

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA



60/2 · 2019

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA

Ex: Razprave razreda za naravoslovne vede
Dissertationes classis IV (Historia naturalis)

60/2
2019

SLOVENSKA AKADEMIJA ZNANOSTI IN UMETNOSTI
ACADEMIA SCIENTIARUM ET ARTIUM SLOVENICA
Razred za naravoslovne vede – Classis IV: Historia naturalis



LJUBLJANA 2019

Uredniški odbor / *Editorial Board*

Matjaž Gogala, Špela Goričan, Ivan Kreft, Ljudevit Ilijanič (Hrvaška), Livio Poldini (Italija), Dragica Turnšek, Branko Vreš in Mitja Zupančič

Glavni in odgovorni urednik / *Editor*

Ivan Kreft

Tehnični urednik / *Technical Editor*

Janez Kikelj

Oblikovanje / *Design*

Milojka Žalik Huzjan

Prelom / *Layout*

Medija grafično oblikovanje

Sprejeto na seji razreda za naravoslovne vede SAZU dne 15. novembra 2018 in na seji predsedstva SAZU 5. februarja 2019.

Naslov Uredništva / *Editorial Office Address*

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA

SAZU

Novi trg 3, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

Faks / Fax: +386 (0)1 4253 423, E-pošta / E-mail: sazu@sazu.si; www.sazu.si

Avtorji v celoti odgovarjajo za vsebino in jezik prispevkov.

The authors are responsible for the content and for the language of their contributions.

Revija izhaja dvakrat do štirikrat letno / *The Journal is published two to four times annually*

Zamenjava / *Exchange*

Biblioteka SAZU, Novi trg 3, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

Faks / Fax: +386 (0)1 4253 462, E-pošta / E-mail: sazu-biblioteka@zrc-sazu.si

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA (Ex Razprave IV. razreda SAZU) je vključena v / *is included into*: Index to Scientific & Technical Proceedings (ISTP, Philadelphia) / Index to Social Sciences & Humanities Proceedings (ISSHP, Philadelphia) / *GeoRef Serials* / *BIOSIS Zoological Record* / *Internationale Bibliographie des Zeitschriften (IBZ)* / *Redaccion Homo* / *Colorado State University Libraries* / *CABI (Wallingford, Oxfordshire)*.

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA (Ex Razprave IV. razreda SAZU) izhaja s finančno pomočjo / *is published with the financial support* Javne agencije za raziskovalno dejavnost RS / *Slovenian Research Agency*.

© 2019, Slovenska akademija znanosti in umetnosti

Vse pravice pridržane. Noben del te izdaje ne sme biti reproduciran, shranjen ali prepisan v kateri koli obliki oz. na kateri koli način, bodisi elektronsko, mehansko, s fotokopiranjem, snemanjem ali kako drugače, brez predhodnega pisnega dovoljenja lastnikov avtorskih pravic. / *All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publisher.*

Naslovnica: Petrijevke, v katerih so v rastni komori preizkušali insekticidno delovanje lesnega pepela in zeolitov na koruznega žužka (foto: S. Trdan)

Cover photo: Petri dishes, in which the insecticidal efficacy of wood ashes and zeolites against the maize weevil was tested (Photo: S. Trdan)

VSEBINA CONTENTS

Ivan Kreft

- 5 Akademik prof. ddr. Jože Maček – devetdesetletnik

Stane Granda

- 7 Akademik prof. ddr. Jože Maček – devetdesetletnik

RAZPRAVE / ESSAYS

Anamarija Jagodič, Stanislav Trdan, Žiga Laznik

- 11 Multitrofične interakcije med rastlinami, talnimi škodljivimi žuželkami ter entomopatogenimi ogorčicami
11 Multitrophic interaction between plants, underground pests and entomopathogenic nematodes

Mario Lešnik

- 23 Koliko se lahko približamo željam javnosti za občutno zmanjšanje rabe pesticidov v kmetijski pridelavi in kakšne učinke prinaša uvajanje alternativnih pristopov zatiranja škodljivih organizmov?
23 How much closer can we get to the public's desire for a significant reduction in the use of pesticides in agricultural production and what are the effects of introducing alternative approaches to the control of organisms harmful to plants?

Uroš Žibrat, Matej Knapič & Gregor Urek

- 41 Plant pests and disease detection using optical sensors
41 Daljinsko zaznavanje rastlinskih boleznin in škodljivcev

Stanislav Trdan & Tanja Bohinc

- 53 12 let (2005-2017) raziskovalnega in strokovnega dela na področju zatiranja skladiščnih škodljivcev v Sloveniji
53 Twelve years (2005-2017) of scientific and professional work in the field of stored products pests protection in Slovenia

Eva Praprotnik, Mojca Narat, Jaka Razinger

- 71 Imunski sistem žuželk in njihov imunski odziv na entomopatogene glive
71 Insect immune system and their immune response to entomopathogenic fungi

Jožica Gričar

- 85 Značilnosti lesnih in floemskih prirastkov pri trepetliki (*Populus tremula* L.)
85 Characteristics of wood and phloem increments in eurasian aspen (*Populus tremula* L.)

AKADEMIK PROF. DDDR. JOŽE MAČEK – DEVETDESETLETNIK



Akademik prof. ddr. Jože Maček

Jože Maček je bil rojen 28. oktobra 1929 v Oleščah pri Laškem. Je doktor agronomskih (Bonn, 1964), ekonomskih (Beograd, 1976) in zgodovinskih (Ljubljana, 1989) znanosti. Bil je redni profesor za fitopatologijo, gozdno fitopatologijo in fitofarmakologijo na Agronomskem in Gozdarskem oddelku Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Leta 1959 je diplomiral na Agronomskem oddelku Biotehniške fakultete in istega leta postal asistent prav tam. Dobri dve leti (1961-64) je bil štipendist Ustanove Alexandra von Humboldta v Bonnu. Leta 1966 je postal vnaprej habilitiran docent. Pozneje, leta 1968, je diplomiral še na Ekonomski fakulteti Univerze v Ljubljani. Leta 1969 je postal docent, leta 1972 izredni in leta 1975 redni profesor ter predstojnik katedre oz. Inštituta za fitomedicino na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Leta 1997 se je upokojil.

Njegovo raziskovalno delo je potekalo na več področjih. Pričel je s preučevanjem mikofloristike, kjer je ugotovil za Slovenijo večje število novih vrst parazitskih gliv in gostiteljskih rastlin. Med bivanjem v tujini je preučeval biokemične odnose med gostiteljskimi rastlinami in paraziti z različnimi fiziološkimi parametri. Prvi je v te raziskave vključil tudi fakultativne parazite. Preučeval je primarni in sekundarni parazitizem. Na entomološkem področju je raziskoval hiponomološko favno Slovenije, ki je bila

dotlej skoraj povsem neznana. Ugotovil je za naše ozemlje blizu 800 novih vrst, nekaj pa je bilo novih tudi za južno in jugovzhodno Evropo. O tem je izdal dvojezično znanstveno monografijo. Na fitofarmakološkem področju je preučeval morebitne negativne vplive različnih herbicidnih substanc na talne mikroorganizme, ki v precejšnjem obsegu opredeljujejo ugodno strukturo tal in s tem tudi rodovitnost. Ugotovil je, da normalna kmetijska tla, v katerih je veliko mikroorganizmov, brez motenj prenesejo tudi pretirane odmerke. Veliko je raziskoval kontaminacijo kmetijskih pridelkov in tal z ostanki fitofarmacevtskih sredstev na ozemlju Slovenije.

Prvi je v tedanji Jugoslaviji uvedel ustrezen monitoring, ki ga je pozneje razvil v obsežno vsakoletno spremljanje kontaminacije kmetijskih pridelkov. Preučeval je ekonomiko varstva rastlin. Vzporedno s poglobitnim delom se je ukvarjal tudi z agrarno in cerkveno gospodarsko zgodovino. Objavil je več deset samostojnih znanstvenih, strokovnih in poljudnoznanstvenih publikacij ter 5 univerzitetnih učbenikov. Znanstvenih in strokovnih razprav je v domačih in tujih revijah objavil nad 350, krajših strokovnih in poljudnoznanstvenih sestavkov pa nad 3.000. Prevedel je več kot 20 strokovnih in 1 znanstveno knjigo. Izdelal je mnogo raziskovalnih poročil in ekspertiz. Bil je 25 let glavni urednik Zbornika Biotehniške fakultete (zdaj *Acta agriculturae Slovenica*). Je ali je bil član uredniških odborov v več domačih in tujih revijah. Bil je mentor 9 doktorandom, 14 magistrandom in 98 diplomantom univerzitetnega študija.

Predvsem je predaval aplikativne predmete, kar mu je omogočilo sodelovanje z gospodarskimi in podobnimi institucijami kot so npr. Gospodarska zbornica, Zvezno in republiško kmetijsko ministrstvo (današnje Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije), Urad za kemikalije idr.

Jože Maček je redni član Slovenske akademije znanosti in umetnosti (1995), za izrednega (dopisnega) člana pa je bil izvoljen že leta 1989, dopisni član Hrvaške akademije znanosti in umetnosti (1998), član Evropske akademije znanosti in umetnosti v Salzburgu (2003), dopisni član *Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft* v Bonnu (1999), član *Mediterranean Phytopathological Union* v Bariju ter član v več strokovnih društvih doma in v tujini. Za doktorsko disertacijo je prejel nagrado Univerze v Bonnu (1964). Za pomembne znanstvene dosežke je prejel nagrado Sklada Borisa Kidriča (1969) in za življenjsko znanstveno delo Zoisovo nagrado (2005). Za znanstveno in pedagoško delo je prejel Jesenkovo priznanje Biotehniške fakultete (1982). Za pomembno in zgledno sodelovanje je prejel nagrado Leka (1982). Odlikovan je bil z redom dela z zlatim vencem (1980). Leta 2002 je postal zaslužni profesor. Društvo za varstvo rastlin Slovenije ga je počastilo s častnim članstvom (2008). Za delo na področju cerkvene gospodarske zgodovine je dobil najvišje odličje sv. Cirila in Metoda, ki mu ga je podelila Slovenska škofovska konferenca (2008). Leta 2005 je postal častni član domače občine Laško. Prejel je še več drugih priznanj in nagrad.

Bibliografija do 2007 je objavljena v publikaciji *Bibliografija akademika zasl. prof. ddr. Jožeta Mačka 1948–2007 v Acta agriculturae Slovenica*, 89–2 (2007), 311–515.

Celotna fitomedicinska bibliografija akademika J. Mačka za obdobje 1984–2019 je objavljena v publikaciji: *FITOMEDICINSKA BIBLIOGRAFIJA akademika zasl. prof. ddr. Jožeta Mačka, 1984–2019, založnik Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, urednik prof. dr. Stanislav Trdan, 235 str., Ljubljana 2019*. Za zgodovinske objave pa *Zgodovinska bibliografija akad. zasl. prof. ddr. Jožeta Mačka, Založba Salve, Ljubljana 2019, 26. str.*

Za uredništvo I. Kreft

AKADEMIK PROF. DDDR. JOŽE MAČEK – DEVETDESETLETNIK

Ob življenju in delu akad. prof. dddr Jožeta Mačka se človek najprej vpraša, kaj je tega izjemnega moža »prineslo« v zgodovinsko znanost. Res je, da je zanimanje za preteklost lastnost vsakega normalnega človeka, zlasti izobraženca, toda postati ob izjemno mednarodno priznanem uspešnem delu na fitopatološkem in fitofarmakološkem področju vrhunski zgodovinar, pa je težko razumljivo in razložljivo.

Čas po II. svetovni vojni mu je onemogočil klasično akademsko izobrazbo. O klasični gimnaziji je lahko le sanjal. Ubirati je moral specifična pota preko trgovskega vajeništva, večerne gimnazije, srednje kmetijske šole v Mariboru in nato na agronomsko fakulteto ljubljanske univerze. Večino tega časa se je sam preživil in je študiral ob delu. Kot kmečki otrok je iskal svoj življenjski smisel v kmetijstvu. Mogoče zato, ker ga je tako opredelilo poreklo in otroštvo, mogoče tudi zato, ker so bile za ljudi njegovega kova določeni študiji preveč povezani s totalitarno ideologijo, vse bolj verjetno pa se nam dozdeva, da gre za logično pot na podlagi življenjske filozofije, ki bi jo skušali strniti v spoznanje, da mora človek gospodovati stvarstvu. To pa je možno edino v primeru če združimo odnos med človekom in naravo v uspešno razmerje med naravo in njenim izkoriščanjem, ki mora izhajati iz poznavanja in spoštovanja naravnih danosti, to je obdelovanja zemlje kot take in njegove ekono-

mike. Slednjo je možno oceniti iz razmerja med vloženim delom in dohodkom, dejanski napredek pa skozi daljši časovni lok, ki daje osnove za primerjave v času in prostoru. Ob tem se je treba soočiti z resnico, da človek ni samo biološko bitje, ampak tudi družbeno in je tako v zapletenem odnosu tako do narave kot soljudi oziroma oblasti. Domišljamo si, da Jože Maček, zvest svojemu poreklu in študiju, življenju in delu, pojmuje agrar kot gospodarsko dejavnost in način življenja, kot odnos do narave in odnose med v njem zaposlenimi ljudmi, kompleksno, kot doslej še nihče v slovenskem prostoru. Pri tem moramo še posebno izpostaviti, da je načela trajnostnega razvoja upošteval, ko se večini ni o njem pri danes politično dejavnih ekologih ni niti sanjalo. Dejansko imajo tudi nekatere njegove izrazito biološke razprave zgodovinski pridih. Kot primer naj navedemo Zgodovinski oris razvoja mikrocimetov v Sloveniji do druge svetovne vojne v Biološkem vestniku 1974. leta ali pa O pojavu pepelaste plesni (*Uncinula necator* / Schw./ Burr.) in peronospore (*Plasmopara viticola* /B. et C./ Berl. et de Toni) na vinski trti in njunem zatiranju v Sloveniji do leta 1941 (1979).

Zgodovinarji smo se osebno поблиže prvič srečali z Jožetom Mačkom verjetno leta 1975 na izjemnem zgodovinskem simpoziju ob 700 letnici Laškega. Dejansko se je agrarnozgodovinske in socialnoekonomske problematike našega

kmetijstva dotaknil že 1970. leta, ko je v Novi poti pisal o ekonomski in socialni problematiki zapuščanja podeželja. Prvo razpravo v strokovni zgodovinski reviji pa je objavil 1975. leta, ko je v Kroniki, časopisu za slovensko krajevno zgodovino, objavil Ustanovitev uprave državnih posestev na Kranjskem pod Leopoldom II. Domnevam, da ga je med nas fizično pripeljal njegov regionalni rojak in organizator znanstvenega srečanja, nepozabni pravnik in zgodovinar Miloš Rybář. Maček je obravnaval upore kmetov Jurkloštra zaradi relucije in abolicije tlake. Tematika ni bila povsem neznan, skoraj nič pa nismo vedeli o njenih realnih dimenzijah in ozadjih. Razpravo je objavil naslednje leto v Časopisu za zgodovino in narodopisje, ki je bil posvečen Laškemu. Zanimivo je, da je bila kasneje ta problematika tudi vsebina njegove zgodovinske disertacije. V tistih letih so bile obravnave kmečkih uporov zaradi znamenitih obletnic kmečkih uporov izrazito ideološka tema, ki se je končala v nesmiselno trditev, da je med njimi in NOB neposredna zveza, kar je bila takratnemu vodilnemu politiku in predvsem izjemno nestrpnemu ideologu Edvardu Kardelju posebej priljubljena teza. Jože Maček tej ideološki histeriji ni podlegel. To so bila tudi leta obračunavanja s tehnokratizmom in liberalizmom, skromnimi in plahimi razmisleki o nujnosti demokratizacije Slovenije in eventualni državni samostojnosti. Mačkov svež in predvsem popolnoma neideološki pristop k slovenski zgodovini je bil nedvomno politično pogumno dejanje, in tako je postal začetnik neke nove, neideološke smeri v slovenske zgodovino, posebej v agrarni zgodovini, ki jo je dokončno potrdil v monumentalnem delu o kranjskem verskem zakladu, problematiki, ki je bila po slovenski osamosvojitvi izrazito ideološko in kulturnobojno obravnavana. Številni zgodovinarji so na njej zgubili verodostojnost. Namesto na pravni osnovi, ki je za resno zgodovino edino možno, so se problema lotevali zgolj in samo ideološko. Poudarjeno upoštevanje ekonomskih in pravnih argumentov je ostalo trajna značilnost njegovega dela.

Uravnovesil je naravno in družbeno plat agrarne problematike, saj je zadnja dotlej močno prevladovala. V nekem smislu je pospešil evropeizacijo pomembnega dela slovenskega zgodovinarstva, ki kot celota še vedno boleha na za laseh privlečenih ideoloških momentih. Nedavna ponovna polemika v časnikih o naravi cerkvene gozdne posesti je pokazala, da zaslepljenim, četudi imajo akademske nazive, ni mogoče odpreti oči zgodovinske resnice. Do te se ni mogoče prikopat, če nam jo mimo zgodovinskih dejstev kroji ideologija.

Izpostaviti moramo še eno značilnost znanstvenega dela jublanta. Za nezgodovinarje je vir njihovega zgodovinskega znanja strokovna literatura. Naš jublant jo nedvomno vrhunsko pozna, kar potrjujejo tudi njegovi članki in razprave. Ni se zadovoljil z njo, ampak je bil prisiljen ubrati druga pota. Odločil se je za lastno temeljito raziskovalno delo v domačih in tujih arhivih. Prav neverjetno je, koliko ur je zmožni sedeti za težko berljivimi rokopisi različnih rokov, jih prebrati in iz njih izluščiti bistvo. Dvomim, da mu po prebitih urah v arhivih dela konkurenco več slovenskih zgodovinarjev kot je prstov na eni roki. Občudovali smo tudi njegovo duševno prožnost, saj je že zelo zgodaj, kljub letom, začel uporabljati prenosnik.

Desetletja v katerem je vstopal Jože Maček v slovensko historiografijo in agrarno zgodovino posebej, ni bilo enostavno. Na eni strani je bil to čas postkavčičevske ideološke ofenzive, na drugi strani pa je bilo tik pred koncem več desetletno sistematično delo na enciklopedični obravnavi slovenske gospodarske in gospodarske zgodovine, dvozvezkovni Zgodovini agrarnih panog. Prvi, izrazito agrarnotehnični del je izšel 1970. leta, drugi, ki je obravnaval družbena razmerja in gibanja pa 1980. Nedvomno je zadnji po zaslugi akad. prof. dr. Sergija Vilfana bistveno boljši. Iz prvega je razvidno, da je skoraj vse slonelo na ljudeh, ki so kmetijstvo poznali zgolj iz knjig, ki so v njem bolj videli podložniška razmerja, kot pa produkcijo hrane oziroma delo na zemlji. Med njimi ni bilo človeka, ki bi kmetijstvo po-

znal iz lastnih življenjskih izkušenj. Niso si znali zastaviti vrste strokovnih vprašanj o vrsti pridelkov in pasmah živine, ki jih danes več ni. Tudi socialne dimenzije agrarne problematike so za čas 20. stoletja preveč zanemarjene. Zamujena prilika, toda ne zgolj po zaslugi avtorjev. Dejstvo, da je eden takratnih in vse do nedavne smrti najbolj ideoloških zgodovinarjev preprečil podelitev najvišjega znanstvenega priznanja avtorjem, je več kot zgovorno. Tudi zato se agrarnih razmer po II. svetovni vojni niso dotaknili. Obžalovati moramo, da Jožeta Mačka niso odkrili in pritegnili kot sodelavca, saj bi bila monografija zlasti v prvem delu bistveno popolnejša.

Zgoraj navedena dejstva niso omajala načrtov Jožeta Mačka. Imel je srečo, da ni bil odvisen od razmerij v slovenski humanistiki in zgodovini-pisju posebej, ampak je našel znanstveni prostor in poslušal za temeljne probleme agrarne zgodovine na biotehnični fakulteti. Zato je bil dolgo časa med nekaterimi zgodovinarji, zlasti onih pri katerih se vse začne in konča z politično zgodovino, manj znan. Biotehniška fakulteta je s tem ne samo dokazala, da je vsaka stroka prvenstveno odgovorna za svojo preteklost, ampak jo je tudi najbolj sposobna strokovno, časovno in prostorsko ovrednotiti. Lepo je biti ljubitelj in spoštovalec agrarne zgodovine, vendar je treba agrar najprej poznati in razumeti. Jubilant je kot aktivni profesor tudi sicer razširil svoje delo tudi na nekatere študente in razpisal vrsto diplomskih nalog iz agrarne zgodovine, ki bi tudi Oddelku za zgodovino filozofske fakultete ljubljanske univerze bili v čast. Agrarnozgodovinske članke je začel objavljati tudi v vrsti agrarnih strokovnih revij in tako fizično razširil polje agrarne zgodovine.

Ker je agrarna zgodovina tako gospodarsko kot družbeno vprašanje, moramo obsežno znanstveno in strokovno delo, veliko ga je tudi v tujih jezikih, akad. dddr. Jožeta Mačka obravnavati po naslednjih vidikih: temeljne razprave in monografije, izdaje zgodovinskih virov, krajevna zgodovina, prevodi (in izdaje) tujih strokovnih del, knjižna poročila in ocene, poljubni strokov-

ni članki. Ker je njegova bibliografija ena najboljših, ki jih premorejo slovenski znanstveniki, bomo opozorili predvsem na vsebinske usmeritve, ne pa naštevati naslove del.

Pri temeljnih razpravah in monografijah gre najprej za serijo del o gospodarjenju z večjimi gozdnimi kompleksi na Slovenskem Štajerskem, ki so ga vedno posebno pritegovali. Lastnina gozdov je namreč temeljna značilnost slovenske veleposesti, hkrati pa prva, ki je začela načrtno uporabljati znanstvena in strokovna dognanja in tehnični napredek. Razmeroma veliko raziskovalne energije je posvetil tudi vinogradništvu. Zanimali so ga tudi modernizacijski in socialni procesi slovenskega kmetijstva predvsem od 18. – 20. stoletja. Spregledal tudi ni agrarne statistike.

Posebno skupino predstavljajo monografije kot ona iz agrarne zgodovine Na zemlji domači, ki jo je napisal za Mohorjevo družbo. Izšla je leta 2007. Njena vsebina posebno izstopa po opisih lokalne samouprave in podložniških obveznostih, ki jih slovenski zgodovinarji slabo poznajo. Kot konkreten primer naj navedemo »odmerjeno in neodmerjeno« tlako, ki dejansko pomeni določeno in nedoločeno, to je vrsto tlake in ne količino.

Metodološko bi ob prikazu obsežnega znanstvenega in strokovnega dela jubilanta kot zgodovinarja na prvem mestu morali omeniti objave virov. Gre predvsem za enkratno monumentalno serijo seznamov mašnih ustanov ljubljanske in lavantinske škofije od konca 18. stoletja oziroma Slomškove akcije sredi naslednjega do druge polovice 20. stoletja. Kaj podobnega po obsegu ni opravil še nihče izmed njegovih slovenskih zgodovinarskih kolegov. To bi bila naloga za znanstveni inštitut, tako pa je delo posameznika, ki je sam finaciral tako delo, kot prispeval k natisu. Ne poznamo niti evropsko primerljivega primera. Deset obsežnih knjig izpisov na več tisoč straneh (6521 strani) razgalja duhovno in mentalitetno kulturo naših prednikov na eni strani, na drugi pa njihove gmotne razmere in nenazadnje tudi obvladovanje manipu-

liranja z vrednostnimi papirji. Verjetno samo on in njegova družina vedo, kako je kaj takega zmožel v tako kratkem obdobju. Posebej bi izpostavili tudi prevod objave laškega urbarja.

Krajevna zgodovina je posebna profesorjeva ljubezen. Napisal je kar vrsto krajevnozgodovinskih monografij od rojstne šentrupertske fare preko Olimja in Jurkloštra do nekaterih naselij v Savinski dolini. Zelo ga privlači tudi tamkajšnja osrednja neagrarna naselbina Laško. Profesorju kot vrhunskemu znanstveniku ni nerodno pisati za nestrokovnjake in manj izobražene ljudi. Očitno se rad z njimi tudi sreča, saj je opravil po slovenskih krajih vrsto predavanj o krajevni problematiki. Vrsto krajevnozgodovinskih razprav je objavil tudi v osrednjih strokovnih revijah.

Vrhunsko znanje stare in sodobne nemščine jubilanant ni izkoristil ne samo pri raziskovalnem delu, ampak tudi prevajanju dokumentov, knjig kot na primer Josepha Hoeffnerja, Odnos Cerkve do srednjeevropskih kmečkih podložnikov v srednjem veku (2014) in objavljanju v nemškem jeziku. Ne gre samo za znanje, ki ga je pridobil v času nemške okupacije, ampak je v vseh pogledih izkoristil izkušnje, ki jih je pridobil kot Humboldov štipendist.

Akad. prof. ddr. Jože Maček ni samo dolgoletni funkcionar naše najstarejše knjižne založbe Mohorjeve družbe, ampak tudi stalni sodelavec koledarja, ene najbolj branih slovenskih knjig, kjer redno sodeluje z prikazi zgodovinskih oseb in pojavov. Za te članke je značilno, da zna najbolj zapleteno problematiko razložiti preprosto, vendar nikoli v škodo zgodovinske verodostojnosti. Kljub simpatijam do določenih oseb ali pojavov vedno ohranja do njih tudi kritično distanco, ki je značilna za vso njegovo znanstveno in strokovno delo. Osrednje slovenske zgodovinske revije sistematično zalaga tudi z knjižnimi poročili in strokovnimi ocenami, pa naj gre za tipično agrarnozgodovinsko problematiko, krajevno zgodovino kot je nekdanji svinčeni rudnik (Anton Seher: Zgodovina premogovnika Velenje) ali pa celo zapisi o usodi ameriških vojnih pilotov sestreljenih med II. svetovno vojno nad

Slovenijo (Marija Čmak. Junaki neba. Zavezniški piloti med 2. svetovno vojno v Sloveniji, 2015)

Jubilant je poleg študija agronomije opravil tudi študij ekonomije in doktoriral pri enem najuglednejših jugoslovanskih ekonomskih zgodovinarjev prof. Nikolu Vuču, ki ni skrival navdušenja nad svojim najboljšim doktorantom v vsej bogati akademski karieri. Zgodovine pa v nasprotju z ekonomijo ni študiral, lahko pa kljub temu zatrdimo, da sodi med vrhunske slovenske zgodovinarje. Svojo izjemno nadarjenost zanjo je dokazal predvsem z objavami, v posebnem spominu pa nam je ostal dogodek pri zagovoru njegovega tretjega doktorata. Akad. Sergij Vilfan kot eden od članov komisije je pred obrambo obiskal arhiv in iz nekega dokumenta izpisal neko formulacijo. To je prebral kandidatu ddr. Mačku in prosil za časovno opredelitev besedila. Jože Maček je kot iz topa izstrelil potrebna dejstva in eksaminator ni mogel skriti svojega čudenja. Akad. Vilfan mu je samo čestital in nehal spraševati.

Ob branju akademskega naziva Jožeta Mačka se številni ustavijo pri številu njegovih doktoratov. Čeprav je ta naziv iz dveh soglasnikov zgolj dokaz sposobnosti znanstvenega dela, moramo pri našem jubilanantu izpostaviti ne število doktoratov, ne opravljeno delo, ampak njegovo vrhunskost. On očitno nikoli ni delal zaradi pridobitve znanstvenih nazivov. Ti so kolateralni rezultati njegovega temeljnega znanstvenega dela. To je tisto, kar človeka pred njegovim obličjem in opusom dobesedno ohromi. Še v tekočem devetdesetem letu je njegova bibliografija obsežnejša in zahtevnejša kot nekaterih za vse življenje.

Spoštovani gospod akad. prof. ddr. Jože Maček: *»Hvala vam za vse, od temeljnih zgodovinskih odkritij, objav virov, številnih monografij, razprav in drugih objav, predvsem pa nedosegljiv vzor, kako je treba z delom in moralno služiti znanosti in narodu, vsemu kar nas osmišlja ter omogoča, da smo in bomo!«*

Stane Granda

MULTITROFIČNE INTERAKCIJE MED RASTLINAMI, TALNIMI ŠKODLJIVIMI ŽUŽELKAMI TER ENTOMOPATOGENIMI OGORČICAMI

MULTITROPHIC INTERACTION BETWEEN PLANTS, UNDERGROUND PESTS AND ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES

Anamarija JAGODIČ^{1,4}, Stanislav TRDAN^{1,3}, Žiga LAZNIK^{1,2}

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0055>

IZVLEČEK

Multitrofične interakcije med rastlinami, talnimi škodljivimi žuželkami ter entomopatogenimi ogorčicami

V kmetijskih ekosistemih lahko talni škodljivci povzročijo veliko gospodarsko škodo. Za njihovo zatiranje se največkrat uporabi kemična fitofarmacevtska sredstva, ki pa imajo lahko tudi negativne vplive na okolje. Raziskovalci zato preučujejo druge možnosti zatiranja tako nadzemskih kot tudi talnih škodljivih organizmov v kmetijstvu. Gibanje organizmov je povezano z zaznavanjem kemičnih dražljajev iz okolja. Študije so v zadnjih letih pokazale, da se proti kemičnim dražljajem lahko gibajo tudi naravni sovražniki škodljivcev (entomopatogene ogorčice). Govorimo o t.i. neposredni obrambi rastlin pred škodljivimi organizmi. Rastlina, ki jo je napadel herbivor, začne v okolico sproščati kemične signale, ki na naravne sovražnike povzročitelja delujejo privabilno. Doslej je bilo identificiranih le nekaj ključnih spojin, ki so odgovorne za posredovanje v tako imenovanih multitrofičnih interakcijah in le nekaj genov ter biokemičnih poti, ki so odgovorne za proizvodnjo hlapljivih organskih snovi (HOS). Mnoge spojine ostajajo še vedno neznane, toda identifikacija le-teh ima velik potencial za uporabo pri varstvu rastlin. Napredki v razumevanju rastlinskih emisij in njihove vloge pri signaliziranju predstavljajo enega izmed novih načinov manipulacije rastlinskih eksudatov, s katerimi bi izboljšali naravne obrambne lastnosti rastlin.

Ključne besede: entomopatogene ogorčice, talni škodljivci, HOS, neposredna rastlinska obramba

ABSTRACT

Multitrophic interaction between plants, underground pests and entomopathogenic nematodes

In agricultural ecosystems, soil pests can cause great economic damage. Pesticides are often used for their control, but they may also have negative effects on the environment. Researchers are therefore exploring other options for suppressing both above-ground and soil-dwelling organisms in agriculture. The movement of organisms is associated with the detection of chemical stimuli from the environment. Studies have shown in recent years that natural enemies (entomopathogenic nematodes) of pests can also move against chemical stimuli. The term is known as an indirect plant defense. The plant that has been attacked by the herbivor starts to release chemical signals to the environment, which act on the natural enemies of the pests. To date, only a few key compounds have been identified that are responsible for mediation in so-called multitrophic interactions and only a few genes and biochemical pathways that are responsible for the production of volatile organic compounds (VOCs). Many compounds remain unknown, but their identification has great potential for use in plant protection. Progress in understanding plant emissions and their role in signaling is one of the new ways to manipulate plant exudates to improve the natural defenses of plants.

Key words: entomopathogenic nematodes, soil-dwelling pests, VOCs, indirect plant defense

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo – Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia;

² e-mail: ziga.laznik@bf.uni-lj.si

³ e-mail: stane.trdan@bf.uni-lj.si

⁴ e-mail: anamarija.jagodic@gmail.com

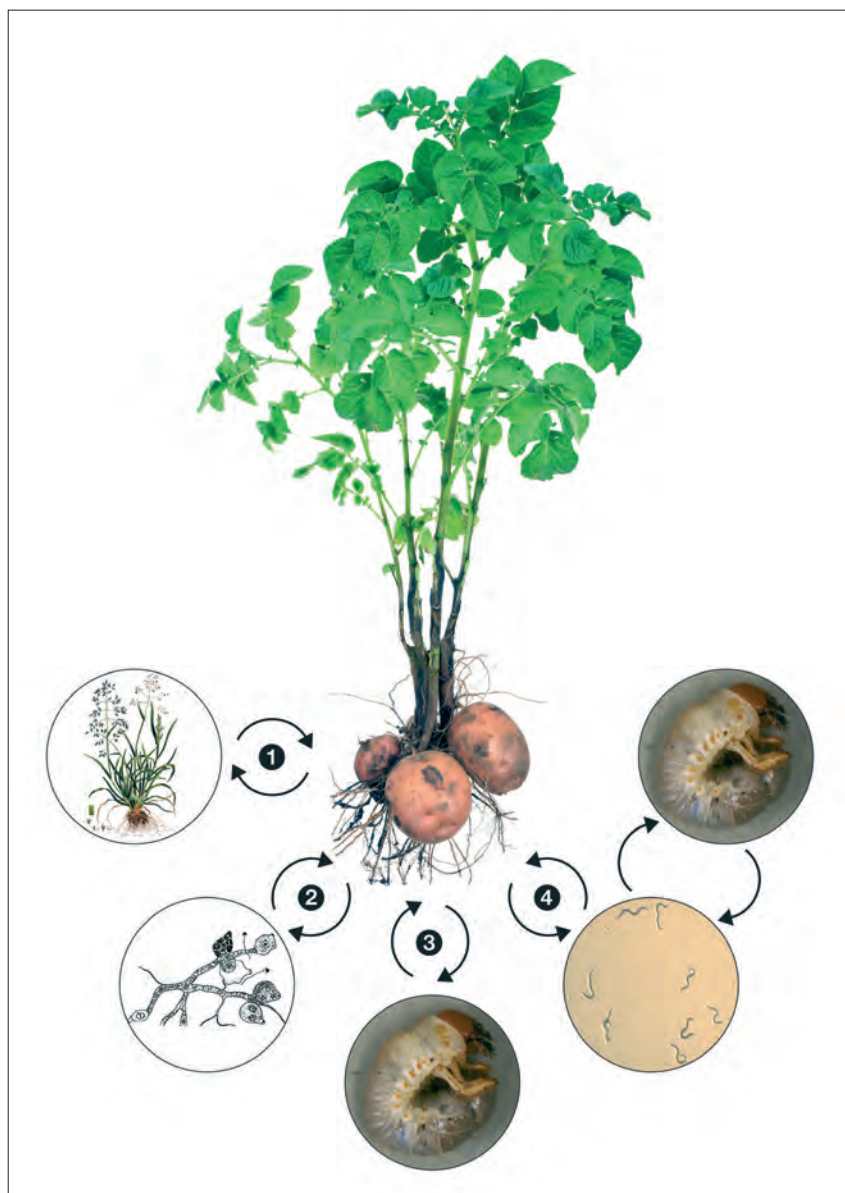
1 UVOD

Multitrofične interakcije, ki se nanašajo na varstvo rastlin pred herbivori opisujejo ekološke vplive treh ali več trofičnih ravni (slika 1). Te ravni zavzemajo rastlino, škodljive žuželke in naravne sovražnike škodljivih žuželk (HEIL & MARTIN, 2008). Predatorji, patogeni organizmi in parazitoidi, ki napadejo herbivore, imenovani tudi naravni sovražniki v kontekstu multitrofičnih interakcij, koristijo rastlinam tako, da odstranijo ali ovirajo prehranjevalne navade herbivorov. Znanstveniki menijo, da so se številne rastlinske lastnosti razvile kot odziv na vzajemnost (mutualističen odnos rastlina-naravni sovražnik), da bi postale privlačnejše za naravne sovražnike. Tak način rastlinske obrambe

uvrščamo med posredne obrambne mehanizme (HEIL & MARTIN, 2008).

Entomopatogene ogorčice (EO) so organizmi, ki se uporabljajo v programih biotičnega varstva rastlin. Uvrščamo jih med parazite žuželk (LAZNIK & TRDAN, 2011). Tla predstavljajo naravni habitat EO, ki so sistematično uvrščene v družini Steinernematidae in Heterorhabditidae. Žuželke parazitirajo samo infektivne ličinke (IL) EO (slika 2), ki v črevesnih veziklih nosijo simbiotske bakterije. EO simbiotskim bakterijam predstavljajo vektor, s pomočjo katerega vstopijo v gostiteljevo telo, pri čemer začnejo izločati toksine, zaradi katerih žuželka po 24 – 72 h pogine (LAZNIK & TRDAN, 2011). EO se pri gibanju v tleh orientirajo tako, da sledijo kemičnemu signalu (kemotaksija). S pomočjo kemotaksije zaznajo gostitelja v okolju, oz. zaznajo področje kjer je večja verjetnost, da se bo le-ta nahajal (LEWIS, 2002). Dosedanje raziskave so pokazale, da na gibanje EO v tleh vplivajo tudi drugi dejavniki (CO_2 , rastlinski izločki, pH, temperatura, električni potencial, HOS) (BURMAN & PYE, 1980; GREWAL et al., 1993; RASMANN et al., 2005; SHAPIRO-ILAN et al., 2012).

Rizosfera predstavlja tisti del tal, ki obdaja koreninski sistem rastlin. Tu se nahaja veliko število organizmov (WENKE et al., 2010). Raziskave so pokazale, da rastline v rizosfero izločajo številne organske snovi, ki jih uvrščamo med amino kisline, fenole, slad-



Slika 1: Vpliv hlapnih rastlinskih izločkov na talno bioto (Hiltpold in sod., 2011)

*Korenine rastlin izločajo različne vrste snovi v tla, ki omogočajo interakcije med rastlinami in drugimi organizmi (Flores in sod., 1999). HOS naj bi omogočale interakcije na nivoju rastlina-rastlina (slika 1/1), rastlina-mikrobi (slika 1/2), rastlina-škodljivec (slika 1/3) in rastlina-škodljivec-polenilec (slika 1/4).

korje, polisaharide, amide ter proteine višjih molekularski mas (WENKE et al., 2010). Znanstveniki so dokazali, da se lahko rastline z rastlinskimi izločki branijo pred napadi žuželk, bakterij in patogenimi glivami (BAIS et al., 2006; HILTPOLD et al., 2011). Rastline se pred napadom škodljivih organizmov branijo na različne načine, in sicer ločimo neposredne (direktne) in posredne (indirektne). Pri neposredni obrambi se lahko rastline branijo z morfološki lastnostmi (rast dlačic, trni) ter fiziološkimi lastnostmi (izločanje sekundarnih metabolitov). Pri posredni obrambi, gre za mehanizem, kjer rastlina izloča določene hlapljive organske komponente, ki lahko privabljajo ali odvrčajo naravne sovražnike rastlinskih škodljivcev (plenilske pršice, entomopatogene ogorčice). Hlapljive organske snovi (HOS) so li-

pofilne komponente z visokim parnim tlakom, ki se izločajo iz listov, cveta in plodov v ozračje ter v tla (DUDAREVA et al., 2006). HOS lahko izločajo poškodovane ali nepoškodovane rastline in jih uvrščamo med terpe- ne, benzoide, derivate maščobnih kislin, fenil propano- ide (BAIS et al., 2006). Izločanje HOS pa je odvisno od vrste poškodbe (mehanska, herbivorna), kot tudi od vrste škodljivca. Gosset in sodelavci (2009) so ugotovi- li, da rastlina, ki jo poškodujejo ličinke koloradskega hrošča, izloča druge snovi kot tiste, ki so jo napadle li- stne uši. Seveda pa imajo rastlinski izločki tudi druge učinke. Rastline lahko s koreninskimi izločki spodbu- jajo koristno simbiozo, uravnavajo mikrobiološke sku- pnosti, inhibirajo rast sosednjih rastlin in uravnavajo fizikalno-kemijske lastnosti tal (FLORES et al., 1999).

2 UPORABNA VREDNOST ENTOMOPATOGENIH OGORČIC V KMETIJSTVU

Ogorčice so valjasti črvi, ki jih uvrščamo v kraljestvo Animalia (živali) in deblo Nemata. Spadajo v razreda Adenophorea (podrazred Enoplia, Chromadoria) in Secernentea (podrazredi Rhabditia, Spiruria, Diplo- gasteria) (NGUYEN & HUNT, 2007). Vrsto najštevilč- nejše so fitoparazitske ogorčice (paraziti rastlin). Uvrščamo jih v več rodov (*Ditylenchus*, *Anguina*, *He-*

terodera, *Globodera*) (UREK & HRŽIČ, 1998). Znane so tudi ogorčice, ki parazitirajo žuželke. Govorimo o entomopatogenih ogorčicah (EO). Beseda je sesta- vljenka iz grških besed *entomon* (žuželka) in *pathos* (bolezen).

EO so učinkoviti agensi za zatiranje škodljivcev (KLEIN, 1990). Spekter uporabe EO je zelo širok, lahko



Slika 2: Infektivne ličinke entomopatogene ogorčice vrste *Heterorhabditis bacteriophora*

se jih uporablja za zatiranje škodljivcev brusnic, artičok, jablan, travne ruše in drugih gojenih rastlin (GAUGLER, 2002). Učinkovitost uporabe EO v primerjavi s kemičnimi sredstvi je manjša, vendar pri tem ne smemo zanemariti izredno pomembnega dejstva, da je pri uporabi biotičnih agensov stopnja tveganja za okolje manjša (EHLERS, 1998). Uporaba ogorčic je varna za uporabnika in do sedaj še ni bilo podatkov, ki bi poročali o škodljivosti EO in njihovih simbiotskih bakterijah za sesalce in rastline (BOEMARE et al., 1982; AKHURST & SMITH, 2002).

EO išče svojega gostitelja le v razvojni fazi IL. Vanj vstopi preko ustne in zadnjične odprtine, dihal, za vrste iz rodu *Heterorhabditis* pa je dokazano, da lahko v gostitelja vstopijo tudi preko njegove kutikule (GAUGLER, 2002). Iskanje gostitelja poteka s pomočjo kemo-taksije. Gre za zaznavanje kemičnih signalov v okolju. EO sledijo gradientu izločenega CO₂, temperaturi, električnemu polju, spremembi pH, rastlinskim izločkom in HOS (BURMAN & PYE, 1980; GREWAL et al., 1993; RASMANN et al., 2005; SHAPIRO-ILAN et al., 2012; LAZNIK & TRDAN, 2016).

3 IZLOČANJE HOS

Podobno kot ostale lastnosti rastlin, je tudi izločanje podzemnih HOS dedno pogojena lastnost. Raziskav na tem področju ni bilo veliko, zato ni neposrednih dokazov, ki bi kazali na to, da je naravna selekcija vplivala na izločanje HOS za namen obrambe (posredne in neposredne) pred herbivori (HILTPOLD et al., 2013). Nekateri avtorji vseeno navajajo, da je proizvodnja HOS dedna (ALI et al., 2010; HILTPOLD et al., 2013). Omenjeni avtorji so to dokazali na primeru citrusov in koruze. Pri koruzi tvorjenje E-β-kariofilena zmanjša napad škodljivcev in s tem tudi zmanjša količino uničenih

korenin (DEGENHARDT et al., 2009). Tako tuji kot tudi domači raziskovalci ugotavljajo, da je večina kultivarjev koruze, ki jih poznamo danes, zaradi križanj in drugih žlahtniteljskih postopkov izgubila sposobnost tvorbe tovrstnih signalnih alarmov (KÖLLNER et al., 2008; LAZNIK & TRDAN, 2011). Spet drugi avtorji navajajo, da talni organizmi močno vplivajo na nivo populacijske variabilnosti HOS (MARON & KAUFFMAN, 2006). Tako lahko večji napad talnih organizmov privede do povečanega izločanja bolj toksičnih HOS.

4 LABORATORIJSKE METODE ZA DOLOČANJE HOS

Koreninski izločki so največkrat omenjeni kot tekoči izcedki, ki se izcedijo iz vira. Lahko so tudi hlapni. Za analizo HOS se lahko kot posredno metodo uporabi SPME (*ang. solid phase microextraction*). SPME je metoda vzorčenja hlapnih komponent brez uporabe topila. Pri tej metodi se HOS vežejo na kondenzirana silicijeva vlakna od koder jih kasneje sprostimo in analiziramo s plinsko kromatografijo (GC-MS; *ang. Gas chromatography-mass spectrometry*). Za analizo se uporabijo zamrznjene korenine, ki so poškodovane zaradi napada škodljivcev. Te se nato zmelje v prah, ki je kasneje izpostavljen silicijevim vlaknom (RASMANN et al., 2005). Ta metoda je zelo učinkovita za analiziranje HOS, vendar je destruktivna saj zahteva drobljenje in mletje rastlinskega tkiva.

Obstajajo tudi druge nedestruktivne metode, kot je na primer dinamično vzorčenje s pomočjo adsorpcijskih pasti, pri čemer se hlapne komponente izločijo s pomočjo adsorbenta in topila. Adsorpcijske pasti so steklene cevke, ki vsebujejo adsorbent v obliki granul, ki se nahajajo na nerjaveči mreži s teflonskimi obroči. Adsorpcijske pasti se nato poveže z vakumsko črpalko, ki vleče zrak skozi steklene cevke. Ali in sod. (2010) so na ta način uspeli vzorčiti HOS »*in situ*«. Hlapne komponente, ki se ujamejo v adsorpcijskih pasti se nato izperejo s topilom. Slednja metoda je prav tako zelo učinkovita saj se jo lahko uporabi za ocenjevanje interakcij »*in situ*«.

5 PRIMERI KI DOKAZUJEJO DELOVANJE HOS NA EO

WANG IN GAUGLER (1998) sta bila med prvimi znanstveniki, ki sta dokazala, da HOS, ki jih izločajo korenine rastlin privabljajo EO. Ugotovila sta, da IL *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) in *Heterorhabditis bacteriophora* (POINAR, 1976), privabljajo hlapljive organske komponente, ki jih izločajo korenine trav. TOL in sodelavci (2001) so preučevali odzivnost EO *Heterorhabditis megidis* (POINAR, JACKSON & KLEIN, 1987) na izločke, ki jih izločajo poškodovane korenine iglavcev vrste (*Thuja occidentalis* L.), poškodbe so nastale zaradi ličink vrste *Otiorhynchus sulcatus* (FABRICIUS, 1775). Podobno raziskavo so naredili tudi BOFF in sodelavci (2001), ki so ugotovili, da EO *Heterorhabditis megidis* privabljajo izločki poškodovanih korenin jagod, zaradi prej navedenega škodljivca.

Slovenski raziskovalci so delovanje HOS na EO dokazali na primeru navadnega korenja (*Daucus carota* L.), ki je bil predhodno napaden s strunami (družina Elateridae). Ključna ugotovitev v njihovi raziskavi je bila ta, da nepoškodovane korenine korenja izločajo snovi, ki na EO delujejo repelentno. To pomeni, da rastlina odda preko kemičnega signala v okolje sporočilo, da je zdrava in ne potrebuje dodatne zaščite (LAZNIK & TRDAN, 2016a). Raziskave so nadaljevali tudi na primeru krompirja (*Solanum tuberosum* L.) (LAZNIK & TRDAN, 2016b), kjer so gomolje krompirja poškodovali ogrci gozdnega majskega hrošča (*Melolontha hippocastani*, FABRICIUS 1801). V raziskavo so vključili 7 HOS, ki jih izločajo poškodovani gomolji krompirja; oktanal, dekanal, undekan, nonanal, 6-metil-5-hepten-2-on, 1,2,4-trimetilbenzen ter 2-etil-1-heksanol. Rezultati raziskave so pokazali, da so EO sposobne razločevati med posameznimi HOS, ki jih izločajo poškodovani ali nepoškodovani gomolji krompirja. Rezultati raziskave so tudi pokazali, da je odziv EO na HOS vrstno pogojena lastnost, ki prevladuje nad strategijo iskanja gostitelja, ki so jo v evoluciji razvile EO (LAZNIK & TRDAN, 2016b).

Raziskave o učinkih glukozinolatov na gibanje EO so se lotili tudi Crespo in sodelavci (2012), ki so preučevali, izločke, ki so jih izločale poškodovane korenine črne gorjušice (*Brassica nigra* L.), zaradi ličink kapusove muhe (*Dellia radicum* L., 1758). Napadene korenine so izločale številne žveplove spojine ter glukozinolate. Dodatne raziskave so naredili tudi slovenski raziskovalci, kjer so preučevali učinke šestih HOS, ki jih izločajo poškodovane korenine črne gorjušice (*Brassica nigra* L.), zaradi kapusove muhe, na gibanje EO. Ugotovili so, da določeni glukozinolati ter žveplove spojine delujejo repelentno na določene vrste EO (JAGODIČ et al., 2017).

EO so se izkazale, kot učinkoviti biotični agensi pri zatiranju koruznega hrošča (*Diabrotica virgifera virgifera*, LECONTE, 1868), ki spada med pomembnejše škodljivce koruze. Prve raziskave z olfaktometri so pokazale, da poškodovane korenine koruze zaradi ličink koruznega hrošča bolj privabljajo EO *Heterorhabditis megidis*, kot pa korenine koruze, ki so bile mehansko poškodovane ali pa nepoškodovane (RASMANN et al., 2005). Razlika med nepoškodovanimi in poškodovanimi koreninami koruze zaradi ličink koruznega hrošča je bila v tem, da so slednje izločale terpen E- β -kariofilen, ki deluje kot atraktant na EO *H. megidis* (RASMANN et al., 2005). Vrednost njihove raziskave je toliko večja saj so pridobljene rezultate v laboratorijski raziskavi potrdili tudi s poskusi na prostem. Ugotovili so, da EO locirajo svojega gostitelja tudi na 50 cm oddaljenosti od rastline in s tem potrdili njihovo sposobnost lociranja gostiteljev na daljših razdaljah.

Raziskave na sirske svilnici (*Asclepias syriaca* L.) so pokazale, da zaradi napada talnega škodljivca *Tetraopes tetraophthalmus* (FORSTER, 1771) izločajo hlapljive organske komponente, ki privabljajo EO *Heterorhabditis bacteriophora* (RASMANN et al., 2011). Zaradi kompleksne sestave HOS, ki jih izloča sirska svilnica med napadom je težko oceniti katera sestavina konkretno privablja EO *H. bacteriophora*. Zato so v nadaljnjem poljskem poskusu ugotovili, da prej omenjena vrsta EO vpliva na preživetje ličink *T. tetraophthalmus*, kar posledično omogoči rastlini, da si povrne nadzemno biomaso (RASMANN et al., 2011). Ta poskus spada med prve demonstracije, ki dokazujejo, da naravni sovražniki herbivorov prispevajo, k pozitivni izbiri rastline za proizvodnjo signalov pri herbivoriji (hranjenje z rastlinskim materialom).

Ali in sodelavci (2010, 2011) so ugotovili, da določene vrste EO močno privlačijo izločki korenin citrusov, ki so poškodovane zaradi ličinke *Diaprepes abbreviatus* (L., 1758). Ugotovili so, da korenine citrusov izločajo enostavno mešanico terpenoidov, tovrstni obrambni mehanizem je lahko pri rastlini vzpostavljen konstitutivno ali pa se vzpostavi samo ob napadu, v obeh primerih izločki privabljajo EO (ALI et al., 2011). Ugotovili so tudi, da HOS, ki privabljajo EO lahko privabljajo tudi fitoparazitske ogorčice, kar lahko rastlini predstavlja veliko grožnjo. To je lahko tudi ena izmed razlag, zakaj večina preučevanih rastlin izloča HOS samo ob napadu. Edini kultivar citrusov, ki so jih preučevali Ali in sodelavci (2011), ki je izločal HOS konstitutivno je bil dokazano odporen na fitoparazitske ogorčice.

Hallem in sodelavci (2011) so testirali spekter različnih rastlinskih HOS, pri čemer so ugotovili, da privabljajo IL *H. bacteriophora* in *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955). Na podlagi teh raziskav je bilo ugotov-

vljeno, da imajo EO izredno dobro razvit kemosenzoričen aparat, ki je zelo dovzeten za zaznavanje rastlinskih komponent kar učinkovito uporabljajo pri lociranju primernih gostiteljev (RASMANN et al., 2012).

6 UPORABA HOS V KMETIJSTVU

EO imajo izjemen potencial za zatiranje različnih vrst talnih škodljivcev (TOEPFER et al., 2009). Dobro poznavanje hlapljivih organskih snovi, ki jih izločajo rastline bi lahko v prihodnje pripomoglo k izboljšanju zaščite kmetijsko pomembnih rastlin pred škodljivci, še posebej na področju varstva rastlin s pomočjo EO (DEGENHARDT et al., 2003; HILTPOLD & TURLINGS, 2012; PICKETT et al., 2006; TURLINGS & TON, 2006).

Za signale, ki jih oddajajo nadzemni deli rastlin, je bilo ugotovljeno, da se jih lahko izboljša oz. okrepi s pomočjo genske transformacije rastlin. To so dokazali tako v laboratoriju, kot v rastlinjakih, kjer so ugotovili, da tovrstna manipulacija izboljša privlačnost rastlin za plenilske pršice (KAPPERS et al., 2005) in parazitske ose (FONTANA et al., 2011; SCHNEE et al., 2006). Identifikacija terpena E- β -kariofilena, ki ga izločajo herbivorno poškodovane korenine koruze, je prinesla še eno odlično priložnost za preizkušanje tovrstnega pristopa varstva rastlin pred škodljivci. Znanstveniki so za poskus uporabili ameriške kultivarje koruze, ki so izgubili sposobnost sproščanja E- β -kariofilena (DEGEN et al., 2004; RASMANN et al., 2005; KÖLLNER et al., 2008), s čimer so lahko potrdili, da se lahko rastlinske signale, ki se izločajo pri herbivoriji, uporablja pri nadaljnjem varstvu rastlin pred škodljivci. Signalizacija pri koruzi je bila obnovljena v neproizvodni liniji s pomočjo genske transformacije gena za sintezo E- β -kariofilena, ki je bil identificiran v origanu (*Origanum vulgare* L.) (CROCOLL et al., 2010). Uspešna transformacija rastlin koruze je povzročila, da so rastline izločale seskviterpen v ekvivalentnih količinah, kot bi ga sicer izločale normalne rastline koruze pri napadu ličink koruznega hrošča. V nasprotju z netransformiranimi rastlinami koruze so transformirane rastline oddajale E- β -kariofilen konstitutivno ter sistemsko (sproščanje HOS od korenin do listov) (DEGENHARDT et al., 2009). Znanstveniki so nato izvedli zelo obširen poljski poskus pri katerem so ugotovili, da so transformirane rastline prejele veliko več EO-posredovane zaščite pred poškodbami korenin, ki jih povzročajo ličinke koruznega hrošča, kot netransformirane rastline (DEGENHARDT et al., 2009). Vendar pa je potrebno opozoriti, da konstitutivno sproščanje tovrstnih signalov, lahko negativno vpliva na uporabo v

kmetijstvu. Sproščanje HOS lahko v neposredno bližino tudi privablja škodljivce gospodarsko pomembnih poljščin ter je lahko tudi izredno energetska potratna, kar lahko vpliva tudi na kakovost in količino pridelka. Zato so znanstveniki predvideli izboljšanje postopka z vstavljanjem inducibilnega promotorja pred gen za sintezo E- β -kariofilena.

Poleg izboljšanja samega signala, pa je mogoče izboljšati tudi samo odzivnost EO na signale. Veliko številko IL, ki jih EO proizvajajo vsako generacijo ter kratek čas trajanja ene generacije so lastnosti, ki jih uvrščajo med idealne preučevalne subjekte za izboljšanje lociranja gostiteljev in same infektivnosti (GAUGLER et al., 1989; GAUGLER & CAMPBELL, 1991; GRIFFIN & DOWNES, 1994). Povečano odzivnost EO na rastlinske HOS so ponovno dokazali s pomočjo E- β -kariofilena (HILTPOLD et al., 2010a). Z uporabo olfaktometra in razpršilnikov so za povečano odzivnost na E- β -kariofilena (HILTPOLD et al., 2010a) izbirali IL *H. bacteriophora*. V nasprotju s *H. megidis*, se *H. bacteriophora* običajno ne odziva na to spojino (HILTPOLD et al., 2010c, RASMANN & TURLINGS, 2008), vendar je trajalo le šest generacij selekcije, da bi pridobili sev z visoko stopnjo odzivnosti (HILTPOLD et al. 2010a). V poljskem poskusu na Madžarskem je bil ta sev bolj učinkovit pri zatiranju ličink koruznega hrošča blizu koreninam koruze, ki so oddajale E- β -kariofilen, kot pa prvotni sev, vendar pa ni bilo opaziti razlike med sevi pri koruzi, ki ni oddajala E- β -kariofilen (HILTPOLD et al., 2010a), medtem ko je bila obstojnost obeh sevov enakovredna (HILTPOLD et al., 2010b). S poskusom so tudi dokazali, da odzivnost na E- β -kariofilen ni zelo specifična, saj se je izkazalo, da je izbrani sev pokazal odzivnost tudi na druga seskviterpena, kot je E- β -farnesen, vendar nekoliko manj na monoterpen α -pinen (HILTPOLD et al., 2010a). Ti podatki, skupaj s tistimi iz študije difuzije (HILTPOLD IN TURLINGS, 2008), kažejo, da privlačnost hlapnih rastlin ni specifična, temveč je odvisna tudi od tega kako se spojina razprši v tleh.

Znanstveniki so že ugotovili načine kako izboljšati rastlinsko signalizacijo in odzivnosti EO na te signale. Zagotovo pa ostaja ene izmed največjih ovir pri varstvu rastlin pred škodljivci z EO, težavna in delovno intenzivna aplikacija EO na terenu. Predvsem je ohr-

njanje velikega števila EO v tleh le redko uspešno (SHAPIRO-ILAN et al., 2006). Hiltbold in sodelavci so tako uvedli novo metodo uporabe EO, ki temelji na kapsulah, ki vsebujejo entomopatogene ogorčice. Natančna formulacija lupine kapsule omogoča nadzorovano sproščanje EO. Teoretično bi bilo mogoče sejaln-

ce prilagoditi tako, da se kapsule lahko vstavijo med setvijo v tla, kar nam prihrani na času in sami intenzivnosti dela ter prepreči večje izgube EO. Uporaba kapsul je lahko še posebej učinkovita, če vsebujejo atraktante in stimulative snovi, ki privabljajo škodljivce do samih kapsul.

7 POMISLEKI RABE HOS V KMETIJSTVU

Na prvi pogled se zdi, da uporaba HOS predstavlja obetavna orodja pri biotičnem varstvu rastlin pred škodljivci (KAPLAN, 2012a). Več znanstvenikov je poskušalo spremeniti rastline z gensko transformacijo, da bi le-te povečale svoj potencial za oddajanje HOS (BRILLADA et al., 2013). Vendar je tovrsten sistem v katerem se vedenje rastlin zavestno in uspešno uporablja v biotičnem varstvu rastlin veliko bolj kompleksne narave (KHAN et al., 1997; HASSANALI et al., 2008).

Eden izmed pomembnejših omejevalnih dejavnikov bi lahko bil, da posredna obramba rastlin z izločanjem HOS ne bi bila samo stvar žlahtniteljskih postopkov, kar bi lahko pogosto poslabšalo koristne interakcije rastlin s tretjo trofično stopnjo. Na primer, komercialne sorte bombaža (*Gossypium hirsutum* L.) sproščajo sedemkrat nižje skupne količine HOS kot pa njegove naravne linije (LOUGHRIN et al., 1995), prav tako severnoameriške sorte koruze ne sproščajo terpena E- β -kariofilena iz korenin, ki privablja EO (RASMANN et al., 2005). Ni velike verjetnosti, da so bile HOS zavestno izbrane pri žlahtnjenju rastlin, drži pa, da količine izločenih HOS niso bile zmanjšane v nekaterih kultivarjih *Brassica* in *Phaseolus* (BENREY et al., 1998) ter pri nekaterih kultivarjih koruze (GOUNGUENÉ et al., 2001).

Kmetijski ekosistemi so veliko bolj zapleteni od laboratorijskih postavitvev (KAPLAN, 2012a) in za zaščito rastlin pred škodljivci je treba storiti še veliko več raziskav, da bomo lahko v celoti razumeli delovanje tovrstnih sistemov. Katere so najpogostejše težave, s katerimi so se znanstveniki srečevali pri integraciji HOS v kmetijske namene? Ugotovili so da, povečana privlačnost parazitoidov na HOS ni povečala stopnje parazitizma herbivorov na poskusnem polju (VON MEREY et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Velikokrat se tudi zgodi, da parazitirani herbivori zrastejo večji in porabijo več kot neparazitirani (ALLEYNE & BECKAGE, 1997; HARVEY et al., 2010). Zavedati se moramo, da HOS predstavljajo informacije, ki so dostopne tudi drugim organizmom in jih lahko uporabljajo tudi herbivori in hiperparazitoidi za lociranje svojih gostiteljev. Tako so na primeru rastlin koruze, ki so jih predhodno tretirali s

hlapnimi komponentami opazili, da so se močnejše okužile z ličinkami koruznega hrošča in gosenicami *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797), zato so bile bolj poškodovane kot kontrolne rastline (MÉREY et al., 2011).

Znano je, da HOS predstavljajo zgolj informacijo, zato se lahko parazitoidi in plenilci hitro naučijo ali prilagodijo, da bi se izognili rastlinam, ki oddajajo HOS, ne da bi prenašali herbivore. Prav tako pa se je potrebno zavedati, da kmetijski ekosistemi preprosto niso vedno sposobni vzdrževati populacij koristnih členonožcev, ki bi bili potrebni za stabilno biotično varstvo škodljivcev. Nenazadnje pa bo potrebno veliko truda pri integraciji tovrstnih bioloških strategij, kajti le-te ne omogočajo 100% odstranitve škodljivcev iz sistema.

V težnji po razvoju učinkovite biološke strategije pri varstvu rastlin, bo potrebno razširiti perspektivo, kjer bi lahko več pozornosti namenili neposrednim učinkom HOS na škodljivce in patogene. Repelentnost je ena izmed pomembnejših komponent v primerih, kjer so bili HOS uspešno uporabljeni pri kmetijskih poskusih (HASSANALI et al., 2008; BRAASCH & KAPLAN, 2012; XIAO et al., 2012) vsekakor pa je več pozornosti potrebno nameniti tudi anti-mikrobnemu delovanju HOS. Divje rastline se pri obrambi pred škodljivimi organizmi ne zanašajo samo na eno obrambno strategijo, zato bi tudi biološko varstvo rastlin moralo slediti njihovemu vzorcu. Tako bi se lahko v bodoče v biotičnem varstvu rastlin poslužili tudi uporabe rastlin, ki izločajo nektar na drugih predelih kot je cvet (EFN; ang. extrafloral nectary), gre za posreden mehanizem obrambe, ki vključuje privabljanje os in mravelj, ki nadalje poskrbijo za odganjanje herbivorov (OLSON & WÄCKERS, 2007; GÉNEAU et al., 2012). Tako bi lahko sproščanje koristnih organizmov v kombinaciji z zasajanjem vrst, ki proizvajajo EFN, ustvarili zanimive možnosti v varstvu rastlin. V tem primeru bi EFN rastline zadrževale biotične agense na stabilnih ravneh populacije na posevku tudi med obdobji brez škodljivih organizmov, HOS pa bi jih vodile do rastlin, ki so napadene s strani herbivorov.

8 ZAKLJUČEK

Raziskovanja multitrofičnih interakcij s kemičnim posredovanjem drastično naraščajo in niso več omejena zgolj na interakcije med koreninami in mikrobnimi simbionti, vendar vključujejo tudi številne druge organizme v tleh. Narašča pa tudi število primerov, ki kažejo, da so koreninski izločki rastlin aktivni igralci v rizosferi in da lahko vplivajo na oblikovanje svojega rastnega okolja, s čimer zagotavljajo zaščito rastlini in optimizacijo njihove učinkovitosti. Dokazano je bilo, da kemično vplivajo na talne mikroorganizme ter talne koristne organizme, kot so entomopatogene ogorčice.

Primanjkuje nam predvsem dobrega razumevanja ko-evolucijske perspektive pri ekologiji rizosfere in talnih interakcijah. Dobro razumevanje teh procesov bi pripomoglo pri pristopih, ki ohranjajo dobro uvelja-

vljene koristne interakcije med domestikacijo in gojenjem gospodarsko pomembnih kultivarjev. Pomembno je predvsem poudariti, da bo potrebno pred dejansko aplikativno uporabo tehnik v varstvu rastlin, o katerih se razpravlja v tem članku, ovrednotiti kakšne so lahko posledice tovrstnih manipulacij. Dejstvo je, da lahko najdemo na stotine vrst mikroorganizmov le v peščici tal in spreminjanje le enega parametra lahko povzroči nepričakovane posledice v uveljavljenem ekosistemu in ogrozi stabilnost tal. Ker so tla kompleksen in heterogen ekosistem, zato aplikacije različnih strategij ni mogoče posplošiti in jih bo potrebno zelo natančno oceniti na različnih primerih. Tovrstno pridobljeno znanje bi nam moralo nadaljnje omogočiti optimalne trajnostne kmetijske prakse.

9 CONCLUSION

Research on multitrophic interactions with chemical mediation is drastically increasing and it is no longer limited to interactions between roots and microbial symbionts, but also includes many other organisms in the soil. There is also an increasing number of cases showing that plant root secretions are active players in the rhizosphere and that they can influence the formation of their growing environment, thereby protecting the plant and optimizing their effectiveness. It has been proven that they have a chemical effect on soil microorganisms and soil beneficial organisms, such as entomopathogenic nematodes.

In particular, we lack a good understanding of the co-evolutionary perspective in the ecology of rhizosphere and ground interactions. A good understanding

of these processes would contribute to approaches that maintain well-established beneficial interactions between domestication and the cultivation of economically important cultivars. It is important to emphasize that before the actual application of the plant protection techniques discussed in this article, it will be necessary to evaluate the consequences of such manipulations. The fact is that we can find hundreds of species of microorganisms only in a handful of soil and changing only one parameter can cause unexpected consequences in an established ecosystem and endanger the stability of the soil. Because soil is a complex and heterogeneous ecosystem, the applications of different strategies can not be generalized and will need to be very accurately assessed in different cases.

10 ZAHVALA

Prispevek je nastal v okviru predmeta Raziskovalno delo v varstvu rastlin.

11 LITERATURA-REFERENCES

- ALI J.G., ALBORN H.T. & L.L. STELINSKI, 2010: Subterranean herbivore-induced volatiles released by Citrus roots upon feeding by *Diaprepes abbreviatus* recruit entomopathogenic nematodes. *Journal of Chemical Ecology*, 36: 361-368. DOI: 10.1007/s10886-010-9773-7
- ALI J.G., ALBORN H.T. & L.L. STELINSKI, 2011: Constitutive and induced subterranean plant volatiles attract both entomopathogenic and plant parasitic nematodes. *Journal of Ecology*, 99: 26-35. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2010.01758.x

- AKHURST, R. & K. SMITH, 2002: Regulation and safety. In: R. Gaugler (ed.), entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Oxon, UK. pp.311-332.
- ALLEYNE M. & N.E. BECKAGE, 1997: Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *Journal of Insect Physiology*, 43: 407-424. DOI: 10.1016/S0022-1910(96)00086-8
- ARIMURA G., KÖPKE S., KUNERT M., VOLPE V., DAVID A. & P. BRAND P, 2008: Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves: IV. Diurnal and nocturnal damage differentially initiate plant volatile emissions. *Plant Physiology*, 146: 965-73. DOI: 10.1104/pp.107.111088
- BAIS H.P., WEIR T.L., PERRY L.G., GILROY S. & J.M. VIVANCO, 2006: The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 233-266. DOI:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- BENREY B., CALLEJAS A., RIOS L., OYAMA K. & R.F. DENNO, 1998: The effects of domestication of *Brassica* and *Phaseolus* on the interaction between phytophagous insects and parasitoids: *Biological Control*, 11:130-140. DOI: 10.1006/bcon.1997.0590
- BOEMARE, N.E., LAUMOND, C. & J. LUCIANI, 1982: Mise en évidence d'une toxicogenèse provoquée par le nematode entomophage *Neoplectana carpocapsae* Weiser chez l'insecte *Galleria mellonella* L. *Comptes Rendus des séances de l'Académie des Sciences, Paris, Ser. III*. 295, 543-546.
- BOFF M.I.C., ZON F.C. & P.H. SMITS, 2001: Orientation of Heterorhabditis megidis to insect hosts and plant roots in a Y-tube sand olfactometer. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98 (3):329-337. DOI: 10.1046/j.1570-7458.2001.00789.x
- BRAASCH J. & I. KAPLAN, 2012: Over what distance are plant volatiles bioactive? Estimating the spatial dimensions of attraction in an arthropod assemblage. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 145:115-123. DOI:10.1111/j.1570-7458.2012.01317.x
- BRILLASA C., NISHIHARA M., SHIMODA T., GARMS S., BOLAND W., MAFFEI M.E. & G. ARIMURA, 2013: Metabolic engineering of the C₁₆ homoterpene TMTT in *Lotus japonicus* through overexpression of (E,E)-geranylinalool synthase attracts generalist and specialist predators in different manners. *New Phytologist*, 200:1200-1211. DOI: 10.1111/nph.12442
- BRILLADA C., NISHIHARA M., SHIMODA T., GARMS S., BOLAND W., MAFFEI M.E. & G. ARIMURA, 2013: Metabolic engineering of the C₁₆ homoterpene TMTT in *Lotus* generalist and specialist predators in different manners. *New Phytologist* 200: 1200–1211. DOI: 10.1111/nph.12442
- BURMAN M. & A. PYE, 1980: *Neoplectana carpocapsae*: movement of nematode populations on thermal gradient. *Experimental Parasitology*, 49: 258-265. DOI: 10.1016/0014-4894(80)90122-8
- CRESPO, E., HORDIJK, C.A., DE GRAFF, R.M., SAMUDRALA, D., CRISTESCU, S.M., HARREN, F.J.M. & N.M. VAN DAM, 2012: On-line detection of root-induced volatiles in *Brassica nigra* plants infested with *Delia radicum* L. root fly larvae. *Phytochemistry*, 84: 68-77. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.08.013.
- CROCOLL C., ASBACH J., NOVAK J., GERSHENZON J. & J. DEGENHARDT, 2010: Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 73:587–603. DOI: 10.1007/s11103-010-9636-1
- DEGENHARDT J., GERSHENZON J., BALDWIN I.T. & A. KESSLER, 2003: Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. *Current Opinion in Biotechnology*, 14:169–176. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00025-9
- DEGENHARDT J., 2009: Indirect defense responses to herbivory in grasses. *Plant Physiology*, 149: 96-102. DOI: 10.1104/pp.108.128975
- DUDAREVA N., NEGTE F., NAGEGOWDA D.A. & I. ORLOVA, 2006: Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Science*, 25: 417-40. DOI: 10.1080/07352680600899973
- EHLERS, R.-U., 1998: Entomopathogenic nematodes – Save biocontrol agents for sustainable systems. *Phytoprotection*, 79: 94-102. DOI: 10.7202/706164ar
- FLORES H.E., VIVANCO J.M. & V.M. LOYOLA-VARGAS, 1999: 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in Plant Science*, 4: 220-226.
- FONTANA A., HELD M., FANTAYE C.A., TURLINGS, T.J.C., DEGENHARDT J. & J. GERSHENZON, 2011: Attractiveness of constitutive and herbivore-induced sesquiterpene blends of maize to the parasitic wasp *Cotesia marginiventris* (Cresson). *Journal of Chemical Ecology*, 37 (6): 582-591. DOI: 10.1016/S1360-1385(99)01411-9
- GAUGLER R., CAMPBELL J.F. & T.R. MCGUIRE, 1989: Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *Journal of*

- Invertebrate Pathology, 54(3): 363-372. DOI: 10.1016/0022-2011(89)90120-1
- GAUGLER R. & J.F. CAMPBELL, 1991: Selection for enhanced host-finding of scarab larvae (Coleoptera, Scarabaeidae) in an entomopathogenic nematode. *Environmental Entomology*, 20(2): 700–706. DOI: 10.1093/ee/20.2.700
- GAUGLER R., 2002: Entomopathogenic nematology. CABI Publishing, New Jersey: 373 str.
- GENEAU C.E., WÄCKERS F.L., LUKA H., DANIEL C. & O. BALMER, 2012: Selective flowers to enhance biological control of cabbage pests by parasitoids. *Basic and Applied Ecology*, 13: 85-93. DOI: 10.1016/j.baae.2011.10.005
- GRIFFIN C.T. & M.J. DOWNES, 1994: Selection of *Heterorhabditis* sp. for improved infectivity at low temperatures. In: Burnell AM, Ehlers RU, Masson JP (eds) Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes. European Commission Publication EUR 15681 EN, Luxembourg, pp 120-128
- GOSSET V., HARMEL N., GÖBEL C., FRANCIS F., HAUBRUGE E., WATHELET J.P., DU JARDIN P., FEUSSNER I. & M.L. FAUCONNIER, 2009: Attacks by piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1231-1240. DOI: 10.1093/jxb/erp015
- GOUINGUENE S., DEGEN T. & T.J.C. TURLINGS, 2001: Variability in herbivore-induced odour emissions among maize cultivars and their wild ancestors (teosinte). *Chemoecology*, 11: 9-16. DOI: 10.1007/PL00001832
- GREWAL P.S., GAUGLER R. & E.E. LEWIS, 1993: Host recognition behaviour by entomopathogenic nematodes during contact within insect gut contents. *Journal of Parasitology*, 79: 495-503. DOI: 10.1007/BF00987382.
- HALLEM E.A., DILLMAN A.R., HONG A.V., ZHANG Y.J., YANO J.M., DEMARCO S.F. & P.W. STERNBERG, 2011: A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. *Current Biology*, 21(5): 377–383. DOI: 10.1016/j.cub.2011.01.048
- HANLEY M.E., LAMONT B.B., FAIRBANKS M.M. & C.M. RAFFERTY, 2007: Plant structural traits and their role in antiherbivore defense. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 8: 157-79. DOI: 10.1016/j.ppees.2007.01.001
- HARE J.D., 2011: Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insect. *Annual Review of Entomology*, 56: 161-90. DOI: 10.1146/annurev-ento-120709-144753
- HARVEY J.A., SANO T. & T. TANAKA, 2010: Differential host growth regulation by the solitary endoparasitoid *Meteorus pulchicornis* in two hosts of greatly differing mass. *Journal of Insect Physiology*, 56: 1178-1183. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.03.018
- HASSANALI A., HERREN H., KHAN Z.R., PICKETT J.A. & C.M. WOODCOCK, 2008: Integrated pest management: the push-pull approach for controlling insect pest nad weeds of cereals, and its potential for other agricultural systems including animal husbandry. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 363: 611-621. DOI:10.1098/rstb.2007.2173
- HEIL, M., 2008: „Indirect defence via tritrophic interactions“. *New Phytologist*, 178(1): 41–61. DOI:10.1111/j.1469-8137.2007.02330.x
- HILTPOLD I., BARONI M., TOEPFER S., KUHLMANN U. & T.C.J. TURLINGS, 2010a: Selection of entomopathogenic nematodes for enhanced responsiveness to a volatile root signal helps to control a major root pest. *Journal of Experimental Biology*, 213(14): 2417–2423. DOI: 10.1242/jeb.041301.
- HILTPOLD I., BARONI M., TOEPFER S., KUHLMANN U. & T.C.J. TURLINGS, 2010b: Selective breeding of entomopathogenic nematodes for enhanced attraction to a root signal did not reduce their establishment or persistence after field release. *Plant Signaling and Behaviour*, 5(11): 1450–1452. DOI: 10.4161/psb.5.11.13363
- HILTPOLD I., TOEPFER S., KUHLMANN U. & T.C.J. TURLINGS, 2010c: How maize root volatiles influence the efficacy of entomopathogenic nematodes against the western corn rootworm? *Chemoecology*, 20(2): 155–162. DOI: 10.4161/psb.5.11.13363
- HILTPOLD I., ERB M., ROBERT C.A.M. & T.C.J. TURLINGS, 2011: Systemic root signalling in a belowground, volatile-mediated tritrophic interaction. *Plant Cell and Environment*, 34: 1267-1275. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02327.x.
- HILTPOLD I., BERNKLAU E., BJOSTAD L.B., ALVAREZ N., MILLER-STRUTTMANN N.E., LUNDGREN J.G. & B.E. HIBBARD, 2013: Nature, evolution and characterisation of rhizospheric chemical exudates affecting root herbivores. V: Behaviour and physiology of root herbivores. S.N. Johnson, I. Hiltbold and T.C.J. (ur.). New York, Academic Press: 97-157. DOI: 10.1016/B978-0-12-417165-7.00003-9
- HOWE G. A. & G. JANDER, 2008: Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 41-61. DOI:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825

- JAGODIČ, A., IPAVEC, N., TRDAN, S. & Ž. LAZNIK, 2017: Attraction behaviours: are synthetic volatiles, typically emitted by insect-damaged *Brassica nigra* roots, navigation signals for entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis*)? *BioControl* 62: 515-524. DOI: 10.1007/s10526-017-9796-x
- KAPLAN I., 2012a: Attracting carnivorous arthropods with plant volatiles: the future of biocontrol or playing with fire? *Biological Control*, 60: 77-89. DOI: 10.1007/s10526-017-9796-x
- KAPPERS I.F., AHRONI A., TWJM VAN HERPEN L.L.P., LUCKERHOFF M., DICKE & H.J. BOUWMEESTER, 2005: Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to *Arabidopsis*. *Science*, 309: 2070-2072. DOI:10.1126/science.1116232
- KHAN Z.R., AMPONGNYARKO K., CHILISWA P., HASSANALI A., KIMANI S., LWANDE W., OVERHOLT W.A., PICKETT J.A., SMART L.E. & L.J. WADHAMS, 1997: Intercropping increases parasitism of pests. *Nature*, 388: 631-632. DOI: 10.1038/41681
- KÖLLNER T.G., HELD M., LENK C., HILTPOLD I., TURLINGS T.J.C., GERSHENZON J. & J. DEGENHARDT, 2008: A maize (E)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell*, 20: 482-494. DOI: 10.1105/tpc.107.051672
- LAZNIK Ž. & TRDAN S., 2011: Entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) in Slovenia: from tabula rasa to implementation into crop production systems. V: *Insecticides – pest engineering*. Perveen F (ur.). Rijeka, InTech: 627-656. DOI: 10.5772/29540
- LAZNIK Ž. & TRDAN S., 2016a: *Attraction behaviors of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to synthetic volatiles emitted by insect damaged carrot roots*. *Journal of Pest Science*, 4:977-984. 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 DOI: 10.1007/s10886-016-0686-y
- LEWIS E.E., 2002: *Behavioural Ecology*. V: *Entomopathogenic Nematology*. Gaugler R. (ur.). Wallingford, UK, CABI Publishing: 205-223. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2005.11.007
- LOUGHRIN J., MANUKIAN A., HEATH R. & J. TURLINSON, 1995: Volatiles emitted by different cotton varieties damaged by feeding beet armyworm larvae. *Journal of Chemical ecology*, 21: 1217-1227. DOI: 10.1007/BF02228321
- MARON J.L. & M.J. KAUFFMAN, 2006: Habitat-specific impacts of multiple consumers on plant population dynamics. *Ecology*, 87: 113-124. DOI: 10.1890/05-0434
- NGUYEN K.B. & D.J. HUNT, 2007: *Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts*. *Nematology monographs and perspectives*: 816 str. DOI: 10.1163/156854108783900230
- OLSON D.M. & F.L. WÄCKERS, 2007: Management of fields margins to maximize multiple ecological services. *Journal of Applied Ecology*, 44: 13-21. DOI: 10.1111/j.1365-2664.2006.01241.x
- PICKET J.A., BRUCE T.J.A., CHAMBERLAIN K., HASSANALI A., KHAN Z.R., MATTHES M.C., NAPIER J.A., SMART L.E., WADHAMS L.J. & C.M. WOODCOCK, 2006: Plant volatiles yielding new ways to exploit plant defence. In: Dicke M., Takken W. (eds) *Chemical ecology: from gene to ecosystem*. Springer, Dordrecht.
- RASMANN S. & T.C.J. TURLINGS, 2008: First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. *Oikos*, 117: 362-369. DOI: 10.1111/j.2007.0030-1299.16204.x
- RASMANN S., KÖLLNER T.G., DEGENHARDT J., HILTPOLD I., TOEPFER S., KUHLMANN U., GERSHENZON J. & T.C.J. TURLINGS, 2005: Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, 434: 732-737. DOI:10.1038/nature03451
- RASMANN S., ERWIN A.C., HALITSCHKE R. & A.A. AGRAWAL, 2011: Direct and indirect root defences of milkweed (*Asclepias syriaca*): trophic cascades, trade-offs and novel methods for studying subterranean herbivory. *Journal of Ecology*, 99:16–25. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2010.01713.x
- RASMANN S., HILTPOLD I. & J. ALI, 2012: *The role of root-produced volatile secondary metabolites in mediating soil interactions*. V: *Advances in selected plant physiology aspects*. Montanaro, G., Cichio, B. (ur.). Rijeka, InTech: 269-290. DOI:10.1016/j.tim.2016.12.002
- SHAPIRO-ILAN D.I., GOUGE D.H., PIGGOTT S.J. & J.P. FIFE, 2006: Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control*, 38 (1): 124:133. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2005.09.005
- SHAPIRO-ILAN D., LEWIS E.E., CAMPBELL J.F. & D.B. KIM-SHAPIRO, 2012: *Directional movement of entomopathogenic nematodes in response to electrical field: effect of species, magnitude of voltage, and infective juvenile age*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109: 34-40. DOI: 10.1016/j.jip.2011.09.004

- SCHNEE C., KÖLLNER T.G., HELD M., TURLINGS T.J.C., GERSHENZON J. & J. DEGENHARDT, 2006: The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103: 1129-1134. DOI: 10.1073/pnas.0508027103
- TOEPFER S., HAYE T., ERLANDSON M., GOETTEL M., LUNDGREN J.G., KLEESPIES R.G., WEBER D.C., WALSH G.C., PETERS A., EHLERS R.U., STRASSER H., MOORE D., KELLER S., VIDAL S. & U. KUHLMANN, 2009: A review of the natural enemies of beetles in the subtribe Diabroticina (Coleoptera: Chrysomelidae): implications for sustainable pest management. *Biocontrol Science and Technology*, 19: 1-65. DOI: 10.1080/09583150802524727
- TURLINGS T.C.J., HILTPOLD I. & S. RASMANN, 2012: The importance of root-produced volatiles as foraging cues for entomopathogenic nematodes. *Plant Soil*, 359: 51-60. DOI:10.1007/s11104-012-1295-3
- TURLINGS T.C.J. & J. TON, 2006: Exploiting scents of distress: the prospect of manipulating herbivore-induced plant odours to enhance the control of agricultural pests. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4): 421-427. DOI: 10.1016/j.pbi.2006.05.010
- UREK G. & A. HRŽIČ, 1998: Ogorčice nevidni zajedavci rastlin: fitoentomologija. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 240 str.
- USHA RANI P. & Y. JYOTHSNA, 2010: Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 695-701. DOI : 10.1007/s11738-009-0449-2
- VERHAGE A., VAN WEES S.C.M. & C.M.J. PIETERSE, 2010: *Plant immunity: it is the hormones talking, but what do they say?* *Plant Physiology*, 154: 536-40. DOI: 10.1104/pp.110.161570
- VIEIRA C.R., BLASSIOLI MORAS M.C., BORGES M., SUJII E.R. & R.A. LAUMANN, 2013: *Cis-Jasmone indirect action on egg parasitoids (Hymenoptera: Scelionidae) and its application in biological control of soybean stink bugs (Hemiptera: Pentatomidae)*. *Biological Control*, 64: 75-82. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2012.10.004
- VON MEREY G., VEYRAT N., MAHUKU G., VALDEZ R.L., TURLINGS T.J.C. & M. D'ALESSANDRO, 2011: *Dispensing synthetic green leaf volatiles in maize fields increase the release of sesquiterpens by the plants, but has little effect on the attraction of best beneficial insect*. *Phytochemistry*, 72: 1838-1847. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.04.022
- VON MEREY G., VEYRAT N., MAHUKU G., VALDEZ R.L., TURLINGS T.J.C. & M. D'ALESSANDRO, 2012: *Minor effects of two elicitors of insect and pathogen resistance on volatile emissions and parasitism of Spodoptera frugiperda in Mexican maize fields*. *Biological Control*, 60: 7-15. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2011.09.010
- WANG Y. & R. GAUGLER, 1998: *Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese beetle larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72 (3): 313-318. DOI: 10.1006/jipa.1998.4805
- WAR A.R., PAULRAJ M.G., WAR M.Y. & S. IGNACHIMUTU S, 2011a: *Jasmonic acid-mediated induced resistance ground nut (Arachis hypogaea L.) against Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae)*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 30: 512-30. DOI: 10.1007/s00344-011-9213-0
- WAR A.R., PAULRAJ M.G., WAR M.Y. & S. IGNACHIMUTU S, 2011b: *Herbivore- and elicitor-induced resistance in ground nut to Asian armyworm, Spodoptera litura (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae)*. *Plant Signaling and Behav.*, 6: 1769-77. DOI: 10.4161/psb.6.11.17323
- WENKE K., KAI M. & B. PIECHULLA, 2010: Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta*, 231: 499-506. DOI: 10.1007/s00425-009-1076-2
- XIAO Y., WANG Q., ERB M., TURLINGS T.J.C., GE L., HU L., LI J., HAN X., ZHANG T. & J. LU, 2012: Specific herbivore-induced volatiles defend plants and determine insect community composition on the field. *Ecology Letters*, 15: 1130-1139. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2012.01835.x

Pregledni članek je nastal v času prejemanja štipendije Svetovnega laboratorija Svetovne federacije znanstvenikov.

KOLIKO SE LAHKO PRIBLIŽAMO ŽELJAM JAVNOSTI ZA OBČUTNO ZMANJŠANJE RABE PESTICIDOV V KMETIJSKI PRIDELAVI IN KAKŠNE UČINKE PRINAŠA UVAJANJE ALTERNATIVNIH PRISTOPOV ZATIRANJA ŠKODLJIVIH ORGANIZMOV?

HOW MUCH CLOSER CAN WE GET TO THE PUBLIC'S DESIRE FOR A SIGNIFICANT REDUCTION IN THE USE OF PESTICIDES IN AGRICULTURAL PRODUCTION AND WHAT ARE THE EFFECTS OF INTRODUCING ALTERNATIVE APPROACHES TO THE CONTROL OF ORGANISMS HARMFUL TO PLANTS?

Mario LEŠNIK¹

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0056>

IZVLEČEK

Koliko se lahko približamo željam javnosti za občutno zmanjšanje rabe pesticidov v kmetijski pridelavi in kakšne učinke prinaša uvajanje alternativnih pristopov zatiranja škodljivih organizmov?

V članku so predstavljene nekatere okoliščine odnosa javnosti do postopkov registracije in regulacije rabe fitofarmacevtskih sredstev (FFS) v EU, zahteve po zmanjšanju porabe FFS, možnosti za zmanjšanje porabe FFS in nekateri učinki uvajanja alternativnih metod zatiranja škodljivih organizmov. Znanstveni razvoj na področju varstva rastlin je zagotovil veliko novih sredstev in metod za nekemično zatiranje ŠO, vendar uporaba le teh trenutno ne omogoča popolnega prenehanja rabe kemičnih FFS. Ena od ovir za obsežno zmanjšanje rabe kemičnih FFS je manjša ekonomska učinkovitost zatiranja ŠO z uporabo alternativnih metod in sredstev ter premajhna prilagoditev kmetijskih ekosistemov za izvedbo metod biotičnega varstva (spremembe pri obdelavi tal, v kolobarju, pri gojenju dosevkov, vzdrževanju robnih habitatov).

Gljučne besede: pesticidi, hrana, varstvo rastlin, škodljivi organizmi, zatiranje

ABSTRACT

How much closer can we get to the public's desire for a significant reduction in the use of pesticides in agricultural production and what are the effects of introducing alternative approaches to the control of organisms harmful to plants?

The article presents some of the conditions of public attitudes to the procedures for registration and regulation of the use of plant protection products (PPP) in the EU, the requirements for reducing the use of PPP, the possibilities for reducing the consumption of PPP and some of the effects of introducing alternative methods of pest, weed and disease control. Scientific developments in the field of plant protection have provided many new means and methods for non-chemical pest control, but the use of these currently does not allow the complete abandonment of the use of chemical PPPs. One of the obstacles to the extensive reduction in the use of chemical PPPs is the lower economic efficiency of the control of pests using alternative methods and resources and the lack of adaptation of agricultural ecosystems for the implementation of biological protection methods (changes in soil cultivation, in crop rotation, in cultivation of cover crops and in the maintenance of habitats surrounding production plots).

Key words: pesticides, food, plant protection, plant pests, pest control

¹ Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede - Pivola 10, SI-2311 Hoče, Slovenija, e-mail: mario.lesnik@um.si

1 UVOD

Ostanki fitofarmaceutskih sredstev (FFS; angl. plant protection products PPP) v hrani in vodi ter učinki le teh na zdravje ljudi so ena od najbolj pogostih sociološko ekonomskih diskurzov v sodobni družbi EU (Evropske unije). FFS so sredstva s katerimi zatiramo za rastline škodljive organizme (ŠO). Delimo jih na klasična kemična sredstva (pesticidi) in sredstva, ki vsebujejo organizme ali izločke organizmov. Evropejci se počutijo zdravstveno ogroženi od ostankov FFS v hrani in v naravi ter zahtevajo občutno zmanjšanje rabe FFS v kmetijski pridelavi. Izvajajo se velike kampanje za podpro zmanjševanju rabe FFS in po zahtevah iz EU direktive 128/2009 EC se izdelujejo Nacionalni akcijski načrti (NAP) za zmanjšanje rabe FFS. Tudi v Sloveniji imamo takšen akcijski načrt (ANONYMOUS 2019a). Ustanove pristojne za registracijo FFS umikajo številna FFS iz trga, ker le ta ne izpolnjujejo več sodobnih humano- in eko-toksikoloških standardov. Pritisk novih bolezni in škodljivcev je vse večji in uspešnost zatiranja ŠO je zaradi zoženega izbora sredstev za zatiranje vse manjša. Število zemljanov se hitro povečuje in prav tako hitro izgubljammo rodovitna zemljišča, ki omogočajo pridelavo živeža. Takšne okoliščine kažejo, da lahko kmalu zaidemo v težave, tako pri preskrbi s hrano in vodo, kot tudi glede zagotavljanja okolja, ki omogoča trajno ohranjanje pestrosti življenja. Varstvo rastlin pred ŠO je eden od stebrov zagotavljanja blaginje in civilizacijskih dobrin. Znanstvene vede vključene v varstvo rastlin so pred velikim izzivom, kako preiti iz klasičnega kemičnega varstva v dobo alternativnega varstva, ki omogoča zatiranje ŠO brez obsežne uporabe škodljivih kemičnih snovi.

Namen tega prispevka je nekoliko osvetliti zapletena ekonomska, sociološka in strokovna ozadja glede transformacije varstva rastlin v EU v smeri občutnega zmanjšanja uporabe klasičnih kemičnih FFS (s tujko

pesticidov). Slovenijo lahko v pogledu razvitosti sistemov varstva rastlin štejemo med srednje razvite države, v pogledu sistema varovanja zdravja ljudi institucionalno gledano in »na papirju«, pa med najbolj razvite države sveta. V državnih strategijah za razvoj kmetijstva je izražena želja po spremembi kmetovanja v smeri zmanjšane rabe kemičnih snovi, a hkrati imamo zamude v praktičnem uvajanju novih pridelovalnih sistemov, tako po integriranem, kot po ekološkem konceptu. Zaostajamo tudi pri vlaganjih v razvoj alternativnih metod varstva rastlin pred ŠO.

Ker živila z ostanki FFS uživamo vsakodnevno lahko v telesnih tekočinah (npr. kri in urin) pri ključno izbranih ljudeh na ulici ali tistih, ki delajo v kmetijstvu, FFS izmerimo prav vsak dan (MURPHY et al. 1983; LATIF et al. 2012; BEVAN et al. 2017; SIERRA-DIAZ et al. 2019). Hkrati ne smemo prezrti dejstva, da se v našem telesu nahaja še veliko število drugih zdravju škodljivih snovi, kot so: težke kovine, mikotoksini, zdravila, industrijske kemikalije, konzervansi, barvila, aditivi, dioksini, trans maščobne kisline, akrilati, ftalati, perklorati, PCB, PAH in druge. Spremembe v varstvu rastlin v smeri naravi in človeku prijaznejših tehnik so v interesu večine ljudi. Za prehod v drugačne sisteme pridelovanja živeža so potrebni veliki premiki v delovanju družbe, ki jih na kratki rok težko naredimo. Ni težava zgolj v omejenem znanstveno tehnološkem napredku, temveč tudi v interesih kapitala in v vsakdanji politiki ozkih obzorij. Dogajanja v EU in politično strateški interesi držav in velikih korporacij so zelo zapleteni in hrana je velik strateški dejavniki v sferi mednarodne trgovine, mednarodnih odnosov in neodvisnosti držav. Eden od osnovnih atributov neodvisnosti je tudi sposobnost zagotavljanja lastne prehranske varnosti.

2 METODE DELA

Prispevek je pregledna razprava glede vzrokov za zahteve javnosti za občutno zmanjšanje rabe FFS (poglavje 3.2), možnosti za zmanjševanje porabe FFS in nekaterih posledic zmanjševanja porabe FFS v kmetijski pridelavi EU (poglavje 3.4). Je rezultat pregleda nekaterih virov literature, objav različnih institucij EU in izkušenj pridobljenih pri dolgotrajnem raziskovalnem delu povezanem s preučevanjem možnosti nadomeščanja klasičnih kemičnih FFS z drugimi sredstvi in metodami (biotičnimi, fizikalnimi,

mehanskimi, ...). Podan je socio-ekonomski in tehnični pogled na nekatera alternativna sredstva za spreminjanje tehnike izvedbe varstva rastlin pred škodljivimi organizmi v EU.

V razpravo smo vnesli tudi nekaj rezultatov iz domačih gospodarskih raziskav za razvoj 0-residue pridelave jabolk. 0-residue pridelava je koncept integrirane pridelave, kjer prvo polovico rastne dobe uporabljamo kemična sredstva, ki hitro razpadajo in drugo polovico rastne dobe ekološka sredstva (bakte-

rije, viruse, rastlinske izvlečke, kisle gline, eterična olja, ...). Takšen koncept varstva omogoči, da popolnoma kemično zatremo izhodiščne populacije ŠO, v drugem delu sezone pa lahko shajamo z bolj blagimi ekološkimi sredstvi. Tako pridelamo sadje z zelo nizkimi koncentracijami ostankov kemičnih snovi. V tej razpravi so prikazani podatki iz poskusa v sezoni 2018, kjer smo primerjali klasični kemični škropilni program (glej preglednico 3) in 0-residue program (glej preglednico 4). Poskus je bil izveden na različnih sortah jablan gojenih po gojitveni obliki vitko vreteno v povsem običajnem proizvodnem sadovnja-

ku. Imeli smo 3 ponovitve poskusnih parcelic. V času obiranja smo v 3 ponovitvah pobrali po 30 naključno izbranih plodov z vsake parcelice in jih poslali na analizo ostankov v laboratorij Institut dr. Wagner analitik v Lebringu (Avstrija). Laboratorij izvaja analize ostankov FFS po najvišjih obstoječi EU standardih z uporabo analitskih tehnik kot je tekočinska kromatografija (HPLC), plinska kromatografija (GC / μ ECD, FID, NPD) in masna spektrometrija (LC/MS/MS). LOD (meja detekcije) za večino aktivnih snovi FFS je bila vsaj 0,001 mg/kg in LOQ (meja kvantifikacije) 0,003 do 0,005 mg/kg.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Dejavniki porabe FFS in dejavniki količine ostankov FFS v živežu

Ostanki FFS v živežu so neizbežen rezultat kemičnega varstva rastlin pred ŠO. Trenutni sistemi pridelave hrene za pridelavo živeža po zmernih in širokim množicam dostopnih cenah temeljijo na veliki porabi FFS. Generator takšnega stanja je ekonomika, ki je bila zadnja tri desetletja na strani kemičnih metod zatiranja v primerjavi z drugimi metodami. Sodobne študije kažejo, da ni več povsem tako, če upoštevamo stroške sanacije ekosistemov in zdravja ljudi (GILL & GARG 2014). Pri uporabi FFS moramo natančno slediti navodilom uporabe. Sledenje navodilom (odmerek, čas in način nanosa) omogoča, da je ob spravi v živežu najmanjša možna količina ostankov, ki po razpoložljivih toksikoloških študijah ni nevarna za zdravje ljudi. Konkretna količina ostankov FFS na splošno v živežu je odvisna od mnogih dejavnikov, kot so: strokovnost dela uporabnikov, število nanosov FFS letno, izbrani pripravki, kakovosti naprav za nanos, pridelovalnega sistema, vremenskih dogajanj, lastnosti zemljišč in mnogih drugih. Vsebnost ostankov FFS v živežu med leti in sezonami zelo niha. V povprečju, zelo na splošno, za živež v EU lahko rečemo, da ima sadje in zelenjava navadno med 2 do 7 ostankov FFS na ravni med 10 in 70 % od legalno dovoljene količine. Približno 60 % vseh vzorcev živeža obravnavnega v EU monitoringu vsebuje enega ali več ostankov FFS. Približno 1,8 do 2,5 % od vseh vzorcev sadja in zelenjave po podatkih iz EU monitoringov, vsebuje višje koncentracije FFS, kot je dovoljeno (ANONYMOUS 2017a; 2018a). Slovenija v tem pogledu ne odstopa bistveno od EU povprečja.

3.2 Toksikološka znanost in sprejemanje EU sistema zagotavljanja varnosti hrane s strani laične javnosti

V EU imamo obsežno administracijo, ki skrbi za nadzor nad rabo FFS in nad stanjem ostankov FFS v živežu. Nekatere analize kažejo, da je zaupanje javnosti v EU v institucije, ki vodijo in nadzirajo uporabo FFS precej omajano (URL 2018; ANONYMOUS 2019a). Številni menijo, da se s FFS zastrupljamo prekomerno in da imamo veliko nekemičnih možnosti zatiranja ŠO. Pojasnjevanje toksikoloških vsebin vezanih na FFS javnosti ni preprosto. Vzroki za strah pred FFS so večplastni. Eden od vzrokov je, da imamo velik pluralizem medijev, ki pogosto objavljajo pol-resnice in mnenja nestrokovnjakov ali slavnih osebnosti, ki imajo velik vpliv na ljudi (ANONYMOUS 2019b). Argumentirane razumske strokovne razprave težko naredijo primerljiv vtis proti političnim populističnim izjavam. Predstavitev EU sistema registracije FFS je dostopna na spletni strani osnovnega EU organa EFSA (European food safety agency). Evropski sistem temelji na znanstvenih ocenah tveganj in številnih politično-pravnih konsenzih (ANONYMOUS 2019c). Ker institucije ljudi ne morejo povsem prepričati, da so obstoječe povprečne ravni ostankov v živilih ugotovljene z državnimi monitoringi povsem varne, zahtevajo spremembe v sistemu registracije FFS, večjo transparentnost postopkov, dostopnost do vseh toksikoloških dosjejev ter nadaljnje omejevanje rabe klasičnih kemičnih FFS (SASS & MAE WU 2013; LAANINEN 2018; ANONYMOUS 2019d; ANONYMOUS 2019e).

Pogosta kritika javnosti, da se v postopkih registracije FFS v toksikoloških študijah preverjajo le toksični učinki posamezne snovi in ne kombinacij različnih snovi je upravičena, saj živež pogosto vsebuje več ostan-

kov in ne le enega. Na trgu se najdejo vzorci, ki vsebujejo tudi 10 ostankov ali več. Z obstoječimi metodami preprosto ni možno preveriti učinkov sto tisočih različnih kombinacij snovi, ki vstopajo v naše telo. Torej obstoječi sistem toksikoloških testiranj morda ne zagotavlja popolne ocene zdravstvenih tveganj izpostavljenosti FFS. Nekateri na drugi strani poudarjajo, da imamo veliko dvojnih meril in da tako natančnih toksikoloških študij, kot jih naredimo pri FFS, ne naredimo pri zdravilih, industrijskih kemikalijah, prehranskih dodatkih, kontracepcijskih sredstvih, snoveh iz barvil, plastike in embalaže ter pri stotinah drugih kemikalij, ki vsakodnevno vstopajo v naše telo. Veliko nezaupanja se je razvilo tudi zaradi tega, ker večinski del dokumentacije za presojo tveganj FFS pred odobritvijo za registracijo na trgu EU izvira iz študij vodenih s strani kemične industrije in le manjši del iz neodvisnih študij registracijskih agencij. To dejstvo se je posebej pokazalo na primeru dogajanj pri predlogih za prepoved rabe snovi glifosat. Veliko različnih ustanov je podalo naspotujoča si mnenja glede rakotvornosti snovi glifosat. EFSA opravi presoje tveganja tudi na podlagi zaupanja do kemične industrije, da so podatki v dostavljenih dosjelih realni, žal pa zaradi omejenih sredstev premalo študij opravi sama. Tak sistem pri ljudeh vzbuja dvome o popolni objektivnosti toksikoloških ocen (LAANINEN 2015, 2018; ANONYMOUS 2019b). Zavedati se je potrebno, da imamo omejena obzorja glede možnih učinkov FFS v našem telesu. V akutni toksikologiji so učinki FFS dobro pojasnjeni, v kronični toksikologiji, glede dolgotrajne izpostavljenosti koktajlu velikega števila snovi, pri nizkih koncentracijah, pa ne. Čeprav pri klasičnih toksikoloških študijah ne vidimo okvar na celično tkivnem nivoju, pa so možne na fiziološkem nivoju koordinacije delovanja organov in imunskega sistema. Praktična težava toksikologije je pojasnitev tveganj zaradi dolgotrajnega uživanja izredno majhnih količin ostankov FFS. Pri empiričnih analizah posledic prehranske izpostavljenosti FFS pri ljudeh skozi analizo primerov bolezni v bolnišnicah in življenjskega sloga, poklica bolnikov ter modelnih transformacij škodljivih učinkov iz poskusnih živali na človeka, izredno težko razmejimo škodljive učinke FFS od učinkov drugih snovi in učinkov nezdravega življenjskega sloga (stres, pomanjkanje gibanja, premalo spanja, nesorazmerja v prehrani, ...). Pri poskusih na živalih redko simuliramo nezdrav življenjski slog, kot ga imamo sodobni ljudje. Tako so povezave med boleznimi sodobnega časa, npr. demence, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, bolezen imunskega sistema, bolezen obtočil in žlez z notranjim izločanjem in podobnimi, ter izpostavljenostjo pesticidom zelo nejasne. Morda so povezave vezane na rakotvornost še najbolj preučene.

V toksikologiji imamo več različnih mer s katerimi opredelimo toksikološke obremenitve izpostavljenih oseb. Takšne so na primer NOEL (angl. no effect level; odmerek brez merljivih učinkov), ADI (angl. acceptable daily intake; najvišji sprejemljivi dnevni vnos mg/kg telesne mase na dan) in ARFD (angl. acute reference dose; akutni referenčni enkratni odmerek mg/kg telesne mase na en vnos) (RENEWICK 2002). ADI teoretično poenostavljeno pomeni, da je to koncentracija ostankov FFS izražena na telesno maso v nekem živežu, ki jo lahko v telo vnašamo vso življenje brez posledic za zdravje. Iz ADI izpeljana mera je MRL (angl. maximum residue level, slo. največja dovoljena koncentracija ostankov v živežu). Za določitev ARFD se upoštevajo statistične prehranske košarice in značilnosti uživalcev nekega živeža. ARFD teoretično predstavlja količino FFS, ki jo lahko v hrani brez posledic zaužijemo v enem obroku. Mejne vrednosti teh parametrov za posamezne aktivne snovi FFS so dostopne na spletnih straneh EFSA (ANONYMOUS 2019f). Če ima potrošnik na voljo analizni izvid glede ostankov FFS v živežu lahko sam preveri, kolikšen del od pravno še dopustne koncentracije vsebuje njegov živež.

Praktična težava pri komuniciranju z javnostjo je opredelitev MRL, ki je mera s katero se srečujemo kmetijski strokovnjaki in potrošniki. Večina potrošnikov ne razume, kaj ta dogovorna meja še sprejemljivih ostankov v živežu pomeni. Običajna percepcija je, da je živež, kjer ostanki presežejo vrednost MRL škodljiv za zdravje. Nekateri MRL obravnavajo zgolj kot regulatorno mejo za nadziranje kakovosti dela pridelovalcev uporabnikov FFS. Če so presežene vrednosti MRL to kaže na nestrokovno delo uporabnikov FFS, neposredno povezovanje z zdravstvenimi učinki pa ni možno, če ni linearne povezave med MRL in ADI. Za oceno zdravstvenega tveganja je konkretno preseženo koncentracijo potrebno primerjati z vrednostjo ADI in drugimi kazalci izpostavljenosti in tveganj. Pomembno je razumeti, da tudi pri uživanju hrane z ostanki, ki občutno presegajo vrednost MRL naše zdravje ni ogroženo, če je ugotovljena koncentracija še vedno daleč v stran od vrednosti ADI. Pri določitvi MRL so upoštevani veliki varnostni faktorji do ADI koncentracij, ki so bile ugotovljene kot škodljive na testnih živalih (ANONYMOUS 2016). Pogosto so upoštevane tudi meje analitske natančnosti naprav v laboratorijih in se vrednosti MRL gibljejo na spodnjih še sprejemljivih mejah natančnosti analitskih postopkov.

Težava je nesorazmeren razvoj kemijskih analitskih postopkov in metod ocene toksikoloških tveganj. Sodobne analitske metode lahko ponudijo analize na tako nizkih nivojih (npr. 0,0001 mg/kg za živež ali 0,01 µg/L za vodo), da jih z razpoložljivimi toksikološkimi

metodami preprosto ni možno interpretirati. Lahko se le reče, da kronična izpostavljenost tako nizkim koncentracijami ne more imeti škodljivih učinkov za zdravje po sedaj razpoložljivem vedenju toksikološke znanosti. Če se spustimo na tako nizek nivo analitike praktično skoraj vsi vzorci živeža iz integrirane ali ekološke pridelave vsebujejo FFS (splošni globalni drift). Mnogi trdijo, da to, da z obstoječimi metodami škodljivih učinkov ne moremo dokazati ne pomeni, da jih ni. Veliko je skeptikov, ki dvomijo, da sprejemljivost hrane za uživanje lahko opredelijo parametri kot sta MRL in ARFD, še posebej, ker so odzivi odgovornih organov v različnih EU državah različni (ANONYMOUS 2015). Za praktično ilustracijo zapletenosti pojasnil pri komuniciranju glede ostankov FFS v živežu dajemo primer treh vzorcev jabolk, ki vsebujejo ostanke FFS in so vsi legalni – primerni za trženje (glej preglednico 1).

Za analitski postopek v akreditiranih laboratorijih so za vsako aktivno snov FFS v EU določene meje LOD (meja detekcije ko naprave določijo vrsto aktivne snovi a ne morejo zanesljivo določiti koncentracije),

LOQ (meja kvantifikacije, ko naprave lahko zanesljivo določijo koncentracijo aktivne snovi s še sprejemljivo merilno negotovostjo), LOR (meja poročanja; oblika zapisa vrednosti pri analitskem poročilu za komunikacijo z javnostjo in regulatornimi organi) in dovoljena analitska napaka – merilna negotovost (30 – 50 %). Tako lahko na primer imamo za neko aktivno snov pri dobri analitski opremi LOD 0,0001 mg/kg, LOQ znaša 0,005 mg/kg in LOR znaša 0,01 mg/kg z napako 30 %. Nadzorna telesa po različnih državah različno obravnavajo analitske izvide laboratorijev. Tako bi na primer za AS z določeno koncentracijo 0,007 mg/kg ponekod analitski izvid zapisali kot <0,01 mg/kg, ponekod pa bi navedli konkretno vrednost 0,007 mg/kg. Trženje živeža, ki ima ostanke FFS nad nivojem MRL ni dovoljeno in mora biti sankcionirano. Trženje živil, kjer so koncentracije daleč nad ARFD je neenotno obravnavano, ker vrednost ARFD ni pravna kategorija za odobritev ali prepoved trženja. To izpostavlja tudi EU analiza različnih praks obravnave analitskih izvidov laboratorijev (ANONYMOUS 2015).

Preglednica 1: Primer rezultatov analiz treh vzorcev jabolk pridobljenih v raziskavah s strani avtorja v Sloveniji. LOD metode je bil 0,001 mg/kg in LOQ 0,005 mg/kg.

Table 1: An example of the results of analyzes of three samples of apples obtained during research by the author in Slovenia. LOD of method was 0.001 mg/kg and LOQ 0.005 mg/kg.

Vzorec: Sample:	Aktivna snov: Active substance:	Koncentracija: Concentration: mg/kg	MRL mg/kg	ARFD mg/kg/bw	% MRL	% ARFD
Integrirana 1	Captan	0,40	10,00	0,30	4,00 %	1,70 %
	Spirotetramat	0,032	1,00	1,00	3,20 %	4,55 %
	Dithianon	0,018	3,00	0,12	0,60 %	1,23 %
	Phosmet	0,35	0,50	0,045	7,00 %	6,37 %
	Tebuconazol	0,024	0,50	0,03	8,28 %	6,60 %
	Fluopyram	0,006	0,60	0,50	1,00 %	0,10 %
	Trifloxystrobin	0,008	0,70	0,50	1,14 %	0,13 %
	Chloranthraniliprole	0,009	0,50	X	1,80 %	X
Integrirana 2	Pirimicarb	0,100	0,50	0,10	10,00 %	17,8 %
	Captan	7	10,00	0,3	70 %	>100 %
	Thiacloprid	0,004	0,30	0,03	1,33 %	1,10 %
	Tebuconazol	0,008	0,50	0,03	2,67 %	2,20 %
Ekološka 3	Dithianon	0,034	3,00	0,12	1,13 %	2,33 %
	Captan	0,002	10,00	0,3	0,02 %	0,005 %
	Dithianon	0,001	3,00	0,12	0,032 %	0,07 %

X - ARFD za te aktivne snovi še ni določen (The ARFD for these active substances has not yet been determined).

Vzorec integrirana 1 iz preglednice 1 prikazuje realen vzorec jabolk iz sezone 2018, kjer so izvedli veliko nanosov FFS in so pridelali jabolka z 9 ostanki FFS, vendar so vsi ostanki pod mejo MRL. Prodaja takšnih jabolk je povsem legalna. V toksikoloških študijah za

registracijo FFS ne analizirajo vseh različnih možnih mešanic aktivnih snovi FFS. Po modelih iz toksikoloških študij upamo, da tudi takšen koktajl 9 snovi še vedno ni nevaren za zdravje ljudi. Po internih podatkih iz monitoringa trgovskih verig iz tujine je v neka-

terih letih pri nekaterih vrstah sadja tudi 15 % vzorcev takšnih, da živež vsebuje več kot 8 ostankov FFS in da vsaj 30 % vzorcev vsebuje več kot 5 aktivnih snovi (osebno podani podatki od trgovskih podjetij).

Vzorec integrirana 2 ilustrira običajen primer, jabolko s 4 ostanki, kjer so trije ostanki na nivoju daleč pod 33 % MRL, in eden na nivoju 70 % MRL. Pri običajnem analitskem izvidu, na primer za inšpekcijo, bi večina laboratorijev zapisala da vzorec 2 vsebuje 2 ostanka FFS (kaptan in ditianon) in ne 4 ostanke in, da je vzorec legalen za prodajo, kljub temu da občutno presega ARFD pri snovi kaptan. Enako bi interpretirali tudi v običajni trgovski verigi s tem, da številne trgovske verige teh jabolk nebi sprejele, ker je ena snov na nivoju 70 % MRL in nad 100 % ARFD.

Vzorec 3, iz ekološke pridelave, ilustrira drug zapleten a sicer običajen primer in se dotika tako imenovane »pravne ničle«, oziroma načina poročanja o ugotovljenih ostankih, ki so na zelo nizkem koncentracijskem nivoju. V akreditiranih EU laboratorijih morajo delati po predpisanih analitskih protokolih in tudi rezultate analiz morajo podajati po protokolih. Glede podajanja rezultatov analiz obstajajo navodila kot je dokument EU SANTE/11813/2017 (ANONYMOUS 2017b). Pri vzorcu 3 gre za vprašanje načina ukrepanja ustreznih organov glede na pravne standarde za ekološko sadje. Pri vzorcu 3 imamo ekološko jabolko iz sadovnjaka, ki se nahaja v bližini integriranega sadovnjaka in je prišlo do pojavov zanašanja. Koncentracije obeh snovi so na nivoju pod MRL, pod LOQ a nad LOD kakovostnih analitskih postopkov. Če so analitske napake večje od 50 %, potem je na zelo nizkih ravneh koncentracij pravno nesprejemljivo sankcioniranje ponudnika živeža, čeprav analiza pokaže, da ekološki produkt vsebuje FFS. To je velika težava pri interpretaciji rezultatov potrošniku, kjer mu lahko rezultat podamo kot $< 0,01$ mg/kg, a ga to ne pomiri, ker nismo zapisali, da je živež prost ostankov FFS, še posebej, če gre za živež iz ekološke pridelave, kjer potrošnik pričakuje, da ne vsebuje nobenih ostankov FFS. Običajno potrošnike zanima samo odgovor vsebuje ali ne vsebuje FFS. Pri pojasnilih, da ne vsebuje ostankov na primer nad mejo $0,005$ mg/kg se običajno zatakne, ker potrošniki nimajo predstave, kaj zanje pomeni izpostavljenost na tako nizkih nivojih.

Opređeljene meje LOQ so tudi pomembne za poročila državnih in EU monitoringov, kjer so običajne statistične izjave, da je nek delež vzorcev bil opredeljen kot prost – brez ostankov FFS. Včasih ni jasno opredeljeno, ali je v poročilih mišljena meja $0,01$ mg/kg ali predpisana meja LOQ za neko posamezno snov (med $0,003$ in $0,01$ mg/kg) ali celo meja LOD (pod $0,001$ - $0,003$ mg/kg). Nekateri so mnenja, da so včasih iz zgoraj omenjenega razloga rezultati EU monitoringov za-

vajajoči in kažejo lepšo sliko, kot je v realnosti in da ni možna primerjava z obdobji za nazaj, ker smo v preteklosti imeli višje LOQ, kot danes.

Danes pri ekoloških pridelkih ponekod kod »pravniško ničlo« upoštevajo vrednost LOQ $0,003$ mg/kg (z merilno negotovostjo 50 %). To pomeni, da na primer pri izmerjeni vrednosti $0,0049$ mg/kg že sankcionirajo pridelovalca, ker ima v pridelku nedovoljeno FFS. Če bi dobili enak izvid pri metodi za katero je v analitskem standardu postavljen LOQ $0,01$ mg/kg (50 % merilna negotovost) se pridelovalca ne sankcionira, čeprav je na primer vrednost $0,0049$ mg/kg nad vrednostjo LOD $0,001$ mg/kg neke analitske metode. Razprava iz točke 3.2 kaže kako zapleteno je lahko interpretiranje rezultatov kemičnih analiz živeža in kako težka je komunikacija z javnostjo, ki želi podatke po konceptu črno/belo. Kakšen odgovor lahko damo nekomu, ki ga zanima razlika v toksikološkem bremenu med vzorcema jabolka, kjer pri snovi, ki ima MRL 2 mg/kg, ugotovimo pri vzorcu A koncentracijo $0,012$ mg/kg (integrirano sadje z $0,6$ % MRL) in pri vzorcu B koncentracijo $0,004$ mg/kg (ekološko sadje z $0,2$ % MRL)? Lahko podamo odgovor, da je razlika tako majhna in koncentracija tako daleč od MRL ter ADI, da razlike v toksikološkem bremenu med vzorcema verjetno ni. Če bi to aplicirali širše bi morda lahko rekli, da jabolko A iz vrhunske 0-residue integrirane pridelave, kjer so pogosto vsi ostanki FFS pod $0,01$ mg/kg, po toksikološkem bremenu ni bistveno različno od ekološkega jabolka B, ki je bilo izpostavljeno globalnemu atmosferskemu driftu FFS. Ta trditev za mnoge potrošnike globoko prepričane v EKO koncept ni sprejemljiva.

3.3 Obstoj vzporednega sistema marketinških standardov glede sprejemljive količine ostankov FFS v sadju in zelenjavi kot ena od rešitev za zmanjšanje ostankov FFS v živežu

Potrošniki so skozi delovanje v različnih nevladnih organizacijah ugotovili, da je doseganje ciljev v formalnih postopkih v sistemu delovanja EU institucij težavno in vlaganje pobud ter zahtev za spremembo zakonodaje in standardov preko poslancev in drugih političnih funkcionarjev daje rezultate po več letih aktivnosti. Realizacija pobud lahko traja tudi 5 let, ker je iskanje konsenza med številnimi državami, skupinami strank in več nivoji institucij zelo dolgotrajno. Nevladne organizacije so spoznale, da uporabne rezultate za doseganje sprememb daje pritisk na trgovske verige. V letu 2019 v mestih živi več prebivalcev kot na podeželju in ti se oskrbujejo v glavnem v velikih trgovskih verigah. Nevladne organizacije v trgovskih verigah jemljejo

vzorke živil, izvedejo analize glede ostankov FFS in potem rezultate njihovih monitoringov objavijo na spletnih straneh. Pri podajanju rezultatov so zelo kritični in brez zadržkov očrtno trgovske verige, pri katerih so našli vzorce živeža z veliko ostanki FFS. Objave teh podatkov imajo velik vpliv na trgovske verige, ki se odzovejo z velikim pritiskom na dobavitelje. Te spletne strani imajo zgovorne naslove, na primer »name and shame« ali pa »dirty dozen«. Dobavitelji (pridelovalci) so postavljeni pred zahteve glede ostankov FFS, ki daleč odstopajo od meja legalnih okvirjev ostankov. Tako na primer bolj zahtevne verige od dobaviteljev lahko zahtevajo, da sadje in zelenjave sme vsebovati največ 4 ostanke FFS, največ en insekticid, da koncentracija nobenega ostanka ne sme biti višja od 33 % MRL in 33 % ARFD. Po takšnih zahtevah vzorca 1 in 2 iz preglednice 1 za trgovsko verigo nista sprejemljiva. Preko takšnih vzvodov se doseže, da imamo na trgovskih policah živež, ki ima veliko manj ostankov, kot bi jih zakonodajno gledano lahko imel. Omenjeni mehanizem je pripeljal do novih tržnih znamk sadja in zelenjave višjih kakovosti (npr. O-residue pridelava; glej na primer (ANONYMOUS 2018b; ANONYMOUS 2019). Nekatere trgovske verige sprejemajo le sadje in zelenjavo, kjer so vsi ostanki pod mejo 0,01 mg/kg. Takšen pristop trgovine je pripeljal do občutnega zmanjšanja števila in količine ostankov FFS v živežu na policah. Tako študija iz Nemčije kaže, da je pred leti večina vzorcev

tracija nobenega ostanka ne sme biti višja od 33 % MRL in 33 % ARFD. Po takšnih zahtevah vzorca 1 in 2 iz preglednice 1 za trgovsko verigo nista sprejemljiva. Preko takšnih vzvodov se doseže, da imamo na trgovskih policah živež, ki ima veliko manj ostankov, kot bi jih zakonodajno gledano lahko imel. Omenjeni mehanizem je pripeljal do novih tržnih znamk sadja in zelenjave višjih kakovosti (npr. O-residue pridelava; glej na primer (ANONYMOUS 2018b; ANONYMOUS 2019). Nekatere trgovske verige sprejemajo le sadje in zelenjavo, kjer so vsi ostanki pod mejo 0,01 mg/kg. Takšen pristop trgovine je pripeljal do občutnega zmanjšanja števila in količine ostankov FFS v živežu na policah. Tako študija iz Nemčije kaže, da je pred leti večina vzorcev

Preglednica 2: Sestave pripravkov uporabljenih v raziskavi za analizo ostankov FFS v jabolkah

Table 2: Composition of tested preparations in research of PPP residues in apples

Pripravek: Preparation:	Aktivna snov: Active substance:	Koncentracija: Concentration (g/l, kg ml/l)	Odmerek: Full ha dose L, kg /ha
Nordox 75 WG	Copper-oxide	750	1,6 KG/HA
Cosan	Sulphur	796	3 KG/HA
Antracol WG 70	Propineb	700	2 kg/ha
Affirm	Emamectin	9,5	4 kg/ha
Aliette	Al-phosethyl	800	3,75 kg/ha
Calypso SC 480	Thiacloprid	480	0,3 l/ha
Chorus 50 WG	Cyprodinil	500	0,45 kg/ha
Confidor 70 WG	Imidacloprid	700	0,75 l/ha
Coragen	Chlorantranilpyrol	200	0,27 l/ha
Dithane DG neotec	Mancozeb	750	2 kg/ha
Decis 100 EC	Deltametrin	100	0,175 l/ha
Delan PRO	Dithianon Potassium-phosphonate	125 560	2,5 l/ha
Delegate 250 WG	Spinetoram	250	0,3 kg/ha
Envidor SC 240	Spirodiclofen	240	0,6 l/ha
Faban	Dithianon Pyrimethanil	250 250	1,2 l/ha
Imidan 50 WG	Phosmet	500	1 kg/ha
Luna experience	Fluopyram Tebuconazol	200 200	0,75 l/ha
Movento SC 100	Spirotetramat	100	1,9 l/ha
Nativo 75 WG	Tebuconazol Trifloxystrobin	250 500	0,75 kg/ha
Strobry	Krezoxymethyl	500	0,2 kg/ha
Scab 480 SC	Captan	480	3 l/ha
Sercadis	Fluksapyroxad	300	0,3 l/ha
Serenade ASO	<i>Bacillus subtilis</i>		6 l/ha
Zato plus	Captan Trifloxystrobin	600 40	1,9 kg/ha
MycoSin	Acid clay	900	8 kg/ha
VitiSan	Potassium-bicarbonate	994	6 kg/ha
Madex Max	Granulose virus	/	0,1 l/ha
Lepinox Plus	<i>Bacillus thuringiensis</i>	/	1 kg/ha

sadja vseboval več kot 5-6 aktivnih snovi, danes pa več kot 90 % vzorcev sadja vsebuje manj kot 5 aktivnih snovi na nivoju pod 50 % MRL (ANONYMOUS 2018c).

Uporabnost 0-residue pridelovalnega sistema smo preverili tudi v domačih raziskavah (ROZMAN et al. 2013). V preglednici 5 in 6 prikazujemo rezultate do-

mače raziskave glede izvedbe 0-residue pridelave jabolk iz sezone 2018. Primerjali smo standarden način varstva jablan pred boleznimi in škodljivci (glej preglednico 3) in 0-residue koncept varstva (glej preglednico 4). Razlika med programoma varstva je v tem, da smo pri standardnem programu izvedli škropljena tako,

Preglednica 3: Škropilni program standard – uporaba kemičnih pripravkov.

Table 3: Spray program standard - only conventional chemical preparations were applied.

Datum: Date:	BBCH	Pripravek: Preparation:	Odmerek: Doze:
04.04.2018	9	Frutopan Nordox	3 l/ha 1,5 kg/ha
11.04.2018	12	Antracol Decis Kumulus	3 kg/ha 0,175 l/ha 4 kg/ha
16.04.2018	52	Delan pro Stroby Chorus	0,75 kg/ha 0,2 kg/ha 0,45 kg/ha
23.04.2018	64	Luna Calypso Aliette	0,75 l/ha 0,3 l/ha 3,5 kg/ha
28.04.2018	64	Sercadis	0,3 l/ha
03.05.2018	67	Nativo Confidor Envidor	0,3 kg/ha 0,75 kg/ha 0,6 l/ha
10.05.2018	71	Zato plus Movento Delan pro	1,9 kg/ha 1,9 l/ha 2,5 l/ha
21.05.2018	70	Nativo Calypso	0,3 kg/ha 0,3 l/ha
25.05.2018	73	Movento Coragen	1,9 l/ha 0,27 l/ha
07.06.2018	72	Zato plus Imidan	1,9 kg/ha 1 kg/ha
15.06.2018	75	Scab	3 l/ha
26.06.2018	74	Dithane Madex	2,5 kg/ha 0,1 l/ha
12.07.2018	76	Delan pro Dithane	0,75 kg/ha 2 kg/ha
25.07.2018	77	Kumulus Scab Delegate	3 kg/ha 3,14 l/ha 0,3 kg/ha
07.08.2018	78	Zato plus Affirm Delegate	1,9 kg/ha 4 kg/ha 0,3 kg/ha
16.08.2018	80	Zato plus	2 kg/ha
21.08.2018	81	Serenade	4 l/ha
03.09.2018	82	Luna experience	0,75 l/ha
15.09.2018	82	Serenade	4 l/ha
1.10.2018	82	Serenade	4 l/ha

BBCH – rastni stadiji rastlin – plant growth stages (Meier 2001).

kot se običajno izvedejo v praksi s pogosto uporabo klasičnih kemičnih pripravkov. Pri 0-residue konceptu varstva pa varstvo izvedemo tako, da v sredini sezone, v našem primeru 15.6., prenehamo z uporabo klasičnih kemičnih pripravkov in pričnemo uporabljati pripravke, ki jih uporabljamo v ekološki pridelavi (virusi,

bakterije, rastlinski izvlečki, ...). Sestava teh alternativnih pripravkov je vidna v preglednici 2.

Rezultati, ki smo jih dosegli z 0-residue konceptom pridelave jabolk v raziskavi glede koncentracije ostankov FFS v jabolkih v času obiranja so na primeru dveh vzorcev vidni v preglednici 5.

Preglednica 4: Škropilni program 0-residue. Od 15. 6. naprej uporabljeni samo ekološki pripravki.
Table 4: Spray program 0-residue. After 15. 6. only organic PPP were applied.

Datum: Date:	BBCH	Pripravek: Preparation:	Odmerek: Doze:
04.04.2018	9	Frutopan Nordox	3 l/ha 1,5 kg/ha
11.04.2018	12	Antracol Decis Kumulus	3 kg/ha 0,175 l/ha 4 kg/ha
16.04.2018	52	Delan pro Stroby Chorus	0,75 kg/ha 0,2 kg/ha 0,45 kg/ha
23.04.2018	64	Luna Calypso Aliette	0,75 l/ha 0,3 l/ha 3,5 kg/ha
28.04.2018	64	Sercadis	0,3 l/ha
03.05.2018	67	Nativo	0,3 kg/ha
10.05.2018	69	Zato plus	1,9 kg/ha
21.05.2018	70	Faban Coragen	1,2 l/ha 0,27 l/ha
25.05.2018	71	Madex	0,15 l/ha
07.06.2018	72	Scab Madex	1,9 l/ha 0,15 l/ha
15.06.2018	73	Madex Mycosin	0,2 l/ha 8 kg/ha
26.06.2018	74	Kumulus Mycosin Madex	3 kg/ha 8 kg/ha 0,1 l/ha
09.07.2018	75	Madex Mycosin	0,2 l/ha 8 kg/ha
12.07.2018	76	Kumulus Vitisan	2 kg/ha 3 kg/ha
20.07.2018	76	Mycosin Madex	5 kg/ha 0,1 l/ha
25.07.2018	77	Vitisan Madex	7 kg/ha 0,1 l/ha
07.08.2018	78	Kumulus Mycosin	2 kg/ha 5 kg/ha
16.08.2018	80	Serenade Lepinox	5 l/ha 1 kg/ha
21.08.2018	81	Serenade	4 l/ha
03.09.2018	82	Vitisan	5 kg/ha
15.09.2018	83	Serenade	4 l/ha
1. 10. .2018	83	Vitisan	8 kg/ha

BBCH – rastni stadiji rastlin – plant growth stages (Meier 2001).

V preglednicah 5 in 6 lahko vidimo kako občutno manjše število ostankov FFS je bilo najdeno v jabolkih ob obiranju pri 0-residue pridelavi v primerjavi s standardno pridelavo. V raziskavi smo aplicirali 30 aktivnih snovi FFS. V standardni pridelavi smo jih v jabol-

kih našli 8 in v 0-residue pridelavi le 2 in te daleč pod nivojem 0,01 mg/kg. Raziskava kaže, da imamo pri strokovnem delu še veliko možnosti, da občutno zmanjšamo količino ostankov v sadju. Ni potrebno da se popolnoma odpovemo uporabi FFS.

Preglednica 5: Primer rezultata kemične analize vzorca jabolk iz primerjanih pridelovalnih sistemov.

Table 5: An example of a chemical analysis of a sample of apples from compared production systems.

Program:	Aktivna snov (AS):	Koncentracija v plodu:	MRL	%	% ARFD
Program:	Active substance (AS):	Concentration: mg/kg	mg/kg	MRL	
Program standard	Dithiocarbamate - SCS2	0,018	5,00	0,36	X
	Captan	0,089	10,00	3,70	2,44
	Tebuconazol	0,008	0,30	2,67	2,20
	Dithianon	0,022	3,00	0,73	1,51
	Fluopyram	0,006	0,60	1,00	0,10
	Trifloxystrobin	0,007	0,70	1,00	X
	Spirotetramat	<0,003	1,00	0,90	X
	Phosmet	0,005	0,50	1,00	0,91
Kumulativno:	7 AS > LOQ	5 AS < 0,01 < 3 AS		10,46 %	7,15 %
Cumulative:	8 AS > LOD	1 AS < 0,003 < 7 AS			
Program 0-residue	Chlorantranilipirole	0,007	0,50	1,40	X
	Pyrimethanil	<0,003	15,00	<0,02	X
Kumulativno:	1 AS > LOQ	2 AS < 0,01 < 0 AS		1,40 %	0,00 %
Cumulative:	2 AS > LOD	1 AS < 0,003 < 1 AS			

X - ARFD za te aktivne snovi še ni določen (The ARFD for these active substances has not yet been determined).

Preglednica 6: Povprečne ugotovljene koncentracije aktivnih snovi v jabolkih ob obiranju pri dveh primerjanih škropilnih sistemih.

Table 6: Average concentrations of active substances in apples at harvest in two compared spray systems.

Aktivna snov: (mg/kg)	Program – standard	Program 0-residue
Active substance: (mg/kg)		
Dithiocarbamate SCS2	0,0176 A	0,0000 B
Captan	0,0937 A	0,0000 B
Dithianon	0,0180 A	0,0000 B
Tebuconazol	0,0090 A	0,0000 B
Trifloxystrobin	0,0070 A	0,0000 B
Fluopyram	0,0080 A	0,0000 B
Pyrimethanil	0,0000 A	0,0010 A
Fluoxapyroxad	0,0000 A	0,0000 A
Chlorantranilipirole	0,0000 A	0,0023 A
Thiacloprid	0,0000 A	0,0000 A
Spirotetramat	0,0015 A	0,0000 B
Phosmet	0,0022 A	0,0000 A
Spirodiclofen	0,0000 A	0,0000 A
Spinetoram	0,0000 A	0,0000 A
Emamectin	0,0000 A	0,0000 A
Deltametrin	0,0000 A	0,0000 A

* Vrednosti označene z enako črko pri posamezni aktivni snovi se ne razlikujejo statistično značilno glede na rezultate Tukey HSD testa ($\alpha < 0,05$). Values marked with the same letter for each active substance do not differ statistically according to results of Tukey HSD test ($\alpha < 0,05$).

Preglednica 7: Primerjava rezultatov kemične analize jabolk v pogledu povprečnega števila najdenih aktivnih snovi FFS in kumulativnih vrednosti MRL in ARFD.

Table 7: Comparison of the results of the chemical analysis of apples in terms of the average number of found active substances of the PPP and the cumulative values of MRLs and ARFD.

Najdene aktivna snov (AS): Found active substances (AS):	Program standard	Program 0-residue
Število najdenih AS > 0,01 mg/kg No. of AS concentration > 0,01 mg/kg	4,00 A	0,00 B
Število najdenih AS > 0,03 mg/kg No. of AS concentration > 0,003 mg/kg	6,33 A	0,67 B
Kumulativen S% MRL Cumulative S% MRL	11,37 A	0,46 B
Kumulativen S% ARFD Cumulative S% ARFD	6,70 A	0,00 B

* Vrednosti označene z enako črko pri posameznih parametrih se ne razlikujejo statistično značilno glede na rezultate Tukey HSD testa ($\alpha < 0,05$). Values marked with the same letter for each of compared parameters do not differ statistically according to results of Tukey HSD test ($\alpha < 0,05$).

V preglednici 7 lahko vidimo kumulativni povprečni rezultat kemijske analize jabolk iz obeh primerjanih sistemov pridelave. Pri programu standard smo zadostili zahtevam večjega dela trgovskih verig v EU. Jabolka so vsebovala 4 ostanke FFS nad 0,01 mg/kg in kumulativni MRL in ARFD vrednosti sta bili daleč pod 33 %, kar je zahteva mnogih trgovskih verig. Pri jabolki iz sistema 0-residue ni bilo niti enega ostanka v koncentraciji nad 0,01 mg/kg in vrednosti kumulativni MRL in ARFD sta bili pod 1 %. Marketinški naziv 0-residue pridelava izvira prav iz dejstva, da pri sadju in zelenjavi iz te pridelave ne najdemo ostankov s koncentracijo nad 0,01 mg/kg.

3.4 Posledice občutnega zmanjšanja rabe FFS v kratkem roku

Pritisk javnosti (različnih interesnih skupin ljudi) na politike in na institucije nadzora ter regulacije rabe FFS je izjemno velik in lahko ima dve posledici; vsečna dejanja politikov, ki brez zadržkov podpišejo dokumente o zmanjšanju porabe FFS, prepovedih rabe FFS ali zniževanju dovoljenih vsebnosti ostankov v živežu ali vodi in drug učinek pri nadzornih institucijah, da pod velikimi pritiski postanejo manj objektivne glede nekaterih humano-toksikoloških dejstev, posebej v pogledu učinkov hormonskih motilcev. To vodi v koncept, da je škoda, ki nastane pri poslovanju kemičnih družb in škoda na strani pridelovalcev hrane nepomembna v primerjavi s škodo na zdravju ljudi, če se dovoli uporaba sredstva, pri katerem morda lahko nekoga dne ugotovimo škodljivost za zdravje. Za večino javnosti je ta tako imenovan previdnostni koncept

»angl. precautionary concept« umikanja FFS iz uporabe sprejemljiv. Pripravke organi EU iz trga po previdnostnem konceptu umikajo glede na tako imenovane izključitvene kriterije »angl. cut-off criteria«, na primer z oznako pogojno kancerogena snov ali pogojno hormonski motilec, brez, da bi ta dva učinka dejansko bila znanstveno dokazana. Če kmetje preveč hitro izgubljajo možnosti za kemično zatiranje ŠO in se jim ne nudi uporabnih novih alternativnih tehnik pri trenutnih nizkih cenah pridelkov hitro zabredejo v negativne ekonomske rezultate, ker so neuspešni pri zatiranju ŠO. Pri slabem ekonomskem fitnessu niso sposobni investirati v nove napredne tehnike in kmetije propadajo. Zmanjša se obseg samooskrbe in poveča se uvoz živeža iz drugih držav izven EU območja. S tem zmanjšamo obremenitev narave v EU, ne zmanjšamo pa bistveno obremenitev ljudi preko hrane, saj ceneni uvožen živež iz industrijske pridelave (Brazilija, ZDA, Kanada, Južna Afrika, Turčija, Kitajska, ...) pogosto vsebujejo večje koncentracije pesticidov, kot povprečno produkti evropskih pridelovalcev (ANONYMOUS 2018a).

3.5 Možnosti in ovire za hitro nadomeščanje manj sprejemljivih FFS z alternativnimi ter nekateri učinki alternativnih metod zatiranja ŠO

Za hitro uvajanje novih FFS, ki so toksikološko bolj sprejemljiva je več ovir kot so: veliki stroški razvoja sredstev, meje znanja v znanosti, nesprejemanje biotehnoloških rešitev, slab ekonomski fitness pridelovalcev, nepripravljenost potrošnikov na sprejemanje viš-

jih cen hrane in nižjih standardov kakovosti, precejšnja degradiranost agrarnih ekosistemov, pomanjkanje ustreznih sort gojenih rastlin in še druge.

Obstaja vprašanje, ali lahko pospešitev hitrosti preprečevanja rabe nesprejemljivih FFS pospeši raziskave v smeri alternativnih sredstev? Strošek izdelave novega sodobnega FFS je velik in lahko preseže 200 milijonov evrov (glej na primer ANONYMOUS 2019h). Tako velikih investicij so sposobne samo velike gospodarske družbe. Nekateri optimistično pričakujejo, da bo množično ukinjanje FFS kemično industrijo prisililo k razvoju novih bolj ekoloških sredstev. Odkrivanje novih sredstev, ki so eko-toksikološko in humano-toksikološko brezhibna je izjemno drago. V današnjih ekonomskih razmerah imamo zelo dinamično prelivanje kapitala med manj in bolj dobičkonosnimi gospodarskimi vejami. To pomeni, če je dobičkonosnost fitofarmaceutvske industrije nizka (tudi zaradi zelo visokih vlaganj v razvoj novih sredstev), se kapital seli v druge bolj dobičkonosne panoge (npr. elektronika, zdravila, procesiranje smeti, eko – energetika, ...). Investiranje v razvoj novih FFS je postalo tvegano, saj ni več pravne varnosti za podjetja. Ko nek nov produkt, ki je rezultat dolgoletnih raziskav, stopi na trge je lahko po previdnostnem konceptu kmalu za tem umaknjen iz trga, še preden so s prodajo bili pokriti stroški investicij vanj. Iz tega razloga se velike družbe vse bolj pogosto odločajo za registracije novih snovi izven EU. Takšne snovi so na voljo pridelovalcem izven EU, evropskim pa ne. To vpliva na konkurenčnost pridelovalcev EU.

S stališča znanosti pri obstoječih resursih ni mogoče zagotoviti pripravkov, ki bi bili povsem brez negativnih posledic na katerem od segmentov humane ali eko-toksikologije. Običajne alternativne rešitve za nadomestitev klasičnih kemičnih FFS so: pripravki na podlagi bakterij, virusov, kvasovk, rastlinskih izločkov, alg, saprofitskih gliv, plenilske in parazitoidne žuželke, ogorčice, uporaba feromonov, fizikalne metode in podobno. Kot celovit koncept se kaže moderna oblika ekološke pridelave, ki uporablja vse prej naštete metode in sredstva. Pri registraciji biotičnih pripravkov smo v toksikoloških študijah morda nedosledni. Tako na primer registriramo vse več novih bakterijskih pripravkov (npr. *Bacillus* spp. pripravki). Ko bakterije sprostimo na rastline ne moremo vedeti, katere vse presnovke bodo oblikovale, večine sploh ne poznamo, kaj šele da bi poznali njihove učinke. Torej v dobri veri ljudi izpostavimo neznanim izločkom bakterij in upamo, da niso zdravju škodljivi. Podobno velja za glive in kvasovke. Sadje in zelenjava tretirana z biotičnimi pripravki pri nekaterih povzročata alergije, ki so blaga oblika toksičnih učinkov (ANONYMOUS 2017a).

Učinkovitost alternativnih sredstev pogosto ni primerljiva s klasičnimi FFS in za doseganje visoke učinkovitosti mora biti izpolnjenih veliko okoljskih dejavnikov sicer niso učinkovita (BROHAN et al. 2015). Vrtimo se v krogu odzivov narave, ki se vedno pokažejo kot dejstvo, da škodljivih organizmov ni možno iztrebiti. Žal se tudi pri alternativnih sredstvih pojavi odpornost ŠO nanje in je uporabo nekaterih potrebno omejevati iz razloga preprečevanja odpornosti. Trenuten nabor alternativnih pripravkov je majhen in ne omogoča dobrega kolobarjenja z njimi. Prepegosta uporaba biotičnih pripravkov na podlagi bakterij in virusov privede do odpornosti žuželk nanje (SEIGHWART et al. 2015). Tudi alternativna sredstva imajo učinke na zdravje ljudi, živali, na čebele in tudi na ekosisteme (LAGERQUIST 2014; DRIESCHE & HODDLE 2017). Velik del potrošnikov EU ne sprejema biotehnoških rešitev in gensko spremenjenih organizmov in ima romantično predstavo, da lahko velike količine poceni hrane zagotovimo v ekološki pridelavi po starih tradicionalnih metodah pridelovanja. Ekološka pridelava je dobrodošla, vendar mora za visoko produktivnost vključevati vsa moderna agrotehnična in biotehnoška spoznanja.

Moderno biotično varstvo temelji na uporabi naravnih sovražnikov škodljivcev. Tudi tukaj lahko gre kaj narobe. Primer je sprememba prehranskih preferenc pri plenilskih žuželkah iz drugih okolij (LOOMANS 2015). V literaturi pogosto naveden primer je primer plenilske polonice *Harmonia axyridis* Pallas. Polonico so v ZDA vnesli kot plenilca uši v rastlinjakih. Pozneje je iz ZDA prišla v Evropo in tudi k nam. Žal se sedaj hrani na sadju in grozdu in je postala nov škodljivec (ORLOVA BIENKOWSKAJA 2014). Njeni izločki se najdejo v vinu in naredijo vino neprimerno za uživanje. Poročajo tudi, da izločki polonice ogrožajo zdravje ljudi (KOCH et al. 2008; FOLEY et al. 2009). Opisani primer ne pomeni, da so takšni pojavi množični, so pa možni.

Verjetno smo večkrat pristranski ko prikazujemo dobre in slabe plati različnih alternativnih tehnik zatiranja ŠO. Za primer analizirajmo alternative ob prenehanju uporabe snovi glifosat. Številni pozivajo, prenehajmo glifosat uporabljati takoj, saj je na voljo veliko alternativ (npr. košnja, strojno krtačenje, uporaba ognja, uporaba vroče pare, ...) (BRANCO 2017). Torej plevel lahko namesto s herbicidi zatiramo strojno z okopavanjem, z uporabo ognja, vroče vode, s strojnimi metlami ali na primer z gojenem vrtnin na folijah. Kakšne snovi se lahko sprostijo pri alternativnem zatiranju plevelov običajno ne pomislimo? Zgodi se lahko, da preprosto zamenjamo izpostavljenost enim kemikalijam za izpostavljenost drugim. Pri mehanskem

zatiranju plevela, zatiranju z ognjem in vročo paro trošimo veliko fosilnih goriv iz katerih se pri zgorevanju sproščajo nevarne snovi (npr. benzeni, dioksini, furani, radioaktivni elementi, ...). Ilustracija tega je na primer francoska študija, ki analizirala vsebnost strupenih snovi v telesu delavcev, ki so v urbanem okolju plevel zatirali na način, da so s škropilnico nanašali herbicid glifosat, da so uporabljali kosilnico na nitko z bencinskim motorjem, da so uporabljali žično strojno metlo z bencinskim motorjem, ali pa so uporabljali ožigalnik na plin (BROHAN et al. 2015). Ugotovili so, da lahko pri delavcih, ki uporabljajo kosilnico, strojno metlo ali plin, v krvi najdemo številne zelo strupene kemične snovi, ki se sproščajo ob zgorevanju plina in bencina ali pa so v prahu na tleh, ki se dviguje ob zatiranju plevelov s strojno metlo. Ta prah vsebuje kemikalije, ki pridejo iz kurišč, iz avtomobilskih izpuhov in drugih virov. Omenjenim snovem so v mestih ob zatiranju plevelov izpostavljeni tudi mimoidoči, ker prepoved gibanja v bližini, v času strojnih del ni predpisana, tako kot je pri nanašanju herbicidov. Obstaja možnost, da je škodljivi učinek strupenih snovi na delavca v omenjeni študiji večji od učinka izpostavljenosti snovi glifosat.

Uporaba prekrivnih folij iz plastičnih mas (npr. polietilen) je pogosta alternativna metoda zatiranja plevelov (KASIRAJAN & NGOUAJIO 2012). Iz folij se sproščajo škodljive snovi kot so Bisfenol-A in ftalati, ki so morda bolj škodljive od snovi glifosat (HE et al. 2015; MICHALOWICZ 2014; GIONFRA 2018). Bisfenol in ftalate uvrščajo med hormonske motilce z estrogenim delovanjem (BOTHAM & HOLMEC 2005). Pri uporabi folij več let zapored se v tleh nakopičijo tolikšne količine teh snovi, da se njihovi ostanki najdejo v zelenjavi gojeni na takšni njivi, tudi več let po prenehanju uporabe folije.

V veliki želji zmanjšati uporabo klasičnih FFS organi EU iščejo bližnjice za poenostavljeno registracijo tako imenovanih snovi z nizkim tveganjem (angl. low risk substances) (FLÜH & MEEUSSEN 2014; PITTON 2018). To so pripravki na podlagi mineralnih soli, iz rastlinskih izvlečkov ali mikrobnih fermentati različnih organskih substratov. Te pripravke pogosto uvrščamo med sredstva za krepitev rastlin (angl. plant strengtheners) in med biostimulatorje. V teh pripravkih so rastlinske in mikrobne snovi za katere ne poznamo njihovih toksikoloških učinkov. Primer takšne učinkovine je matrin, izloček rastline *Sophora flavescens* Aiton. Po učinkovitosti bi matrin lahko uvrstili med FFS saj nič ne zaostaja za učinkovitostjo sintetičnih piretroidov, ki imajo ozadje v naravnih piretrinih, prav tako insekticidih rastlinskega izvora. Matrin najdemo v biostimulatorskih pripravkih tudi v Sloveniji. Njihova

uporaba ni regulirana, čeprav je splošno znano, da bi morala biti. Takšnih primerov je še več.

Imamo tudi druge povsem neregulirane alternativne pripravke, kot so na primer doma narejeni rastlinski izvlečki in kompostni čaji. Doma pripravljene pripravke lahko vsebujejo rastlinske in mikrobne toksine ali pa zaradi stika z živinskimi gnojili vsebujejo patogene povzročitelje splošnih zoonoz (ANONYMOUS 2017d). Rodovi bakterij, ki nas običajno skrbijo pri kompostnih čajih so na primer: *Escherichia*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Yersinia*, *Cryptosporidium* (Protozoa) in *Giardia* (Protozoa). Pri nestrokovni uporabi kompostnih čajev obstaja možnost za ogrožanje zdravja ljudi zaradi okužb z mikrobi.

Delno regulirani pripravki so biostimulatorji, ki jih večinoma uvrščajo med gnojila in se registrirajo po shemi EC Fertiliser (glej direktivo 2003/2003 EC). Registracija po tej shemi trenutno ne zahteva podajanja toksikoloških študij. Takšnih pripravkov je na EU trgu na tisoče. Pri njih opažamo primanjkljaj pri navodilih za uporabo. Pogosto ni podatkov o letnem številu rab in ne podatkov o čakalnih dobah pred obiranjem pridelkov. Preveč pogosta uporaba lahko povzroči da imajo pridelki velike vsebnosti težkih kovin, fosfonatov, žvepla, pravega srebra, eteričnih olj, ligninov in drugih škodljivih snovi. Če te pripravke preveč dolgo skladiščimo pri dostopu zraka fermentirajo in v njih se naselijo škodljivi mikroorganizmi. Formalno je zelo tanka meja med mikrobnimi biostimulatorji in mikrobni biotičnimi FFS (RAVENSBERG 2017). Na trgu je možno najti premere, ko je enak organizem ponujen v formulaciji biostimulatorja in v formulaciji FFS ali v formulaciji sredstvo z nizkim tveganjem. Tukaj se kaže možnost obvoda pri dajanju nekega pripravka s snovjo ki ima značilnosti FFS na tržišče mimo formalnega registracijskega postopka ki velja za FFS ali mimo postopka za registracijo pripravkov z nizkim tveganjem, ki so definirani v direktivi 1107/2009 EU.

Pomemben dejavnik uspešnosti alternativnih metod zatiranja ŠO je biološko stanje agrarnih ekosistemov. Uporaba biotičnih metod zatiranja v veliki meri temelji na delovanju naravnih ravnotežij med škodljivimi in koristnimi organizmi. Za zmanjšanje porabe klasičnih kemičnih FFS so potrebne velike spremembe v managementu agrarnih ekosistemov, ki se morajo v biotičnem smislu rehabilitirati, da se ponovno vzpostavijo ravnotežja med koristnimi in škodljivimi organizmi. Po sprostitvi mora koristni organizem v ekosistemu dovolj dolgo preživeti in se namnožiti. Učinkovitost biotičnih metod zatiranja z uporabo organizmov je nižja, če organizme sprostimo v degradirano agrarno okolje (NICOT et al. 2012). Samo z me-

njavo kemičnih pripravkov z biotičnimi, brez sprememb v degradiranem agrarnem ekosistemu ni možno zagotoviti učinkovitega alternativnega varstva pred ŠO.

Potrebno je narediti veliki premik v izvedbi varstva rastlin iz koncepta prepoznav ŠO in ga zatri kemično v koncept, spremeni gojene rastline in agrarne ekosisteme v smeri, da naravni mehanizmi preprečijo obsežen razvoj ŠO. Pomembno vlogo igrajo študije rastlinskih mikrobiomov, ki kažejo kompleksno povezanost mikrobov in rastlin (COMPANT et al. 2019). Povezave med rastlinami in mikrobi so mnogo bolj kompleksne kot smo si predstavljali še nekaj let nazaj. Danes spoznavamo, da v notranjosti rastlin živijo številni mikrobi, ki regulirajo fiziološke procese v rastlinah. Lahko uravnavajo izločanje sekundarnih metabolitov, ki so hrana za saprofitske mikrobe živeče na površju rastlin ali pa obrambnih snovi proti povzročiteljem bolezni in škodljivcem. Ti simbionti - saprofiti so prva obrambna črta proti patogenim mikrobom. Transformacija varstva rastlin ni stvar zgolj strokovnjakov za varstvo rastlin temveč širše družbe, da se generalno spremeni način kmetovanja in ravnanja s kmetijskimi zemljišči. Velika težava je nezmožnost hitrega odpravljanja ekosistemskih ovir sodobnega kmetovanja (monokulturni sistemi, zelo velike parcele brez robnega pol-naravnega rastlinstva, kvarjenje tal zaradi izpostavljenosti težkim strojem in prenehanja vnosa kakovostnih organskih gnojil, prenehanje gojenja dosevkov, na splošno majhna pestrost vrst poljščin, ...). Omenjena ekosistemska degradiranost agrarnih površin je zelo pomembna tudi s stališča velikih koncentracij ostankov FFS v tleh in v podtalnih vodah. Ker je zaradi majhne mikrobne aktivnosti tal razpadanje ostankov počasno se kopičijo in imajo dolgotrajno delovanje na neciljne organizme. Le biološko rehabilitirani ekosistemi omogočajo hitrejšo razgradnjo ostankov FFS, kar lahko omogoči tudi zmanjšanje ostankov v pitni vodi in s tem tudi manjšo toksikološko breme ljudi s pitjem vode.

Za uspešno izvedbo biotičnega varstva potrebujemo drugačne sorte gojenih rastlin. Sodobne sorte gojenih rastlin selekcioniramo precej enostransko, prvenstveno v smeri visokih koncentracij hranil (sladkorji, olja, proteini, ...) in manj v smeri odpornosti na ŠO ali na strese, ki jih povzročajo klimatske spremembe ali zmanjševanje rodovitnosti tal. Takšne rastline so biološko neharmonične in lahek plen ŠO, ki so neke vrste naravni ravnotežni odziv na veliko koncentracijo hrane na majhnem prostoru (npr. njiva v monokulturnem sistemu pridelave polna luksuzno prehranjenih rastlin). Če gojimo občutljive, na stresne razmere neprilagojene sorte in hkrati značilno zmanjšamo pora-

bo FFS, lahko pride do povečanega razvoja glivičnih bolezni in povečanih koncentracij mikotoksinov. Številni mikotoksini (strupeni izločki gliv) so akutno in kronično veliko bolj strupeni od FFS (MATT et al. 2011). Ponovno pri pridelavi živeža pridemo do točke ko ene škodljive snovi (FFS) zamenjamo z drugimi (mikotoksini). Te trditve ne smemo zmotno na splošno povzemati, da na primer pri ekološki pridelavi lahko v pridelkih pričakujemo večje koncentracije mikotoksinov, kot pri integrirani pridelavi. V povprečju med ekološko in integrirano pridelanimi poljščinami ni večje razlike v vsebnosti mikotoksinov (MATT et al. 2011; GOMIERO 2018), je pa povečana vsebnost, kadar se ekološke pridelave lotimo na neustrezen način, to je, da še naprej gojimo občutljive sorte in preprosto prenehamo z izvajanjem ukrepov varstva rastlin. Posebna težava je odziv sort na žuželke. Insekticidi so najbolj moteča skupina FFS. Nekateri si zelo preprosto predstavljajo, da se lahko odpovemo intenzivnemu zatiranju škodljivih žuželk in da težavo rešimo z uvajanjem odpornih sort. Lažje pridobimo sorte odporne na glivične bolezni kot pa na škodljivce. Na primer imamo veliko sort jablan odpornih na škrlup, nikomur pa še ni uspelo vzgojiti sorte jablan, ki bi bile tako odporna na jabolčnega zavijača (*Cydia pomonella* L.), da gosenci nebi bila sposobna prevrtati plodu. Že majhne poškodbe od žuželk so lahko usodne za marketinško kakovost plodov ali pa za prodor gliv vanje. Še bolj zapletene so razmere pri prenašalcih povzročiteljev virusnih in fitoplazmatskih bolezni. Če znižamo intenziteto zatiranja prenašalcev se izrazito poveča prenos virusov in bakterij in pojavijo se velike trajne izgube pridelka. Ko se na primer sadno drevo in vinska trta okuži z virusi in fitoplazmami je rastlina do konca obstoja okužena. Nihče, na primer, še ni ustvaril sorte vinske trte, ki bi bila odporna na fitoplazmo povzročiteljico zlate trsne rumenice. Glavna oblika boja proti bolezni je zatiranje prenašalcev fitoplazme. Prav v točki selekcije na viruse in fitoplazme odpornih sort bo potrebno sprejeti biotehnoške rešitve, sicer napredka v smeri boljših sort ne bo (LEMAIRE et al. 2009).

V povezavi z zmanjšanjem rabe FFS se pojavi tudi vprašanje obnašanja in pričakovanj potrošnikov. Potrošnik ima vzvode da preko povpraševanja in preko priznavanja višjih in poštenih cen omogoči uvajanje alternativnih metod varstva rastlin. Pereča točka so izjemno visoki kakovostni standardi sadja in zelenjave. Pretirano visoki standardi kakovosti so lahko ovira za uvajanje pridelovalnih sistemov z občutno nižanim vnosom kemičnih FFS. Kakovostni standardi so pretirano vezani na zunanje lastnosti – vizualno privlačnost, velikost, oblika in barva. Prav želja po vizualni

privlačnosti sadja in zelenjave nas žene k nerazumno veliki frekvenci uporab FFS. Zato da pridelamo jabolko brez vsake najmanjše pike od glivičnih okužb ali

poškodb od žuželk, ga tretiramo s FFS 30 krat letno. To je absurd, ki je gonilo pretirane rabe FFS in posledično uživanja velikega števila ostankov FFS.

4 ZAKLJUČKI

Odgovor na vprašanje iz naslova te razprave se glasi, da bomo z umikanjem nesprejemljivih FFS iz trga in s postopnim uvajanjem novih metod zatiranja ŠO lahko občutno zmanjšali toksikološko breme od ostankov kemičnih FFS za ljudi, živali in okolje, vendar nikoli v popolnosti, saj imajo prav vse metode zatiranja ŠO stranske učinke in puščajo kemične sledi. Evropski sistem varovanja ljudi in narave pred učinki FFS spada med tiste z najvišjimi standardi varovanja zdravlja ljudi v svetu in je zaupanja vreden. To se praktično vidi v tem, da v EU ni dovoljeno uporabljati številnih snovi, ki se sicer uporabljajo po svetu, tudi v ZDA, Kanadi, Braziliji, Južni Afriki, na japonskem in drugod v državah z visoko razvitim industrijskim kmetovanjem. Institucijam kot je EFSA je potrebno nameniti več sredstev, da lahko izvedejo več neodvisnih toksikoloških študij in vse toksikološke študije morajo biti javno dostopne. Pri reguliranju dajanja na trg alternativnih sredstev (sredstva za krepitev rastlin, sredstva z nizkim tveganjem in osnovnih sredstev za ekološko pridelavo), pod okriljem direktive 1107/2009 in 283/2013 ali izven, je potrebno najti

učinkovite, hitre in poenostavljene metode presoje. Navodila za uporabo (število uporab, neke vrste korenčno obdobje) je pri alternativnih sredstvih potrebno pripraviti na podoben način, kot pri FFS, da se tveganja za ljudi in živali zmanjšajo na najmanjšo možno raven. Preprečiti je potrebno, da bi bile tovrstne oblike registracij obvod za izvedbo popolnih registracij snovi, ki po mehanizmu delovanja spadajo med klasična kemična FFS.

Potrebno je ustvariti okoliščine za razvoj novih pridelovalnih sistemov, saj biotično in naravi prijazno varstvo rastlin zgolj z uporabo novejših generacij ne kemičnih pripravkov, brez ekosistemskih sprememb, ne more zagotoviti ekonomsko učinkovitega pridelovanja rastlin. Preprosta zamenjava klasičnih pesticidov z biotičnimi pripravki brez korenite spremembe pridelovalnih sistemov ne more značilno zmanjšane rabe FFS in zagotoviti zmanjšanja koncentracij škodljivih snovi v hrani. Pripravkom in non-GMO sortam gojenih rastlin, ki so bili razviti po biotehnoloških metodah je potrebno dati priložnost, da se uveljavijo v sodobnem varstvu rastlin in jih ne v naprej zavračati.

5 SUMMARY

The article deals with the EU's public attitude towards the system of registration and controlling the use of plant protection products (PPPs), presents the reasons for the requirements for a significant reduction in the use of PPPs in agriculture and describes the possibilities for reducing PPP use by introducing alternative methods of pest control. The existing PPP registration system and monitoring system for PPP residues in foods, needs to be improved somewhat in terms of transparency, development of new indicators of potential harm to humans, and a uniform treatment of chemical analytical results in regulatory surveillance procedures has to be implemented EU wide, as we have a single EU market. In any case, alternative methods of controlling harmful organisms means relieving the toxicological burdens of humans and nature, but not completely. Without major changes in agrarian ecosystems, such as modified soil cultivation, a more varied

crop rotation, an increase in the diversity of cultivated plants and cover crops, systematic maintenance of border semi-natural habitats and other measures plant protection based only on alternative methods will not be successful. It is not feasible to expect that only using non-chemical methods of control, without proper ecosystem management, can provide economic success in plant production and the control of organisms harmful to plants.

When introducing new alternative methods and biotic agents, we should consider that even these methods can lead to the release of harmful substances. Since the development of new alternative products (biostimulators, low risk substances) is very encouraged and the registration procedures for the placing on the market are being simplified, effective methods of rapid and simplified assessment of potential effects on human, animal and environmental health must be investigat-

ed. The requirements for these preparations must not be too loose, considering that these preparations contain heavy metals, various salts, microbial and plant extracts and microbes that tend to be used frequently, and especially when used shortly before harvest, can cause unacceptable contamination of crops with harmful substances and microbes. The application instructions (the number of applications, some kind of wait-

ing period) should be prepared in a similar way to that of the standard chemical PPP, in order to minimize the risks to humans and animals. Preparations and non-GMO varieties of crops that have been developed according to biotechnological methods should be given the opportunity to become established in modern plant protection and should not be rejected in advance in the future.

LITERATURA – REFERENCES:

- ANONYMOUS, European Commission, 2015: Pesticide Residue Control in Organic Production. DG Health and Food Safety Publications, 31 s.
- ANONYMOUS, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016: Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed. FAO Monograph series – Plant Production Paper 255 (Rome), 298 s.
- ANONYMOUS, EFSA, 2017a: The 2015 European Union report on pesticide residues in food. European Food Safety Authority. EFSA Journal 15(4): 134 s. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4791
- ANONYMOUS, European Commission, 2017b: SANTE/11813/201721–22. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf
- ANONYMOUS, IOMC, 2017c: Report of the 7th biopesticides steering group seminar on sensitisation potential of micro-organisms. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Pesticides 91, 37 s.
- ANONYMOUS, Nova Scotia Department of Agriculture, 2017d: Human Health Concerns Related to Soil Applications of Manure and Compost. 4 s. <https://novascotia.ca/agri/documents/food-safety/factsheet-human-health-risks.pdf>.
- ANONYMOUS, EFSA, 2018a: The 2016 European Union report on pesticide residues in food. European Food Safety Authority. EFSA Journal 16(17): 139 s. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5348
- ANONYMOUS, 2018b: European project LIFE12/ENV/ES/0902. <http://zeroresidues.eu/>
- ANONYMOUS, EUFRUIT, 2018c: Synthesis report and catalogue of outreach activities. Project documentation. 125 s.
- ANONYMOUS, Republika Slovenija, 2019a: Nacionalni akcijski program RS. http://www.uvhvvr.gov.si/si/delovna_podrocja/fitofarmaceutvska_sredstva/nacionalni_akcijski_program/
- ANONYMOUS, Euracity, 2019b: Politicians should trust EFSA, set aside their personal views. <https://www.euractiv.com/section/agriculture-food/news/german-mep-politicians-should-trust-efsa-set-aside-their-personal-views/>
- ANONYMOUS, EFSA, 2019c: Hov pesticides are regulated in EU. https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/Pesticides-ebook-180424.pdf.
- ANONYMOUS, EFSA, 2019d; Food safety: Enhancing consumer trust in EU risk assessment and authorisation. European Food Safety Authority – European Parliament news. <http://www.europarl.europa.eu/news/en/press-room/20190212IPR25936/food-safety-enhancing-consumer-trust-in-eu-risk-assessment-and-authorisation>
- ANONYMOUS, European Commission, 2019e: Boosting trust in scientific studies on food safety: Commission welcomes the provisional agreement reached today. http://europa.eu/rapid/press-release_IP-19-1030_en.htm
- ANONYMOUS, European Commission, 2019f: European Pesticide database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>
- ANONYMOUS, Fresh Plaza, 2019g: The “Zero Pesticide Residue” label celebrates its 1st anniversary. <https://www.freshplaza.com/article/9075945/the-zero-pesticide-residue-label-celebrates-its-1st-anniversary/>
- ANONYMOUS, European Crop Protection Association, 2019h: Cost of Crop Protection Innovation Increases to \$286 Million per Product. <https://www.ecpa.eu/news/cost-crop-protection-innovation-increases-286-million-product>
- BEVAN, R., BROWN, T., MATTHIES, F., SAMS, C., JONES, K., HANLON, J. & M.L. VEDRINE, 2017: Human biomonitoring data collection from occupational exposure to pesticides. External scientific reports of Institute for Environment and Health – IEH Consulting documents, 207 s.

- BOTHAM, C. & P. HOLMEC, 2005: Chemicals purported to be endocrine disrupters. A compilation of published lists. Publication of Institute for Environment and Health – IEH Web Report W20, 91 s.
- BRANCO, I. 2017: Alternative methods in weed management to the use of glyphosate and other herbicides. PAN Europe Monograph - Integrated Weed Management (Brussels), 132 s.
- BROHAN, E., SLADE, M., CLEMENT, S. & G. THORNICROFT, 2015: Review of factors influencing the success or failure of biocontrol: technical, industrial and socio-economic perspectives. Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. IOBC-WPRS Bulletin 78: 95-98.
- BROHAN, G., BUCHMANN, W. & P. LAÏLLE, 2015: Evaluation des risques liés aux techniques de désherbage sur la santé des travailleurs. Publications of Centre for Landscape and Horticulture Plante & Cité (Angers France), 191 s.
- COMPANT, S., SAMAD, A., FAIST, H. & A. SESSITSCH, 2018: A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. Journal of Advanced Research, in press. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>.
- DRIESHE, R.V. & M. HODDLE, 2017: A review of nontarget effects of insects biological control agents: concepts and examples. Department of Environmental Conservation, University of Massachusetts (Amherst), 136 s.
- FLÜH, M. & J. MEEUSSEN, 2014: Regulatory Issues in Europe including low risk substances and endocrine disruptor developments. Oral presentation 9th ABIM Meeting, Basel, Switzerland, 32. s https://www.abim.ch/file-admin/abim/documents/presentations2014/1_Jeroen_Meeussen_ABIM2014.pdf
- FOLEY, I.A., IVIE, M.A. & P. M. DENKE, 2009: The first state record for the multicolored Asian lady beetle, *Harmónia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae), from Montana. Coleopterists Bulletin 63(3): 351-352. <https://doi.org/10.1649/1175.1>.
- GILL, H.K. & H. GARG, 2014: Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. INTECH electronic monographs, 187-228. doi:10.5772/57399.
- GIONFRA, S. 2018: Plastic pollution in soil. Institute for European Environmental Policy, 18 s.
- GOMIERO, T. 2018: Food quality assessment in organic vs. conventional agricultural produce: Findings and issues. Applied Soil Ecology 123: 714-728. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.014>.
- HE, L., GIELEN, G. & N.S. BOLAN, 2015: Contamination and remediation of phthalic acid esters in agricultural soils in China: a review. Agron. Sustain. Dev., 35: 519-534. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0270-1>.
- KASIRAJAN, S. & M. NGOUAJO, 2012: Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: a review. Agron. Sustain. Dev. 32: 501–529. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0068-3>.
- KOCH R. L. & L. GALVAN TEDERSON, 2008: Bad side of a good beetle: the North American experience with *Harmónia axyridis* BioControl (Dordrecht) 53(1): 23-35. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6939-03>.
- LAANINEN, T. 2015: Reconsidering the General Food Law. Briefing EU Parliament. 11 s.
- LAANINEN, T. 2018: Reconsidering the General Food Law. European Parliamentary Research Service. 11 s.
- LAGERQVIST, E. 2014: Side effects of biological control agents in agriculture – Does the bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* affect the earthworm *Aporrectodea longa*? Agriculture Programme - Soil and Plant Sciences, 31 s.
- LAIMER, M., LEMAIRE, O., HERRBACH, E., GOLDSCHMIDT, V., MINAFRA, A., BIANCO, P.A. & T. WETZEL, 2009: Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: A review. Journal of plant pathology, 91(1): 7-23. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v91i1.620>.
- LATIF, Y., HUSSAIN SHERAZI, S.T., BHANGER, M.I. & S. NIZAMANI, 2012: Evaluation of Pesticide Residues in Human Blood Samples of Agro Professionals and Non-Agro Professionals. American Journal of Analytical Chemistry, 3: 587-595. doi:10.4236/ajac.2012.38077.
- LOOMANS, A.J.M. 2015: Environmental benefits and risks of biological, control: evaluation of natural enemies as a basis for releasing BCAS in the Netherlands. Zbornik predavanj in referatov 12. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Ptuj, marec 2015 1-7.
- MATT, D., REMBIALKOWSKA, E., LUIK, A., PEETSMANN, E. & S. PEHME, 2011: Quality of Organic vs. Conventional Food and Effects on Helth Report. Estonian University of Life Sciences, 104 s.
- MICHAŁOWICZ, J. 2014: Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. Environmental Toxicology and Pharmacology 37: 738-758. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003>.
- MURPHY R. S., KUTZ F. W. & S. C. STRASSMAN, 1983: Selected Pesticide Residues or Metabolites in Blood and Urine Specimens from a General Population Survey. The National Institute of Environmental, Health Sciences. Environmental Health Perspectives 48: 81-86. <https://dx.doi.org/10.1289%2Fehp.834881>.
- NICOT, P., BARDIN, M., ALABOUVETTE, C., KÖHL, J. & B. BLUM, 2012: Review of factors influencing the success or

- failure of biocontrol: technical, industrial and socio-economic perspectives. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens* 78: 95-98. <https://www.researchgate.net/publication/263203181>.
- ORLOVA- BIENKOWSKAJA, M. J. 2013: The Outbreak of Harlequin Ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera, Coccinellidae) in the Caucasus and Possible Sources of Invasion. *Russian Journal of Biological Invasions* 5(4): 275–281. doi: 10.1134/S2075111714040055.
- PITTON, P. 2018: Low risk active substances in plant protection state of play. DG SANTE Unit E4 Pesticides and Biocides European Commission, 17 s. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/adv-grp_plenary_20180427_pres_09a.pdf.
- RAVENSBERGER, W. 2017: The future of microbial products and regulatory issue. International Biocontrol Manufacturers Association, 41 s. <http://www.ibma-global.org/upload/documents/ravensbergthefutureofmicrobial-productsandregulatoryissues.pdf>.
- ROZMAN, Č., UNUK, T., PAŽEK, K., LEŠNIK, M., PRIŠENK, J., VOGRIN, A. & S. TOJNKO, 2013: Multi Criteria Assessment of Zero Residue Apple Production. *Erwerbs-Obstbau* 55: 51–62. doi:10.1007/s10341-013-0186-y.
- RENWICK, A.G. 2002: Pesticide residue analysis and its relationship to hazard characterisation (ADI/ARfD) and intake estimations (NEDI/NESTI)†. *Pest Manag. Sci.* 58: 1073–1082. doi: 10.1002/ps.544.
- SASS, J. & M. WU, 2013: Superficial Safeguards: Most Pesticides Are Approved by Flawed EPA Process. NRDC ISSUE BRIEF, 1-6.
- SIEGWART, M., GRAILLOT, B., BLACHERE LOPEZ, C., BESSE, S., BARDIN, M., NICOT, P.C. & M. LOPEZ-FERBER, 2015: Resistance to bio- insecticides or how to enhance their sustainability: a review. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00381>.
- SIERRA-DIAZ, E., ROSA, A., LOZANO-KASTEN, F., TRASANDE, L., PEREGRINA-LUCANO, A.A., SANDOVAL-PINTO, E. & H. GONZALES-CHAVEZ, 2019: Urinary Pesticide Levels in Children and Adolescents Residing in Two Agricultural Communities in Mexico. *International Journal Environmet Research and Public Health* 16(562): 1-8. <https://doi.org/10.3390/ijerph16040562>.
- URL, B. 2018: Don't attack science agencies for political gain. 2018 Macmillan Publishers Limited, *Nature* (Springer) 553: 381. doi: 10.1038/d41586-018-01071-9.

PLANT PESTS AND DISEASE DETECTION USING OPTICAL SENSORS

DALJINSKO ZAZNAVANJE RASTLINSKIH BOLEZNI IN ŠKODLJIVCEV

Uroš ŽIBRAT¹, Matej KNAPIČ² & Gregor UREK³

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0057>

ABSTRACT

Plant pests and disease detection using optical sensors

Traditional agricultural plant pest and disease management practices are based on visible characteristics and require that plants are checked individually, making these practices time consuming and therefore costly. Plant pests and diseases also often exhibit a heterogeneous distribution, making detection more difficult. Remote sensing methods enable comparatively accurate detection of pests and diseases over larger areas. Furthermore, because remote sensing sensors utilize light outside the human visible spectrum, presymptomatic detection becomes possible, thus facilitating timely, appropriate and spatially accurate management practices. Because remote sensing systems generate large amount of data, novel data analysis methods, such as machine learning, were introduced to plant protection. While pest and disease detection is possible using individual sensors, best results can be obtained by combining different sensors, utilizing different spectral ranges or physiological responses to light. A large amount of data and information has been generated in the past, but this research has mostly been focused on individual pathogens. Future research will have to focus on combined infections or infestations, and include abiotic stressors as well.

Key words: Remote sensing, plant protection, hyperspectral, multispectral, thermal, fluorescence, precision agriculture

IZVLEČEK

Daljinsko zaznavanje rastlinskih boleznih in škodljivcev

Velikokrat tradicionalni pristopi varstva rastlin pred rastlinskimi boleznimi in škodljivci temeljijo na vidnih simptomih, ki vključuje redno pregledovanje posameznih rastlin. Postopki so zato lahko dolgotrajni in s tem dragi. Bolezni in škodljivci imajo v prostoru pogosto heterogeno razporeditev, kar otežuje njihovo odkrivanje. Metode daljinskega zaznavanja omogočajo razmeroma natančno odkrivanje škodljivcev in boleznih na večjih območjih. Ker uporabljajo senzori daljinskega zaznavanja tudi svetlobo izven nam vidnega spektra, je možno tudi zgodnje odkrivanje, t.j. odkrivanje pred razvojem vidnih znakov boleznih. To omogoča pravočasno, ustrezno in prostorsko natančno upravljanje z boleznimi in škodljivci. Sistemi daljinskega zaznavanja ustvarjajo velike količine podatkov, zato so bile v varstvo rastlin uvedene sodobne metode za analizo podatkov, na primer strojno učenje. Čeprav je možno zaznava boleznih in škodljivcev z uporabo posameznih senzorjev, lahko dosežemo najboljše rezultate z združevanjem različnih senzorjev, torej z uporabo različnih spektralnih območij ali fizioloških odzivov na svetlobo. Dosedanje raziskave so bile osredotočene na posamezne škodljivce in bolezni. Prihodnje raziskave se bodo morale osredotočiti na kombinirane okužbe ter vključevati tudi abiotične stresorje.

Ključne besede: daljinsko zaznavanje, varstvo rastlin, hiperspekter, multispekter, toplotno slikanje, fluorescenca, precizno kmetijstvo

¹ Agricultural institute of Slovenia, Plant protection department, Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, e-mail: Uros.Zibrat@kis.si

² Agricultural institute of Slovenia, Plant protection department, Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, e-mail: Matej.Knapic@kis.si

³ Agricultural institute of Slovenia, Plant protection department, Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, e-mail: Gregor.Urek@kis.si

1 INTRODUCTION

Traditional agricultural management practices assume a homogenous distribution of plant pests and diseases in a field. But plant pests and diseases often exhibit a heterogeneous distribution, thus making traditional plant health management practices unsuitable to actual field conditions. Furthermore, traditional plant pests and diseases detection is based on visible characteristic symptoms of individual plants, and accuracy is further confounded by temporal variability of symptoms (BOCK et al. 2008). Precision agriculture is a management system based on spatial and temporal variability in crop and soil factors within a field (STAFFORD 2000), and it utilizes various sensors and platforms to provide on-time and accurate mapping systems of crops, which facilitate timely and site-specific management decisions.

Given the heterogeneous distribution of plant pests and diseases, optical remote sensing techniques can be considered as a best-fit technology, providing information on disease foci, and infection and infestation severity (GEBBERS and ADAMCHUCK 2007, MAHLEIN 2016). Contemporary optical sensors generate comparatively large amounts of complex data, making remote sensing applications for plant protection an information and technology based domain. Advanced data analysis methods are crucial to effectively utilize remote sensing data for plant pest/disease detection. Regardless of the sensor and application, remote sensing data has to fulfil several criteria in order to be considered of adequate quality for plant pests or disease detection (MAHLEIN 2016). It has to enable: (1) early (i.e. presymptomatic) detection of pests and diseases, (2) differentiation of various pests and diseases, (3) discrimination between abiotic and biotic stress, and (4) quantification of disease or infestation severity. These criteria have to be assessed at least as accurately as with traditional methods, but with shorter computing times. Considering these requirements, machine learning methods are being increasingly employed for data analysis and detection method development (BEHMANN et al. 2014).

Remote sensing is the science of obtaining information about an object or area at a distance, without making physical contact with the object under study, by measuring the reflected or emitted radiation at a distance. Optical sensors utilize the light spectrum

(Figure 1), both natural and artificial, from ultraviolet (wavelengths from 100 to 400 nm), to far infrared ($15 \cdot 10^3$ nm to $350 \cdot 10^3$ nm). Humans can perceive light in the so called visible range, from 400 to 700 nm. Near infrared (NIR) ranges from 700 to 1000 nm, and short-wave infrared from 1000 to 2500 nm (SWIR). Sensors above SWIR wavelengths are considered as pure infrared or thermal sensors, with varying spectral ranges. Light interacts with objects in three ways, reflection, transmission, and absorption (LILLESAND 2004). In addition, as light passes through a medium, such as the atmosphere, it can hit suspended molecules and become scattered. The type and amount of scattering depends on particle size (e.g. particles smaller than the wavelength cause wavelength-dependant Rayleigh scattering, which predominantly scatters blue wavelengths, making the sky to appear blue), and has to be accounted for in remote sensing applications. Optical remote sensing sensors measure the combined effect of the main three phenomena (called spectral reflectance, often also referred to as reflectance), and their ratios at different wavelengths are characteristic for objects (e.g. plants, soil, and water), and enable their identification. This unique and characteristic combined reflectance is called spectral signature, i.e. spectral reflectance as a function of wavelength. The configuration of spectral signatures at various wavelengths depends on canopy optical properties, biophysical and biochemical attributes, illumination, background effects, and viewing geometry (KUPIEC and CURRAN 1995).

Spectral signatures of plants are influenced by several factors, linked to specific areas of the light spectrum. In the visible part of the spectrum (400 – 700 nm), pigments are prevalent (e.g., chlorophyll, carotenoids, anthocyanins). In the near infrared region (NIR, 700 – 1000 nm), leaf morphology and structure influence signatures, while short-wave infrared (SWIR, 1000 – 2500 nm) reflectance is influenced by water and metabolites (e.g., cellulose and proteins) (BEHMAN et al. 2014, MATESE and GENNARO 2015) (Figure 1). Appropriate spectral analyses can detect these changes and can be used to characterize the plant's physiological state, and assess genotype-specific responses to biotic and abiotic stresses (MAHLEIN et al. 2012, WAHABZADA et al. 2015).

2 OPTICAL SENSORS FOR PLANT PEST AND DISEASE DETECTION

Humans observe sunlight using two kinds of photoreceptors in the retina. Rod cells are sensitive to absolute light levels, and cone cells are used for colour vision. Cone cells come in three types (S-cones, M-cones, and L-cones), each more responsive to certain wavelength

of visible light. S-cones are responsive to short-wavelength (blue) light, M-cones to medium-wavelength (green), and L-cones to long-wavelength (red) light. Humans perceive colour as a combination of these three spectral bands. This is also referred to as the

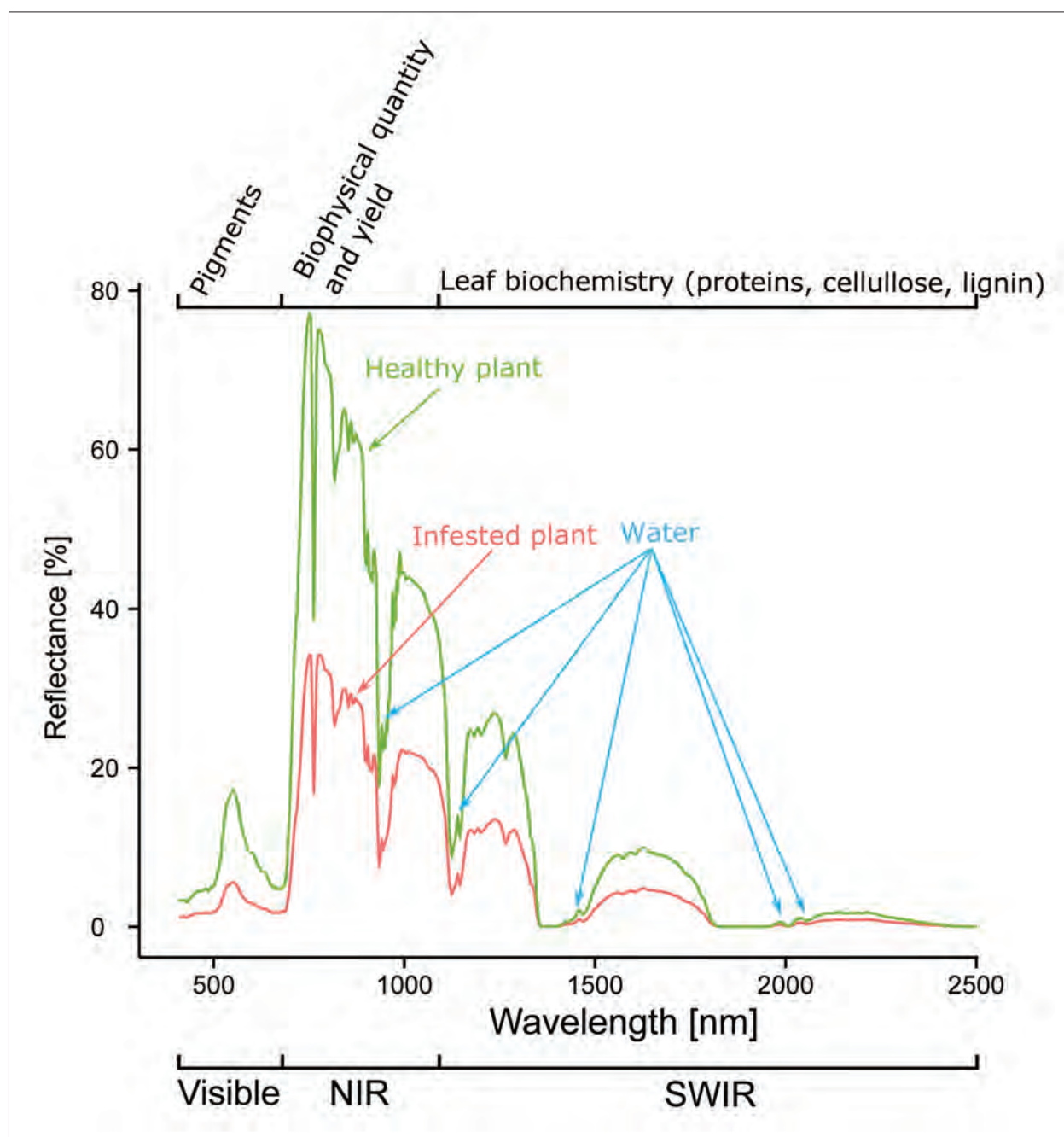


Figure 1: Spectral signatures of healthy and infested plants captured using a hyperspectral imaging sensor (Žibrat, unpublished data). Atmospheric water absorption bands can be observed, due to the high spectral resolution of hyperspectral sensors.

RGB colour system, which we use in electronic appliances (e.g. computer screens).

Optical sensors utilize the same system, by dividing the recorded light into spectral bands of various widths. Depending on the wavelength they record and the number of spectral bands they divide the light into, optical sensors can be classified into five groups: (1) RGB, (2) multispectral, (3) hyperspectral, (4) thermal, and (5) fluorescence imaging sensors. Regardless of the system, a standardized data acquisition step is of utmost importance in order to obtain results with high accuracy and repeatability. Low detection accuracy is often the result of low image quality (e.g. small spatial resolution) and heterogenic (e.g. non-uniform lighting) conditions.

2.1 RGB sensors

Standard, off-the-shelf digital cameras use the RGB (red-green-blue) system, and can be used for disease and pathogen detection. Because they are comparatively easy and cheap to produce, they have become ubiquitous, as almost everyone carries such a device on their mobile phone. RGB sensors can be used on various platforms, from hand-held to satellite mounted, providing information over large areas throughout the growing season.

RGB sensors have been used extensively for plant disease and pathogen detection. NEUMANN et al. (2014) used colour, gray levels, texture, dispersion, connectivity, and shape as features in pattern recognition and machine learning schemes to detect cercospora leaf spot (*Cercospora beticola*), sugar beet rust (*Uromyces betae*), Ramularia leaf spot (*Ramularia beticola*), Phoma leaf spot (*Phoma betae*), and bacterial leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *Aptata*) in sugar beet plants. Similarly, BOCK et al. (2010) enhanced colour information with LAB (L – light, AB – colour-component dimensions), YCBCR (Y – luma component, CB – blue difference, CR – red difference chroma component), and HSV (Hue, Saturation, Value) information to detect Citrus canker (*Xanthomonas axonopodis*) in grapefruit. Texture-related features combined with support vector machines were used for detection of bacterial angular (*Xanthomonas campestris*) and ascochyta blight (*Ascochyta gossypii*) in cotton (CAMARGO and SMITH 2009). Digital image analysis is well-established, and is also being applied in remote sensing of plant diseases and pathogens. Using the shareware software package Scion Image (Scion Corporation), WIJEKON et al. (2008) successfully determined anthracnose (*Colletotrichum destructivum*) infection se-

verity (measured as percent diseased leaf area) in infected tobacco plants.

2.2 Multispectral sensors

Multispectral sensors utilize the RGB bands of visible light, and expand them into the NIR and SWIR spectral regions. Band width varies between sensors; generally shorter wavelengths (RGB) have narrower bandwidths than longer wavelengths (NIR and SWIR). Spatial resolution follows the same pattern. For example, the European Space Agency (ESA) satellite Sentinel-2 has a spatial resolution of 10 m in RGB bands, 10 – 20 m in NIR, and 20 – 60 m in SWIR. Off-the-shelf handheld, UAV-borne (unmanned aerial vehicle) and airborne sensors assess spectral information in up to ten bands. In addition to RGB, VNIR (visible to NIR), and SWIR regions, sensors aimed at agriculture also utilize the red-edge part of the spectrum. In this spectral area, between 700 and 750 nm, plant reflectance changes rapidly, from approximately 5 % to 50 %. Green plants absorb solar radiation in the photosynthetically active radiation (PAR) spectral region (400 – 700 nm), and reflect approximately half of incoming light in the near-infrared spectral region. Chlorophyll is almost transparent at wavelengths greater than 700 nm, while each cell acts as an elementary corner reflector (reflecting light directly back to the source). This effect is extensively used in vegetation indices.

Vegetation indices are spectral transformations of two or more spectral bands. They are designed to enhance vegetation properties and allow spatial and temporal comparisons of photosynthetic activity and canopy structure (HUETE et al. 2000) (Table 1). These spectral indices can be classified into several groups, by various criteria: bandwidth (wide- and narrow-band indices), by number of bands (2 or more), calculation method (ratio or orthogonal), by objective (e.g. pigment indices), or historical development (first or second generation) (BANNARI et al. 1995). One of the most well-known vegetation indices is the Normalized difference vegetation index – NDVI (KRIEGLER et al. 1969). NDVI is related to photosynthetic capacity and therefore to energy absorption of plant canopies (MYNENI et al. 1995). In practice, NDVI has been used for a variety of purposes, e.g. in satellite imagery (LEON et al. 2012, LANORTE et al. 2014, BLAES et al. 2016).

Multispectral imaging has been used extensively in plant protection and health assessment research. For example, these types of sensors have been suc-

Table 1: Examples of broad- and narrow-band vegetation indices (adapted after Calderon et al. 2013 and references therein). In the “Abbreviation and calculation” column “Rn” refers to the reflectance measured at a wavelength of n nanometers.

Vegetation indices	Abbreviation and calculation
Structural indices	
<i>Normalized difference vegetation index</i>	$\text{NDVI} = \frac{R_{800} - R_{670}}{R_{800} + R_{670}}$
<i>Simple ratio</i>	$\text{SR} = \frac{R_{800}}{R_{670}}$
<i>Modified simple ratio</i>	$\text{MSR} = \frac{\frac{R_{800}}{R_{670}} - 1}{\left(\frac{R_{800}}{R_{670}}\right)^{0.5} + 1}$
<i>Modified soil-adjusted vegetation index</i>	$\text{MSAVI} = \frac{2 * R_{800} + 1 - \sqrt{(2 * R_{800} + 1)^2 - 8 * (R_{800} - R_{670})}}{2}$
<i>Modified triangular vegetation index 2</i>	$\text{MTVI2} = \frac{1.5 * (1.2 * (R_{800} - R_{550}) - 2.5 * (R_{670} - R_{550}))}{\sqrt{(2 * R_{800} + 1)^2 - (6 * R_{800} - 5 * \sqrt{R_{670}}) - 0.5}}$
<i>Modified chlorophyll absorption ratio index 2</i>	$\text{MSAVI2} = \frac{1.5 * (2.5 * (R_{800} - R_{670}) - 1.3 * (R_{800} - R_{550}))}{\sqrt{(2 * R_{800} + 1)^2 - (6 * R_{800} - 5 * \sqrt{R_{670}}) - 0.5}}$
Pigment indices	
<i>Transformed chlorophyll absorption in reflectance index</i>	$\text{TCARI} = 3 * (R_{700} - R_{670}) - 2 * (R_{700} - R_{550}) * \frac{R_{700}}{R_{670}}$
<i>Normalized phaeophytinization index</i>	$\text{NPQI} = \frac{R_{415} - R_{735}}{R_{415} + R_{735}}$
<i>Plant senescing reflectance index</i>	$\text{PSRI} = \frac{R_{680} - R_{500}}{R_{750}}$
<i>Pigment specific normalized difference</i>	$\text{PSND}_c = \frac{R_{800} - R_{470}}{R_{800} + R_{470}}$
Photochemical reflectance indices	
<i>Photochemical reflectance index (570)</i>	$\text{PRI}_{570} = \frac{R_{570} - R_{531}}{R_{570} + R_{531}}$
<i>Photochemical reflectance index (670 and 570)</i>	$\text{PRI}_{m4} = \frac{R_{570} - R_{531} - R_{670}}{R_{570} + R_{531} + R_{670}}$
<i>Normalized photochemical reflectance index</i>	$\text{PRI}_n = \frac{\text{PRI}_{570}}{\frac{R_{800} - R_{670}}{\sqrt{R_{800} + R_{670}}} * \frac{R_{700}}{R_{670}}}$

Chlorophyll fluorescence indices

Reflectance curvature index

Colour indices

Redness index

Red/green index

Lichtenthaler index

Plant disease indices

Health index

$$\text{LIC2} = \frac{R_{675} * R_{690}}{R_{683}^2}$$

$$R = \frac{R_{700}}{R_{670}}$$

$$\text{RGI} = \frac{R_{690}}{R_{550}}$$

$$\text{LIC2} = \frac{R_{440}}{R_{690}}$$

$$\text{HI} = \frac{R_{534} - R_{698}}{R_{534} + R_{698}} - \frac{R_{704}}{2}$$

successfully used to detect panicle blast (*Magnaporthe grisea*) in rice (KOBAYASHI et al. 2001), greenbug (*Schizaphis graminum*) infestations in wheat (YANG et al. 2005, 2009), citrus greasy spot disease in citrus (DU et al. 2008), late blight in tomato (ZHANG et al. 2005), aphid (*Diuraphis noxia*) infestations in wheat fields (BACKOULOÛ et al. 2010), soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) (NUTTER et al. 2002), streak mosaic virus in wheat fields (MIRIK et al. 2011), head blight in winter wheat (DAMMER et al. 2011), grapevine yellows (*Flavescence dorée*) in vineyards (ŽIBRAT and KNAPIČ 2015), and light leaf spot (*Pyrenopeziza brassicae*) in winter oilseed rape (*Brassica napus*) (VEYS et al. 2018).

2.3 Hyperspectral sensors

Similarly to multispectral sensors, hyperspectral systems divide the spectrum in bands with a constant width of up to 10 nm, providing a much better spectral resolution. While multispectral vegetation indices can be used with hyperspectral data, and narrow-band indices have been developed (MARSHALL et al. 2016), the large amount of spectral data warrants the use of machine learning and neural networks for data analysis. Principal component analysis is often used as data exploration methods, and has been successfully used to monitor pathogenesis of *Fusarium graminearum* in wheat (BAURIEGEL et al. 2011). Supervised and non-

supervised classification, clustering, self-organizing maps, and support vector machines have all been used for effective plant disease detection (CAMARGO and SMITH 2009, MOSHOÛ et al. 2004, RUMPF et al. 2010). Even though a wide variety of methods have been tested, up to date none of them proved to be superior for all plant health assessment methods (BEHMANN et al. 2014).

In recent years, hyperspectral remote sensing has seen widespread use in plant protection. High spectral resolutions enable not only detection of abiotic and biotic stress, but also chemometric analyses, and identification of wavelengths related to infections and infestations, as well as early (i.e. presymptomatic) detection of infections or infestations (SUSIČ et al. 2018, ZOVKO et al. 2019). Hyperspectral remote sensing has been used to quantify *Rhizoctonia* crown and root rot in sugar beet (REYNOLDS et al. 2012), *Venturia inaequalis* infections in apple (DELIALIEUX et al. 2007), *Phytophthora infestans* in tomato (WANG et al. 2008), combined infections of *Rhizoctonia* and cyst nematodes (*H. schachtii*) in sugar beet (HILLNHÜTTER et al. 2011), *Fusarium* head blight in wheat (BAURIEGEL et al. 2011), and differentiation between drought and biotic stress combined with presymptomatic detection of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infestations in tomato plants (SUSIČ et al. 2018). The latter study led to development of hyperspectral remote sensing pre-processing and analysis guidelines (ŽIBRAT et al. 2019). Furthermore, hyper-

spectral remote sensing is also used for screening fruits and crops to avoid storage disease. For example, MEHL et al. (2004) detected surface defects on apples, ELMASRY et al. (2007) used hyperspectral imaging for detection of strawberry rot, and QIN et al. (2009) developed methods for detection of canker lesions of citrus fruits.

2.4 Thermal sensors

Infrared thermography assesses plant canopy temperature, which is correlated with plant stress and the microclimate in crop stands (JONES et al. 2002, LENTHE et al. 2007). But canopy temperature is also influenced by environmental factors, such as ambient temperature, sunlight, rainfall, and wind. Thermal detection methods therefore need to account for these confounding effects. Effective analyses consider the heterogeneity between and within leaves, i.e. the mean temperature difference within single leaves, plants, and crop stands has to be included. Systemic infections (e.g. *Fusarium* spp.) and root pathogens (e.g. *Rhizoctonia solani*) influence the transpiration rate and water flow of the entire plant or plant organs, leading to higher canopy temperatures. For example, PINTER et al. (1979) were among the first to find 3 – 4 °C higher canopy temperatures in diseased sugar beet and cotton plants. Similarly, NILSSON (1995) found that *Verticillium dahliae* infections caused a canopy temperature increase of 5 -8 °C in oilseed rape. Temperature changes were also observed for *Cercospora beticola* infections in sugar beet, and downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) in cucumbers (OERKE et al. 2006). OERKE et al. (2011) managed to visualize the spatial spread of scab disease (*Venturia inaequalis*) on apples, and GOMEZ (2014) monitored *Peronospora sparsa* infections in *Rosa* varieties.

2.5 Fluorescence imaging

Fluorescence imaging (FI) commonly utilizes a LED or laser light source to assess photosynthetic electron transfer (BAURIEGEL et al. 2014), and photosynthetic activity can be measured by a variety of chlorophyll fluorescence parameters. For disease detection, the empirical fluorescence parameter F_v/F_0 has been proposed for use on dark adapted plants (KUCKENBERG et al. 2007). F_v/F_0 is considered to be a representation of the maximum quantum yield of fluorescence (BUSCHMANN et al. 1999), and has been used as an indicator of photosystem II (PSII) status and may estimate rates of energy transport from PSII to PSI in low-temperature fluorescence (-196 °C; KITAJIMA et al. 1975). Fluorescence imaging requires plants to be prepared according to strict guidelines, and can therefore be challenging to implement in agricultural greenhouses or fields.

Nevertheless, FI is considered to be an effective tool for examining the development and effects of bacterial, fungal, and viral infections on leaves of cultivated plants (DALEY 1995). BÜRLING et al. (2011) used FI to differentiate between nitrogen deficiency and powdery mildew in wheat. By combining FI and image analysis, KONANZ et al. (2014) achieved successful discrimination and quantification of fungal infections and nitrogen deficiency in sugar beet, grapes, and barley. FI was also used to assess heat stress (WANG et al. 2011), nutrient deficiencies (TARTACHNYK et al. 2006), leaf rust (BÜRLING et al. 2010), and leaf blotch (ROBERT et al. 2006). Early detection is also possible, for example leaf rust and powdery mildew infections on wheat leaves (KUCKENBERG et al. 2007). Infections by *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana* can be detected a few hours after inoculation (MATOUS et al. 2006), while leaf rust and mildew on winter wheat could be detected merely a few days prior to development of visible symptoms (KUCKENBERG et al. 2009).

3 FUTURE PERSPECTIVES

This review demonstrates the applicability of different optical remote sensing methods for detecting and differentiating abiotic and biotic stress in plants. Fluorescence imaging and thermography are sensitive to early stress responses in plants, but cannot identify specific diseases. The latter is possible using RGB, multi-, and hyperspectral sensors. A comparatively large amount of information regarding remote sensing of plant diseases and pathogens has been generated. The accumulation of large amounts of data has led to the introduc-

tion and development of novel analysis methods, such as machine learning and neural networks.

In order to become truly useable in field and greenhouse conditions, any novel remote sensing research should also focus on combined abiotic and biotic stress. Visible symptoms in the canopy are often similar, or possibly identical, and visual identification of individual plants doesn't yield satisfactory results. Remote sensing methods provide a good alternative, and can be adapted to different platforms. Further-

more, presymptomatic detection would facilitate precision agriculture and integrated pest management approaches at field and greenhouse levels, by enabling timely and accurate management practices. Further-

more, best results can be obtained by combining different sensors and advanced analysis methods, even though individual sensors can achieve comparatively good results.

ACKNOWLEDGMENTS

Preparation of this review paper was financially supported by the Slovenian Research Agency (ARRS), grant P4-0072, and the European Food Safety Authority (EFSA), grant GP/EFSA/ALPHA/2018/02. Some of

the research was conducted using equipment financed by EU-FP7 project CropSustaIn, grant agreement FP7-REGPOT-CT2012-316205.

POVZETEK

Tradicionalne prakse zatiranja rastlinskih bolezní in škodljivcev predpostavljajo njihovo homogeno prostorsko razporeditev na poljih, vendar so bolezní in škodljivci v prostoru pogosto razporejeni heterogeno. Tradicionalni pristopi varstva rastlin velikokrat temeljijo na vidnih simptomih, za kar je potrebno redno pregledovanje posameznih rastlin. Postopki so zato lahko dolgotrajni in dragi. Natančno kmetijstvo je sistem upravljanja, ki temelji na zagotavljanju natančnih prostorskih in časovnih podatkov različnih rastnih dejavnikov ter razvoja in stanja rastlin. Pri tem uporablja različne senzorce z različnih platform, ki omogočajo pravočasno in prostorsko natančno ukrepanje.

Glede na heterogeno prostorsko porazdelitev rastlinskih škodljivcev in bolezní je daljinsko zaznavanje z optičnimi senzorji najprimernejša tehnologija, ki zagotavlja informacije o žariščih ter jakosti okužb. Napredne metode za analizo podatkov so ključne za učinkovito uporabo podatkov daljinskega zaznavanja za odkrivanje rastlinskih škodljivcev in bolezní. Ne glede na senzor in aplikacijo morajo podatki pridobljeni z daljinskim zaznavanjem izpolnjevati več meril, da jih lahko uporabljamo za določanje rastlinskih bolezní in škodljivcev. Omogočiti morajo: (1) zgodnje odkrivanje škodljivih organizmov in bolezní, (2) ločevanje različnih škodljivcev in bolezní, (3) ločiti morajo med abiotским in biotičnim stresom in (4) kvantifikacijo bolezní ali jakosti okužbe. Ta merila morajo oceniti najmanj tako natančno kot s tradicionalnimi metodami, vendar s krajšimi časi obdelave podatkov. Glede na te zahteve vse pogosteje uporabljamo metode strojnega učenja za analizo podatkov in razvoj metod za določevanje bolezní.

Daljinsko zaznavanje je znanost o pridobivanju informacij o predmetih ali območju na daljavo, brez fi-

zičnega stika med senzorjem in predmetom, ki ga proučujemo. Optični senzorji izkoriščajo svetlobni spekter, tako naravnega kot umetnega, od ultravijoličnega (valovne dolžine od 100 do 400 nm) do dolgovalovne infrardeče svetlobe ($15 \cdot 10^3$ nm do $350 \cdot 10^3$ nm). Ljudje zaznavamo svetlobo v tako imenovanem vidnem razponu, od 400 do 700 nm. Bližnje-infrardeča svetloba (NIR) sega od 700 do 1000 nm in kratkovalovna infrardeča svetloba od 1000 do 2500 nm (SWIR). Čisti infrardeči oziroma toplotni senzorji zajemajo elektromagnetno sevanje pri večjih valovnih dolžinah kot so valovne dolžine v območju SWIR-a. Med predmeti in svetlobo so možne tri interakcije, odboj, presevanje in absorpcija. Ob prehodu skozi medije, kot je atmosfera, se svetloba sipa zaradi interakcij z molekulami. Vrsta in jakost sipanja sta odvisni od velikosti delcev (npr. delci manjši od valovne dolžine povzročajo Rayleighovo sipanje, ki je odvisno od valovne dolžine), kar moramo upoštevati pri metodah daljinskega zaznavanja. Optični senzorji merijo skupni učinek glavnih treh interakcij (t.i. spektralni odboj, ki se pogosto imenuje tudi odbojnost), njihova razmerja na različnih valovnih dolžinah pa so značilna za objekte (npr. rastline, tla in vodo) in omogočajo njihovo identifikacijo. Tej edinstveni in značilni odbojnosti pravimo spektralni podpis, t.j. spektralna odbojnost kot funkcija valovne dolžine. Spektralni podpisi so odvisni od optičnih lastnosti nadzemnih delov rastlin, biofizikalnih in biokemičnih lastnosti, osvetlitve, ozadja in geometrije med senzorjem in objektom.

Optične senzorce delimo na pet skupin: RGB, multispektralni, hiperspektralni, termalni in fluorescenčni senzorji. Čeprav je zaznavanje bolezní in škodljivcev možno s senzorji vseh petih skupin, je izbira senzorca odvisna od platforme (npr. v rastlinjaku, brezpilotni le-

talnik, letalo, satelit) in željene natančnosti. Na primer, RGB senzorji omogočajo določanje prisotnosti bolezni, ki povzročajo spremembe na listih, njihova uporabnost za določanje okužb pred razvojem vidnih simptomov pa je omejena. Slednje omogočajo multi- in hiperspektralni ter toplotni senzorji. Te štiri skupine senzorjev lahko tudi uporabljamo na večjih razdaljah (na primer na letalu), z naravno osvetlitvijo. Senzorji fluorescence omogočajo natančno določanje bolezni, vendar zahtevajo natančno pripravo vzorcev in ustrezno umetno osvetlitev. Zato so primerni za uporabo na omejenih površinah, na primer v rastlinjakih in laboratorijih.

Dosedanje raziskave daljinskega zaznavanja za določanje rastlinskih bolezni in škodljivcev so se osredo-

točale na posamezne bolezni. Bodoče raziskave daljinskega zaznavanja se bodo morale osredotočiti na mešane okužbe in kombinirane biotske in abiotske strese. Vidni znaki biotskih in abiotskih stresov so pogosto podobni, če ne celo povsem enaki, vizualna identifikacija posameznih rastlin pa pogosto ne daje zadovoljivih rezultatov. Metode daljinskega zaznavanja so dobra alternativa in jih je mogoče prilagoditi različnim platformam. Poleg tega omogočajo določanje stresorjev pred razvojem vidnih znakov, kar olajša natančno kmetovanje in integrirane varstvo rastlin. Čeprav lahko posamezni senzorji dosežejo zadovoljive rezultate, lahko z združevanjem različnih senzorjev in naprednih analiznih metod rezultate izboljšamo.

REFERENCES

- BACKOLOU, G.F., N.C. ELLIOT, K. GILESA, M. PHOOFLOA, V. CATANA, 2010. Development of a method using multispectral imagery and spatial pattern metrics to quantify stress to wheat field caused by *Diuraphis noxia*. *Computers and electronics in agriculture* 75: 64-70. doi: 10.1016/j.compag.2010.09.011
- BANNARI, A., D. MORIN, F. BONN, A.R. HUETE, 1995. *A review of vegetation indices. Remote sensing reviews* 13(1-2): 95-120. doi:10.1080/02757259509532298.
- BAURIEGEL, E., H. BRABANDT, U. GÄRBER, W.B. HERPPICH, 2014. Chlorophyll fluorescence imaging to facilitate breeding of *Bremia lactucae* resistant lettuce cultivars. *Computers and electronics in agriculture* 105: 74-82.
- BAURIEGEL, E., A. GIEBEL, M. GEYER, U. SCHMIDT, W.B. HERPPICH, 2011. Early detection of *Fusarium* infection in wheat using hyperspectral imaging. *Computers and electronics in agriculture* 75: 304-312.
- BEHMANN, J., A.-K. MAHLEIN, T. RUMPF, C. RÖMER, L. PLÜMER, 2014. A review of advanced machine learning methods for the detection of biotic stress in precision crop protection. *Precision agriculture* 16: 239-260.
- BLAES, X., G. CHOMÉ, M.-J. LAMBERT, P. TRAORÉ, A. SCHUT, P. DEFOURNY, 2016. *Quantifying fertilizer application response variability with VHR satellite NDVI time series in a rainfed small holder cropping system of Mali. Remote sensing* 8: 531.
- BOCK, C.H., P.E. PARKER, A.Z. COOK, T.R. GOTTWALD, 2008. Visual rating and the use of image analysis for assessing different symptoms of citrus canker on grapefruit leaves. *Plant Disease* 92: 530-541.
- BOCK, C.H., G.H. POOLE, P.E., PARKER, T.R. GOTTWALD, 2010. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. *Critical reviews in plant science* 29: 59-107.
- BUSCHMANN, C., S. BILKE, A. BUTTERER, A. ENK, T. LÄNGLE, O. WENZEL, H.K. LICHTENTHALER, 1999. *Einfluß von Trockenstreß auf die Photosyntheseaktivität verschiedener Ökotypen der Buche (Fagus sylvatica L.)—Unterschiede in der Trockenstressempfindlichkeit. In Berichtsreihe zum Statusseminar der Baden-Württemberg-Projektträgerschaft "Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung" (BW-PLUS), FZKA-BWPLUS 15, Diskussionskreis; Botanisches Institut II, Universität Karlsruhe, Leopoldshafen, Germany: 1-12.*
- BÜRLING, K., M. HUNSCH, G. NOGA, 2010. Quantum yield of non-regulated energy dissipation in PSII (Y(NO)) for early detection of leaf rust (*Puccinia triticina*) infection in susceptible and resistant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Precision agriculture* 11: 703-716.
- BÜRLING, K., M. HUNSCH, G. NOGA, 2011. Use of blue-green and chlorophyll fluorescence measurements for differentiation between nitrogen deficiency and pathogen infection in winter wheat. *Journal of plant physiology* 168: 1641-1648.
- CALDERÓN, R., J.A. NAVAS-CORTÉS, S. LUCENA, P.J. ZARCO-TEJADA, 2013. High-resolution airborne hyperspectral and thermal imagery for early detection of *Verticillium* wilt of olive using fluorescence, temperature and narrow-band spectral indices. *Remote sensing of the environment* 139: 231-245. doi: 10.1016/j.rse.2013.07.031
- CAMARGO, A. & J.S. SMITH, 2009. Image pattern classification for the identification of disease causing agents in plants. *Computers and electronics in agriculture* 66: 121-125.

- DALEY, P.F. 1995. Chlorophyll fluorescence analysis and imaging in plant stress and disease. *Canadian journal of plant physiology* 17: 167–173.
- DAMMER, K.H., B. MOELLER, B. RODEMANN, D. HEPPNER, 2011. Detection of head blight (*Fusarium* spp.) in winter wheat by color and multispectral image analyses. *Crop Protection* 30: 420–428.
- DELIALIEUX, S., J.V. AARDT, W. KEULEMANS, E. SHREVEVS, P. COPPIN, 2007. Detection of biotic stress (*Venturia inaequalis*) in apple trees using hyperspectral data: Non-parametric statistical approaches and physiological implications. *European journal of agronomy* 27: 130–143.
- DU, Q., N.B. CHANG, C. YANG, K.R. SRILAKSHMI, 2008. Combination of multispectral remote sensing, variable rate technology and environmental modelling for citrus pest management. *Journal of environmental management* 86: 25–26.
- ELMASRY, G., N. WANG, A. ELSAYED, M. NGADI, 2007. Hyperspectral imaging for nondestructive determination of some quality attributes for strawberry. *Journal of food engineering* 81: 98–107.
- GEBBERS, R. & V.I. ADAMCHUCK, 2010. Precision agriculture and food security. *Science* 327: 828–831.
- MAHLEIN, A.-K. 2016. Plant disease detection by imaging sensors – Parallels and specific demands for precision agriculture and plant phenotyping. *Plant disease* 100(2): 241–251.
- GOMEZ, S., 2014. Infection and spread of *Peronospora sparsa* on *Rosa* sp. (Berk.) - a microscopic and a thermographic approach. Dissertation, University of Bonn, Germany.
- HILLNHÜTTER, C., A.-K. MAHLEIN, R.A. SIKORA, E.-C. OERKE, 2011. Remote sensing to detect plant stress induced by *Heterodera schachtii* and *Rhizoctonia solani* in sugar beet fields. *Field crops research* 122: 10–77.
- HUETE, A., K. DIDAN, T. MIURA, E.P. RODRIQUEZ, X. GAO, L.G. FERRERIA, 2000. *Overview of the radiometric and biophysical performance of the MODIS vegetation indices. Remote sensing of the environment* 83(5): 195–213. doi:10.1006/anbo.2000.1262.
- JONES, H.G., M. STOLL, T. SANTOIA, C. DE SOUSA, M.M. CHAVES, O.M. GRANT, 2002. *Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: Application to grapevine. Journal of experimental botany* 53: 2249–2260.
- KITAJIMA, M. & W.L. BUTLER, 1975. Excitation spectra for photosystem-I and photosystem-II in chloroplasts and spectral characteristics of distribution of quanta between 2 photosystems. *Biochimica et biophysica acta* 408: 297–305.
- KOBAYASHI, T., E. KANDA, K. KITANDA, K. ISHIGURO, Y. TORIGOE, 2001. *Detection of rice panicle blast with multi-spectral radiometer and the potential of using airborne multispectral scanners. Phytopathology* 91: 316–323.
- KRIEGLER, F.J., W.A. MALILA, R.F. NALEPKA, W. RICHARDSON, 1969. *Preprocessing transformations and their effects on multispectral recognition. Proceedings of the Sixth International Symposium on Remote Sensing of Environment: 97–131.*
- KUCKENBERG, J., I. TARTACHNYK, G. NOGA, 2009. Temporal and spatial changes of chlorophyll fluorescence as a basis for early and precise detection of leaf rust and powdery mildew infections in wheat leaves. *Precision agriculture* 10: 34–44.
- KUCKENBERG, J., I. TARTACHNYK, M. SCHMITZ-EIBERGER, G. NOGA, 2007. Early detection of leaf rust and powdery mildew infections on wheat leaves by PAM fluorescence imaging. *Precision agriculture* 8: 515–521.
- KUPIEC, J.A. & P.J. CURRAN, 1995. *Decoupling effects of the canopy and foliar biochemicals in AVIRIS spectra. Journal of remote sensing* 16: 1731–1739.
- LANORTE, A., R. LASAPONARA, M. LOVALLO, L. TELESKA, 2014. Fisher–Shannon information plane analysis of SPOT/VEGETATION normalized difference vegetation index (NDVI) time series to characterize vegetation recovery after fire disturbance. *International journal of applied earth observation and geoinformatics* 26: 441–446.
- LENTHE, J.-H., E.-C. OERKE, H.-W. DEHNE, 2007. *Digital infrared thermography for monitoring canopy health of wheat. Precision agriculture* 8: 15–26.
- LEON, J.R.R., W.J.D. VAN LEEUWEN, G.M. CASADY, 2012. *Using MODIS-NDVI for the modelling of post-wildfire vegetation response as a function of environmental conditions and pre-fire restoration treatments. Remote sensing* 4: 598–621.
- LILLESAND, T.M., R.W. KIEFER, T.W. CHIPMAN, 2004. *Remote sensing and image interpretations.* Wiley, Hoboken.
- MAHLEIN, A.-K., E.-C. OERKE, U. STEINER, H.-W. DEHNE, 2012. Recent advances in sensing plant diseases for precision crop protection. *European Journal of Plant pathology* 133: 197–209.

- MARSHALL, M., P. THENKABAIL, T. BIGGS, K. POST, 2016. Hyperspectral narrowband and multispectral broadband indices for remote sensing of crop evapotranspiration and its components (transpiration and soil evaporation). *Agricultural and forest meteorology* 218-219: 122-134. doi: dx.doi.org/10.1016/j.agrformet.2015.12.025
- MATESE, A., D.F. GENNARO, 2015. Technology in precision viticulture: a state of the art review. *International journal of wine research* 7: 69-81. doi: 10.2147/IJWR.S69405
- MATOUS, K., Z. BENEDIKTYOVA, S. BERGER, T. ROITSCH, L. NEDBAL, 2006. Case study of combinatorial imaging: What protocol and what chlorophyll fluorescence image to use when visualizing infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae*? *Photosynthesis research* 90: 243-253.
- MEHL, P.M., Y.-R. CHEN, S.M. KIM, D.E. CHAN, 2004. Development of hyperspectral imaging technique for the detection of apple surface defects and contaminations. *Journal of food engineering* 61: 67-81.
- MIRIK, M., D.C. JONES, J.A. PRICE, F. WORKNEH, R.J. ANSLEY, C.M. RUSH, 2011. Satellite remote sensing of wheat infected by wheat streak mosaic virus. *Plant disease* 95: 4-12.
- MOSHOU, D., C. BRAVO, J. WEST, S. WAHLEN, A. MCCARTNEY, H. RAMON, 2004. Automatic detection of yellow rust in wheat using reflectance measurements and neural networks. *Computers and electronics in agriculture* 44: 173-188.
- MYNENI, R.B., F.G. HALL, P.J. SELLERS, A.L. MARSHAK, 1995. The interpretation of spectral vegetation indexes, *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 33: 481-486.
- NEUMANN, M., L. HALLAU, B. KLATT, K. KERSTING, C. BAUCKHAGE, 2014. Erosion band features for cell phone image based plant disease classification. In: *Proceeding of the 22nd International Conference on Pattern Recognition (ICPR)*, Stockholm, Sweden: 3315-3320.
- NILSSON, H.-E., 1995. Remote sensing and imaging analysis in plant pathology. *Canadian journal of plant pathology* 17: 154-166.
- NUTTER, F.W., G.L. TYLKA, J. GUAN, A.J.D. MOREIRA, C.C. MARETT, T.R. ROSBURG, J.P. BASART, C.S. CHONG, 2002. Use of remote sensing to detect soybean cyst nematode-induced plant stress. *Journal of Nematology* 34 (3): 222-231.
- OERKE, E.-C., P. FRÖHLING, U. STEINER, 2011. Thermographic assessment of scab disease on apple leaves. *Precision agriculture* 12: 699-715.
- OERKE, E.-C., U. STEINER, H.-W. DEHNE, M. LINDENTHAL, 2006. Thermal imaging of cucumber leaves affected by downy mildew and environmental conditions. *Journal of experimental botany* 57: 2121-2132.
- PINTER, P.J., M.E. STANGHELLINI, R.J. REGINATO, S.B. IDSO, A.D. JENKINS, R.D. JACKSON, 1979. *Remote detection of biological stresses in plants with infrared thermometry. Science* 205: 585-587.
- QIN, J., T.F. BURKS, M.A. RITENOUR, W.G. BONN, 2009. Detection of citrus canker using hyperspectral reflectance imaging with spectral information divergence. *Journal of food engineering* 93: 183-191.
- REYNOLDS, G.J., C.E. WINDELS, I.V. MACRAE, S. LAGUETTE, 2012. Remote sensing for assessing *Rhizoctonia* crown and root rot severity in sugar beet. *Plant disease* 96: 497-505.
- ROBERT, C., M.O. BANCAL, C. LANNOU, B. NEY, 2006. Quantification of the effects of *Septoria tritici* blotch on wheat leaf gas exchange with respect to lesion age, leaf number, and leaf nitrogen status. *Journal of experimental botany* 57: 225-234.
- RUMPF, T., A.-K. MAHLEIN, U. STEINER, E.-C. OERKE, H.-W. DEHNE, L. PLÜMER, 2010. Early detection and classification of plant diseases with Support Vector Machines based on hyperspectral reflectance. *Computers and electronics in agriculture* 74: 91-99.
- STAFFORD, J.V., 2000. Implementing precision agriculture in the 21st century. *Journal of agricultural engineering research* 76: 267-275.
- SUSIČ, N., U. ŽIBRAT, S. ŠIRCA, P. STRAJNAR, J. RAZINGER, M. KNAPIČ, A. VONČINA, G. UREK, B. GERIČ STARE, 2018. Discrimination between abiotic and biotic drought stress in tomatoes using hyperspectral imaging. *Sensors and actuators B: Chemical* 273: 842-852. doi:10.1016/j.snb.2018.06.121.
- TARTACHNYK, I.I., I. RADEMACHER, W. KUEHBAUCH, 2006. Distinguishing nitrogen deficiency and fungal infection of winter wheat by laser-induced fluorescence. *Precision agriculture* 7: 281-293.
- VEYS, C., C. FOKION, A. ALSUWADI, J. HIBBERT, M. HANSEN, G. BERNOTAS, M. SMITH, H. YIN S. ROLFE, B. GRIEVE, 2018. Multispectral imaging for presymptomatic analysis of light leaf spot in oilseed rape. *Plant methods* 14: 4. doi: doi.org/10.1186/s13007-019-0389-9
- WAHABZADA, M., A.-K. MAHLEIN, C. BAUCKHAGE, M. STEINER, E.-C., OERKE, K. KERSTING, 2015. *Metro maps of plant disease dynamics — automated mining of differences using hyperspectral images. PLoS One* 10(1): e0116902. doi: 10.1371/journal.pone.0116902

- WANG, X., J. CAI, D. JIANG, F. LIU, T. DAI, W. CAO, 2011. *Pre-anthesis high-temperature acclimation alleviates damage to the flag leaf caused by post-anthesis heat stress in wheat*. *Journal of plant physiology* 168: 585–593.
- WANG, X., M. ZHANG, J. ZHU, S. GENG, 2008. Spectral prediction of *Phytophthora infestans* infection on tomatoes using artificial neural network (ANN). *International journal of remote sensing* 29: 1693-1706.
- WIJEKON, C. P., P.H. GOODWIN, T. HSIANG, 2008. Quantifying fungal infection of plant leaves by digital image analysis using Scion Image software, *Journal of microbiological methods* 74: 94-101.
- YANG, Z., M.N. RAO, N.C. ELLIOTT, S.D. KINDLER, T.W. POPHAM, 2005. Using ground-based multispectral radiometry to detect stress in wheat caused by greenbug (Homoptera: Aphididae) infestation. *Computers and electronica in agriculture* 47: 121-135.
- YANG, Z., M.N. RAO, N.C. ELLIOTT, S.D. KINDLER, T.W. POPHAM, 2009. Differentiating stress induced by green bugs and Russian wheat aphids in wheat using remote sensing. *Computers and electronica in agriculture* 67: 64-70.
- ZHANG, M., Z. QIN, X. LIU, 2005. Remote sensed spectral imagery to detect late blight in field tomatoes. *Precision agriculture* 6: 489-508.
- ZOVKO, M., U. ŽIBRAT, M. KNAPIČ, M. BUBALO KOVAČIČ, D. ROMIĆ, 2019. Hyperspectral remote sensing of grapevine drought stress. *Precision agriculture* 20(2): 335-347. doi: doi.org/10.1007/s11119-019-09640-2
- ŽIBRAT, U., N. SUSIČ, M. KNAPIČ, S. ŠIRCA, P. STRAJNAR, J. RAZINGER, A. VONČINA, G. UREK, B. GERIČ STARE, 2019. *MethodsX* 6: 399-408. doi: doi.org/10.1016/j.mex.2019.02.022
- ŽIBRAT, U. & M. KNAPIČ, 2015. Remote sensing of grapevine yellows. In: Čeh, B. (ed.), *New challenges in agronomy: proceedings of symposium, Slovenian agronomical society, Ljubljana*: 245-251.

12 LET (2005-2017) RAZISKOVALNEGA IN STROKOVNEGA DELA NA PODROČJU ZATIRANJA SKLADIŠČNIH ŠKODLJIVCEV V SLOVENIJI

TWELVE YEARS (2005-2017) OF SCIENTIFIC AND PROFESSIONAL WORK IN THE FIELD OF STORED PRODUCTS PESTS PROTECTION IN SLOVENIA

Stanislav TRDAN¹ & Tanja BOHINC¹

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0058>

IZVLEČEK

12 let (2005-2017) raziskovalnega in strokovnega dela na področju zatiranja skladiščnih škodljivcev v Sloveniji

Začetki poglobljenega znanstvenega in strokovnega dela na področju zatiranja skladiščnih škodljivcev v Sloveniji segajo v leto 2005, ko smo v okviru raziskav na področju preučevanja učinkovitosti entomopatogenih ogorčic v laboratorijskih razmerah ugotavljali njihovo delovanje na črnega žitnega žužka (*Sitophilus granarius*) in surinamskega molarja (*Oryzaephilus surinamensis*). Leta 2007 smo bili povabljeni kot partnerji v projekt SEE-ERA.NET Development of a non-toxic, ecologically compatible, natural-resource based insecticide from diatomaceous earth deposits of South Eastern Europe to control stored-grain insect pests, kjer smo se pod koordinatstvom C. Athanassiou-a prvič seznanili z raziskovalnim delom na področju preučevanja učinkovitosti diatomejske zemlje na hrošče iz rodu *Sitophilus*. Različne aspekte raziskav na področju diatomejske zemlje (vpliv geokemične sestave in abiotičnih dejavnikov na njeno učinkovitost, učinkovitost samostojne in kombinirane uporabe, delovanje na različne vrste škodljivcev idr.) smo ohranili do danes. Z namenom primerjave učinkovitosti z diatomejsko zemljo smo na različnih škodljivih hroščih preučevali insekticidno delovanje kremeno-vega peska in entomopatogenih ogorčic iz Slovenije, rastlinskega praha in eteričnih olj, v zadnjih letih pa v tej zvezi največ časa namenjamo lesnemu pepelu in zeolitom, ki kažejo zadovoljivo delovanje pri zatiranju hroščev iz rodu *Sitophilus*. V navedenem obdobju smo preučili sezonsko dinamiko krhljevega molja (*Plodia interpunctella*), močne vešče (*Ephestia kuehniella*) in koruznega molja (*Sitotroga cerealella*) v skladiščih žita, kjer smo iskali tudi morebitne domorodne naravne sovražnike skladiščnih škodljivcev. Našli smo parazitoida *Anisopteromalus calandrae* in *Dibrachys microgastri*. Leta 2017 smo bili organizatorji 11th Conference of the IOBC/wprs Working Group on Inte-

ABSTRACT

Twelve years (2005-2017) of scientific and professional work in the field of stored products pests protection in Slovenia

Scientific and professional work in the field of stored products pests protection in Slovenia began in 2005, when we tested the efficacy of entomopathogenic nematodes against the granary weevil (*Sitophilus granarius*) and the sawtoothed grain beetle (*Oryzaephilus surinamensis*) adults under laboratory conditions. In 2007, we participated as partners in the project SEE-ERA.NET "Development of a non-toxic, ecologically compatible, natural-resource based insecticide from diatomaceous earth deposits of South Eastern Europe to control stored-grain insects pests" (coordinated by C. Athanassiou), and we thus became acquainted with the research work in the field of investigation the efficacy of diatomaceous earth in controlling beetles from the *Sitophilus* genus. We have continued the research of different aspects of diatomaceous earth (the influence of geochemical composition and abiotic factors on its efficiency, the effects of individual and combined application, the effects on various harmful insect pests, etc.). In search for comparable substances to diatomaceous earth (regarding the efficacy), we have studied insecticidal effects of quartz sand and entomopathogenic nematodes from Slovenia, plant powders and essential oils on various harmful beetles. In the recent years, our research work has been mainly dedicated to studying the efficacy of wood ash and zeolites as natural insecticides, which have demonstrated sufficient efficiency in suppressing *Sitophilus* beetles. In the same period, we studied the seasonal dynamics of the Indian mealmoth (*Plodia interpunctella*), the Mediterranean flour moth (*Ephestia kuehniella*) and the Angoumois grain moth (*Sitotroga cerealella*) in cereal stores, where we were also searching for possible indigenous natural enemies of stored product insects pests. We have confirmed the occurrence of two parasitoids, *Anisopteromalus calandrae* and *Dibrachys microgastri*. In

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Dept. of Agronomy, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia.
E-mails: stanislav.trdan@bf.uni-lj.si, tanja.bohinc@bf.uni-lj.si

grated Protection of Stored Products (Ljubljana, 3.-5. julij), ki se je udeležilo 136 udeležencev iz 25 držav, tudi domačo strokovno javnost pa izobražujemo o škodljivosti in možnih načinih zatiranja skladiščnih škodljivcev. V tej zvezi smo leta 2014 organizirali delavnico »Od tehnološke zrelosti do skladiščenja žit in stročnic«, leta 2015 pa smo v okviru 12. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo na Ptuju gostili C. Athanassiou-a kot vabljenega predavatelja. V zadnjih letih v sodelovanju s strokovnjaki iz drugih držav preučujemo tudi delovanje okoljsko sprejemljivejših insekticidov (spinosad, spinetoram) in vpliv tehnologij pridelave žita na njegovo občutljivost na napad škodljivih hroščev iz rodu *Sitophilus*, sodelujemo pa tudi pri preučevanju učinkovitosti novih formulacij insekticidnih pripravkov. V prispevku bo podana kronologija aktivnosti na navedenem področju našega dela.

Ključne besede: skladiščni škodljivci, Slovenija, raziskovalno delo, strokovno delo

2017, we have organized the 11th Conference of the IOBC/wprs Working Group on Integrated Protection of Stored Products (Ljubljana, 3-5 July), which was attended by 136 participants from 25 countries. We also transfer knowledge to Slovenian agricultural specialists about the harmfulness and possible ways of controlling stored products insects pests. In 2014, we have organized a workshop on this topic ("From Technological Maturity to Storing of Cereals and Legumes"). In 2015, we have hosted C. Athanassiou as an invited lecturer at the 12th Slovenian Conference on Plant Protection with international participation in Ptuj. In recent years, we have been working with experts from other countries with the aim of studying the efficacy of environmentally acceptable insecticides (spinosad, spinetoram) and the influence of cereal production technologies on grains' susceptibility to attack by *Sitophilus* beetles. Furthermore, we participate in the research regarding the efficiency of new formulations of insecticidal preparations. The paper presents the chronology of activities in this area of our work.

Keywords: stored products pests, Slovenia, scientific work, professional work

1 UVOD

V Sloveniji smo se sistematično začeli ukvarjati z raziskovalnim in strokovnim delom na področju zatiranja skladiščnih škodljivcev leta 2005, ko smo izbrane skladiščne hrošče v laboratorijskih razmerah izpostavili entomopatogenim ogorčicam, katerih delovanje smo tedaj preizkušali na različnih vrstah škodljivih žuželk.

V naslednjih 12 letih smo tudi s pomočjo tujih strokovnjakov spekter naših raziskav s skladiščnimi škodljivci razširili na druga področja, predvsem na področja njihovega zatiranja s snovmi naravnega izvora. V nadaljevanju predstavljamo rezultate našega dela in popoln pregled referenc na tem področju.

2 KRONOLOGIJA RAZISKOVALNEGA IN STROKOVNEGA DELA NA PODROČJU ZATIRANJA SKLADIŠČNIH ŠKODLJIVCEV

2.1 Prvi poskusi ali uporaba entomopatogenih ogorčic za zatiranje skladiščnih hroščev

Štiri vrste entomopatogenih ogorčic (*Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*, *Heterorhabditis bacteriophora* in *H. megidis*) smo preučevali v laboratorijskih razmerah, da bi preučili njihovo učinkovitost pri zatiranju odraslih osebkov dveh vrst skladiščnih hroščev, črnega žitnega žužka (*Sitophilus granarius*) in zobatega žitnika (*Oryzaephilus surinamensis*). Delovanje ogorčic smo preizkušali pri treh koncentracijah (500, 1000 in 2000 infektivnih ličink [IL] na osebek) in temperaturah (15, 20 in 25°C). Pri črnem žitnem žužku smo ugotovili višjo smrtnost kot pri zobatem žitniku. Ogorčica *Heterorhabditis megidis* je bila najmanj učinkovita pri zatiranju obeh škodljivcev, med ostalimi tremi vrstami biotičnih agensov pa nismo potrdili razlik v de-

lovanju. S poskusom smo dokazali, da so bile entomopatogene ogorčice najbolj učinkovite pri zatiranju vrste *S. granarius* pri 20°C (LC₅₀ po 7 dneh je bila 803-1195 IL/osebek) in 25°C (LC₅₀ 505-1175 IL/osebek). Zadovoljivo delovanje ogorčic na vrsto *O. surinamensis* so ugotovili pri 20°C (LC₅₀ 921-1335 IL/osebek). Koncentracija suspenzije ogorčic je bila malo pomemben dejavnik njihove učinkovitosti pri zatiranju obeh vrst hroščev. Čeprav uporaba entomopatogenih ogorčic pri zatiranju skladiščnih škodljivcev trenutno še ni mogoča v praksi, pa bi jih bilo mogoče v prihodnje v ta namen uporabljati skupaj z nekaterimi drugimi (biotehniškimi) metodami (TRDAN et al., 2005; TRDAN et al., 2006).

V laboratorijskih razmerah smo preizkušali tudi učinkovitost treh novih ras (B30, B49 and 3162) entomopatogene ogorčice *Steinernema feltiae* pri zatiranju

odraslih osebkov riževega žužka (*Sitophilus oryzae*). Namen naše raziskave je bil preučiti njihovo delovanje na enega od najpomembnejših primarnih skladiščnih škodljivcev, saj bi z uporabo preučevanih biotičnih agensov lahko vplivali na manjše pojavljanje odpornosti tega škodljivca na sintetične insekticide. Patogenost ogorčic smo ugotavljali pri štirih temperaturah (15, 20, 25 in 30°C) in petih koncentracijah suspenzije (125, 250, 500, 1000 in 2000 IJs/osebek). Smrtnost hroščev smo določali 4., 6. in 8. dan po izpostavitvi različnim rasam ogorčic. Rezultati raziskave so pokazali, da so bile vse rase najbolj patogene (42-72 % smrtnost hroščev) pri 25°C in najvišji koncentraciji suspenzije ogorčic, medtem ko smo najmanjšo patogenost (6-11 %) potrdili pri 30°C in najnižji koncentraciji suspenzije ogorčic. Ugotovili smo, da so lahko entomopatogene ogorčice pri visoki koncentraciji suspenzije učinkoviti biotični agensi pri zatiranju odraslih osebkov riževega žužka. Najnižjo vrednost LC_{50} (1165 IL/osebek po 8-dnevni izpostavitvi ogorčicam) smo potrdili pri madžarski rasi 3162 pri 25°C, najnižjo LC_{50} vrednost (2533 IL/osebek po osmih dneh) pa je imela slovenska rasa B30 pri 30°C (LAZNIK et al., 2010; LAZNIK & TRDAN, 2010).

2.2 Sezonska dinamika škodljivih metuljev v skladiščih

V obdobju 2004-2006 smo preučevali sezonsko dinamiko močne vešče (*Ephestia kuehniella*), krljevega molja (*Plodia interpunctella*) in koruznega molja (*Sitotroga cerealella*) v mlinih in skladiščih žita v osrednji Sloveniji. V ta namen smo od aprila do decembra nastavljali feromonske pasti, v katerih smo v dvotedenskih intervalih šteli samce navedenih vrst škodljivcev. Vse tri vrste so razvile dva rodova na leto. V koruzniku na prostem se je najbolj številčno pojavljala močna vešča, krljev molj je bil najštevilčnejši v zaprtem prostoru v mlinih in skladiščih žita, koruzni molj, ki je bil najmanj številčna vrsta v poskusu, pa se je pojavljal le v zaprtem skladišču žita (TRDAN et al., 2010).

2.3 Diatomejska zemlja, kremenov pesek, rastlinski prah, lesni pepel in zeoliti v samostojni ali kombinirani uporabi

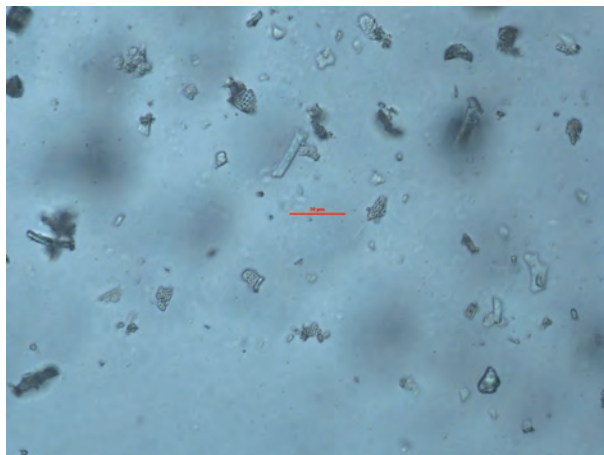
S ciljem določitve učinkovitosti diatomejske zemlje (DZ) različnega izvora pri zatiranju riževega žužka (*S. oryzae*) smo izvedli laboratorijsko raziskavo. V primerjavi s tržnim pripravkom SilicoSec® smo preizkušali insekticidno delovanje DZ iz Srbije, Grčije in Slo-



Slika 1: Lokacija v bližini Bele Cerkve, kjer smo 11. novembra 2007 prvič nabrali diatomejsko zemljo za laboratorijske raziskave (foto: S. Trdan)

Figure 1: Location in the vicinity of village Bela Cerkev, where (at November 11 2007) we acquired the first sample of diatomaceous earth from Slovenia for the purpose of laboratory investigations (photo: S. Trdan)

venije (slika 1) na odrasle osebeke škodljivca. Poskus je bil izveden pri treh temperaturah (20, 25 in 30 °C) in dveh vrednostih relativne zračne vlage (55 in 75 %). Smrtnost hroščev smo ugotavljali 7, 14 in 21 dni po izpostavitvi DZ v koncentracijah 100, 300, 500 in 900 ppm. Smrtnost hroščev se je povečevala z naraščanjem koncentracije DZ in dnevi njihove izpostavljenosti temu inertnemu materialu. Pri vseh vzorcih smo pri koncentraciji DZ 900 ppm 21. dan po izpostavitvi ugotovili več kot 90 % smrtnost hroščev, izjemi sta bili slo-



Slika 2: Delci diatomej v testiranem vzorcu diatomejske zemlje iz Srbije. Fotografija je posneta pod optičnim mikroskopom Nikon Eclipse 80i (foto: H. Rojht)

Figure 2: Diatoms particles in the sample of diatomaceous earth from Serbia. The photo was made under optical microscope Nikon Eclipse 80i (photo: H. Rojht)

venski vzorec pri 20 °C in 55 % relativni zračni vlagi in grški vzorec pri 25 °C in 75 % relativni zračni vlagi, pri katerih smo potrdili 85,3 oz. 67,6 % smrtnost. S 100 % učinkovitostjo je bil 14. dan po izpostavitvi pri koncentraciji 900 ppm najbolj učinkovit pripravek SilicoSec®. Slovenski vzorec DZ je bil 7. dan po izpostavitvi pri vseh temperaturah bolj učinkovit pri 55 % kot pri 75 % relativni zračni vlagi (ROJHT et al., 2008, 2010a; ROJHT et al., 2012a).

V laboratorijskem poskusu smo preučevali tudi vpliv geokemične sestave DZ iz Srbije (slika 2), Grčije in Slovenije na njeno insekticidno delovanje pri zatiranju odraslih osebkov riževega žužka (*S. oryzae*). Poskusi, kjer je pozitivno kontrolo predstavljal pripravek SilicoSec®, so potekali v enakih razmerah kot predhodno predstavljeni poskus. Ugotovljeno je bilo, da je kremenica v obliki SiO₂ in opala-A tista sestavina DZ, ki ima signifikanten vpliv na učinkovitost DZ. Med smrtnostjo hroščev riževega žužka in vsebnostjo MnO in Cao v DZ smo ugotovili šibko pozitivno korelacijo. Vse signifikantne korelacije med smrtnostjo hroščev in vsebnostjo Al₂O₃, Fe₂O₃, K₂O, TiO₂, Cr₂O₃, P₂O₅ in MgOso bile negativne, medtem ko korelacija med

vsebnostjo Na₂O in smrtnostjo hroščev ni bila signifikantna (ROJHT et al., 2010b).

Za zatiranje riževega žužka (*S. oryzae*) (slika 3) pa smo v laboratorijskih razmerah preučevali tudi učinkovitost petih vzorcev kremenovega peska iz Slovenije (slika 4). V šestih različnih koncentracijah (100, 300, 500, 900, 1200 in 1500 ppm) smo ugotavljali insekticidno delovanje vzorcev iz lokacij Raka-Ravno in Moravče (v obeh primerih neočiščenega in očiščenega vzorca) ter tržno dostopnega kremenovega peska iz Puconcev (Plantella). Vsebnost SiO₂ je bila v vseh vzorcih visoka in je znašala od 91,52 do 99,24 %. Insekticidno delovanje kremenovega peska, ki smo ga primešali zrnju pšenice, smo preučevali pri temperaturah 20, 25, 30 in 35 °C in pri 55 in 75 % relativni zračni vlagi. Smrtnost hroščev smo ugotavljali 7, 14 in 21 dni po nastavitvi. Vsi vzorci so imeli samo majhen insekticidni učinek na odrasle osebkove riževega žužka in se niso izkazali kot ustrezni za širšo uporabo v skladiščih žita. Najvišjo smrtnost (15 %) hroščev smo potrdili 21. dan po nastavitvi poskusa pri koncentraciji 900 ppm, 30 °C and 55 % relativni zračni vlagi pri neočiščenem vzorcu kremenovega peska iz Moravč (ROJHT et al., 2010c; ROJHT et al., 2011).



Slika 3: Zrnje pšenice s poškodbami zaradi riževega žužka (foto: S. Trdan)
Figure 3: Wheat grains with injuries caused by rice weevil (photo: S. Trdan)



Slika 4: Jemanje vzorca kremenovega peska v kamnolomu v Moravčah za laboratorijske raziskave njegovega insekticidnega delovanja na riževega žužka (foto: Ž. Laznik) Figure 4: Taking the sample of quartz sand in quartz quarry in Moravče, which was used for laboratory investigations of its insecticidal activity against the rice weevil (photo: Ž. Laznik)

V iskanju učinkovitih (in) okoljsko sprejemljivih načinov zatiranja odraslih osebkov fižolarja (*Acanthoscelides obtectus*) smo preučevali insekticidno delovanje dveh rastlinskih prahov (slika 5) in DZ v laboratorijskih razmerah. Delovanje prahov navadne sivke (*Lavandula angustifolia*) in njivske preslice (*Equisetum arvense*) smo primerjali s pripravkom SilicoSec pri petih temperaturah (15, 20, 25, 30 in 35°C), dveh vrednostih relativne zračne vlage (55 in 75 %) in štirih koncentracijah prahov (100, 300, 500 in 900 ppm). Smrtnost hroščev smo ugotavljali 1, 2, 4 in 7 dni po nastavitvi poskusa.

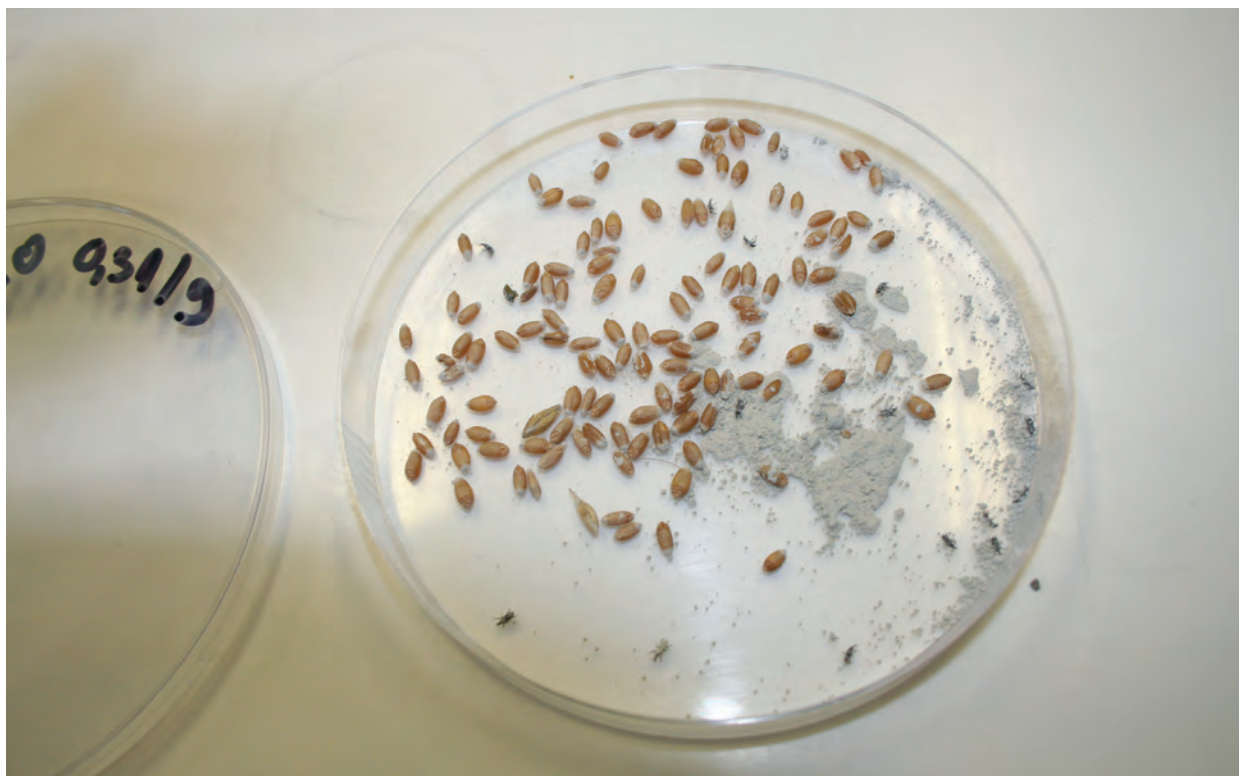
Učinkovitost prahov je naraščala s temperaturo, relativna zračna vlaga pa ni imela signifikantnega vpliva na smrtnost hroščev. Ob upoštevanju dejstev o najpogostejšem načinu skadiščenja fižola v praksi, za zatiranje fižolarja predlagamo uporabo DZ, saj je pokazala največjo insekticidno učinkovitost pri nižjih temperaturah in koncentracijah. Za morebitno širšo uporaba prahov navadne sivke in njivske preslice, pa predlagamo preučitev njunega delovanja proti fižolarju v mešanicah ali kombinacijah z drugimi okoljsko sprejemljivi

vimi načini zatiranja škodljivcev, saj menimo, da bi na ta način lahko dosegli sinergistično delovanje in boljše insekticidno učinkovitost (TRDAN & BOHINC, 2011; BOHINC et al., 2013).

V laboratorijskih razmerah pa smo iskali tudi učinkovit in okoljsko sprejemljiv način zatiranja koruznega žužka (*Sitophilus zeamais*), ki je v Sloveniji vse pomembnejši skladiščni škodljivec. V ta namen smo zrnju pšenice primešali kremenov pesek, zeolite in diatomejsko zemljo. Uporabili smo inertne prahove različnega izvora, in sicer DZ iz Slovenije in pripravek SilicoSec®, kremenov pesek iz dveh lokacij v Sloveniji in tri različne vzorce zeolitov, dva naravna iz Slovenije in sintetični zeolit Asorbio®. Kontrolno obravnavanje je predstavljalo netretirano zrnje pšenice. Vse snovi smo preizkušali pri treh temperaturah (15, 20 in 25 °C), dveh vrednostih relativne zračne vlage (55 in 75 %) in dveh koncentracijah prahov (450 in 900 ppm). Smrtnost hroščev smo ugotavljali 7, 14 in 21 dni po nastavitvi poskusa. Z generalno analizo smo potrdili signifikantno največjo smrtnost hroščev v obravnavanjih s pripravkom SilicoSec® (52,31 ± 2,07%) in enim tipom



Slika 5: Odrasla osebkca fižolarja v poskusu ugotavljanja insekticidnega delovanja rastlinskih prahov (foto: T. Bohinc)
Figure 5: Bean weevil adults in the investigation of insecticidal efficacy of plant powders (photo: T. Bohinc)



Slika 6: Petrijevka, v kateri smo preizkušali kontaktno delovanje zeolitov proti koruznemu žužku (foto: T. Bohinc)
Figure 6: Petri dish, in which we tested the contact activity of zeolites against the maize weevil (photo: T. Bohinc)

naravnega zeolita iz Slovenije ($31,48 \pm 1,42\%$), najmanjšo smrtnost pa smo ugotovili v obeh obravnavanih s kremenovim peskom iz Slovenije, iz Moravč ($18,84 \pm 1,31\%$) in lokacije Raka-Ravno ($9,12 \pm 0,66\%$). Smrtnost odraslih osebkov vrste *S. zeamais* je bila signifikantno največja pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($28,32 \pm 1,16\%$) in največji koncentraciji prahov (900 ppm, $27,30 \pm 0,87\%$). Rezultati pričujoče raziskave so bili za nas zanimivi zlasti zaradi zadovoljivega insekticidnega delovanja zeolitov, ki so se pokazali kot ena od alternativ diatomejski zemlji (TRDAN et al., 2015).

V laboratorijskem poskusu pa smo ugotavljali tudi insekticidno delovanje različnih zeolitov na odrasle osebkke koruznega žužka. V ta namen smo v poskus vključili dva vzorca naravnega zeolita (iz Slovenije in Srbije) in sintetični zeolit Asorbio®, katerih učinkovitost smo pri treh temperaturah (15 , 20 in $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) in 55 ter 75% relativni zračni vlagi primerjali s pripravkom SilicoSec®. Površinski nanos (slika 6) snovi je bil izveden v koncentracijah 10 in 20 g/m^2 , v mešanici s pšeničnim zrnjem (slika 7) pa smo snovi uporabili v koncentracijah 450 in 900 ppm . Smrtnost hroščev pri po-

vršinskem nanosu snovi smo dnevno ugotavljali do 7. dneva po nanosu, nato pa smo od 8. do 14. dneva po nanosu ugotavljali še t.i. zapoznelo smrtnost odraslih osebkov. Insekticidno delovanje zeolitov, primešanih zrnju pšenice, smo določevali 7., 14. in 21. dan po začetku poskusa. Ugotavljamo, da sta na večjo smrtnost hroščev vplivala višja temperatura in nižja relativna zračna vlaga. Pri mešanju naravnega zeolita iz Slovenije z zrnjem pšenice v koncentraciji 900 ppm , smo pri $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 55% relativni zračni potrdili $69,69 \pm 7,04\%$ smrtnost hroščev 21 dni po nastavitvi poskusa, medtem, ko smo pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ugotovili $83,66 \pm 3,21\%$ smrtnost hroščev. 100% smrtnost hroščev smo pri uporabi zeolita iz Slovenije ugotovili pri površinskem nanosu že 7 dni po začetku poskusa pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentracija zeolita ni imela vpliva na smrtnost hroščev. Vzorca naravnega zeolita iz Srbije in Slovenije sta imela primerljivo delovanje na odrasle osebkke koruznega hrošča, najslabše insekticidno delovanje pa je imel sintetični zeolit Asorbio®. Ugotavljamo, da naravni zeoliti imajo potencial za uporabo pri zatiranju skladiščnih škodljivcev, pred njihovo implementacijo v sisteme skladišče-



Slika 7: Erjenmajerice s zrnjem pšenice in zeoliti pred mešanjem (foto: T. Bohinc)

Figure 7: Glass erlenmeyer flasks with wheat grains and zeolites before mixing (photo: T. Bohinc)

nja žit pa vseeno predlagamo nadaljevanje raziskav (BOHINC et al., 2017b).

Proti 2-4 tedne starim odraslim osebkom koruznega žužka smo preizkušali tudi delovanje treh lesnih pepelov (slika 8), navadne robinije (*Robinia pseudoacacia*), navadne bukve (*Fagus sylvatica*) in navadne smreke (*Picea abies*). Obravnavanje s DZ je predstavljalo pozitivno kontrolo. Lesni pepel smo preizkušali kot prašivo za površinsko uporabo (10 in 20 g/m²) in v mešanici z zrnjem pšenice (2,5 in 5 utežnih %). Smrtnost hroščev pri površinskem nanosu pepela smo dnevno ugotavljali do sedmega dne po nanosu, nato pa še dnevno do 14. dne po nanosu (kot zapoznala smrtnost). V mešanici z zrnjem pšenice pa smo delovanje lesnih pepelov na hrošče ugotavljali 7, 14 in 21 dni po izpostavitvi. Na podlagi rezultatov naše raziskave, ki je potekala pri 55 in 75 % relativni zračni vlagi in treh

temperaturah (15, 20 in 25 °C), ugotavljamo, da so na smrtnost hroščev koruznega žužka vplivali vrsta lesnega pepela, temperatura zraka in relativna zračna vlaga. Pri površinski uporabi lesnega pepela navadne smreke smo 7. dan pri 25 °C potrdili 99,69 ± 0,31 % smrtnost hroščev, pri mešanju z zrnjem pšenice pa smo pri isti temperaturi 14. dan ugotovili njihovo 100 % smrtnost. Lesni pepel se je izkazal kot zelo učinkovita snov za zatiranje skladiščnih hroščev, zato priporočamo še nadaljnje raziskave in čim prejšnjo vpeljavo v sisteme skladiščenja žita (BOHINC et al., 2017a).

Za zatiranje črnega žitnega žužka (*S. granarius*) smo v laboratorijskih razmerah preučevali učinkovitost različnih okoljsko sprejemljivih snovi. Zrnju pšenice smo pred vnosom škodljivca v erlenmajerice v ločenih obravnavanjih primešali diatomejsko zemljo (pripravek SilicoSec®), kremenov pesek, listni prah dre-



Slika 8: Petrijevke, v katerih smo v rastni komori preizkušali insekticidno delovanje lesnega pepela in zeolitov na koruznega žužka (foto: S. Trdan)

Figure 8: Petri dishes, in which we tested the insecticidal efficacy of wood ashes and zeolites against the maize weevil (photo: S. Trdan)

vesa neem (aktivna snov azadirachtin, pripravek Neem listni prah[®]) in lesni pepel. Zrnju pšenice smo primešali tudi mešanice DZ in lesnega pepela, listnega praha drevesa neem in lesnega pepela, kremenovega peska in lesnega pepela ter mešanico vseh štirih snovi. Preizkušane snovi in njihove kombinacije smo uporabili v različnih koncentracijah pri temperaturah 20, 25 in 30°C in relativni zračni vlagi 55 in 75 %. Smrtnost hroščev smo določali 7, 14 in 21 dni po nastavitvi poskusa. Med številnimi obravnavanji smo ugotovili signifikantne razlike v insekticidnem delovanju na hrošče. Signifikantno največjo smrtnost hroščev smo potrdili v obravnavanjih s samostojno in kombinirano uporabo lesnega pepela, in sicer s samostojno uporabo 2,5 ut. % lesnega pepela (69,73±2,52%), mešanico DZ (450 ppm) in 2,5 ut. % lesnega pepela (71,94±2,40 %), mešanico kremenovega peska (450 ppm) in 2,5 ut. % lesnega

pepela (68,72±2,80 %) in mešanico DZ (225 ppm), lesnega pepela (1,25 ut. %), listnega prahu drevesa neem (0,625 ut. %), in kremenovega peska (225 ppm) (68,76±2,75%). Lesni pepel v samostojni ali kombinirani uporabi z drugimi okoljsko sprejemljivimi snovmi predstavlja okoljsko sprejemljivo alternativo sintetičnim insekticidom pri zatiranju odraslih osebkov črnega žitnega žužka, pred vpeljavo lesnega pepela v sisteme skladiščenja žita pa bo potrebno preučiti še njegovo delovanje na jajčeca in ličinke tega škodljivca (TRDAN & BOHINC, 2013, 2014; BOHINC & TRDAN, 2017).

2.4 Eterična olja in rastlinski izvlečki

V petrijevkah s fižolovim zrnjem smo preučevali fumigantno delovanje eteričnih olj (slika 9) navadnega



Slika 9: Perforirana mikrocentrifugirka v petrijevki, v kateri smo preučevali fumigantno delovanje eteričnih olj na fižolarja (foto: S. Trdan)

Figure 9: Perforated Eppendorf tube in Petri dish, where we investigated the fumigant activity of essential oils in controlling bean weevil (photo: S. Trdan)

rožmarina (*Rosmarinus officinalis*), žajblja (*Salvia officinalis*), navadnega lovora (*Laurus nobilis*), bergamota (*Citrus bergamia*) in kafrovca (*Cinamomum camphora*) na odrasle osebkke fižolarja (*A. obtectus*). Eterična olja smo uporabili v dveh koncentracijah (245 in 980 $\mu\text{l/l}$), njihovo delovanje pa smo preučevali pri petih različnih temperaturah (15, 20, 25, 30 in 35°C) in dvema vrednostima relativne zračne vlage (55 in 75 %). Na smrtnost hroščev je vplivala vrsta eteričnega olja, čas izpostavitve hroščev, koncentracija eteričnega olja in oba abiotična okoljska parametra. Tri dni po izpostavitvi smo ugotovili prek 90 % smrtnost hroščev, največjo učinkovitost (nad 94 %) pa smo ugotovili pri eteričnem olju navadnega rožmarina. Pri višji relativni zračni vlagi smo ugotovili boljše delovanje eteričnih olj kot pri nižji vlagi. Eterična olja vseh petih rastlinskih vrst so pokazala potencial za zatiranje fižolarja v skladiščih (TRDAN & BOHINC, 2012; BOHINC & TRDAN, 2013).

Za zatiranje odraslih osebkov črnega žitnega žužka (*S. granarius*) pa smo preučevali fumigantno delovanje eteričnih olj navadnega rožmarina, žajblja, prave sivke (*Lavandula angustifolia*) in poprove mete (*Mentha balsamea*). Smrtnost hroščev smo ugotavljali 1, 2 in 3 dni po njihovi izpostavitvi plinu pri dveh koncentracijah (2,4 in 7,4 ml/L zraka) in temperaturah 20, 25, 30, 35 in 40 °C. Učinkovitost eteričnih olj pri 40 °C je bila 95 %, pri nižji temperaturi pa je bila znatno manjša (od 12 do 36 %). Najbolj učinkovito delovanje na hrošče je imelo eterično olje navadnega rožmarina z več kot 60 % generalno učinkovitostjo. Pri 35 °C smo pri eteričnem olju rožmarina ugotovili 89 % smrtnost hroščev, pri 40 °C pa 99 % smrtnost. Eterična olja prave sivke, poprove mete in žajblja so bila zadovoljivo učinkovita (90, 97 in 94 %) le pri najvišji temperaturi. Olja so imela boljše fumigantno delovanje pri višji koncentraciji. Z izračunom vrednosti LD₅₀ in LD₉₀ smo najboljše fumigantno delovanje pri zatiranju črnega žitnega žužka potrdili pri navadnem rožmarinu. Rezultati naše laboratorijske raziskave bodo pridobili tudi praktični pomen, ko bomo njihovo delovanje na skladiščne hrošče dokazali tudi v skladiščih žita (LAZNIK et al., 2012).

V laboratorijskih razmerah smo preučevali delovanje etanolnih ekstraktov navadnega rožmarina, prave sivke in vinske rutice (*Ruta graveolens*) na odrasle osebkke fižolarja. Z uporabo na novo razvitega računalniškega programa za analizo premikanja žuželk v prostoru smo pri vseh ekstraktih potrdili repelentno delovanje na hrošče. Najboljše repelentno delovanje je imel etanolni izvleček vinske rutice, ki je mešanica več hlapljivih snovi. Vsi trije ekstrakti so imeli insekticidno delovanje na odrasle osebkke fižolarja, vplivali na manjše število potomcev škodljivca, na kalitev fižola pa niso vplivali (ROJHT et al., 2012b).

2.5 Naravni sovražniki (biotični agensi) skladiščnih škodljivcev

V Sloveniji se naravni sovražniki, katerih vnos, gojenje in praktična uporaba je dovoljena s Pravilnikom o biotičnem varstvu rastlin (Uradni list RS, št. 45/06), nahajajo na Seznamu domorodnih vrst organizmov za biotično varstvo rastlin. Od leta 2006, ko je bil objavljen navedeni pravilnik, do leta 2015, se je število biotičnih agensov na seznamu povečalo za 11 vrst, do tedanjih 25. Informacije o zastopanosti in razširjenosti domorodnih vrst naravnih sovražnikov so torej ključni dejavniki za njihovo implementacijo in sisteme pridelave hrane in okrasnih rastlin (TRDAN & BOHINC, 2016).

Leta 2012 smo v Sloveniji prvič našli parazitoidno oso *Dibrachys microgastri*. Najezdnik je bil najden v Laboratoriju za entomologijo (Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani), in sicer v gojitvenih posodah za črnega žitnega žužka, napolnjenih z zrnjem pšenice (Trdan et al., 2013). V obdobju 2013-2014 smo v Sloveniji prvič potrdili najdbo devetih koristnih vrst, med njimi je bila tudi parazitoidna osa *Anisopteromalus calandrae*. Menimo, da ima ta biotični agens potencial za prihodnjo implementacijo v sisteme skladiščenja žita, saj ga v nekaterih evropskih državah že uporabljajo za zatiranje skladiščnih hroščev, na primer hroščev iz rodu *Sitophilus* in žitnega kutarja (*Rhyzopertha dominica*) (BOHINC & TRDAN, 2015).

2.6 Okoljsko sprejemljivi insekticidi

V laboratorijski raziskavi smo preizkušali učinkovitost spinetorama in spinosada pri zatiranju 2-4 tedne starih odraslih osebkov iz rodu *Sitophilus*. Spinetoram in spinosad smo uporabili v treh koncentracijah (0,5, 1 in 2 mg/kg zrnja pšenice). Poskus je potekal pri 25 °C in 65 % relativni zračni vlagi na štirih sortah ozimne pšenice. Smrtnost hroščev smo ugotavljali 7, 14 in 21 dni po nastavitvi poskusa. Ugotovili smo, da so na smrtnost hroščev vplivali sorta pšenice, koncentracija insekticidov in čas po tretiranju. V obravnavanjih s spinetoramom smo ugotovili večjo smrtnost hroščev (90,19 \pm 0,48 %). 21. dan po izpostavitvi hroščev je spinosad vplival na njihovo 91,64 \pm 0,93 % smrtnost, spinetoram pa na 96,13 \pm 0,51 % smrtnost hroščev. Pri koncentraciji 2 mg/kg smo pri uporabi spinosada potrdili 96,35 \pm 0,44% smrtnost hroščev, pri uporabi spinetorama pa 96,79 \pm 0,38 % smrtnost. Insekticidno delovanje spinosada (69,47 \pm 1,87%) in spinetorama (78,23 \pm 0,83%) je bilo najslabše na sorti 'Fidelius'. Spinosad je vplival na največjo smrtnost hroščev v obravnavanjih s koruznim žužkom (96,64 \pm 0,31%), spinetoram pa v

obravnanih z riževim žužkom ($94,58 \pm 0,77\%$) in črnim žitnih žužkom ($94,07 \pm 0,64\%$). Vse tri vrste so bile po poreklu iz Srbije. Gre za prvo domačo raziskavo preučevanja spinetoroma in spinosada proti skladiščnih škodljivcem, njeni rezultati pa so dobra podlaga za nadaljevanje sorodnih raziskav in morebitno prihodnjo vpeljavo obeh snovi v sisteme skladiščenja (TRDAN et al., 2017).

2.7 Ostale raziskave

V laboratorijski raziskavi smo ugotavljali vpliv tehnologije pridelave ozimne pšenice na smrtnost, številčnost potomstva in preferenco koruznega žužka (*S. zeamais*). V poskus smo vključili zrnje iz integrirane, ekološke, biodinamične in konvencionalne pridelave, katerega pridelava se je razlikovala v programih varstva rastlin in gnojenja v rastni dobi žita. Poskus je bil izveden pri temperaturah 20, 25 in 30° C, relativni zračni vlagi 55 in 75 %, smrtnost hroščev pa smo ugotavljali 7,

14 in 21 dni po nastavitvi poskusa. V večini obravnavanj smo potrdili, da se je 7. dan po nastavitvi poskusa z naraščanjem temperature povečevala smrtnost hroščev, z naraščanjem vlage pa se je zmanjševala. 7 dni po začetku poskusa je bila smrtnost hroščev večja na zrnju iz ekološke pridelave kot na zrnju iz integrirane pridelave. Potomce koruznega hrošča smo v zrnju našli 56 dni po odstranitvi hroščev, več pa jih je bilo pri 75 % relativni zračni vlagi. Pri 55 % relativni zračni vlagi in 20°C je bilo potomstvo škodljivca na zrnju v ekološki pridelavi za 60,8 % večje kot v integrirani pridelavi. Smrtnost hroščev je bila v optimalnih razmerah skladiščenja večja na zrnju iz alternativnih oblik pridelave pšenice kot na zrnju iz integrirane pridelave. Ugotovljamo, da je razumevanje agronomskih tehnologij, biotičnih in abiotičnih dejavnikov, ki vplivajo na pojavljanje skladiščnih škodljivcev, lahko zelo uporabno pri uporabi oz. razvoju strategij zatiranja škodljivcev (TURINEK et al., 2016).



Slika 10: Udeleženci 11. konference IOBC/wprs delovne skupine za integrirano varstvo uskladiščenih pridelkov, ki je bila v Ljubljani med 3. in 5. julijem 2017 (foto: J. Rupnik)

Figure 10: Participants of the 11th Conference of the IOBC/wprs Working Group on Integrated Protection of Stored Products, which was held in Ljubljana from July 3 to 5 2017 (photo: J. Rupnik)

2.8 Organizacija delavnic za kmetijske strokovnjake in konference IOBC

Leta 2017 smo v Ljubljani med 3. in 5. julijem organizirali 11. konferenco IOBC/wprs delovne skupine za integrirano varstvo uskladiščenih pridelkov (slika 10). Mednarodno odmevnega dogodka se je udeležilo 136 strokovnjakov iz 25 držav (Trdan and Trematerra, 2017; Trematerra and Trdan, 2018). Naše znanje iz področja zatiranja skladiščnih škodljivcev pa prenašamo tudi na domače kmetijske strokovnjake. Tako smo leta 2014 na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete organizirali delavnico z naslovom »Od tehnološke zrelosti do skladiščenja žit in stročnic« (Trdan, 2014ab) (slika 11), podobno srečanje z nekoliko širšo vsebino pa smo organizirali že tri leta prej (Trdan and Bohinc, 2011). Leta 2015 smo na 12. slovenskem posvetovanju o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo na Ptuj kot vabljenega predavatelja gostili prof. dr. C. Athanassiou-a (slika 12) (ATHANASSIOU, 2015; TRDAN, 2015ab).

2.9 Sodelovanje s tujimi strokovnjaki

Leta 2007 smo se kot partnerji vključili v mednarodni projekt SEE-ERA.NET "Development of a non-toxic, ecologically compatible, natural-resource based insecticide from diatomaceous earth deposits of South Eastern Europe to control stored-grain insects pests" (koordinator je bil C. Athanassiou) in takrat smo se prvič seznanili z raziskovalnim delom na področju zatiranja hroščev iz rodu *Sitophilus* z diatomske zemlje (ATHANASSIOU et al., 2009, 2011).

Pod koordinatrstvom C. Athanassiou-a, v kateri sva bila tudi slovenski raziskovalec in študentka, je mednarodna raziskovalna skupina preučevala delovanje pirimifos-metila, formuliranega kot elektrostatični prah, da bi s tem zmanjšali količino te aktivne snovi na zrnju. Učinkovitost insekticida v tej formulaciji so primerjali z njegovim delovanjem v formulaciji koncentrata za emulzijo (EC) pri zatiranju hroščev *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Rhyzopertha domi-*



Slika 11: Delavnica »Od tehnološke zrelosti do skladiščenja žit in stročnic«, ki je bila 27. novembra 2014 na Biotehniški fakulteti v Ljubljani (foto: J. Rupnik)

Figure 11: Workshop »From technological maturity to storing of cereals and legumes«, organized in the Biotechnical Faculty on November 27, 2014 (photo: J. Rupnik)

nica in *Tribolium confusum*. Preučevali so tudi obstojnost elektrostatičnega prahu na zrnju riža, koruze in pšenice ter njegov vpliv na lastnosti moke pri pripravi kruha in testenin. Pirimifos-metil v formulaciji elektrostatičnega prahu je učinkoviteje zatiral odrasle osebkne hroščev *O. surinamensis* in *T. confusum*, pri hroščih vrste *R. dominica* pa med formulacijama nismo ugotovili razlik v insekticidni učinkovitosti. Številčnost potomcev preučevanih hroščev je bilo vedno manjše na zrnju, tretiranem z insekticidom v formulaciji elektrostatičnega prahu. Dodajanje elektrostatičnega prahu na zrnje žita ni vplivalo na spremembo lastnosti moke, kruha in testenin. Ugotavlja-

mo, da je mogoče z pirimifos-metilom v formulaciji elektrostatičnega prahu učinkovito zatirati skladiščne hrošče, ne da bi pri tem vplivali na kakovost žitnega zrnja (ATHANASSIOU et al., 2016, 2017).

V okviru našega sodelovanja s srbskimi strokovnjaki smo preučevali delovanje spinosada in spinetorama na odrasle osebkne hroščev iz rodu *Sitophilus* in njun vpliv na številčnost potomstva. Rezultati te raziskave (ANDRIĆ et al., 2016, 2017), ki so bili začetek sodelovanja te mednarodne skupine, so predstavljeni v poglavju 2.6. in so bili podlaga za skupne raziskave, ki so sledile (delovanje lesnega pepela in zeolitov na skladiščne hrošče).

3 ZAKLJUČEK

V 12 letih našega dela na področju zatiranja skladiščnih škodljivcev smo v naše laboratorijske raziskave največkrat vključili tri vrste iz rodu *Sitophilus* (*S. granarius*, *S.*

oryzae in *S. zeamais*) in fižolarja (*A. obtectus*), torej škodljivce, ki imajo v Sloveniji velik gospodarski pomen. Gospodarsko škodljive metulje (*E. kuehniella*,



Slika 12: Prof. dr. Christos Athanassiou med vabljenim predavanjem na 12. slovenskem posvetovanju o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo 3. marca 2015 na Ptujju (foto: J. Rupnik)

Figure 12: Prof. Dr. Christos Athanassiou during invited lecture in the 12th Slovenian Conference on Plant Protection with international participation in Ptuj, 3th March 2015 (photo: J. Rupnik)

P. interpunctella in *S. cerealella*) smo doslej obravnavali le v eni raziskavi. Glavnina našega raziskovalnega dela je vključevala preučevanje insekticidne učinkovitosti diatomejske zemlje in drugih inertnih prahov, kot so kremenov pesek, rastlinski prah, lesni pepel, in zeoliti. Diatomejsko zemljo smo zaradi učinkovitosti velikokrat uporabili tudi kot pozitivno kontrolo pri preučevanju učinkovitosti drugih inertnih prahov. Precejšnje fumigantno učinkovitost na škodljive hrošče so v naših laboratorijskih poskusih pokazala tudi nekatera eterična olja, zlasti eterično olje rožmarina. V sklopu našega strokovnega dela, kjer že več kot 10 let sistematično vzorčimo domorodne naravne sovražnike, smo našli dva parazitoida skladiščnih hroščev. Večji pomen pripisujemo vrsti *Anisopteromalus calandrae*, ki se v nekaterih državah v Evropi že načrtno vnaša v skladišča žit, a slovenska zakonodaja na področju biotičnega varstva še ne omogoča njene uporabe v praksi. Z orga-

nizacijo strokovnih srečanj za potrebe domačih strokovnjakov na področju pomena in zatiranja skladiščnih škodljivcev skrbimo za prenos strokovnih informacij v prakso, nadvse veseli pa smo bili tudi, da nam je IOBC-WPRS zaupala organizacijo 11th Conference of the IOBC/wprs (OILB/srop) Working Group on Integrated Protection of Stored Products (Ljubljana, Slovenija, 3.-5. julij 2017), kar je tudi rezultat naše prepoznavnosti in našega dobrega sodelovanja s tujimi strokovnjaki. Tudi v prihodnje bo del naših raziskovalno-strokovnih aktivnosti namenjen raziskavam na področju monitoringa in zatiranja skladiščnih škodljivcev, saj bo ta skupina škodljivcev zaradi večanja števila svetovnega prebivalstva, intenzivne mednarodne trgovine z rastlinskim materialom, podnebnih sprememb in nekaterih drugih dejavnikov tudi v prihodnosti predstavljala eno od gospodarsko najpomembnejših skupin rastlinskih škodljivcev.

4 CONCLUSIONS

In 12 years of our work in the field of stored product pest control, our laboratory studies most often included three species from the genus *Sitophilus* (*S. granarius*, *S. oryzae* and *S. zeamais*) and the bean weevil (*A. obtectus*), i.e. harmful organisms which are in Slovenia of great economic significance. The economically harmful butterflies (*E. kuehniella*, *P. interpunctella* and *S. cerealella*) have been so far addressed in only one study. The main body of our research work included studying insecticidal properties of diatomaceous earth and other inert dusts, e.g. quartz sand, plant powders, wood ashes and zeolites. Diatomaceous earth was due to its efficiency often used as a positive control when studying the efficiency of other inert dusts. Considerable fumigant effects on harmful beetles were in our laboratory experiments displayed also by some essential oils, particularly rosemary essential oil. In our professional work, in which we have been systematically sampling autochthonous natural enemies for more than 10 let years, we found two parasitoids of stored products beetles. In our view, the more important of these two is *Anisoptero-*

malus calandrae, which is already being systematically introduced in cereal storages in some European countries, while the Slovenian legislation in the field of biological control do not yet enable its use in practice. By organising expert meetings for the needs of the domestic experts who study the significance and control of stored product pests, we provide implementation of expert knowledge into practice, and we were delighted when the IOBCWPRS entrusted us with the organisation of the 11th Conference of the IOBC/wprs (OILB/srop) Working Group on Integrated Protection of Stored Products (Ljubljana, Slovenia, 3-5 July 2017), which is also a result of our recognisability and our good cooperation with foreign experts. Studies in the field of monitoring and control of stored product pests will remain a part of our research professional activities, as this group of harmful organisms will be also in future, due to the increasing world population, intense international trading in plant materials, climate changes and some other factors, one of the economically most important groups of plant pests.

5 ZAHVALA

Ta pregledni članek je nastal v okviru strokovnih nalog iz področja zdravstvenega varstva rastlin, ki jih financira Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin.

6 LITERATURA-REFERENCES

- ANDRIĆ, G., KLJAJIĆ, P., PRAŽIĆ GOLIĆ, M., TRDAN, S., LAZNIK, Ž. 2016: Efikasnost spinosada i spinetorama za žitnog i pirinčanog žiška u tretiranoj pšenici u zrnu. In: Zbornik rezimea radova, XV. Simpozijum o zaštiti bilja, Zlatibor, 28 November - 2 December 2016. Beograd, Društvo za zaštitu bilja Srbije, p. 46.
- ANDRIĆ, G., KLJAJIĆ, P., PRAŽIĆ GOLIĆ, M., LAZNIK, Ž., BOHINC, T., TRDAN, S. 2017. Influence of spinosad and spinetoram on *Sitophilus granarius* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.) offspring production and wheat grain damage rates. In: Trdan, S. (ed.). Abstract volume, 13th Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation, 7-8. March 2017, Rimske Toplice, Slovenia. Ljubljana: Plant Protection Society of Slovenia, p. 85-86.
- ATHANASSIOU, C., KAVALLIERATOS, N., VAYIAS, B., TOMANOVIĆ, Ž., PETROVIĆ, A., TRDAN, S., ADLER, C., KORUNIĆ, Z., ROZMAN, V. 2009. Development of non-toxic, ecologically compatible, natural-resource based insecticide from diatomaceous earth deposits of South Eastern Europe to control stored-grain insect pests. In: Athanassiou, C. (ed.). Conference [of the] IOBC/WPRS working group Integrated protection of stored products, Compobasso, Italy, June 29-July 2, 2009. Book of abstracts, IOBC/WPRS, 1 p.
- ATHANASSIOU, C., KAVALLIERATOS, N., VAYIAS, B., TOMANOVIĆ, Ž., PETROVIĆ, A., TRDAN, S., ADLER, C., ROZMAN, V. 2011. Development of a non-toxic, ecologically compatible, natural-resource based insecticide from diatomaceous earth deposits of South Eastern Europe to control stored grain insect pests. In: Macháčova, J. (ed.), Rohsmann, K. (ed.). Scientific results of the SEE-ERA.NET - pilot joint call. 1st ed. Vienna, Centre for Social Innovation, 2009, 83-93.
- ATHANASSIOU, C. G. 2015. The long jump from chemical to non-chemical control in stored product protection: which are the viable alternatives to neurotoxic insecticides in this meta-pesticide era? In: Trdan, S. (ed.). Lectures and papers presented at the 12th Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation, Ptuj, March 3-4 2015. Ljubljana, Plant Protection Society of Slovenia, 14-19.
- ATHANASSIOU, C. G., VASSILAKOS, T. N., DUTTON, A.-C., JESSOP, N., SHERWOOD, D., PEASE, G., BRGLEZ, A., STORM, C., TRDAN, S. 2016. Combining electrostatic powder with an insecticide: effect on stored product beetles and on the commodity. *Pest management science*, 72, 12, 2208-2217. DOI 10.1002/ps.4255
- ATHANASSIOU, C. G., VASSILAKOS, T. N., DUTTON, A.-C., JESSOP, N., SHERWOOD, D., PEASE, G., BRGLEZ, A., STORM, C., TRDAN, S. 2017. Novel insecticide formulations using Entostat powder technology: effects on stored product beetles and on the commodity. In: Trematerra, P. (ed.), Hamel, D. (ed.). Proceedings of the meeting [of the] IOBC-WPRS working group „Integrated protection of stored products“, Zagreb (Croatia), June 28- July 1, 2015 (IOBC-WPRS Bulletin, Vol. 111, 2015). Darmstadt, IOBC-WPRS. cop. 2015, p. 105.
- BOHINC, T., TRDAN, S. 2013. Insecticidal efficacy of five essential oils against bean weevil (*Acanthoscelides obtectus*, Coleoptera, Chrysomelidae) adults. In Trdan, S. (ed.), Maček, J. (ed.). Lectures and papers presented at the 11th Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation (and The Round Table of Risks Reduction in Phyto-pharmaceutical Products Use in the Frame of CropSustaIn Project), Bled, March 5-6 2013. Ljubljana, Plant Protection Society of Slovenia, 313-319 [Slovenian]
- BOHINC, T., VAYIAS, B. J., BARTOL, T., TRDAN, S. 2013. Assessment of insecticidal efficacy of diatomaceous earth and powders of common lavender and field horsetail against bean weevil adults. *Neotropical Entomology* 42, 6, 642-648. DOI 10.1007/s13744-013-0168-7
- BOHINC, T., TRDAN, S. 2015. New records of biological control agents in Slovenia in the period 2013-2014. In: Trdan, S. (ed.). Lectures and papers presented at the 12th Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation, Ptuj, March 3-4 2015. Ljubljana, Plant Protection Society of Slovenia, 289-294 [Slovenian]
- BOHINC, T., TRDAN, S. 2017. Comparison of insecticidal efficacy of four natural substances against granary weevil (*Sitophilus granarius* [L.]) adults: does the combined use of the substances improve their efficacy? *Spanish journal of agricultural research*, 15, 3, 1-8 (e1009). DOI 10.5424/sjar/2017153-11172.
- BOHINC, T., JELNIKAR, J., HORVAT, A., KLJAJIĆ, P., ANDRIĆ, G., PRAŽIĆ GOLIĆ, M., TRDAN, S. 2017a. Research on insecticidal efficacy of three different wood ashes against maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky, Coleoptera, Curculionidae) adults under laboratory conditions. In: Trdan, S. (ed.), Trematerra, P. (ed.). Book of abstracts, 11th Conference of the IOBC/wprs (OILB/srop) Working Group on Integrated Protection of Stored Products, Ljubljana, Slovenia, 3-5 July 2017. Ljubljana: Biotechnical Faculty; Zürich: IOBC. 2017, p. 86.

- BOHINC, T., DERVIĆ, A., HORVAT, A., KLJAJIĆ, P., ANDRIĆ, G., PRAŽIĆ GOLIĆ, M., TRDAN, S. 2017b. Effects of natural and synthetic zeolites against maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky, Coleoptera, Curculionidae) adults under laboratory conditions. In: Trdan, S. (ed.), Trematerra, P. (ed.). Book of abstracts, 11th Conference of the IOBC/wprs (OILB/srop) Working Group on Integrated Protection of Stored Products, Ljubljana, Slovenia, 3-5 July 2017. Ljubljana: Biotechnical Faculty; Zürich: IOBC. 2017, p. 87.
- LAZNIK, Ž., TÓTH, T., LAKATOS, T., VIDRIH, M., TRDAN, S. 2010. The activity of three new strains of *Steinernema feltiae* against adults of *Sitophilus oryzae* under laboratory conditions. International journal of food, agriculture & environment, 8, 1: 150-154.
- LAZNIK, Ž., TRDAN, S. 2010. Intraspecific variability of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae) as biological control agent of rice weevil (*Sitophilus oryzae* [L.], Coleoptera, Curculionidae) adults. Acta agriculturae Slovenica, 95, 1: 51-59.
- LAZNIK, Ž., VIDRIH, M., TRDAN, S. 2012. Efficacy of four essential oils against *Sitophilus granarius* (L.) adults after short-term exposure. African journal of agricultural research, 7, 21, 3175-3181.
- ROJHT, H., KOS, K., TRDAN, S. 2008. Research on insecticidal activity of diatomaceous earth against of rice weevil (*Sitophilus oryzae*, Curculionidae, Coleoptera). In: Tajnšek, A. (ed.). New challenges in field crop production 2008. Proceedings of symposium, Rogaška Slatina, 4-5 December 2008. Ljubljana, Slovenian Society for Agronomy, 263-270 [Slovenian]
- ROJHT, H., ATHANASSIOU, C., VAYIAS, B., KAVALLIERATOS, N., TOMANOVIĆ, Ž., VIDRIH, M., KOS, K., TRDAN, S. 2010a. The effect of diatomaceous earth of different origin, temperature and relative humidity against adults of rice weevil (*Sitophilus oryzae* [L.], Coleoptera, Curculionidae) in stored wheat. Acta agriculturae Slovenica, 95, 1: 13-20 [Slovenian]
- ROJHT, H., HORVAT, A., ATHANASSIOU, C. G., VAYIAS, B. J., TOMANOVIĆ, Ž., TRDAN, S. 2010b. Impact of geochemical composition of diatomaceous earth on its insecticidal activity against adults of *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Journal of pest science, 83, 4, 429-436. DOI 10.1007/s10340-010-0313-6
- ROJHT, H., HORVAT, A., TRDAN, S. 2010c. Local Slovenian quartz sands have low insecticidal activity against rice weevil (*Sitophilus oryzae* [L.], Coleoptera, Curculionidae) adults. International journal of food, agriculture & environment, 8, 3 & 4, 500-505.
- ROJHT, H., HORVAT, A., TRDAN, S. 2011. Efficacy of five Slovenian natural quartz sands admixed with wheat grains against *Sitophilus oryzae*. In: Athanassiou, C. G. (ed.), Adler, C. (ed.), Trematerra, P. (ed.). Proceedings of the meeting [of the] IOBC/WPRS Working group „Integrated protection of stored products“ at Campobasso, Italy, June 29 - July 2, 2009, (IOBC/WPRS Bulletin, Vol. 69). Darmstadt, Germany, IOBC/WPRS, 439-444.
- ROJHT, H., HORVAT, A., TRDAN, S. 2012a. Characteristics of diatomaceous earth as biopesticide for control of stored pests. Acta agriculturae Slovenica, 99, 1, 99-105 [Slovenian]
- ROJHT, H., KOŠIR, I. J., TRDAN, S. 2012b. Chemical analysis of three herbal extracts and observation of their activity against adults of *Acanthoscelides obtectus* and *Leptinotarsa decemlineata* using a video tracking system. Journal of plant diseases and protection, 119, 2, 59-67.
- TRDAN, S., VALIČ, N., UREK, G., MILEVOJ, L. 2005. Concentration of suspension and temperature as factors of pathogenicity of entomopathogenic nematodes for the control of granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Acta agriculturae Slovenica, 85, 1, 117-124.
- TRDAN, S., VIDRIH, M., VALIČ, N. 2006. Activity of four entomopathogenic nematode species against young adults of *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) under laboratory conditions. Journal of plant diseases and protection, 113, 4, 168-173.
- TRDAN, S., KAČ, M., VIDRIH, M., LAZNIK, Ž. 2010. Seasonal dynamics of three lepidopteran stored grain pests in Slovenia. In: Carvalho, M. O. (ed.). Proceedings of the 10th International working conference on Stored products protection, 27 June to 2 July 2010, Estoril, Portugal (Julius Kühn Archiv, No. 425, 2010). Berlin, Julius Kühn-Institut, 197-201.
- TRDAN, S., BOHINC, T. 2011. Results of laboratory trials on environmentally acceptable control measures against stored products pests (diatomaceous earth, essential oils ...). In: Trdan, S. (ed.). Abstracts of presentations. Workshop »Possibilities of environmentally acceptable production of field crops, industrial and fodder plants and sustainable use of grasslands in Slovenia. Ljubljana, 10-11 May 2011. Ljubljana, Biotechnical Faculty, Dept. of Agronomy, p. 17. [Slovenian]
- TRDAN, S., BOHINC, T. 2011. Testing the insecticidal activity of diatomaceous earth, and dusts of lavender and field horsetail against bean weevil (*Acanthoscelides obtectus* [Say], Coleoptera, Bruchidae) under laboratory condi-

- tions. In: Maček, J. (ed.), Trdan, S. (ed.). Lectures and papers presented at the 10th Slovenian Conference on Plant Protection, Podčetrtek, March 1-2 2011. Ljubljana, Plant Protection Society of Slovenia, 197-202.
- TRDAN, S., BOHINC, T. 2012. Testing the insecticidal activity of five different essential oils against bean weevil (*Acanthoscelides obtectus* [Say], Coleoptera, Chrysomelidae) adults under laboratory conditions. In: Athanassiou, C. G. (ed.), Kavallieratos, N. (ed.), Weintraub, P. G. (ed.). Proceedings of the meeting [of the] IOBC-WPRS Working group „Integrated protection of stored products“, Volos, Greece, 4 - 7 July, 2011, (IOBC wprs bulletin, Vol. 81, 2012). Darmstadt, Germany, IOBC/WPRS. cop. 2012, 123-131.
- TRDAN, S., BOHINC, T. 2013. Research on insecticidal efficacy of single and combined use of different natural substances against the granary weevil (*Sitophilus granarius* L.). In: Trdan, S. (ed.), Maček, J. (ed.). Lectures and papers presented at the 11th Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation (and The Round Table of Risks Reduction in Phyto-pharmaceutical Products Use in the Frame of CropSustaIn Project), Bled, March 5-6 2013. Ljubljana, Plant Protection Society of Slovenia, 160-167 [Slovenian]
- TRDAN, S., KAVALLIERATOS, N., STATHAKIS, T., KREITER, S., STOJANOVIĆ, A., TOMANOVIĆ, Ž., BOHINC, T. 2013. First records of three natural enemies in Slovenia: predatory mite *Neoseiulus californicus* (Arachnida, Acari, Phytoseiidae) and parasitoid wasps *Neochrysocharis formosus* (Insecta, Hymenoptera, Eulophidae) and *Dibrachys microgastri* (Insecta, Hymenoptera: Pteromalidae). In: Trdan, S. (ed.), Maček, J. (ed.). Lectures and papers presented at the 11th Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation (and The Round Table of Risks Reduction in Phyto-pharmaceutical Products Use in the Frame of CropSustaIn Project), Bled, March 5-6 2013. Ljubljana, Plant Protection Society of Slovenia, 286-294 [Slovenian]
- TRDAN, S., BOHINC, T. 2014. Testing the insecticidal efficacy of individual and combined use of four different natural substances against granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) adults under laboratory conditions. In: Athanassiou, C. G. (ed.), et al. Proceedings of the meeting [of the] IOBC-WPRS working group „Integrated protection of stored products“, Bordeaux, France, July 1-4, 2013, (IOBC-WPRS Bulletin, Vol. 98, 2014). Darmstadt, IOBC-WPRS. cop. 2014, 235-241.
- TRDAN, S. (ED.). 2014a. Workshop »From technological maturity to storing of cereals and legumes«. Abstracts of presentations, Ljubljana, 27 November 2014. Ljubljana, Biotechnical Faculty, Dept. of Agronomy, 23 p. [Slovenian]
- TRDAN, S. 2014b. Pests of stored cereals and legumes: presentation and control measures. In: Trdan, S. (ed.). Abstracts of presentations. Workshop »From technological maturity to storing of cereals and legumes«. Ljubljana, 27 November 2014. Ljubljana, Biotechnical Faculty, Dept. of Agronomy, 10-12 [Slovenian]
- TRDAN, S. (ED.). 2015a. 12. Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation, Ptuj, March 3-4 2015. Abstract volume. Ljubljana, Plant Protection Society of Slovenia, 127 p. [Slovenian]
- TRDAN, S. (ED.). 2015b. Lectures and papers presented at the 12th Slovenian Conference on Plant Protection with International Participation, Ptuj, March 3-4 2015. Ljubljana, Plant Protection Society of Slovenia, 398 p.
- TRDAN, S., HORVAT, A., BOHINC, T. 2015. Research on insecticidal efficacy of different inert dusts against the maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky, Coleoptera, Curculionidae) adults. In: Trematerra, P. (ed.), Hamel, D. (ed.). Proceedings of the meeting [of the] IOBC-WPRS working group „Integrated protection of stored products“, Zagreb (Croatia), June 28- July 1, 2015, (IOBC-WPRS Bulletin, Vol. 111, 2015). Darmstadt, IOBC-WPRS. cop. 2015, str. 141-145.
- TRDAN, S., BOHINC, T. 2016. New records of biological control agents in Slovenia in the period 2012-2014. In: Bockx, P. (ed.). Proceedings [of the] 68th International symposium on crop protection, Gent, May 17, 2016, (Communications in agricultural and applied biological sciences, 81(3), 2016), Gent, Gent University, 375-380.
- TRDAN, S., BOHINC, T., SNOJ, M., PRAŽIĆ GOLIĆ, M., KLJAJIĆ, P., ANDRIĆ, G. 2017. Assessment of the efficacy of spinetoram and spinosad against adults of three *Sitophilus* species reared of four different winter wheat varieties. In: Trdan, S. (ed.), Trematerra, P. (ed.). Book of abstracts, 11th Conference of the IOBC/wprs (OILB/srop) Working Group on Integrated Protection of Stored Products, Ljubljana, Slovenia, 3-5 July 2017. Ljubljana: Biotechnical Faculty; Zürich: IOBC. 2017, p. 89.
- TRDAN, S., TREMATERRA, P. (EDS.). 2017. 11th Conference of the IOBC/wprs (OILB/srop) Working Group on Integrated Protection of Stored Products, Ljubljana, Slovenia, 3-5 July 2017. Book of abstracts. Ljubljana: Biotechnical Faculty; Zürich: IOBC, 2017. 126 p.
- TREMATERRA, P., TRDAN, S. (EDS.). 2018. Proceedings of the meeting [of the] IOBC-WPRS Working group „Integrated protection of stored products“, Ljubljana, July 3-5, 2017 (IOBC WPRS Bulletin, Vol. 130, 2018). Darmstadt, Germany, IOBC/WPRS, 404 p.

TURINEK, M., BAVEC, F., REPIČ, M., BAVEC, M., ATHANASSIOU, C. G., TURINEK, M., LEITNER, E., TREMATERRA, P., TRDAN, S. 2016. Mortality, progeny production and preference of *Sitophilus zeamais* adults to wheat from integrated and alternative production systems. Acta agriculturæ Scandinavica. Section B, Soil and plant science, 66, 5, 443-451.

IMUNSKI SISTEM ŽUŽELK IN NJIHOV IMUNSKI ODZIV NA ENTOMOPATOGENE GLIVE

INSECT IMMUNE SYSTEM AND THEIR IMMUNE RESPONSE TO ENTOMOPATHOGENIC FUNGI

Eva PRAPROTNIK^{1,2}, Mojca NARAT³, Jaka RAZINGER¹

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0059>

IZVLEČEK

Imunski sistem žuželk in njihov imunski odziv na entomopatogene glive

Imunski sistem predstavlja enega izmed najbolj kompleksnih sistemov, saj nadzoruje interakcije med mikroorganizmi in gostitelji. Najbolj kompleksen imunski sistem imajo sesalci, vendar pa imajo tudi žuželke svoj imunski sistem in poznavanje le-tega ima posreden vpliv na ljudi. Težko je oceniti zdravstveni pomen in finančno breme škodljivih žuželk na ljudi. Ocenjuje se, da žuželke letno uničijo približno 15-18 % svetovne produkcije hrane, bolezni, ki jih prenašajo žuželke, pa so odgovorne za več milijonov smrti ljudi in domačih živali letno. To so razlogi, zakaj je že od konca 19. stoletja prejšnjega tisočletja imunski sistem žuželk predmet podrobnih raziskav, z namenom odkrivanja metod za biološki nadzor nad škodljivimi žuželkami. Namen tega prispevka je obravnavanje tematike in razjasnitev določenih pojmov v slovenskem jeziku, saj je slovensko izrazoslovje na področju imunskega obrambnega sistema nevretenčarjev pomanjkljivo.

Ključne besede: imunski sistem žuželk, entomopatogene glive, imunske signalne poti, parazitizem

ABSTRACT

Insect immune system and their immune response to entomopathogenic fungi

The immune system is one of the most complex systems, as it controls the interactions between microorganisms and hosts. Mammals have the most complex immune system, however insects also have their immune system and improved knowledge of it has an indirect effect on human life quality. It is difficult to assess the health significance and financial burden of harmful insects on humans. It is estimated that insects annually destroy approximately 15-18 % of global food production; furthermore insect-borne diseases are responsible for millions of deaths of people and domestic animals annually. Immune system of insects has been the subject of detailed research since the end of the 19th century in order to discover practical methods for the biological control of harmful insects. The purpose of this paper is to discuss and clarify certain concepts in the Slovenian language, since the Slovenian terminology of invertebrate immune system is sometimes inadequate.

Keywords: insect immune system, entomopathogenic fungi, immune signaling pathways, parasitism

¹ Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, Ljubljana, SI-1000, Slovenija, e-mail: eva.praprotnik@kis.si, jaka.razinger@kis.si

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, SI-1000, Slovenija

³ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale, SI-1230, Slovenija, e-mail: mojca.narat@bf.uni-lj.si

UVOD

Imunski sistem večceličnih organizmov temelji na prirojenem in pridobljenem imunskem sistemu. Prirojeni imunski sistem je evolucijsko starejši obrambni mehanizem in temelji na prepoznavanju in uničenju telesu tuje snovi. Prirojeni imunski sistem ni specifičen in reagira na vse morebitno škodljive elemente, ki so iz zunanega okolja vdrlji v telo (LAVINE & STRAND 2002). Pridobljeni imunski sistem pa temelji na specifičnem prepoznavanju tuje molekule, in sicer z vezavo antigena na receptorje limfocitov (BECKAGE 2003). Oba temeljna imunska sistema uporabljata tako celične kot tudi humoralne obrambne strategije, vendar se le-te med prirojenim in pridobljenim imunskim sistemom med seboj razlikujejo.

Pri žuželkah sta najpomembnejša celični in humoralni imunski odziv, ki sodita v okvir prirojenega oz. naravnega imunskega odziva. Žuželčji hemociti definirajo celični imunski odziv s procesi kot so fagocitoza, nodulacija in enkapsulacija, humoralni imunski odziv pa temelji na produkciji protibakterijskih, protiglivnih in protivirusnih molekul, ter melanizirajočega encima fenoloksidaza. Naloga gostiteljskega obrambnega sistema je, da prepreči vdor patogenov, oziroma, da ublaži posledice okužbe, medtem ko se patogeni

poskušajo izogniti imunskemu odzivu in v čim večji meri izkoristiti gostiteljske vire (BECKAGE 2003).

Glive so heterotrofni organizmi in so torej odvisne od organskih snovi, ki jih proizvedejo drugi organizmi. Eden od načinov pridobivanja organskih snovi, ki se ga poslužujejo glive, se imenuje parazitizem. Entomopatogene glive (EPG) so torej glive, ki uspešno parazitirajo žuželke in povzročijo njihovo smrt ali pa jih močno poškodujejo. Da so pri tem uspešne, je potreben stik z gostiteljem, penetracija in kolonizacija hemocela gostitelja (telesna odprtina členonožcev in nekaterih mehkužcev), ter uspešen razvoj spor. V večini primerov spore predstavljajo okuževalno enoto, torej enoto, ki je sposobna prenosa bolezni (ang. Infectious propagule), ta pa se veže na eksoskelet žuželke in prične s penetracijo hif v gostitelja (GILLESPIE IN SOD. 1997; TSAKAS & MARMARAS 2010; BUTT IN SOD. 2016). Koevolucija EPG in žuželk traja že zadnjih 400 milijonov let (LOVETT & ST. LEGER 2017). Najpogostejša interakcija med glivo in žuželko je parazit-gostitelj in je posledica selekcijskega pritiska, ki omogoča neprestani razvoj obrambnih mehanizmov žuželke ter strategije naselitve in preživetja gliv (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI 2013).

IMUNSKI SISTEM ŽUŽELK

Kljub temu, da imajo žuželke le prirojeni imunski sistem, imajo tudi druge učinkovite načine obrambe pred patogenimi organizmi, med katerimi so najpogostejši bakterije, glive, protozoi, virusi in ogorčice (DUBOVSKIY IN SOD. 2016). Najefektivnejši način obrambe je izogibanje in odstranjevanje patogenih organizmov še preden pride do okužbe. Tako vedenje je največkrat prisotno pri socialnih žuželkah. Zaradi večje koncentracije osebkov na enoto površine imajo socialne žuželke povečano možnost okužbe s patogenimi organizmi (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI 2013; BUTT IN SOD. 2016; LU & ST. LEGER 2016).

V primeru prisotnosti EPG *Metarhizium brunneum* mravlje delavke vrste *Lasius neglectus* s česanjem mehansko preprečujejo okužbo svojih ličink. Pri tem lahko uporabijo tudi strup, katerega glavna komponenta je mravljična kislina, s katero omogočijo kemijsko dezinfekcijo okuženega zaroda in delavk (TRAGUST IN SOD. 2013). Termiti vrste *Reticulitermes flavipes* se ob prisotnosti okuženega posameznika odzovejo z značilnim gibanjem, s katerim opozorijo ostale osebkove, nato pa sledi pokop okuženega termita (MYLES 2002).

Kobilice vrste *Camnula pellucida* v primeru prisotnosti EPG *Entomophaga grylli* izkoriščajo sončno sevanje, zaradi katerega se njihova telesna temperatura dvigne 10-15°C nad temperaturo okolja. Daljša izpostavljenost temperaturam nad 35°C je za kobilice koristna, saj je to zgornja meja preživetja te glive, ki je ena izmed najpogostejših povzročiteljev naravne smrti pri kobilicah (CARRUTHERS IN SOD. 1992).

Težava pri prepoznavanju patogenov je njihova velika variabilnost, molekularna heterogenost ter za mikroorganizme značilna visoka stopnja mutacije. Vendar obstajajo določene molekularne strukture patogenov, ki so zelo specifične in visoko ohranjene, poleg tega pa pri posameznih patogenih določajo njihovo stopnjo patogenosti, zato morajo biti nujno prisotne. Take specifične molekularne vzorce imenujemo molekule DAMP (ang. Damage Associated Molecular Patterns) in molekule PAMP (ang. Pathogen Associated Molecular Patterns) (MEDZHITOV & JANEWAY 1997). Žuželke so razvile receptorje v hemolimfi, na membrani epidermisa in maščobnem telesu, ki so v primeru mehanske ali encimske poškodbe kutikule ter vdora

mikroorganizmov sposobni prepoznave specifičnih molekul DAMP in PAMP na površini patogena. Ti receptorji se imenujejo receptorji PRR (ang. Pattern-Recognition Receptors) in aktivirajo celični ali humoralni imunski odziv prirojenega imunskega sistema (GROSS 2006).

Celični imunski odziv

Žuželke nimajo krvnih žil; imajo odprt krvožilni sistem, pri katerem hemolimfa obliva tkiva in organe v telesni votlini, hemocelu (TSAKAS & MARMARAS 2010). Celični imunski odziv žuželke temelji na celicah, imenovanih hemociti, ki se nahajajo v hemolimfi. Morfologija hemocitov se med vrstami razlikuje, prav tako pa so lahko različni tudi med osebki iste vrste različnih starosti. Najpogostejši hemociti pri žuželkah so granulociti in plazmatociti, ki sodelujejo pri procesih fagocitoze, nodulacije in enkapsulacije (VINSON 1991).

Hemociti lahko fagocitirajo patogene, ki so v primeru manjši od 1 μm (na primer bakterije in kvasovke). Proces se prične z vezavo patogenov (tarčnih celic) na receptorje hemocitov. Membrane posameznih hemocitov se uvihajo, tvorijo prstu podobne psevdopodije, ki obdajo patogen. Sledi sprostitvev litičnih encimov v fagosom, ki patogen razkrojijo (ROSALES 2011).

Enkapsulacija je mehanizem edinstven za žuželke in temelji na združenem delovanju posameznih celic v hemolimfi. Enkapsulacija poteče, ko je tujek prevelik za fagocitozo. Hemociti se razporedijo po površini tujka, dokler ni v celoti prekrit z več plastmi hemocitov (SCHMIT & RATCLIFFE 1977). Enkapsulacija lahko poteče v nekaj minutah od pričetka penetracije patogena. Granulocite so navadno prve celice, ki pridejo v stik s patogenom in nato sprostijo svojo vsebino, ki na površini patogenov tvori lepljiv matriks. Ta proces sproži vezavo številnih plazmatocitov, ki tvorijo kapsulo in tako izolirajo patogen. Na koncu sledi še plast granulocit, ki tvorijo tanko ovojnico okoli formirane kapsule. Te kapsule se nato vežejo na notranje strukture gostitelja, kot so maščobna telesa, malpighijeva telesca, žleza slinavka ipd., in so nato odstranjene iz obtoka (BECKAGE 2003).

Med procesom enkapsulacije hemociti, ki se nahajajo v notranjih slojih kapsule, nalagajo melanin in druge toksične molekule v kapsulo in povzročijo smrt parazita (BECKAGE 2003; DUBOVSKIY IN SOD. 2016). Melanin fizično omeji vsiljivca in tako prepreči oziroma upočasni njegovo rast, hkrati pa se med nastajanjem melanina sproščajo strupeni kvinonski intermedijati (CERENIUS & SÖDERHÄLL 2004). Melanizacija

patogenov in poškodovanih tkiv je ena izmed najpomembnejših funkcij prirojenega imunskega sistema in poteka v procesu proPO kaskade. Ob prisotnosti patogena pride do pretvorbe neaktivnega encima profenoloksidaza (proPO) v aktivni encim fenoloksidaza (PO), kar omogoča sintezo melanina in celjenje kutikule s procesom sklerotizacije. Sklerotizacija je kemijski proces, pri katerem pride do utrditve hitinske kutikule, ki je nato odpornejša na encimsko razgradnjo in tako lahko zavira delovanje glivnih proteaz, katerih funkcija je hidroliza kutikularnih proteinov (ANDERSEN 2003). Serinske proteaze regulirajo delovanje encima PO in tako preprečujejo nepotrebno proizvodnjo strupenih spojin (SÖDERHÄLL IN SOD. 2013). Hkrati serinske proteaze v primeru poškodbe uravnavajo koagulacijo hemolimfe z namenom preprečevanja izgube telesne tekočine in omejevanja gibanja mikrobov (THEOPOLD IN SOD. 2002).

Humoralni imunski odziv

Besedna zveza izhaja iz besede humorizem ali humoralizem in se nanaša na sistem medicine, ki so se ga posluževali starogrški filozofi. Osredotoča se na koncept, da imajo različne kombinacije štirih ključnih telesnih tekočin (kri, sluz, črni in rumeni žolč) značilne učinke na človekovo zdravje in vedenje. V okviru imunskega sistema pri sesalcih pod besedo humoralni imunski odziv razumemo nastanek specifičnih protiteles, ki se večinoma pojavijo v krvi (BROD IN SOD. 2014).

Humoralni imunski odziv žuželk temelji na izločanju protimikrobnih peptidov v hemolimfo, kjer vplivajo direktno na parazite ali posredno preko spodbujanja delovanja hemocitov (BECKAGE 2003). Navadno so sintetizirani iz maščobnega telesa in v manjši meri tudi iz hemocitov, reprodukcijskih organov in žlez slinavk. Maščobno telo je največji organ v hemocelu in pri žuželkah opravlja podobno funkcijo kot ledvice pri vretenčarjih. Poleg sinteze protimikrobnih peptidov deluje tudi kot shramba lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov (HOFFMANN 2003; TSAKAS & MARMARAS 2010). Do sedaj je bilo izoliranih čez 150 žuželčjih protimikrobnih peptidov. Načeloma so to majhne molekule, ki se nahajajo v tkivih in organih, ki so izpostavljeni patogenom. Protimikrobni peptidi se vežejo na membrane patogenih organizmov in pri njih povzročijo okvaro ali smrt celic na način, da poškodujejo celično membrano, ustvarjajo luknjice, ki povzročijo izlitje celične vsebine, zavirajo sintezo proteinov ter DNK in RNK molekul ipd. (CHOI IN SOD. 2016).

IMUNSKKE SIGNALNE POTI ŽUŽELK

Ko receptorji PRR na gostiteljskih celicah zaznajo mikroorganizem, se aktivira serija signalnih molekul znotraj celic. Glede na molekulo PAMP/DAMP, ki jo določena molekula na hemocitu prejme, se določi odziv celice na mikroorganizem. Vinska mušica *Drosophila melanogaster* je modelni organizem za preučevanje signalnih poti prirojenega imunskega sistema (HOFFMANN 2003). Pri žuželkah sintezo protimikrobnih peptidov omogočajo štiri znotrajcelične imunske signalne poti, in sicer Toll, Imd (ang. Immune Deficiency), JNK (ang. Jun Amino-terminal Kinase) in (JAK)/STAT (ang. Janus Kinase/Signal Transducer – Activator of Transcription; BOUTROS IN SOD. 2002). Gram-pozitivne bakterije in glive spodbudijo signalno pot Toll, Gram-negativne bakterije (in v nekaj primerih tudi Gram-pozitivne bakterije) spodbudijo signalno pot Imd (Rosales 2017), glive in virusi pa signalno pot (JAK)/STAT (BUTT IN SOD. 2016).

Signalna pot Toll

Signalna pot Toll temelji na aktivaciji tollu podobnih receptorjev (ang. Toll-like receptors, TLR), ki so sposobni prepoznave določenih molekul PAMP na antigenih (Slika 1). TLR so transmembranski proteini, katerih naloga je prenos signala v procesu imunskega odziva. Aktivacija receptorja TLR zahteva vezavo citokinom podobnega polipeptida Spätzle (ligand) na zunajcelično domeno receptorja TLR, katere naloga je prepoznavanje liganda in prenos signala (EVANS IN SOD. 2006). Tri serinske proteaze so potrebne za aktivacijo polipeptida Spätzle. Sledi konformacijska sprememba (prehod v drugo obliko) TLR in aktivacija znotrajceličnih domen smrti (DD), ki skupaj s TLR tvorijo receptorski kompleks (HOFFMANN 2003). Aktivacija tega kompleksa vodi do fosforilacije proteina Cactus, ki je inhibitor proteina NF kappa B (proteinski kompleks, ki omogoča transkripcijo DNK – transkripcijski faktor), imenovanega Dorsal/Dif (ang. Dorsal Related Immunity Factor). Po degradaciji inhibitorja Cactus sledi translokacija Dorsal/Dif v jedro, kjer aktivira transkripcijo protimikrobnih peptidov (EVANS IN SOD. 2006; ROSALES 2017). Rezultat signalne poti Toll je nastanek protiglivnega peptida, imenovanega drozomicin in protibakterijskega peptida, imenovanega diptericin (LEMAITRE & HOFFMANN 2007).

Signalna pot Imd

Aktivacija signalne poti Imd poteče, ko transmembranski protein PGRP-LC (ang. Peptidoglycan reco-

gnition protein) prepozna poly PGN (ang. Polymeric DAP-type Peptidoglycan), ki je značilen za Gram-negativne bakterije. Sledi vezava znotrajceličnih domen smrti (DD) s proteinom Imd, ki skupaj s PGRP-LC tvorijo receptorski kompleks. Protein DREDD (ang. Death-Related ced-3/Nedd2-like Protein) loči protein Imd in tako aktivira njegovo vezavo s kompleksom TAB2 in TAK1. TAK1 je odgovoren za aktivacijo kompleksa IKK, katerega posledica je fosforilacija proteina NF kappa B, imenovanega Relish (HOFFMANN 2003; ROSALES 2017). Tega za razliko od Dorsal/Dif proteina (v Toll signalizacijski poti) ne inhibira Cactus, ampak sam vsebuje inhibitorško sekvenco (DUSHAY IN SOD. 1996). Po fosforilaciji te inhibitorске domene lahko pride do translokacije proteina Relish v jedro, kjer aktivira transkripcijo protimikrobnih peptidov. Protein DREDD naj bi sodeloval pri cepitvi in translokaciji proteina Relish v jedro (STÖVEN IN SOD. 2003). Rezultat signalne poti Imd je nastanek protibakterijskih snovi diptericin, drosocin in atacin (HOFFMANN 2003).

Signalna pot JNK

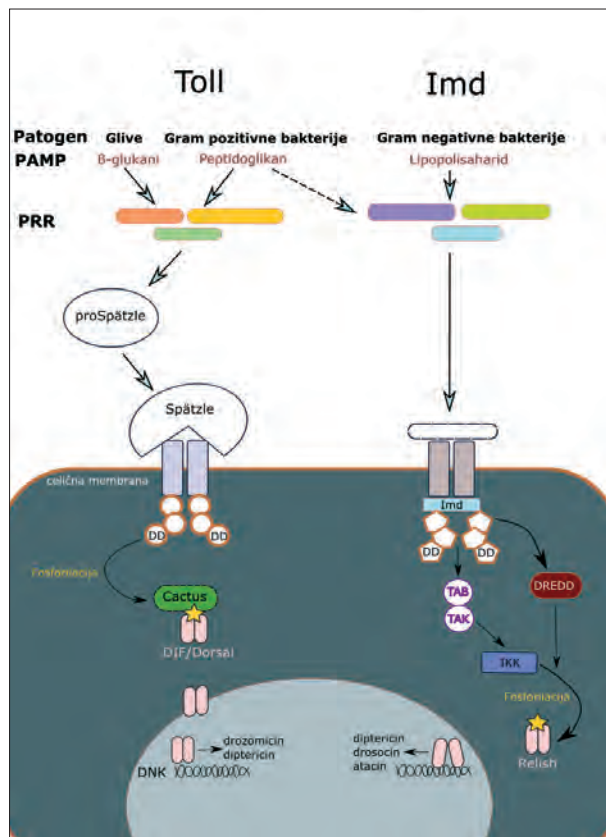
Aktivacijo te signalne poti povzroči okoljski stres (sevanje, visoka temperatura, oksidativni stres, poškodbe DNK), vnetni citokini in rastni faktorji. MAPK kinaza (ang. Mitogen-Activated Protein Kinase) prenese signal na JNK. Sledi fosforilacija transkripcijskih faktorjev Jun in Fos, ki skupaj tvorita kompleks AP-1, ta pa aktivira transkripcijo tarčnih genov. Signalna pot JNK je vključena v številne biološke procese, kot so embrionalni razvoj, apoptoza, imunski sistem, uravnavanje stresa in diferenciacija celic. JNK signalna pot je kompleksna in je aktivirana s številnimi mehanizmi (GARVER IN SOD. 2013). Na izražanje citoskeletnih proteinov v signalni poti JNK naj bi imela vpliv tudi signalna pot Imd, kar bi lahko pomenilo povezavo med protimikrobnimi obrambnimi mehanizmi in procesi obnove tkiva (BOUTROS IN SOD. 2002).

Signalna pot JAK-STAT

Aktivacijo signalne poti JAK-STAT povzroči vezava citokinom podobnih proteinov v hemolimfi, imenovanih upd, na transmembranski receptor Dome, ki je vezan na protein JAK. Konformacijska sprememba receptorja Dome povzroči fosforilacijo proteina JAK in citoplazemske domene receptorja Dome, s čimer se

ustvarijo ustrezna mesta za vezavo proteina Stat92E. Sledi fosforilacija proteina Stat92E in translokacija njegove spremenjene oblike v jedro, kjer aktivira transkripcijo genov (BINA & ZEIDLER 2013). Geni vinske mušice kodirajo tudi proteine, ki zavirajo JAK-STAT

signalno pot. Eden izmed takih inhibitorjev je Socs36E (ROSALÉS 2017). JAK-STAT signalna pot je poleg imunskega sistema vključena tudi v embrionalni razvoj in-sektov, formacijo spola, trahealni sistem, hematopoezo in prebavni sistem (BINA & ZEIDLER 2013).



Slika 1: Poenostavljena skica imunskih signalnih poti. Signalna pot Toll: molekule PRR (ang. Pattern-Recognition Receptors) prepoznajo molekule PAMP (ang. Pathogen Associated Molecular Patterns) gliv in Gram-pozitivnih bakterij, čemur sledi pretvorba polipeptida Spätzel iz neaktivne v aktivno obliko. Transmembranski protein skupaj z DD (ang. Death Domain) tvori receptorski kompleks, čemur sledi fosforilacija proteina Cactus. Sledi sprostitvev transkripcijskega faktorja Dif/Dorsal v jedro, kjer aktivira transkripcijo protimikrobnih peptidov. Signalna pot Imd (ang. Immune Deficiency): molekule PRR prepoznajo molekule PAMP Gram-negativnih bakterij. Sledi vezava Imd s transmembranskim proteinom. DREDD (ang. Death-Related ced-3/Nedd2-like Protein) loči Imd in aktivira njegovo vezavo s kompleksom TAB2 in TAK1. Aktivira se kompleks IKK, zaradi katerega pride do fosforilacije proteina Relish. Sledi translokacija proteina v jedro, kjer pride do transkripcije protimikrobnih peptidov.

ODZIV IMUNSKEGA SISTEMA ŽUŽELK NA ENTOMOPATOGENE GLIVE

Glive, ki povzročajo bolezn in smrt pri žuželkah imenujemo entomopatogene glive. EPG so med številnimi mikroorganizmi najpomembnejše povzročiteljice bolezni in smrti pri žuželkah (MOORE IN SOD. 2000) in predstavljajo okolju prijaznejšo alternativo kemijskim insekticidom (ROBERTS & HAJEK 1992). Za zatiranje škodljivih žuželk se v kmetijstvu najpogosteje uporablja glive iz reda Hypocreales, med katerimi prevladujejo predstavniki rodov *Metarhizium* spp. in *Beauveria* spp. (ROBERTS & ST. LEGER 2004). Uporaba teh gliv prevladuje zaradi širokega razpona tarčnih gostiteljev, saj je mnogo vrst gliv znotraj teh rodov fakultativnih parazitov in posledično za dokončanje življenjskih ciklov niso popolnoma odvisni od svojega gostitelja (GOETTEL IN SOD. 2001).

Vstop EPG v telo gostitelja poteka po sledečem vrstnem redu: pričvrstitev konidijev (nespolna in negibljava glivna spora) na kutikulo žuželke, v mnogih, vendar ne v vseh primerih, tvorba apresorija, penetracija kutikule, kjer ob ustreznih pogojih spore pričnejo kaliti, kolonizacija hemocela in na koncu sporulacija. Imunski sistem gostitelja se tekom celotnega procesa poskuša upreti okužbi in kolonizaciji patogena.

Pričvrstitev konidijev na kutikulo

Kutikula predstavlja prvo in najpomembnejšo oviro za EPG, saj je zaradi UV svetlobe, spreminjajoče se temperature in vlage ter gostiteljskih obrambnih sistemov

to za glivo zelo zahtevno okolje (BUTT IN SOD. 2016; BUTT & GOETTEL 2000). Gostitelju je pomembno, da s samo strukturo in kemijsko sestavo kutikule onemogoči pričvrstitev čim večjega števila konidijev in posledično zmanjša njihovo stopnjo patogenosti (BOUCIAS & PENDLAND 1991).

Zunanjo plast kutikule predstavlja hidrofobni sloj, bogat z lipidi, kateremu sledijo sloji hitina in kutikularnih proteinov (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI 2013; MUN IN SOD. 2015), zaradi katerih je posledično nepropustna za večino organizmov (npr. virusi, bakterije, protozoi). Ti v telo žuželke navadno vstopajo preko prebavnega trakta. Glive pa so razvile aktivne mehanizme za vezavo propagul (razmnoževalnih enot, navadno konidiji ali blastospore) na kutikulo. V kopenskih ekosistemih zračni konidiji pasivno potujejo preko zraka in proste vode, ki teče čez substrat, kjer so prisotni insekti. Konidiji se na hidrofobne površine eksoskeleta gostitelja vežejo s pomočjo proteinov imenovanih hidrofobini, ki se nahajajo v zunanjih slojih celične stene konidijev. Hidrofobini omogočajo tvorbo hidrofobnega ovoja (BOUCIAS IN SOD. 1988; WÖSTEN 2001). Zračni konidiji imajo slabo sposobnost vezave na hidrofilne površine, še posebej v vodnih okoljih. Konidiji EPG rodu *Metarhizium* se posledično težje pričvrstijo na površino komarjevih (vodnih) ličink kot pa na kopenske gostitelje, predvidoma zaradi hidrofilne narave in pomanjkanja specifičnih ogljikovodikov v kutikuli ličink (GREENFIELD IN SOD. 2014).

Poleg fizične odpornosti, gostiteljski organizem poseduje tudi druge mehanizme, ki povečujejo odpornost kutikule pred EPG. Na patogenezo gliv lahko vpliva z različnimi koncentracijami ogljikovodikov, estrov, alkoholov in ketonov (ANDERSEN 2010; GREENFIELD IN SOD. 2014), ter toksičnimi maščobnimi kisljinami, lipidi in aldehidi v zunanji plasti kutikule; gosenice vrst *Heliiothis zea* in *Spodoptera fragiterda* imajo v kutikuli prisotno kaprilno kislino, ki zavira kalitev glive *B. bassiana* (SMITH & GRULA 1982), določeni lipidi in aldehidi v kutikuli stenice zelene smrdljivke *Nezara viridula* pa imajo fungistatični učinek (zavira rast gliv, vendar glive ne ubije) na vrsto *M. anisopliae* (SOSA-GOMEZ IN SOD. 1997). Gostiteljski organizem na patogenezo gliv vpliva tudi z levitvijo in metamorfozo, saj levitev potencialno zmanjša učinkovitost patogena (FARGUES & VEY 1974), ter z izborom simbiotov, ki proizvajajo fungistatične spojine; samice samotarske ose čebeljega volkca *Philanthus triangulum* gojijo bakterije iz rodu *Streptomyces* v posebnih antenskih žlezah, ki jih nanesejo na svoj zarod. Bakterija je posledično prisotna v kutikuli osje bube, kar znatno zmanjša možnost glivne okužbe in posledično poveča možnost preživetja bube (KALTENPOTH IN SOD. 2005).

Glive posedujejo številne gene, ki kodirajo proteine, odgovorne za vezavo konidijev na kutikulo, hkrati pa ti proteini vplivajo tudi na imunski sistem žuželk. Produkcijo hidrofobinov opredeljujejo geni *hyd*. Študija ZHANG IN SOD. 2011 je pokazala, da inaktivacija le-teh vpliva na spremembo površinskih elementov konidijev, zmanjša se hidrofobnost, adhezijska sposobnost in virulenca konidijev. Geni *mad* omogočajo produkcijo proteinov Mad1 in Mad2, ki pozitivno vplivajo na vezavo konidijev na kutikulo žuželk in korenine rastlin ter hkrati vplivajo na izražanje genov, ki so povezani s kalitvijo in formacijo blastospor (WANG & ST. LEGER 2007a). Protein celične stene *cwp10* povečuje hidrofobnost konidijev in sposobnost vezave konidijev EPG (LI IN SOD. 2010). Gen *MrCYP52* kodira encim, ki je potreben za učinkovito razgradnjo voskastih ogljikovodikov v zunanjih delih kutikule (LIN IN SOD. 2011).

Penetracija kutikule

Ko se konidij uspešno veže na kutikulo, prične z izražanjem kalitvene cevke. Na koncu le-te lahko pride do formacije apresorija (nabrekliina, ki olajša pritrditev in vdor glive v gostitelja s pomočjo prodornega klina; VEGA IN SOD. 2012). Lipidi predstavljajo enega izmed pomembnejših zalog hranil in so pred penetracijo transportirani v nastajajoči apresorij. Tam pride do razgradnje lipidov, pri čemer se sprošča glicerol, posledično pa se zviša tudi turgor (sila znotraj celice, s katero membrana pritiska na celično steno; WANG & ST. LEGER 2007b). Tvorba apresorija je pri večini EPG vrstno specifična in torej odvisna od hranil in fizikalno-kemijskih elementov na površini kutikule (ST. LEGER IN SOD. 1989). Penetracija glive nastopi z mehansko silo turgorja in uporabo encimov za razgradnjo kutikule. MCCAULEY IN SOD. 1968 so raziskovali penetracijo EPG *M. anisopliae* v kutikulo ličink štirih vrst pokalic (Elateridae). Ličinke pokalic se imenujejo strune in so pomembni škodljivci kmetijskih pridelkov tako v Sloveniji kot tudi drugje po svetu. Večina okužb se je pojavila v pregibnih intersegmentnih membranah in spiraklih (dihalne odprtine), saj se nanje lažje vežejo kot pa na hitinizirane in zunanjim dejavnikom izpostavljene dele kutikule. Hkrati višja vlaga v pregibnih delih poveča možnost kalitve.

Zunanji del epikutikule je odporen na kemijsko in encimsko razgradnjo, vendar je pri večini žuželk ta plast relativno krhka in torej bolj občutljiva na mehansko silo (HEPBURN 1958). Prokutikula vsebuje hitinske fibrile, ki so skupaj z lipidi vgrajeni v proteinski matriks, torej so pri razgradnji kutikule in prevzemanju

hranil najuspešnejši konidiji, ki vsebujejo encime, kot so proteaze, hitinaze, lipaze in drugi (CHARNLEY 2003).

V virulentnih konidijih je prisoten gen, ki kodira nastanek proteina Pr1, ki omogoča razgradnjo funkcijskih elementov na površini kutikule in sodeluje pri penetraciji hif znotraj kutikule gostitelja (SHAH IN SOD. 2005; SMALL & BIDOCHKA 2005). Gen *MPL1* je pri *M. anisopliae* vpet v akumulacijo lipidov in ima posledično velik vpliv na debelino hif in zmožnost mehanske penetracije konidija v telo gostitelja (WANG & ST. LEGER 2007b).

Kolonizacija hemocela

Večina notranjih parazitov odloži svoja jajčeca ali spore znotraj hemocela svojega gostitelja, saj so tam idealni prehranski in okoljski pogoji za nadaljnji razvoj (VINSON 1991). Na podlagi študij EPG *M. anisopliae* sta se razvili dve teoriji o strategijah, ki jih EPG uporabijo pri parazitiranju gostitelja:

1. Strategija rasti: glive se v hemocelu hitro in gosto razrastejo in porabljajo hranila svojih gostiteljev, fizično poškodujejo njihova tkiva ter blokirajo tok hemolimfe, kar privede do smrti žuželke (ANDERSON IN SOD. 2011).
2. Strategija produkcije toksičnih sekundarnih metabolitov: glive imajo v hemocelu počasnejšo vegetativno rast in svoje gostitelje ubijajo s produkcijo strupenih sekundarnih metabolitov (SRIVASTAVA IN SOD. 2009), ki pri žužkah povzročijo paralizo, krče, spremembo v obnašanju, motnje v koordinaciji... Destruksin na primer povzroči nepravilno delovanje kalcijevih kanalčkov v žuželčnih mišičnih membranah, sledi mišična paraliza in ob velikih koncentracijah tudi smrt (SAMUELS IN SOD. 1988; KERSHAW IN SOD. 1999).

Za uspešno kolonizacijo hemocela se morajo glive ubraniti pred napadom gostiteljskega imunskega odziva. Prepoznavi gostiteljskega imunskega sistema se izognejo z uporabo različnih strategij, in sicer EPG rodu *Entomophthora* se v dvokrilcih razmnožujejo v obliki protoplasta (glivne celice brez celične stene; VINSON 1991), EPG rodu *Metarhizium* uporabljajo »kamuflačno strategijo«, kjer hifne celice obdajo s hidrofilnim kolagenom (WANG & ST. LEGER 2006), EPG vrste *M. anisopliae* lahko s procesom fagocitoze vstopi v gostiteljske celice, s pomočjo katere lahko neovirano potuje po telesu gostitelja (KURTTI & KEYHANI 2008). Nekateri sevi rodov *Metarhizium* in *Beauveria* so odporni na drozomicin, glavni protiglivi peptid vinske mušice (LU & ST. LEGER 2016), nekatere EPG pa so

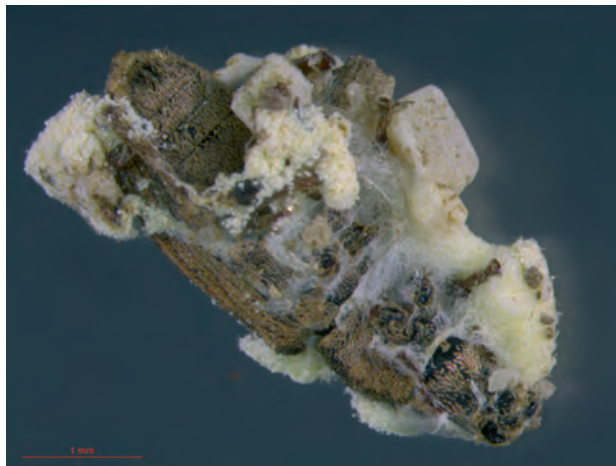
sposobne tvorbe sekundarnih metabolitov, na primer destruksin in oosporein, ki delujejo kot efektorske molekule, ki zavirajo proPO kaskado in posledično tvorbo protiglivnih peptidov in melanizacije (FENG IN SOD. 2015). Veliko vrst EPG ob stiku s hemocelom spremeni svojo rast iz večcelične micelijske oblike v enocelično obliko kvasovk. Take glive imenujemo dimorfne glive. S spremembo rastne oblike se izognejo imunskemu odzivu gostitelja in se posledično lahko neovirano množijo v hemocelu (BOYCE & ANDRIANOPOULOS 2015). Mehanizmi, ki sprožijo dimorfizem gliv, so pri žužkah slabo poznani (GAUTHIER 2015), vendar temeljijo na tem, da gliva v stiku s hemocelom prične s tvorbo kvasnih celic, imenovanih blastospore, te pa nato pričnejo z brstitvijo. Blastospore EPG vrste *B. bassiana* izlevijo epitope (območje na antigenu, ki ga prepozna imunski sistem) na celični steni, imunski sistem žuželke pa jih zato ne prepozna kot tujke (WANCHOO & SOD. 2009).

Sporulacija

Ko EPG izčrpa svojega gostitelja, še posebej dušikovih virov, kvasna oblika zopet preide v micelijsko. Hife nato pričnejo rasti navzven, od znotraj predrejo kutikulo in tvorijo spore na vrhu hif (Slika 2). Sporulacija lahko poteče tako v živih kot tudi mrtvih gostiteljih (BROBYN & WILDING 1983; FREIMOSER IN SOD. 2003). Za uspešno kalitev konidiji potrebujejo vlago in ustrezna hranila, kot so sladkorji, lipidi, amino kisline in dolgoveržne maščobne kisline (SMITH & GRULA 1981). Proces produkcije, širjenja in preživetja spor je v veliki meri odvisen od zunanjih dejavnikov, zato glive proizvedejo veliko število spor (BELAY & TENKEGNA 2017) kot prilagoditev na visoko verjetnost, da večina teh spor ne bo preživela in uspešno okužila novega gostitelja. Glede na okoljske razmere, glivne hife začnejo bdisi s proizvodnjo infektivnih spor za takojšnji prenos na naslednjega gostitelja, ali mirujočih spor, ki postanejo aktivne ob ugodnejših razmerah (LOVETT & ST. LEGER 2017). Proizvodnja infektivnih spor za takojšnji prenos na naslednjega gostitelja velja za učinkovitejšo, saj dlje kot je žuželčje truplo izpostavljeno okolju, večja je možnost, da ga obrastejo saprofitske glive (gniloživke), je prestavljen na območje neugodno za sporulacijo ali pa ga pojejo mrhovinarji (ROY IN SOD. 2006). Glive so znane tudi po sposobnosti manipulacije gostiteljevega vedenja z namenom zagotovitve boljših pogojev za prenos spor. Najbolj znan je primer EPG vrste *Ophiocordyceps unilateralis*, katere gostitelj so mravlje. Okužena mravlja zapusti svoje mravljišče in se s svojimi mandibulami (spodnje čeljusti) oprime spodnje

strani drevesnega lista, kjer sta vlaga in temperatura najustrežnejši za sporulacijo. Iz mravljinca trupa sča-

soma zrastejo spore, ki padejo na mimoidoče mravlje in v krogu se zaključijo (ANDERSEN in sod. 2009).



Slika 2: Odrasle žuželke okužene z entomopatogenimi glivami; levo - dvokrilec iz družine pravih muh (*Muscidae*) okužen z glivo *Trichothecium roseum*; desno - predstavnik družine rilčkarjev (*Curculionidae*), okužen z EPG *Metarhizium robertsii*. Foto: Jaka Razinger

ZAKLJUČEK

Žuželke so neprestano izpostavljene potencialno patogenim mikroorganizmom in evkariontskim parazitom, zato so razvile različne obrambne mehanizme. Njihova obramba temelji na fizični obrambi s pomočjo kutikule ter odzivu prirojenega imunskega sistema s sintezo hemocitov in protimikrobnih peptidov. Kutikula žuželk skupaj z vedenjsko ekologijo in fizičnim odstranjevanjem patogenov predstavlja primarno obrambo žuželk, ki je hkrati tudi energijsko najvarčnejša. Sam imunski sistem predstavlja sekundarno obrambo, ki nastopi po vstopu patogena v gostitelja in ima veliko skupnega s prirojenim imunskim sistemom vretenčarjev, vključno z izločanjem protimikrobnih peptidov, fagocitozo in encimsko razgradnjo patogenih organizmov. Glivne spore v stiku z žuželčjo kuti-

kulo začnejo s tvorbo apesorija in prodornega klina, nato pa s pomočjo encimov in sile turgorja penetrirajo v telo gostitelja. Sledi kolonizacija hemocela, pri kateri pa se glivni patogeni soočajo s številnimi obrambnimi mehanizmi imunskega sistema žuželk.

Poleg ključne vloge v naravnih ekosistemih, entomopatogene glive predstavljajo alternativo kemičnim insekticidom, saj so glive najpogostejši naravni povzročitelji obolenja in smrti žuželk. V kmetijstvu ima torej proučevanje adhezijskih lastnosti mikroorganizmov veliko vlogo pri biološkem varstvu rastlin pred škodljivimi žuželkami in pleveli (OERKE & DEHNE 2004), v medicini pa predstavljajo učinkovito orodje za nadzor bolezni, ki se prenašajo preko žuželčjih vektorjev (KLEMPNER IN SOD. 2007).

SUMMARY

The immune system of multicellular organisms is based on the innate and acquired immune system. The innate immune system is an evolutionary older defense mechanism and is based on recognition and removal of foreign substances. The innate immune system is not specific and reacts to all possible harmful

elements that have entered the body from the external environment (LAVINE & STRAND 2002). The acquired immune system is based on the specific recognition of the foreign molecule by binding of the antigen to the lymphocytic receptors (BECKAGE 2003). Both types of the immune system use cellular and humoral defensive

strategies, although the strategies differ between innate and acquired immune system.

The immune system of insects is based on innate immunity, which is characterised by specific cellular and humoral immune response. Humoral immune response is based on the production of antibacterial, antifungal and antiviral molecules together with melanization reaction, which includes enzyme phenoloxidase. Insect hemocytes define cellular immune response with processes such as phagocytosis, nodulation and encapsulation (BECKAGE 2003). One cannot forget the importance of behavioral ecology and physical removal of pathogens which represents the primary and more energy-efficient defense of insects since it allows avoiding and removing pathogenic organisms before infection even occurs. This behavior is most often present in social insects. Due to the increased concentration of specimens per unit area, social insects have an increased possibility of infection with pathogens (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI 2013; BUTT et al., 2016; LU & ST. LEGER 2016). Function of the host defense system is therefore to prevent the pathogen invasion, or to diminish the consequences of the infection, while the pathogen attempts to avoid the immune response and to make the most of the host resources (BECKAGE 2003).

The problem of identifying pathogens is their high variability, molecular heterogeneity and high degree of mutation. However, pathogens possess certain molecular structures that are very specific and conservative, therefore they need to be present in individual pathogens, as they determine their degree of pathogenicity. This specific molecular samples are called DAMP molecules (Damage Associated Molecular Patterns) and

PAMP molecules (Pathogen Associated Molecular Patterns) (MEDZHITOV & JANEWAY 1997). In case of mechanical or enzymatic damage of the cuticle, followed by the invasion of microorganisms, insects developed receptors in the hemolymphs, epidermal membranes and the fat body that are capable to identify specific DAMP and PAMP molecules on the surface of the pathogen. These receptors are called PRR receptors (Pattern-Recognition Receptors) and are crucial for activating proper cellular or humoral immune response (GROSS 2006).

Fungi are heterotrophic organisms and therefore depend on organic matter produced by other organisms. One way to obtain organic matter is in the form of parasitism. Entomopathogenic fungi (EPF) are therefore fungi that successfully infect insect's body and cause death or serious injury. In order to be successful, they need to come into physical contact with the host, followed by penetration and colonization of the host haemocoel (cavity between the organs of arthropods and some molluscs) and lastly a successful spore development. In most cases, spores represent infectious propagules that bind to the exoskeleton of an insect and begin the penetration of fungal hyphae into the host (GILLESPIE et al., 1997; TSAKAS & MARMARAS 2010; BUTT et al., 2016).

EPF and insects coevolved for over 400 million years (LOVETT & ST. LEGER 2017). The most frequent interaction between fungus and insect is the parasite-host interaction and is the result of selection pressure that allows the continuous development of insect defense mechanisms and the fungus attack strategy (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI 2013).

LITERATURA

- ANDERSEN, S.O., 2003: *Cuticle*. V: *Encyclopedia of Insects*. Elsevier Science (ZDA): 281-282.
- ANDERSEN, S. O., 2010: *Insect cuticular sclerotization: A review*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40(3): 166-178. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.007>
- ANDERSEN, S.B., S. GERRITSMAN, K.M. YUSAH, D. MAYNTZ, N.L. HYWEL-JONES, J. BILLEN, J. J. BOOMSMA, & D.P. HUGHES, 2009: *The Life of a Dead Ant: The Expression of an Adaptive Extended Phenotype*. *The American Naturalist* 174(3): 424-433.
- ANDERSON, R. D., A. S. BELL, S. BLANFORD, K.P. PAAIJMANS, & M. B. THOMAS, 2011: *Comparative growth kinetics and virulence of four different isolates of entomopathogenic fungi in the house fly (Musca domestica L.)*. *Journal of Invertebrate Pathology* 107(3): 179-184. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.04.004>
- BECKAGE, N.E., 2003: *Immunology*. V: *Encyclopedia of Insects*. Elsevier Science (ZDA): 555-560.
- BELAY, Y. C., & T. A. TENKEGNA, 2017: *Bioassay and Pilot Mass Production of Entomopathogenic Fungus, Beauveria bassiana for the Control of Coffee Berry Borer (Hypothenemus hampei: Scolytidae)*, Ferrari. *J. Appl. Biosci. Journal of Applied Biosciences* 117: 11669-11683. <https://doi.org/10.4314/jab.v117i1.4>
- BINA, S., & M. ZEIDLER, 2013: *JAK/STAT pathway signalling in Drosophila melanogaster*. V: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Landes Bioscience (Austin, TX): 2000-2013.

- BOUCIAS, D. G., J. C. PENDLAND, & J. P. LATGE, 1988: *Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle*. Applied and Environmental Microbiology 54(7): 1795–1805.
- BOUCIAS, D. G., & J. C. PENDLAND, 1991: *Attachment of Mycopathogens to Cuticle. The Initial Event of Mycoses in Arthropod Hosts. V: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press (New York): 101–105.
- BOUTROS, M., H. AGAÏSSE, & N. PERRIMON, 2002: *Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in Drosophila*. Developmental Cell 3: 711–722.
- BOYCE, K. J., & A. ANDRIANOPOULOS, 2015: *Fungal dimorphism: The switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host*. FEMS Microbiology Reviews 39(6): 797–811. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv035>
- BROBYN, P. J., & N. WILDING, 1983: *Invasive and developmental processes of Entomophthora muscae infecting houseflies (Musca domestica)*. Trans. Br. Mycol. Soc. 80(1): 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(83\)80157-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80157-0)
- BROD S., L. RATTAZZI, G. PIRAS, & F. D'ACQUISTO, 2014: *'As above, so below' examining the interplay between emotion and the immune system*. Immunology 143: 311–318.
- BUTT, T. M., C. J. COATES, I. M. DUBOVSKIY, & N. A. RATCLIFFE, 2016: *Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions*. Advances in Genetics 94. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>
- BUTT, T. M., & M. S. GOETTEL, 2000: *Bioassays of entomogenous fungi*. Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. School of Biological Sciences, University of Wales (Swansea): 141–195. <https://doi.org/10.1079/9780851994222.0141>
- CARRUTHERS, R. I., T. S. LARKIN, H. FIRSTENCEL, & Z. FENG, 1992: *Influence of thermal ecology on the mycosis of a rangeland grasshopper*. Ecology 73(1): 190–204.
- CERENIUS, L. & K. SÖDERHÄLL, 2004: *The prophenoloxidase-activating system in invertebrates*. Immunological Reviews 198: 116–126.
- CHARNLEY A.K., 2003: *Fungal Pathogens of Insects: Cuticle Degrading Enzymes and Toxins*. Advances in Botanical Research 40: 241–321.
- CHOI, M. K., S. SON, M. HONG, M. S. CHOI, J. Y. KWON, & J. LEE, 2016: *Maintenance of membrane integrity and permeability depends on a patched-related protein in Caenorhabditis elegans*. Genetics 202(4): 1411–1420. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.179705>
- DUBOVSKIY, I.M., N.A. KRYUKOVA, V.V. GLUPOV, & N.A. RATCLIFFE, 2016: *Encapsulation and nodulation in insects*. ISJ 13: 229–246.
- DUSHAY, M. S., B. ASLING, & D. HULTMARK, 1996: *Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences 93(19): 10343–10347. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.19.10343>
- EVANS, J. D., K. ARONSTEIN, Y.P. CHEN, C. HETRU, J.L. IMLER, H. JIANG, M. KANOST, G.J. THOMPSON, Z. ZOU, & D. HULTMARK, 2006: *Immune pathways and defence mechanisms in honey bees Apis mellifera*. Insect Molecular Biology 15 (5): 645–656.
- FARGUES, J., & A. VEY, 1974: *Modalités d'infection des larves de Leptinotarsa decemlineata par Beauveria bassiana au cours de la mue*. Entomophaga 19(3): 311–323.
- FENG, P., Y. SHANG, K. CEN, & C. WANG, 2015: *Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity*. Proceedings of the National Academy of Sciences 112(36): 11365–11370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503200112>
- FREIMOSER, F. M., A. GRUNDSCHÖBER, U. TUOR, & M. AEBI, 2003: *Regulation of hyphal growth and sporulation of the insect pathogenic fungus Entomophthora thripidum in vitro*. FEMS Microbiology Letters 222(2): 281–287. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00315-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00315-X)
- GARVER, L. S., G. DE ALMEIDA OLIVEIRA, & C. BARILLAS-MURY, 2013: *The JNK Pathway Is a Key Mediator of Anopheles gambiae Antiplasmodial Immunity*. PLoS Pathogens 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003622>
- GAUTHIER, G. M., 2015: *Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants, and Insects*. PLoS Pathogens 11(2): 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004608>
- GILLESPIE, J.P., M. R. KANOST, & T. TRENCZEK, 1997: *Biological mediators of insect immunity*. Annu. Rev. Entomol. 42: 611–43.
- GOETTEL, M.S., A.E. HAJEK, J.P. SIEGEL, & H.C. EVANS, 2001: *Safety of Fungal Biocontrol Agents. V: Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing (Wallingford): 347–377.

- GREENFIELD, B. P. J., A. M. LORD, E. DUDLEY, & T. M. BUTT, 2014: *Conidia of the insect pathogenic fungus, Metarhizium anisopliae, fail to adhere to mosquito larval cuticle*. Royal Society Open Science 1(2). <https://doi.org/10.1098/rsos.140193>
- GROSS, L., 2006: *A Protean Insect Receptor Holds the Key to Broad-Based Pathogen Recognition*. PLoS Biol 4(7): e246. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040246>
- GROSS, J., K. SCHUMACHER, H. SCHMIDTBERG, & A. VILCINSKAS, 2008. *Protected by fumigants: Beetle perfumes in antimicrobial defense*. Journal of Chemical Ecology 34(2): 179–188. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9416-9>
- HEPBURN, H. R., 1985: *Structure of the integument*. V: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press (Oxford).
- HOFFMANN, J.A., 2003: *The immune response of Drosophila*. Nature 426(6): 33–38.
- KALTENPOTH, M., W. GÖTTLER, G. HERZNER, & E. STROHM, 2005: *Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation*. Current Biology 15: 475–479. DOI 10.1016/j.cub.2004.12.084
- KERSHAW, M. J., E. R. MOORHOUSE, R. BATEMAN, S. E. REYNOLDS, & A. K. CHARNLEY, 1999: *The Role of Destruxins in the Pathogenicity of Metarhizium anisopliae for Three Species of Insect*. Journal of Invertebrate Pathology 74(3): 213–223. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4884>
- KLEMPNER, M.S., T.R. UNNASCH, & L. HU, 2007: *Taking a Bite Out of Vector-Transmitted Infectious Diseases*. N Engl J Med. 356(25): 2567–2569. doi:10.1056/NEJMp078081
- KURTTI, T. J., & N. O. KEYHANI, 2008: *Intracellular infection of tick cell lines by the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae*. Microbiology 154(6): 1700–1709. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/016667-0>
- LAVINE, M.D., & M.R. STRAND, 2002: *Insect hemocytes and their role in immunity*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 1295–1309.
- LEMAITRE, B., & J. HOFFMANN, 2007: *The Host Defense of Drosophila melanogaster*. Annual Review of Immunology 25(1): 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- LI, J., S. H. YING, L. T. SHAN., & M. G. FENG, 2010: *A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of Metarhizium anisopliae enhances conidial hydrophobicity when expressed in Beauveria bassiana*. Applied Microbiology and Biotechnology 85(4): 975–984. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2083-8>
- LIN, L., W. FANG, X. LIAO, F. WANG, D. WEI, & R. J. ST. LEGER, 2011: *The MrCYP52 cytochrome P450 monooxygenase gene of Metarhizium robertsii is important for utilizing insect epicuticular hydrocarbons*. PLoS ONE 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028984>
- LORD, J. C., 2005: *From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control*. Journal of Invertebrate Pathology 89(1): 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.04.006>
- LOVETT, B., & R. J. ST. LEGER, 2017: *The Insect Pathogens*. Microbiology Spectrum 5(2): 1–19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0001-2016>
- LU, H. L., & R. J. ST. LEGER, 2016: *Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi*. Advances in Genetics 94: 251–285. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.002>
- MCCAULEY, V. J. E., R. Y. ZACHARUK, & R. D. TINLINE, 1968: *Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera)*. Journal of Invertebrate Pathology 12(3): 444–459. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(68\)90352-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(68)90352-2)
- MEDZHITOV, R., & C. A. JANEWAY JR, 1997: *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Opinion in Immunology 9: 4–9.
- MELILLO, D., R. MARINO, P. ITALIANI, & D. BORASCHI, 2018: *Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans: A Critical Appraisal*. Frontiers in Immunology 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01915>
- MOORE, D., G. ROBSON, & A. TRINCI, 2000: *Fungi as pathogens of animals, including humans*. V: *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge University Press (Cambridge): 411–448. doi:10.1017/CBO9780511977022.017,
- MUN, S., M. Y. NOH, N. T. DITTMER, S. MUTHUKRISHNAN, K. J. KRAMER, M. R. KANOST, & Y. ARAKANE, 2015: *Cuticular protein with a low complexity sequence becomes cross-linked during insect cuticle sclerotization and is required for the adult molt*. Scientific Reports 5: 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep10484>
- MYLES, T. G., 2002: *Alarm, aggregation, and defense by Reticulitermes flavipes in response to a naturally occurring isolate of Metarhizium anisopliae*. Sociobiology 40(2): 243–255. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.110.943621>
- NEYEN, C., A. J. BRETSCHER, O. BINGGELI, & B. LEMAITRE, 2014: *Methods to study Drosophila immunity*. Methods 68(1): 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.023>
- OERKE, E. C., & H. W. DEHNE, 2004: *Safeguarding production - Losses in major crops and the role of crop protection*. Crop Protection 23(4): 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.001>

- ORTIZ-URQUIZA, A., & N. O. KEYHANI, 2013: *Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle*. *Insects* 4(3): 357–374. <https://doi.org/10.3390/insects4030357>
- PANDEY, U. B., & C. D. NICHOLS, 2011: *Human Disease Models*. *Pharmacological Reviews* 63(2): 411–436. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293.411>
- ROBERTS, D.W., & A.E. HAJEK, 1992: *Entomopathogenic Fungi as Bioinsecticides*. V: *Frontiers in Industrial Mycology*. Springer (Boston, MA): 144–159.
- ROBERTS, D.W., & R. J. ST. LEGER, 2004: *Metarhizium spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects*. *Advances in applied microbiology* 54.
- ROSALES, C., 2011: *Phagocytosis, a cellular immune response in insects*. *ISJ* 8: 109–131. ISSN 1824-307X.
- ROSALES, C., 2017: *Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity*. V: *Insect Physiology and Ecology*. IntechOpen (London): 179–212.
- ROY, H. E., D. C. STEINKRAUS, J. EILENBERG, A. E. HAJEK, & J. K. PELL, 2006: *Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts*. *Annual Review of Entomology* 51(1): 331–357. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150941>
- SAMUELS, R. I., S. E. REYNOLDS, & A. K. CHARNLEY, 1988: *Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 90(2): 403–412. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(88\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0742-8413(88)90018-7)
- SCHMIT, A. R., & N. A. RATCLIFFE, 1977: *The encapsulation of foreign tissue implants in Galleria mellonella larvae*. *Journal of Insect Physiology* 23(2). [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(77\)90027-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(77)90027-0)
- SHAH, F. A., C. S. WANG, & T. M. BUTT, 2005: *Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* 251(2): 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.010>
- SMALL, C. L. N., & M. J. BIDOCHKA, 2005: *Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research* 109(3): 307–313. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001856>
- SMITH, R. J., & E. A. GRULA, 1981: *Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37(3): 222–230. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90079-3)
- SMITH, R. J., & E. A. GRULA, 1982: *Toxic components on the larval surface of the corn earworm (Heliothis zea) and their effects on germination and growth of Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 39(1): 15–22. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90153-7](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90153-7)
- SÖDERHÄLL, K., A. TASSANAKAJON, & P. AMPARYUP, 2013: *Prophenoloxidase-activating Enzyme*. V: *Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edition*. Elsevier: 3068–3074.
- SOSA-GOMEZ, D. R., D. G. BOUCIAS, & J. L. NATION, 1997: *Attachment of Metarhizium anisopliae to the southern green stink bug Nezara viridula cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes*. *Journal of Invertebrate Pathology* 69(1): 31–39. <https://doi.org/10.1006/jjipa.1996.4619>
- SRIVASTAVA, C. N., P. MAURYA, P. SHARMA, & L. MOHAN, 2009: *Prospective role of insecticides of fungal origin*. *Entomological Research* 39(6): 341–355. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2009.00244.x>
- ST.LEGER, R. J., T. M. BUTT, M. S. GOETTEL, R. C. STAPLES, & D. W. ROBERTS, 1989: *Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology* 13(3): 274–288. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(89\)90049-2](https://doi.org/10.1016/0147-5975(89)90049-2)
- STÖVEN, S., N. SILVERMAN, A. JUNELL, M. HEDENGREN-OLCOTT, D. ERTURK, Y. ENGSTRÖM, T. MANIATIS, & D. HULTMARK, 2003: *Caspase-mediated processing of the Drosophila NF- B factor Relish*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(10): 5991–5996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1035902100>
- THEOPOLD, U., D. LI, M. FABBRI, C. SCHERFER, & O. SCHMIDT, 2002: *The coagulation of insect hemolymph*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 363–372.
- TRAGUST, S., B. MITTEREGGER, V. BARONE, M. KONRAD, L.V. UGELVIG, & S. CREMER, 2013: *Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison*. *Current Biology* 23(1): 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.034>
- TSAKAS, S., & V. J. MARMARAS, 2010: *Insect immunity and its signalling : an overview Abstract The innate immunity is the immediate and sole response of invertebrates for the protection against foreign substances and pathogens . In insects , it relies on both humoral and cellular responses*. *Invertebrate Survival Journal* 7: 228–238.
- VEGA, F. E., N. V. MEYLING, J. J. LUANGSA-ARD, & M. BLACKWELL, 2012: *Fungal entomopathogens*. V: *Insect Pathology*. Academic Press (Cambridge). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>

- VINSON, S.B., 1991: *Suppression of the insect immune system by parasitic Hymenoptera. V: Insect Immunity*. Kluwer Academic Publishers (Dordrecht, Boston and London): 171-187.
- WANCHOO, A., M. W. LEWIS, & N. O. KEYHANI, 2009: *Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana*. *Microbiology* 155(9): 3121–3133. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029157-0>
- WANG, C., & R. J. ST. LEGER, 2006: *A collagenous protective coat enables Metarhizium anisopliae to evade insect immune responses*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(17): 6647–6652. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601951103>
- WANG, C., & R. J. ST. LEGER, 2007a: *The MAD1 adhesin of Metarhizium anisopliae links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants*. *Eukaryotic Cell* 6(5): 808–816. <https://doi.org/10.1128/EC.00409-06>
- WANG, C., & R. J. ST. LEGER, 2007b: *The Metarhizium anisopliae perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence*. *Journal of Biological Chemistry* 282(29): 21110–21115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609592200>
- WANG, C., & S. WANG, 2017: *Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements*. *Annual Review of Entomology* 62(1): 73–90. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035509>
- WÖSTEN, H. A. B. 2001: *Hydrophobins: Multipurpose Proteins*. *Annual Review of Microbiology* 55(1): 625–646. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.625>
- ZHANG, S., Y.X. XIA, B. KIM, N. O. KEYHANI, 2011: *Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology* 80(3): 811–826. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07613.x

ZNAČILNOSTI LESNIH IN FLOEMSKIH PRIRASTKOV PRI TREPETLIKI (*POPULUS TREMULA* L.)

CHARACTERISTICS OF WOOD AND PHLOEM INCREMENTS IN EURASIAN ASPEN (*POPULUS TREMULA* L.)

Jožica GRIČAR¹

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0060>

IZVLEČEK

Značilnosti lesnih in floemskih prirastkov pri trepetliki (*Populus tremula* L.)

Poznavanje strukture lesa in floema je ključno za razumevanje njune plastičnosti v smislu prilagoditve danim okoljskim razmeram, s čimer se zagotovi karseda optimalno delovanje drevesa. V ta namen smo raziskali značilnosti lesnih in floemskih prirastkov pri trepetliki (*Populus tremula* L.) v Ljubljani v rastni sezoni 2010. Analizirali smo tudi prevodne elemente v lesu (traheje) in floemu (sitaste cevi) ter razlike v dimenzijah interpretirali z vidika njihove prevajalne funkcije. Vzorce lesa in floema smo odvzeli po zaključku rastne sezone, pripravili preparate prečnih prereзов in opravili histometrične analize s pomočjo svetlobnega mikroskopa in sistema za analizo slike. Ugotovili smo, da je floemski prirastek predstavljal 11,7 % širine lesnega prirastka, rani floem pa 80,5 % širine kasnega floema. Rezultati so v skladu s predhodnimi objavami o večji intenzivnosti kambijeve celične produkcije na lesno stran v primerjavi s floemom pri zdravih drevesih, ki rastejo v ugodnih okoljskih razmerah. Traheje so bile značilno najširše v prvi tretjini branike in najmanjše v zadnji tretjini branike. Posledično so bile tudi največje površine trahej v prvi tretjini branike, medtem ko v primeru gostot trahej značilnih razlik med posameznimi tretjinami lesne branike nismo zabeležili. Povprečni premeri sitastih cevi so bili v kasnem floemu za 25,4 % manjši kot v ranem floemu, vendar razlike niso bile statistično značilne. Sitaste cevi ranega floema so bile za 28,2 % manjše od trahej na začetku rastne sezone, sitaste cevi kasnega floema pa za 35,4 % manjše od trahej nastalih na koncu raste sezone, kar kaže na večjo transportno zmogljivost prevodnega sistema v lesu v primerjavi s floemom.

Ključne besede: branika, traheja, sitasta cev, rani floem, kasni floem, anatomija, svetlobna mikroskopija

ABSTRACT

Characteristics of wood and phloem increments in Eurasian aspen (*Populus tremula* L.)

Information on wood and phloem anatomies is crucial to understand better their plasticity in terms of adapting their structure to given environmental conditions, and by that ensuring optimal functioning of the tree. To this purpose, we investigated the characteristics of wood and phloem increments in Eurasian aspen (*Populus tremula* L.) in Ljubljana in the growing season of 2010. In addition, we analysed the conductive elements in the wood (vessels) and phloem (sieve tubes) and interpreted the differences in these parameters in terms of their transport functions. We collected samples of wood and phloem at the end of the growing season, prepared cross-sections and performed histometric analysis by using light microscopy and image analysis system. We found that the phloem increment represented 11.7% of the wood increment width, whereas the early phloem represented 80.5% of the late phloem width. These findings are in line with the previous publications about higher intensity of cambium production of wood cells than of phloem cells in healthy trees growing in favourable environmental conditions. The vessels were statistically the widest in the first third of the xylem increment and the smallest in the last third of the increment. Consequently, the vessels in the first third of the increment had the largest areas, while in the case of vessel density there was no significant difference among the xylem increment parts. Mean diameters of the sieve tubes in the late phloem were 25.4% smaller than in the early phloem; however, these differences were not statistically significant. Sieve tubes in the early phloem were 28.2% smaller than vessels formed at the beginning of the growing season and late phloem sieve tubes were 35.4% smaller than vessels formed at the end of the growing season, indicating higher transport capacity of the conductive system in wood compared to the phloem.

Key words: growth ring boundary, vessel, sieve tube, early phloem, late phloem, anatomy, light microscopy

¹ Gozdarski inštitut Slovenije, Večna pot 2, 1000 Ljubljana, jozica.gricar@gozdis.si

1 UVOD

Debelinska rast, značilna za lesnate rastline (tj. drevesa in grme), je rezultat delovanja dveh obstranskih meristemov: prevodnega kambija in plutnega kambija (Torelli 1990). Raziskave procesov, ki so vključeni v debelitev dreves, so zelo aktualne, saj je eden izmed teh produktov tudi les, gospodarsko zelo pomemben naravni in obnovljiv material. Zaradi delovanja različnih okoljskih in notranjih dejavnikov (hormoni, geni) na procese debelinske rasti je struktura sekundarnih tkiv zelo variabilna (Panshin & de Zeeuw 1980). Z ekonomskega vidika je poznavanje strukture in lastnosti lesa pomembno za njegovo smotrno uporabo. Z ekološkega vidika pa je poznavanje strukture lesa in ostalih sekundarnih tkiv ključno za razumevanje njihove plastičnosti v smislu prilagoditve danim okoljskim razmeram, s čimer se zagotovi karseda optimalno delovanje drevesa.

Ker podnebne spremembe pomembno vplivajo tudi na gozdne ekosisteme (UN-ECE 2015), so se za ocenjevanje odziva in prilagoditve rasti dreves na te spremembe lesno-anatomske analize izkazale za zelo primerne, saj zunanji dejavniki vplivajo na časovno dinamiko razvoja in s tem morfološke značilnosti celic, in sicer v obdobju pred in tekom njihovega nastanka. Zlasti značilnosti prevodnih elementov (tj. traheide pri iglavcih in traheje pri listavcih) so se potrdile kot zanesljiv ekološke kazalnik, ki vsebuje komplementarne okoljske informacije tistim, ki so shranjene v širinah lesnih prirastkov (Fonti et al. 2010). Čeprav so značilnosti trahej v veliki meri genetsko določene in tako vrstno specifične, na njih vplivajo tudi zunanji dejavniki (Sass & Eckstein 1995). Velikost trahej je v tesni zvezi z razpoložljivostjo vode v tleh, saj vsebnost vlage v tleh vpliva na turgorski tlak v celici in posledič-

no na njeno rast. Suša tako negativno vpliva na rast celic, kar se odraža v njihovih manjših dimenzijah (Eilmann et al. 2014). Prevodnost vode v trahejah je na četrto potenco polmera traheje, zato majhne razlike v velikosti trahej značilno vplivajo na učinkovitost in varnost transporta vode v njih (Tyree & Zimmermann 2010). Zmogljivost daljinskega transporta vode v drevesu je pomembna naloga lesnih elementov (Fonti & Jansen 2012). Ker se dimenzije celic po zaključku njihovega razvoja ne morejo več spreminjati, svojo vlogo pa v difuzno poroznih lesnih vrstah brez jedrovine opravljajo več let, so njihove 'ustrezne' dimenzije pomembne za dolgoročno preživetje drevesa (Sass-Klaassen et al. 2016).

Raziskave skorjinih oz. floemskih tkiv so v dendroekoloških in znatno redkejših v primerjavi z lesom. Eden izmed razlogov so sekundarne spremembe skorjinih tkiv, ki se začnejo že konec tekoče rastne sezone. Te spremembe celice do te mere preoblikujejo, da jih je težko analizirati in njihove značilnosti povezati z okoljskimi signali. Kljub temu pa v zadnjih letih zanimanje za tovrstne študije raste, saj napredne mikroskopske tehnike in sistemi za analizo slike omogočajo boljši vpogled v strukturo in delovanje (tudi starejših) skorjinih tkiv. Tako novejši rezultati kažejo, da je struktura floema prilagojena na lokalne rastiščne razmere, četudi se med leti na posameznem rastišču manj spreminja kot lesni prirastki (Gričar et al. 2015, 2016).

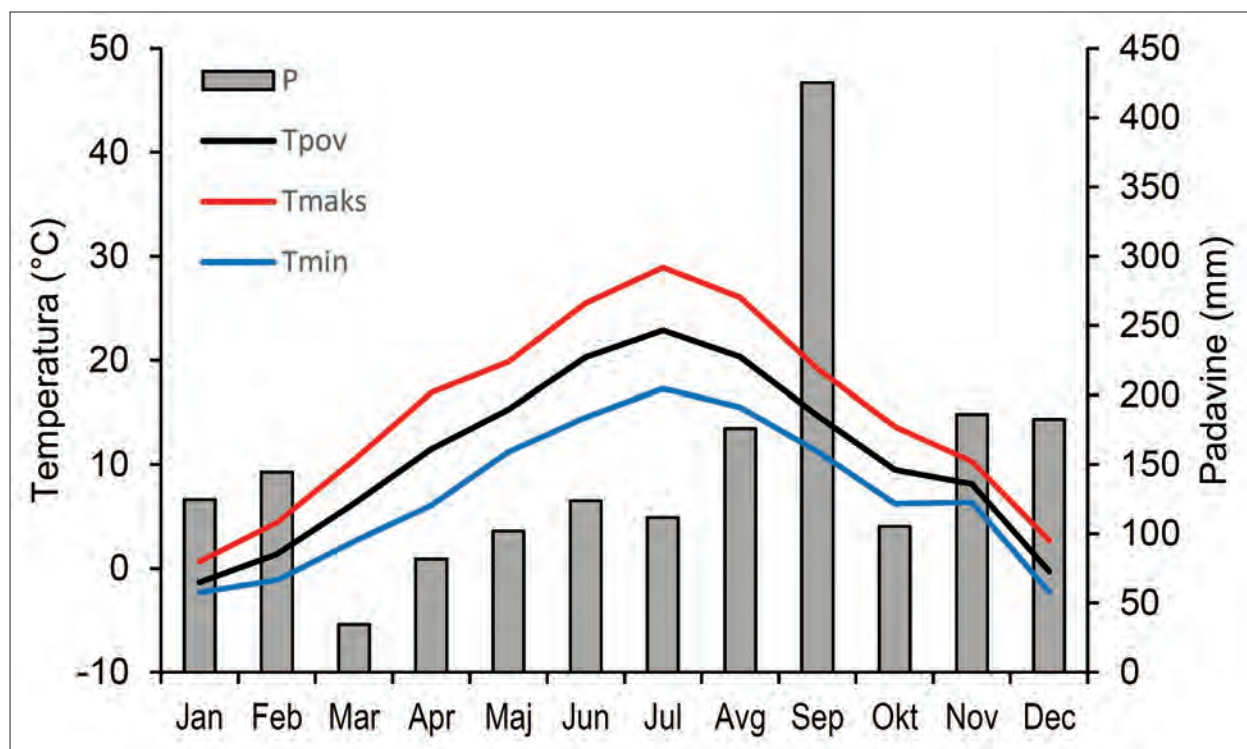
V pričujočem prispevku smo raziskali značilnosti lesnih in floemskih prirastkov pri trepetliki (*Populus tremula* L.) v Ljubljani v rastni sezoni 2010. Analizirali smo tudi prevodne elemente v lesu (traheje) in floemu (sitaste cevi) ter razlike v dimenzijah interpretirali z vidika njihove prevajalne funkcije.

2 MATERIAL IN METODE

Raziskava je bila opravljena na odraslih drevesih trepetlike (*Populus tremula* L.), ki se nahajajo na obronku južnega pobočja mestnega gozda Rožnik v Ljubljani (46°03'N, 14°28'E 323 m n.m.). Gozd spada v gozdno združbo *Blechno-Fagetum* in je prepuščen naravnemu razvoju. Ker je funkcija v prvi vrsti socialna, se z gozdom ne gospodari, opravljajo se le nujne sanitarne sečnje.

Vremenske podatke za leto 2010, ko je potekal poskus, smo pridobili z vremenske postaje za Ljubljano Agencije RS za okolje (ARSO) (slika 1). V tem letu je

bila povprečna temperatura zraka 10,8°C s povprečno maksimalno mesečno temperaturo v juliju 28,9°C in povprečno minimalno mesečno temperaturo v januarju -2,3°C. Povprečna letna količina padavin je bila 1800 mm, pri čemer je polovica padavin padla po zaključku rastne sezone, tj. v obdobju oktober–december. V rastni sezoni (obdobje april–september) je skupno padlo 1020 mm padavin, od tega v septembru 425 mm. Sicer je v ostalih mesecih rastne sezone padlo med 82 mm (april) in 175 mm (avgust) padavin.



Slika 1: Vremenske razmere v Ljubljani v letu 2010. Povprečne mesečne temperature: srednja (črna črta), minimalna (modra črta) in maksimalna (rdeča črta) ter padavine (sivi stolpci).

Figure 1: Weather conditions in Ljubljana in 2010. Mean monthly temperatures: mean (black line), minimum (blue line), and maximum (red line), and precipitation (grey columns).

Za pričujočo raziskavo smo izbrali 10 dominantnih odraslih dreves topola, starih okoli 100 let s premerom v prsni višini med 30–35 cm. Krošnja dreves je bila normalno razvita, debela in drevesni koren so bili brez vidnih mehanskih poškodb. Vzorčenje je potekalo v oktobru in novembru, ko so bile lesne in floemske branike popolnoma oblikovane. Iz živih dreves smo 1,3 m nad tlemi odvzeli po dva mikroizvrtka premera 2,4 mm, ki so zajemali živi del skorje, kambij in zunanji del lesa. Odvzete vzorce smo za en teden hranili v fiksirni raztopini mešanice formalina, 50 % etanola in očetne kisline. Nato je sledila dehidracija v etanolni vrsti (30 %, 50 % in 70 %) in vklapljanje v parafin (GRIČAR 2007). Z rotacijskim mikrotomom Leica RM2245 smo pripravili preparate prečnih prereзов debeline 10 μm , jih obarvali v vodni mešanici barvil safranin (Merck, Darmstadt, Nemčija) (0,04 %) in astra modro (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija) (0,15 %) (VAN DER WERF et al. 2007). Trajne preparate smo vklopili v vklopni medij Euparal (Waldeck, Münster, Nemčija). Histometrične analize smo opravili s svetlobnim mikroskopom Olympus BX51 (Olympus, Tokio, Japon-

ska) v svetlem polju s sistemom za analizo slike Elements Basic Research v.2.3 (Nikon, Tokio, Japonska). V treh radialnih nizih smo izmerili širino ksilemskega in floemskega prirastka 2010 ter izračunali povprečje. V floemskih branikah smo izmerili še širino ranega in kasnega floema. V lesnih branikah analizirali naslednje značilnosti trahej: premer, površino in gostoto (število/ mm^2). Pri tem smo braniko razdelili na tri dele in tako primerjali njihove značilnosti na začetku, v sredini in zaključku rastne sezone. V popolnoma oblikovanih floemskih branikah smo primerjali značilnosti sitastih cevi ranega in kasnega floema. V ta namen smo naključno izbrali in pomerili premer in površino 30 sitastih cevi ranega in kasnega floema.

Vse potrebne izračune, statistično obdelavo podatkov in grafe smo opravili v programih Microsoft Excel in Statgraphics 18 X-64. Slike smo obdelali v programu Adobe Photoshop CS2. Za primerjavo izmerjenih anatomskih parametrov v lesu in floemu smo uporabili F-test ali One-way ANOVA. Za ugotavljanje moči povezanosti med različnimi anatomskimi spremenljivkami smo uporabili Pearsonov koeficient korelacije.

3 IZSLEDKI IN RAZPRAVA

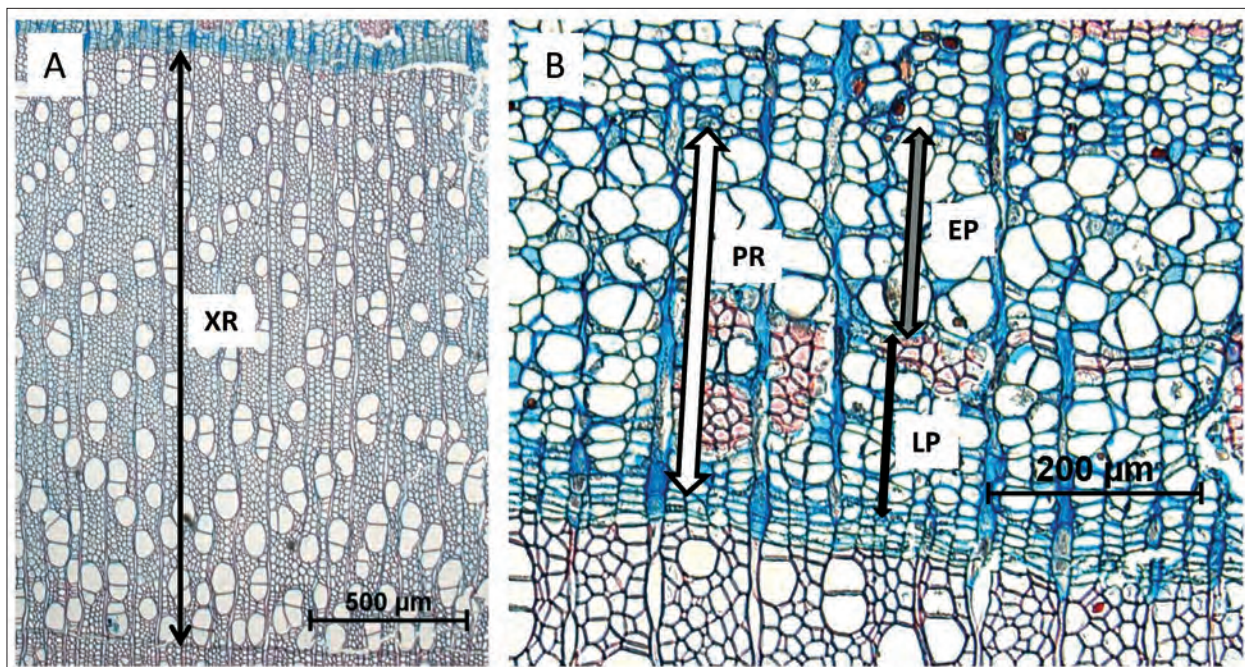
3.1 Zgradba lesnih in floemskih branik pri trepetliki

Trepetlika spada med difuzno porozne lesne vrste. Traheje v prečnem prerezu so porazdeljene bodisi posamično ali v skupinah po 2–3 skupaj (slika 2a). Letnice se dokaj izrazite, kar v veliki meri zavisi od razlik v velikosti trahej ranega in kasnega lesa, ki se nahajajo neposredno ob letnici. Aksialni parenhim ni v stiku s trahejami (t.i. apotrahealni), po braniki je razporejen posamično, včasih tudi v kratkih tangencialnih pasovih. Lahko se pojavlja tudi ob letnici. Trakovi so enoredni in homogeni – sestavljeni le iz parenhimskih celic enakih oblik. Piknje med trakovno parenhimsko celico in trahejo so velike in okrogle, kar je tudi ključen razpoznavni znak lesa pri tej vrsti. Struktura lesa roda *Populus* oz. topolov je zelo podobna kot pri rodu *Salix* oz. vrb in se jih zlahka zamenja (TORELLI 1991, SCHWEINGRUBER 2007).

Skorja zajema vsa tkiva v centripetalni smeri od prevodnega kambija, sekundarni floem pa tista skorjina tkiva, ki nastanejo kot produkt prevodnega kambija (TROCKENBRODT 1990). Podobno kot les je tudi

floem sestavljen iz letnih prirastnih plasti oz. branik. Če se celice ranega in kasnega floema morfološko razlikujejo, so letnice dobro vidne, dokler sekundarni procesi, ki potekajo v starejših skorjinih tkivih, celice do te mere ne spremenijo, da letnic ni več mogoče prepoznati (GRIČAR et al. 2016). Zgradba mlajših floemskih branik pri drevesih zmernega pasu je navadno takšna, da so letnice vidne, sicer je pa struktura floemskih branik v primerjavi z lesnimi branikami veliko bolj raznolika in vrstno specifična (IAWA COMMITTEE 2016).

Najmlajša floemska branika je pri trepetliki zgrajena iz: sitastih cevi, celic spremljevalk, aksialnega in trakovnega parenhima ter floemskih vlaken (slika 2b). Sitaste cevi ranega floema so večje v primerjavi s sitastimi cevmi kasnega floema. Prehod med ranim in kasnim floemom pri trepetliki ponazarjajo kratki tangencialno usmerjeni skupki floemskih vlaken. V floemskih vlaknih so često prisotni kristali kalcijevega oksalata. V starejših floemskih branikah so prisotne še sklereide nastale iz aksialnega in trakovnega parenhima (HOLDHEIDE 1951).



Slika 2: Prečni prerez lesne (A) in floemske branike (B) pri trepetliki. XR – lesni prirastek; PR – floemski prirastek; EP – rani floem; LP – kasni floem

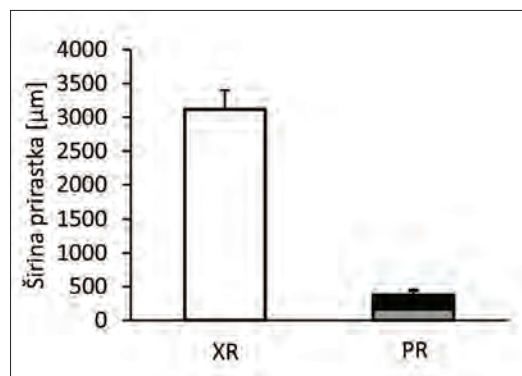
Figure 2: Cross-section of wood (A) and phloem growth ring (B) in Eurasian aspen. XR – wood increment; PR – phloem increment; EP – early phloem; LP – late phloem

3.2 Širina lesnih in floemskih branik pri trepetliki

V letu 2010 je bila povprečna širina lesnega prirastka $3116,7 \pm 285,6 \mu\text{m}$, floemskega pa $364,1 \pm 17,5 \mu\text{m}$. Floemski prirastek je bil tako značilno ožji ($F = 265,399$; $p = 0,000$) od lesnega in je predstavljal 11,7 % širine lesnega prirastka (slika 3). Rani floem ($168,0 \pm 6,3 \mu\text{m}$) je bil 19,5 % ožji kot kasni floem ($208,6 \pm 21,4 \mu\text{m}$; $F = 0,086$; $p = 0,0004$).

V zdravih drevesih, ki rastejo v razmeroma ugodnih okoljskih razmerah, je kambijeva produkcija lesnih celic intenzivnejša v primerjavi s floemom, zato so lesni prirastki navadno širši (PANSIN & DE ZEEUW 1980, KOZLOWSKY & PALLARDY 1997). Ta razmerja so

odvisna od številnih dejavnikov, kot na primer rastiščnih razmer, drevesne vrste, starosti drevesa, vitalnosti drevesa, dela drevesa itd. Tako je lahko pri manj vitalnih drevesih floemski prirastek širši od lesnega, ki lahko v skrajnih primerih lokalno celo izostane. Razmerja med širinami floemskih in lesnih prirastkov pri različno vitalnih jelkah denimo znašajo med 1:0,75 do 1:17 celic (GRIČAR et al. 2009). Za razliko od lesnega prirastka floemski prirastek nastane vsako leto, četudi je zelo ozek in zajema le nekaj celic. Njegov vsakoletni nastanek je ključen za preživetje dreves, saj sitasti elementi prevajajo produkte fotosinteze 1–2 rastni sezoni, potem so celice podvržene sekundarnim spremembam, katerih rezultat je propad celic in s tem prenehanje njihovega delovanja (PRISLAN et al. 2018a).



Slika 3: Povprečna širina lesnega (XR) in floemskega prirastka (PR) pri trepetliki v letu 2010. Siva barva PR stolpca ponazarja širino ranega floema, črna barva pa širini kasnega floema. Črte označujejo standardno napako.

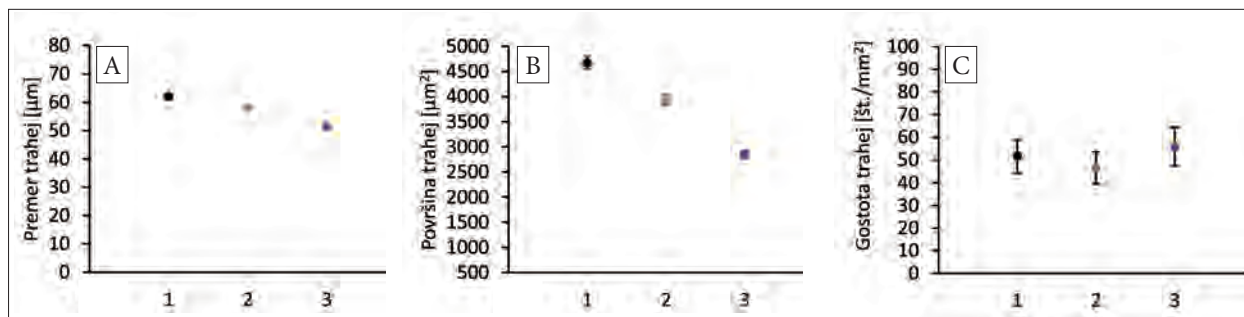
Figure 3: Average width of xylem (XR) and phloem increments (PR) in Eurasian aspen in 2010. Grey colour of PR column indicated width of early phloem and black colour of late phloem. Bars indicate standard error.

3.3 Značilnosti trahej v lesu pri trepetliki

V difuzno poroznem lesu topola ni mogoče določiti meje med ranim in kasnim lesom, zato smo braniko razdelili na tretjine in v njih analizirali značilnosti trahej, tj. povprečni premer, povprečno površino in gostoto trahej. Traheje so bile statistično značilno najširše v prvi tretjini branike ($62,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$), in sicer za 6,4 % v primerjavi z drugo tretjino ($58,1 \pm 0,8 \mu\text{m}$) in 17,1 % z zadnjo tretjino ($51,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$; $F = 44,01$; $p = 0,0000$) (slika 4a). Posledično so bile tudi največje površine trahej v prvi tretjini branike ($4669,6 \pm 125,2 \mu\text{m}^2$), za 15,9 % v primerjavi z drugo tretjino ($3928,0 \pm 104,4 \mu\text{m}^2$) in 39,1 % z zadnjo tretjino branike ($2845,8 \pm 68,4 \mu\text{m}^2$; $F = 89,72$; $p = 0,0000$) (slika 4b). Pri gostotah trahej značilnih razlik med posameznimi tretjinami branike nismo zabeležili ($F = 0,36$; $p = 0,7091$). Kljub temu je bila gostota trahej v zadnji tretjini branike največja ($55,7 \pm 8,6 \text{ št./mm}^2$), najmanjša pa v drugi tretjini branike ($46,5 \pm 7,0 \text{ št./mm}^2$) (slika 4c).

Čeprav je bilo veliko raziskav opravljenih na lesu topolov, tudi trepetlike, je naše podatke zelo težko pri-

merjati s tistimi iz literature, saj rastišče, starost drevesa ali del drevesa (veja, deblo, korenine) vplivajo na velikost oz. razporeditev trahej v lesnem tkivu. Izmed izmerjenih parametrov naj bi gostota trahej vsebovala največji klimatski signal (SCHUME et al. 2004), česar v naši študiji ne moremo preveriti, saj imamo podatke le za eno rastno sezono. SASS in ECKSTEIN (1995) sta pri navadni bukvi zabeležila najmanjšo variabilnost v dimenzijah trahej na začetku branike in to pojasnila z ugodnimi ravnimi razmerami na začetku rastne sezone, ko oskrba z vodo, ki zelo vpliva na velikost trahej, navadno ni omejena. V našem primeru je bil trend ravno obraten, variabilnost v razlikah dimenzij trahej je bila najmanjša v zadnji tretjini branike. To bi lahko deloma pojasnile ugodne vremenske (padavinske) razmere tekom celotne rastne sezone v Ljubljani v letu 2010, ko je vsak mesec padlo preko 100 mm padavin in je bila oskrba z vodo zadostna. Le domnevamo lahko, da bi potencialna poletna suša negativno vplivala na velikosti celic v drugi polovici branike, saj je znano, da se v takšnih primerih lahko struktura lesa iz difuzne spremeni v polvenčasto (SCHWEINGRUBER 2007). Na-



Slika 4: Premer trahej (A), površina trahej (B) in gostota trahej (C) v prvi (1), drugi (2) in zadnji (3) tretjini lesne branike pri trepetliki v 2010. Pike označujejo povprečne vrednosti, črte pa standardno napako.

Figure 4: Vessel diameter (A), vessel area (B) and vessel density (C) in the first (1), the second (2) and the last third (3) of the xylem increment in Eurasian aspen in 2010. Dots denote mean values and bars standard error.

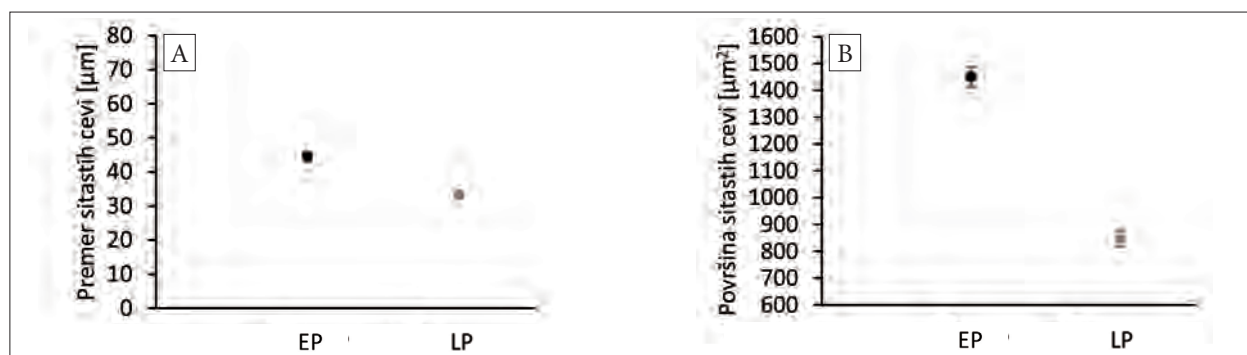
dalje so SCHUME in sodelavci (2004) pri topolu *Populus x euramericana* zabeležili negativno zvezo med gostoto in premerom trahej. Tudi v našem primeru je bila zveza med omenjenima parametroma trahej negativna, a statistično neznačilna ($r = -0,28$; $p = 0,3793$). Največje povezavo med gostoto in premerom trahej smo zasledili v prvi tretjini branike ($r = -0,67$; $p = 0,3270$), kar je skladno z ugotovitvami PRISLANA in sodelavcev (2018b) pri navadni bukvi, da se zveze med parametri trahej znotraj branike spreminjajo.

Dimenzije prevodnih elementov lahko razumemo tudi kot kompromis med prevajalno učinkovitostjo in varnostjo. V primeru suše tenzijska napetost v vodnih stolpcih narašča in lahko lokalno popusti, pri čemer pride do kavitacije oz. prekinitve vodnih stolpcev. Ker je kavitacija navadno nepovraten proces, se takšna celica izloči iz sistema za prevajanje vode, zato mora drevo te celice nadomestiti, da ohrani prevajalni sistem. V tem smislu ožji elementi zagotavljajo drevesu večjo prevajalno varnost kot širši elementi, saj je verje-

tnost kavitacije v njih manjša, vendar ob manjši prevajalni učinkovitosti (TORELLI 1998). Za razliko od venčasto poroznih drevesnih vrst, kjer je prevajanje vode navadno omejeno na zadnji dve lesni braniki, pri difuzno poroznih vrstah prevajanje poteka po večjem številu najmlajših branik, zato je vpliv zadnje nastale branike na skupno prevajalno zmogljivost trahejnega sistema le delen (GASSON 1987).

3.4 Značilnosti sitastih cevi v floemu pri trepetliki

V floemski braniki 2010 smo primerjali premer sitastih cevi v ranem in kasnem floemu. Ugotovili smo, da so bili povprečni premeri sitastih cevi v kasnem floemu ($33,3 \pm 0,8 \mu\text{m}$) za 25,4 % manjši kot v ranem floemu ($44,6 \pm 0,9 \mu\text{m}$), vendar razlike niso bile statistično značilne ($F = 1,2111$; $p = 0,3976$). Podobno nismo zasledili razlik v povprečni površini sitastih cevi ranega in ka-



Slika 5: Premer (A) in površina (B) sitastih cevi v ranem floemu (EP) in kasnem floemu (LP) pri trepetliki v 2010. Pike označujejo povprečne vrednosti, črte pa standardno napako.

Figure 5: Diameter (A) and area (B) of sieve tubes in early phloem (EP) and late phloem (LP) in Eurasian aspen in 2010. Dots denote mean values and bars standard error.

snega floema ($F = 1,4517$; $p = 0,0997$), četudi so bile površine v slednjem za 41,6 % manjše ($847,6 \pm 30,2 \mu\text{m}^2$) v primerjavi z ranim floemom ($1450,7 \pm 36,4 \mu\text{m}^2$) (slika 5).

Strukturne razlike ranega in kasnega floema so povezane z njunimi različnimi vlogami v drevesu. Širše sitaste cevi ranega floema omogočajo večji transport asimilatov, medtem ko večji delež aksialnega parenhima v kasnem floemu prispeva k skladiščni funkciji. Osrednja vloga ranega floema je tako prevodna, kasnega pa skladiščna (PRISLAN et al. 2018a). Za razliko od lesa, kjer prevajalno vlogo opravljajo mrtvi elementi, v floemu poteka prevajanje produktov fotosinteze in drugih signalnih biomolekul iz listov po deblu do korenin po živih sitastih ceveh. Prevodna funkcija sitastih cevi navadno traja 1–2 rastni sezoni in se zaključuje z odlaganjem kaloze na sitasta polja in ploščice sitastih členov v smeri od najstarejših do najmlajših celic (DAVIS & EVERT 1968). Istočasno odmrejo celice spremljevalke, ki so morfološko in fiziološko povezane s sitastimi cevmi. Sledi razgradnja celične vsebine ter porušitev celic. Prevodni del floema je tako nekobiliran, starejše, kolabirano floemsko tkivo pa se poruši in skrči. Obenem začnejo rasti posamezne parenhimske celice rasti, iz katerih lahko naknadno nastanejo različni tipi elementov (npr. sklereide, sluzne celice). Tra-

kovi se zveržijo, floemske branike pa z oddaljevanjem od kambija postajajo čedalje manj prepoznavne (TROCKENBRODT 1990). Četudi se prevodna vloga sitastih cevi v kolabiranem floemu preneha, starejše floemske celice v živem delu skorje še vedno opravljajo skladiščno funkcijo za nestrukturne ogljikove hidrate in vodo, zato so v tem smislu za dolgoročno preživetje drevesa izjemno pomembne.

Primerjava velikosti trahej in sitastih cevi je pokazala, da so bile sitaste cevi ranega floema za 28,2 % manjše od trahej na začetku rastne sezone, sitaste cevi kasnega floema pa za 35,4 % manjše od trahej nastalih na koncu rastne sezone, kar kaže na večjo transportno zmogljivost prevodnega sistema v lesu v primerjavi s floemom. Večji premeri prevodnih celic lesa v primerjavi s floemom so v skladu s preteklimi ugotovitvami pri navadni smreki (GRIČAR et al. 2015, JYSKE & HÖLTTÄ 2015). Sicer velikosti prevodnih elementov le deloma nakazujejo njihovo transportno zmogljivost, saj poleg velikosti celic na njihove prevodne kapacitete vplivajo še druge strukturne posebnosti, kot denimo dolžina trahejnih členov, velikost, struktura in porazdelitev pikenj v lesu ter dolžina sitastih členov, velikost in porazdelitev sitastih por v floemu (JYSKE & HÖLTTÄ 2015).

4 ZAKLJUČKI

Podnebne spremembe in s tem povezanimi pogostejši in intenzivnejši ekstremni vremenski dogodki, kot so suše, vročinski valovi, pozebe in poplave, bodo nedvomno vplivali na vitalnost dreves, produkcijo in kakovost lesa v Sloveniji v prihodnjih letih. Ob tem se bo spremenila porazdelitev drevesnih vrst in njihovo uveljavitev v združbah, kar predstavlja velike izzive upravljalcem gozdov. Poleg ekonomske (predvsem lesno-predelovalne) funkcije gozdov ni zanemarljiva njihova socialna, ekološka in estetska vloga. Razumevanje funkcioniranja rastlin v stresnih razmerah je zelo pomembno za področji biogeokemije in ekosistemske ekologije, saj rastline predstavljajo več kot 90 % celotne žive komponente okolja, ogljik shranjen v visokolignificiranih celicah dreves je ključna komponenta in skla-

dišče globalnega cikla ogljika. Povezovanje strukture tkiv z njihovo vlogo v drevesu tako omogoča boljši vpogled v kratkoročni in dolgoročni odziv dreves na spreminjajoče se okoljske razmere, zlasti ekstremne vremenske dogodke, katerih pogostost in intenziteta se v zadnjih letih povečujeta. Ovrednotenje vpliva stresorjev na debelinsko rast dreves, strukturo lesa in vzorce nastajanja sekundarnih tkiv v različnih delih drevesa prispeva k boljšemu razumevanju mehanizma teh procesov in njihove pomembnosti za upravljanje vodne in ogljikove bilance v različnih drevesnih vrste na različnih območjih Slovenije. Nenazadnje bo ohranjanje zdravih gozdov prispevalo k blaženju podnebnih sprememb in s tem neugodnih posledic na počutje in kvaliteto bivanja ljudi.

5 SUMMARY

Information on wood and phloem anatomies is crucial to understand better their plasticity in terms of adapting their structure to given environmental conditions,

and by that ensuring optimal functioning of the tree. Wood anatomical traits have been widely used to investigate and compare tree performance in different en-

vironments, (bark) phloem conducting cells have been less investigated in this respect, which may be partly related to methodological obstacles. To this purpose, we investigated the characteristics of wood and phloem increments in Eurasian aspen (*Populus tremula* L.) in Ljubljana in the growing season of 2010. In addition, we analysed the conductive elements in the wood (vessels) and phloem (sieve tubes) and interpreted the differences in these parameters in terms of their transport functions. We collected samples of wood and phloem at the end of the growing season, prepared cross-sections and performed histometric analysis by using light microscopy and image analysis system.

We found that the phloem increment ($364.1 \pm 17.5 \mu\text{m}$) represented 11.7% of the wood increment width ($3116.7 \pm 285.6 \mu\text{m}$), whereas the early phloem ($168.0 \pm 6.3 \mu\text{m}$) represented 80.5% of the late phloem width ($208.6 \pm 21.4 \mu\text{m}$). These findings are in line with the previous publications about higher intensity of cambium production of wood cells than of phloem cells in healthy trees growing in favourable environmental conditions. Since the wood of Eurasian aspen has diffuse-porous structure, it was not possible to determine the transition between earlywood and latewood, we divided the wood increment into three thirds and in each of them analysed the vessel characteristics, i.e., average diameter, average area and vessel density. The vessels were statistically the widest in the first third of the xylem increment ($62.1 \pm 1.0 \mu\text{m}$) and the smallest in the last third of the increment ($51.4 \pm 0.7 \mu\text{m}$). Consequently, the vessels in the first third of the increment had the largest areas ($4669.6 \pm 125.2 \mu\text{m}^2$), while in the case of vessel density there was no significant difference among the xylem increment parts. Nevertheless, the density was the smallest in the second third ($46.5 \pm 7.0 \text{ no/mm}^2$) and the highest in the last third of the xylem increment ($55.7 \pm 8.6 \text{ no/mm}^2$). Mean diameters of the sieve tubes in the late phloem were 25.4% smaller ($33.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$) than in the early phloem ($44.6 \pm 0.9 \mu\text{m}$);

however, these differences were not statistically significant. Sieve tubes in the early phloem were 28.2% smaller than vessels formed at the beginning of the growing season and late phloem sieve tubes were 35.4% smaller than vessels formed at the end of the growing season, indicating higher transport capacity of the conductive system in wood compared to the phloem.

Climate change and associated more frequent and intense extreme weather events, such as droughts, heat waves, frosts and floods, will undoubtedly affect the vitality of trees, as well as the production and quality of wood in Slovenia in the coming years. These changes will be one of the major factors, which will limit species distribution and establishment in the near future, and therefore presents many challenges for forest managers. In addition to the economic (especially wood-processing) functions of forests, their social, ecological and aesthetic roles are also very important. An increased understanding of plant function in stressful conditions is highly relevant to biogeochemistry and ecosystem ecology, as plants make up over 90% of the living biomass stock, and the carbon stored in the highly lignified cells of trees is a crucial component in the global carbon cycle. Linking structure and their roles in the tree enables better insight into the short-term and long-term response of trees to changing environmental conditions. In particular extreme weather events, should be taken into consideration because their frequency and intensity have been increasing over recent years. The evaluation of the influence of stressors on radial growth of trees, wood structure, and patterns of secondary growth in different parts of the tree will help us to understand better the mechanism of these processes and their importance for the management of water and carbon balances in different tree species in different regions of Slovenia. After all, preserving healthy forests will contribute to the mitigation of climate change and thereby positively affect the well-being and quality of people's lives.

ZAHVALA - ACKNOWLEDGEMENTS

Pripravo prispevka so omogočili raziskovalni program št. P4-0107 (Gozdna biologija, ekologija in tehnologija) ter raziskovalna projekta L7-2393 (Vpliv klimatskih sprememb na trajnost, stabilnost in biodiverziteteto sestojev bukve in črnega bora na Balkanu) in V4-0496 (Vpliv klimatskih sprememb na nastanek in kakovost juvenilnega lesa pri boru, topolu in robiniji), ki jih je

sofinancirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna. Zahvaljujem se Špeli Jagodic, univ. dipl. geog. in Robertu Krajncu z Gozdarskega inštituta Slovenije za pomoč pri delu na terenu. Hvala tudi Adriani Podržaj, mag. inž. agr. z Oddelka za agronomijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani za pomoč pri pripravi preparatov.

6 LITERATURA - REFERENCES

- DAVIS, J.D. & R.F. EVERT, 1968: *Seasonal development of the secondary phloem in Populus tremuloides*. Botanical Gazette 129: 1-8. 10.1086/336406
- EILMANN, B., F. STERCK, L. WEGNER, S.M.G. DE VRIES, G. VON ARX, G.M.J. MOHREN, J. DEN OUDEN & U. SASS-KLAASSEN, 2014: *Wood structural differences between northern and southern beech provenances growing at a moderate site*. Tree Physiology 34: 882-893. 10.1093/treephys/tpu069
- FONTI, P. & S. JANSEN, 2012: *Xylem plasticity in response to climate*. New Phytologist 195: 734-736. 10.1111/j.1469-8137.2012.04252.x
- FONTI, P., G. VON ARX, I. GARCÍA-GONZÁLEZ, B. EILMANN, U. SASS-KLAASSEN, H. GÄRTNER & D. ECKSTEIN, 2010: *Studying global change through investigation of the plastic responses of xylem anatomy in tree rings*. New Phytologist 185: 42-53. 10.1111/j.1469-8137.2009.03030.x
- GASSON, P., 1987: *Some implications of anatomical variations in the wood of pedunculate oak (Quercus robur L.) including comparisons with common beech (Fagus sylvatica L.)*. IAWA Bulletin n.s. 8: 149-166.
- GRIČAR, J., 2007: *Xylo- and phloemogenesis in silver fir (Abies alba Mill.) and Norway spruce (Picea abies (L.) Karst.)*. Studia Forestalia Slovenica, Slovenian Forestry Institute. Ljubljana.
- GRIČAR, J., L. KRŽE & K. ČUFAR, 2009: *Relationship among number of cells in xylem, phloem and dormant cambium in silver fir (Abies alba Mill.) trees of different vitality*. IAWA Journal 30: 121-133.
- GRIČAR, J., P. PRISLAN, M. DE LUIS, V. GRYS, J. HACUROVA, H. VAVRČIK & K. ČUFAR, 2015: *Plasticity in variation of xylem and phloem cell characteristics of Norway spruce under different local conditions*. Frontiers in Plant Science 6: 10.3389/fpls.2015.00730
- GRIČAR, J., P. PRISLAN, M. DE LUIS, K. NOVAK, L.A. LONGARES, E. MARTINEZ DEL CASTILLO & K. ČUFAR, 2016: *Lack of annual periodicity in cambial production of phloem in trees from Mediterranean areas*. IAWA Journal 37: 332-348. 10.1163/22941932-20160151
- HOLDHEIDE, W., 1951: *Anatomie mitteleuropäischer Gehölzrinden*. V: H. Freud (ur.) *Handbuch der Mikroskopie in der Technik*. Umschau Verlag. Frankfurt am Main. pp. 193-367.
- IAWA COMMITTEE, 2016: *IAWA list of microscopic bark features*. IAWA Journal 37: 517-615.
- JYSKE, T. & T. HÖLTTÄ, 2015: *Comparison of phloem and xylem hydraulic architecture in Picea abies stems*. New Phytologist 205: 102-115. 10.1111/nph.12973
- KOZLOWSKY, T.T. & S.G. PALLARDY, 1997: *Growth control in woody plants*. Academic Press, Inc. San Diego, California.
- PANSHIN, A.J. & C. DE ZEEUW, 1980: *Textbook of wood technology*. McGraw-Hill. New York.
- PRISLAN, P., P. MRAK, N. ŽNIDARŠIČ, J. ŠTRUS, M. HUMAR, N. THALER, T. MRAK & J. GRIČAR, 2018a: *Intra-annual dynamics of phloem formation and ultrastructural changes in sieve tubes in Fagus sylvatica*. Tree Physiology 39: 262-274. 10.1093/treephys/tpy102
- PRISLAN, P., K. ČUFAR, M. DE LUIS & J. GRIČAR, 2018b: *Precipitation is not limiting for xylem formation dynamics and vessel development in European beech from two temperate forest sites*. Tree Physiology 38: 186-197. 10.1093/treephys/tpx167
- SASS-KLAASSEN, U., P. FONTI, P. CHERUBINI, J. GRIČAR, E.M.R. ROBERT, K. STEPPE & A. BRÄUNING, 2016: *A tree-centered approach to assess impacts of extreme climatic events on forests*. Frontiers in Plant Science 7: 10.3389/fpls.2016.01069
- SASS, U. & D. ECKSTEIN, 1995: *The variability of vessel size in beech (Fagus sylvatica L.) and its ecophysiological interpretation*. Trees 9: 247-252. 10.1007/bf00202014
- SCHUME, H., M. GRABNER & O. ECKMÜLLNER, 2004: *The influence of an altered groundwater regime on vessel properties of hybrid poplar*. Trees Structure-Function 18:184-194.
- SCHWEINGRUBER, F.H., 2007: *Wood structure and environment*. Springer, Berlin Heidelberg.
- TORELLI, N., 1990: *Les & skorja. Slovar strokovnih izrazov*. Biotehniška fakulteta, VTORZD za lesarstvo. Ljubljana.
- TORELLI, N., 1991: *Makroskopska in mikroskopska identifikacija lesa (ključ)*. Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo. Ljubljana.
- TORELLI, N., 1998: *Daljinski transport vode v drevesu - vodni potencial*. Les 50: 169-173.
- TROCKENBRODT, M., 1990: *Survey and discussion of the terminology used in bark anatomy*. IAWA Bulletin n.s. 11: 141-166.
- TYREE, M.T. & M.H. ZIMMERMANN, 2010: *Xylem structure and the ascent of sap*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York.

UN-ECE, 2015: *State of Europe's Forests 2015. FOREST EUROPE Liaison Unit Madrid.*

WERF VAN DER, G.W., U. SASS-KLAASSEN & G.M.J. MOHREN, 2007: *The impact of the 2003 summer drought on the intra-annual growth pattern of beech (*Fagus sylvatica* L.) and oak (*Quercus robur* L.) on a dry site in the Netherlands.* *Dendrochronologia* 25: 103-112. 10.1016/j.dendro.2007.03.004

NAVODILA AVTORJEM

Folia biologica et geologica so znanstvena revija IV. razreda SAZU za naravoslovne vede. Objavljajo naravoslovne znanstvene razprave in pregledne članke, ki se nanašajo predvsem na raziskave v našem etničnem območju Slovenije, pa tudi raziskave na območju Evrope in širše, ki so pomembne, potrebne ali primerljive za naša preučevanja.

1. ZNANSTVENA RAZPRAVA

Znanstvena razprava zajema celovit opis izvirne raziskave, ki vključuje teoretični pregled tematike, podrobno predstavlja rezultate z razpravo in zaključki ali sklepi in pregled citiranih avtorjev. V izjemnih primerih so namesto literarnega pregleda dovoljeni viri, če to zahteva vsebina razprave.

Razprava naj ima klasično razčlenitev (uvod, material in metode, rezultati, diskusija z zaključki, zahvale, literatura idr.).

Dolžina razprave, vključno s tabelami, grafikoni, tablam, slikami ipd., praviloma ne sme presežati 2 avtorskih pol oziroma 30 strani tipkopisa. Zaželeno so razprave v obsegu ene avtorske pole oziroma do dvajset strani tipkopisa.

Razpravo ocenjujeta recenzenta, od katerih je eden praviloma član SAZU, drugi pa ustrezni tuji strokovnjak. Recenzente na predlog uredniškega odbora revije *Folia biologica et geologica* potrdi IV. razred SAZU.

Razprava gre v tisk, ko jo na predlog uredniškega odbora na seji sprejmeta IV. razred in predsedstvo SAZU.

2. PREGLEDNI ČLANEK

Pregledni članek objavljamo po posvetu uredniškega odbora z avtorjem. Na predlog uredniškega odbora sprejmeta IV. razred in predsedstvo SAZU. Članek naj praviloma obsega največ 3 avtorske pole (tj. do 50 tipkanih strani).

3. NOVOSTI

Revija objavlja krajše znanstveno zanimive in aktualne prispevke do 7000 znakov.

4. IZVIRNOST PRISPEVKA

Razprava oziroma članek, objavljen v reviji *Folia biologica et geologica*, ne sme biti predhodno objavljen v drugih revijah ali knjigah.

5. JEZIK

Razprava ali članek sta lahko pisana v slovenščini ali katerem od svetovnih jezikov. V slovenščini zlasti tedaj, če je tematika lokalnega značaja.

Prevod iz svetovnih jezikov in jezikovno lektoriranje oskrbi avtor prispevka, če ni v uredniškem odboru dogovorjeno drugače.

6. POVZETEK

Za razprave ali članke, pisane v slovenščini, mora biti povzetek v angleščini, za razprave ali članke v tujem jeziku ustrezen slovenski povzetek. Povzetek mora biti dovolj obširen, da je tematika jasno prikazana in razumljiva domačemu in tujemu bralcu. Dati mora informacijo o namenu, metodi, rezultatu in zaključkih. Okvirno naj povzetek zajema 10 do 20 % obsega razprave oziroma članka.

7. IZVLEČEK

Izvleček mora podati jedrnat informacijo o namenu in zaključkih razprave ali članka. Napisan mora biti v slovenskem in angleškem jeziku.

8. KLJUČNE BESEDE

Število ključnih besed naj ne presega 10 besed. Predstaviti morajo področje raziskave, podane v razpravi ali članku. Napisane morajo biti v slovenskem in angleškem jeziku.

9. NASLOV RAZPRAVE ALI ČLANKA

Naslov razprave ali članka naj bo kratek in razumljiv. Za naslovom sledi ime/imena avtorja/avtorjev (ime in priimek).

10. NASLOV AVTORJA/AVTORJEV

Pod ključnimi besedami spodaj je naslov avtorja/avtorjev, in sicer akademski naslov, ime, priimek, ustanova, mesto z oznako države in poštno številko, država, ali elektronski poštni naslov.

11. UVOD

Uvod se mora nanašati le na vsebino razprave ali članka.

12. ZAKLJUČKI ALI SKLEPI

Zaključki ali sklepi morajo vsebovati sintezo glavnih ugotovitev glede na zastavljena vprašanja in razrešujejo ali nakazujejo problem raziskave.

13. TABELE, TABLE, GRAFIKONI, SLIKE IPD.

Tabele, table, grafikoni, slike ipd. v razpravi ali članku naj bodo jasne, njihovo mesto mora biti nedvoumno označeno, njihovo število naj racionalno ustreza vsebini. Tabele, table, slike, ilustracije, grafikoni ipd. skupaj z naslovi naj bodo priloženi na posebnih listih. Če so slike v

digitalni obliki, morajo biti pripravljene u zapisu **.tiff** v barvni skali **CMYK** in resoluciji vsaj **300 DPI/inch**. Risanje slike pa v zapisu **.eps**.

Pri fitocenoloških tabelah se tam, kjer ni zastopana rastlinska vrsta, natisne pika.

14. LITERATURA IN VIRI

Uporabljeno literaturo citiramo med besedilom. Citirane avtorje pišemo v kapitelkah. Enega avtorja pišemo » (Priimek leto)« ali »(Priimek leto: strani)« ali »Priimek leto« [npr. (BUKRY 1974) ali (OBERDORFER 1979: 218) ali ... POLDINI (1991) ...]. Če citiramo več del istega avtorja, objavljenih v istem letu, posamezno delo označimo po abecednem redu »Priimek leto mala črka« [npr. ...HORVATÍĆ (1963 a)... ali (HORVATÍĆ 1963 b)]. Avtorjem z enakim priimkom dodamo pred priimkom prvo črko imena (npr. R. TUXEN ali J. TUXEN). Več avtorjev istega dela citiramo po naslednjih načelih: delo do treh avtorjev »Priimek, Priimek & Priimek leto: strani« [npr. (SHEARER, PAPIKE & SIMON 1984) ali PEARCE & CANN (1973: 290-300)...]. Če so več kot trije avtorji, citiramo »Priimek prvega avtorja et al. leto: strani« ali »Priimek prvega avtorja s sodelavci leto« [npr. NOLL et al. 1996: 590 ali ...MEUSEL s sodelavci (1965)].

Literaturo uredimo po abecednem redu. Imena avtorjev pišemo v kapitelkah:

– **Razprava ali članek:**

DAKSKOBLER, L., 1997: *Geografske variante asociacije Seslerio autumnalis-Fagetum (Ht.) M. Wraber ex Borhidi 1963*. Razprave IV razreda SAZU (Ljubljana) 38 (8): 165–255.

KAJFEŽ, L. & A. HOČEVAR, 1984: *Klima. Tlatvorni činitelji*. V D. Stepančič: *Komentar k listu Murska Sobota*. Osnovna pedološka karta SFRJ. Pedološka karta Slovenije 1:50.000 (Ljubljana): 7–9.

LE LOEUFF, J., E. BUFFEAUT, M. MARTIN & H. TONG, 1993: *Decouverte d'Hadrosauridae (Dinosauria, Ornithischia) dans le Maastrichtien des Corbieres (Aude, France)*. C. R. Acad. Sci. Paris, t. 316, Ser. II: 1023–1029.

– **Knjiga:**

GORTANI, L. & M. GORTANI, 1905: *Flora Friuliana*. Udine.

Če sta različna kraja založbe in tiskarne, se navaja kraj založbe.

– **Elaborat ali poročilo:**

PRUS, T., 1999: *Tla severne Istre*. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani. Center za pedologijo in varstvo okolja. Oddelek za agronomijo. Ljubljana. (Elaborat, 10 str.).

– **Atlasi, karte, načrti ipd.:**

KLIMATOLOGIJA Slovenije 1988: Prvi zvezek: *Temperatura zraka 1951–1980*. Hidrometeorološki zavod SR Slovenije. Ljubljana.

LETNO poročilo meteorološke službe za leto 1957. Hidrometeorološki zavod SR Slovenije. Ljubljana.

Za vire veljajo enaka pravila kot za literaturo.

15. LATINSKA IMENA TAKSONOV

Latinska imena rodov, vrst in infraspecifičnih taksonov se pišejo kurzivno. V fitocenoloških razpravah ali člankih se vsi sintaksoni pišejo kurzivno.

16. FORMAT IN OBLIKA RAZPRAVE ALI ČLANKA

Članek naj bo pisan v formatu RTF z medvrstičnim razmikom 1,5 na A4 (DIN) formatu. Uredniku je treba oddati izvornik in kopijo ter zapis na disketi 3,5 ali na CD-ROM-u. Tabele in slike so posebej priložene tekstu. Slike so lahko priložene kot datoteke na CD-ROM-u, za podrobnosti se vpraša uredništvo.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Folia biologica et geologica is a scientific periodical of the Classis IV: Natural history that publishes natural scientific proceedings and review articles referring mainly to researches in ethnic region of ours, and also in Europe and elsewhere being of importance, necessity and comparison to our researches.

1. SCIENTIFIC TREATISE

It is the entire description of novel research including the theoretical review of the subjects, presenting in detail the results, conclusions, and the survey of literature of the authors cited. In exceptional cases the survey of literature may be replaced by sources, if the purport requires it.

It should be composed in classic manner: introduction, material and methods, results, discussion with conclusions, acknowledgments, literature, etc.

The treatise should not be longer than 30 pages, including tables, graphs, figures and others. Much desired are treatises of 20 pages.

The treatises are reviewed by two reviewers, one of them being member of SASA as a rule, the other one a foreign expert.

The reviewers are confirmed by the Classis IV SASA upon the proposal of the editorial board of *Folia biologica et geologica*.

The treatise shall be printed when adopted upon the proposal of the editorial board by Classis IV and the Presidency SASA.

2. REVIEW ARTICLE

On consultation with the editorial board and the author, the review article shall be published. Classis IV and the Presidency SASA upon the proposal of the editorial board adopt it. It should not be longer than 50 pages.

3. NEWS

The periodical publishes short, scientifically relevant and topical articles up to 7000 characters in length.

4. NOVELTY OF THE CONTRIBUTION

The treatise or article ought not to be published previously in other periodicals or books.

5. LANGUAGE

The treatise or article may be written in one of world language and in Slovenian language especially when the subjects are of local character.

The author of the treatise or article provides the translation into Slovenian language and corresponding editing, unless otherwise agreed by the editorial board.

6. SUMMARY

When the treatise or article is written in Slovenian, the summary should be in English. When they are in foreign language, the summary should be in Slovenian. It should be so extensive that the subjects are clear and understandable to domestic and foreign reader. It should give the information about the intention, method, result, and conclusions of the treatise or article. It should not be longer than 10 to 20% of the treatise or article itself.

7. ABSTRACT

It should give concise information about the intention and conclusions of the treatise or article. It must be written in English and Slovenian.

8. KEY WORDS

The number of key words should not exceed 10 words. They must present the topic of the research in the treatise or article and written in English and Slovenian.

9. TITLE OF TREATISE OR ARTICLE

It should be short and understandable. It is followed by the name/names of the author/authors (name and surname).

10. ADDRESS OF AUTHOR/AUTHORS

The address of author/authors should be at the bottom of the page: academic title, name, surname, institution, town and state mark, post number, state, or e-mail of the author/authors.

11. INTRODUCTION

Its contents should refer to the purports of the treatise or article only.

12. CONCLUSIONS

Conclusions ought to include the synthesis of the main statements resolving or indicating the problems of the research.

13. TABLES, GRAPHS, FIGURES, ETC.

They should be clear, their place should be marked unambiguously, and the number of them must rationally respond to the purport itself. Tables, figures, illus-

trations, graphs, etc. should be added within separated sheets. In case that pictures in digital form, **TIFF** format and **CMYK** colour scale with **300 DPI/inch** resolution should be used. For drawn pictures, **EPS** format should be used.

In cases, when certain plant species are not represented, a dot should be always printed in phytocenologic tables.

14. LITERATURE AND SOURCES

The literature used is to be cited within the text. The citation of the authors is to be marked in capitals. One writes the single author as follows: "(Surname year)" or "(Surname year: pages)" or "Surname year" [(BUKRY 1974) or (OBERDORFER 1979: 218) or ... POLDINI (1991)...]. The works of the same author are to be cited in alphabetical order: "Surname year small letter" [...HORVATIĆ (1963 a)... or (HORVATIĆ (1963 b)]. The first letter of the author's name is to be added when the surname of several authors is the same (R. TUXEN or J. TUXEN). When there are two or three authors, the citation is to be as follows: "Surname, Surname & Surname year: pages" [(SHEARER, PAPIKE & SIMON 1984) or PEARCE & CANN (1973: 290-300)...]. When there are more than three authors, the citation is to be as follows: "Surname of the first one et al. year: pages" or "Surname of the first one with collaborators year" [NOLL et al. 1996: 590 or MEUSEL with collaborators (1965)].

The literature is to be cited in alphabetical order. The author's name is written in capitals as follows:

- **Treatise or article:**

DAKSKOBLER, L., 1997: *Geografske variante asociacije Seslerio autumnalis-Fagetum (Ht.) M. Wraber ex Borhidi 1963*. Razprave IV. Razreda SAZU (Ljubljana) 38 (8): 165-255.

KAJFEŽ, L. & A. HOČEVAR, 1984: *Klima. Tlatvorni činitelji*. V D. Stepančič: *Komentar k listu Murska Sobota*. Osnovna pedološka karta SFRJ. Pedološka karta Slovenije 1:50.000 (Ljubljana): 7-9.

LE LOEUFF, J., E. BUFFEAUT, M. MARTIN & H. TONG, 1993: *Découverte d'Hadrosauridae (Dinosauria, Ornithischia) dans le Maastrichtien des Corbieres (Aude, France)*. C. R. Acad. Sci. Paris, t. 316, Ser. II: 1023-1029.

- **Book:**

GORTANI, L. & M. GORTANI, 1905: *Flora Friuliana*. Udine.

In case that the location of publishing and printing are different, the location of publishing is quoted.

- **Elaborate or report:**

PRUS, T., 1999: *Tla severne Istre*. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani. Center za pedologijo in varstvo okolja. Oddelek za agronomijo. Ljubljana. (Elaborat, 10 str.).

- **Atlases, maps, plans, etc.:**

KLIMATOGRAFIJA Slovenije 1988: Prvi zvezek: *Temperatura zraka 1951-1980*. Hidrometeorološki zavod SR Slovenije. Ljubljana.

LETNO poročilo meteorološke službe za leto 1957. Hidrometeorološki zavod SR Slovenije. Ljubljana.

The same rules hold for sources.

15. LATIN NAMES OF TAXA

Latin names for order, series, and infraspecific taxa are to be written in italics. All syntaxa written in phytocenological treatises or articles are to be in italics.

16. SIZE AND FORM OF THE TREATISE OR ARTICLE

The contribution should be written in RTF format, spacing lines 1.5 on A4 (DIN) size. The original and copy ought to be sent to the editor on diskette 3.5 or on CD-Rom. Tables and figures are to be added separately. Figures may be added as files on CD-Rom. The editorial board is to your disposal giving you detailed information.

17. THE TERM OF DELIVERY

The latest term to deliver your contribution is May 31.

FOLIA BIOLOGICA ET GEOLOGICA 60/2 - 2019
Slovenska akademija znanosti in umetnosti v Ljubljani

Grafična priprava za tisk
Medija grafično oblikovanje, d.o.o.

Tisk
Abo Grafika d.o.o.

Ljubljana
2019



VSEBINA / CONTENTS



Ivan Kreft

Akademik prof. ddr. Jože Maček – devetdesetletnik

Stane Granda

Akademik prof. ddr. Jože Maček – devetdesetletnik

RAZPRAVE / ESSAYS

Anamarija Jagodič, Stanislav Trdan, Žiga Laznik

Multitrofične interakcije med rastlinami, talnimi škodljivimi žuželkami ter entomopatogenimi ogorčicami

Multitrophic interaction between plants, underground pests and entomopathogenic nematodes

Mario Lešnik

Koliko se lahko približamo željam javnosti za občutno zmanjšanje rabe pesticidov v kmetijski pridelavi in kakšne učinke prinaša uvajanje alternativnih pristopov zatiranja škodljivih organizmov?

How much closer can we get to the public's desire for a significant reduction in the use of pesticides in agricultural production and what are the effects of introducing alternative approaches to the control of organisms harmful to plants?

Uroš Žibrat, Matej Knapič & Gregor Urek

Plant pests and disease detection using optical sensors

Daljinsko zaznavanje rastlinskih bolezní in škodljivcev

Stanislav Trdan & Tanja Bohinc

12 let (2005-2017) raziskovalnega in strokovnega dela na področju zatiranja skladiščnih škodljivcev v Sloveniji

Twelve years (2005-2017) of scientific and professional work in the field of stored products pests protection in Slovenia

Eva Praprotnik, Mojca Narat, Jaka Razinger

Imunski sistem žuželk in njihov imunski odziv na entomopatogene glive

Insect immune system and their immune response to entomopathogenic fungi

Jožica Gričar

Značilnosti lesnih in floemskih prirastkov pri trepetliki (*Populus tremula* L.)

Characteristics of wood and phloem increments in eurasian aspen (*Populus tremula* L.)