo na izločanje HS v koreninskem delu. Hlapljive snovi, ki jih izločajo rastline lahko na koristne organizme delujejo tako privabilno kot tudi odvrčalno (Rasmann et al., 2005; Hallem et al. 2011; Laznik in Trdan, 2016ab). Herbivori imajo pomembno vlogo pri privabljanju naravnih sovražnikov, saj tudi sami oddajajo kemične signale, ki na naravne sovražnike delujejo kot kairomoni (Laznik in Trdan, 2016ab).

Raziskave hlapnih snovi, povezanih z biotičnim varstvom rastlin, so praktično nujno vezane na uporabo sodobne plinske kromatografije z masno spektrometrično detekcijo (GC-MS), saj je le s to tehniko možna detekcija in identifikacija snovi, prisotnih v majhnih množinah in koncentracijah (Rasmann et al., 2005). Zaradi kompleksne sestave preiskovanega materiala (rastlinsko tkivo, prst) in nizkih koncentracij preiskovanih snovi pa je tako rekoč nujna uporaba primernih vzorčevalnih tehnik iz plinske faze, pri analizi vzorcev z GC-MS, z namenom selektivne ekstrakcije/obogatitve vzorca s ciljnim analiti ter razpolaganjem s primernimi koncentracijami le-teh za analizo (Rasmann et al., 2005).

Večina induciranih odgovorov na biotski stres je sistemskih. Zaradi rastlinskih poškodb se v nadzemnih in podzemnih organih vzpodbudijo kvantitativne in kvalitativne spremembe v določenih metabolitih (Luna in sod., 2012; Gao in sod., 2015). Med številnimi obrambnimi odzivi sta pomembni sinteza antioksidantov in aktivacija antioksidativnih encimov, ki varujejo rastlino pred reaktivnimi kisikovimi spojinami (ROS). Centralno mesto v antioksidativnem sistemu predstavlja askorbatno-glutationski cikel (ASK/GSH), ki sodeluje pri vzpostavitvi celične redoks homeostaze in indukciji izražanja obrambnih genov povezanih z odgovorom na stres (Luna in sod., 2012; Gao in sod., 2015). Vloga ASK in GSH je v interakciji rastlin z rastlinojedimi žuželkami dobro znana (Luna in sod., 2012; Gao in sod., 2015), medtem ko je pomen askorbatno-glutationskega sistema v odzivu na napad polžev še neraziskan. Poleg tega je znanje o prostorski in časovni dinamiki obrambnega odziva na nivoju ASK/GSH med nadzemnimi deli in korenino ter nočno aktivnostjo polžev še neraziskano. Raziskave dokazujejo, da je v veliki meri odvisno od učinkovitosti fotosintezne fiksacije ogljika in deleža fotorespiracije, ki zagotavlja glicin potreben v sintezi GSH (Luna in sod., 2012; Gao in sod., 2015). V poskus bomo kot modelno rastlino vključili zelje. Med sekundarnimi žveplovimi spojinami imajo v križnicah pomembno vlogo glukozinolati. Pri poškodbi rastlinskih tkiv se glukozinolati encimatsko razgradijo z encimom mirozinaza pri čemer nastanejo različne biološko aktivne spojine. Glukozinolatio-mirozinazni sistem ima ključno vlogo pri interakcijah rastlina-škodljivcev oz. rastlina-patogen (Luna in sod., 2012; Gao in sod., 2015). V iztrebkih polžev, ki so se hranili z navadnim repnjakovcem, so znanstveniki dokazali specifične konjugate glukozinolatov, kar nakazuje, da polži glukozinolate aktivno razstrupljajo (Luna in sod., 2012; Gao in sod., 2015). Ti konjugati nastanejo z vezavo glutaciona na produkte hidrolize glukozinolatov v presnovni poti merkapturne kisline. Rezultati potrjujejo vpletenost glutaciona pri razstrupljanju izotiocijanatov ob poškodbah križnic zaradi napada polžev. V predlaganem projektu bo glutacion eden od označevalcev stresa ob napadu polžev. Pojem z žveplom inducirana odpornost (SIR, S- inducirana odpornost, sulphur induced resistance) označuje krepitev naravne odpornosti rastlin na

povzročitelje bolezni in škodljivcev s spodbujanjem presnovnih procesov, ki temeljijo na stimulaciji S-metabolizma preko ciljnega gnojenja s sulfati. SIR so na oljni ogrščici in ostalih rastlinah že proučevali v povezavi z glivnimi patogeni, vendar je mehanizem SIR še zmeraj precej nepojasnen. Znanstveniki domnevajo, da aplikacija sulfata vzpodbudi sintezo glukozinolatov in tiolov, ki so ključni dejavniki aktivacije SIR (Luna in sod., 2012; Gao in sod., 2015). Na podlagi teh ugotovitev se bomo v predlaganem projektu osredotočili na analizo glutationa, cisteina in askorbata kot ključnih komponent SIR in označevalcev biotskega stresa ob napadu polžev, s ciljem nadgradnje naših predhodnih temeljnih raziskav SIR in prenos le-teh iz laboratorija v prakso. Svetovni trg biotičnih pripravkov je bil leta 2013 ocenjen na okrog 1,8 milijarde \$, pričakuje pa se, da se bo do leta 2025 povečal na okrog 4,8 milijarde \$. Največji uporabnik biotičnih agensov so na svetovni ravni še vedno ZDA, vendar se pričakuje, da bo v prihodnjih letih najhitreje rastoči trg z biotičnimi agensi prav Evropa, ki s strogo zakonodajo, vezano na uporabo fitofarmaceutskih sredstev, načrtno pospešuje ekološko pridelavo živeža in krme. Uporaba limacidov predstavlja veliko tveganje za okolje (Wajnberg et al., 2001). Ena od aktivnih snovi v limacidih je tudi metaldehid, katerega koncentracije pogosto presegajo zakonsko mejo Evropske unije  $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$  (Direktiva 98/83/ES; ES, 1998) v površinski vodi (Wajnberg et al., 2001). Ker se metaldehid šteje za vse bolj zaskrbljujoče onesnaževalo, bo uporaba metaldehida na prostem v VB prepovedana od marca 2022 (DEFRA 2020).

561



Slika 1: Multitrofična komunikacija med rastlino, polži in parazitskimi ogorčicami polžev.

Vse več članic EU želi v prihodnjih letih slediti tem ukrepom, kar bo predstavljalo velik izziv za pridelovalce, kako uspešno zatirati polže v kmetijski pridelavi. Prav zato ukrepi vezani na biotično zatiranje škodljivih organizmov predstavljajo alternativo obstoječemu načinu zatiranja škodljivcev, ki temelji na uporabi kemičnih fitofarmaceutskih sredstev. Poznavanje komunikacije med rastlinami, herbivori in

njihovimi naravnimi sovražniki je ključnega pomena pri učinkovitejši implementaciji in optimizaciji biotičnega varstva v sisteme pridelave živeža. EU si je zastavila pet ambicioznih ciljev – na področju zaposlovanja, inovacij, izobraževanja, socialne vključenosti in podnebja/energije, ki naj bi jih dosegla v prihodnje. Trg z novimi, izboljšanimi biotičnimi pripravki bi pripomogel z varovanju okolja, kot tudi pri dvigu gospodarske dejavnosti.

V raziskavah želimo ugotoviti ali nadzemski deli rastlin solate (*Lactuca sativa*) in zelja (*Brassica oleracea* var. *capitata*), ki jih poškodujejo različne vrste polžev; španski lazar (*Arion vulgaris*) in mrežasti slinar (*Deroceras reticulatum*); inducirajo izločanje hlapljivih snovi v koreninskem sistemu, in kakšno vlogo imajo te snovi na usmerjenost gibanja parazitskih ogorčic polžev (*Phasmarhabditis hermaphrodita*, *P. papillosa*, *Oscheius myriophila*) (slika 1).

Projektno skupino sestavljajo tri domače organizacije: Biotehniška fakulteta (Oddelek za agronomijo), Kemijski inštitut Slovenije (KI) in Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru (FKBV).

## 2 Literatura

- Capinera J.L. 2001. Handbook of vegetable pests. Academic Press, London: 729 pp.
- Danner H., Brown P., Cator E.A., Harren F.J.M., van Dam N.M., Cristescu S.M. 2015. Aboveground and belowground herbivores synergistically induce volatile organic sulfur compound emissions from shoots but not from roots. *J Chem Ecol*, 631-640.
- Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA) (2020) Outdoor use of metaldehyde to be banned to protect wildlife. <https://www.gov.uk/government/news/outdoor-use-of-metaldehyde-to-be-banned-to-protect-wildlife>
- Gao Q-M, Zhu S, Kachroo P, Kachroo A (2015).. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Front Plant Sci*. 6: 228.
- Hallem EA, Dillman AR, Hong AV, Zhang Y, Yano JM, DeMarco SF, Sternberg PW (2011) A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. *Curr Biol* 21:377-383.
- Heinz K.M., Van Driesche R.G., Parrella M.P. 2004. BIO Control in protected culture. Ball Publishing, Batavia: 552 pp.
- Laznik Ž, Trdan S (2016a) Attraction behaviors of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to synthetic volatiles emitted by insect-damaged carrot roots. *J Pest Sci* [DOI 10.1007/s10340-015-0720-9]
- Laznik Ž, Trdan S 2016b. Attraction behaviours of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to synthetic volatiles emitted by insect damaged potato tubers. *Journal of Chemical Ecology*, 42: 314-322
- Laznik Ž, Majič I., Trdan S., Malan A. P., Pieterse A., Ross J. L. 2020. *Is Phasmarhabditis papillosa* (Nematoda: Rhabditidae) a possible biological control agent against the Spanish slug, *Arion vulgaris* (Gastropoda: Arionidae)? *Nematology*, 0: 1-9
- Laznik Ž., Trdan S., Tóth T., Ádám S., Lakatos T., Majič I. 2023. Discovery of *Oscheius myriophilus* (Nematoda: Rhabditidae) in Gastropods and Its Similar Virulence to *Phasmarhabditis papillosa* against *Arion vulgaris*, *Deroceras reticulatum*, and *Cernuella virgata*. *Agronomy*, 13, 5: 1386.
- Luna E, Bruce TJA, R. Roberts M, Flors V, Ton J (2012). Next-Generation Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol*. 158(2): 844–853.
- Rasmann S, Köllner TG, Degenhardt J, Hiltbold I, Toepfer S, Kuhlmann U, Gershenzon J, Turlings TCJ (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434:732-737.
- Wajnberg E., Scott J.K., Quimby P.C. 2001. Evaluating indirect ecological effects of biological control. CABI Publishing, London: 261 pp.