

Uporaba metod z nizkim tveganjem za varstvo zelenjadnic (CRP V4-1602)

Izroček 4: Poročilo z opisom analize vzorcev zemlje na prisotnost ogorčic vrste *Phasmarhabditis hermaphrodita*

Ljubljana, 26.1.2018

Barbara Gerič Stare, Saša Širca

Izvleček

Na podlagi opravljenih analiz vzorcev zemlje odvzete v l. 2016 in 2017 na različnih lokacijah in v različnih habitatih, kjer živijo polži, z izolacijo celotne populacije ogorčic iz zemlje ter molekularno bioloških testom na osnovi PCR v realnem času nismo potrdili prisotnosti ogorčic vrste *Phasmarhabditis hermaphrodita* v analiziranih vzorcih.

Ključne besede

Polži, biotično zatiranje, parazitske ogorčice polžev, nematode, *Phasmarhabditis hermaphrodita*, kopenski polži, polži lazarji, polži slinarji, španski lazar, *Arion lusitanicus*.

Uvod

Polži v zadnjih letih povzročajo čedalje večjo škodo v kmetijski rastlinski proizvodnji. Zaradi omejevanja rabe pesticidov kot je metaldehid (limacid), je postalo nujno iskanje novih, za okolje varnejših pristopov zatiranja polžev. Za enega od uspešnih načinov biotičnega zatiranja polžev se je v tujini že izkazala uporaba parazitskih ogorčic *Phasmarhabditis hermaphrodita*. Vrsta *P. hermaphrodita* parazitira in ubije več vrst golih polžev. Deluje tudi na invazivno vrsto polža španski lazar (*Arion lusitanicus*), vendar samo na mlade polže španskega lazarja. Obstajata dva komercialna pripravka na osnovi te ogorčice, ki se jih lahko uporablja v 15 Evropskih v državah. V Sloveniji teh pripravkov zaenkrat ni mogoče uporabljati, saj je omenjena ogorčica trenutno uvrščena na seznam tujerodnih vrst koristnih organizmov (Pravilniku o biotičnem varstvu rastlin).

Lov okuženih polžev je zelo težak; potrebno bi bilo presejati zemljo in iz nje izločiti umirajoče polže, v zdravih polžih, ki jih najdemo na površini pa je verjetnost detekcije *P. hermaphrodita* zelo majhna. Zato smo namesto ekstrakcije ogorčic iz polžev pristopili k iskanju ogorčic vrste *P. hermaphrodita* v vzorcih same zemlje, torej substrata, kjer polži in ogorčice živijo. Združba ogorčic v zemlji je zelo velika in raznolika; tipična obdelovalna tla vsebujejo preko 20 ogorčic/g suhe teže. Ker so ogorčice morfološko zelo podobne in ker je v zemlji prisotna samo stopnja ličinke *P. hermaphrodita*, ki še nima reproduktivnih struktur, ki jih navadno uporabljamo kot znake v diagnostiki, je za identifikacijo ogorčic *P. hermaphrodita* iz vzorcev zemlje najprimernejša molekularno-biološka metoda, ki določi vrsto na osnovi specifične molekule DNA (MacMillan in sod., 2006) in jo rutinsko izvajamo v nematološkem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije (KIS) od l. 2012. S pomočjo opisane metode lahko vrsto *P. hermaphrodita* ločimo od ostalih vrst ogorčic vključno z morfološko identično vrsto *P. neopapillosa*. Ti dve vrsti lahko med seboj ločimo samo po številu samcev v populaciji. Pri vrsti *P. hermaphrodita* so samci zelo redki. V preiskovanem vzorcu pa lahko z opisano molekularno metodo zanesljivo določimo prisotnost že ene same ličinke ogorčic vrste *P. hermaphrodita*, kar je še ena prednost pred iskanjem vrste *P. hermaphrodita* v mrtvih polžih.

Metode

Vzorčili smo zemljo z različnih geografskih lokacij v Sloveniji in različnih habitatov, kjer se polži pogosteje pojavljajo. Posamezen talni vzorec je zajemal 200 cm³ zemlje. Prostoživeče ogorčice smo iz vzorcev zemlje izločili po metodi Baermannovega sistema ekstrakcije, ki temelji na aktivnem gibanju ogorčic. Vzorce zemlje smo suspendirali v vodi in celotno vsebino prelili na 50 µm sita, ki zadržijo ogorčice. Vsebino sit smo izprali ter postavili na Baermannov lijak, kjer so se žive ogorčice zbrale v 10 ml vode. S centrifugiranjem smo ogorčice zbrali v cca. 100 µl vode. Iz te suspenzije smo izolirali DNA vseh ekstatiranih ogorčic iz zemlje s pomočjo avtomatizirane izolacije DNA s pomočjo robota KingFisher mL in komercialnega kompleta kemikalij za izolacijo DNA: Wizard Magnetic DNA Purification System for Food kit proizvajalca Promega. Uspešnost ekstrakcije ogorčic smo potrdili pod stereomikroskopsko lupo (vidne ogorčice). Uspešnost izolacije DNA smo testirali z metodo, ki pomnoži DNA odsek katerekoli vrste iz debla Nematoda (komercialni komplet Nematode DNA identification & detection: Scope: All nematode species, 'non-specific, general nematode DNA', proizvajalec ClearDetections). Prisotnost ogorčic vrste *P. hermaphrodita* smo določili z molekularno metodo na osnovi PCR v realnem času; s TaqMan kemijo v preiskovanem vzorcu določimo prisotnost ogorčic *P. hermaphrodita* s pomočjo pomnoževanja predela 18S rDNA (MacMillan in sod., 2006).

Rezultati

Analizirali smo 24 vzorcev zemlje zbranih v l. 2016 in 2017 iz različnih geografskih lokacij in različnih habitatov, kjer se polži pogosteje pojavljajo (travnik, vrt, njiva, gozd, gozdni rob, rečni breg, brežina potoka, vinograd, hmeljišče). Z ekstrakcijo smo iz vzorcev izločili vse prostoživeče ogorčice v zbranih vzorcih. Iz vzorcev zemlje smo uspešno izločili ogorčice in uspešno izolirali njihovo DNA. Prisotnost ogorčicogorčic vrste *P. hermaphrodita* smo preverjali z molekularno metodo na osnovi PCR v realnem času. Vrsta *P. hermaphrodita* ni bila prisotna v nobenem od 24 testiranih vzorcev.

Diskusija in zaključki

Leta 1993 je Michael Wilson patentiral uporabo ogorčic iz rodu *Phasmarhabditis* (vrsta *P. hermaphrodita*) za zatiranje gospodarsko pomembnih poljev (Laznik in Trdan 2009). Pripravke so patentirali pod uradnim imenom Nemaslug®, na Britanskem tržišču ga je moč kupiti že od l. 1994 (Laznik in Trdan 2009). Od tam se je uporaba razširila tudi v druge evropske države.

Na globalnem trgu obstajata dva komercialna pripravka *Phasmarhabditis*-System (Biobest, Belgija) in Nemaslug (BASF International). Pripravka sta na voljo za uporabo v sledečih evropskih državah: Belgija, Češka, Danska, Finska, Francija, Irska, Italija, Nemčija, Nizozemska, Norveška, Poljska, Španija, Švedska, Švica in Velika Britanija (Bio-Pesticide Database; EPPO; Rae in sod., 2007). *P. hermaphrodita* so uspešno uporabili v številnih poljskih poskusih in različnih Evropskih državah, vključno z Veliko Britanijo, Hrvaško, Francijo, Nizozemsko, Španijo in Švico. Uspešni testi učinkovitosti so bili opravljeni tudi v Čilu in ZDA (Rae in sod., 2009).

V Sloveniji teh pripravkov ni mogoče uporabljati, saj je omenjena vrsta ogorčic uvrščena na seznam tujerodnih vrst koristnih organizmov (Pravilnik o biotičnem varstvu rastlin). S to raziskavo smo poskušali dognati, ali je vrsta *P. hermaphrodita* naravno prisotna tudi v Sloveniji. Vrsta *P. hermaphrodita* ni bila prisotna v nobenem od vzorcev testiranih v tej raziskavi. Šele takšna potrditev bi glede na trenutno veljavno zakonodajo omogočila registracijo pripravkov za zatiranje poljev na osnovi te vrste parazitske ogorčice poljev v Sloveniji.

Viri in literatura

Laznik Ž., Trdan S. 2009. Parazitske ogorčice poljev. *Acta agriculturae Slovenica*, 93: 87-92.

MacMillan Keith, Blok Vivian, Young Iain, Crawford John, Wilson Michael J. 2006. Quantification of the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* from soil samples using real time qPCR *International Journal for Parasitology* 36:1453-1461.

BPDB: Bio-Pesticide Database (<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/bpdb/>) (iskanje 6.9.2017), baza, ki jo vzdržuje The University of Hertfordshire je zanesljiv vir podatkov o tradicionalnih pesticidih za kmetijsko pridelavo, kot tudi pesticidih na osnovi naravnih spojin.

EPPO (http://archives.eppo.int/EPPOStandards/biocontrol_web/nematoda.htm#phasmhe)

Rae R.G., Robertson J.F., Wilson M.J. 2009. Optimization of biological (*Phasmarhabditis hermaphrodita*) and chemical (iron phosphate and metaldehyde) slug control. *Crop Protection*, 28:765-773.

Rae R.G., Verdun C., Grewal P., Robertson J.F., Wilson M.J. 2007. Biological control of terrestrial molluscs using *Phasmarhabditis hermaphrodita*: progress and prospects. *Pest Management Science*, 63:1153-1164.