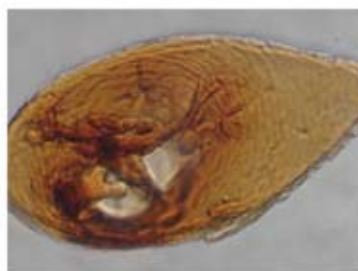




**Gregor Urek, Saša Širca,
Barbara Gerič Stare**

**CISTOTVORNE OGORČICE
(NEMATODA: HETERODERINAE)
SLOVENIJE**



Kmetijski
inštitut
Slovenije

**CISTOTVORNE OGORČICE
(NEMATODA: HETERODERINAE) SLOVENIJE**

Gregor Urek, Saša Širca, Barbara Gerič Stare

**CISTOTVORNE OGORČICE
(NEMATODA: HETERODERINAE) SLOVENIJE**

Kmetijski inštitut Slovenije
Ljubljana 2009

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

632.651.32(497.4)

595.132(497.4)

UREK, Gregor

Cistotvorne ogorčice (Nematoda: heteroderinae) Slovenije /

Gregor Urek, Saša Širca, Barbara Gerič Stare. - Ljubljana :

Kmetijski inštitut Slovenije, 2009

ISBN 978-961-6505-39-0

1. Širca, Saša, 1973- 2. Gerič Stare, Barbara

245393920

VSEBINA

	KJNIGI NA POT	ix
1	RAZŠIRJENOST IN GOSPODARSKI POMEN	003
2	MORFOLOGIJA	007
	2.1 Jajčeca	007
	2.2 Ličinke	008
	2.3 Samci	008
	2.4 Samice	008
	2.5 Ciste	009
	2.5.1 Oblika, velikost, barva	009
	2.5.2 Ovojnica s pripadajočimi tvorbami	010
	2.5.3 Anatomija vulvinega stožca (kalote)	012
	2.5.3.1 Zunanja anatomska znamenja	012
	2.5.3.2 Notranja anatomska znamenja	019
3	TAKSONOMSKA UVRSTITEV CISTOTVORNIH OGORČIC	023
4	MOLEKULARNA TAKSONOMIJA IN FILOGENIJA	025
5	RAZVOJNI KROG	031
6	ZGODOVINSKI PREGLED NEMATOLOŠKE KONTROLE OBDELOVALNIH TAL V SLOVENIJI	033

7	VZORČENJE IN PRIPRAVA OGORČIC ZA MIKROSKOPSKO OPAZOVANJE	037
	7.1 Vzorčenje	037
	7.2 Izločanje cist iz talnih vzorcev	038
	7.3 Priprava cist za analizo - pomen vulvinega stožca	043
	7.3.1 Način rezanja cist – cistotomija	043
	7.3.2 Čiščenje vulvinega stožca	044
	7.3.3 Opazovanje zgradbe vulvinega stožca	044
	7.3.4 Izločanje ličink iz jajčnih ovojníc	044
	7.3.5 Fiksacija	045
	7.3.6 Priprava preparatov za mikroskopski pregled	046
8	OPIS IN RAZŠIRJENOST VRST, UGOTOVLJENIH V SLOVENIJI	049
	8.1 <i>Heterodera schachtii</i> – pesna ogorčica	049
	8.2 <i>Heterodera avenae</i> – ovsova ogorčica	053
	8.3 <i>Heterodera trifolii</i> – deteljna ogorčica	056
	8.4 <i>Heterodera galeopsidis</i> – zebratova ogorčica	059
	8.5 <i>Heterodera cruciferae</i> – zeljna ogorčica	061
	8.6 <i>Heterodera göttingiana</i> – grahova ogorčica	064
	8.7 <i>Heterodera humuli</i> – hmeljeva ogorčica	067
	8.8 <i>Heterodera carotae</i> – korenčkova ogorčica	069
	8.9 <i>Punctodera punctata</i> – travna ogorčica	072
	8.10 <i>Globodera achilleae</i> – rmanova ogorčica	075
9	KROMPIRJEVE OGORČICE – POSEBNI DEL	079
	9.1 <i>Globodera rostochiensis</i> – rumena krompirjeva ogorčica in <i>Globodera pallida</i> – bela krompirjeva ogorčica	079

9.2	Morfološke značilnosti	080
9.3	Biologija in ekologija	085
9.4	Pomen in znamenja napada	086
9.5	Razširjenost	087
9.6	Molekularna identifikacija	089
9.6.1	PCR ali verižna reakcija s polimerazo in gelska elektroforeza	089
9.6.2	PCR v realnem času	091
9.6.3	PCR-RFLP ali polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov	093
9.6.4	Določanje nukleotidnega zaporedja DNA	094
9.6.5	IEF ali izoelektrično fokusiranje	096
9.6.6	Prednosti in slabosti molekularnih tehnik identifikacije	097
9.7	Biološke rase – patotipi	098
9.7.1	Določanje patotipov	098
9.7.2	Preskusi določanja občutljivosti kultivarjev krompirja	099
9.8	Parazitski geni	101
9.9	Obvladovanje	107
10	VIRI	117
11	SEZNAM SLIK	121
12	SEZNAM TABEL	123
13	STVARNO KAZALO	123

KNJIGI NA POT

Znanstvena monografija Cistotvorne ogorčice (Nematoda: Heteroderinae) Slovenije je prvo obširnejše domače delo o tej zanimivi, gospodarsko pomembni, a tudi strokovnjakom še premalo znani skupini rastlinskih zajedalcev. Mnogi predstavniki te skupine, ki so razširjeni na različnih območjih sveta, so imeli v preteklosti tudi na območju Slovenije precejšen pomen v pridelavi poljščin, vrtnin in krmnih rastlin; nekatere med njimi, takšna je na primer rumena krompirjeva ogorčica (*Globodera rostochiensis*), pa spadajo tudi danes med najbolj prepoznavne škodljive organizme gojenih rastlin v naši državi.

Avtorji monografije Gregor Urek, Saša Širca in Barbara Gerič Stare prihajajo s Kmetijskega inštituta Slovenije, z inštitucije, na kateri je deloval začetnik slovenske rastlinske nematologije, dr. Aleksander Hržič, kateremu je delo posvečeno. Bogato znanje, ki ga je dr. Hržič več desetletij prenašal na svoje mlajše sodelavce, zlasti na doc. dr. Gregorja Ureka, idejnega vodjo pričujoče publikacije, se kaže v veliki uporabnosti tega dela, pa čeprav ga odlikuje visoka strokovnost besedila. Izjemno nematološko znanje je dr. Urek pridobil tudi z rednim spremljanjem najrazličnejših informacij s področja nematologije (nenazadnje je dolgoletni predstavnik Slovenije pri EPP0 – evropski in sredozemski organizaciji za varstvo rastlin - za področje karantenskih ogorčic), z dolgoletnim sodelovanjem z vrhunskimi tujimi strokovnjaki s področja nematologije, bržčas največ pa z intenzivnim raziskovalnim in strokovnim ter mentorskim delom po zgledu svojega predhodnika. Rezultate vseskozi predstavlja na številnih domačih srečanjih, srečanjih v tujini, pa tudi dodiplomskim in podiplomskim študentom na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

V pričujoči publikaciji so v 9 poglavjih obravnavani razširjenost in gospodarski pomen cistotvornih ogorčic, natančno je predstavljena njihova morfologija, ki je podlaga za klasično taksonomijo, a je kot nadgradnja slednje v posebnem poglavju opisana molekularna taksonomija in filogenija, ki jo v okviru raziskovalnega dela preučujeta soavtorja tega dela. Razvojni krog ogorčic, ki je v živalskem svetu prav poseben, je opisan v samostojnem poglavju, predvsem za kmetijske strokovnjake pa bo verjetno še posebno

zanimivo poglavje, v katerem je predstavljena zgodovina pregledovanja obdelovalnih tal na zastopanost ogorčic. Celo poglavje avtorji namenjajo tudi vzorčenju cistotvornih ogorčic in pripravi njihovih preparatov, temu pa sledi vsebinsko bogato poglavje, v katerem je predstavljenih 10 vrst, ki so že bile ugotovljene pri nas.

Karantenskim krompirjevim ogorčicam so avtorji namenili celotno poglavje, kar je logično vsaj iz dveh razlogov; gre namreč za gospodarsko najpomembnejši vrsti cistotvornih ogorčic, pa tudi nematološka skupina iz Kmetijskega inštituta Slovenije ima z vrstami iz rodu *Globodera* bogate raziskovalne izkušnje, objave v uglednih mednarodno priznanih revijah in temu ustrezen velik ugled v svetu. Prav na primeru krompirjevih ogorčic bodo bralci še najboljše spoznali vso pestrost nematoloških dejavnosti na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

Po knjigi Ogorčice – nevidni zajedalci rastlin, ki sta jo avtorja Urek in Hržič napisala pred 11 leti, prihaja med nas novo nematološko delo. To predstavlja velik doprinos tudi za slovensko fitomedicinsko in zoološko stroko, vsebina nekaterih poglavij bo pomembno študijsko gradivo dodiplomskim in podiplomskim študentom na Biotehniški fakulteti, pa tudi ljubitelji živalskega in rastlinskega sveta bodo v njem našli obilo zanimivih informacij.

prof. dr. Stanislav Trdan in prof. dr. Lea Milevoj

**CISTOTVORNE OGORČICE
(NEMATODA: HETERODERINAE) SLOVENIJE**

1 RAZŠIRJENOST IN GOSPODARSKI POMEN

Cistotvorne ogorčice so precej velika skupina obligatnih rastlinskih endoparazitov, v kateri je trenutno okoli sto različnih vrst, ki pripadajo šestim rodovom poddružine Heteroderinae (Heteroderidae), in sicer: *Heterodera*, *Globodera*, *Cactodera*, *Punctodera*, *Dolichodera* in *Afenestrata*. Omenjene rodove oziroma posamezne vrste prištevamo k skupini izredno nevarnih rastlinskih parazitov, ki zajedajo številne kmetijske rastline.

Cistotvorne ogorčice so razširjene širom po svetu predvsem zaradi vse bolj razvitega trgovanja in prometa z rastlinskim materialom (transport napadenih pridelkov) in zaradi izvirnega življenjskega kroga. V času razvoja namreč samice okroglasto, hruskasto ali limonasto nabreknejo, kar je posledica razvoja gonad in nastajanja jajčec, ki ostanejo v telesu in so v novonastali tvorbi, cisti, sorazmerno dolgo zavarovana pred neugodnimi okoljskimi dejavniki.

Prva opisana cistotvorna ogorčica je bila pesna ogorčica *Heterodera schachtii*, katero je s korenin sladkorne pese iz okolice Magdeburga v Nemčiji leta 1859 izoliral botanik Schacht. Vrsto je nekoliko kasneje, leta 1871, opisal Schmidt in jo v čast najditelju poimenoval *H. schachtii*. Kmalu po odkritju in opisu pesne ogorčice so različni avtorji poročali o najdbah cist na koreninah različnih gostiteljskih rastlin, ječmenu, ovsu, grahu, detelji, krompirju itn. ter jih precej časa pripisovali vrsti *H. schachtii* oziroma jih obravnavali kot različne biološke rase imenovane vrste. Leta 1892 pa je Liebscher s korenin graha izoliral ciste, ki so se razlikovale od cist pesne ogorčice. Opisal je novo vrsto *H. göttingiana*. Njegova ugotovitev je sprožila vrsto novih spoznanj, na temelju katerih so bile opisane številne nove vrste cistotvornih ogorčic (cit. po Decker, 1969). Trenutno pripada samo rodu *Heterodera* okoli šestdeset različnih vrst, ki so razširjene v različnih pridelovalnih območjih sveta.

Vse številnejši novi zapisi in številna odkritja novih vrst cistotvornih ogorčic so okrepila spoznanja o škodljivosti in gospodarskem pomenu predstavnikov iz poddružine Heteroderinae, o katerih so poročali iz zelo različnih koncev sveta. Omenjena poročila so

vplivala in ovrgla do tedaj uveljavljeno mnenje, da so cistotvorne ogorčice razširjene v glavnem v hladnejših pridelovalnih območjih. Prvi opisi in preučevanja teh ogorčic so sicer res vezani v glavnem na zmerna območja Evrope in severne Amerike, kjer še vedno predstavljajo precejšnjo grožnjo kmetijskim rastlinam, so se pa skozi leta s pomočjo mednarodne trgovine razširile v vsa znana pridelovalna območja sveta. Tako je na primer pesna ogorčica danes navzoča na vseh pridelovalnih zemljiščih s sladkorno peso v Evropi, Rusiji, ZDA, Mehiki pa tudi Afriki, vključno s puščavskimi in tropskimi predeli. Za predstavnike rodu *Heterodera* lahko danes trdimo, da so razširjeni skoraj v vseh območjih sveta. Medtem ko so nekatere vrste vezane na manjše število gostiteljskih rastlin oziroma so omejene na ožja geografska območja (vrstama *H. sacchari* na sladkornem trsu in *H. oryzae* na bananah in rižu odgovarjajo vroče podnebne razmere, prav tako vrsti *H. zaeae*, ki je precej bolj agresivna v toplejših predelih Indije kot v zmernih razmerah Marylanda, ZDA; vrsta *H. amygdali*, parazit mandljev in nekaterih vrst rodu *Prunus*, pa je geografsko zelo omejena, trenutno je znana le na območju Tadžikistana), so druge, na primer *H. avenae*, *H. cruciferae*, *H. glycines* in *H. trifolii* skoraj kozmopolitne. Zanimiv je primer krompirjevih ogorčic, *Globodera rostochiensis* in *G. pallida*, vrst ki sta bili po mnenju številnih avtorjev v šestnajstem stoletju, skupaj s krompirjem, iz gorskih predelov južne Amerike naključno zaneseni v Evropo. S pridelavo oziroma trženjem krompirja so se nato razširile po vsej Evropi, od tam pa tudi v druga pridelovalna območja krompirja, v Azijo, Indijo, Afriko, Avstralijo, Novo Zelandijo, Filipine, v omejenem obsegu tudi v Kanado in ZDA.

Cistotvorne ogorčice lahko povzročijo tudi do 100 % izpad pridelka. Čeprav so posledice njihovega zajedanja rastlin očitne, je škoda oziroma stroške, ki nastanejo zaradi njihove navzočnosti v posameznih rastiščih, največkrat težko natančno ovrednotiti. Škoda je lahko posredna ali neposredna. Neposredna škoda se odraža predvsem v iznakaženem koreninju, gomoljih in koreninah, različnih nekrozah, klorozah, venenju in odmiranju celih rastlin. Posledica tega je manjši in manj kakovosten pridelek ter manjši finančni izkupiček. Mnogo bolj prikrita, včasih celo večja škoda pa lahko nastane zaradi hkratnega delovanja cistotvornih ogorčic in različnih drugih dejavnikov, med slednjimi so tudi patogene bakterije, glive in verjetno virusi. Škoda, ki jo povzročajo cistotvorne ogorčice je odvisna tudi od številnih abiotičnih dejavnikov (teksture tal, talne reakcije, založenosti

tal s hranili, vlage, suše in vročine) in se ob ustreznem ukrepanju lahko zmanjša, ob neukrepanju pa poveča.

SUMMARY

Distribution and economic importance

Cyst nematodes are obligate endoparasites that attack numerous higher plant species. A total of more than hundred species within six genera: Heterodera, Globodera, Cactodera, Punctodera, Dolichodera in Afenestrata (Heteroderidae) have been described from temperate, tropical and subtropical regions. The unique feature of the cyst forming nematodes is the ability to transform the cuticle of the female into a long lasting, hard brown shell which is highly resistant to environmental conditions. Numerous eggs produced by females in the course of the development are retained within the cysts where they are protected from unfavourable effects of the environment. Cyst nematodes (sugar beet nematode) were first discovered in 1859 by Schacht on the roots of sugar beet in the Magdeburg valley in Germany. The losses due to cyst nematodes are considerable and difficult to quantify. The losses are direct and indirect through interactions with other biotic factors. Infested plants are smaller, chlorotic and sometimes with browning of leaf margins. Roots may become deformed and many lateral rootlets develop continuously on them to compensate the infested system. Necrosis can develop on roots and plants can even die. The most economically important cyst forming nematodes are within the genera Heterodera and Globodera.

2 MORFOLOGIJA

2.1 Jajčeca

Jajčeca se nahajajo v jajčnih vrečkah, cistah, ki so pritrjene na koreninah, ali pa so prosto razkropljena v tleh. Jajčeca se med sabo razlikujejo po velikosti, obliki in razmerjih med njihovo dolžino in širino. Omenjene razlike niso izražene zgolj med jajčeci različnih vrst, temveč tudi med jajčeci ene in iste vrste. Dolžina jajčec in velikost ciste nista v sorazmerju (Müller, 1958, cit. po Decker, 1969).

Oblika jajčec je odvisna od načina zloženosti ličink v jajčnih ovojnicah. Na splošno so ličinke zvite štiri do petkrat, pri vrsti *H. leptonepia* pa celo sedemkrat. Posamezne vrste ni mogoče določiti na temelju oblike jajčec, ki je zaradi številnih okoljskih dejavnikov (ozmotski tlak, vlažnost) in samega notranjega razvoja ličink zelo raznolika.



Slika 1:

Drugostopenjska ličinka vrste *Heterodera galeopsidis* znotraj jajčnega ovoja (foto: Hržič)

Figure 1:

Second stage juvenile of *Heterodera galeopsidis* within the egg shell (photo: Hržič)

Velikost jajčec in razmerja med dolžinami in širinami imajo določen pomen pri razlikovanju posameznih vrst, toda številne vrste imajo podobno velika jajčeca. Glede velikosti obstajajo tudi podatki o obstoju tako imenovanih orjaških jajčec (Mulvey, 1959, cit. po Decker, 1969), vendar je potrebno poudariti, da je to izjemen pojav in predstavlja le neznaten delež jajčec v neki vrsti.

Časovno obdobje med oblikovanjem jajčeca in izvalitvijo ličinke je pri posameznih vrstah različno, vendar tega dejstva zaradi številnih okoljskih dejavnikov ni mogoče uporabiti pri določanju posameznih vrst.

2.2 Ličinke

Ličinke sekundarne razvojne stopnje (infektivna ličinka), ki se izločijo iz jajčnih ovojnic se lahko premikajo in so kot edini razvojni stadij sposobne napasti gostiteljske rastline. Ko zapustijo cisto, so dolge večinoma 0,4–0,6 mm, njihovo telo je črvasto, ogrodje glave sorazmerno dobro razvito in imajo oblikovano močno ustno bodalo (stilet). Kutikula ličink je navidezno obročasta. Preko njihovega telesa potekajo vzdolžno štiri (redkeje tri) lateralna polja, telesno votlino zapolnjujejo požiralniške žleze, rep je konusno zašiljen, hialini del repa je raznolik in ponavadi zavzema polovico repne dolžine. Pri posameznih vrstah je velikost opisanih ličink različna. Največje ličinke imata vrsti *H. avenae* in *Punctodera punctata* (0,5 mm), najmanjše pa vrsti *H. humuli* in *H. cruciferae* (0,45 mm). Ličinke sekundarne razvojne stopnje lahko s pridom uporabimo pri določanju vrst.

2.3 Samci

Za cistotvorne ogorčice je značilen izrazit spolni dimorfizem. Samci so tanki nitasti črvički s topo zaokroženim repom. Dolgi so od 1 do 1,5 mm. Kutikula je obročasta. Ogrodje glave imajo sorazmerno močno razvito. Bodalo (stilet) je precej robustno z izrazitimi, zaokroženimi bazalnimi grčami. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja manj kot eno tretjino dolžine bodala za bazalnimi grčami bodala. Metakorpus je opremljen z zaklopko in je ponavadi velik; postkorpus, v katerem so žleze, prekriva sprednji del srednjega črevesa. Reproductivni sistem samcev je preprost, spolna in analna odprtina se združujeta v kloako. Paritveni organ (spikula) leži skupaj z gubernakulumom blizu vrha repa, repnih kril ni. Samci se lahko premikajo.

2.4 Samice

Samice med razvojem zaradi oblikovanja gonad in nastajanja jajčec, ki ostanejo v telesu, okroglasto, hruškasto ali limonasto nabreknejo. So negibljive. Telo samic je vedno zaobljeno (vrečasto). Ornamentacija telesa samic je glede na vrsto raznolika. Ogrodje glave je pri samicah slabše razvito kot pri samcih. Ustna odprtina je na skrajnem sprednjem delu telesa, spolna odprtina pa je na terminalnem delu telesa, navadno na izboklini, pri rodu *Heterodera*. Samice so amfidelfične, z dvema prodelfičnima ovarijema. Brazdasta

maternica je sestavljena iz treh celičnih vrst. Analna odprtina leži subterminalno. Samice odlagajo jajčeca v želatinasti matriki ali pa jajčeca ostanejo v telesu samice – cisti.

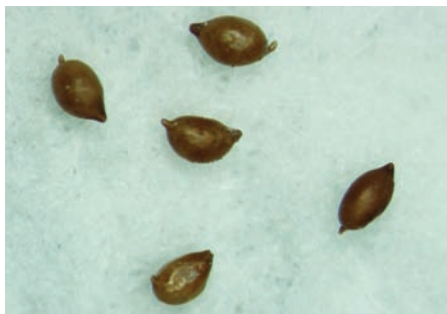
2.5 Ciste

Ciste so odmrle samice, pri katerih se kutikula spremeni v žilavo, rjavo, na številne zunanje dejavnike odporno tvorbo. V njih so jajčeca zavarovana pred neugodnimi dejavniki okolja.

2.5.1 Oblika, velikost, barva

Obstajajo tri oblike cist: okrogle, hruškaste in limonaste. Okroglo oblikovane ciste imajo samo eno izboklino (prominenco), in sicer na sprednjem, proksimalnem delu, ki predstavlja ostanek vratu samice. Manjše ciste so lahko zaradi skrajšanega razvoja ali kakšnega drugega vzroka bolj jajčaste oziroma hruškasto okrogle. Tipični predstavniki okroglih cist pripadajo rodu *Globodera* (*G. rostochiensis*, *G. pallida*). Ciste hruškastih oblik imajo podaljšano jajčasto obliko. Če ne upoštevamo vratu ciste, so le-te približno enainpolkrat tako dolge, kot so široke. Hruškasto oblikovane ciste pripadajo na primer vrsti *Punctodera punctata*. Najpogostejša oblika cist je limonasta in je značilna za predstavnike rodu *Heterodera*. Za limonasto oblikovane ciste sta značilni dve izboklini, in sicer proksimalna, ki predstavlja ostanke vratu samice in distalna, ki je oblikovana v vulvin stožec.

Velikost cist je različna. Ciste nekaterih vrst (skupina bulata: *H. avenae*, *H. schachtii*) so večinoma večje od drugih (skupina abulata: *H. carotae*, *H. cruciferae*, *H. göttingiana*). Upoštevati je potrebno dejstvo, da se tudi v skupini večjih cist (bulata) pojavljajo mnogo



Slika 2:
Ciste limonastih oblik (*Heterodera* spp.)

Figure 2:
Lemon shaped cysts (*Heterodera* spp.)

manjše, zaradi česar lahko sklenemo, da je določanje posameznih vrst na temelju velikosti cist skoraj nemogoče. Pri istih vrstah lahko obstajajo makro- in mikrociste.

Barva cist je različna glede na vrsto in glede na razvojni stadij posamezne vrste. Nekatere ciste, na primer *H. galeopsidis*, spreminjajo barvo od bele preko rumene do rjave. Posamezni barvni odtenki so posledica določenih sprememb v ovojnici, včasih pa na spremembo barve vpliva tudi barva same vsebine cist. Med posameznimi vrstami obravnavane skupine ogorčic obstaja v barvi velika variabilnost, zaradi česar je uporaba barvnih odtenkov za diagnosticiranje zelo tvegana in zahteva veliko izkušenj (Hijner, Oostenbrink in Den Ouden, 1953, cit. po Decker, 1969).

2.5.2 Ovojnica s pripadajočimi tvorbami

Ovojnica ciste ima različno debelino in prosojnost. Sestavljena je iz dveh različnih plasti, ekso- in endokutikule, vsaka od teh plasti pa je še nadalje razslojena na bolj ali manj različne podplasti. Celotno število teh podplasti je pri posameznih vrstah različno. Na tem področju je bilo sicer opravljenih manj raziskav, vendar je kljub vsemu jasno, da ima debelina in prosojnost ovojnice določeno diagnostično vrednost.

Ovojnico cist lahko opazujemo že pri 20- do 40-kratni povečavi. Nekatere ciste imajo temno, motno (*H. humuli*, *H. carotae*), druge pa gladko, bleščečo povrhnjico (zlasti nove ciste *H. göttingiana*). Starejše ciste postopoma izgublajo lesk, zaradi česar je identifikacija cist na temelju vrednotenja ovojnice glede sposobnosti odbijanja svetlobe omejeno uporabna.

Površje ovojnice je različno ornamentirano. Glede na obliko vzorca povrhnjice razlikujemo dva osnovna tipa ornamentacije: mrežasti in točkasti tip. Vrste z mrežasto okrašeno povrhnjico uvrščamo v tri skupine ogorčic (Taylor, 1957, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991):

- skupina *schachtii* (na srednjem delu ciste so značilne kratke, nepravilno razvrščene cik-cak črtice, v bližini vratu in spolne odprtine pa potekajo črte bolj vzporedno ali valovito);
- skupina *cacti* (značilen vzorec predstavljajo vzporedne črte, ki potekajo transverzalno okoli ciste, včasih pa so te črte prekinjene s kratkimi vertikalnimi ali poševnimi črtami);

- skupina *rostochiensis* (v bližini spolne odprtine potekajo valovite, na sredini kratko ukrivljene in na sprednjem delu ciste vertikalne črte).

Točkasti tip povrhnjice predstavlja punktirano ovojnico in točkaste tvorbe, ki jih opazimo na povrhnjici, različno imenujemo: jamice, luknje, fibrile, tuberkuli, mehurčki, pike. Omenjene tvorbe so pri posameznih vrstah glede na površino in globino različno oblikovane.

Pri nekaterih vrstah je ovojnica cist prekrita s subkristalino plastjo, z belo skorjasto snovjo različne debeline. Omenjena plast je pri nekaterih novih cistah (*H. cacti*) v obliki kratkotrajnega belega "cveta" (oprha), lahko pa oblikuje goste, razpokane kredaste plasti (*H. avenae*). Mnenja o nastanku subkristaline plasti so različna. Oblikovala naj bi jo eksokutikula (pri *H. cruciferae*) ali pa ovojnica ciste skozi drobne tuberkule. Kemični sestav subkristaline plasti posameznih vrst še ni popolnoma preučen. Subkristalina plast naj bi ciste varovala pred različnimi roparskimi organizmi.

Med zanimivejše tvorbe cistotvornih ogorčic spada tudi jajčna vrečka. Mlajše ciste, predvsem tiste, ki so še pritrjene na koreninje, so polne jajčec, ki se nahajajo v sluzasti gmoti. Ko pride vsebina cist v stik z vodo, nabrekne njihova notranjost zaradi naraslega turgorja, ki pri nekaterih vrstah iztisne jajčeca iz ciste v sluzasto jajčno vrečko – želatinasti matriks. Jajčna vrečka je iz snovi, ki je po konsistenci podobna žolci in se nahaja na vulvinem stožcu razvijajočih cist. Velikost jajčnih vrečk niha sorazmerno z velikostjo cist in pri nekaterih vrstah pokriva celotni zadnji del ciste, pri drugih pa je majhna ali je sploh ni.

Jajčne vrečke oblikujejo predvidoma vse vrste rodu *Heterodera*, tudi tiste, za katere so bili vrsto let prepričani, da so brez njih (*G. rostochiensis*). Izvor in način nastanka jajčne vrečke ni pri nobeni vrsti obravnavanega rodu zadostno preučen, zaradi česar obstajajo različna tolmačenja njenega nastanka, ki temeljijo na raziskavah sorodnih ogorčic (*Meloidogyne*, *Tylenchulus*, *Trophonema*, *Rotylenchulus* itn.). Jajčna vrečka nastane kmalu za tem, ko samica zaradi nabrekanja pretrga koreninsko skorjo, in kmalu po tem, ko je oplojena. Oploditev ni nujno potrebna za oblikovanje jajčne vrečke, ki jo lahko najdemo tudi pri partenogenetskih vrstah cistotvornih ogorčic (*H. trifolii*). Ciste, ki so odpadle s koreninja in se nahajajo v tleh, so brez jajčnih vrečk.

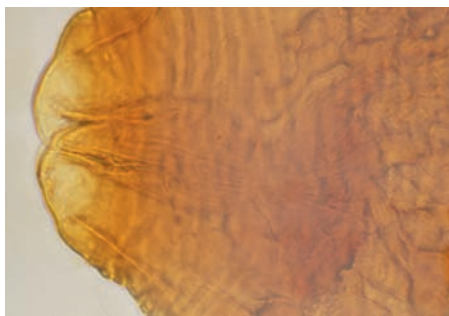
2.5.3 Anatomija vulvinega stožca (kalote)

2.5.3.1 Zunanja anatomska znamenja

Oblika in barva cist v nekaterih primerih predstavljata pomemben diagnostični element. Ko naletimo na primer na cisto z zaokroženim distalnim delom, bleščečo povrhnjico rdeče rjave barve ali kakšnim drugim barvnim odtenkom (rumenorjava, motna povrhnjica), tedaj lahko sklepamo, da gre za predstavnika rodu *Globodera*. Če naletimo na ciste limonastih oblik, na katere smo pri kontrolnih pregledih večinoma naleteli, pa lahko ugotovimo, da gre za predstavnika iz rodu *Heterodera*. Pri določanju posameznih vrst te skupine pa lahko kaj hitro naletimo na težave.

Določitev posamezne vrste zadnje omenjenega rodu lahko opravimo s pomočjo testnih gostiteljskih rastlin, vendar je potrebno poudariti, da so tovrstna določanja zamudna in predvsem nepraktična. Zaradi tega so bili uvedeni postopki diagnosticiranja s pomočjo vrednotenja morfoloških značilnosti cist.

Pomembno vlogo pri tovrstnih vrednotenjih ima zlasti struktura vulvinega stožca (vulvine kalote). Dolžina vulvine špranje, tip fenestracije, navzočnost ali nenavzočnost bul, ostanki vagine, most in podmost so pomembni znaki, ki jih lahko z določenim zaupanjem uporabljamo pri določanju posameznih vrst cist ali vsaj pri uvrščanju cist v skupine.



Slika 3:

Vulvin stožec zebrotave ogorčice (*Heterodera galeopsidis*)

Figure 3:

Vulval cone of *Heterodera galeopsidis*

Morfometrijska preučevanja so pokazala koristnost uporabe nekaterih vrednosti in razmerij omenjenih anatomskih tvorb. Pri določanju posameznih vrst lahko uporabimo razmerje med dolžino in širino fenester (Goffart, 1960, cit. po Decker, 1969). Ogorčici *H. schachtii* in *H. trifolii* imata različno globino podmosta in različne dolžine fenester

(Oostenbrink in Den Ouden, 1954, cit. po Golden, 1986). Značilno je razmerje med razdaljo spolne in analne odprtine in premerom spolne odprtine (Granek, 1955, cit. po Golden, 1986). S pomočjo zadnje omenjenega, Granekovega razmerja, lahko razlikujemo nekatere »cirkumfenestralne« ciste (npr. pri vrstah *G. rostochiensis* in *G. tabacum*).

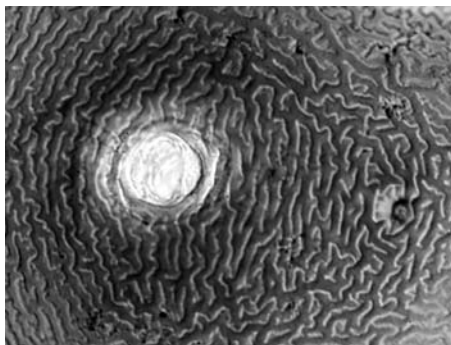
Nadaljnja morfometrijska preučevanja vulvinih stožcev in njihovih oblik so utemeljila enostavnejše metode določanja cist, ki se jih do takrat ni dalo z gotovostjo opredeliti. Omenjeno dejstvo se je zrcalilo v delih De Grisseja in Gillarda (1963, cit. po Decker, 1969), iz katerih je bilo razvidno, da velikost fenestre in velikost ciste pri ogorčici *H. humuli* nista v korelaciji. Mulvey je leta 1958 opozoril na razmerje med dolžino fenestre in prostornino ciste *H. trifolii* (cit. po Decker, 1969). Leta 1955 je bilo v delu Cooperja zapisano, da imajo relativna razmerja semifenester, anusa, velikosti vulvinega mostu in špranje določeno vrednost neodvisno od velikosti cist (cit. po Decker, 1969). Znamenja, ki so v diagnostiki cistotvornih ogorčic že dolgo znana, na primer tvorba jajčne vrečke in subkristalina plast, so pri cistah limonastih oblik enakovredna znamenjem strukture površja cist, dolžini ličink in velikosti jajčec.

Struktura vulvinega stožca ima poseben pomen pri določanju posameznih vrst cist (Oostenbrink in Den Ouden, 1954; Cooper, 1955; Hesling, 1959; Goffart, 1960, cit. po Golden, 1986). Spolno odprtino, ki leži na distalnem delu ciste predstavlja špranja, ki se nahaja med dvema ustnoma (labialnima oporama). Ta del se imenuje vulvin most. Na obeh straneh vulvinega mostu je prosojno površje – polokni (semifenestri). Pri mladih cistah so robovi semifenester nerazločni, medtem ko so pri starejših cistah ostro omejeni. Obe semifenestri skupaj oblikujeta tako imenovano fenestro. Pri vrstah, ki nimajo razvitega vulvinega mostu, je fenestra oblikovana kot enovita površina.

Po zgradbi fenestre razlikujemo dva glavna tipa:

- *cirkumfenestralni tip, ki nima vulvinega mostu in pri katerem ima spolna odprtina sprva vretenasto obliko. S staranjem samic se končno izoblikuje v okroglo odprtino. Ta tip imajo vrste iz rodov Globodera in Punctodera;*
- *semifenestralni tip, katerega ima izoblikovanega večina vrst iz rodu Heterodera. Vulvin most deli fenestro na dve bolj ali manj simetrični*

polovici. Vulvin most obstaja tudi pri večini starih cist, pri vrsti H. carotae pa pogosto propade.



Slika 4:

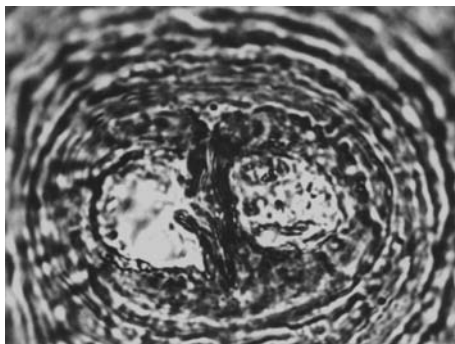
Cirkumfenestralni tip fenestre krompirjeve ogorčice (*G. rostochiensis*)

Figure 4:

Circumfenestral type of fenestrae of *Globodera rostochiensis*

Semifenestralni tip delimo na dva podtipa:

- *bifenestralni tip, pri katerem deli fenestro širok vulvin most, ki je sicer ožji kot širina fenestre, v dve semifenestri, kateri sta videti kot dva ločena dela. Na splošno je fenestra komaj dvakrat tako dolga, kot je široka. Bifenestralni tip je značilen za vrste H. avenae, H. humuli in H. fici.*



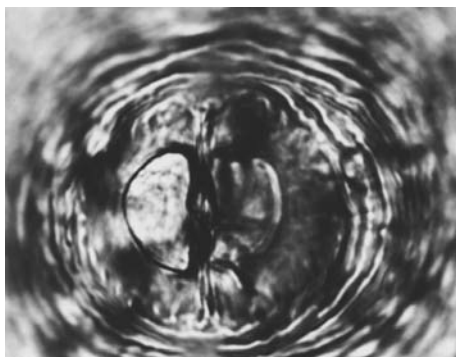
Slika 5:

Bifenestralni tip fenestre hmeljeve ogorčice (*Heterodera humuli*) (foto: Hržič)

Figure 5:

Bifenestral type of fenestrae of *Heterodera humuli* (photo: Hržič)

- *ambifenestralni tip, pri katerem je most, ki deli fenestro, slabše razvit, tako da imata semifenestri videz dveh ločenih delov. Fenestra je lahko malo daljša od širine. Ambifenestralni tip je značilen za vrste H. schachtii, H. trifolii, H. galeopsidis, H. carotae, H. göttingiana.*

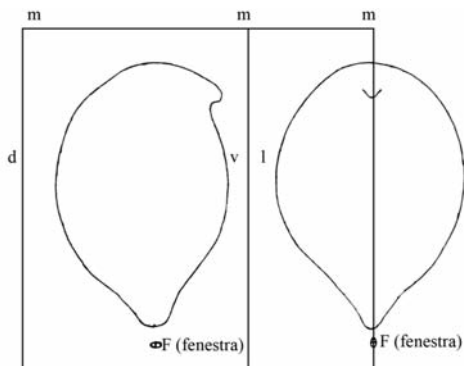


Slika 6:
Ambifenestralni tip fenestre zebrotave ogorčice
(*Heterodera galeopsidis*) (foto: Hržič)

Figure 6:
Ambifenestral type of fenestrae of *Heterodera*
galeopsidis (photo: Hržič)

Hržič (1980) je ugotovil, da imajo posamezne ciste oziroma odmrle samice v mlajših razvojnih stadijih, podobno kot ostale nitaste ogorčice, značilno obliko in značilna razmerja med posameznimi telesnimi deli. Sklepal je, da obstaja na posameznih cistah vsaj eno območje, ki ohrani obliko in je vrstno značilna dedna lastnost. Ugotovil je, da so posamezne preučevane vrste cistotvornih ogorčic po odmrtnju oziroma oblikovanju cist ohranile značilno obliko samo na distalnem delu oziroma na vulvinem stožcu. Na temelju preučevanja cist limonastih oblik (rod *Heterodera*) je prišel do spoznanja, da je potrebno posamezno cisto, predvsem njen distalni del oziroma vulvin stožec (kaloto) prostorsko opredeliti, s čimer je bilo postavljeno izhodišče za morfološko analizo cist na temelju njihovega distalnega dela. Cisto lahko opazujemo z dveh različnih projekcij. Opazujemo jo lahko iz dorzoventralne projekcije – dv projekcija, kjer je bolj izbočen hrbet (dorsum – D) in njemu nasproten, manj izbočen trebuh ciste (ventrum - V). Če obrnemo cisto za 90° jo lahko opazujemo iz bilateralne projekcije - II projekcija (slika 7). V dorzoventralni projekciji ležijo proksimalno-distalna kontura hrbta, trebuha in obe prominenci v mediani ravnini. Mediana ravnina (m) se v bilateralni projekciji kaže kot simetrala, ki deli cisto na dve simetrični, lateralni polovici. Tako predstavljena cista je v dv projekciji asimetrična, v II projekciji pa bolj ali manj simetrična. Na temelju povedanega lahko sklenemo, da je cista lahko simetrična le takrat, ko mediana ravnina deli glavo, trebuh, hrbet in vulvin stožec (kaloto) ciste v dve simetrični, lateralni polovici. Mediana ravnina v takem primeru seka vulvin most pod pravim kotom in deli fenestro v dve stranski polovici. Ciste, ki ustrezajo gornjemu opisu uvrščamo v tako imenovane simetrično oblikovane ciste, ki pa so dejansko sorazmerno redke, saj je bila ugotovljena zgolj 33 %

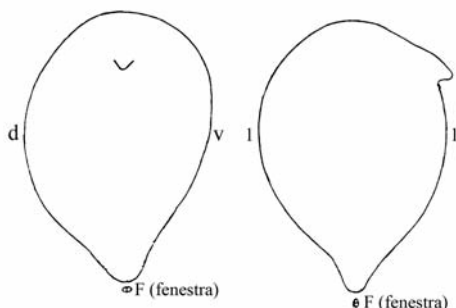
zastopanost tovrstnih cist (Hržič, 1980; Hržič, 1985). Večino cist prištevamo med asimetrično oblikovane.



Slika 7:
Dorzoventralna (levo) in bilateralna (desno) projekcija ciste (Hržič)

Figure 7:
Dorsoventral (left) and bilateral (right) cyst projection (after Hržič)

Asimetrične ciste (slika 8) nastajajo predvsem zaradi torzije v ekvatorialnem delu ciste, ki nastaja zaradi okoljskih dejavnikov v razvojni dobi ciste. Pri asimetričnih cistah lahko ležita glava in vulvin stožec v isti ravnini, mediane ravnine, ki bi delila cisto v dve simetrični polovici pa ne moremo postaviti.



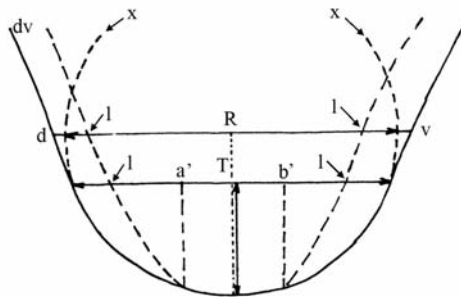
Slika 8:
Asimetrična oblika ciste (Hržič)

Figure 8:
Asymmetrical cyst (after Hržič)

Hržič (1980) je cisto razdelil tudi na proksimalni, ekvatorialni (srednji) in distalni del tako, da je polovico ventralne dolžine (konture) nanese na proksimalni in distalni del dorzalne črte (konture). V ekvatorialnem delu ciste nastopa pod vplivom okoljskih dejavnikov večja ali manjša torzija zaradi nasprotnega sukanja ekstremov ciste okoli dolžinske osi. Zaradi delovanja številnih dejavnikov prihaja do morfološke variabilnosti cist, ki se odraža v prej opisanih predelih ciste, zlasti pa je izrazita v obliki in položaju proksimalne promi-

nence. V nasprotju s proksimalno prominenco ima predvsem vrhnji del distalne prominence značilno obliko posamezne vrste rodu *Heterodera*, iz česar lahko sklenemo, da vplivajo na značilnosti vrhnjega dela distalne prominence predvsem dedne lastnosti ogorčic in manj okoljski dejavniki. Hržič (1980) je trdil, da plodnost samic iz rodu *Heterodera* ni vedno enaka, zaradi česar vsebujejo ciste več ali manj jajčec, kar vpliva na morfološke značilnosti posamezne ciste kot celote, a le neznatno na obliko vrhnjega dela distalnega dela ciste – kalote ali vulvinega stožca.

Na distalnem delu ciste (sliki 7 in 8) ločimo osnovni del in distalno prominenco (vulvina kalota), v katere vrhnjem delu se nahajajo spolni organi s tvorbami, ki so po anatomski zgradbi značilne za posamezne vrste rodu *Heterodera*.



Slika 9:
Vulvina kalota (vulvin stožec). Dorzoventralna in bilateralna projekcija (Hržič)

Figure 9:
Vulval cone. Dorsoventral and bilateral vulval cone projection (after Hržič)

Leta 1980 se je Hržič posvetil študiju vulvine kalote. Ugotovil je, da je kontura vulvine kalote pri dorzoventralnem oziroma bilateralnem položaju pravzaprav projekcija kalote na ravni preseka kalote in mediane oziroma sagitalne ravnine. Njen distalni del omejuje lok in premer vrisane krožnice. V dv projekcijo kalote je mogoče vrisati največjo možno krožnico (slika 9). Tangencialni lok krožnice (x) poteka v loku vulvine kalote ali pa premosti top (odsekan) vrh kalote. Določitev točk, v katerih se ločita krožnica in lok vulvine kalote je po Hržičevem mnenju izredno pomembna za točnost dimenzij dolžine (T) in višine (V) tetive. Višina tetive predstavlja razdaljo med najbolj distalno točko kalote in se vedno ne ujema z geometrijsko razdaljo: lok krožnice – tetiva. V krožnico je mogoče vrisati tudi s tetivo vzporeden premer krožnice. Podaljšan premer dv projekcije kalote do črte kalote imenujemo dorzoventralna (dv) črta. Bilateralni črti na ravni polmera in višine (V) omejuje bilateralna projekcija kalote (ll). Na temelju opisanih značilnosti vulvine kalote je Hržič

(1980) opredelil parametre, ki se medsebojno ne prekrivajo in lahko kot taki služijo za določanje pripadnosti posameznih vrst rodu *Heterodera* skupini bulata ali abulata: $V/d3$ ($d3$ = razlika med polmerom krožnice in razdaljo distalne točke kalote in tetive), T/V , R/V in dv/V . Prav tako je opredelil tudi parametre, ki omogočajo medsebojno ločevanje posameznih, v Sloveniji navzočih vrst, znotraj skupin bulata oziroma abulata. Za medsebojno ločevanje posameznih vrst ogorčic znotraj skupine bulata je Hrzič (1980) opredelil kot uporabne parametre $dv/II(r)$, $V/T-II(V)$ in $Ta'b'$, znotraj skupine abulata pa le $Ta'b'$. Na temelju tovrstnih ugotovitev je izdelal tudi ključ za parametralno določanje v Sloveniji navzočih limonasto oblikovanih cistotvornih ogorčic.

Ključ za parametralno določanje v Sloveniji navzočih limonasto oblikovanih cistotvornih ogorčic (Hrzič, 1980)

1	Vrednost parametra dv/V je manjša ali enaka 4,4 (bulata), II projekcija kalote je koničasta	2
	Vrednost parametra dv/V je večja od 4,5 (abulata), II projekcija kalote ima obojestransko konkaviteto	4
2	Vrednost parametra $dv/II(r)$ je enaka 1, $T/ab = 2,3$	<i>H. galeopsidis</i>
	Vrednost parametra $dv/II(r)$ je večja od 1	3
3	Parameter $V/T-II(V)$ je 1,5 – 4,3, $T/ab = 4,5$	<i>H. trifolii</i>
	Parameter $V/T-II(V)$ je 4,5 – 45, $T/ab = 1,5$	<i>H. schachtii</i>
4	II projekcija kalote seka distalni del dv projekcije kalote v dveh točkah	<i>H. göttingiana</i>
	dv in II projekcija kalote imata skupen lok	5
5	Parameter T/ab je 1 – 2,4	<i>H. cruciferae</i>
	Parameter T/ab je 4 – 10	<i>H. humuli</i>

Poleg parametralnega vrednotenja cistotvornih ogorčic je Hrzič (1980) opredelil tudi morfološke tipe kalot šestih različnih vrst cist, ki služijo kot dodatni element za njihovo identifikacijo. Kalote posameznih vrst je namreč prikazal kot projekcije obrisov (kontur) kalot

na mediano (dv projekcija) in sagitalno (II projekcija) ravnino (projekcije so prikazane v sklopu opisov posameznih vrst).

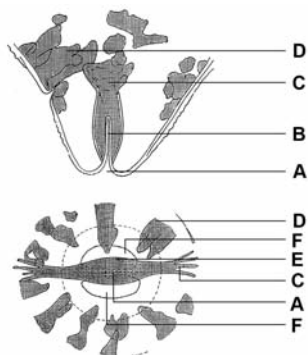
2.5.3.2 Notranja anatomska znamenja

Pri določanju cist limonastih oblik moramo upoštevati tudi samo zgradbo vulvine kalote. Poseben pomen imajo endokutikularne odebelitve kepastih oblik, ki jih imenujemo bule (Cooper, 1955, cit. po Decker, 1969). Nekateri avtorji (Franklin, 1939; Hirschmann, 1956) so bule poimenovali kot trde rjave izrastke, ki naj bi bili pritrjevališča določenih mišic (cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Drugi so prištevali te tvorbe k organom posebnih struktur, ki naj bi izločali želatino podobno snov jajčnih vrečk (Thorne, 1961). Ker pa so jajčne vrečke našli tudi pri cistah, ki nimajo bul (*G. rostochiensis*, Hesling, 1965), je zadnja domneva manj utemeljena (cit. po Decker, 1969).

Zastopnost bul ter njihova oblika in velikost so značilne za posamezne vrste. Bule so razporejene posamično ali v skupinah. Vrsta *H. avenae* ima na primer zelo velike bule, ki so gosto nakopičene takoj pod spolno odprtino. Pri nekaterih vrstah bule manjkajo ali pa so slabo razvite. Glede na bule lahko cistotvorne ogorčice razdelimo v dve skupini:

- bulata – identična je s skupino schachtii;
- abulata – identična je s skupinama göttingiana in cacti.

V vulvinem stožcu cist nekaterih vrst cistotvornih ogorčic lahko opazimo tudi ostanke vagine. Le-ta je na dorzoventralni strani sploščena in tu opazimo številne brazde in gube,



Slika 10:

Shematski prikaz notranjosti vulvinega stožca (Hržič) (A) vulva, (B) vagina, (C) podmost, (D) bula, (E) most, (F) semifenestra

Figure 10:

Vulval cone (diagrammatic) (after Hržič) (A) vulva, (B) vagina, (C) underbridge, (D) bullae, (E) bridge, (F) semifenestrae

ki dajejo vagini progast videz. Tako tvorbo imenujemo snopast organ. Ciste, ki imajo snopast organ, imajo bule na ravni podmostu. Ciste brez snopastega organa pa imajo grozdasto razporejene bule neposredno pod fenestro.

Vagina je z lateralne strani ozka in neprosojna. Na tej strani ni razločne progavosti. Na proksimalni strani se vagina razširi v tako imenovani cerviks (Thorne, 1961), ki je povezan s steno ciste z dvema podaljškoma, ki prečkata vulvin stožec. Podaljška sta vzporedno nameščena pod vulvinim mostom. Povezavo cerviksa s steno ciste imenujemo podmost, katerega konca se pogosto razločno vežeta na steno ciste. Ta povezava je lahko odebeljena (bula), cepljena, necepljena, ploščata ali pa razvejana. Podmost naj bi bila tvorba, sestavljena iz otrdelih mišičnih vlaken, ki podpirajo vagino v njeni legi. Skupaj z drugim tkivom preprečuje vdor jajčec v vulvino kaloto. Ciste brez podmostu imajo okroglo ali hruškasto obliko, ciste s podmostom pa so limonaste.

V vulvinem stožcu lahko opazimo še eno, mostu podobno tvorbo, ki jo je leta 1959 prvič opisal Mulvey, po katerem jo danes imenujemo Mulveyev most (cit. po Golden, 1986). Le-tega najdemo pri mlajših, rjavih cistah vrste *H. trifolii* in se nahaja neposredno pod fenestro. Je pravokotno postavljen na most. Pri starejših cistah omenjena tvorba izgine.

Za taksonomsko razvrščanje in klasifikacijo cistotvornih ogorčic sta najpomembnejša razvojna stadija cista in drugostopenjska ličinka.

SUMMARY

Morphology

The cyst nematodes are sexually dimorphic species. Adult males and second stage juveniles are vermiform and motile, whereas adult females are swollen and sedentary. Second stage juveniles are relatively robust, characterized with relatively strong stylet and hyaline terminal region. Males are slightly longer than 1 mm, vermiform, with stout stylet with well-formed knobs. Females (cysts) have a narrow anterior proturbance and swollen body, but they differ in details of shape, above all in the presence or absence of a terminal cone. Globodera females are globose, with no cone, while female of the genus Heterodera have distinct terminal cone and are lemon-shaped. Since the cyst is the life stage most readily available from the soil, taxonomic characters are primarily related to the cyst. Therefore the characters of cysts such as colour, wall cuticle and the area surrounding the vulva are described more precisely in this chapter. Regarding vulva and surrounding tissue, two basic patterns of fenestrae exist: with two openings - semifenestrate

(bifenestral and ambifenestral type) and circumfenestrate, with a single opening which delete the vulva and surrounding tissue.

According to Hržič, the terminal cone region of the genus Heterodera is morphologically the most stable and therefore very useful cyst character for species identification. Six Heterodera species discovered in Slovenia were studied and characterized more precisely. Symmetrical and asymmetrical cysts as well as their dorsoventral and bilateral projection, defined by Hržič are discussed. Based on the characteristics and differences of the dorsoventral and bilateral vulval cone projection, calculated parameters as well as cone models were included in the dichotomous key (Hržič, 1980) for differentiating Heterodera species which were found in Slovenia: H. galeopsidis, H. trifolii, H. schachtii, H. humuli, H. göttingiana and H. cruciferae.

3 TAKSONOMSKA UVRSTITEV CISTOTVORNIH OGORČIC

Ogorčice spadajo med najštevilnejše in najbolj razširjene živalske organizme. Uvrščamo jih v posebno deblo Nemata (Nematoda), ki ima dva razreda: Adenophorea in Secernentea. So skupina več tisoč vrst glistic, za katere je značilno valjasto, iztegnjeno, z dokaj debelo povrhnjico pokrito telo, pri katerem ne zasledimo členjenosti. Povrhnjica je ponavadi gladka ali drobno razbrazdana, pri nekaterih vrstah pa so na njej različne odebelitve v obliki bodic, zobcev ali ploščic. Telo nekaterih vrst je lahko vretenasto, hruškasto, limonasto ali kako drugače vrečasto oblikovano (npr. Heteroderidae).

Heteroderidae: Medtem ko so ličinke in samci črvasti, je telo samic vedno zaobljeno (vrečasto). Ogrodje glave je predvsem pri ličinkah in samcih dobro razvito. Metakorpus je opremljen z zaklopko in je ponavadi velik; postkorpus, v katerem so žleze, prekriva sprednji del srednjega črevesa. Kutikula ličink in samcev je obročasta, ornamentacija telesa samic je glede na vrsto raznolika. Samice so zaobljene, amfidelnične, z dvema podelfičnima ovarijema. Brazdasta maternica je sestavljena iz treh celičnih vrst. Samice odlagajo jajčeca v jajčno vrečko, pri nekaterih vrstah pa jajčeca ostanejo v telesu samice – cisti (cistotvorne ogorčice). Samci nimajo repnih kril, odprtina kloake je blizu vrha repa (izjema: rod *Bursadera*). Vrste te družine so sedentorni, obligatni paraziti koreninja; včasih povzročajo oblikovanje bradavičastih novotvorb.

Deblo:	Nemata (Nematoda)
Razred:	Secernentea
Podrazred:	Diplogasteria
Red:	Tylenchida
Podred:	Tylenchina
Naddružina:	Tylenchoidea
Družina:	Heteroderidae (Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941)
Poddružina:	Heteroderinae
Rodovi:	<i>Heterodera</i> * Schmidt, 1871

*Globodera** Skarbilovich, 1959
*Punctodera** Mulvey & Stone, 1976
Afenestrata Baldwin & Bell, 1985
Cactodera Krall & Krall, 1978
Dolichodera Mulvey & Ebsary, 1980

*Rodovi, v katerih so uvrščene gospodarsko najpomembnejše vrste cistotvornih ogorčic.

Poleg naštetih cistotvornih ogorčic uvrščamo v poddružino Heteroderinae še celo kopico rodov, katerih predstavniki tekom svojega razvoja ne oblikujejo cist. Ti rodovi so naslednji:

Atalodera Wouts & Sher, 1971
Bellodera Wouts, 1985
Bilobodera Sharma & Siddiqi, 1992
Brevicephalodera Kaushal & Swarup, 1989
Camelodera Krall, Shagalina & Ivanova, 1988
Cryphodera Colbran, 1966
Ekphymatodera Baldwin, Bernard & Mundo, 1989
Hylonema Luc, Taylor & Cadet, 1978
Meloidodera Chitwood, Hannon & Esser, 1956
Rhizonema Cic Del Prado Vera, Lownsberry & Maggenti, 1983
Sarisodera Wouts & Sher, 1971
Thecavermiculatus Robbins, 1978
Verutus Esser, 1981

SUMMARY

Taxonomy

Nematodes are bilaterally symmetrical, elongated, cylindrical, unsegmented wormlike organisms that prefer moisture. The body is covered with cuticle which is secreted by the underlying hypodermis. The females of a few genera do not have the typical vermiform shape; their body may be more or less swollen. The nematodes are classified in the separate phylum Nemata (=Nematoda) with two classes: Adenophorea and Secernentea.

Cyst nematodes belong to the family Hetroderidae (subfamily Heteroderinae) within the order Tylenchida (Secernentea). More than hundred species within six genera Heterodera, Globodera, Cactodera, Punctodera, Dolichodera in Afenestrata have been described until now.

4 MOLEKULARNA TAKSONOMIJA IN FILOGENIJA

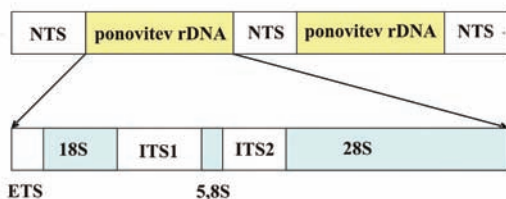
Molekularna taksonomija (poimenovanje, identifikacija in katalogizacija organizmov) in molekularna filogenija (določanje sorodnostnih razmerij med organizmi, določanje skupnega izvora oziroma skupnega prednika) temeljita na genomskih informacijah. Za reševanje taksonomskih in filogenetskih vprašanj o organizmih lahko uporabimo različne genomske podatke, najpogosteje podatke o zaporedju in strukturi DNA, RNA in proteinskih molekul, lahko pa tudi podatke o prisotnosti, odsotnosti ali razporeditvi določenih genov (Subbotin in Moens, 2006).

Po nekaterih ocenah so molekularne informacije ustrežnejše za filogenetske študije kot morfološke značilnosti, saj so DNA in proteinska zaporedja dedne identitete, medtem ko so morfološke značilnosti nekega organizma odvisne tudi od številnih okoljskih dejavnikov. Razlaga molekularnih znakov (npr. homologija zaporedij) je bolj enostavna kot vrednotenje morfoloških znamenj. Molekularne lastnosti se na splošno razvijajo enakomerneje kot morfološka znamenja in lahko zato nudijo jasnejšo sliko medsebojnih odnosov določenih skupin organizmov. Molekularni znaki so številčnejši kot morfološki ter jih lahko preučimo v sorazmerno kratkem času. Za molekularne analize potrebujemo izredno malo materiala, dovolj je lahko že del posameznega osebk. Tudi različno shranjeni, deformirani in delno degradirani vzorci se pogosto lahko uporabijo v molekularnih študijah. DNA ogorčic lahko z uporabo vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov pomnožimo tudi neposredno iz ekstraktov tal ali rastlin.

Po drugi strani pa se moramo zavedati, da filogenetsko drevo na osnovi določene molekule ne odraža nujno dejanskega poteka evolucije oziroma pravih sorodstvenih razmerij. Preučevano molekulo je potrebno izbrati previdno glede na lastnosti spreminjanja v evoluciji živih organizmov. Kljub temu je uporaba molekularnih tehnik razrešila številna vprašanja taksonomije in filogenije ogorčic.

Za reševanje taksonomskih in filogenetskih vprašanj se je kot zelo primeren molekularni označevalec izkazal predel genoma, imenovan ribosomalna DNA (rDNA). rDNA nosi zapis za ribosomalne RNA (rRNA) in vmesna nekodirajoča zaporedja, v genomu pa jo najdemo

v velikem številu zaporednih ponovitev (slika 11). Evolucija rDNA regije je mozaična. Medtem, ko se kodirajoči predeli za 18S, 5,8S in 28S rRNA razvijajo sorazmerno počasi, se vmesna nekodirajoča zaporedja (ITS, ETS, NTS) razvijajo bistveno hitreje (slika 11). Počasi razvijajoči geni so primerni za analizo odnosov med višjimi taksonomskimi nivoji (slika 12), medtem ko so ribosomalni vmesniki primerni za analize na ravni družine, rodu in posamezne vrste (slika 13). Evolucijska razmerja med vrstami ali drugimi taksonomskimi nivoji lahko grafično prikažemo s filogenetskim drevesom. V filogenetskem drevesu vsak vozle predstavlja zadnjega skupnega prednika, dolžina vej pa lahko predstavlja ocenjen čas divergence oziroma ločene evolucije.



Slika 11:

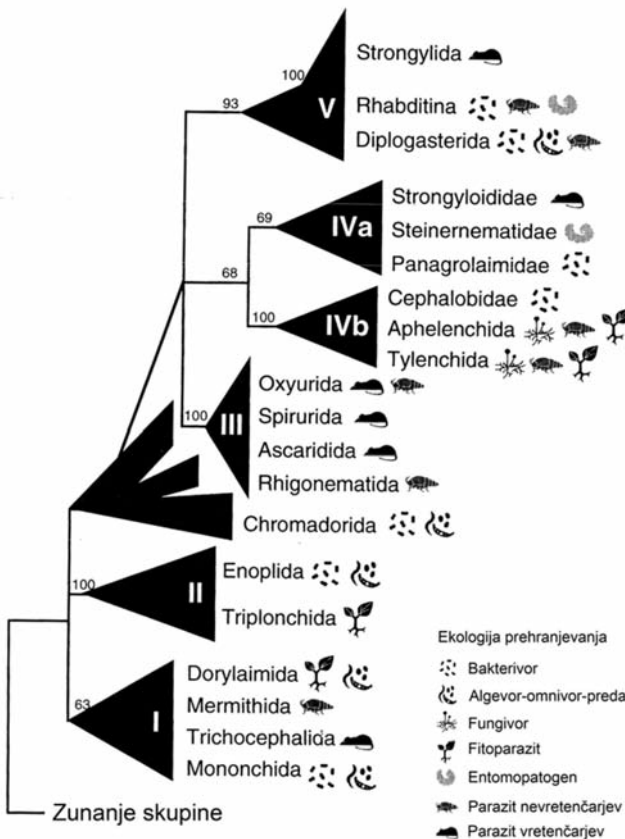
Shematski prikaz rDNA evkariontskih organizmov. Tandemsko se ponavlja predel, ki nosi zapis za 18S, 5,8S in 28S rRNA ter vmesna nekodirajoča zaporedja označena z ITS (notranji prepisani vmesnik), ETS (zunanji prepisani vmesnik) in NTS (neprepisani vmesnik).

Figure 11:

Schematics of rDNA of eukaryotic organisms. Tandem repeats of the region comprised of 18S, 5.8S and 28S rRNA genes and intermediate noncoding regions marked as ITS (internal transcribed spacer), ETS (external transcribed spacer) and NTS (non transcribed spacer).

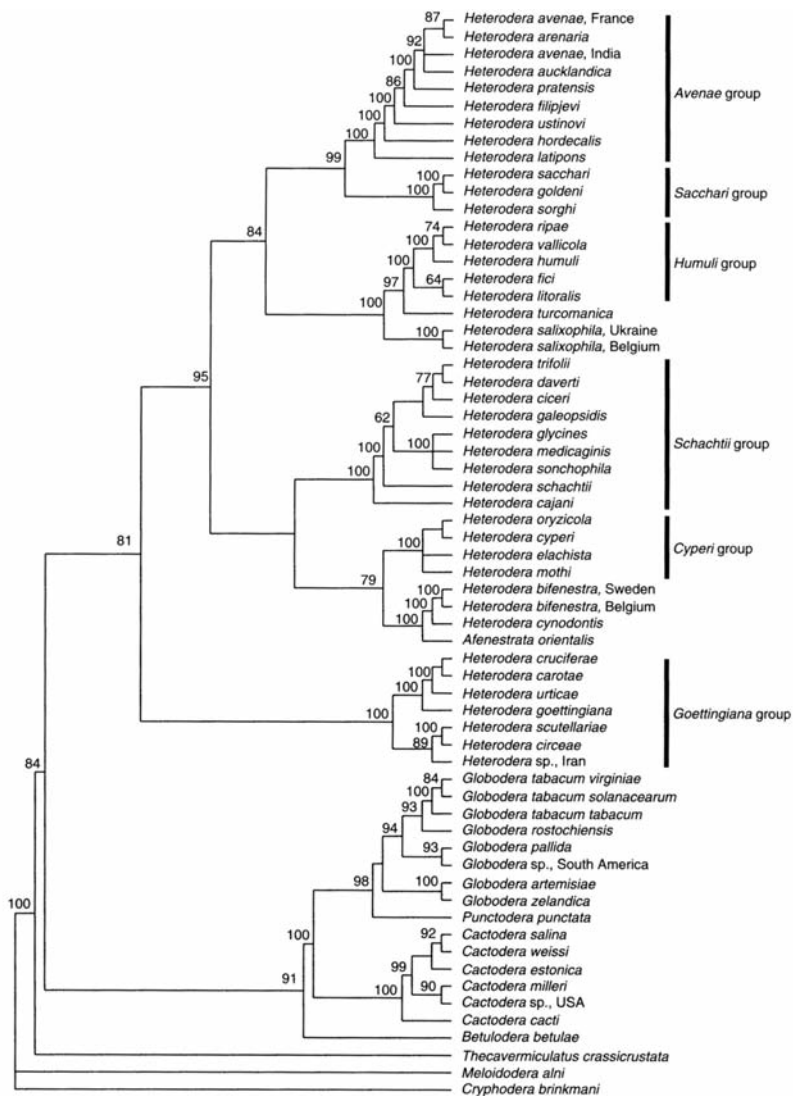
Plod analize zaporedja 18S rDNA pri velikem številu različnih predstavnikov debla Nematoda (Nematoda) je novo razumevanje medsebojnih odnosov v skupini (slika 12) (Blaxter, 2001). Molekularni podatki ne podpirajo delitve na dva razreda (Secernentea in Adenophorea), ki sta bila določena na osnovi morfoloških lastnosti, pač pa na tri skupine: I, II in C&S. Skupina I zajema Dorylaimida, prostoživeče vrste reda Mononchida, parazite žuželk Mermithida in parazite vretenčarjev Triplonchida. Skupina II zajema morske in rastlinsko parazitske vrste redov Enoplida in Triplonchida. Skupina C&S (Chromadorida in Secernentea) je nova kombinacija morskih Chromadorida in taksonov predhodno združenih v razred Secernentea. Chromadorida so v glavnem prostoživeče morske vrste, vanjo pa je vključenih tudi nekaj kopenskih in sladkovodnih predstavnikov. Secernentea

se nadalje delijo v tri skupine (III, IV in V), ki zajemajo živalske parazite, rastlinske parazite ter prostoživeče vrste v novi razporeditvi. Skupina III zajema izključno živalske parazite (Oxyurida, Spirurida, Ascaridida in Rhigonematida). Skupina IV združuje živalske in rastlinske parazite, parazite gliv ter prostoživeče vrste skupin Strongyloididae, Steinernematidae, Panagrolaimidae, Cephalobidae, Aphelenchida in Tylenchida. Skupina IV je mnogo bolj raznovrstna kot skupina III, zato jo lahko razdelimo v dve podskupini. Skupino V sestavljajo prostoživeče Rhabditida in Diplogasterida ter paraziti vretenčarjev Strongylida. Rastlinsko parazitski način življenja se je v evoluciji pojavil trikrat neodvisno in sicer pri skupinah Tylenchida, Dorylaimida in Triplonchida.



Slika 12: Grafični prikaz filogenetskega drevesa debla Nemata (Nematoda) na podlagi DNA zaporedij 18S rRNA gena združen s podatki o ekologiji prehranjevanja posameznih redov znotraj skupine nematoda. Arabske številke predstavljajo verjetnost združevanja v skupine (prirejeno po Blaxter, 2001).

Figure 12: The phylogenetic structure of the phylum Nematoda (Nematoda) based on DNA sequences of 18S rRNA gene analysis coupled with data on tropic ecologies of nematode orders. Arabic numbers present maximal bootstrap support (adapted after Blaxter, 2001).



Slika 13:

Grafični prikaz filogenetskega drevesa cistotvornih ogorčic na podlagi DNA zaporedij ITS regije rRNA gena. Verjetnost združevanja v skupine večja od 60% je prikazana za ustrezne skupine (Subbotin in Moens, 2006).

Figure 13:

The schematics of the phylogenetic tree of the cyst nematodes based on DNA sequences of the ITS region of rRNA gene. Probability of clustering larger than 60% is showed for the corresponding groups (Subbotin and Moens, 2006).

SUMMARY***Molecular taxonomy and phylogeny***

Molecular taxonomy (to name, identify and catalogue organisms) and molecular phylogeny (ancestral relationships among organisms) are supported by genomic information (Subbotin and Moens, 2006). Information about the structure of rDNA region has resolved many taxonomic and phylogenetic questions. Analysis of the small subunit rRNA for a large number of nematode taxa distributed across the phylum of Nemata (Nematoda) gave a new understanding of relationships within the group (Blaxter, 2001). The molecular analysis no longer supports division into two classes (Secerenentea and Adenophorea) based on morphological characteristics, but rather distribution into three groups: I, II and C&S. Order Tylenchida is part of the subgroup IVb within C&S.

5 RAZVOJNI KROG

Cistotvorne ogorčice se od drugih vrst razlikujejo po sposobnosti preobrazbe samic v ciste, pri katerih se kutikula spremeni v žilavo, rjavo, na številne zunanje dejavnike odporno tvorbo.

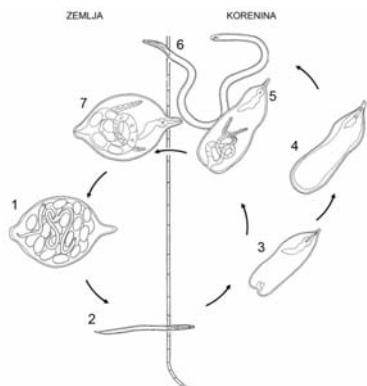
V času razvoja samice okroglasto, hruškasto ali limonasto nabreknejo, kar je posledica razvoja gonad in nastajanja jajčec, ki ostanejo v telesu in so v novonastali tvorbi, cisti, zavarovana pred že omenjenimi neugodnimi dejavniki okolja. Jajčeca so najprej sestavljena iz granulirane, neizoblikovane gmote in se preko nekaj delitev razvijejo v ličinke. Prvi stadij ličink se razvije že v jajčni ovojnici, s čimer se konča embrionalni razvoj. Po prvi levitvi, ki se konča v jajčecu, so ličinke popolnoma oblikovane in jih z ontogenetskega stališča štejemo za ličinke prve razvojne stopnje. Po drugi levitvi se razvijejo v drugo stopenjske ličinke, ki se lahko premikajo in so kot edini razvojni stadij sposobne napasti gostiteljske rastline.

Ličinke prodrejo v koreninice gostiteljskih rastlin neposredno pod rastnim stožcem. Preden se umirijo, se namestijo vzporedno z osjo koreninice (rep je usmerjen proti vrhu koreninice). Približno dva tedna po vdoru v koreninico se ličinke ponovno levijo in preidejo v tretjo razvojno fazo. Ličinke v tej fazi že nekoliko nabreknejo in so podobne stekleničkam, na njih pa že lahko ločimo nekatere organe (zasnove spolovila, rektum). Ta faza je v nekaj dneh sklenjena.

Ličinke, iz katerih se bodo razvile samice, v četrti razvojni fazi nabreknejo, medtem ko ličinke moškega spola ostanejo bolj vitke, črvaste. Izoblikovani samci so nekajkrat zviti v larvalnih kožah in so približno štirikrat tako dolgi kot koža. Na samcih je opazen paritveni organ. Četrta razvojna faza traja od štiri do pet dni, samci se končno izločijo iz larvalnih kož in zapustijo koreninje.

Samci živijo le kratek čas in po oploditvi samic poginejo. Številne vrste iz rodu *Heterodera* nimajo samcev, ali pa so le-ti zelo redki, tako da se te vrste razmnožujejo partenogenetsko.

Razvoj samic traja nekoliko dlje. V četrti razvojni fazi začnejo intenzivno nabrekati, zaradi česar počni koreninska skorja in samice osvobodijo večji del telesa. V korenini dejansko ostane le njen sprednji del. To razvojno fazo opazimo na napadenem koreninju kot majhne tvorbe mlečno bele barve. Pri večini vrst tega rodu so samice oplojene, ko dosežejo spolno zrelost. Pred tem izločajo snov, ki privablja samce (Green, 1967, cit. po Decker, 1969). Jajčeca se dokončno razvijejo en mesec po oploditvi, njihovo število niha in je pogojeno z okoljskimi dejavniki (od nekaj jajčec do več sto).



Slika 14:

Razvojni krog cistotvornih ogorčic: (1) cista, napolnjena z jajčeci, (2) J2, drugostopenjska ličinka, (3) J3, tretjestopenjska ličinka, (4) in (5) J4, četrstopenjska ličinka, (6) samec, (7) samica

Figure 14:

Life cycle of cyst nematodes: (1) cyst with eggs, (2) second stage juvenile, (3) third stage juvenile, (4) and (5) fourth stage juvenile, (6) male, (7) female

Ko se v samicah razvijejo jajčeca, odmrejo in iz njihovega telesa nastane cista, pri kateri se spreminja barva od mlečno bele do različnih odtenkov rjave barve. Spreminjanje barve dozorevajočih cist je posledica delovanja encima polifenoloksidaze na fenole, ki se nahajajo v ovojnici cist. Čeprav je ovojnica čvrsta in žilava, je vendarle prepustna za različne kemične snovi in raztopljeni kisik (Erlenburg, 1955, cit. po Decker, 1969).

SUMMARY

Life cycle

The life cycle within Heteroderinae consists of four moults and four juvenile stages plus adults. The first moult takes place within the eggshell. Due to roots exudates the larvae (second stage juveniles) are stimulated and hatched from the eggs. The second stage juveniles are worm like and are the only stage which can parasitize the host plants. They feed within the roots. As each female matures it swells and becomes almost spherical, bursting through the root wall. Only the head of the female remains embedded in the root. When the female of either species dies, its body forms a dark, reddish-brown cyst with a hard skin. Each cyst usually contains 100–600 eggs. At harvest, most cysts become detached from the roots and remain in the soil as a source of infestation for future crops.

6 ZGODOVINSKI PREGLED NEMATOLOŠKE KONTROLE OBDELOVALNIH TAL V SLOVENIJI

Začetki slovenske nematologije so tesno povezani s problematiko krompirjevih ogorčic, ki so sredi dvajsetega stoletja pustošile po krompirjevih nasadih skoraj po vsem svetu in prisilile oblasti številnih držav, da so začele z organiziranjem strokovnih služb za preprečevanje širjenja oziroma za zmanjševanje populacijskega pritiska teh izredno nevarnih škodljivcev. Državam, kjer je krompir strateško izjemno pomemben in kjer so zaradi nevarnosti vnosa oziroma širjenja krompirjevih ogorčic začeli sistematično nadzorovati njive s krompirjem in druga zemljišča, se je v zgodnjih šestdesetih dvajsetega stoletja z izdajo navodil za opravljanje analiz tal glede navzočnosti čist krompirjeve ogorčice, *Heterodera (Globodera) rostochiensis* Woll. pridružila tudi bivša Jugoslavija, vključno s Slovenijo. Navodila za spremljanje krompirjevih ogorčic je izdelala Zvezna uprava za varstvo rastlin, na temelju njih pa je bil 20. septembra 1962 sklican sestanek o problematiki, ki se je nanašala na obvladovanje oziroma ugotavljanje morebitne napadenosti krompirja s krompirjevimi ogorčicami, na Sekretariatu Izvršnega sveta Slovenije za kmetijstvo in gozdarstvo. Glede na to, da je bil krompir v Sloveniji v tistem obdobju izjemno pomemben so udeleženci sestanka sklenili, da je v Sloveniji potrebno organizirati sistematičen in trajen nadzor krompirjevih nasadov glede krompirjevih ogorčic. Na temelju teh sklepov je bil na Kmetijskem inštitutu Slovenije ustanovljen nematološki laboratorij, ki je takoj začel delovati. Rezultat tega je bilo prvo poročilo o preiskavi tal na zastopanost krompirjeve ogorčice, ki je nastalo leta 1963. Tedaj je bilo obdelanih 731 vzorcev in v enem od njih (Bitnje, Gorenjska) naj bi bila najdena krompirjeva ogorčica.

V letih 1963-1968 so v poročilih Kmetijskega inštituta Slovenije omenjali navzočnost krompirjeve ogorčice, kar je po mnenju Ureka in Lapajnet (2001) rezultat zablode, ki je bila posledica ohlapnih navodil za determinacijo krompirjeve ogorčice, katera je pooblaščenim ustanovam posredovala Zvezna uprava za varstvo rastlin leta 1959. Po naših predvidevanjih, ki temeljijo na rezultatih kasnejših analiz (1980–1992), je šlo v

omenjenih letih za najdišča takrat še neopisane vrste *Heterodera (Globodera) achilleae*. V letih 1980–1992 so bile iz tal na območju Gorenjske (Bitnje, Ilovka, Škofja Loka), kjer naj bi bila na temelju poročil iz let 1963–1968 najdena krompirjeva ogorčica, izločene ciste (205) vrste *Globodera achilleae* (Hržič in Urek, 1987, 1989, 1990 in 1996; Urek in Hržič, 1993). Leta 1968 je v ZDA izšla celo publikacija *The Golden Nematode Handbook*, v kateri je med drugim tudi zapisano, da so krompirjevo ogorčico v Jugoslaviji zasledili že leta 1964 in da je bila med drugim najdena tudi na dveh lokacijah blizu Kranja (Urek in Hržič, 1998). Po mnenju Ureka in Hržiča (1998) je šlo tudi v tem primeru za posredovanje napačnih podatkov, ki so izvirali iz takrat še nepopolnih in nejasnih določevalnih postopkov. V letu 1968 v poročilih niso več omenjene le okrogle in limonaste ciste, temveč so bile slednje že določene. Prvič so bile pri nas dokazane vrste *H. trifolii*, *H. schachtii*, *H. avenae* in *H. göttingiana* (Urek in Hržič, 1998).

V letu 1970 je prišlo do premika v prepoznavanju morfoloških značilnosti krompirjeve ogorčice in posledica tega je bila tudi prva omemba vrste *H. pseudorostochiensis* (species inquerendae): Tržič, Voklo, Velesovo – okrogla cista (verjetno vrsta *G. achilleae*). Iz zapisov leta 1973 je razvidno, da je bilo v okolici Dravograda najdeno večje število cist ogorčice *G. achilleae*. Omenjena vrsta, ki je bila v tem letu tudi opisana (Golden in Klindić, 1973), je bila tedaj pri nas tudi dejansko prvič poimenovana s tem imenom (Urek in Hržič, 1998). Kljub vsem nejasnostim pa je bila leta 1971 v Dobravi pri Dravogradu prvič dejansko pri nas najdena in določena rumena krompirjeva ogorčica *Globodera rostochiensis* (Urek in Hržič, 1998).

Laboratorijsko delo je bilo pri nas v prvih obdobjih usmerjeno predvsem v izpopolnjevanje laboratorijskih metod, z vpeljavo parametralnega določanja cist ogorčic iz rodu *Heterodera* (Hržič, 1980) pa so bili postavljeni temelji za intenzivnejše delo na področju sistematičnega spremljanja razširjenosti cistotvornih ogorčic, v skladu z direktivo EU (69/465/EEC) in Odredbo o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje krompirjevega raka (*Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.) in krompirjevih ogorčic (*Globodera rostochiensis* Woll. in *Globodera pallida* Stone), Ur. l. RS št. 51/1998. V letih 1980–2002 smo obdelali skoraj 50.000 vzorcev tal, pobranih s skoraj 9.000 ha obdelovalnih zemljišč in iz njih izločili preko 50.000 cist cistotvornih ogorčic. O razširjenosti cistotvornih ogorčic na območju Slovenije je bilo doslej objavljenih več zapisov, iz katerih je razvidno, da je

Tabela 1:

 Število odvzetih vzorcev, analiziranih na prisotnost vrst iz rodov *Globodera*, *Punctodera* in *Heterodera*, v obdobju 1980-2002

Table 1:

 Number of samples taken in the period 1980-2002, analysed on *Globodera* spp., *Punctodera* spp. and *Heterodera* spp.

Leto vzorčenja Year of sampling	Skupaj pregledane površine Total surface of examined fields (ha)	Število vzorcev Number of samples	Število najdenih cist Number of extracted cysts	<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Globodera pallida</i>	<i>Globodera achilleae</i>	<i>Punctodera punctata</i>	<i>Heterodera trifolii</i>	<i>Heterodera cruciferae</i>	<i>Heterodera galeopsidis</i>	<i>Heterodera göttingiana</i>	<i>Heterodera humuli</i>	<i>Heterodera carotae</i>	<i>Heterodera avenae</i>	<i>Heterodera schachtii</i>
1980-1992	4.704,4	27.062	44.942	0	0	205	451	17.483	2.603	3.084	1.989	17.820	873	0	436
1993	337,7	1.875	692	0	0	0	13	260	254	116	14	27	7	0	1
1994	354,7	2.841	822	0	0	0	0	708	23	14	65	9	3	0	0
1995	422,2	1.309	511	0	0	4	6	299	127	42	5	28	0	0	0
1996	404,1	1.731	828	0	0	0	0	543	146	125	0	14	0	0	0
1997	884,8	6.955	1080	0	0	1	11	459	439	154	14	2	0	0	0
1998	660,5	1.777	854	0	0	0	3	97	55	124	2	562	11	0	0
1999	371,0	636	358	10	0	0	0	97	30	4	3	214	0	0	0
2000	217,5	688	453	1	0	0	9	264	49	7	6	114	3	0	0
2001	488,3	891	474	43	0	7	2	236	51	3	28	93	11	0	0
2002	151,6	316	260	0	0	0	0	132	3	0	0	67	0	51	7
Skupaj (Total) 1980-2002	8.976,8	46.061	51.272	54	0	217	495	20.578	3.780	3.673	2.156	18.950	908	51	444

najbolj razširjena vrsta v Sloveniji *Heterodera trifolii*. Poleg nje se pri nas pojavlja še sedem drugih vrst rodu *Heterodera*, in sicer *H. schachtii*, *H. cruciferae*, *H. göttingiana*, *H. galeopsidis*, *H. avenae*, *H. humuli* in *H. carotae*, navzoče pa so tudi vrste *Punctodera punctata*, *Globodera rostochiensis* in *G. achilleae* (Hržič in Urek, 1987, 1988, 1989, 1990, 1992, 1995, 1996; Urek s sod., 2003, tabela 1).

SUMMARY

Historical review of nematological control of arable soil in Slovenia

*Nematology in Slovenia commenced in 1963 due to the problems and within European countries harmonized phytosanitary measures against potato cyst nematodes. In 1963 it was reported that among 731 examined samples one presumably contained a potato cyst nematode. In the years 1963-1968 the presence of potato cyst nematodes was mentioned for many times in the Annual Reports of Agricultural Institute of Slovenia. From the Reports of that time and from a letter by Agricultural Institute of Slovenia to the Secretariat of Economy of the Republic Slovenia dated 10 March 1969 it is evident that in frame of "examination of soil for the cysts of potato nematode" 22 round cysts were found for which they claimed that they belonged to potato nematode (*Heterodera rostochiensis*). *Globodera achilleae* was described in 1973 in former Yugoslavia and is likely to be endemic in the Yugoslave, including Slovenian region, while *G. rostochiensis* was probably introduced to Slovenia in the early 60ies with the imported seed potatoes. Already in 1971 a *Globodera* species different from *G. rostochiensis* had been reported from Slovenia and at that time named *H. pseudorostochiensis*. From 1973 on the *H. pseudorostochiensis* findings were named *H. achilleae* (= *Globodera achilleae*), and therefore the 1970 Report on *H. pseudorostochiensis* is most likely to be the oldest known record of *G. achilleae*. It is also not impossible that some of the early *G. rostochiensis* records from former Yugoslavia were in fact *G. achilleae* and are therefore rather doubtful. The first report of potato cyst nematode in Slovenia dates back to 1971 when a single cyst of *G. rostochiensis* was extracted from a soil sample taken from a potato field in the area of Dobrova close to the Slovene-Austrian border (Hržič, 1971). In 1975, a potato cyst nematode was found again in the same location. No PCN, however, was encountered in spite of intensive inspections of fields. Only in 1999, a relatively high infestation was discovered in a field located in Libeliče, near the Slovene-Austrian border (Urek & Lapajne, 2001). Beside *G. rostochiensis* the yarrow cyst nematode, *G. achilleae*, has been found repeatedly, mostly in the central part of Slovenia (Klindič & Petrovič, 1974; Urek & Hržič, 1993). Cyst nematodes are the best studied nematode group within Slovenia. During surveys of cyst nematodes almost 50.000 soil samples were screened between 1980 and 2002. Eight different *Heterodera*, one *Punctodera* and two *Globodera* species had been identified. The genus *Heterodera* is widely distributed and detected in most Slovenian districts. *Heterodera trifolii* is evidently the most frequent species in Slovenia. Beside it seven other species of the genus *Heterodera*: *H. schachtii*, *H. cruciferae*, *H. göttingiana*, *H. galeopsidis*, *H. avenae*, *H. humuli* and *H. carotae* have been described from the arable soil in Slovenia.*

7 VZORČENJE IN PRIPRAVA OGORČIC ZA MIKROSKOPSKO OPAZOVANJE

V tem poglavju je predstavljen način odvzema vzorcev tal, podan pa je tudi pregled laboratorijskih metod, namenjenih pripravi cist in ličink cistotvornih ogorčic za mikroskopsko opazovanje. Posebej so opredeljene metode, ki jih v ta namen uporabljamo v nematološkem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije.

7.1 Vzorčenje

Preden se lotimo zbiranja ali pobiranja talnih vzorcev, moramo izdelati ustrezen načrt vzorčenja, vključno z modelom zbiranja vzorcev, potrebnim številom in velikostjo posameznih vzorcev, ki mora temeljiti na teoretičnih in praktičnih načelih. Omenjena načela vzorčenja morajo izhajati neposredno iz poznavanja biologije ogorčic, njihove vertikalne in horizontalne razprostranjenosti in njihovega razmerja do številnih okoljskih dejavnikov, neposredno pa so odvisna od zahtevane natančnosti dela in razpoložljivih finančnih sredstev. Želena natančnost vzorčenja je odvisna od populacijske ocene (absolutna ali relativna ocena, populacijski kazalci itn.) in vrste preučevanja ogorčic (intenzivno ali ekstenzivno preučevanje).

Pri vzorčenju si pomagamo z ustrežno opremo: lopatami, pedološkimi sondami ali svedri (standardna oprema nematologov), včasih pa tudi z določenimi motornimi napravami. Po trditvah Southeya (1986) so najpogosteje v uporabi manjše sonde, premera 20–25 mm, s pomočjo katerih lahko na primer s 50-kratnim vbadanjem odvzamemo neposredno 2-kilogramske vzorce. V Evropi je izredno priljubljena tako imenovana nizozemska metoda vzorčenja tal, ki je zasnovana na približno petdesetih sondnih vbodih, s katerimi lahko sestavimo 250–500 cm³ velike talne vzorce. Najpogosteje jemljemo vzorce tal iz globine do 20 cm. Z razvojem nematologije so se neposredno razvijale tudi posamezne metode vzorčenja, vključno z načini odvzema vzorcev, ki temeljijo na uporabi strojev za vzorčenje tal z vakuumskim čiščenjem, na električnih in hidravličnih svedrih in podobnem.

Pri nas zajemamo tla v primeru cistotvornih ogorčic z nematološkimi sondami dimenzije 100 x 15 mm do globine 20 cm. Posamezen vzorec tal (cca 500 cm³) je sestavljen iz 50-70 podvzorcev - vbodov z različnih vzorčevalnih točk. Število vzorcev je odvisno od velikosti njive in izenačenosti preučevanega zemljišča. Z manjših površin (do 5 ha) ponavadi odvzamemo en (1) vzorec / 0,5 ha, število odvzetih vzorcev z večjih površin pa je manjše. Najmanj en vzorec je odvzet s površine do 4 ha. Mesta vzorčenja geografsko opredelimo.

7.2 Izločanje cist iz talnih vzorcev

Izločanje cist cistotvornih ogorčic iz talnih vzorcev je zasnovano na lastnostih preučevanih tal, ki se kažejo v različnih specifičnih težah organskih in anorganskih delcev, ki sestavljajo tla. Vzorce tal je priporočljivo zaradi boljšega izkoristka navedenih lastnosti pred izpiranjem zračno posušiti in iz njih odstraniti večje skeletoidne dele (kamne). Tovrstno sušenje lahko pospešimo s pomočjo toplega zraka (35–40 °C).

V nematoloških laboratorijih različnih držav uporabljajo različne načine izločanja cist cistotvornih ogorčic, ki temeljijo na lastnostih cist, ki so prekrite z voščeno prevleko, kar jim omogoča boljšo plovnost. Najenostavnejši način izločanja cist iz talnih vzorcev temelji na uporabi belih plastičnih skodelic, v katerih zmešamo zračno suhi vzorec tal s primerno količino vode. Ciste, ki so lažje od večine drugih organskih in anorganskih delcev, splavajo skupaj z drugim plavajočim materialom na površino in se postopoma zberejo ob steni skodelice. Leta 1954 je Kirchner (Decker, 1969) za izločanje cist iz talnih vzorcev uporabil stekleni lijak z jedkanim površjem, katerega iztočna cev je ukrivljena pod kotom 80°, njeno površje pa je gladko. Iztočno cev lijaka je mogoče odpreti ali zapreti s pomočjo stožčasto oblikovanega gumijastega zamaška. V lijak stresemo zračno suha tla in jih s curkom vode zavrtinčimo - povzročimo krožno gibanje mešanice vode in tal. Navzoče ciste splavajo na površje ob steno lijaka. Ciste, ki se med praznjenjem oziroma odtekanjem vode in težjih organskih delcev usedajo na steno lijaka izločimo, preštejemo in laboratorijsko obdelamo. V nekaterih laboratorijih uporabljajo Fenwickov način izpiranja talnih vzorcev iz leta 1940 (Decker, 1969), pri čemer zračno posušen in presejan vzorec tal vsujemo na 1 mm sito in ga preko lijaka speremo v podstavljeno posodo s curkom vode. Težji delci tal se potopijo na poševno dno posode, lažji delci, vključno s cistami,

pa splavajo na površje in se skupaj z vodo prelijejo preko žleba, ki je sestavni del posode, na sito z drobnimi odprtnicami. Na sito ujete drobne organske in anorganske delce tal izperemo z vodo v bele posode in zajeto vsebino pregledamo. Fenwickova posoda je primerna za izločanje cist pesne in krompirjeve ogorčice, za spiranje cist ovsove ogorčice (*Heterodera avenae*) pa je njena uporaba omejena, saj se zaradi velikosti ciste te vrste prehitro potopijo na dno posode.

Buhr je leta 1954 uvedel postopek izločanja cist iz vzorcev tal z uporabo filtrirnega papirja (Decker, 1969). Valjasto oblikovano stekleno posodo višine približno 20 cm in premera 15 cm obložimo z notranje strani s trakom filtrirnega papirja, in sicer tako, da njegov zgornji rob sega približno 1 do 2 cm pod rob posode. Posodo nato napolnimo z vodo do približno dveh tretjin, nato pa, ponavadi prek ustreznega lijaka, vanjo vsujemo zračno posušen talni vzorec (100 cm³). Mešanico vode in zemlje večkrat premešamo, nato pa vanjo kanemo nekaj kapljic milnice. Plavajoči organski delci se posledično razpršijo od sredine proti robu posode oziroma natančneje, proti traku filtrirnega papirja. Organski delci se vključno s cistami oprimejo omenjenega traku, ki ga nato previdno odstranimo iz posode, razprostremo na stekleno ploščo in pustimo, da se nekoliko posuši. Ciste nato s trakom filtrirnega papirja odstranimo, jih preštejemo in določimo. Istega leta kot Buhr je Oostenbrink zasnoval način izpiranja cist cistotvornih ogorčic iz tal, pri katerem vsujemo vzorec tal na 1 mm sito in ga nato z vodnim curkom izperemo preko lijaka v posodo za izpiranje. Vodni curek (0,7 l/minuto) s pomočjo šobe razpršimo po celotni površini talnega vzorca, hkrati pa skozi odprtine cevi na dnu izpiralne posode spustimo močnejši curek vode (4 l/minuto), ki dvigne drobne delce, ciste in ostale organske sestavine tal ter jih preko roba posode oziroma preko pretočnega žleba izpere na sito. Na ta način obdelujemo vzorce tal velikosti od 100 do 200 cm³.

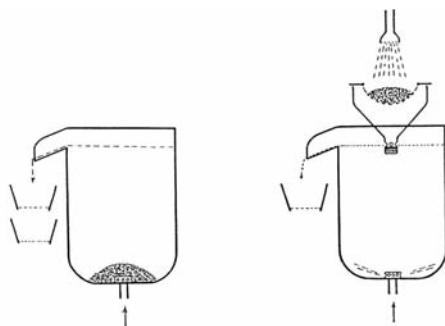
Seinhorst je leta 1964 uvedel postopek, s katerim lahko ciste izločamo tudi iz nekoliko vlažnejših vzorcev tal (Shepherd, 1986). Ekstrakcijsko napravo priključimo na vodni rezervoar, preko katerega sprostim stalni dotok vode (3,5 l/minuto). Ko raven vode doseže zgornji, razširjeni del naprave, vsujemo na sito z velikostjo luknjic 1 mm predhodno presejani vzorec tal in ga s premikanjem sita izpraznimo v napravo. Večji in težji delci tal se počasi sesedajo v spodnji, razširjeni del naprave. Voda, ki priteka iz rezervoarja, odplakne plavajoče delce tal preko roba naprave v odtočni žleb in od tod naprej, preko cevi, v

posodo. Sesedanje talnih delcev na dno posode traja približno dve minuti. Po tem času odpremo cev in iztočimo suspenzijo, v kateri se nahajajo tudi ciste iz zgornjega dela naprave, neposredno v posodo. Tako zbrano vsebino nato iz posode prelijemo na 100 µm sito, organski material s sita pa prenesemo v belo skodelico in ga pregledamo.

V ZDA je Spears leta 1968 zasnoval postopek, ki temelji na napravi za izpiranje talnih vzorcev, ki je sestavljena iz valjaste posode prostornine deset litrov, kateri sta na zunanji strani dodana obroča za namestitvev dveh sit. Velikost luknjic zgornjega sita je 1,5 mm, velikost luknjic spodnjega sita, v katerem lahko zberemo drobne delce tal vključno s cistami pa 175 µm. Talni vzorec (100–1000 g) vsujemo v posodo, v katero skozi šobo na dnu doteka močan curek vode (približno 4 l/minuto), ki dviguje drobne organske in anorganske talne delce. Omenjeni delci se vključno s cistami preko pretočnega žleba izperejo na dve zaporedni, vertikalno nameščeni siti. Prestrežen material s spodnjega sita prenesemo v primerno belo skodelico in ga pregledamo.

Schuiling je na Nizozemskem razvil polavtomatski flotacijski sistem izločanja cist iz talnih vzorcev (Hietbrink in Ritter, 1982), katerega delovanje je zasnovano na izkoriščanju sredotežnih sil. 200 cm³ zračno suhih tal stresemo v prozorno valjasto posodo, ki je delno (do približno ene četrtine) napolnjena z vodo. Dobljeno suspenzijo zavrtinčimo s pomočjo samodejnega rotacijskega sistema, ki sestoji iz dveh podolgovatih ukrivljenih vilic (450–500 obratov na minuto), zaradi česar se ustvari vrtinec, ki povzroči, da se ciste, skupaj z drobnimi organskimi in anorganskimi delci tal, usmerijo proti sredini posode, v kateri je nameščeno valjasto oblikovano sito z 1,5 mm velikimi odprtnicami. Omenjeno sito je nameščeno nad pretočno cevjo enakega premera, ki vodi curek vode, v kateri so ciste in anorganski ter organski delci tal do premera 1,5 mm, na zbiralno sito. Celoten ekstrakcijski sistem je programiran tako, da med vrtinčenjem suspenzije tal in vode, ki se nahaja v posodi, doteka v več zaporednih časovnih razmikih dodatna voda preko osrednjega in stranskih curkov, ki izhajajo iz obroča, nameščenega na vrhnjem obodu posode. Voda nezadržno polzi po stenah posode, s katere izpira morebitne delce, ki so se nabrali in prilepili nanjo. Po končanem izpiranju se posoda samodejno očisti. Izloženo organsko gmoto prenesemo z zbiralnega sita neposredno na filtrirni papir in s pomočjo mikroskopske lupe opravimo pregled, izložimo in določimo navzoče ciste.

V nematološkem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije pa ciste že vrsto let izločamo iz talnih vzorcev z uporabo leta 1977 modificiranega Oostenbrinkovega načina (Hrzič, 1973; Hrzič, 1980), s katerim dosegamo $91 \pm 3\%$ (Multiple Range Test, $LSD=95\%$) učinkovitost (Urek in Širca, 2003). V okviru medlaboratorijskih testiranj, v katerih smo sodelovali v obdobju 2007–2008 pa se je metoda izkazala še za bolj učinkovito (celo 99,8 %). Vzorec tal stresemo na kuhinjsko sito, ki ima premer luknjic 1 mm, in ga s pomočjo pomičnega pršilnika izpiramo v lijak. Dotok in odtok mešanice vode in tal je skupaj z organskimi delci uravnavan tako, da vzdržuje določeno raven te mešanice v cevi lijaka. Pretok 3,5 l/minuto omenjene mešanice vode in tal omogoča razmerje cevi lijaka (zgornji premer: 29 mm, spodnji premer: 25 mm), višina stolpca zmesi vode in tal (25 mm) in kontrolirani dotok in odtok skozi štiri okrogle odprtine na spodnjem delu iztočne cevi lijaka. Odprtine premera 6 mm so postavljene neposredno nad ravnijo vode izpiralne naprave. Vzporedno z vodo, ki priteka na opisan način od zgoraj, pa skozi odprtino (šobo) na dnu posode doteka tudi voda (6,5 l/minuto) od spodaj. Premer posode je 20 cm. Voda se skupaj z lažjimi organskimi in anorganskimi delci tal preko pretočnega žleba, ki je nameščen na vrhnjem, stranskem delu posode, preliva na sito z velikostjo luknjic 250 μm .



Slika 15:

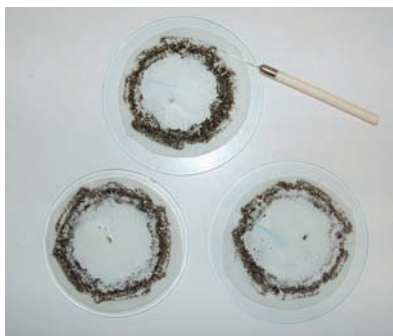
Modificiran Oostenbrinkov postopek izločanja cist, ki ga uporabljamo na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

Figure 15:

Modified Oostenbrink procedure of extracting cysts from the soil, the method used at Agricultural Institute of Slovenia.

Naplavino, ki se ujame na omenjeno, 250 μm sito, nato speremo v večji lijak (obod lijaka = 18 cm) tako, da se talno-vodna suspenzija v njem zavrtinči. Ko se vrtnčenje nekoliko upočasni, lijak odmašimo (odstranimo gumijast čep) tako, da odteče večina vode skupaj s težjimi delci tal, ki so se sesedli, na dno lijaka. Zadnjih 200 ml vode, ki odteka iz lijaka prestrežemo skupaj s plavajočim organskim materialom s podstavitvijo plastične skodelice. Iz skodelice nato vsebino prelijemo v naslednji, manjši lijak, ki je podobno kot

prejšnji zamašen z gumijastim čepom, katerega iztočna cev je zavita pod kotom 45° in speljana v naslednji, podstavljeni lijak. V tega namestimo okrogel filtrirni papir, na katerega ulovimo naplavino, ki jo postopoma izperemo iz lijaka. Ko je lijak, katerega obdaja filtrirni papir napolnjen do roba, kapnemo v sredino kapljico detergenta in preluknjamo sredino filtrirnega papirja tako, da iz lijaka počasi odteče voda, naplavina pa se nabere na robu filtriranega papirja (slika 16). Naplavino nato pregledamo s stereo-mikroskopsko lupo in ciste izločimo.



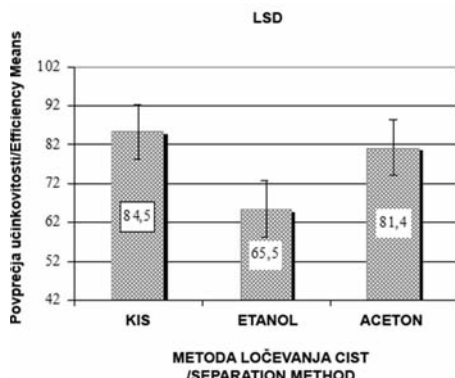
Slika 16:

Naplavina s cistami na filtrirnem papirju

Figure 16:

Cysts within the debris remain on the filter paper

S primerjalnim testom pri nas uporabljane in nekaterih v svetu uveljavljenih metod ločevanja cist cistotvornih ogorčic iz ekstarhirane organske gmote (ločevanje z acetonom (Seinhorst, 1964) in etanolom (Seinhorst, 1970) smo potrdili ustreznost našega načina ločevanja cist iz organske gmote. Izkazalo se je namreč, da je naša metoda povsem primerljiva z metodo ločevanja z acetonom, oziroma celo bolj učinkovita kot metoda z etanolom (Fisherjev test, LSD=95 %, slika 17).



Slika 17:

Primerjava učinkovitosti različnih načinov ločevanja cist cistotvornih ogorčic iz ekstarhirane organske gmote

Figure 17:

Comparative efficiency of different methods used for the separation of nematode cysts from organic debris

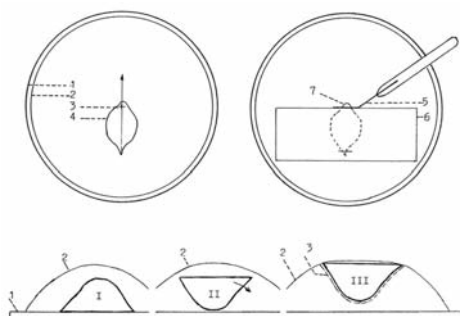
7.3 Priprava cist za analizo – pomen vulvinega stožca

Na ali v vulvinem stožcu se nahajajo elementi, ki so značilni za posamezne vrste in so kot taki izredno pomembni za določanje vrstne pripadnosti ciste. Pomembne so vse podrobnosti anatomske zgradbe spolne odprtine, pa tudi elementi, ki se nahajajo bodisi na zunanji ali notranji strani vulvinega stožca, v neposredni bližini spolne odprtine ali so od nje nekoliko oddaljeni.

Analna odprtina, ki se nahaja na vrhu stičišča lateralnih linij, je potrebna za neposredno prostorsko usmeritev stožca oziroma za usmeritev celotne ciste (dorzalno oziroma ventralno). Za določanje posameznih vrst cist je pomembno, da so omenjena anatomska znamenja razvidna oziroma da so ciste preparirane tako, da je njihova zgradba razločno izražena.

7.3.1 Način rezanja cist – cistotomija

Glede na diagnostični pomen vulvinega stožca je pomemben čim bolj natančen prerez ciste, pri katerem na primeren način odrežemo vulvin stožec. Vsak neuspeh prereza lahko popolnoma onemogoči analizo ciste. V številnih nematoloških laboratorijih je pri rezanju cist uveljavljen postopek s pomočjo igle in drobnega, ponavadi trikotnega skalpela. Cisto postavimo v drobno kapljico vode, ki jo kanemo na objektno stekelce, jo nabodemo z iglo oziroma pritrdimo na podlago in jo zarežemo. S predhodno odstranitvijo proksimalnega dela onemogočimo učinek pritiska v cisti, ki bi lahko vsebino skupaj z zrakom, ki se nahaja v njej, usmeril skozi njene naravne odprtine, spolno in analno, in jih poškodoval,



Slika 18:

Cistotomija – način rezanja cist: (1) premična plošča, (2) filtrirni papir, (3) sredina vidnega polja, (4) cista, (5) rezilo, (6) lamela, (7) vulvin stožec – zgoraj; opazovanje anatomske zgradbe vulvinega stožca: (1) objektno stekelce, (2) glicerin, (3) etanolamin – spodaj (Hržič, 1980)

Figure 18:

Cyst examination – dissection of cysts: (1) movable plate, (2) filter paper, (3) middle of field of vision, (4) cyst, (5) scalpel, (6) lamella, (7) vulval cone – above, examination of vulval cone – (1) slide, (2) glycerin, (3) ethanolamine – below (Hržič, 1980)

neposredno pod fenestro pa bi lahko nastal tudi zračni mehurček. S tem bi bila onemogočena nadaljnja obdelava ciste. S skalpelom nato čim bolj natančno odrežemo vulvin stožec.

7.3.2 Čiščenje vulvinega stožca

Za opazovanje je primeren le ustrezno očiščen vulvin stožec. Notranje stene stožca so prekrite z ostanki praznih jajčec in notranjih organov ogorčice. Sprijetost (adhezijo) ovojnice ciste z omenjenimi ostanki povečuje navzočnost posušanih anorganskih soli. Mehanično čiščenje vulvinega stožca v kapljici vode ali razredčenega glicerina ponavadi ni dovolj učinkovito, zato je bil v nematološkem laboratoriju KIS razvit postopek čiščenja (Hrzič, 1980) s pomočjo:

- koncentrirane mlečne kisline (40 delov) in 80 % očetne kisline (20 delov),
- koncentrirane mlečne kisline,
- glicerina (dehidriranega).

Vulvin stožec izpiramo s pomočjo namakanja in stalnega krožnega mešanja v vsaki od prej naštetih kemičnih snovi od tri do pet minut.

7.3.3 Opazovanje zgradbe vulvinega stožca

Vulvin stožec opazujemo z zunanje (analiza fenester) in notranje (analiza notranje anatomske zgradbe) strani. Za opazovanje notranjosti namestimo vulvin stožec v položaj I (opazovanje podmosta skozi ovojnico stožca) ali v položaj III (slika 18). V položaju II se stožec nagiba; v položaju III pa ostane dolgo časa negiben, zaradi česar lahko mirno opazujemo notranjo anatomsko zgradbo vulvinega stožca. Položaj III, ki je med drugim tudi izredno primeren za mikrofotografiranje, dosežemo s pomočjo mešanice glicerina in trietanolamina, ki imata različni specifični teži in različni površinski napetosti.

7.3.4 Izločanje ličink iz jajčnih ovojnic

Z izločitvijo ličink iz jajčnih ovojnic si zagotovimo pogoje za opazovanje določenih delov ličink in vzpostavitev telesnih razmerij, ki so pomembna pri določanju nekaterih vrst cistotvornih ogorčic. Obravnavanje vitalnih cist posameznih vrst iz rodu *Heterodera* z mešan-

ico karbolne (0,25 g) in mlečne kisline (10 ml) ter dehidriranega glicerina (7,1 ml) in destilirane vode (100 ml) ohranja strukturo vsebine cist, jajčec in ličink ter stimulatивно vpliva na izločanje ličink iz jajčnih ovojnic in poltrajno ohranja ličinke pred mikrobiološko razgradnjo – poltrajna konzervacija. Izločanje ličink iz jajčnih ovojnic je biofizikalni proces, ki je neposredno vezan na vitalna jajčeca, katera vstavimo v prej opisano mešanico kemikalij pri temperaturi 22 °C. Po 24 urah izpostavimo celotno vsebino temperaturi 35 °C. Ovojnica jajčeca zaradi povišanega turgorja poči in izločijo se ličinke.



Slika 19:

Izločanje ličinke iz jajčne ovojnice (foto: Hržič)

Figure 19:

Second stage juvenile hatching (photo: Hržič)

7.3.5 Fiksacija

Pri cistotvornih ogorčicah fiksiramo le gibljive razvojne stadije (samce ali drugostopenjske ličinke). Ogorčice so v vodi, v kateri jih ponavadi zberemo, zaradi vpliva številnih okoljskih dejavnikov (povečana osvetlitev, povečana temperatura ipd.) izredno nemirne in gibljive, zaradi česar je njihovo opazovanje onemogočeno. Zaradi tega se večkrat odločimo, da jih omrtvimo (anesteziramo), saj je znano, da so nekateri njihovi deli bolje vidni pri živih, omrtvičenih, kot pri mrtvih, fiksiranih ogorčicah. Z namenom dolgotrajnejšega opazovanja in določanja pa ogorčice največkrat ubijemo, ponavadi s povišano temperaturo, jih fiksiramo in poltrajno ali trajno pripravimo. Fiksiranje preprečuje naravni razkroj in več mesecev ohranja primerno strukturo obravnavanih organizmov. V različnih delih so priporočeni različni bolj ali manj uveljavljeni fiksativi: FA 4 : 1 ali FA 4 : 10 (FP 4 : 1, cit. po Hooper, 1986), TAF (Courtney in sod., 1955, cit. po Hooper, 1986), formalinsko glicerinski fiksativ (Golden in Hooper, 1970, cit. po Hooper, 1986), Ditlevsenov ali FAA fiksativ (cit. po Hooper, 1986).

Preden ogorčice fiksiramo, jih moramo najprej relaksirati, torej spraviti v čim bolj iztegnjen položaj. S tem si olajšamo opazovanje posameznih delov ogorčic in povečamo možnosti njihovega natančnejšega merjenja. Postopek relaksacije in fiksacije izvajamo v našem laboratoriju hkrati, in sicer tako, da ogorčice, zbrane v drobni kapljici vode, v 12 mm konusni epruveti, za dvajset sekund potopimo v vodno kopel (65 °C) in jim nato dodamo zadostno količino (1 ml) fiksativa TAF (Courtney in sod., 1955, cit. po Hooper, 1986), ki vsebuje sedem delov 40 % formalina, dva dela trietanolamina in enaindevetdeset delov destilirane vode. Ta mešanica je izredno obstojna, izgled fiksiranih ogorčic je večinoma zadovoljiv. Trietanolamin nevtralizira nezaželene učinke proste mravljinčne kisline, hkrati pa je higroskopen in preprečuje izsušitev ogorčic, tudi če fiksativ izhlapi. Dolgoročno shranjevanje ogorčic v tem fiksativu ni priporočljivo, zato je potrebno ogorčice po nekaj mesecih trajno pripraviti – shraniti v glicerinu.

7.3.6 Priprava preparatov za mikroskopski pregled

Izdelava začasnih (semipermanentnih) preparatov ogorčic ne predstavlja posebnih težav. Na objektno stekelce, v sredino primerno velike kapljice fiksativa, položimo relaksirane ogorčice. Ob robu kapljice razporedimo tri do štiri majhne delce steklenih vlaken premera 0,3 mm, ki preprečujejo pokrovki, s katero prekrijemo kapljico z ogorčicami, da bi s svojo težo stisnila in deformirala preučevani objekt. Zadostna količina fiksativa preprečuje nastanek mehurčkov. Pokrovko pritrdimo na objektno stekelce s pomočjo voska.

Izdelava trajnih preparatov je nekoliko bolj zapletena. Kot konzervans uporabljamo laktofenol ali še boljše glicerol. Za pripravo trajnega preparata potrebujemo navadno objektno stekelce (75 x 25 mm), ki ga po možnosti vgradimo v tanek aluminijast okvirček, ki objema rob objektnega stekelca, v sredini pa ima odprtino premera 20–21 mm. Za pokrievanje preparata uporabljamo kvadratne (24 x 24 mm) ali še boljše okrogle (premera 15 mm) pokrovke, ki jih na objektno stekelce pritrdimo s posebnim lepilom (glicilom). Tako pripravljen preparat opremimo še z etiketo, na kateri so zapisani osnovni podatki o preparatu (vrsta ogorčice, datum, najdišče, avtor).

Pri izdelavi trajnih preparatov moramo posebno pozornost nameniti prehodu prepariranih ogorčic iz fiksativa v čisti glicerol. Omenjeni postopek izvajamo previdno in počasi. Višja koncentracija fiksirnega sredstva z naglo spremembo izzove pri ogorčicah različne, bolj

ali manj intenzivne deformacije. Dober učinek dosežemo, če damo fiksirane ogorčice za deset minut v čisto vodo in jih šele nato prenesemo v raztopino 1–1,5 % glicerina. S počasnim izhlapevanjem vode iz razredčenega glicerina postopoma zvišujemo koncentracijo glicerina. Tovrstno zviševanje koncentracije naj traja približno tri do štiri tedne. Izhlapevanje po potrebi pospešimo v izparilniku na temperaturi 35–40 °C.

Fiksirane oziroma preparirane ogorčice v nadaljnjem postopku natančneje pregledamo in analiziramo s pomočjo ustreznih mikroskopov ter jih po potrebi mikrofotografiramo ali narišemo s pomočjo tako imenovanih prisovalnih cevi.

V novejšem obdobju se pri analiziranju ogorčic vse bolj uveljavlja tudi računalniška tehnika oziroma sistemi za analizo slike, vedno več pa je v uporabi tudi elektronska (transmisijska in skenerska) mikroskopija.

SUMMARY

Field sampling and preparation of nematodes for optic microscopy

This chapter reviews the methods for studies of cyst nematodes: collection, extraction, fixation, mounting, and related studies. More precisely, the methods used in our laboratory are described. Cyst extraction requires special techniques and procedures. The cysts are extracted from soil by gravity method, therefore the modified Oostenbrink method is used in our laboratory; the average recovery of cysts for all soil types and cyst population densities was 91 ± 3 %. After using the modified Oostenbrink method the cyst must be separated from the debris using different methods, e.g. acetone or ethanol flotation method. In our laboratory, the method by which the debris is washed to the moistened filter paper placed in a funnel is used. This method is fully comparable to the acetone flotation method and it is much better than the ethanol flotation method. Technical methods for nematode optical microscope observation and identification (cyst preparation and juvenile preparation) used in nematological laboratory of Agricultural Institute of Slovenia are described.

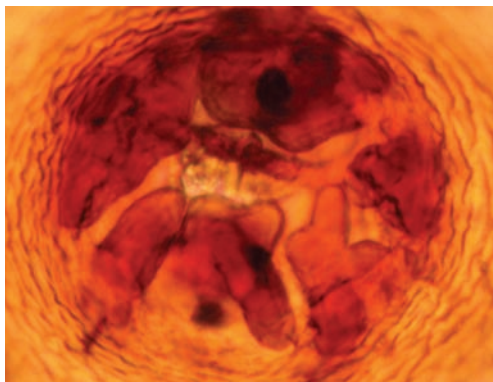
8 OPIS IN RAZŠIRJENOST VRST, UGOTOVLJENIH V SLOVENIJI

8.1 *Heterodera schachtii* Schmidt, 1871 – pesna ogorčica

Pesna ogorčica je pridelovalcem sladkorne pese znana že več kot sto let, saj pustoši med pridelki omenjene poljščine po Evropi že vse od druge polovice devetnajstega stoletja naprej (Thorne, 1961). Leta 1859 je Hermann Schacht objavil kratko poročilo o svojih opazovanjih iz leta 1850, ko je ugotovil, da je tako imenovana pesna utrujenost tal ali "Rübenmüdigkeit" posledica nepretrganega gojenja sladkorne pese na isti površini. Opazil je, da pesa na takih površinah vene in da ima glavne korenine prekrte s številnimi lasastimi koreninicami, na katerih se razvijejo majhne, bele, limonaste tvorbe, za katere je trdil, da so samice do tedaj še neznanih ogorčic (cit. po Decker, 1969). Schmidt je leta 1871 to vrsto natančneje opisal, jo taksonomsko razvrstil in jo v čast Schachta imenoval *Heterodera schachtii*. Kühn (1881) in Liebscher (1878) sta potrdila neposredno povezanost med ogorčico *H. schachtii* in tako imenovano pesno utrujenostjo tal (cit. po Decker, 1969).

Morfološke značilnosti vrste (izmere so povzete po Brzeskemu, 1998)

Jajčeca so dolga 90-114 μm in široka 42-50 μm . Ličinke so črvaste in merijo v dolžino 390-550 μm . Obdane so z navidez obročasto povrhnjico. Na bočni strani telesa potekajo



Slika 20:

Notranjost vulvinega stožca pesne ogorčice,
Heterodera schachtii

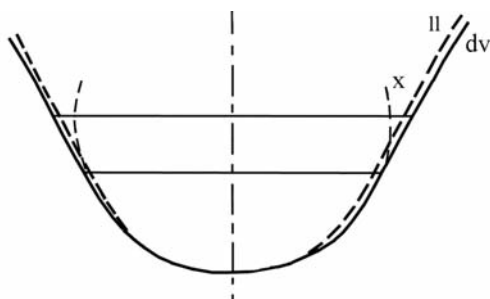
Figure 20:

Vulval cone of sugar beet nematode,
Heterodera schachtii

štiri lateralne linije. Glava je nekoliko privzdignjena (se loči od telesa). Bodalo, dolgo okoli 25 μm , je precej robustno, s sidrasto oblikovanimi grčami. Odprtina dorzalne požirniške žleze se nahaja okoli 4 μm za grčami bodala. Rep je stožčast, se krožno končuje in meri v dolžino 38-60 μm ; hialini del repa je dolg okoli 55 % dolžine repa.

Ciste ogorčice *H. schachtii* so slamnato rumene do temno rjave (motna tekstura), limonasto oblikovane. Dolge so (brez vratnega dela) med 530 in 970 μm , široke pa do 520 μm . Zadaj se koničasto zožujejo in prehajajo v šilast, vitek vulvin stožec. Imajo močno razvite bule, ki se nahajajo v vulvinem stožcu in so blizu skupaj. Snopast organ je razvit. Ovojnica ciste je cikcakasta in fino nepravilno punktirana. Imajo ambifenestralni tip fenester. Fenestra je skoraj okrogla, za malenkost daljša (24-56 μm) od širine (18-40 μm). Semifenestri sta fižolaste oblike, dolgi okoli 16 μm . Dolžina vulvinega mostu je okoli 50 μm , širina pa okoli 5 μm . Razdalja med fenestralnim robom in analno odprtino je okoli 77 μm . Vagina je večinoma progasta in široka, navzoč je snopast organ. Podmost, katerega dolžina je med 70 in 140 μm , je slabo pigmentiran ali pa sploh ne.

Parametralne značilnosti ($dv/II(r) > 1$; $V/T-bl(V) = 4,5-45$; $T/a'b' = 1,5 (1-3,2)$) in modelni opis vulvinega stožca (Hržič, 1980): bilateralna (II) projekcija poteka večinoma v dorzoventralni (dv) projekciji kalote - dolg skupen lok. Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca se prekrivata ali pa potekata tesno druga ob drugi (slika 21).



Slika 21:
Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca pesne ogorčice (Hržič)

Figure 21:
Bilateral (II) and dorsoventral (dv) vulval cone projection of sugar beet nematode (after Hržič)

Biologija in ekologija

Preko leta razvije pesna ogorčica dva do tri rodove, ki se med rastno dobo med seboj prekrivajo, tako da lahko v tleh hkrati zasledimo vse razvojne stadije. Škodljivca najdemo

večinoma v ornici, včasih pa ga lahko opazimo tudi do globine enega metra. Ogorčice prezimujejo v obliki cist, ki vsebujejo povprečno 200-300 ovalnih jajčec in katere služijo za konzerviranje ter nadaljnji razvoj vrste ali osebk. Hitinizirana kutikula ciste varuje jajčeca pred izsuševanjem in temperaturnimi nihanji, tako da lahko več let obdrži njihovo vitalnost. Ličinke se izležejo spomladi, največkrat pod vplivom izločenih rastlinskih sokov gostiteljskih rastlin. Če sta temperatura in vlažnost tal primerni, se izležejo tudi brez navzočnosti gostiteljskih rastlin. Ličinke se začnejo premikati pri 6 °C, izleganje se začne pri 10 °C (v tleh), množično pa pri 16 do 18 °C. Premikanje ličink je odvisno od strukture, temperature, vlažnosti in zračnosti tal ter je omejeno, tako da razdalja preseljevanja ne presega 40 cm. Ličinka zleze iz ciste, ki je zaradi vlažnosti omeščana, in se zapiči v drobno koreninico, kjer se potem zadržuje in se razvija pod pokožico v razmeščanem koreninskem tkivu.

Razvoj obsega štiri larvalne stopnje. Ličinke so po prvi in drugi levitvi črvaste, po tretji stekleničaste (v tej fazi se loči razvojna pot samcev in samic), po četrti pa postanejo limonaste. Pokožica koreninic zaradi naraščanja velikosti ogorčic počí tako, da zadnji del dozorele samice pogleda ven. Oplojujejo jih samci, ki so v tleh. Po oploditvi se v telesu rumenkaste samice oblikuje od 10 do 600 jajčec. Samica nato kmalu pogine, odpade s koreninic in oblikuje se temno rjava cista. Iz odpadle ciste se izlegajo mlade ličinke, ki napadajo navzoče gostiteljske rastline. Izleganje ličink iz ene ciste lahko traja več let, izlegla ličinka pa lahko, ob primernih razmerah (temperatura, vlaga) in brez navzočnosti gostiteljskih rastlin, ostane živa tudi več kot leto dni, in sicer na račun svojih rezervnih snovi.

Intenzivnost razmnoževanja pesne ogorčice je večinoma odvisna od tipa tal, podnebnih razmer in navzočnosti gostiteljskih rastlin. Najmočnejše napade so opazili v lahkih in srednje težkih tleh z večjo vsebnostjo organske snovi, v težkih tleh pa je zastopanost pesne ogorčice manjša. Med podnebnimi vplivi na obravnavano vrsto pripisujejo največji pomen temperaturi in vlagi. Po nekaterih podatkih se optimalna temperatura za razvoj pesne ogorčice giblje med 18 in 28 °C.

Pomen in znamenja napada

Pesna ogorčica (*Heterodera schachtii*) je izjemno nevaren gospodarski škodljivec. Zajeda veliko rastlinskih vrst, ki so pomembne za kmetijstvo. Po nekaterih podatkih (Steele,

1965) napada številne rastline iz skupine plevelov, vrtnin, poljščin in okrasnih rastlin, ki so razvrščene v kar 23 rastlinskih družin oziroma pripadajo najmanj 218 rastlinskim vrstam iz 95 rodov (cit. po Steele, 1984). Njena pomembnost in nevarnost se ne kaže le v njeni patogenosti oziroma v širokem spektru gostiteljskih rastlin, temveč tudi v načinu življenja in v izredni razprostranjenosti po skoraj celotni zemeljski obli.

Ogorčice se hranijo s sesanjem koreninskih sokov, zaradi česar se poruši vodna bilanca in sam proces prehrane v rastlini, kar se negativno odraža pri asimilaciji. Zaradi tega rastline hirajo. Pri nizki talni vlagi v vročih poletnih mesecih rastline venejo in se sušijo v otokih. Prva znamenja napada se kažejo v slabi rasti mladih rastlin in v začetnem venenju zunanjih listov ob pripeki, ki si v vlažnejšem in hladnejšem obdobju ali ponoči opomorejo. Posebej izrazito se napad odraža na koreninju, kjer se močno razvijejo stranske korenine, medtem ko ostaja glavna korenina zvečine podolgovata (negomoljasta) in zaostane v razvoju. Bradat koren, gosto poseljen z limonastimi cistami, je zanesljivo znamenje napada pesne ogorčice. Glede na intenzivnost napada so lahko izgube pridelka zelo različne. Če je napad močan, dosežejo tudi 50 % in več, kar je odvisno od okoljskih dejavnikov.

Razširjenost

Pesna ogorčica, *H. schachtii*, izvira po nekaterih podatkih iz območja sredozemskega bazena, prvič pa je bila natančneje opisana leta 1871 v Nemčiji. Našli so jo že v najmanj 40 državah Evrope, Afrike, Severne in Južne Amerike, o njeni navzočnosti pa so poročali tudi s Havajev, Avstralije in Nove Zelandije. 64 % dežel, kjer so našli omenjeno ogorčico, leži med 30° in 60° severnega vzporednika, 23 % med 30° in 60° južnega vzporednika in le 13 % v ekvatorialnem pasu. Nekateri avtorji, med njimi sta na primer Thorne in Giddings (1922), so preučevali vertikalno razporeditev cist pesne ogorčice in prišli do ugotovitev, da so ciste navzoče v globinah od 0 do največ 76 cm. Največ cist so našli v globini med 0 in 35 cm (98 %), v globini med 36 in 76 cm pa so našli le 2 % vseh cist. V ornici (do 20 cm) so našli več kot 90 % vseh cist, kar je razumljivo glede na življenjske navade oziroma odvisnost pesne ogorčice od gostiteljskih rastlin, ki imajo koreninje razvito večinoma v globini do 20 cm (cit. po Steele, 1984).

Pesna ogorčica je glede na rezultate dosedanjega spremljanja cistotvornih ogorčic pri nas sorazmerno redka. Navzoča je sicer v tleh osrednje, južne in severovzhodne Slovenije,

vendar smo v obdobju 1980-2002 od skupnega števila 51.272 cist iz tal izločili le 444 cist te vrste. Njena zastopanost je bila manj kot 1%.

8.2 *Heterodera avenae* Wollenweber, 1924 – ovsova ogorčica

Vrsto *Heterodera avenae* so na pšenici, ovsu in ječmenu prvič opazili v Nemčiji (Kuhn, 1874) in jo opisali kot eno od bioloških ras (ovsova) pesne ogorčice, *H. schachtii*. Leta 1908 jo je Mortensen s sodelavci poimenoval *H. schachtii* var. *avenae*, leta 1930 pa jo je Schmidt povzdignil na raven podvrste *Heterodera schachtii* sub. sp. *major*. Leta 1940 jo je Franklinova ponovno razvrstila in jo poimenovala *H. major*. Kasneje, leta 1951, je ista avtorica ugotovila, da gre v primeru ovsove ogorčice dejansko za posebno vrsto in zanjo privzela ime *Heterodera avenae* Wollenweber, 1924 (cit. po CPC Global Module).

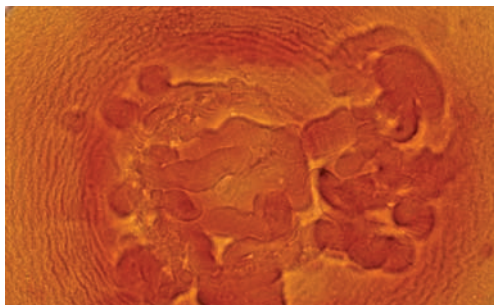
Krall in Krall (1978) sta ovsovo ogorčico *H. avenae* in druge cistotvorne ogorčice z bifenestralnim tipom fenester kasneje uvrstila v poseben rod *Bidera*, a sta Mulvey in Golden (1983) sklenila, da gre v primeru rodov *Bidera* in *Heterodera* pravzaprav za isti rod in da je *Bidera* pravzaprav soznačnica *Heterodera*. Njunemu mnenju sta pritrdila tudi Stone (1986) in Luc s sod. (1988).

Morfološke značilnosti vrste (izmere ličink in cist so povzete po Handooju, 2002)

Jajčeca so dolga 110-136 µm in široka 44-54 µm (Brzeski, 1998). Ličinke so dolge med 520 in 620 µm. Povrhnjica telesa je navidez obročasta. Preko telesa potekajo vzdolžno štiri lateralne linije, od katerih sta največkrat vidni le notranji dve. Glava je nekoliko privzdignjena (se loči od telesa), z dva do štirimi obroči. Bodalo je dolgo okoli 27 (24-28) µm, grče so anteriorno sploščene ali rahlo konkavne. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja okoli 5-6 µm za grčami bodala. Rep je stožčast, se krožno ali skoraj koničasto končuje in meri v dolžino 58-70 µm. Hialini del repa meri med 35 in 45 µm.

Ciste ogorčice *H. avenae* so temno rjave, skoraj črne, limonasto oblikovane, delno prekrite z belo subkristalino plastjo. Dolge so (brez vratnega dela) med 580 in 975 µm, široke pa med 390 in 725 µm. Imajo številne, močno razvite temne bule, ki se nahajajo blizu vrha vulvinega stožca. Ovojnica ciste je cikcakasta in fino nepravilno

punktirana. Imajo bifenestralni tip fenester. Dolžina fenestre je 40-52 μm , širina pa 18-23 μm . Vulvin most je širok 5-8 μm . Podmost ni razvit.



Slika 22:

Notranjost vulvinega stožca ovsove ogorčice, *Heterodera avenae*, močno razvite bule

Figure 22:

Vulval cone of Heterodera avenae, well developed bullae

Biologija in ekologija

Ovsova ogorčica ima letno le enega ali največ dva rodova. Jajčeca so uskladiščena v cistah, kjer ostanejo zavarovana pred neugodnimi okoljskimi dejavniki, predvsem mrazom in sušo, več let. Pravimo, da so jajčeca v stadiju mirovanja, v diapavzi. V jajčecih se preko prve levitve razvijejo drugostopenjske, infektivne ličinke, ki se izležejo iz jajčec in vstopijo v koreninsko tkivo tik za rastnim vršičkom. V prvem letu se ponavadi izleže 60 % jajčec, izleganje pa se lahko zavleče tudi na tri do štiri leta. Ko se izležejo drugostopenjske ličinke, poiščejo korenino, se zarijejo vanjo in si poiščejo oziroma oblikujejo ustrezno prehranjevalno mesto, sincicij oziroma mnogojedno gmoto protoplazme.

Posamezne biološke rase ovsove ogorčice so z oziroma na življenjski prostor, iz katerega izhajajo, različno prilagojene okoljskim razmeram. Na območju Sredozemlja se ličinke izlegajo od jeseni pa vse do začetka pomladi, stadij mirovanja pa nastopi v vročih in suhih mesecih; v Indiji pa se izlegajo od sredine novembra do januarja. Evropske populacije so manj odporne na sušne razmere kot indijske in avstralske. Drugostopenjske ličinke se v subtropskih podnebnih razmerah izležejo iz cist pri 10-25 °C, optimalna temperatura je med 20 in 25 °C; za izleganje avstralskih populacij pa je optimalna temperatura pri 10 °C. V Evropi, Kanadi in Avstraliji nastopi faza najintenzivnejšega prehranjevanja oziroma zajedanja ličink približno istočasno.

Ličinke se med razvojem še trikrat levijo in se razvijejo v samice ali samce. Samice dozori v 6-9 tednih po vstopu v gostiteljsko rastlino, samci pa zapustijo korenino po pri-

bližno treh tednih. Zrele samice lahko na koreninah v Evropi in Kanadi opazimo od maja do julija, v Avstraliji pa se ciste razvijajo v obdobju med avgustom in oktobrom. Samci poiščejo samice in jih oplodijo. V oplojenih samicah se oblikuje 100-600 jajčec. Za izleganje jajčec so ugodnejše nižje temperature (2-10 °C), sušne razmere v času rasti gostiteljskih rastlin pa so ugodnejše za razvoj ogorčic. Življenjski krog ovsove ogorčice sovpada z razvojem gostiteljskih rastlin.

Ovsova ogorčica je bolj virulentna v lahkih tleh, težka tla ji ne ustrezajo. Medtem ko so avstralske in indijske populacije bolj prilagojene aridnim razmeram, so evropske populacije sušnim razmeram manj prilagojene. Največja škoda zaradi ovsove ogorčice nastane na rastlinah, ko v času izleganja ličink nastopi vlažno in hladno obdobje in ko je v času najintenzivnejše rasti gostiteljskih rastlin sušno obdobje.

Pomen in znamenja napada

Primarni gostitelji ovsove ogorčice so žita (Poaceae) vključno s pšenico, tritikalo, ječmenom, ovsom in ržjo, pa tudi nekaterimi travami. Manj pomemben oziroma slab gostitelj je tudi koruza.

Vrsta *H. avenae* je nevaren škodljivec pšenice, ječmena in ovsa in predstavlja resno grožnjo gospodarni pridelavi žit, predvsem v severozahodni Indiji in južni Avstraliji. Po nekaterih ocenah znašajo letne izgube zaradi tega škodljivca v Avstraliji okoli 70 milijonov ameriških dolarjev, v Evropi 4,5 milijone in v Indiji okoli 9 milijonov. V ZDA ocenjujejo, da znašajo izgube okoli 312 milijonov ameriških dolarjev na leto (CPC Global Module).

Škoda, ki jo lahko povzroči ovsova ogorčica, je odvisna od velikosti začetne populacije, tipa tal, podnebnih razmer, vrste in sorte gostiteljske rastline in morebitne navzočnosti drugih, rastlinam nevarnih organizmov (interakcijski vplivi), kaže pa se v splošni oslabelosti in zakrnelosti napadenih rastlin. Napadene rastline se slabše razraščajo, venejo, listi spreminjajo barvo (postanejo rdečkasto rumeni in ožji pri pšenici, porumenijo pri ječmenu in pordečijo pri ovsu) in se lahko popolnoma posušijo, klasi so zakrneli, zrnje je manjše. Koreninski sistem je prizadet, korenine so manjše in močno razvejane; razrastejo se krajše in robate stranske korenine.

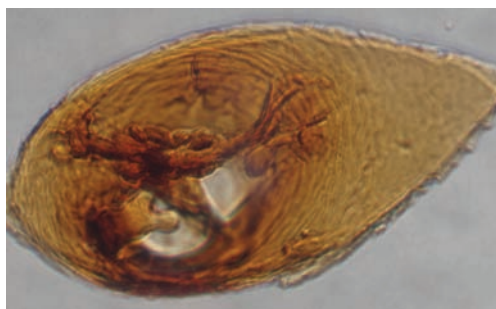
Razširjenost

Ovsova ogorčica, *H. avenae* je razširjena v številnih pridelovalnih območjih žit in je izjemno nevaren škodljivec pšenice in ječmena v zahodni in vzhodni Evropi, Rusiji, območjih okoli Sredozemskega morja, severni Afriki, Indiji, Japonski, Kitajski, Izraelu, Avstraliji, Novi Zelandiji, ZDA, Kanadi in Peruju.

Pri nas smo nanjo naleteli le enkrat, in sicer v osrednji Sloveniji leta 2002. Z ozirom na dosedanje rezultate spremljanja cistotvornih ogorčic trdimo, da je njena razširjenost oziroma zastopanost v Sloveniji zanemarljiva, manj kot 0,01 %; od skupnega števila 51.272, smo iz tal izločili le 51 cist te vrste.

8.3 *Heterodera trifolii* Goffart, 1932 – deteljna ogorčica

Deteljno ogorčico, *Heterodera trifolii* Goffart, 1932, prištevamo v skupino z limonasto oblikovanimi cistami in je bila najprej opisana kot ena od bioloških ras pesne ogorčice. Natančnejše primerjalne študije vrst *H. schachtii* in *H. trifolii* (Franklin, 1951; Oostenbrink in Den Ouden, 1954; Wouts in Weischer, 1977, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991) ter *H. trifolii* in *H. glycines* (Hirschmann, 1956, cit. po Riggs in Wrather, 1992) so pokazale biološko raznolikost preučevanih vrst. Deteljna ogorčica je sicer pesni in sojini ogorčici zelo podobna, vendar se v nekaterih podrobnostih razlikuje od omenjenih vrst. Opazne razlike deteljne (*H. trifolii*) in sojine ogorčice (*H. glycines*) so v velikosti drugostopenjskih, infektivnih ličink, v velikosti bodala in repa, razmiku med bazalnimi grčami in dorzalne požiralniško žlezno odprtino in v navzočnosti samcev (McBeth, 1938; Franklin, 1951, cit. po Decker, 1969). Podobno se deteljna ogorčica razlikuje tudi od pesne, in sicer v nav-



Slika 23:
Notranjost vulvinega stožca deteljne ogorčice, *Heterodera trifolii*, v ospredju: podmost, v ozadju: bule

Figure 23:
Vulval cone of Heterodera trifolii, in the foreground: underbridge; in the background: bullae

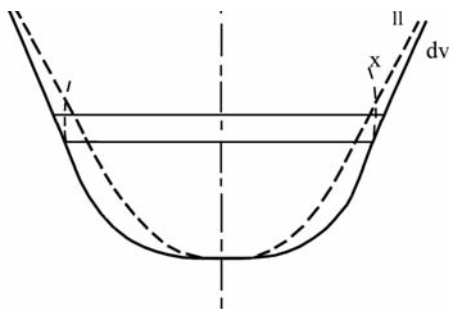
zočnosti oziroma pomanjkanju samcev (Kirjanova in Krall, 1980) ter v razmerju med dorzoventralno in bilateralno projekcijo vulvinega stožca (Hržič, 1980).

Morfološke značilnosti vrste (izmere so povzete po Brzeskemu, 1998)

Jajčeca so dolga 102-132 μm in široka 40-56 μm . Ličinke merijo povprečno 520 μm (490-580 μm). Preko njihovega telesa vzdolžno potekajo štiri lateralne linije. Glava je nekoliko privzdignjena (se loči od telesa), ponavadi s tremi ali štirimi obroči. Bodalo, dolgo okoli 28 μm , s sidrasto oblikovanimi, naprej usmerjenimi grčami. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja okoli 4-8 μm za grčami bodala. Rep je stožčast, se krožno končuje in meri v dolžino 49-77 μm ; hialini del repa je dolg okoli 56 % dolžine repa.

Ciste *H. trifolii* so limonastih oblik z izboklim vulvinim stožcem. Pogosto so asimetrične (glava in vulvin stožec ne ležita v isti ravnini). Njihova dolžina (brez vratnega dela) je med 770 in 950 μm , širina pa 340-660 μm . Ovojnica ciste je temno rjava in grobo punktirana. Vulvin stožec je na vrhu raven. Imajo močno razvite bule, ki se nahajajo v vulvinem stožcu, in so blizu skupaj. Snopast organ je razvit. Količnik med dolžino in širino fenestre znaša 1,2-1,4. Vulvina špranja je krajša od vulvinega mostu. Semifenestre so raztegnjene. Podmost je dolg 80-105 μm , močno pigmentiran in se na koncu enostavno cepi.

Parametralne značilnosti ($dv/II(r) > 1$; $V/T-II(V) = 1,5-4,3$; $T/a'b' = 4,5$ (2-13,5) in modelni opis vulvinega stožca (Hržič, 1980): II projekcija seka dv projekcijo izven projekcije kalote (nad dorzoventralno črto). Med projekcijami II kalote in dv modela kalote je površinska razlika, ki je poudarjena v srednjem in spodnjem delu kalote (slika 24).



Slika 24:

Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca deteljne ogorčice (Hržič)

Figure 24:

Bilateral (II) and dorsoventral (dv) vulval cone projection of *H. trifolii* (after Hržič)

Biologija in ekologija

Mlade samice izlegajo jajčeca v želatinasto jajčno vrečko, matriks, ki se oblikuje na zunanem delu ciste, neposredno ob spolni odprtini. Ko samice dozorijo, ostarijo in odmrejo oziroma se pretvorijo v ciste ostanejo jajčeca v njih. V cistah so jajčeca zavarovana pred neugodnimi okoljskimi dejavniki. Izleganje drugostopenjskih ličink iz jajčec lahko traja več let, poteka pa takrat, ko so okoljske razmere ugodne za njihov razvoj. Optimalna temperatura za izleganje ličink iz jajčec je 17,2 °C (med 4-31 °C). Koreninski izločki gostiteljskih rastlin privabijo izležene ličinke, le te pa nato vstopijo v korenine takoj za rastnim vrhom. V koreninah se ličinke še trikrat levijo in se preobrazijo v odrasle osebkke, samice ali samce. Življenjski krog je pri temperaturi tal 25 °C sklenjen v 17 dneh, v hladnejšem okolju, pri temperaturah 10-20 °C traja razvoj od ličinke do spolno zrele samice okoli mesec dni. Deteljna ogorčica lahko letno razvije več rodov.

Pomen in znamenja napada

Deteljna ogorčica (*Heterodera trifolii*) spada v skupino ogorčic s širokim spektrom gostiteljskih rastlin iz skupine metuljnic vključno z deteljo, lucerno, sojo, grahom in fižolom. Napada tudi predstavnike številnih drugih družin oziroma rodov: *Dianthus*, *Vinca*, *Lotus*, *Melilotus*, *Spinacea*, *Polygonum*, *Rumex* in *Chenopodium* (Thorne, 1961; Norton in Isley, 1976; Mulvey in Anderson, 1974, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991).

Škodljivost deteljne ogorčice je povezana z velikostjo njene populacije (Sikora in Maas, 1986). Neposredne poškodbe gostiteljskih rastlin so najintenzivnejše v primerih množičnega napada infektivnih ličink, odražajo pa se v obliki odmiranja koreninskih vršičkov (Sikora in Maas, 1986). Poleg tovrstnega odmiranja se pojavlja škoda tudi v obliki interakcij z drugimi patogenimi organizmi (Sikora in Maas, 1986; Ennik s sod., 1964; Yeates, 1973, cit. po Sikora in Maas, 1986). Obravnavane ogorčice zavirajo včasih tudi fiksacijo dušika (Yeates s sod., 1977, cit. po Sikora in Maas, 1986). Veliko številno osebkov vrste *H. trifolii* lahko preprečuje tudi normalen odvzem vode, kar se odraža pri višjih temperaturah kot venenje rastlin (Thorne, 1961).

Po podatkih, zbranih v CPC Global Module, so poleg črne (*Trifolium pratense* L.) in bele detelje (*Trifolium repens* L.), pomembne gostiteljske rastline vrste *H. trifolii* še nekatere

trave (Poaceae), vrtni nagelj (*Dianthus caryophyllus* L.), krompir (*Solanum tuberosum* L.) in sladkorna pesa (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera*).

Razširjenost

Ciste deteljne ogorčice, *Heterodera trifolii*, prištevajo v ZDA med najpogosteje najdene v Severni Ameriki (Norton, 1984). Po nekaterih podatkih je to najbolj razširjena cistotvorna ogorčica v tamkajšnih obdelovalnih tleh (cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Deteljno ogorčico, ki so jo zasledili tudi v južnih predelih Kanade in v najmanj tridesetih državah ZDA, obravnavajo kot resnega škodljivca bele in črne detelje, pa tudi kot parazita nekaterih drugih krmnih metuljnic (Norton in Isley, 1967, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Zelo je razširjena tudi v Zahodni Evropi, območjih bivše Jugoslavije, severnih območjih evropskega dela bivše Sovjetske zveze, pa tudi v Izraelu, Avstraliji, Novi Zelandiji in na Japonskem (Kirjanova in Krall, 1980). Našli so jo tudi v Indiji in Iranu (CPC, Global Module).

Podobno kot v ZDA je deteljna ogorčica geografsko najbolj razširjena cistotvorna ogorčica tudi v Sloveniji. Rezultati nematoloških analiz iz obdobja 1980-1992 (Hrzič in Urek, 1993) kažejo, da je vrsta *H. trifolii* z 38,9 % zastopanostjo med vsemi pri nas najdenimi cistotvornimi ogorčicami najbolj razširjena. V omenjenem obdobju smo na ogorčico *H. trifolii* naleteli na 16 od 17 pregledanih občinskih območjih v severovzhodni in osrednji Sloveniji. Ugotovili smo jo v 14,3 % pregledanih vzorcev, o morebitni škodi, ki naj bi jo povzročala pa nimamo podatkov (Urek in Hrzič, 1991). Odstotni delež vrste *H. trifolii* je bil v letih 1992-1996 sicer nekoliko nižji, le 18,3 %, vendar predvsem na račun velikega števila izločenih cist hmeljeve ogorčice zaradi intenzivnejšega vzorčenja hmeljišč in bivših hmeljišč na območju Štajerske v tem obdobju (Urek in Hrzič, 1997). Na splošno lahko sklenemo, da je deteljna ogorčica v slovenskih obdelovalnih tleh najpogosteje zastopana vrsta. V obdobju 1980–2002 smo od skupno 51.272 najdenih cist iz tal izločili 20.578 cist *H. trifolii*, kar pomeni, da je bila zastopanost te vrste okoli 40 odstotna.

8.4 *Heterodera galeopsidis* Goffart, 1936 – zebratova ogorčica

Zebratovo ogorčico je leta 1936 odkril Goffart na koreninju navadnega zebrata (*Galeopsis tetrahit* L.) v Turingiji (cit. po Decker, 1969).



Slika 25:
Notranjost vulvinega stožca zebratove ogorčice
(*Heterodera galeopsidis*) – podmost

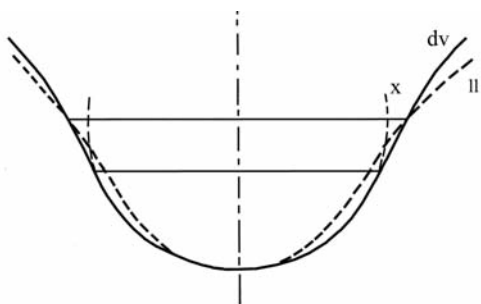
Figure 25:
Vulval cone of Heterodera galeopsidis – underbridge

Morfološke značilnosti vrste

Velikost ličink niha, povprečno pa merijo v dolžino 485 μm . Hialini del repa je za eno tretjino daljši od bodala.

Ciste ogorčice *H. galeopsidis* so temno rjave, simetrične, zaokroženo limonasto oblikovane, z izboklim vulvinim stožcem. Imajo močno razvite bule, ki se nahajajo znotraj vulvinega stožca, na kratkih medsebojnih razdaljah. Snopast organ je razvit. Vulvin stožec je top. Količnik med dolžino in širino fenestre je manjši od 1,5. Vulvina špranja je daljša od vulvinega mostu. Močno pigmentiran podmost je pritrjen na steno ciste široko ploščato ali prstasto. Cista, ki je trebušasto razširjena je dolga povprečno 778 μm , široka 556 μm , končuje pa se s topim vulvinim stožcem. Ovojnica ciste je rjava do temno rjava.

Parametralne značilnosti ($dv/II(r) = 1$; $T/a'b' = 2,3$ (1,4-3,8) in modelni opis vulvinega stožca (Hržič, 1980): II projekcija seka dv projekcijo v točkah d in v (na ravni dorzoventralne črte). II projekcija kalote prekriva dv model kalote (slika 26).



Slika 26:
Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija
modela vulvinega stožca zebratove ogorčice (Hržič)

Figure 26:
*Bilateral (II) and dorsoventral (dv) vulval cone
projection of H. galeopsidis (after Hržič)*

Biologija in ekologija

Zebratova ogorčica ima najmanj dva rodova na leto (Decker, 1969). Razmnožuje se partenogenetsko.

Pomen in znamenja napada

Zebratovo ogorčico je leta 1936 odkril Goffart na koreninju navadnega zebrata (*Galeopsis tetrahit* L.) v Turingiji (cit. po Decker, 1969). Omenjeno vrsto zasledimo najpogosteje na navadnem zebratu (*Galeopsis tetrahit*) in vrstah *G. speciosa* Mill., *Stellaria media* L., *Saponaria officinalis* L. in *Veronica agrestis* L., ogorčica pa lahko parazitira tudi vrste iz rodov *Rumex* in *Chenopodium*. Od gojenih rastlin lahko napada le rdečo in belo deteljo, posamezne ciste pa se lahko razvijejo tudi na vrtni pesi in mangoldu.

Razširjenost

O zebratovi ogorčici so po njenem odkritju v Turingiji (Nemčija) poročali še iz Anglije, Nizozemske, Poljske, območja nekdanje Sovjetske zveze, Indije, ciste pa smo našli tudi v naših obdelovalnih tleh.

Pri nas jo lahko glede razširjenosti postavimo ob bok zeljni ogorčici. V obdobju 1980–1992 smo iz tal izločili 3.084 cist vrste *H. galeopsidis* oziroma 6,9 % vseh najdenih cist (Urek in Hrzič, 1993), v letih 1992–1996 pa 678 cist oziroma 4,5 % vseh najdenih cist (Urek in Hrzič, 1997). Razprostranjena je bila v vseh preučevanih območjih. V širšem časovnem razmaku, torej v obdobju 1980–2002, smo od skupnega števila 51.272 izločili 3.673 oziroma 7,2 odstotka cist vrste *H. galeopsidis*.

8.5 *Heterodera cruciferae* Franklin, 1945 – zeljna ogorčica

Od odkritja pesne ogorčice leta 1871 so nematologi kar nekaj časa obravnavali številne najdene ogorčice kot vrsto *Heterodera schachtii*, in sicer ne glede na gostiteljsko rastlino in kasneje odkrite morfološke razlike. Šele kasneje so določeni avtorji začeli posamezne ogorčice medsebojno ločevati (*H. göttingiana*, Liebscher, 1892; *G. rostochiensis*, Wollenweber, 1923). Rezultat tega je bilo med drugim tudi odkritje angleške nematologinje Franklinove, ki je leta 1945 pri poskusih ugotovila, da ogorčice, ki jih je našla na koreninah zelja, ne napadajo sladkorne pese, hkrati pa so bile na novo odkrite ciste tudi nekoliko manjše od cist *H. schachtii*. Opisala je novo vrsto iz rodu *Heterodera*, in sicer

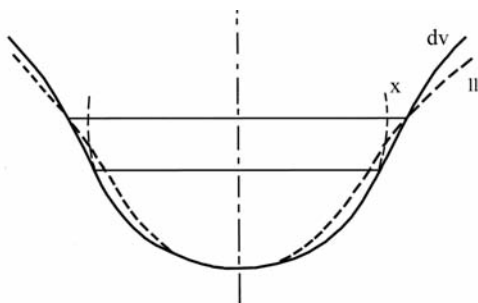
zeljno ogorčico *H. cruciferae*, ki jo je izolirala iz vrste *Brassica oleracea* v St. Albansu v Angliji (cit. po Decker, 1969).

Morfološke značilnosti vrste (izmere so povzete po Brzeskemu, 1998)

Jajčeca so dolga 82-113 μm in široka 40-56 μm . Ličinke merijo 390-520 μm . Preko njihovega telesa potekajo vzdolžno štiri lateralne linije. Glava je hemisferična, nekoliko privzdignjena (se loči od telesa), ponavadi s štirimi obroči, visoka 4-5 μm . Bodalo je dolgo 20-24 μm ; oblika grč je precej raznolika, anteriorno konkavna, okrogla ali ploska. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja 5-7 μm za grčami bodala. Rep je stožčast, se krožno končuje in meri v dolžino 40-56 μm ; hialini del repa je dolg med 43 in 55 % dolžine repa.

Ciste ogorčice *H. cruciferae* so večinoma majhne, dolge (brez vratnega dela) med 380 in 710 μm , široke 300-580 μm , zaokroženo limonastih oblik z majhnim, a različnim vulvinim stožcem. So rdečkasto rjave do temno rjave, ambifenestralne, ovojnica ima razločen cik cak vzorec. Semifenestre so ledvičasto oblikovane, njihovi robovi pa so manj razločni. Vulvin most je zelo ozek. Bul nimajo razvitih (skupina abulata). Podmost je ponavadi navzoč, nežen, prosojen, dolg 90-110 μm in se nahaja tik pod vulvinim mostom.

Parametralne značilnosti ($T/a'b' = 1-2,4$) in modelni opis vulvinega stožca (Hržič, 1980): kalote so plitve z izrazitimi dv konkavitetami. II projekcija kalote in dv projekcija modela imata dolg skupen lok (slika 27).



Slika 27:
Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca zeljne ogorčice (Hržič)

Figure 27:
Bilateral (II) and dorsoventral (dv) vulval cone projection of *H. cruciferae* (after Hržič)

Biologija in ekologija

V nasprotju s številnimi cistotvornimi ogorčicami, ki so razširjene v območjih zmerne pasu, zajeda zeljna ogorčica v glavnem prezimne rastline. Število rodov, ki jih ta vrsta

lahko razvije v enem letu je odvisno od časa saditve oziroma rasti gostiteljskih rastlin. V severnejših območjih Evrope ima ta vrsta letni rod na poleti presajenih rastlinah cvetače in zelja oziroma do tri rodove na poznih kultivarjih brstičnega ohrovta, spomladanske cvetače in spomladanskega zelja (Stone in Rowe, 1976, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Izleganje drugostopenjskih ličink stimulirajo koreninski izločki vrst iz rodu *Brassica*. Ličinke parazitirajo gostiteljske rastline pri temperaturah nad 4 °C.

Pomen in znamenja napada

Obseg gostiteljskih rastlin zeljne ogorčice (*Heterodera cruciferae*) je ožji kot pri pesni ogorčici (*H. schachtii*), očitno pa je, da lahko prva napada vse vrste iz rodu *Brassica*, vključno s pomembnimi gojenimi rastlinami, kot so zelje, brstični ohrovt, cvetača, brokoli, repa in redkev (Franklin, 1945, 1951; Jones, 1950, cit. po Decker, 1969). Križnice, ki ne pripadajo rodu *Brassica* L., so manj občutljive, nekatere na primer kamnice (*Aethionema* R. Br. spp.), nočnice (*Hesperis* L. spp.), šeboji (*Matthiola* R. Br. spp.) pa sploh niso gostitelji zeljne ogorčice (Winslow, 1954, cit. po Decker, 1969). Po nekaterih podatkih ogorčica *H. cruciferae* zajeda tudi nekatere vrste iz družine ustnatic (Lamiaceae) (Whitehead, 1998).

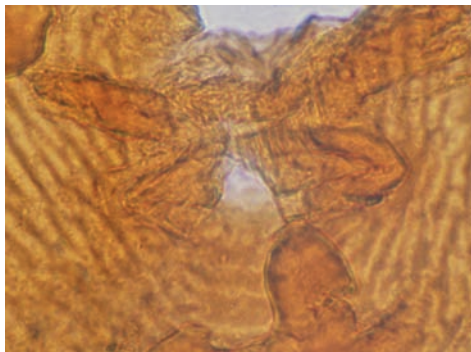
Razširjenost

Zeljna ogorčica (*Heterodera cruciferae*) je precej razširjena v Angliji, kjer je bila tudi prvič opisana (Franklin, 1945), našli pa so jo tudi drugod po Evropi (Irska, Nizozemska, Belgija, Nemčija, Švica, Francija, Portugalska, Bolgarija, Madžarska, Rusija, Hrvaška, Slovenija, Vojvodina). V ZDA so jo našli le v Kaliforniji, njeno navzočnost pa so zabeležili tudi v južni Avstraliji, kamor je bila po predvidevanjih strokovnjakov zanesena iz Evrope, in sicer z lesenimi zaboji in sodi (Stirling in Wicks, 1975, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991).

Glede na rezultate dosedanjega spremljanja cistotvornih ogorčic v naših obdelovalnih tleh sklepamo, da je zeljna ogorčica po razširjenosti v Sloveniji na tretjem mestu. V letih 1980–1992 smo od skupnega števila 30.821 cist iz tal izločili 2.094 vitalnih cist te vrste (6,8 %) (Urek in Hržič, 1993), v obdobju 1980–2002 pa je bila njena zastopanost še nekoliko višja, 7,4 %. Od skupno 51.272 cist smo izločili 3.780 cist vrste *H. cruciferae*.

8.6 *Heterodera göttingiana* Liebscher, 1892 – grahova ogorčica

Leta 1890 je Liebscher s poskusnih polj Kmetijskega inštituta v Göttingenu poročal o propadanju graha (*Pisum sativum*) zaradi navzočnosti pesne ogorčice (Di Vito in Greco, 1986). Kasnejša preučevanja morfologije in biologije navzočega parazita so omenjenega avtorja pripeljala do sklepa, da gre v primeru napadenega graha za povsem novega parazita, za grahovo ogorčico, *Heterodera göttingiana*, Liebscher, 1892. O škodi, ki jo je ta ogorčica povzročala na grahu, so nekaj let pozneje poročali tudi drugi avtorji v Veliki Britaniji (Theobald, 1912) in Franciji (Capus, 1917, 1918) (Di Vito in Greco, 1986). Ogorčica *H. göttingiana*, katere ciste pripadajo skupini limonasto oblikovanih cist, je po obliki najbolj podobna pesni ogorčici, od nje pa se razlikuje predvsem po barvi, pomanjkanju subkutikularne plasti na cisti, velikosti samcev (Krnjajić, 1987), kot tudi po razmerju med dorzoventralno in bilateralno projekcijo vulvinega stožca (Hržič, 1980).



Slika 28:

Notranjost vulvinega stožca grahove ogorčice (*Heterodera göttingiana*)

Figure 28:

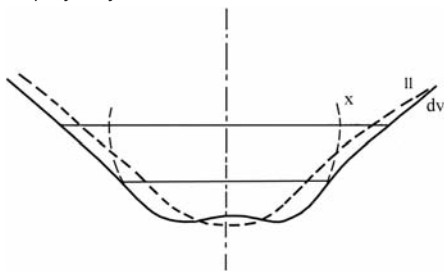
Vulval cone of *Heterodera göttingiana*

Morfološke značilnosti vrste (izmere so povzete po Brzeskemu, 1998)

Jajčeca so dolga 95-122 μm in široka 40-55 μm . Ličinke merijo povprečno 470 μm (370-530 μm). Preko njihovega telesa potekajo vzdolžno štiri lateralne linije. Glava je nekoliko privzdignjena (se loči od telesa), ponavadi z dvema do štirimi obroči. Bodalo, dolgo okoli 24 μm , ima anteriorno zasekane ali okroglo oblikovane grče. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja 5-8 μm za grčami bodala. Rep je stožčast, se krožno, včasih tudi šilasto končuje in meri v dolžino 50-70 μm ; hialini del repa je dolg okoli 49-63 % dolžine repa.

Ciste ogorčice *H. göttingiana* so limonastih oblik z bolj ali manj izboklim vulvinim stožcem. So precej velike, dolge (brez vratnega dela) nad 500 μm in široke 310-600 μm , rdečkasto rjave, bleščče in brez subkristaline plasti. So ambifenestralne. Fenestra je skoraj okrogla, z nerazločnimi robovi, dolga okoli 35 in široka okoli 37 μm . Semifenestra fizioloških do polkrožnih oblik, dolgi okoli 16 μm . Dolžina vulvinega mostu je okoli 33 μm , širina pa okoli 3 μm . Razdalja med fenestralnim robom in analno odprtino je okoli 36 μm . Cirkumfenestralno območje ima značilen vzorec. Podmost se nahaja blizu spolne odprtine, dolg pa je približno 113 μm . Bul nimajo razvitih (skupina abulata).

Parametralne značilnosti in modelni opis vulvinega stožca (Hržič, 1980): dv projekcija vulvine kalote ima izrazito konkavnost na vrhu kalote. bl projekcija kalote seka vrh kalote dv projekcije v dveh točkah (slika 29).



Slika 29:

Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca grahove ogorčice (Hržič)

Figure 29:

Bilateral (II) and dorsoventral (dv) vulval cone projection of *H. göttingiana* (after Hržič)

Biologija in ekologija

Iz jajčec se pod vplivom ugodnih okoljskih dejavnikov in navzočnosti rastlinskih izločkov gostiteljskih rastlin izležejo drugostopenjske ličinke. Optimalna temperatura za izleganje je okoli 15 °C, temperatura nad 25 °C ovira izleganje ličink (Di Vito in Greco, 1986, cit. po CPC Global Module). Za izleganje je pomembna tudi starost gostiteljskih rastlin. Po podatkih Perrya in sod. (1980) vplivajo starejše rastline bolj stimulatивно na izleganje ličink kot mlajše (cit. po CPC Global Module). Potem ko ličinke vstopijo v gostiteljske rastline, se še trikrat levijo in se končno preobrazijo v odrasle osebkke. Minimalna temperatura za razvoj ličink v koreninskem tkivu je po podatkih Beane-a in Perry-a (1984) (cit. po CPC Global Module) okoli 4,4 °C; pod to temperaturo je preobrazba ovirana.

Samci se pojavljajo sorazmerno pogosto, na njihov pojav in pogostnost pa vplivajo okoljski dejavniki (Guevara-Benitez s sod., 1970, cit. po CPC Global Module). Pojavijo se približno dva meseca zatem, ko so ličinke napadle gostiteljske rastline, populacijski vrh

pa dosežejo približno štiri mesece potem. Podobno kot samci drugih vrst iz rodu *Heterodera* se tudi samci grahove ogorčice ne prehranjujejo, služijo le za oploditev samic in po dveh do treh tednih poginejo.

Samice ostanejo pritrjene na korenine, nabreknejo in prebijejo povrhnjico korenin, na katerih počakajo na oploditev. Spolno zrele samice so bele, po oploditvi pa porjavijo, odmrejo in se spremenijo v ciste. V ugodnih razmerah, kot so ustrezna vlažnost tal, navzočnost gostiteljskih rastlin in talne temperature med 13 in 15 °C, lahko samice izležejo tudi več kot sto jajčec v jajčno vrečko (matriks). Če so okoljske razmere neugodne, se jajčna vrečka ne oblikuje in jajčeca ostanejo zavarovana v cistah.

Število rodov grahove ogorčice je odvisno od okoljskih dejavnikov. V toplejših območjih je število rodov večje; tako so na primer v južni Italiji Di Vito in sod. (1974) poročali o treh rodovih, medtem ko je Jones (1950) v Veliki Britaniji ugotovil enega, redkeje dva rodova letno (cit. po CPC Global Module). Vitalnost cist oziroma število živih jajčec v cistah z leti upada, vendar lahko ciste, v katerih naletimo na živa jajčeca, v tleh zdržijo tudi do dvanajst let (Di Vito in Greco, 1986). Ciste ostanejo vitalne v tleh toliko let tudi ob odsotnosti gostiteljskih rastlin (Brown, 1958, cit. po CPC Global Module).

Pomen in znamenja napada

Vrsta *Heterodera göttingiana* zajeda številne metuljnice (Fabaceae) kot so: navadni grah (*Pisum sativum* L.), bob (*Vicia faba* L.), soja (*Glycine max*. L. (Merr.), navadna leča (*Lens culinaris* Med. ssp. *culinaris*), grahorji (*Lathyrus* L. spp.), vključno s samoniklimi vrstami (Jones, 1950; Winslow, 1954; Goodey, 1965, cit. po Di Vito in Greco, 1986). Poleg že naštetih rastlinskih vrst, pa je grahova ogorčica (CPC Global Module, CAB International) omenjana tudi v povezavi z navadno čičeriko (*Cicer arietinum* L.), belim volčjim bobom (*Lupinus albus* L.), *Lupinus luteus*, lucerno (*Medicago sativa* L.), vrstama *Pisum sativum* L. var. *arvense* in *Vicia benghalensis*, ptičjo grašico (*Vicia cracca* L.), lečnato grašico (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) in vrsto *Vicia calcarata*. Di Vito je leta 1976 poročal o navzočnosti omenjene vrste na koreninju njivske perle (*Asperula arvensis* L.), ki ne spada med metuljnice (cit. po Di Vito in Greco, 1986).

Posledice napada grahove ogorčice se na njivi, podobno kot pri drugih cistotvornih ogorčicah, odražajo v obliki manjših krožnih depresij, ki se nato razširijo na celotno njivo.

Močni napadi lahko povzročijo popolno izgubo pridelka. Napadene rastline postopoma venejo in rumenijo. Stroki graha so pri šibkejših napadih manjši, vsebujejo le malo zrn, pri močnejših napadih pa rastline strokov sploh ne oblikujejo. Koreninje je slabo razvito, prav tako je slabo razvita nodulacija z *Rhizobium* spp., ki lahko popolnoma izostane (Oostenbrink, 1955; Moriarty, 1962, cit. po Di Vito in Greco, 1986).

Razširjenost

Grahova ogorčica je razširjena skoraj povsod po svetu. O njeni navzočnosti so poročali iz Nemčije (Goffart, 1941), Nizozemske (Oostenbrink, 1951), Velike Britanije (Jones, 1965), Belgije (D'Herde, 1966), Sovjetske zveze (Kirjanova in Krall, 1971), Španije (Jimenez, 1962), Portugalske (Macara, 1963), Francije (Cayrol, 1961), Italije (Garofolo, 1964; Di Vito s sod., 1973; D'Errico s sod., 1975; Sicilije (Marinari-Palmisano in Cavalli, 1982, cit. po Di Vito in Greco, 1986), prejšnje Jugoslavije (Alphey in Ivezić, 1985; Krnjajić, 1987), zasledili pa so jo tudi v ZDA (Thorne, 1961), Izraelu (Cohn, 1975), Alžiriji in Malti (Lamberti in Dandria, 1979) ter Libiji (Pucci, 1965, cit. po Di Vito in Greco, 1986). Navzoča je tudi v Sloveniji.

Po razširjenosti lahko grahovo ogorčico pri nas razvrstimo tik za zeljno in zebatovo, saj je v obdobju 1980–1992 zasedala peto mesto s 4,4 odstotnim deležem (Hržič in Urek, 1991; Urek in Hržič, 1993). Odstotni delež te vrste ostaja v preučevanem obdobju 1980–2002 skoraj enak, 4,2 %. Od skupnega števila 51.272 cist smo iz tal izločili 2.156 cist *H. göttingiana*.

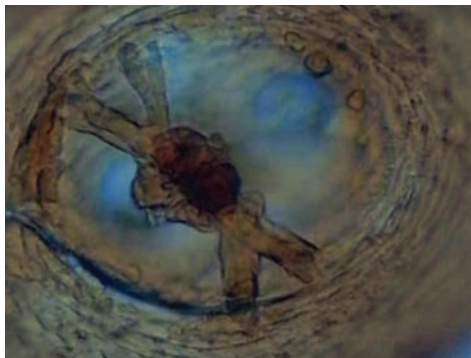
8.7 *Heterodera humuli* Filipjev, 1934 – hmeljeva ogorčica

Prva poročila o navzočnosti cist na koreninju hmelja pripisujejo Voigtu (1894) in Percivalu (1895, cit. po Decker, 1969).

Morfološke značilnosti vrste (izmere so povzete po Brzeskemu, 1998)

Jajčeca so dolga 80-110 µm in široka 33-55 µm. Ličinke merijo 320-480 µm. Preko njihovega telesa potekajo vzdolžno štiri lateralne linije. Glava je nekoliko privzdignjena (se loči od telesa), ponavadi s tremi ali štirimi obroči. Bodalo, dolgo med 21 in 25 µm, s skodeličasto ali sidrasto oblikovanimi, naprej usmerjenimi grčami. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja okoli 3-7 µm za grčami bodala. Rep je stožčast, se krožno,

včasih tudi šilasto končuje in meri v dolžino 42-58 μm ; hialini del repa je dolg 49-67 % dolžine repa.

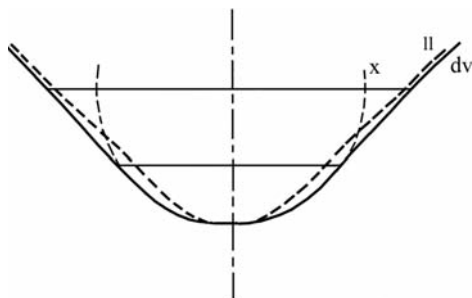


Slika 30:
Notranjost vulvinega stožca hmeljeve ogorčice
(*Heterodera humuli*)

Figure 30:
Vulval cone of *Heterodera humuli*

Ciste ogorčice *H. humuli* so limonastih oblik z bolj ali manj izboklim vulvinim stožcem. So večinoma majhne, dolge 240-760 μm in široke od 100 in 600 μm , motno, svetlo rumeno rjave, s subkristalino plastjo. So bifenestralne in imajo tanko ovojnico. Nimajo bul ali pa so le-te precej redke (skupina *abulata*). Dolžina fenester je 44-76 μm , širina pa 16-36 μm .

Parametralne značilnosti ($T/a'b' = 4-10$) in modelni opis vulvinega stožca (Hržič, 1980): dv kontura kalot je plitva. II projekcija kalote in dv projekcija modela kalote imata kratek skupni lok (slika 31).



Slika 31:
Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija
modela vulvinega stožca hmeljeve ogorčice (Hržič)

Figure 31:
Bilateral (II) and dorsoventral (dv) vulval cone
projection of *H. humuli* (after Hržič)

Biologija in ekologija

Hmeljeva ogorčica ima v eni rastni sezoni dva do tri rodove. Razvoj enega rodu traja približno mesec in pol. Optimalna temperatura za razvoj te vrste je okoli 20 °C. Drugostopenj-

ske ličinke so najagresivnejše in zajedajo korenine hmelja pri temperaturah okoli 15 °C, izleganje ličink iz jajčec pa je najintenzivnejše pri 20 °C. V ugodnih okoljskih razmerah oziroma v zadosti vlažnih tleh lahko preživijo ličinke okoli 54 dni; nato vstopijo v koreninsko tkivo, kjer se preko treh levitev preobrazijo v odrasle osebkke (Von Mende in McNamara, 1995).

Pomen in znamenja napada

Poročila o znamenjih napada cistotvornih ogorčic na hmelju izvirajo iz leta 1895 (Percival, cit. po Decker, 1969). Glede na to, da je bila takrat znana le pesna ogorčica, so tovrstne napade pripisovali prav njej. Danes je znano, da vrsta *H. humuli* napada predvsem razne kultivarje hmelja (*Humulus lupulus*). Napadene rastline zaostajajo v rasti, so svetlejšje, pridelki pa so okrnjeni.

Gostiteljske rastline hmeljeve ogorčice so navadna konoplja (*Cannabis sativa* L.), navadni hmelj (*Humulus lupulus* L.) in velika kopriva (*Urtica dioica* L.). Večje gospodarske škode ne povzročā.

Razširjenost

Vrsta *Heterodera humuli* je razširjena v Angliji, vseh zahodno- in srednjeevropskih državah, na območju bivše SZ, v ZDA, Kanadi, južni Afriki in na Novi Zelandiji.

V Sloveniji je izredno razširjena, pojavlja pa se predvsem na območjih, kjer pridelujejo oziroma so pridelovali hmelj (Savinjska dolina, Koroška). V obdobju 1980-1992 je bilo število izločenih cist hmeljeve ogorčice (17.820) celo nekoliko večje od števila izločenih cist pri nas najbolj razširjene vrste, *Heterodera trifolii* (17.483) (Urek in Hržič, 1993). To je bila posledica odvzema večjega števila talnih vzorcev iz območij, kjer se prideluje hmelj, v katerih je bila pojavnost cist hmeljeve ogorčice izrazita in prevladujoča. Zaradi tega je bil delež najdenih cist hmeljeve ogorčice tudi v obdobju 1992-1996 zelo visok in je znašal kar 59 odstotkov. Tudi v obdobju 1980-2002 zavzemajo ciste hmeljeve ogorčice v razmerju do drugih pomemben delež. Iz talnih vzorcev smo izločili 18.950 cist, kar pomeni, da je bila zastopanost hmeljeve ogorčice sorazmerno velika in je znašala skoraj 37 odstotkov.

8.8 *Heterodera carotae* Jones, 1950 – korenčkova ogorčica

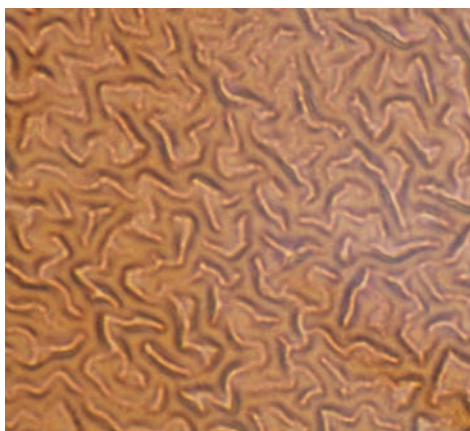
Preden so ugotovili, da tako imenovano oslabelost korenčka povzročā ogorčica *H. carotae*, so omenjeno bolezen pripisovali patogenim glivam. Leta 1931, ko so še skoraj vse

ciste obravnavali kot različke vrste *H. schachtii*, je Trifft poročal iz Anglije o samicah cistotvornih ogorčic na korenčku (*Daucus carota*). Te so se nekoliko razlikovale od do tedaj znanih cist vrste *H. schachtii*, kajti bile so neprimerno manjše, imele pa so občutno večje jajčne vrečke (cit. po Greco, 1986). Leta 1944, ko je Jones odkril korenčkovo ogorčico (*H. carotae*), so bili številni različki *H. schachtii* sensu lato opisani kot morfološko povsem različne vrste (cit. po Greco, 1986). Natančnejši morfološki pregled cist korenčkove ogorčice so opravili na cistah izvorne gostiteljske rastline (*Daucus carota*) z otoka Ely v Angliji (Jones, 1955) (cit. po Greco, 1986).

Morfološke značilnosti vrste (izmere so povzete po Brzeskemu, 1998)

Jajčeca so dolga 96-120 μm in široka 42-53 μm . Ličinke merijo 370-470 μm . Vzduž telesa potekajo štiri lateralne linije. Glava je rahlo privzdignjena (se loči od telesa), s štirimi, slabo izraženimi obroči. Bodalo, dolgo 22-25 μm , z anteriorno ravnimi, konkavnimi ali zaokroženimi grčami. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja okoli 4-7 μm za grčami bodala. Rep je stožčast, se krožno končuje in meri v dolžino 43-59 μm ; hialini del repa zajema 45-58 % dolžine repa.

Ciste ogorčice *H. carotae* so svetlo rjave, limonasto oblikovane, s subkristalino plastjo. Dolge (brez vratnega dela) so 220-620 μm in široke 160-500 μm . Vzorec ovojnice je izrazito cikcakast. Vulvin most je ozek, bul ni, podmost je tanek in nežen. Dolžina fenester je 27-52 μm , širina pa 35-50 μm .



Slika 32:

Notranje površine ovojnice ciste korenčkove ogorčice (*H. carotae*)

Figure 32:

Pattern of cuticle of *Heterodera carotae*

Biologija in ekologija

Korenčkova ogorčica zahteva specifične temperaturne razmere. Pogostokrat ima ta vrsta letno le en rod, včasih, predvsem takrat, ko je rastna sezona dolga in se na rastišču zvrsti zaporedoma več gostiteljskih vrst, pa lahko razvije tudi do štiri rodove (Jones, 1950; Stelter, 1969; Greco, 1986; Mugniery in Bossis, 1988, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Drugostopenjske ličinke, ki parazitirajo gostiteljske rastline, se izležejo iz jajčec, ki jih samice izležejo (ponavadi okoli 160) v jajčno vrečko, matriks. Za izleganje ličink morajo biti zagotovljene ustrezne razmere, stimulirajoči koreninski izločki, zadostna vlažnost in temperatura tal med 15 in 20 °C. Pomembna je tudi starost cist, saj se ličinke iz jajčec manj kot dva meseca starih cist redkokdaj izležejo. Parazitiranje rastlinskega tkiva sicer poteka pri temperaturah od 5 do 30 °C, a ličinke se ne razvijajo pri temperaturah pod 10 °C. Celoten življenjski krog korenčkove ogorčice traja 26 dni pri temperaturi 20 °C (Greco, 1986; Volvas, 1978, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991).

Pomen in znamenja napada

V primerjavi z večino drugih cistotvornih ogorčic je lista gostiteljskih rastlin korenčkove ogorčice precej kratka. Jones (1950) je na temelju svojih opazovanj ugotovil, da se kot gostiteljski vrsti ogorčice *H. carotae* pojavljata le gojeno in samoniklo korenje (*Daucus carota* L.), Winslow (1954) pa kot gostiteljsko rastlino navaja tudi vrsto *D. pulcherrimus* (cit. po Greco, 1986). Leta 1980 je Vallotton ugotovil, da lahko ogorčica *H. carotae* sklene celotni razvojni krog tudi na nekaterih vrstah družine koblunic (Apiaceae), kakršni sta na primer njivska oklobnica *Torilis arvensis* (Huds.) Link. in japonska oklobnica (*T. japonica* (Houtt.) DC.). Isti avtor je povzel tudi ugotovitve Mugnieryja, ki trdi, da se obravnavana ogorčica razvije tudi na vrsti *T. leptophylla* (cit. po Greco, 1986). Po nekaterih podatkih (CPC, CAB International) zajeda obravnavana ogorčica tudi divje oljke (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*).

Po podatkih Oostenbrinka (1955) korenčkova ogorčica ni posebej problematična, čeprav jo na Nizozemskem pogostokrat neposredno povezujejo z oslabeledstjo korenčka (cit. po Greco, 1986). Oudinet in sod. (1962) trdijo, da povzročča vrsta *H. carotae* precejšnjo škodo v Bretaniji in Normandiji (Francija), njeno navzočnost pa so ugotovili kar v 60 % obdelovalnih tal, na katerih so pridelovali korenček (Oudinet, 1968, cit. po Greco, 1986). Iz Švice,

natančneje iz območij Martigny in Saillon, izvirajo podatki iz leta 1973 (Vallotton, 1980) o hudih napadih ogorčice *H. carotae* oziroma o povezanosti ogorčic z zaostajanjem rasti korenčka (cit. po Greco, 1986). Tudi iz Italije (Ambrogioni, 1969; Lamberti, 1971; Tacconi, 1976) in Nemčije (Sturhan, 1960; Decker, 1968) prihajajo podatki o precej močnih napadih korenčkove ogorčice na korenčku (cit. po Greco, 1986).

Razširjenost

Korenčkovo ogorčico (*H. carotae*) lahko najdemo v skoraj vseh pridelovalnih območjih korenčka v Evropi (Anglija, Irska, Škotska, Nizozemska, Francija, Italija, Švica, Nemčija, Švedska, Češka, Madžarska (Mathews, 1975; Greco, 1986), o njeni navzočnosti pa so poročali tudi iz bivše Sovjetske zveze, Cipra, Indije (Greco, 1986) in Michigana (Graney, 1985, cit. po Greco, 1986).

Korenčkova ogorčica je pri nas sorazmerno redka. V obdobju 1980-1992 je bila njena zastopanost glede na vse takrat izločene in določene vrste komaj 1-odstotna (Urek in Hržič, 1993). V letih 1992-1996 smo iz tal izločili le 21 (Urek in Hržič, 1997), v obdobju 1997-1999 pa le 11 cist ogorčice *H. carotae*, kar je manj kot 0,5% vseh najdenih cist. V celotnem, več kot dvajsetletnem obdobju, 1980–2002, smo v obdelovalnih tleh Slovenije našli skupno 908 cist korenčkove ogorčice, kar predstavlja skoraj 1,8 odstotka vseh najdenih cist.

8.9 *Punctodera punctata* (Thorne, 1928) – travna ogorčica

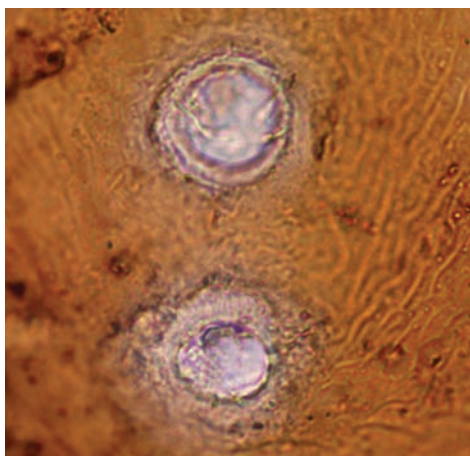
Travna ogorčica pripada rodu *Punctodera*, katerega ciste so hruškasto oblikovane. Zanje je značilen cirkumfenestralni tip fenester; obe fenestri sta enako veliki, ena obdaja spolno (vulvo), druga pa analno odprtino. Poleg vrste *P. punctata* pripadata temu rodu tudi vrsti *P. matadorensis* in *P. chalconensis*; leta 1998 pa je Brzeski opisal tudi vrsto *P. stonei*. Vrsto *Punctodera punctata* so prvič izločili iz vzorcev tal, odvzetih z njive v Saskatchewanu v Kanadi, na kateri je rasla pšenica (Thorne, 1928) (cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991).

Morfološke značilnosti vrste: (izmere so povzete po Horne-u, 1965, cit. po CPC Global Module)

Jajčeca so dolga 100-130 (118) μm in široka 40-50 (46) μm . Ličinke merijo 510-570 (540) μm . Vzdolž telesa potekajo štiri lateralne linije. Glava je rahlo privzdignjena (se loči od

telesa), s štirimi obroči. Bodalo, dolgo 24-32 μm , ima sidrasto oblikovane, naprej usmerjene grče. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja okoli 4-7 μm za grčami bodala. Rep je stožčast, se koničasto končuje in je dolg 68-93 (80) μm ; hialini del repa meri 51-60 (54) μm .

Ciste ogorčice *P. punctata* so hruškasto ali stekleničasto oblikovane, posteriorni del je zaokrožen, vulvin stožec ni razvit. So temno rumene do rjave barve. Dolge (brez vratnega dela) so 330-420 (370) μm in široke 170-320 (236) μm ; vratni del je dolg 110-150 (123) μm . Vzorec ovojnice je sestavljen iz številnih naključno potekajočih točkastih linij; okoli fenester je ovojnica včasih nekoliko bolj razbrazdana oziroma valovita, okoli njih potekajo tako imenovani grebeni. Na terminalnem delu ciste se nahajata dve enako veliki fenestri. Razdalja med njima je za približno 1,5 premera posamezne fenestre. Podmostu nimajo, bule niso razvite.



Slika 33:

Spolno analni predel vrste *Punctodera punctata*

Figure 33:

The perineal region of Punctodera punctata

Biologija in ekologija

Drugostopenjske ličinke se, vzpodbujene s strani koreninskih izločkov gostiteljskih rastlin, izležejo spomladi, ko se tla nekoliko ogrejejo. Deset do 14 dni po izleganju zapustijo ciste, v katerih so v obliki jajčec prezimile, poiščejo gostitelja, se zapičijo vanj in vstopijo v korenine. Kmalu po vstopu v korenine se začnejo prehranjevati na parenhimskih celicah prevodnega tkiva. Med prehranjevanjem postanejo ličinke negibne in pričnejo izločati snovi, ki razgrajujejo celične membrane, pri čemer prizadete celice hipertrofirajo in se

medsebojno zlivajo. Oblikujejo se tako imenovane gigantske celice oziroma sincicij, večjedrna masa protoplazme, s katero se prehranjujejo ličinke. Ličinke pričnejo nabrekati in se preko nadaljnjih treh levitev preobrazijo v odrasle osebkke. Samice postanejo nabrekle, hruškaste, samci pa črvasti. Ob nabrekanju ličink, ki se preobrazijo v samice počí koreninsko tkivo, ličinke ostanejo z glavo pritrjene na prehranjevalnem mestu, preostanek telesa pa se osvobodi iz koreninskega tkiva.

Samci in samice se v Evropi začnejo pojavljati proti koncu junija, populacijski vrh pa nastopi v juliju. Razmnoževanje je amfimiksično, samci oplodijo samice. Samice ne oblikujejo jajčnih vrečk, jajčeca (okoli 250) ostanejo znotraj samic. Po odmrtnju samic nastanejo ciste, v katerih so jajčeca zavarovana pred neugodnimi okoljskimi dejavniki. Mesec dni po odmrtnju samic oziroma nastanku cist jajčeca dozoriijo, nastanejo ličinke prve razvojne stopnje. Po prvi levitvi, ki poteka znotraj jajčec se oblikujejo drugostopenjske ličinke, ki vzpodbujene s strani koreninskih izločkov gostiteljskih rastlin pričnejo parazitsko fazo te vrste naslednjo pomlad.

Vrsta *P. punctata* je v Evropi vezana predvsem na trajne travnike. Odgovarjajo ji vlažna, a zračna peščena tla. Občutljive so na sušo (Webley in Lewis, 1977, cit. po CPC Global Module). Populacijo te vrste prizadene intenzivna obdelava tal in odsotnost gostiteljskih rastlin.

Pomen in znamenja napada

Najpomembnejše gostiteljske rastline te vrste so: enoletna latovka (*Poa annua* L.), travniška latovka (*Poa pratensis* L.), angleška ljuljka (*Lolium perenne* L.), rdeča bilnica (*Festuca rubra* L.), *Agrostis palustris*, plazeča šopulja (*Agrostis stolonifera* L.), lasasta šopulja (*Agrostis palustris* L.), napada pa lahko tudi pšenico (*Triticum vulgare* L.), oves (*Avena sativa* L.) in ječmen (*Hordeum vulgare* L.).

Webley in Lewis (1977) trdita, da travna ogorčica na poljih ne povzroča gospodarske škode (CPC Global Module), Thorne in Malek (1968) pa menita, da ob prerasmnožitvah oziroma pri visokih populacijah te vrste, posebej na pšenici, ki jo sejemo na polja, ki so bila predhodno zasejana s travami (travniki), lahko povzroči določene poškodbe. Sčasoma se stanje normalizira in poškodbe oziroma simptomi z leti izginejo. Brzeski (1971) je s sodelavci, podobno kot Horne (1965), v ZDA zapažal določene nekroze in venenje

travniške latovke, ki naj bi bilo posledica parazitiranja travne ogorčice (CPC Global Module).

Razširjenost

Travna ogorčica je razširjena po vsej Evropi. Poročila o njeni navzočnosti prihajajo iz več kot dvajsetih evropskih držav. O njeni navzočnosti so poročali tudi iz Azije (Japonska, Izrael), Afrike (Maroko), Južne Amerike (Argentina, Čile), Mehike, ZDA in Kanade (CPC - Global Module, CAB International).

V Sloveniji smo na vrsto *P. punctata* v manjšem obsegu naleteli skoraj vsako leto. V obdobju 1980–1992 smo iz talnih vzorcev, odvzetih s skupne površine 4.700,4 ha obdelovalnih tal, izločili skupno 44.942 cist, med katerimi jih je le 451 oziroma 1 % pripadalo vrsti *P. punctata* (Urek in Hržič, 1993), v obdobju 1992-1996 pa je bila zastopanost te vrste le 0,8 % (Urek in Hržič, 1997). Razmere se v zadnjem, triletnem, pregledovalnem obdobju niso bistveno spremenile. Iz tal smo izločili le 14 tovrstnih cist, kar predstavlja okoli 0,6 % vseh, med letoma 1997 in 1999 izločenih cist. Delež izločenih cist ogorčice *P. punctata* v obdobju 1980–2002 je bil okoli 1-odstoten, skupno smo iz tal izločili 495 cist te vrste.

8.10 *Globodera achilleae* (Golden & Klindić, 1973) - rmanova ogorčica

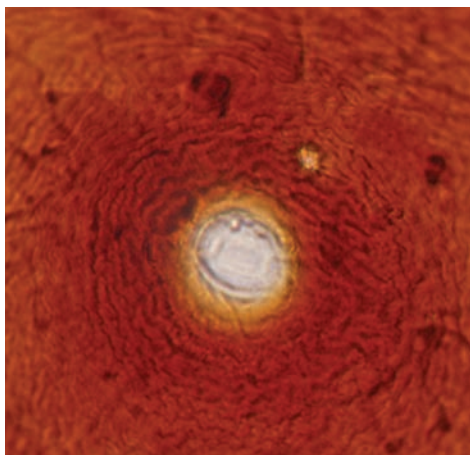
Prvo poročilo o odkritju rmanove ogorčice sega v leto 1973, ko sta Golden in Klindićeva iz vzorcev tal, pobranih v okolici Fojnice na območju Bosne in Hercegovine, izločila in opisala takrat novo vrsto iz skupine cistotvornih ogorčic z okroglimi cistami (Golden in Klindić, 1973). Omenjena avtorja navajata kot gostiteljsko rastlino navadni rman (*Achillea millefolium* L.). Leta 1974 sta Klindićeva in Petrović poročala o razširjenosti vrste *Heterodera* (*Globodera*) *achilleae* na območju Bosne (Fojnica), Hrvaške (Žumberak, Delnice) in Slovenije (Sorško polje).

Morfološke značilnosti vrste (izmere, razen za jajčeca, so povzete po Urek s sod., 2002)

Jajčeca so dolga 96-119 µm in široka 44-56 µm (Brzeski, 1998). Ličinke so v relaksiranem stanju rahlo upognjene, dolge so 472-519 µm. Na bočni strani telesa potekajo štiri lat-

eralne linije. Glava je privzdignjena, od telesa se loči z izrazitim utorom; s štirimi do petimi (včasih tudi tremi) obroči. Bodalo je dolgo 23,7-27 μm . Grče bodala so spredaj zaokrožene. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja okoli 5-8 μm za grčami bodala. Rep je dolg 48,6-53 μm , stožčast, zaokrožen. Hialini del repa meri 21-26,4 μm .

Ciste ogorčice *G. achilleae* so podobno kot ciste krompirjevih ogorčic okrogle, brez vulvinega stožca. So svetlo rjave do rjave. V dolžino (brez vratu) merijo 370-581 μm , v širino pa 271-545 μm . Vrat cist je razločen, raven ali delno upognjen. Ovojnica ciste blizu fenestre je nagubana; med fenestro in analno odprtino se nahaja med 5 in 6 kutikularnih grebenov. Imajo cirkumfenestralni tip fenestre, ki obdaja spolno odprtino; pri starih cistah je vidna le odprtina, brez kakršnih koli struktur. Premer fenestre je med 13,6 in 16,5 μm . Analna odprtina se nahaja na dorzalni strani vulve. Analna fenestracija ne obstaja. Bule niso navzoče. Razdalja med fenestro in analno odprtino je 21,5-37,7 μm . Granekovo razmerje (razmerje med razdaljo fenestre in analno odprtino ter premerom fenestre) je 0,9-1,4.



Slika 34:

Spolno analni predel vrste *G. achilleae*

Figure 34:

The perineal region of *G. achilleae*

Biologija in ekologija

Vrsta *Globodera achilleae* v eni rastni dobi razvije najmanj dva rodova. V ugodnih razmerah se v jesenskem času lahko oblikuje tudi manjše število cist tretjega rodu, v katerih pa je manjše število jajčec. Ciste prvega rodu se pojavijo predvidoma v maju

(Klindić in Petrović, 1974), ciste drugega rodu pa približno mesec in pol kasneje. Izleganje ličink iz jajčec stimulirajo izločki korenin gostiteljskih rastlin, rmana. Tovrstno izleganje se pojavlja, v nasprotju z izleganjem ličink pri krompirjevih ogorčicah, kjer pride do izleganja le v primeru starih, dozorelih cist, pri sorazmerno mladih cistah (Klindić in Petrović, 1974); prihaja do spontanega izleganja ličink že v zimskem času, posledica česar je verjetno izločanje sorazmerno slabo vitalnih cist (z manjšim številom jajčec) iz vzorcev tal med rastno dobo.

Pomen in znamenja napada

Rmanova ogorčica je sorazmerno redka in po doslej znanih podatkih zajeda rman *Achillea millefolium* L. in še nekatere vrste iz družine Compositae: *Achillea abrotanoides* Vis., *Chrysanthemum macrophyllum* W.K., *Matricaria chamomilla* L., *M. indora* L. in *Anthemis cotula* L. (Klindić in Petrović, 1974). Z gospodarskega stališča je nepomembna.

Razširjenost

V Sloveniji naletimo na ciste rmanove ogorčice sorazmerno redko. Iz rezultatov večletnega sistematičnega spremljanja razširjenosti cistotvornih ogorčic je razvidno, da smo v obdobju 1980-1992 izločili iz vzorcev tal vsega skupaj 205 cist, ki so pripadale vrsti *G. achilleae*, kar je v razmerju do skupnega števila izločenih cist predstavljalo 0,5-odstotno zastopanost (Urek in Hrzič, 1993). V letih 1992-1996 smo iz tal izločili le 6 cist te vrste (Urek in Hrzič, 1997). Razmere se v sklopu tovrstnih preučevanj v zadnjih letih niso bistveno spremenile. V obdobju 1996-1999 smo iz vzorcev obdelovalnih tal izločili le eno tovrstno cisto. V celotnem preučevanem obdobju, 1980–2002, smo iz vzorcev tal izločili 217 cist ogorčice *G. achilleae*, kar predstavlja 0,4 % vseh izločenih cist.

SUMMARY

Description of cyst nematodes discovered in Slovenia

Morphology, biology, host plants, symptoms of infestations and pathogenicity and distribution of eight Heterodera, one Punctodera and one Globodera (G. achilleae) species discovered in Slovenia are discussed in this chapter. The genus Heterodera is widely distributed and detected in most Slovenian districts. Heterodera trifolii is the most common species in Slovenia. Beside it, seven other species of the genus Heterodera: H. schachtii, H. cruciferae, H. göttingiana, H. galeopsidis, H. avenae,

H. humuli and *H. carotae* have been described from the arable soil in Slovenia. In addition to *Heterodera* species *Punctodera punctata*, which is rather infrequent, and yarrow nematode *Globodera achilleae* were discovered in Slovenia. The cysts of yarrow nematode are restricted to only few districts within central and north eastern Slovenia.

9 KROMPIRJEVE OGORČICE – POSEBNI DEL

9.1 ***Globodera rostochiensis* (Woll., 1923) Behrens, 1975 – rumena krompirjeva ogorčica in *Globodera pallida* (Stone, 1973 Behrens, 1975) – bela krompirjeva ogorčica**

Krompirjeve ogorčice prištevamo v skupino najnevarnejših fitofagnih organizmov, ki lahko v pridelovalnih območjih krompirja resno ogrozijo pridelavo te, v številnih območjih izredno pomembne gojene rastlinske vrste. Taksonomsko uvrščamo krompirjeve ogorčice (*G. rostochiensis* in *G. pallida*) v rod *Globodera*, v katerem je poleg omenjenih vrst trenutno vključenih še dvanajst, gospodarsko manj pomembnih predstavnikov te skupine organizmov. Prva poročila o napadenosti krompirja s strani cistotvornih ogorčic segajo v leto 1881, v obdobje, ko so še vse cistotvorne ogorčice obravnavali kot vrsto *H. schachtii*. Krompirjeve ogorčice na začetku 19. stoletja po mnenju Franklinove (1951) še niso bile razširjene, saj so tedanji avtorji obravnavali rastline iz družine Solanaceae kot neobčutljive za cistotvorne ogorčice (cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Na začetku 20. stoletja pa so krompirjeve ogorčice postale znane po vsej Evropi in številni avtorji so tedaj trdili, da obstaja najmanj ena rasa vrste *H. schachtii*, ki lahko napada krompir in povzroča tako imenovano »talno obolenost krompirja« (Spears, 1968, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Leta 1923 je Wollenweber ugotovil morfološke razlike med ogorčicami, ki so napadale krompir oziroma sladkorno peso. Predlagal je imenovanje posebne vrste, *Heterodera rostochiensis*. Kljub njegovim ugotovitvam so številni avtorji omenjeno ogorčico takrat še vedno obravnavali kot podvrsto ogorčice *H. schachtii*, in sicer vse do leta 1940, ko je Franklinova objavila natančnejši morfološki opis vrste *H. rostochiensis* (cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991).

Zanimanje za krompirjevo ogorčico se je z njenim širjenjem v različna pridelovalna območja krompirja od takrat naprej stopnjevalo. Leta 1972 je Stone ugotovil še drugo vrsto krompirjeve ogorčice, *H. pallida* (cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Za obe sorodni vrsti je značilna okrogla oblika cist oziroma odsotnost terminalne kalote. Leta 1976 sta Mulvey in Stone potrdila ugotovitve Behrensa (1975), ki je povzdignil okrogle ciste,

vključno z vrstama *H. rostochiensis* in *H. pallida*, na rodovno raven in utemeljil rod *Globodera* (*G. rostochiensis*, *G. pallida*) (cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991).



Slika 35:

Ciste krompirjeve ogorčice (*Globodera rostochiensis*) na koreninah krompirja

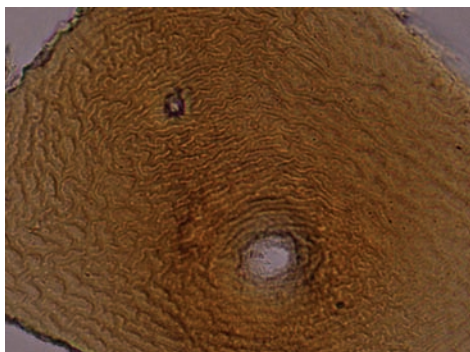
Figure 35:

Cysts of Globodera rostochiensis on the potato roots

9.2 Morfološke značilnosti

Rumena krompirjeva ogorčica, *Globodera rostochiensis* (izmere so povzete po različnih avtorjih - tabela 2): Jajčeca so dolga 95-115 μm in široka 42-48 μm (Brzeski, 1998). Ličinke so v relaksiranem stanju ravne ali rahlo upognjene. Na bočni strani telesa potekajo štiri lateralne linije. Glava je nekoliko privzdignjena (se loči od telesa), ima štiri do šest obročev. Bodalo je robustno. Grče bodala so spredaj zaokrožene, dorzalno pa so poševno usmerjene nazaj. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja okoli 4-7,5 μm za grčami bodala. Rep je stožčast, zaokrožen.

Ciste ogorčice *G. rostochiensis* so okrogle, brez vulvinega stožca. Na prehodu iz belih zrelih samic se preko rumeno obarvanih, mladih cist spremenijo v temno rjave zrele ciste. Vzorec ovojnice med spolno in analno odprtino oblikujejo bolj ali manj vzporedni kutikularni grebeni. Imajo cirkumfenestralni tip fenestre, ki obdaja spolno odprtino; pri starih



Slika 36:

Krompirjeva ogorčica (*Globodera rostochiensis*) - spolno analni predel ciste

Figure 36:

Posterior end of potato cyst nematode G. rostochiensis

Morfološke značilnosti / <i>Morphological characteristics</i>	Urek s sod., 2002	Mulvey, 1972	Stone, 1973	Golden & Ellington, 1972	Baldwin & Mundo-Ocampo, 1991	Golden, 1986	Fleming & Powers, 1988	Brzeski, 1998
CISTE / CYSTS								
Dolžina ciste / <i>Cyst length (µm)</i>	355-820	360 - 650	445 ± 50	450 - 990	440
Širina ciste / <i>Cyst width (µm)</i>	292-792	310 - 550	382 ± 51	250 - 810	250-810
Premer fenestre / <i>Fenestra diameter (µm)</i>	10,3-21,7	10 - 30 (dot.) 12 - 20 (str.)	18,8 ± 2,2	8,0 - 20,0	8 - 20 (< 19)	15 (8 - 20)
Razdalja med fenestro in anusom / <i>Distance fenestra to anus (µm)</i>	42,5-81,2	...	60 (37 - 77)	68 (29 - 116)	37 - 77 (> 55)	29 - 116
Grmekovo razmerje / <i>Grmek's ratio</i>	1,9-4,7	3,7 (1,29 - 9,5)	3,6 ± 0,8	4,5 (2,0 - 7,0)	4,5 (1,3 - 9,5)	4,5	1,3 - 9,5 (> 3)	2,0 - 7,0
Št. kutikularnih grebenov med vulvo in anusom / <i>No. of cuticular ridges between vulva and anus</i>	12-22	...	21,5 (16 - 31)	...	22 (16 - 31)	21,6 (16 - 31)	12 - 31 (> 14)	21,6 (16 - 31)

Tabela 2:

Izmere cist in ličink ogorčice *Globodera rostochiensis* po različnih avtorjih (µm)

DRUGO-STOPENJSKA LIČINKA / 2ND LARVAE								
Dolžina telesa / <i>Body length (µm)</i>	434-469	...	468 ± 23	370 - 470	370-560
Dolžina bodala / <i>Stylet length (µm)</i>	19,8-21,5	...	21,8 ± 0,7	22 (21 - 23)	21 - 23	22	21 - 23	19-23
Dolžina repa / <i>Tail length (µm)</i>	38,6-51,5	...	43,9 ± 11,6	51 (44 - 57)	41-57
Hialini deli repa / <i>Hyaline part of tail (µm)</i>	20,6-29,1	...	26,5 ± 1,8	24 (18 - 30)	45-55 % dolžine repa
Oblika grč bodala / <i>Stylet knob shape</i>	Srednji del grč okrogel / <i>Anterior surface rounded</i>	...	Srednji del zaokrogel, usmerjen nazaj / <i>Anterior face curving backward</i>	...	Okrogla, poševno se zaokrojuje / <i>Rounded, dorsal may slope backward</i>	...	Srednji del grč okrogel / <i>Anterior surface rounded</i>	Srednji grč ploščat do končaven / <i>Anterior flattened to rounded</i>

Table 2:

Measurements (µm) of cysts and terminal areas of second-stage larvae of *Globodera rostochiensis* after different authors

cistah je vidna le odprtina brez kakršnihkoli struktur. Analna odprtina je majhna luknjica in se nahaja na dorzalni strani vulve. Analna fenestracija ne obstaja.

Bela krompirjeva ogorčica, *Globodera pallida* (izmere so povzete po Brzeskemu, 1998) je zelo podobna rumeni krompirjevi ogorčici in se od nje razlikuje po dolžini bodala in obliki grč pri ličinkah ter Granekovem razmerju (razmerje med razdaljo med anusom in fenestro ter premerom fenestre) in po številu kutikularnih grebenov med anusom in fenestro pri cistah. Ciste ogorčice *G. pallida* so okrogle, brez vulvinega stožca. Na prehodu iz belih zrelih samic se neposredno spremenijo v temno rjave zrele ciste (ni znana rumena faza kot pri *G. rostochiensis*). Vzorec ovojnice med spolno in analno odprtino oblikujejo bolj ali manj vzporedni kutikularni grebeni in jih je manj kot pri ogorčici *G. rostochiensis*. Imajo cirkumfenestralni tip fenestre, ki obdaja spolno odprtino; pri starih cistah je vidna le odprtina, brez kakršnihkoli struktur. Analna odprtina se nahaja na dorzalni strani vulve. Analna fenestracija ne obstaja. Ličinke merijo 410-530 μm . Vzdolž telesa potekajo štiri lateralne linije. Glava je privzdignjena (se loči od telesa) in ima štiri do šest obročev. Bodalo, dolgo 20,5-24,1 μm , ima naprej izbočene grče. Odprtina dorzalne požiralniške žleze se nahaja okoli 2,7-5 μm za grčami bodala. Rep je stožčast, zaokrožen in je dolg 46-60 μm ; hialini del repa pa meri 47-53 % dolžine repa. Jajčeca ogorčice *G. pallida* so dolga 108,3 \pm 2,0 μm in široka 43,2 \pm 3,2 μm (CPC Global Module).

Krompirjeve ogorčice pa si niso podobne le medsebojno, ampak jih je morfološko težko ločiti tudi od drugih vrst iz rodu *Globodera*: *G. tabacum tabacum* (Lownsbey in Lownsbey, 1954), *G. tabacum solanacearum* (Miller in Gray, 1972), *G. tabacum virginiae* (Miller in Gray, 1968), ki podobno kot krompirjeve ogorčice, zajedajo vrste rodu razhudnikov (*Solanum*), pa tudi od vrst, ki napadajo druge gostiteljske rastline, npr. *G. artemisia* (Eroshenko in Kazachenko, 1972), ki zajeda rastlinske vrste iz družine Compositae in *G. achilleae* (Golden in Klindić, 1973), za katero je znano, da zajeda rman. Za medvrstno ločevanje oziroma identifikacijo posameznih vrst so potrebne dolgoletne izkušnje.

Identifikacija posameznih vrst iz rodu *Globodera* temelji na določenih morfoloških značilnostih, ki jih zasledimo v večini determinacijskih ključev. Z razvojem biokemičnih in molekularnih metod pa morfološke identifikacije vedno enostavneje potrjujemo. Identifikacija posameznih vrst se tako zdi precej enostavna. Vendar velja to le za primere, ko imamo pri svojem delu dovolj razpoložljivega materiala, katerega moramo podrobneje preučiti. V območjih, kjer so posamezne vrste, na primer *G. rostochiensis* oziroma *G. pallida*, razširjene in je ustreznega biološkega materiala (cist, ličink) dovolj na voljo, je identifikacija posameznih vrst ob morebitni

datni uporabi modernejših identifikacijskih tehnik precej netežavna. Identifikacija posameznih vrst pa postane precej bolj zapletena v primerih, kjer se z določenimi vrstami srečujemo prvič, oziroma ko nimamo na voljo dovolj ustreznega biološkega materiala (na primer le manjše število starih cist). V takšnih primerih identifikacija sicer ne more biti zanesljiva, moramo pa v primeru prvih tovrstnih najdb ustrezno ukrepati.

Pri pregledu nekaterih morfoloških parametrov, pomembnih za identifikacijo krompirjevih ogorčic, ki jih zasledimo v obstoječih determinacijskih ključih, se nam porajajo določena vprašanja. Izmere cist ogorčice *G. rostochiensis* oziroma njihovih terminalnih regij, ki so zajete v delih Mulveya, 1972, Stone-a, 1973 ter Golden-a in Ellingtonove, 1972, temeljijo na dotlej znanih podatkih. Glede na to, da je bila leta 1973 opisana tedaj nova vrsta, *G. achilleae* (Golden in Klindić, 1973) je možno sklepati, da so se prej omenjene izmere nanašale tudi na to, krompirjevi ogorčici precej podobno vrsto. Precejšnjo zmedo v zvezi z identifikacijo krompirjevih ogorčic ponazarjata Urek in Hržič, 1993, ki trdita, da je bila v sredini sedemdesetih opisana navzočnost ogorčice *G. rostochiensis* na območju Slovenije posledica nenatančnih navodil za identifikacijo krompirjevih ogorčic, ki so bila takrat (1959) podana s strani odgovornih ustanov (Zvezna uprava za varstvo rastlin Jugoslavije). Njuna trditev temelji na dejstvu, da krompirjeva ogorčica, ki naj bi se nahajala na območju Gorenjske, ni bila kasneje nikdar več najdena, večkrat pa so naleteli na vrsto *G. achilleae*. Tudi Krnjaić s sod. (2000) trdi, da je bilo območje bivše Jugoslavije proglašeno za napadeno z ogorčico *G. rostochiensis* na temelju prehitre in napačne determinacije leta 1965. Isti avtorji trdijo, da je šlo v tistem času pravzaprav za vrsto *G. achilleae* in da ogorčica *G. rostochiensis* ni bila najdena na območju bivše Jugoslavije vse do leta 1971 oziroma kasneje, 1999.

Dejanska revizija podatkov, ki so zajeti v različnih determinacijskih ključih, ni bila nikdar opravljena. Problem uporabe obstoječih determinacijskih ključev se torej kaže v navajanju nekaterih parametrov, ki so očitno značilni za organizme iste vrste točno določenih območij, ne upoštevajo pa parametrov, ki se od njih lahko nekoliko razlikujejo in ki so pridobljeni z izmerami organizmov na drugih območjih (znotrajvrstna variabilnost je glede na različna geografska območja precejšnja). Enostranska, toga, uporaba determinacijskih ključev, temelječih na določenih morfoloških značilnostih, lahko brez uporabe dodatnih, biokemičnih ali molekularnih metod, oziroma zaradi neupoštevanja možnosti morebitnih populacijsko morfoloških razlik vodi do napačnih odločitev oziroma identifikacij. Zato je razvoj tovrstnih tehnik v posameznih diagnostičnih laboratorijih, predvsem pa medsebojna primerjava diagnostičnih rezultatov (medlaboratorijska testiranja), izjemnega pomena.

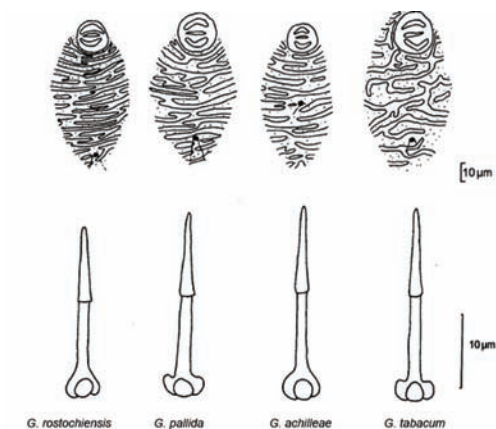
VRSTA /SPECIES	Oblika grč na bodalu JZ / JZ stylet knob shape	Dožina bodala JZ / JZ stylet length	Št. kutikularnih grebenov med zadnjikom in vulvnim obročem /No. of cuticular ridges between anus and vulval basin	Premjer vulvinega obročja /Vulval basin diameter	Razdalja med zadnjikom in vulvnim obročem /Distance from anus and vulval basin	Granevsko razmerje/ Graneč's ratio
G. rostochiensis	Spreddnji del grče okrogel	21 - 23 (22)	12 - 31 (> 14)	8 - 20 (< 19)	37 - 77 (> 55)	1.3 - 9.5 (> 3)
G. pallida	Spreddnji del grče ploščat do konkaven	21 - 26 (> 23)	8 - 20 (< 14)	18 - 21 (> 19)	22 - 67 (< 50)	1.2 - 3.5 (< 3)
G. tabacum	Spreddnji del grče koničast do okrogel	19 - 28 (23 - 24)	10 - 14	12 - 33	28 - 85	1 - 4.2 (< 2.8)
G. achilleae	Spreddnji del grče okrogel	24 - 26.5 (25)	4 - 5	12 - 18 (16)	22 - 34 (27)	1.3 - 1.9 (1.6)
G. rostochiensis (lastne izmere)	Spreddnji del grče okrogel	19,8 - 21,5	16 - 22	14,6 - 19,4	58,5 - 73,3	3 - 4,3
G. achilleae (lastne izmere)	Spreddnji del grče okrogel	23,6 - 26,6	4 - 7	18,1 - 32,3	18,1 - 34,9	0,9 - 1,7

Tabela 3:

Diagnostične izmere za ogorčice *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *G. tabacum* in *G. achilleae* (po Flemingu in Powersu, 1998) v primerjavi z izmerami, opravljenimi na osebkih, najdenih pri nas. Izmere so v mikronih, dodane pa so tudi njihove srednje vrednosti.

Table 3:

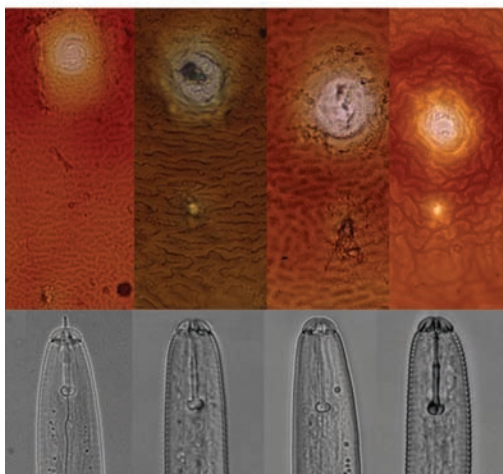
Diagnostic measurements for *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *G. tabacum* and *G. achilleae* (after Fleming and Powers, 1998) compared to measurements of Slovene specimens measurements (in microns), show range with mean value in parentheses.

**Slika 37:**

Spolno analni predel cist in bodala drugostopenjskih ličink štirih vrst rodu *Globodera* (shematski prikaz je prirejen po Flemingu in Powersu, 1998; fotografija original)

Figure 37:

Vulval-anal ridge patterns and J2 stylets in four *Globodera* species (drawing after Fleming and Powers, 1998; photo original)



9.3 Biologija in ekologija

Življenjski krog krompirjevih ogorčic je podoben kot pri drugih cistotvornih ogorčicah. Jajčeca, ki se nahajajo v cistah lahko v ugodnih razmerah preživijo tudi do 28 let (Grainger, 1964, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Prva stopnja ličink se razvije v jajčni ovojnici, s čimer se konča embrionalni razvoj. Po prvi levitvi se razvijejo drugostopenjske ličinke, ki se lahko premikajo in so sposobne napasti gostiteljske rastline. Izleganje ličink je povezano s prisotnostjo gostiteljskih rastlin in njihovih koreninskih izločkov. V primeru krompirjevih ogorčic so koreninski izločki, ki stimulirajo izleganje

ličink, povezani predvsem z rastlinami, ki pripadajo družini Solanaceae (krompir, paradižnik, jajčevac in številne samonikle vrste). Ličinke prodrejo v koreninice gostiteljskih rastlin neposredno pod rastnim stožcem. Preden se umirijo, se namestijo vzporedno z osjo koreninice (rep je usmerjen proti vrhu koreninice). Dva tedna po vdoru v koreninico se ličinke ponovno levijo in preidejo v tretjo razvojno fazo. Ličinke v tej fazi že nekoliko nabreknejo in so podobne stekleničkam, na njih pa že lahko ločimo nekatere organe (zasnove spolovila, rektum). Ta faza je v nekaj dneh sklenjena. Ličinke, iz katerih se bodo razvile samice, v četrti razvojni fazi nabreknejo, medtem ko ličinke moškega spola ostanejo bolj vitke, črvaste. Samci živijo le kratek čas, okoli deset dni, in se ne prehranjujejo. Oplodijo lahko do deset spolno zrelih samic, nato pa poginejo.

Razvoj samic, od izleganja do odrasle samice, traja 38–45 dni (Spears, 1968), spolno zrele oziroma pripravljene za oploditev pa postanejo po 50 dneh (cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Jajčeca se dokončno razvijejo en mesec po oploditvi, njihovo število niha in je pogojeno z okoljskimi dejavniki. Navadno se razvije 250–500 jajčec.

9.4 Pomen in znamenja napada

Krompirjeve ogorčice napadajo okoli 90 vrst gostiteljskih rastlin iz rodu razhudnikov (*Solanum*). Številne vrste iz tega rodu izvirajo iz Južne Amerike (Southey, 1965, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991), v naših podnebnih razmerah pa so kot možni gostitelji pomembni predvsem krompir, paradižnik in jajčevac. Poleg teh lahko napadajo tudi nekatere plevele: grenkoslad (*S. dulcamara* L.), pasje zelišče (*S. nigrum* L.) in v manjši meri tudi zobnik (*Hyoscyamus niger* L.).

Močno napaden krompir raste počasneje in v začetku junija je za napadene rastline značilna izrazita zakrnelost; listi ostanejo majhni, na vršičkih rumenijo, kasneje porjavijo



Slika 38:

Posledice napada krompirjeve ogorčice

Figure 38:

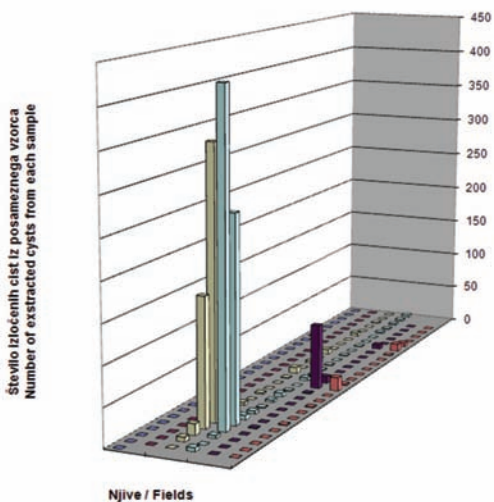
Potato cyst nematodes parasitize potato plants

in se zvijejo. Pri začetnem napadu zemljišča se napadenost krompirja kaže kot zakrnelost rastlin v obliki krožnih depresij le v določenih predelih njive. Ob pogledu na napadene rastline dobimo občutek, da rastline trpijo za pomanjkanjem hranil in vlage. V drugi polovici junija se na močno razvitem koreninju pojavi večje število majhnih bradavičastih izrastkov (zrele samice), ki imajo velikost bučikinih glav in proti koncu junija odpadejo s korenin (ciste).

9.5 Razširjenost

Danes prevladuje prepričanje, da izvirajo krompirjeve ogorčice, podobno kot njihovi glavni gostitelji, iz gorskih predelov Južne Amerike, od koder so jih okoli leta 1600 s krompirjem vnesli v Evropo. Tu so se v naslednjih dvesto letih na posameznih območjih, kjer so pridelovali krompir, povečevale njihove populacije, ne da bi se kdor koli tega zavedal (Spears, 1968, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991). Iz Evrope so se omenjene ogorčice v glavnem s semenskim krompirjem razširile skoraj po vsem svetu, kjer pridelujejo krompir, in sicer v najmanj 50 držav (Evans in Stone, 1977; Mai, 1977, cit. po Baldwin in Mundo-Ocampo, 1991).

Danes je rumena krompirjeva ogorčica razširjena v večini evropskih držav, Aziji, Afriki, Južni Ameriki, Oceaniji, v omejenem obsegu pa tudi v ZDA. V državah, ki mejijo na Slovenijo (Italija, Avstrija, Madžarska) je razširjena že dlje (CPC - Global Module, CAB International), na Hrvaškem pa je bila prvič ugotovljena leta 2001 (Grubišić s sod., 2007).



Slika 39:

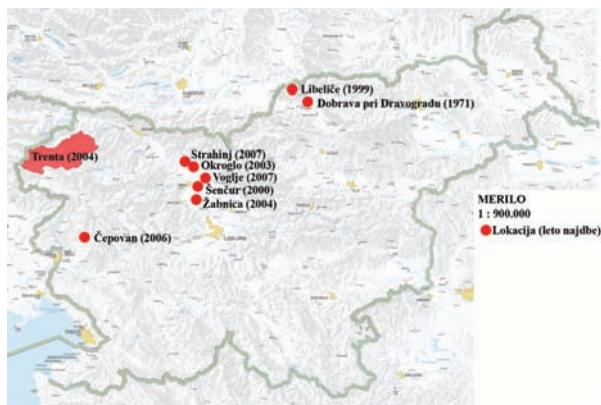
Rezultati mrežnega vzorčenja njiv na območju Libelič (leto 2000)

Figure 39:

Results of net sampling in the area of Libeliče (leto 2000)

V Sloveniji je bila rumena krompirjeva ogorčica prvič ugotovljena leta 1971. Izolirana je bila iz vzorca tal, pobranega z njive jedilnega krompirja na območju Dravograda blizu slovensko avstrijske meje. Tedaj je bila ugotovljena ena cista vrste *G. rostochiensis* (Urek in Lapajne, 2001). Leta 1975 je bila na tem območju ponovno najdena ena cista krompirjeve ogorčice, vendar takrat kljub natančnejšemu, kontrolnemu pregledu zemljišča, na katerem je bila omenjena cista najdena, iz tal niso več izločili novih cist krompirjevih ogorčic (Urek in Lapajne, 2001). Na krompirjevo ogorčico v Sloveniji kljub intenzivnemu nadzoru zemljišč po letu 1975 nismo naleteli vse do leta 1999. Tega leta pa smo v vzorcih tal, odvzetih z njive v katastrski občini Libeliče, blizu slovensko avstrijske meje, naleteli na deset cist krompirjeve ogorčice. Pri naknadnem, mrežnem vzorčenju, ki smo ga opravili na napadeni njivi spomladi leta 2000, se je pokazalo, da razprostranjenost cist na napadenem zemljišču, ki meri skupaj 3,2 ha (dve stikajoči se njivi, ki sta pred letom 1990 predstavljali eno zaključeno celoto) ni enakomerna, saj so bile ciste bolj množično izločene le iz dveh posameznih otokov, ki nista presejala površine 200 m² (Urek in Lapajne, 2001) (slika 39).

Sledile so najdbe rumene krompirjeve ogorčice na Gorenjskem, in sicer v okolici Šenčurja (2001), v bližini Okroglega (2003) in Žabnice (2004 in 2005), v bližini vasi Križe (2006), blizu Strahinja in Voklega (2007), v okolici vasi Čirče (2008) in v Čepovanu na Primorskem (2006), ki so bile omejene na posamezne njive. V Posočju je bilo leta 2004 ugotovljeno širše napadeno območje, ki se razprostira po dolini Trente, vse do Bovca in Kobarida.



Slika 40:

Rumena krompirjeva ogorčica je v Sloveniji navzoča na Koroškem, Gorenjskem in Primorskem

Figure 40:

Yellow cyst nematode is spread in Slovenia in the Koroška, Gorenjska and Primorska regions

Podobno kot rumena je tudi bela krompirjeva ogorčica razširjena, čeprav v manjšem obsegu, v številnih evropskih državah, Aziji, Afriki, Južni Ameriki, ZDA (Idaho) in Oceaniji,

(CPC - Global Module, CAB International; Hafez in sod., 2007). Od držav, ki mejijo na Slovenijo, je v omejenem obsegu razširjena le v Avstriji in Italiji (CPC - Global Module). Na belo krompirjevo ogorčico v obdelovalnih tleh Slovenije še nismo naleteli, smo jo pa v obdobju 2000–2003 večkrat prestregli v pošiljkah jedilnega krompirja na meji z Italijo.

9.6 Molekularna identifikacija

Temeljni pogoj za ustrezen nadzor in obvladovanje rastlinskih boleznih in škodljivcev je pravilna in hitra določitev oziroma identifikacija škodljive vrste. Za identifikacijo rastlinsko parazitskih ogorčic so poleg morfoloških analiz izredno pomembne tudi novejšje, molekularne metode, kot so PCR, PCR v realnem času, RFLP, določanje nukleotidnega zaporedja ter analize proteinov za ogorčice iz rodu *Globodera*, katere učinkovito uporabljamo tudi na Kmetijskem inštitutu Slovenije (Gerič Stare in sod., 2009).

Posamezne rastlinsko parazitske ogorčice določamo na temelju morfoloških značilnosti, pomagamo pa si tudi z informacijami o njihovih gostiteljih in njihovih patoloških učinkih na gostitelja. Za nedvoumno identifikacijo vrste naštetih kriteriji velikokrat niso dovolj, zato se v zadnjem času strokovnjaki vedno pogosteje poslužujejo tudi molekularnih tehnik na osnovi nukleinskih kislin in proteinov, ki zagotavljajo dodatne informacije za določanje oziroma razločevanje posameznih vrst. Pravo metodološko revolucijo na področju taksonomije in genetike ogorčic predstavlja verižna reakcija s polimerazo ali PCR, ki jo je leta 1984 razvil Kary Mullis (Mullis, 1987). Občutljivost te metode omogoča pomnoževanje genov oziroma delov genov iz minimalne količine genomske DNA, kar je pri obravnavanju nekaterih rastlinsko parazitskih ogorčic še posebej pomembno, saj je bilo s tradicionalnimi načini pogosto nemogoče pridobiti ali izolirati zadostno količino materiala za proteinske analize (Gasser, 2001).

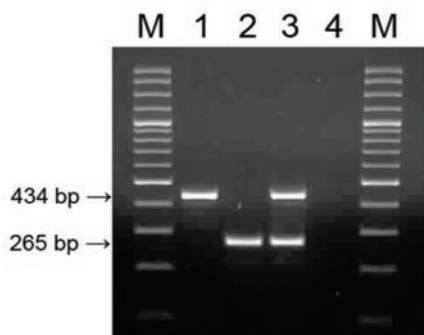
9.6.1 PCR ali verižna reakcija s polimerazo in gelska elektroforeza

Metoda PCR ali verižna reakcija s polimerazo omogoča selektivno encimsko pomnoževanje dela genoma *in vitro*. Matrico, dvoverižno genomsko DNA s segrevanjem denaturiramo oziroma razpemo. Naknadno zmanjšanje temperature omogoči paru začetnih oligonukleotidov hibridizacijo oziroma vezavo na komplementarno zaporedje matrice. Termostabilen encim DNA polimeraza nato omogoča sintezo DNA od mesta naleganja

začetnih oligonukleotidov vzdolž matrice tako, da nastane dvovertična molekula DNA. Sintezo na tak način ponavljamo, navadno 35-krat, v avtomatskem cikličnem termostatu. V vsakem ciklu se izbrani del matrične molekule DNA podvoji, tako da imamo na koncu reakcije na voljo za nadaljnje analize več milijonov kopij izvorne matrice.

Del genoma, ki ga želimo pomnožiti z metodo PCR, izberemo glede na namen poskusa. Za identifikacijo oziroma ločevanje vrst ogorčic se je za zelo uporabno izkazala rDNA, ki se v ponovljivih kopijah nahaja v celičnem jedru. rDNA kodira rRNA, ki skupaj z ribosomalnimi proteini sestavlja ribosome – centre za sintezo celičnih proteinov. Značilnost rDNA je velika evolucijska stabilnost in vrstna značilnost oziroma specifičnost. Posamezni predeli so vrstno značilni, drugi pa opredeljujejo višje ali nižje taksonomske skupine. Omenjene genetske značilnosti omogočajo uporabo univerzalnih začetnih oligonukleotidov, ki jih lahko npr. izkoriščamo za pomnoževanje odseka rDNA pri različnih vrstah znotraj skupine rastlinsko parazitskih ogorčic.

Vrsti *G. rostochiensis* in *G. pallida* lahko ločujemo s pomočjo dupleks PCR reakcije, kjer pomnožimo del rDNA, ki zajema del 18S in del ITS1 regije. Uporabimo en univerzalni začetni oligonukleotid, ki prepozna obe vrsti, ter dva vrstno specifična, za vsako vrsto enega (Bulman in Marshal, 1997). Pomnoženi del rDNA molekule je pri navedenih vrstah različno dolg, kar omogoča enostavno in nedvoumno identifikacijo (slika 41). Metoda je primerna tudi za identifikacijo mešanih vzorcev cist obeh vrst.



Slika 41:

Fotografija agaroznega gela s produkti dupleks PCR reakcije za identifikacijo vrst *Globodera rostochiensis* in *G. pallida*. DNA lestvica 100 bp Plus (Fermentas) (oznaka M), vzorec 1: proga velikosti 434 bp značilna za *G. rostochiensis*, vzorec 2: proga velikosti 265 bp, značilna za *G. pallida*, vzorec 3: prisotnost *G. rostochiensis* in *G. pallida*, vzorec 4: negativna kontrola, namesto matrične DNA je v reakcijo dodana voda.

Figure 41:

A photography of agarose gel with products of duplex PCR reaction for identification of *G. rostochiensis* and *G. pallida*. DNA ladder 100 bp Plus (Fermentas) (marked M), column 1: bend of 434 bp typical of *G. rostochiensis*, column 2: bend of 265 bp typical of *G. pallida*, column 3: presence of *G. rostochiensis* and *G. pallida*, column 4: negative control, water instead of matrix DNA is put into reaction.

Velikost DNA produkta, ki je nastal v PCR reakciji, ocenjujemo s pomočjo gelske elektroforeze, tehnike za ločevanje nukleinskih kislin ali proteinskih molekul s pomočjo električnega toka v gelskem matriksu. Molekule potujejo v električnem polju glede na svoj naboj in velikost proti ustrezno nabiti elektrodi. Negativno nabita molekula DNA potuje skozi mrežo agaroznega gela proti anodi, hitrost potovanja pa je poleg naboja odvisna še od velikosti molekule: manjše molekule potujejo hitreje, večje pa počasneje. Podobno kot negativne molekule proti anodi potujejo pozitivne molekule proti katodi.

Preučevane molekule ponavadi obarvamo z različnimi barvili, na primer z etidijevim bromidom ali SYBR® Safe za nukleinske kisline ter srebrovim nitratom ali barvilom comassie modro za proteine. V našem laboratoriju obarvamo DNA molekule, ki smo jih namnožili v reakciji PCR, z etidijevim bromidom. Ta ima lastnost, da pri UV svetlobi fluorescira, tako da agarozni gel fotografiramo pri UV svetlobi.

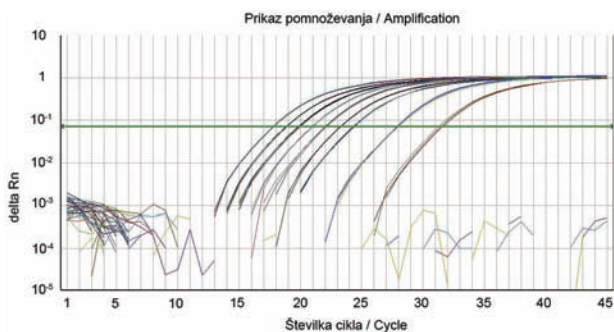
9.6.2 PCR v realnem času

Metoda PCR v realnem času temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR). Uporablja se jo za pomnoževanje matrične DNA molekule, kjer je poleg detekcije možna tudi hkratna kvantifikacija produkta. Od klasične PCR metode se PCR v realnem času razlikuje predvsem v tem, da pomnoženo DNA kvantificiramo v realnem času po vsakem ciklu encimskega pomnoževanja, s čimer se izognemo detekciji produkta na koncu pomnoževanja s pomočjo gelske elektroforeze, kar pomeni, da je identifikacija z metodo PCR v realnem času hitrejša.

Hitrejša identifikacija preučevane vrste zagotavlja veliko prednost, saj na temelju hitre in pravilne identifikacije sprejemamo ustrezne ukrepe obvladovanja škodljivih vrst, katerih uspešnost je lahko v veliki meri odvisna tudi od hitrosti njihove izvedbe. Dolgotrajna identifikacija pomeni tudi veliko ekonomsko breme, če npr. določenega materiala ne moremo uvoziti zaradi suma na zastopanost karantenskih škodljivcev.

Z ozirom na kemijsko reakcijo, obstajata dva postopka PCR metode z detekcijo v realnem času. Pri prvem postopku uporabljamo fluorescentno barvilo (npr. SYBR green), ki se interkalarno veže z dvojno vijačnico DNA molekule, pri drugem pa modificirano oligonukleotidno sondo (npr. TaqMan), ki fluorescira, ko je hibridizirana s komplementarno verigo DNA.

Metodo PCR v realnem času in uporabo fluorescentnega barvila SYBR green uporabljamo za identifikacijo krompirjevih ogorčic, *Globodera rostochiensis* in *G. pallida*, tudi na Kmetijskem inštitutu Slovenije (Bačić s sod., 2008). DNA pomnožujemo v cikličnem termostatu z detekcijo v realnem času (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System). Ta ima vgrajen detektor fluorescence in je povezan z računalnikom. Rezultate merjenja fluorescence po vsakem ciklu pomnoževanja obdela poseben računalniški program (Sequence Detection Software v.1.3, Applied Biosystems) (slika 42). Uspešnost pomnoževanja DNA odčitamo iz vrednosti praznega cikla oziroma vrednosti Ct (treshold cycle). Vrsto specifičnost pomnožene molekule DNA določimo glede na temperaturo disociacije produkta, to pomeni temperaturo, pri kateri se dvojna vijačnica DNA razpre. Različno dolge molekule DNA oziroma molekule DNA z različnim zaporedjem nukleotidov disociirajo pri različni temperaturi (slika 43).

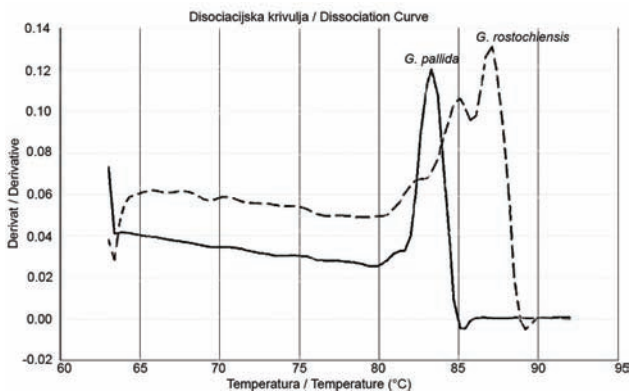


Slika 42:

Grafični prikaz naraščanja fluorescence med reakcijo PCR v realnem času predstavlja pomnoževanje matrične molekule DNA pri vzorcih z razredčeno genomsko DNA, ki ga uporabljamo pri določanju občutljivosti metode.

Figure 42:

The schematics of the increase of fluorescence during the real-time PCR reaction represents amplification of the matrix DNA in the samples with serial dilution of genomic DNA used for determination of method's sensitivity.



Slika 43:

Vrh disociacijske krivulje 87.0 ± 0.5 °C pomeni zastopnost vrste *G. rostochiensis*, 83.3 ± 0.5 °C pa zastopnost vrste *G. pallida* v vzorcu.

Figure 43:

Peaks of dissociation curve 87.0 ± 0.5 °C and 83.3 ± 0.5 °C indicate the presence of *G. rostochiensis* and *G. pallida*, respectively.

Metoda PCR v realnem času, pri kateri se uporabljajo specifične sonde označene s fluorescentnim barvilom, velja za najbolj specifično, a tudi najdražjo metodo. Vrsti *G. rostochiensis* in *G. pallida* lahko določimo tudi z metodo, ki temelji na TaqMan kemiji. V tem primeru predel rDNA pomnožujemo s pomočjo para vrstno specifičnih začetnih oligonukleotidov ter vrstno specifičnih sond, ki so jih razvili na inštitutu SCRI (Blok in sod., neobjavljeno). Za razliko od prejšnjega načina, kjer fluorescirajo vse molekule dvojne vijačnice DNA v vzorcu, tudi pari začetnih oligonukleotidov in nespecifični produkti, v tem primeru fluorescirajo samo specifične molekule dvojne vijačnice DNA, ki jih v reakciji pomnožujemo. Uspešnost pomnoževanja DNA odčitamo iz vrednosti praznega cikla oziroma Ct.

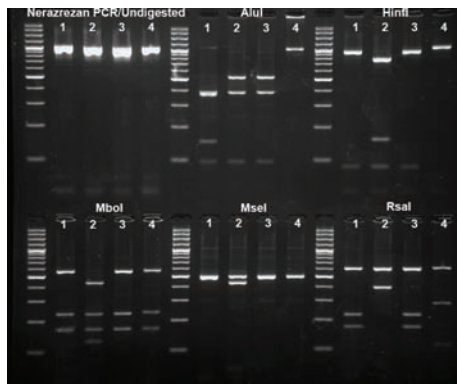
Metoda PCR v realnem času je izredno občutljiva, kar pomeni, da lahko pomnožimo DNA tudi iz izredno majhnega začetnega vzorca matrične DNA. Po naših izkušnjah je 0,5 pg genomske DNA ali celo manj že dovolj za uspešno pomnoževanje. Za primerjavo naj navedemo, da po klasičnem načinu izolacije genomske DNA iz posamezne ciste krompirjevih ogorčic pridobimo nekaj µg genomske DNA. Izredna občutljivost omenjene metode nam omogoča, da namesto klasične izolacije DNA pripravimo enostaven homogenizat ogorčic v destilirani vodi in tako pripravljen grobi ekstrakt DNA uporabimo kot matrično DNA v PCR reakciji z detekcijo v realnem času. Na ta način pridemo do primerljivih rezultatov identifikacije še hitreje, saj ne potrebujemo enega dneva za izolacijo genomske DNA, pač pa homogenizat pripravimo v nekaj minutah.

9.6.3 PCR-RFLP ali polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov

Metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov temelji na analizi variabilnosti v nukleotidnem zaporedju DNA molekule. Tarčno molekulo DNA, ki jo predhodno pomnožimo s PCR reakcijo, razrežemo v manjše molekule z restrikcijskimi encimi, njihove velikosti pa določimo z gelsko elektroforezo. Restrikcijski encimi prepoznajo specifična kratka zaporedja v DNA molekuli in jo na tem mestu prerežejo (restrikcija). Če imajo DNA molekule iz različnih vzorcev variabilnost na mestu, ki ga prepozna restrikcijski encim, to zaznamo kot različen vzorec prog na agaroznem gelu.

Na Kmetijskem inštitutu Slovenije smo razvili PCR-RFLP metodo, s katero ločimo štiri vrste ogorčic iz rodu *Globodera*: krompirjevi ogorčici *G. rostochiensis* in *G. pallida*,

rmanovo ogorčico *G. achilleae* ter tobakovo ogorčico *G. tabacum* (Širca s sod., 2003; Širca in Urek, 2004; Širca s sod., 2009). V PCR reakciji pomnožimo predel rDNA, ki zajame del gena za 18S, ITS1, celoten gen za 5,8S, ITS2 ter del gena za 28S rRNA. Na osnovi specifičnega vzorca ločimo omenjene vrste ogorčic po restrikciji s petimi restrikcijskimi encimi (slika 44).



Slika 44:

Fotografija agaroznega gela s PCR-RFLP vzorci za vrste *G. rostochiensis* (1), *G. pallida* (2), *G. tabacum* (3) in *G. achilleae* (4). DNA lestvica 100 bp Plus (Fermentas), uporabljeni restrikcijski encimi *AluI*, *HinfI*, *MboI*, *MseI*, in *RsaI*.

Figure 44:

Photography of an agarose gel with PCR-RFLP patterns of *G. rostochiensis* (1), *G. pallida* (2), *G. tabacum* (3) and *G. achilleae* (4). DNA ladder 100 bp Plus (Fermentas), restriction enzymes used *AluI*, *HinfI*, *MboI*, *MseI* and *RsaI*.

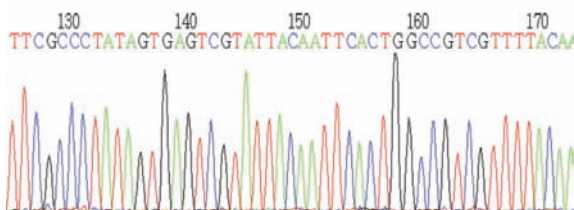
9.6.4 Določanje nukleotidnega zaporedja DNA

Kljub precejšnji učinkovitosti prej opisanih metod pa dobimo najbolj popolno informacijo o zgradbi DNA molekule z metodo določanja nukleotidnega zaporedja DNA.

Z metodo določanja nukleotidnega zaporedja DNA določimo primarno strukturo molekule DNA, ki jo prikazemo kot linearen, simboličen opis njene strukture. Zaporedje osnovnih gradnikov molekule DNA, nukleotidov, prikazemo s simboli A, C, G in T (adenin, citozin, gvanin in timin).

Navadno uporabljamo metodo, ki jo je razvil Frederick Sanger (metoda po Sangerju), kjer zaporedje določimo s pomočjo prekinitve sinteze DNA. Vzdlolž molekule DNA, ki ji želimo določiti zaporedje, sintetiziramo nove molekule DNA s pomočjo začetnega oligonukleotida, DNA polimerazo in štirimi osnovnimi gradniki DNA molekule – nukleotidi A, C, G in T, skupaj z majhno koncentracijo nekoliko spremenjenih nukleotidov (navadno di-deoksinukleotidi). Ko se v rastočo verigo vgradi spremenjen nukleotid, se sinteza molekule ustavi. Zmes molekul, ki nastanejo v reakciji, nato po velikosti ločimo z elek-

troforezo na poliakrilamidnem gelu ali v stekleni kapilari z viskozno matriksom. Modificirani nukleotidi, ki ustavijo sintezo DNA verige, so dodatno označeni z barvilom. To nam razkrije, kateri je bil zadnji nukleotid, ki se je vgradil v molekuli določene velikosti ter omogoči določitev zaporedja nukleotidov DNA molekule (slika 45).



Slika 45:

Grafični prikaz določanja strukture DNA molekule imenovan kromatogram, prikaže pozicijo nukleotidov v DNA molekuli (A, C, G, T).

Figure 45:

The schematics of DNA sequencing named chromatogram shows position of nucleotides in DNA molecule (A, C, G, T).

Podobno kot z metodami PCR, PCR z detekcijo v realnem času ali PCR-RFLP določimo prisotnost vrste na podlagi specifične DNA molekule, omogoča določanje nukleotidnega zaporedja rDNA izredno natančno in zanesljivo identifikacijo vrste tudi pri vzorcih, kjer druge metode ne dajo jasnega odgovora. Določeno zaporedje preučevanega vzorca z orodjem BLAST primerjamo z zaporedjem iste in sorodnih vrst oziroma z vsemi določenimi zaporedji DNA molekul, ki so shranjena v javno dostopnih bazah (npr. NCBI GenBank). Velika podobnost ali identičnost novo določenega zaporedja z referenčnimi zaporedji v bazi pomeni pripadnost določeni vrsti. Na tak način smo pri nas določili rumeno in belo krompirjevo ogorčico ter tobakovo ogorčico (tabela 4). Določanje nukleotidnega zaporedja rDNA se uporablja tudi za preučevanje odnosov sorodnosti med vrstami, ki jih grafično ponazorimo s filogenetskimi drevesi (Širca in Urek, 2004).

Tabela 4: Vrste, ki smo jih določili na osnovi nukleotidnega zaporedja dela rDNA molekule, s pripadajočimi številkami DNA zaporedij v javni bazi NCBI GenBank.

Table 4: Identification of plant-parasitic nematode-species based on nucleotide sequence of rDNA molecule with the corresponding NCBI GenBank accession numbers of the sequences in the public database.

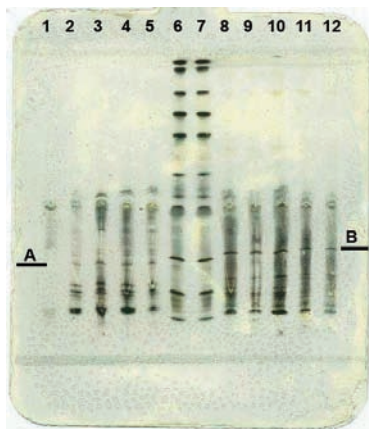
VRSTA / SPECIES	Št. zaporedja v bazi NCBI GenBank / Accession no. at the NCBI GenBank	Reference / References
<i>Globodera rostochiensis</i>	AY700060	Širca in Urek, 2004
<i>Globodera achilleae</i>	AY599498	Širca in Urek, 2004
<i>Globodera tabacum</i>	FJ667945, FJ667946	Gerič Stare in Širca, neobj.

V zadnjih letih se v svetu intenzivno razvija tudi tako imenovana nova generacija tehnologij za določanje nukleotidnega zaporedja, ki bo morda v prihodnosti omogočala hitrejše in cenejše določanje zaporedja, s tem pa še večjo uporabnost določanja nukleotidnega zaporedja DNA v diagnostične namene.

9.6.5 IEF ali izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje ali IEF je ena izmed osnovnih tehnik v analitiki proteinov. Vsak protein je pri določeni pH vrednosti, imenovani izoelektrična točka (pI), na zunaj navidezno električno nevtralen, število pozitivnih nabojev pa je enako številu negativnih nabojev. Vzorec proteina nanese na gel, v katerem smo poprej vzpostavili pH gradient in gel priklopimo v električno polje. Protein, ki je npr. pri pH vrednosti, pri kateri smo ga na gel nanegli, negativno nabit, bo potoval proti pozitivno nabiti anodi. Gibal se bo vse dokler ne bo dosegel pH vrednosti v gelu, ki je enaka njegovi izoelektrični točki. Takrat bo na zunaj električno nevtralen in gibanje se bo ustavilo. Če imamo v vzorcu dva proteina z različnima izoelektričnima točkama, ju lahko z metodo IEF med seboj ločimo. Proteini so pri pH vrednostih pod izoelektrično točko pozitivno, pri pH vrednostih nad izoelektrično točko pa negativno nabiti (Malovrh, 2007).

Tudi vrsti *G. rostochiensis* in *G. pallida* lahko medsebojno ločimo z metodo IEF ločevanja celokupnih proteinov. Vse proteine v osebku ločimo na poliakrilamidnem gelu z gradientom pH (PhastGel 3-9) ter jih obarvamo s srebrevim nitratom (slika 46) (Širca in sod., 2003).



Slika 46:

Poliakrilamidni gel prikazuje IEF vzorec posamezne ciste pri vrstah *G. pallida* (kolone 1-5) in *G. rostochiensis* (kolone 8-12), kalibracijski komplet za širok spekter izoelektričnih točk (pI) (koloni 6, 7). Z A in B so označene razlike v pI.

Figure 46:

Photography of a polyacrylamide gel shows IEF pattern of a single cyst of *G. pallida* (columns 1-5) and *G. rostochiensis* (columns 8-12), broad pI calibration kit (columns 6, 7). A and B mark the difference in pI.

9.6.6 Prednosti in slabosti molekularnih tehnik identifikacije

Prednosti molekularnih tehnik identifikacije:

- *velika občutljivost metod; identifikacija je možna tudi če je na voljo le majhen vzorec začetnega materiala (še posebno pri metodi PCR v realnem času),*
- *velika zanesljivost identifikacije (velika specifičnost metod), ki smo jo dokazali v mednarodnih medlaboratorijskih primerjavah identifikacije vzorcev,*
- *zadovoljiva hitrost identifikacije (še posebno z metodo PCR z detekcijo v realnem času),*
- *enostavno in sočasno obravnavanje velikega števila vzorcev (še posebno z metodama PCR in PCR v realnem času),*
- *možnost primerjave rezultatov zaporedja z javnimi bazami podatkov, ki se neprestano dograjujejo oziroma izpopolnjujejo (za metodo določanja nukeotidnih zaporedij DNA),*
- *v nasprotju z identifikacijo rastlinsko parazitskih ogorčic na temelju morfoloških značilnosti, kjer so potrebne dolgoletne izkušnje in predvsem ozka specializiranost oziroma usmerjenost v določeno skupino organizmov, slednja ni potrebna za identifikacijo s pomočjo molekularnih tehnik.*

Poleg dobrih strani, pa imajo molekularne tehnike tudi nekatere slabosti. Enostavna zamenjava posamezne baze v molekuli DNA (mutacija) lahko tako spremeni strukturo molekule, da jo z izbranimi začetnimi oligonukleotidi, sondami in restrikcijскими encimi ne prepoznamo več in identifikacija po izbrani metodi ni mogoča. Metodološko je najbolj zanesljivo določanje nukleotidnega zaporedja, ki pa je trenutno še dokaj dolgotrajno in drago. Za uspešno uporabo drugih molekularnih metod identifikacije vrst ogorčic je še vedno osnova mikroskopska analiza, s katero lahko precej zanesljivo ogorčicam določimo rod. Zato v praksi kombiniramo identifikacijo na temelju morfoloških značilnosti z rezultati identifikacije z molekularnimi tehnikami, na voljo pa imamo tudi več molekularnih tehnik za identifikacijo posameznih vrst rastlinsko parazitskih ogorčic.

9.7 Biološke rase - patotipi

Različne populacije krompirjevih ogorčic so različno virulentne za različne klonove krompirja, kar se kaže v različni stopnji razmnoževanja ogorčic na določenem kultivarju/klonu krompirja. Na podlagi različne virulentnosti je Kort leta 1974 krompirjeve ogorčice prvič razvrstil v razrede – patotipe oziroma biološke rase.

9.7.1 Določanje patotipov

Znotraj vrste *G. rostochiensis* ločimo pet bioloških ras oziroma patotipov (Ro1-Ro5), znotraj vrste *G. pallida* pa tri (Pa1-Pa3). Patotipe določimo glede na zmožnost razmnoževanja na določenih klonih rodu *Solanum* (Kort, 1974; Kort in sod., 1977; EPPO, 1981; Seinhorst,

Tabela 5:

Določitev bioloških ras oziroma patotipov krompirjevih ogorčic (*G. rostochiensis* in *G. pallida*) (po Kortu s sod., 1977 prilagodil Seinhorst, 1986) (Seinhorst, 1986)

Table 5:

Determination of pathotypes of potato cyst nematodes (G. rostochiensis and G. pallida) (adapted after Kort et al., 1977 in Seinhorst, 1986) (Seinhorst, 1986)

KLON	Ro					Pa		
	1	2	3	4	5	1	2	3
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>tuberosum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. tuberosum</i> ssp. <i>andigena</i> CPC 1673 hibrid	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. kurtzianum</i> hibrid 60 - 21 - 19	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. vernei</i> hibrid 58 - 1652/4	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. vernei</i> hibrid 62 - 33 - 3	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. vernei</i> hibrid 65 - 346/19	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>S. multidissectum</i> hibrid P 55/7	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>S. vernei</i> hibrid 69 - 1377/94	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) občutljiva, (-) odporna

1986) (tabela 5). Kloni, ki jih uporabljamo za določevanje patotipov ogorčic, so večinoma divji sorodniki krompirja in vsebujejo različne gene za odpornost na krompirjeve ogorčice. Za biološko testiranje se uporablja vrsta klonov, pri čemer na temelju razmnoževalnega potenciala ogorčic na različnih klonih določimo patotip ogorčic.

V okviru ugotavljanja navzočnosti oziroma razširjenosti posameznih patotipov rumene krompirjeve ogorčice *G. rostochiensis* na območju Slovenije smo vpeljali klasično biološko metodo za določanje patotipov s testiranjem odpornosti / občutljivosti na različnih kultivarjih iz rodu *Solanum*. V Sloveniji je bila zaenkrat potrjena navzočnost patotipa Ro1/4 vrste *G. rostochiensis*.

Zahteve Evropske Unije, ki se nanašajo na obvladovanje krompirjevih ogorčic, so bile opisane že v Direktivi 69/465/EEC. Omenjeno direktivo je 11. junija 2007 nadomestila nova Direktiva 2007/33/EC, kateri je bila vsebinsko dodana zahteva, da je potrebno vsako na novo ugotovljeno populacijo krompirjevih ogorčic določiti do ravni patotipa, hkrati pa določiti tudi virulenco oziroma virulenčno skupino. Izkazalo se je namreč, da standardna shema Korta in sod. (1977), ki razvršča populacije v patotipe, ni vedno zadostna, saj se določene populacije krompirjevih ogorčic lahko razmnožujejo tudi na kultivarjih krompirja, ki so bili deklarirani kot odporni. Zato so poleg biološke rase ali patotipa vpeljali še dodaten pojem - virulenca. Virulenca določene populacije krompirjevih ogorčic se izraža kot stopnja razmnoževanja ogorčic na specifičnem kultivarju ali klonu krompirja.

9.7.2 Preskusi določanja občutljivosti kultivarjev krompirja

Populacije krompirjevih ogorčic z določeno stopnjo virulence (standardne populacije/patotipi) uporabljamo v testih vrednotenja odpornosti oziroma tolerantnosti krompirja, kjer se ugotavlja stopnja občutljivosti rastlin krompirja na posamezen standarden patotip krompirjevih ogorčic. V testih se uporablja naslednje standardne patotipe: za vrsto *G. rostochiensis* patotipa Ro1 in Ro4, za vrsto *G. pallida* pa Pa1 in Pa3. Zaradi primerljivosti rezultatov se v preskuse občutljivosti vključuje standardni (občutljiv) kultivar 'Desiree', rezultate preskusov pa se opredeljuje kot »relativno občutljivost« preskušane kultiarja, ki je izražena kot:

Relativna občutljivost = $\frac{\text{Pf}_{\text{TESTIRAN KULTIVAR}}}{\text{Pf}_{\text{STANDARDNA KONTROLA 'Desiree'}}} \times 100$

Pf **TESTIRAN KULTIVAR** = končna populacija ogorčic na testiranem kultivarju

Pf **STANDARDNA KONTROLA 'Desiree'** = končna populacija ogorčic na standardnem kultivarju

Relativna občutljivost kultivarja je izražena v odstotkih in je razvrščena v razrede od 1 do 9, kjer predstavlja razred 9 največjo odpornost, razred 1 pa največjo občutljivost kultivarja za krompirjeve ogorčice (tabela 6).

Tabela 6:

Relativna občutljivost kultivarjev krompirja na določen patotip krompirjevih ogorčic

Relativna občutljivost (%) <i>Relative susceptibility</i>	Razred občutljivosti <i>Score</i>
< 1	9
1,1 – 3	8
3,1 – 5	7
5,1 – 10	6
10,1 – 15	5
15,1 – 25	4
25,1 – 50	3
50,1 – 100	2
> 100	1

Table 6:

Relative susceptibility of potato cultivars to the certain potato cyst nematode pathotype

Preskuse občutljivosti krompirja opravljamo v nadzorovanih prostorih, kjer so zagotovljene razmere za delo s karantenskimi organizmi (karantenski rastlinjak ali rastna komora). Posamezen test poteka v najmanj štirih ponovitvah, v 1.000 ml loncih. Kot substrat uporabljamo mešanico drobnega kremenčevega peska, mlete gline in granul ekspanzirane gline v razmerju 4:0,7:1. Preskusi potekajo pri temperaturi med 22 in 24 °C (temperatura ne sme preseči 25 °C), zagotovljena pa mora biti 10-odstotna vlažnost rastnega substrata. Prehrano rastlinam zagotovimo z dolgo delujočimi gnojili (N:P:K = 12:10:18), ki jih zamešamo v substrat v količini 1 kg gnojila na 1.000 kg rastnega substrata. Za zasaditev uporabljamo nakaljene gomolje premera 25-28 mm, katerim pustimo le en poganjek. V substrat vnesemo suspenzijo jajčec in drugostopenjskih ličink ogorčic (5000 osebkov/rastlino = Pi), ki jo pripravimo s pomočjo posebej prirejenega bata (slika 47). Suspenzijo enakomerno porazdelimo po celotni prostornini substrata. Po treh mesecih ovrednotimo preskus, ugotavljamo številčnost populacije ogorčic.



Slika 47: Prirejen bat za drobljenje cist

Figure 47: Modified plunger to crush the cysts

Ciste iz substrata izločimo s pomočjo ekstrakcijske naprave, iz njih izločimo jajčeca in ličinke, jih preštejemo in določimo končno populacijo ogorčic (Pf). Rezultati preskusa so veljavni, če je na kontrolnem kultivarju 'Desiree' dosežena 20-krat večja končna populacija ogorčic ($Pf/Pi \geq 20$). To je zagotovilo, da so bile razmere v preskusu ustrezne. Pomembno je, da se rezultati med ponovitvami na kontrolnem kultivarju ne razlikujejo bistveno in koeficient variabilnosti ne sme presegati vrednosti 35 %. Če se ugotovi, da je testiran kultivar občutljiv na krompirjeve ogorčice (razred občutljivosti ≤ 3), preskusa ni potrebno ponavljati. Če pa ugotovimo, da je testiran kultivar manj občutljiv (razred občutljivosti > 3), je potrebno rezultate potrditi s ponovnim preskusom, kjer se razred občutljivosti kultivarja določi na temelju povprečja ocen obeh izvedenih preskusov.

9.8 Parazitski geni

Cistotvorne ogorčice so prilagodejene parazitskemu načinu življenja (Gheysen in Jones, 2006). Na koreninah gostiteljev povzročijo določene spremembe; oblikuje se prehranjevalno mesto, na katerem se ogorčice oskrbujejo s hrano. Pri parazitiranju si pomagajo z bodalom ali stiletom, s katerim prebodejo rastlinsko tkivo. Skozi bodalo srkajo vsebino rastlinskih celic, s katero se prehranjujejo, istočasno pa v rastlino vbrizgavajo izločke obžrelnih žlez (sekret). Cistotvorne ogorčice imajo dve subventralni in eno dorzalno obžrelna žleza, njihovi izločki pa vzpodbudijo nastanek prehranjevalnega mesta. Prehranjevalno mesto cistotvornih ogorčic je sincicij, sestavljen iz velikih večjedrnih rastlinskih celic, ki nastanejo z razgradnjo vmesnih celičnih sten in zlitjem protoplastov, in je metabolno zelo aktivno mesto. Endoparazitske ogorčice, med katere sodijo tudi cistotvorne ogorčice, vdrejo v rastlinsko tkivo in migrirajo do mesta prehranjevanja. Proti takšnim vdorom patogenih organizmov, vključno z rastlinsko parazitskimi ogorčicami, so

rastline razvile številne obrambne mehanizme, tako mehanične (npr. celična stena) kot kemične (npr. nastanek toksičnih kisikovih radikalov ali oksidativni izbruh). Da lahko ogorčice uspešno zajedajo rastlino, premagajo rastlinske obrambne mehanizme z izločki obžrelnih žlez, ki vsebujejo encime, kot so na primer encimi za razgradnjo celične stene, encim superoksid dizmutaza itn. Parazitski dejavniki so torej vsi tisti dejavniki, geni in njihovi produkti, ki doprinesejo k temu, da je nek organizem parazit. Produkti parazitskih genov se lahko izražajo kot morfološke strukture, ki omogočajo parazitizem (npr. bodalo) ali pa igrajo ključno vlogo v fizioloških procesih oziroma v medsebojnih odnosih (interakciji) med ogorčico in rastlino (npr. izločki obžrelnih žlez, ki vzpodbudijo nastanek prehranjevalnega mesta in premagajo rastlinske obrambne mehanizme) (Davis in sod., 2009).

RAZLAGA IZRAZOV

PARAZIT je organizem, ki živi na ali v drugem organizmu, imenovanem GOSTITELJ. Parazit bolj ali manj očitno škoduje gostitelju.

PARAZITIRANJE ali zajedanje je življenje enega organizma na račun drugega.

RASTLINSKO PARAZITSKA OGORČICA je ogorčica, ki zajeda rastline.

NAPAD je vzpostavitev parazitskega odnosa med zajedalcem in gostiteljem.

OKUŽBA S CISTOTVORNIMI OGORČICAMI pomeni navzočnost vitalnih cist, jajčec oziroma infektivnih ličink v zemljišču, na pridelkih, kmetijski mehanizaciji, orodju itn.

PATOGENOST je sposobnost parazita, da povzroči bolezen ali poškodbo pri gostitelju. Takšne škodljive organizme imenujemo tudi PATOGENI.

Izraz VIRULENCA označuje stopnjo patogenosti, ki jo povzroči parazit. Določen parazit je lahko bolj ali manj virulenten; torej povzroči večjo ali manjšo škodo na gostitelju, oziroma povzroči isto raven škode manjše ali večje število parazitov, ki so napadli gostitelja.

REZULTAT PARAZITSKEGA ODNOSA je odvisen od virulence ter od ODPORNOSTI/ REZISTENCE ali DOVZETNOSTI gostitelja za določenega parazita.

PARAZITSKI DEJAVNIKI so tisti dejavniki, geni in njihovi produkti, ki doprinesejo k temu, da je nek organizem parazit.

AVIRULENTNI DEJAVNIKI so tisti dejavniki parazitskega organizma, ki pri gostiteljski rastlini sprožijo odpornost oziroma izražanje ODPORNOSTNIH R-GENOV.

Rastlina namreč ni ves čas oborožena proti vsem možnim škodljivcem, ampak se pripravi šele, ko pride v stik s točno določenim škodljivcem. Tega prepozna po določenih molekulah, ki so lahko proteini, lipidi ali kake druge snovi, ki jih izdeluje škodljivec (avirulentni dejavniki). Rastlina potem izraža odpornostne gene in postane odporna/rezistentna, navadno po mehanizmu hipersenzitivne reakcije, kar pomeni da odmre del rastline, kjer je vstopil patogen organizem. Ker je rastlina prepoznala vdor škodljivca in ga onemogočila, je odporna.

Po drugi strani lahko škodljivec spremeni svoje avirulentne gene in pretenta rastlino, da ga ta ne prepozna več. Tak spremenjen škodljivec bo spet lahko napadel rastlino, zaobšel bo naravno rastlinsko odpornost.

Parazitizem je izjemno kompleksen odnos med gostiteljem in parazitom, ki temelji na izražanju velikega števila različnih genov. Ocenjujejo, da imajo rastlinsko parazitske ogorčice več deset ali celo več sto parazitskih dejavnikov, ki omogočajo parazitizem. Glede na funkcijo jih lahko razdelimo v več skupin. V prvi skupini so dejavniki, ki sodelujejo pri razgradnji rastlinske celične stene in omogočijo ogorčici prodor v rastlinsko tkivo (celulaza, pektat liaza, ekspanzin, β -1,4-endoglukanaza, β -1,3-endoglukanaza, hitinaza, ksilanaza, β -galaktozidaza idr.). V drugi skupini so dejavniki, ki pomagajo ogorčici pri premagovanju rastlinskih obrambnih mehanizmov (superoksid dizmutaza, peroksire-doksin, glutation peroksidaza, lipoksigenaza, ekstenzin, proteinazni inhibitorji idr.). V tretji skupini so dejavniki, odgovorni za nastanek prehranjevalnega mesta (horizmat muta-taza, RanBMP (Ran-Binding Protein in the Microtubule organizing centre), aneksin, idr.), v četrto skupino pa uvrščamo dejavnike z drugimi oziroma neznanimi funkcijami (kalci-retikulin, protein, podoben proteinu 14-3-3, vaps (venom allergen-like proteins) itn.).

Na Kmetijskem inštitutu Slovenije smo v okviru preučevanja genetske raznolikosti para zitskih dejavnikov rumene krompirjeve ogorčice, *G. rostochiensis* na temelju oznak izraženih zaporedij (ESTs) razvili začetne oligonukleotide in uspešno pomnožili dele osmih virulenčnih genov (gen za pektat liazo 2, ekspanzin B2, superoksid dizmutazo, peroksire-doksin, glutation peroksidazo, dva različna proteina RanBMP ter verjetni virulenčni de-javnik z GenBank oznako AW506406). Izbrali smo za proces parazitiranja tri ključne gene: gen za ekspanzin B2 (*expB2*) in gen za superoksid dizmutazo (*sod*), za katera smo z reak-cijo RT-PCR prikazali prepis v mRNA, torej verjetno izražanje izbranih genov ter gen za pektat liazo 2 (*pef2*).

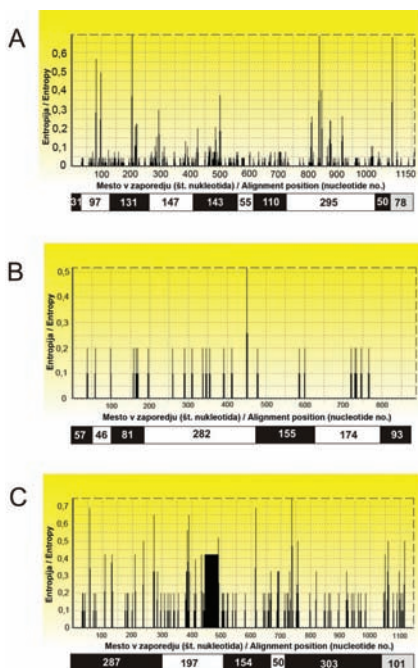
Ekspanzin B2 je encim, ki zrahlja nekovalentne vezi celuloznih vlaken, pomaga pri raz-gradnji rastlinske celične stene in omogoči parazitski ogorčici prodor v rastlino. Tudi pek-tat liaza 2 je encim, ki sodeluje pri razgradnji celične stene in pomaga pri razgradnji pektina. Superoksid dizmutaza je encim, ki katalizira pretvorbo strupenega superoksida (O_2^-) v vodikov peroksid (H_2O_2). Rastline se branijo pred vdorom tujih škodljivih organizmov z nastankom toksičnih kisikovih radikalov, ogorčica pa ta napad nevtralizira z izooblikami encima superoksid dizmutaza.

Odseke izbranih genov smo pomnožili z reakcijo PCR, nato pa jih vstavili v plazmidni vek-ter ter namnožili v modelnem organizmu *Escherichia coli*. Določili smo nukleotidno za-

porodje izbranih odsekov parazitskih dejavnikov in analizirali podatke s pomočjo različnih programskih orodij (Bioedit, BLAST, ClustalX, Mega). Testirali smo deset izbranih populacij (različni patotipi) vrste *G. rostochiensis* iz Evrope in Južne Amerike (Slovenija, Nemčija, Bolivija, Venezuela). Analiza nukleotidnih zaporedij DNA je razkrila raznolikost med populacijami, znotraj populacije za vse tri preučevane gene ter celo znotraj posameznega osebk za gen *expB2*.

Začetne oligonukleotide smo izbrali tako, da smo pomnožili skoraj celotne izbrane gene. V preučevanih genih smo s primerjavo genomske DNA in cDNA določili prisotnost eksonov (kodirajoči predeli genov) in intronov (nekodirajoči predeli genov), in sicer v genu *expB2* pet eksonov in štiri introne, v genu *peI2* tri eksone in dva introna, v genu *sod* pa štiri eksone in tri introne.

Zaporedja vseh treh preučevanih genov so raznolika vzdolž celotnega preučevanega odseka, tako v intronih kot v eksonih (slika 48). Določena DNA in proteinska zaporedja so shranjena pod sledečimi zaporednimi števkami v javni bazi podatkov NCBI GenBank: FJ810102-FJ810121, FJ705444, GQ152150-GQ152288, GQ168346-168367.



Slika 48:

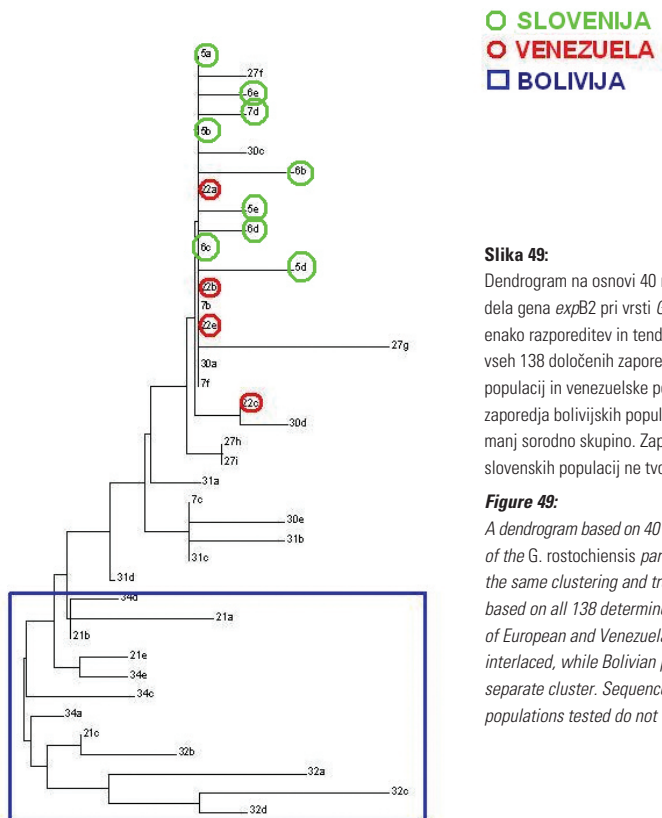
Grafični prikaz entropije za določena DNA zaporedja parazitskih genov *G. rostochiensis* *expB2* (A), *sod* (B) in *peI2* (C) razkriva raznolikost vzdolž zaporedij. Organizacija preučevanih odsekov genov je predstavljena pod vsakim grafom entropije; črna polja predstavljajo eksone, bela introne, siva neprevedena zaporedja, ki so predstavljeni v pravilnem sorazmerju, številke označujejo dolžino intronov in eksonov v baznih parih pri reprezentativnem klonu.

Figure 48:

Entropy plots for determined DNA sequences of *G. rostochiensis* parasitism genes *expB2* (A), *sod* (B) and *peI2* (C) present variability throughout the sequences. Organizations of the determined gene sequences are presented below each entropy plot; exons as black boxes, introns as white boxes, untranslated sequences as grey, drawn schematically to indicate their relative position and sizes in the representing clone.

Zaporedja *expB2* so razkrila 95 % ali večjo identičnost. Večina raznolikosti je bila na račun enobaznih zamenjav, manjši del pa na račun manjših (do nekaj baznih parov dolgih) insercij ali delecij, večinoma v intronih. Nobena od navedenih raznolikosti v nukleotidnih zaporedjih ni bila značilna za določeno populacijo oziroma patotip, saj smo pokazali veliko raznolikost, tako med populacijami, kot tudi znotraj posamezne populacije. Podobne rezultate smo dobili tudi za gena *sod* in *pel2*, kjer so zaporedja kazala 98,6 % oziroma 94,1 % ali večjo identičnost med določenimi zaporedji.

S konstrukcijo dendrograma 138 zaporedij dela gena *expB2* smo analizirali, katera zaporedja so si med seboj bolj ter katera manj podobna. Zaporedja šestih evropskih populacij, ki zajemajo različne znane patotipe ter zaporedja venezuelske populacije se prepletajo, zaporedja treh bolivijskih populacij pa tvorijo ločeno, manj sorodno skupino (slika 49).



Slika 49:

Dendrogram na osnovi 40 reprezentativnih zaporedij dela gena *expB2* pri vrsti *G. rostochiensis* prikazuje enako razporeditev in tendence kot dendrogram vseh 138 določenih zaporedij. Zaporedja evropskih populacij in venezuelske populacije se prepletajo, zaporedja bolivijskih populacij pa tvorijo ločeno, manj sorodno skupino. Zaporedja dveh testiranih slovenskih populacij ne tvorijo ločene skupine.

Figure 49:

A dendrogram based on 40 representative sequences of the *G. rostochiensis* partial gene *expB2* shows the same clustering and trends as a dendrogram based on all 138 determined sequences. Sequences of European and Venezuela populations are interlaced, while Bolivian populations form a separate cluster. Sequences of two Slovenian populations tested do not form a separate clade.

Zaporedja dveh testiranih slovenskih populacij ne tvorijo ločene skupine. Evropske populacije ogorčice *G. rostochiensis* zajemajo le del genetske raznolikosti, ki jo lahko najdemo v Južni Ameriki. Podobne rezultate so predhodno pokazale tudi raziskave drugih molekularnih označevalcev in niso presenetljive ob dejstvu, da krompirjeve cistotvorne ogorčice izvirajo iz Južne Amerike, v Evropo pa so bile po mnenju številnih avtorjev zanesene v šestnajstem stoletju, skupaj s krompirjem, iz gorskih predelov Južne Amerike. Vnos v Evropo predstavlja ozko grlo, ki je zmanjšalo genetsko raznolikost zajedavca.

Oznake izraženih zaporedij (ESTs) so pokazale prisotnost dveh genov za ekspanzin pri ogorčici *G. rostochiensis*: gena za ekspanzin B1 (*expB1*) in ekspanzin B2 (*expB2*). V okviru naših raziskav smo se omejili na *expB2* in pripravili začetne oligonukleotide, ki so specifični za ta gen. Ko smo izolirali genomsko DNA iz posameznega osebk (ličinke druge stopnje) in določili zaporedje pri 15 klonih, smo dobili 10 različnih zaporedij z 99,1% ali večjo identičnostjo. Ta rezultat nakazuje obstoj genske družine – prisotnost več podobnih genov za podobne molekule ekspanzina B2 v posameznem organizmu. Podobno je bil obstoj genske družine že pokazan za gen *expB1* pri vrsti *G. rostochiensis* in drugih vrstah rastlinsko parazitskih ogorčic (Kudla in sod., 2005).

Analiza zaporedja genomske DNA je razkrila prisotnost štirih intronov v proučevanem zaporedju *expB2* pri ogorčici *G. rostochiensis*. Zelo zanimiv rezultat smo dobili, ko smo isti par začetnih nukleotidov uporabili pri sorodni vrsti *G. pallida*. V bazi oznak izraženih zaporedij (ESTs) pri vrsti *G. pallida* ni znanega zaporedja, ki bi kazalo značilno podobnost z geni za ekspanzin, vendar smo v našem poskusu vseeno uspešno namnožili odsek, ki je bil bistveno manjši kot pri vrsti *G. rostochiensis*. Analiza zaporedja vrste *G. pallida* je razkrila, da je to zaporedje zelo podobno zaporedju *expB2* pri ogorčici *G. rostochiensis*,

Slika 50:

Primerjava gena *expB2* med *G. rostochiensis* in *G. pallida* razkriva odsotnost intronov pri vrsti *G. pallida*

```

Intron 1 >G. pallida 15l      ATCTCGAACGAATCTT-----GCATGGGCTG
97 bp  >G. rostochiensis 5d  ATCTCGAACGAATCTGTAAAAATAAATATTTAA...TTATCATTCAATTTCTAAAGGCATGGGCTG

Intron 2 >G. pallida 15l      GCCTTGACGCGGGCA-----AGCCCAAAAT
146 bp >G. rostochiensis 5d  GCCTTGACGCGGGCAAGGTCAGTCAAGAGTCTC...GTCTTACTGAAAAATTCAATTAGCCCAAAAT

Intron 3 >G. pallida 15l      GACTACAAAGGGAAG-----AGTCTGACCC
54 bp  >G. rostochiensis 5d  GACTACAAAGGGAAGAGGTTGGCCAAATTTGTTT...TCAAAGTTGCAACCCCTTGAAGTCTGACCG

Intron 4 >G. pallida 15l      TGGGCAAGCAACGG-----GCGCTACGCT
294 bp >G. rostochiensis 5d  TGGGCAAGCAACGGTTAGAAATTACATATGTC...ATGAAATACAAATTTATTTAGCGCTACGCT

```

Figure 50:

A comparison of the *expB2* gene in *G. rostochiensis* and *G. pallida* reveals the lack of introns in *G. pallida*

s tem, da v zaporedju manjkajo vsi štirje introni (slika 50). Navadno imajo sorodne vrste ohranjeno število in mesto intronov v genih, znani pa so tudi redki primeri, ko so introni prisotni v določeni vrsti in odsotni v sorodni vrsti (Kent in Zahler, 2000). Iz poravnave med samo dvema zaporedjema sicer ni moč določiti ali gre za izgubo ali pridobitev intronov, ki se je zgodila v evoluciji po ločitvi dveh vrst, vendar se po hipotezi introni lahko izgubijo med popravljanjem napak v dvojni vijačnici DNA.

Podobne analize smo naredili tudi na delu gena za izoencim superoksid dizmutazo. Rezultati so tudi tu pokazali veliko medpopulacijsko kot tudi znotrajpopulacijsko raznolikost in niso razkrili molekularnih označevalcev, ki bi jih lahko uporabili za nedvoumno določitev pripadnosti določeni populaciji oziroma patotipu. Preučevano zaporedje za superoksid dizmutazo vsebuje tri introne pri obeh vrstah krompirjevih čistotvornih ogorčic, je pa drugi intron za 80 bp krajši pri vrsti *G. pallida* kot pri *G. rostochiensis*.

Kljub številnim raziskavam na področju parazitskih dejanikov pri rastlinsko parazitskih ogorčicah, proučevanju mehanizmov parazitiranja in identifikaciji številnih novih parazitskih dejavnikov v zadnjih letih, je o raznolikosti parazitskih genov malo znanega. Naša študija pomembno prispeva k razumevanju kompleksnih odnosov (interakcij) med gostiteljem in parazitom.

9.9 Obvladovanje

Stalni zdravstveni nadzor obdelovalnih tal je, skupaj s primernim kolobarjem, temelj za ohranjanje primerne zdravstvene stanja krompirišč. V primerih, da krompirjeve ogorčice presežejo prag ugotovljivosti in kasneje tudi škodljivosti, moramo, če je le mogoče, iz sistema kolobarjenja izključiti krompir, ki je glavna gostiteljska rastlina teh ogorčic. V večini evropskih držav, kjer lahko s prenehanjem pridelovanja krompirja zmanjšamo populacijo krompirjevih ogorčic letno za 35 %, potrebujemo za minimiziranje škode od pet do sedem let. V toplejših mediteranskih območjih je tovrstno zmanjševanje populacije hitrejša, zaradi česar je dovolj učinkovit tudi ožji kolobar.

V sklopu obvladovanja krompirjevih ogorčic so predpisi, kot sta na primer Direktiva sveta 69/465/EGS o obvladovanju rumene krompirjeve ogorčice in Odredba o ukrepih za preprečevanje širjenja in zatiranje krompirjevega raka (*Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.) in krompirjevih ogorčic (*Globodera rostochiensis* Woll. in *Globodera pallida*

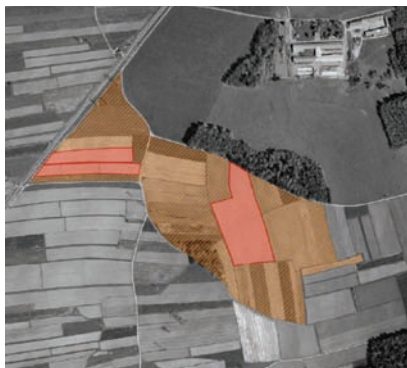
Stone), Uradni list RS, št. 51/98) izjemno pomembni. Na njihovi podlagi se sprejemajo ustrezni fitosanitarni ukrepi in priporočila, ki nastajajo na temelju dejanske ogroženosti pridelave krompirja zaradi krompirjevih ogorčic. Poseben status ima bela krompirjeva ogorčica *G. pallida*, ki še ni bila ugotovljena na pridelovalnih zemljiščih v Sloveniji in je bilo zato celotno ozemlje Slovenije leta 2003 s Pravilnikom o varovanih območjih za belo krompirjevo ogorčico, *Globodera pallida* Stone, Ur. l. RS, št. 91/2003, razglašeno kot varovano območje.

Z odločbo Fitosanitarne uprave RS, izdane na podlagi rezultatov posebnega nadzora krompirjevih ogorčic, ki ga koordiniramo in v sodelovanju s Fitosanitarno inšpekcijo izvajamo na Kmetijskem inštitutu Slovenije, je bilo v zvezi z vrsto *G. rostochiensis* v Sloveniji do vključno leta 2008 razmejenih sedem manjših žarišč z ustreznim varnostnim območjem in eno območje njene uralitve v Zgornjem Posočju. Na območju Dobrove pri Dravogradu (najdba rumene krompirjeve ogorčice v letih 1971 in 1975), kot tudi na območju Libelič (najdba rumene krompirjeve ogorčice leta 1999 in 2000) se ta škodljivi organizem obravnava kot izkoreninjen. Fitosanitarne ukrepe, ki temeljijo na omejevanju sajenja gostiteljskih rastlin oziroma ustreznem kolobarju in sajenju odpornih sort krompirja, smo glede na njihov namen in cilje razvrstili v 3 skupine:

1. Ukrepi za eradikacijo škodljivega organizma, ki temeljijo predvsem na za-travitvi napadenih njiv za obdobje deset let, po potrebi tudi več let, prepovedi pridelave krompirja (semenskega in jedilnega), jajčevcev ali paradiznika in na vzpostavitvi ožjega varnostnega območja (npr: sprejeti ukrepi ob najdbi rumene krompirjeve v Libeličah leta 2000). Na širšem varnostnem območju, ki obkroža ožje varnostno območje se lahko prideluje jedilni krompir, vendar največ enkrat v štirih letih (štiri letni kolobar). Krompir, ki je bil pridelan na napadenem zemljišču, se uniči. Potrebno je tudi uničiti samosevni krompir na vseh zemljiščih v napadenem in varnostnem območju, hkrati pa je potrebno vpeljati ustrezne higienske ukrepe za zmanjšanje prenosa oziroma širjenja krompirjevih ogorčic z mehanizacijo.
2. Ukrepi za preprečevanje širjenja in zmanjševanje populacije krompirjevih ogorčic (npr. sprejeti ukrepi ob najdbi rumene krompirjeve ogorčice v Žabnici leta 2004), v okviru katerih se opredeli žarišča napada oziroma ustrezno

veliko razmejeno območje (slika 51), v sklopu katerega se vzpostavi ustrezen sistem pridelave rastlin, ki zajema prepoved pridelave krompirja, jajčevcev ali paradižnika v samem žarišču. V razmejenem območju se mora ustrezno kolobariti, krompir se lahko prideluje največ enkrat v štirih letih (štiri letni kolobar). Krompir, pridelan na napadenih zemljiščih, se mora pred prodajo oziroma distribucijo ustrezno očistiti zemlje, v kateri bi se lahko nahajale ciste krompirjevih ogorčic. Potrebno je vpeljati ustrezne higienske ukrepe za zmanjšanje prenosa oziroma širjenja krompirjevih ogorčic z mehanizacijo na najmanjšo možno mero (prepoved nepotrebne prevoza čez okužena zemljišča, čiščenje mehanizacije – čimbolj dosledno odstranjevanje zemlje na mestu uporabe itn.). Potrebno je tudi uničevanje samosevnega krompirja na vseh zemljiščih v razmejenem območju. Prav tako je potrebno določiti biološko raso krompirjeve ogorčice in za pridelavo izbrati na ugotovljeno biološko raso odporne kultivarje krompirja.

3. Ukrepi zatiranja na območju, kjer eradikacija ni mogoča in kjer se je škodljivi organizem že ustalil (npr: sprejeti ukrepi ob najdbi rumene krompirjeve v Zgornjem Posočju leta 2005). Ti ukrepi so usmerjeni predvsem v preprečevanje širjenja krompirjevih ogorčic na druga pridelovalna območja krompirja, temeljijo pa na pravočasnem izkopu krompirja, prepovedi pridelave semenskega krompirja, prepovedi premeščanja vseh rastlin za saditev na območju (razen za samooskrbo), prepovedi premeščanja sadik paradižnika in jajčevca (razen za samooskrbo), prepovedi pridelave jedilnega



Slika 51: Razmejeno območje na območju Žabnice leta 2004

Figure 51: Demarcated area at Žabnica in 2004

krompirja v žariščih napada na napadenih zemljiščih, obveznem pranju oziroma čiščenju gomoljev jedilnega krompirja, če se ta premešča iz območja, obvezni uporabi sort krompirja, ki so odporne na biološko raso ugotovljene vrste in končno v obvezno, vsakoletno zamenjavo krompirjevega semena.

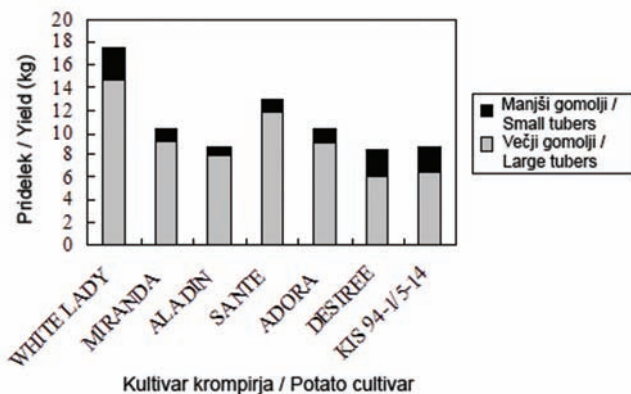
Kot varstveni ukrep pred razmnožitvijo in širjenjem krompirjevih ogorčic lahko učinkovito izrabljamo uvajanje odpornih kultivarjev krompirja, prilagojenih obstoječim biološkim rasam krompirjeve ogorčice, uporabo različnih privabilnih rastlin in končno tudi uporabo različnih nematicidov.

V gostiteljski rastlini sprožijo oziroma izrazijo odpornost tako imenovani R-geni. Prvi registriran gen, odgovoren za odpornost rastlin na pesno ogorčico, *H. schachtii*, je bil gen *Hs^{prot}*, ki so ga s križanjem prenesli iz divje pese v komercialne kultivarje sladkorne pese. Doslej je poznanih in v rastlinskem genomu kartiranih devet genov za odpornost na krompirjeve ogorčice. Gen *Gpa2* omogoča odpornost krompirja na vrsto *G. pallida*, gen *Hero* je odgovoren za odpornost paradižnika na krompirjevi ogorčici *G. pallida* in *G. rostochiensis*, gena *H1* in *Gro1-4* pa za odpornost na rumeno krompirjevo ogorčico, *G. rostochiensis* (Gheysen in Jones, 2006). Prve odporne kultivarje krompirja so ustvarili s križanjem podvrste *S. tuberosum* subsp. *andigena* s komercialnimi kultivarji krompirja in le dvema povratnima križanjima že leta 1963. Z znotrajvrstnim križanjem kultivarjev s *H1* genom lahko včasih pridelamo potomce z več kopijami istega gena. Na ta način so prišli do kultivarjev, ki so zajemali tri ali štiri kopije *H1* gena, zaradi česar so bili zelo uporabni pri žlahtnjenju, saj so zagotavljali odpornost potomcev tudi tedaj, ko so bili križani s popolnoma občutljivimi kultivarji. Odpornost na rumeno krompirjevo ogorčico *G. rostochiensis* je bila ugotovljena tudi pri samoniklih sorodnikih znotraj rodu *Solanum*, pri vrstah *S. kurtzianum*, *S. spegazzini*, *S. gourlayi* in *S. vernei*. Trajnost odpornosti na ogorčice je v veliki meri odvisna od števila genov (in s tem tudi od mehanizma odpornosti), ki jih uporabimo pri gojenih rastlinah, zato si je potrebno zagotoviti več različnih genov oziroma več mehanizmov obrambe. V te namene potekajo v svetu intenzivne raziskave novih virov odpornosti v gojenih in samoniklih rastlinskih vrstah.

V Evropi je množična uporaba odpornih kultivarjev s *H1* genom, na zemljiščih, kjer so zastopane mešane populacije vrst *G. rostochiensis* in *G. pallida* omogočila močno

povečanje virulentnejših populacij vrste *G. pallida*, ki predstavljajo danes veliko težavo v območjih z intenzivno pridelavo krompirja. Za razliko od monogenske odpornosti na vrsto *G. rostochiensis* je za odpornost na belo krompirjevo ogorčico *G. pallida* navadno odgovornih več genov – poligeno dedovanje. Izjema monogenske odpornosti je lokus *H2* vrste *S. multidisectum* z odpornostjo na patotip Pa1. Ta lokus pri žlahtnjenju krompirja ni bil pogosto uporabljen, ker je patotip Pa1 razmeroma avirulenten in sorazmerno redek. Izjema je tudi lokus *Gpa2* vrste *S. tuberosum* spp. *andigena*, ki omogoča zelo ozko odpornost na samo nekatere populacije ogorčice *G. pallida* (Van der Voort in sod., 1997). Primernejša in širša je poligena odpornost iz diploidnega samoniklega sorodnika vrste *S. vernei*, ki se je zaradi narave dedovanja manj uporabljala. Velike genetske razlike kultiviranega krompirja zahtevajo številna povratna križanja, preden se odstranijo vse agronomsko neželene lastnosti, poleg tega pa so zaradi poligene narave potrebna dodatna vmesna križanja, ki ohranjajo ustrezno raven odpornosti.

Sajenje kultivarjev krompirja, ki so odporni na krompirjeve ogorčice spada med najuspešnejše strategije obvladovanja teh škodljivcev. Danes je na trgu veliko kultivarjev krompirja z odpornostjo na rumeno krompirjevo ogorčico *G. rostochiensis*. Nasprotno se je izkazalo žlahtnjenje za odpornost na vrsto *G. pallida* kot zelo težavno zaradi poligene narave odpornosti, zato je na trgu na voljo le nekaj kultivarjev, ki izražajo določeno stopnjo odpornosti oziroma tolerantnosti na biorase Pa2 in Pa3. Na območjih, kjer so razširjene krompirjeve ogorčice, se proti njim najučinkoviteje borimo s kombinacijo sajenja odpornih kultivarjev in ustreznim kolobarjem.



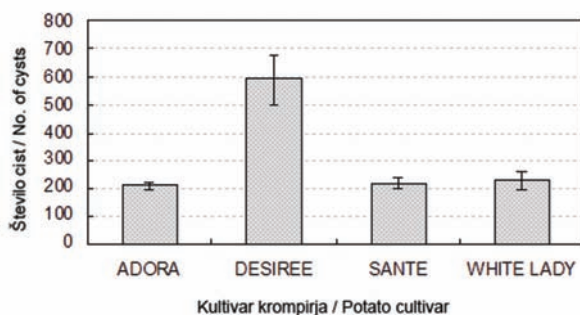
Slika 52: Pridetek krompirja pri različnih sortah krompirja

Figure 52: The potato yield in different potato cultivars

Za uvajanje primernih kultivarjev krompirja v kolobar je nujno potrebna določitev biološke rase v tleh navzoče krompirjeve ogorčice s pomočjo laboratorijskih testov oziroma s pomočjo testnih rastlin (glej podpoglavje 9.7).

Pridelek krompirja je odvisen od gostote populacije krompirjevih ogorčic v tleh (Seinhorst, 1965), kot tudi od drugih okoljskih dejavnikov, na primer tipa tal (Trudgill, 1986), vlažnosti tal, prehranjenosti rastlin itn. Pri preučevanju vpliva rumene krompirjeve ogorčice, *G. rostochiensis* na pridelek nekaterih sort krompirja v dolini Trente smo ugotovili, da biološka rasa Ro1/4 rumene krompirjeve ogorčice ne vpliva le na količino pridelka krompirja, ampak tudi na njegovo kakovost oziroma na velikost krompirjevih gomoljev (slika 52) (Urek s sod., 2008). V omenjenem poskusu se je najbolje izkazala sorta White Lady, ki je dala statistično značilno največji pridelek, njej pa so sledile sorte Sante, Miranda, Adora in Aladin. Najslabši pridelek je bil ugotovljen pri klonu KIS 94-1/5-14 in sorti Desiree. Pozni sorti White Lady in Sante ter zgodnja sorta Adora so se izkazale kot primerne za pridelavo v dolini Trente.

V okviru preučevanja vpliva različnih sort krompirja na populacijsko dinamiko rumene krompirjeve ogorčice je bilo v istem poskusu ugotovljeno, da različne sorte krompirja vplivajo na populacijsko gostoto in vitalnost ogorčice *G. rostochiensis*. Medtem, ko se je število cist vrste *G. rostochiensis* pri sorti Desiree po izkopu krompirja povečalo na 396 % začetne populacije, se je njihovo število pri sortah White Lady, Sante in Adora zmanjšalo na 54 %, 59% oziroma 79% začetne populacije (slika 53). Prav tako je bilo ugotovljeno, da je pri občutljivi sorti Desiree začetna populacija viabilnih jajčec bistveno narasla, pri odpornih sortah pa se je zmanjšala (Urek s sod., 2008).

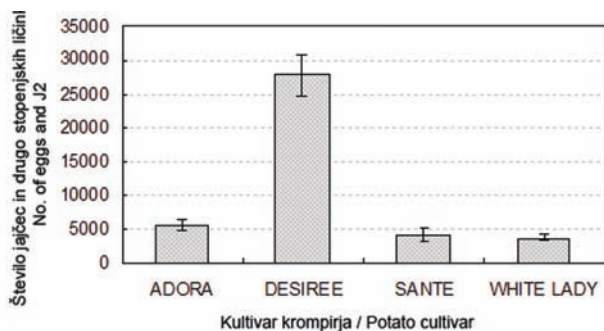


Slika 53:

Skupno število cist ogorčice *G. rostochiensis* / 100 cm³ vzorca tal (začetna populacija $P_i = 208 \pm 50$)

Figure 53:

The total number of cysts of *G. rostochiensis* / 100 cm³ soil sample (initial population $P_i = 208 \pm 50$)



Na temelju tovrstnih preučevanj se pri pridelavi krompirja nakazujejo možnosti gojenja odpornih sort krompirja v smislu strategije gospodarnega kmetovanja na napadenih območjih.

SUMMARY

Potato cyst nematodes parasitize about 90 species of the genus Solanum and they are important potato pests. In this chapter, morphology, biology, host plants, symptoms of infestations, pathogenicity and distribution of Globodera rostochiensis, which is present in Slovenia, as well as G. pallida, which was recently intercepted for a few times, are discussed. Potato cyst nematode survey in Slovenia has been carried on since 1963. Yellow potato cyst nematode, G. rostochiensis, was found for the first time in Slovenia in Dobrava near Dravograd in 1971. This was followed by the findings of G. rostochiensis in Libeliče near Dravograd (1999), Šenčur near Kranj (2000), Okroglo near Zlato polje (2003), Žabnica near Kranj (2004), Posočje - the Trenta valley (2004), Čepovan near Nova Gorica (2006) and Strahinj and Voglje near Kranj (2007). Infested fields which spread from northern to western parts of Slovenia were always limited or geographically isolated. However, with the exception of the restricted mountainous Trenta valley, the infested area as a whole has not exceeded 20 ha. The infestation at Okroglo was very weak. After the findings, adequate phytosanitary measures were taken to prevent the PCN spread within the region.

Correct and quick identification of the species is the basis for suitable and effective control of pests. In addition to morphometrical analyses of the nematodes, the new molecular methods are gaining on importance in the identification of plant-parasitic nematodes. Molecular diagnostic methods for identification of plant-parasitic nematodes of genus Globodera, such as PCR, real-time PCR, PCR-RFLP, rDNA sequencing and protein analysis effectively practiced at the Agricultural Institute of Slovenia, are presented.

Potato cyst nematode populations vary in degree of virulence for different potato cultivars. Based on the ability of G. rostochiensis and G. pallida to develop on

certain cultivars of Solanum pathotypes are defined. Tests for pathotype and virulence determination are defined.

Parasitic factors are all the factors, genes and their products contributing to the parasitic life style of an organism. Variability of three key parasitic factors of G. rostochiensis, expansin B2, pectate lyase 2 and superoxide dismutase studied at the Agricultural Institute of Slovenia, is discussed.

Resistant cultivars play an important role in the management and prevention of spreading of PCN. Nine resistance genes to PCN have been identified and mapped in cultivated and wild Solanum plant genomes. H1 gene from Solanum tuberosum ssp. andigena which assures resistance to G. rostochiensis Ro1 pathotype has been used in breeding of several potato cultivars. These cultivars have been widely grown in Europe which has led to the emergence, recognition and current dominance of G. pallida. There are several potato cultivars which are resistant to G. rostochiensis and partially resistant to G. pallida available on the market. Appropriate crop rotation in combination with growing resistant potato cultivars enables effective PCN management. In the chapter, the method for potato cultivars resistance testing which is used at Agricultural Institute of Slovenia is also described.

The influence of potato cyst nematode G. rostochiensis pathotype Ro1/4 on the yield of different potato cultivars was studied in a field trial conducted in Trenta valley. Susceptible cultivar Desiree and the resistant cultivars White Lady, Miranda, Aladin, Sante and Adora, and the clone KIS 94-1/5-14 were included in the test. The yield of cv. White Lady was the highest and that of susceptible cv. Desiree the lowest. The influence of resistant potato cultivars on the population density and viability of G. rostochiensis was studied on cultivars (White Lady, Sante, Adora) resistant to G. rostochiensis pathotype Ro1/4 and on susceptible cultivar Desiree which was used as a control. The total number of cysts/100 cm³ soil sample and the number of eggs and juveniles per cyst increased of the initial population in the plots where cultivar Desiree was grown. The G. rostochiensis population density decreased after one year of growing resistant cultivars: White Lady, Sante and Adora.

10 VIRI

- Bačić, J., Gerič Stare, B., Širca, S., Urek, G.** 2008. Analyses of *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* populations from Serbia by morphometrics and real-time PCR. Russian journal of nematology, 16: 61-63.
- Baldwin, J. G., Mundo-Ocampo, M.** 1991. Heteroderinae, Cyst- and Non, Cyst-Forming Nematodes. V: Nickle, W. R. Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong: 275-362.
- Blaxter, M. L.** 2001. Molecular analysis of nematode evolution. V: Kennedy, M.W., Harnett, W. Parasitic nematodes; molecular biology, biochemistry and immunology. CABI publishing 486: 1-24.
- Brzeski, M.** 1998. Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe. Museum and Institute of Zoology, Polish Academy of Sciences, Warszawa, 395 s.
- Bulman, S. R., Marshal, J. W.** 1997. Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 25: 123-129.
- CPC** - Crop Protection Compendium, Global Module, CAB International, Wallingford, Oxon OX 10 8DE, UK.
- Davis, E. L., Hussey, R. S., Baum, T.J.** 2009. Parasitism genes: what they reveal about parasitism. V: Berg, R. H. in Taylor, C. G. Cell biology of plant nematode parasitism.- Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 15-44.
- Decker, H.** 1969. Phytonematologie. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin, 526 s.
- Di Vito, M., Greco, N.** 1986. Pea Cyst Nematode.- V: Lamberti, F., Taylor, C. E. Cyst Nematodes, Plenum Press, New York, London: 321-332.
- EPPO**, 1981. Data sheets on quarantine organisms No. 125, *Globodera rostochiensis*. EPPO Bulletin, 11 (1).
- Fenwick, D. W.** 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii*. Journal of Helminthology, 18: 155-172.
- Fleming, C. C., Powers, T. O.:** Potato cyst nematode diagnostics: morphology, differential hosts and biochemical techniques. V: Marks, R. J., Brodie, B. B.: Potato Cyst Nematodes - Biology, Distribution and Control, CAB International, 1998, 408 s.
- Gasser R. B.** 2001. Identification of Parasitic Nematodes and Study of Genetic Variability Using PCR Approaches. V: Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology, Kennedy, M.W., Harnett, W. (Ur.). CABI Publishing: 53-82.
- Gerič Stare, B., Širca, S., Strajnar, P., Urek, G.** 2009. Molekularna diagnostika rastlinsko parazitskih ogorčic v Sloveniji. V: Trdan S (ur.). Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Nova Gorica, 4.-5. marec 2009. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije = Plant Protection Society of Slovenia (v tisku).
- Gheysen, G., Jones, J. T.,** 2006. Molecular aspects of plant-nematode interactions. V: Perry, R. N., Moens, M. Plant Nematology. CABI publishing: 234-254.
- Golden, A. M., Ellington, D. S.** 1972. Redescription of *Heterodera rostochiensis* (Nematoda: Heteroderidae) with a key and notes on related species. Proc. Helm. Soc. Wash., 39: 64-78.
- Golden, A. M., Klindić, O.** 1973. *Heterodera achilleae* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae) from Yarrow in Yugoslavia. Journal of Nematology, 5(3): 196-201.
- Golden, A. M.** 1986. Morphology and identification of cyst nematodes. V: Lamberti, F. and Taylor, C. E. (eds), Cyst nematodes. Plenum Press, New York: 75-99.
- Greco, N.** 1986. The Carrot Cyst Nematode. V: Lamberti, F., Taylor, C. E. Cyst Nematodes, Plenum Press, New York, London: 333-346.
- Grubišić, D., Oštrec, L., Gotlín Čuljak, T., Blumel, S.** 2007. The occurrence and distribution of potato cyst nematodes in Croatia. Journal of Pest Science, 80(1): 21-27.
- Hafez, S., Sundararaj, P., Handoo, Z. A., Skantar, A. M., Carta, L. K., Chitwood, D. J.** 2007. First report of the pale cyst nematode, *Globodera pallida*, in the United States. Plant disease, 91(3): 325.
- Handoo, Z. A.** 2002. A Key and Compendium to Species of

- the *Heterodera avenae* Group (Nematoda: Heteroderidae). Journal of Nematology, 34(3): 250-262.
- Hietbrink, H., Ritter, C. E.** 1982. Separating cysts from dried soil samples by a new centrifugation and a flotation method.- Abstracts, XVth International Symposium, European Society of Nematologists, St. Andrews: 28-29.
- Hržič, A.** 1973. Izdvajanje nematoda pomoću vrtložnog gibanja. Zaštita bilja, XXIV, 122: 53-60.
- Hržič, A.** 1980. Raziskava korelacij med anatomsko zgradbo in morfologijo distalne regije cist nematod vrst *Heterodera*. Doktorska disertacija, BF Univ. v Ljubljani, Ljubljana, 129 s.
- Hržič, A.** 1985. Morfologija cist nematod rodu *Heterodera* in njihovo določanje na podlagi parametrov. Zbornik BF Univerze E.k. v Ljubljani, 45: 115-126.
- Hržič, A., Urek, G.** 1987. Razširjenost rastlinsko-parazitnih ogorčic rodov *Punctodera*, *Globodera* in *Heterodera* (Heteroderidae). Zb. Bioteh. fak. Univ. Edvarda Kardelja Ljubl., Kmet., 49: 253-257.
- Hržič, A., Urek, G.** 1988. Razširjenost cistotvornih ogorčic družine Heteroderidae. Zb. Bioteh. fak. Univ. Edvarda Kardelja Ljubl., Kmet., 51: 271-279.
- Hržič, A., Urek, G.** 1989. Preučevanje nematopopulacij obdelovalne zemlje. Zb. Bioteh. fak. Univ. Edvarda Kardelja Ljubl., Kmet., 53: 115-129.
- Hržič, A., Urek, G.** 1990. Preučevanje nematopopulacij obdelovalne zemlje. Zb. Bioteh. fak. Univ. Ljubl., Kmet. 55: 97-102.
- Hržič, A., Urek, G.** 1990. Razširjenost cistotvornih ogorčic (Heteroderidae) v obdelovalnih tleh Slovenije. Sodob. kmet., 23(12): 519-523.
- Hržič, A., Urek, G.** 1991. Razširjenost grahove ogorčice v obdelovalnih tleh Slovenije. Sodob. kmet., 24(7/8): 340-341.
- Hržič, A., Urek, G.** 1992. Proučevanje nematofavne obdelovalnih tal. Zb. Bioteh. fak. Univ. Ljubl., Kmet. (1990), 59: 169-173.
- Hržič, A., Urek, G.** 1993. Nematološka zdravstvena kontrola obdelovalnih tal. Sodob. kmet., 26(7/8): 304+337-339.
- Hržič, A., Urek, G.** 1995. Nematološka kontrola obdelovalnih tal. Sodob. kmet., 28(11): 492-493.
- Hržič, A., Urek, G.** 1996. Nematološka kontrola obdelovalnih tal. Sodob. kmet., 29(5): 231-232.
- Hooper, D. J.** 1986. Handling, fixing, staining and mounting nematodes. V: Southey, J. F., Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes, Reference Book 402, Her Majesty's Stationery Office, London: 59-80.
- Kent, W. J., Zahler, A. M.** 2000. Conservation, Regulation, Synteny, and Introns in a Large-scale *C. briggsae-C. elegans* Genomic Alignment. Genome Research, 10:1115-1125.
- Kirjanova, E. S., Krall, E. L.** 1980. Plant parasitic nematodes and their control. (prevod dela: Paraziticheskie Nematody Rastenii I Mery Bor'by s Nimi, Akademiya Nauk SSSR, 1971, iz ruščine v angleščino). Amerid publishing Co. PVT, LTD., New Delhi: 748 s.
- Klindić, O., Petrović, D.** 1974. Prilog proučavanju nove nematodne vrste *Heterodera achilleae* (Golden, Klindić). Zaštita bilja, 128-129: 141-162.
- Kort, J.** 1974. Identification of pathotypes of the potato cyst nematode. EPPO Bulletin, 4: 511-518.
- Kort, J., Ross, H., Rumpfenhorst, H. J., Stone, A. R.** 1977. An international scheme for the identification of pathotypes of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. Nematologica, 23: 333-339.
- Krall, E. L., Krall, H. A.** 1978. The revision of plant parasitic nematodes of the family Heteroderidae on the basis of the trophic specialization of these parasites and their co-evolution with their host plants. Fitohelmintologicheskije issledovaniya, Moscow, USSR. 'Nauka': 39-56.
- Krnjaić, Đ., Krnjaić, S.** 1987. Fitonematologija. Nolit, Beograd, 433 s.
- Krnjaić, Đ., Bačić, J., Krnjaić, S., Čalić, R.** 2000. Prvi nalaz zlatnožute krompireve nematode u Jugoslaviji. XI jugoslovenski simpozijum o zaštiti bilja i savetovanje o primeni pesticida, Zlatibor, 71.
- Kudla, U., Qin, L., Milac, A., Kielak, A., Maissen, C., Overmars, H., Popeijus, H., Roze, E., Petrescu, A., Smant, G., Bakker, J., Helder, J.** 2005. Origin, distribution and 3D-modeling of Gr-EXPB1, an expansin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. FEBS Letters, 579 (11): 2451-2457.
- Luc, M., Maggenti, A. R., Fortuner, R.** 1988. A reappraisal of Tylenchina (Nemata) 9. The family Heteroderidae Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941. Revue de Nematologie, 11:159-176.
- Malovrh, P.** 2007. Krvni doping – športniki, novodobni vampirji?. Kvarkadabra, <http://www.kvarkadabra.net/article.php/Krvni-doping>.
- Mullis, K. B.** 1987. U.S. Patent: Process for Amplifying Nu-

cleic Acids, US 4,683,202 - July 28, 1987.

Mulvey, R. H. 1972. Identification of *Heterodera* cysts by terminal and cone top structures. *Can. J. Zool.*, 50: 1277-1292.

Mulvey, R. H., Golden, A. M. 1983. An illustrated key to the cyst-forming genera and species of Heteroderidae in the Western Hemisphere with species morphometrics and distribution. *Journal of Nematology*, 15(1):1-59.

Norton, D. C. 1984. *Nematode Parasites of Corn.* - V: Nickle, W. R., *Plant and Insect Nematodes.* - Marcel Dekker, Inc., New York, Basel: 61-94.

Riggs, R. D., Wrather, J. A. 1992. *Biology and Management of the Soybean Cyst Nematode.* - APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, 186 s.

Seinhorst, J. W. 1964. Methods for the extraction of *Heterodera* cysts from not previously dried soil samples. *Nematologica*, 10: 87-94.

Seinhorst, J. W. 1965. The relation between nematode density and damage to plants. *Nematologica*, 11: 137-154.

Seinhorst, J. W. 1970. Separation of *Heterodera* cysts from organic debris in ethanol 96 %. *Nematologica*, 16: 330.

Seinhorst, J. W. 1986. Agronomic aspects of potato cyst nematode infestation. *Cyst Nematodes*, eds. Lamberti, F., Taylor, C.E., NATO ASI Series. series A: Life Sciences Vol. 121: 211-227.

Shepherd, A. M. 1986. Extraction and estimation of cyst nematodes.- V: Southey, J. F., *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*, Reference Book 402, Her Majesty's Stationery Office, London: 31-50.

Sikora, R. A., Maas, P. W. T. 1986. Analysis of *Heterodera trifolii* complex and other species in the schachtii group attacking legumes.- V: Lamberti, F., Taylor, C. E., *Cyst Nematodes*, Plenum Press, New York, London: 293-313.

Southey, J. F. 1986. *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. Reference Book 402, Her Majesty's Stationery Office, London: 202 s.

Spears, J. F. 1968. The Golden Nematode. *Agr. Handbook U. S. Dep. Agric.*: 81.

Steele, A. E. 1984. *Nematode Parasites of Sugar Beet.* - V: Nickle, W. R., *Plant and Insect Nematodes.* - Marcel Dekker, Inc., New York, Basel: 507-570.

Stone, A. R. 1973. *Heterodera pallida* n.sp. (Nematoda: Heteroderidae), a second species of potato cyst nematode. *Nematologica*, 18: 591-606.

Nematologica, 18: 591-606.

Subbotin, S. A., Moens, M. 2006. Molecular taxonomy and phylogeny. str. 33-58. V: Perry, RN, Moens, M. (Urednika). *Plant Nematology*. CABI publishing, 447 s.

Stone, A. R. 1986. *Taxonomy and phylogeny of cyst nematodes.* V: Lamberti F, Taylor CE, (urednika). *Cyst Nematodes*. New York, USA: Plenum Press: 119-131.

Širca, S., Urek, G., Meglič, V. 2003. Molecular and biochemical methods used for the identification of *Globodera* species in Slovenia. *Plant Protection Science*, 39, 4: 151-153.

Širca, S., Urek, G. 2004. Morphometrical and ribosomal DNA sequence analysis of *Globodera rostochiensis* and *Globodera achilleae* from Slovenia. *Russian journal of nematology*, 12 (2): 161-168.

Širca, S., Geric Stare, B., Strajnar P., Urek G. 2009. Methods used for *Globodera* species diagnostics in Slovenia. EPPO Conference on diagnostics: York, 10. – 15. May 2009: Programme and abstracts. York, EPPO, 2009; 86.

Thorne, G. 1961. *Principles of Nematology.* - McGraw Hill Book Company, Inc., New York, Toronto, London, 553 s.

Trudgill, D. L. 1986. Yield losses caused by potato cyst nematodes: a review of the current position in Britain and prospects for improvement. *Annals of Applied Biology*, 108: 181-198.

Urek, G., Hržič, A. 1991. Razširjenost deteljne ogorčice v obdelovalnih tleh Slovenije. *Sodob. kmet.*, 24(11): 488-490.

Urek, G., Hržič, A. 1993. Razširjenost pesne in zeljne ogorčice v obdelovalnih tleh Slovenije. *Sodob. kmet.*, 26(3): 122-124.

Urek, G., Hržič, A. 1993. Pomen cistotvornih ogorčic in njihova geografska razširjenost v Sloveniji. V: Maček, J. (ur). *Zbornik predavanj in referatov s 1. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Radenci, 24.-5. februar 1993.* Ljubljana: Sekcija za varstvo rastlin pri Zvezi društev kmetijskih inženirjev in tehnikov Slovenije, 1993: 81-93.

Urek, G., Hržič, A. 1997. Izločanje cist iz talnih vzorcev in pregled rezultatov analiz geografske razprostranjenosti cistotvornih ogorčic za obdobje 1992 - 1996. V: Maček, J. (ur). *Zbornik predavanj in referatov 3. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin v Portorožu od 4. do 5. marca 1997.* Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: 133-139.

Urek, G. 1997. Nematopopulation of field soil in Slovenia = Nematopopulacija njivskih tal v Sloveniji. *Zb. Bioteh. fak.*

Univ. Ljublj., Kmet. (1990), 69: 127-136.

Urek, G., Hrzič, A. 1998. Ogorčice, nevidni zajedavci rastlin – fitonematologija. Ljubljana: samozal. G. Urek: 240 s.

Urek, G., Lapajne, S. 2001. Ugotavljanje navzočnosti cistotvornih ogorčic (Heteroderidae) v obdelovalnih tleh Slovenije v obdobju 1997-1999 = Detection of cyst-forming nematodes (Heteroderidae) in arable soil of Slovenia in the period 1997-1999. *Sodob. kmet.*, 34(10): 435-440.

Urek, G., Lapajne, S. 2001. The incidence of potato nematode, *Globodera rostochiensis* (Woll., 1923) Behrens, 1975, in Slovenia. *Zb. Bioteh. fak. Univ. Ljublj., Kmet.* (1990), 77(1): 49-58.

Urek, G., Širca, S., Meglič, V. 2002. Morphological characteristics and distribution of *Globodera* species in Slovenia. *Plant Prot. Sc.*, 38 (Special Issue 2): 354-357.

Urek, G., Širca, S. 2003. Efficiency of the system of nematode cyst extraction from soil samples used in Slovenia. *Acta phytopathol. entomol. Hung.*, 38(1/2): 209-215.

Urek, G., Širca, S., Karszen, G. 2003. A review of plant-parasitic and soil nematodes in Slovenia. *Nematology*, 5(3): 391-403.

Urek, G., Širca, S., Gerič Stare, B., Dolničar, P., Strajnar, P. 2008. The influence of potato cyst nematode *G. rostochiensis* infestation on different potato cultivars. *Journal of central european agriculture*. [Online ed.], 9(1): 71-76.

Van der Voort, J. R., Wolters, P., Folkrestsma, R., Hutten, R., Van Zandvoort, P., Vinke, H., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Jacobsen, E., Janssen, R., Bakker, J. 1997. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 874-880.

Von Mende, N., McNamara, D. 1995. Biology of the hop cyst nematode *Heterodera humuli*. I: Life cycle and survive. *Annals of applied biology*, 126(3): 505-516.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, Eds). San Diego, USA: Academic Press Inc.: 315-322.

Whitehead, A. G. 1985. *Chemical and Integrated Control of Cyst Nematodes*. - V: Lamberti, F., Taylor, C. E., *Cyst Nematodes*, Plenum Press, New York, London: 413-432.

11 SEZNAM SLIK

Slika 1: Drugostopenjska ličinka vrste *Heterodera galeopsidis* znotraj jajčnega ovoja (foto: Hržič).

Slika 2: Ciste limonastih oblik (*Heterodera* spp.).

Slika 3: Vulvin stožec zebrotave ogorčice (*Heterodera galeopsidis*).

Slika 4: Cirkumfenestralni tip fenestre krompirjeve ogorčice (*G. rostochiensis*).

Slika 5: Bifenestralni tip fenestre hmeljeve ogorčice (*Heterodera humuli*) (foto: Hržič).

Slika 6: Ambifenestralni tip fenestre zebrotave ogorčice (*Heterodera galeopsidis*) (foto: Hržič).

Slika 7: Dorzoventralna (levo) in bilateralna (desno) projekcija ciste (Hržič).

Slika 8: Asimetrična oblika ciste (Hržič).

Slika 9: Vulvina kalota (vulvin stožec). Dorzoventralna in bilateralna projekcija (Hržič).

Slika 10: Shematski prikaz notranjosti vulvinega stožca (Hržič).

Slika 11: Shematski prikaz rDNA evkariontskih organizmov. Tandemsko se ponavlja predel, ki nosi zapis za 18S, 5,8S in 28S rRNA ter vmesna nekodirajoča zaporedja označena z ITS (notranji prepisani vmesnik), ETS (zunanji prepisani vmesnik) in NTS (neprepisani vmesnik).

Slika 12: Grafični prikaz filogenetskega drevesa debla Nematoda (Nematoda) na podlagi DNA zaporedij 18S rRNA gena združen s podatki o ekologiji prehranjevanja. Arabske številke predstavljajo verjetnost združevanja v skupine (prirejeno po Blaxter, 2001).

Slika 13: Grafični prikaz filogenetskega drevesa cistotvornih ogorčic na podlagi DNA zaporedij ITS regije rRNA gena. Verjetnost združevanja v skupine večja od 60% je prikazana za ustrezne skupine (Subbotin in Moens, 2006).

Slika 14: Razvojni krog cistotvornih ogorčic.

Slika 15: Modificiran Oostenbrinkov postopek izločanja cist, ki ga uporabljamo na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

Slika 16: Naplavina s cistami na filtrirnem papirju.

Slika 17: Primerjava učinkovitosti različnih načinov loče-

vanja cist cistotvornih ogorčic iz ekstarhirane organske gmote.

Slika 18: Cistotomija – način rezanja cist – zgoraj (Hržič, 1980), opazovanje anatomske zgradbe vulvinega stožca – spodaj.

Slika 19: Izločanje ličinke iz jajčne ovojnice (foto: Hržič).

Slika 20: Vulvin stožec pesne ogorčice, *Heterodera schachtii*, znotraj ovojnice ciste je zaznaven obris ličinke.

Slika 21: Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca pesne ogorčice (Hržič).

Slika 22: Notranjost vulvinega stožca ovsove ogorčice, *Heterodera avenae*, močno razvite bule.

Slika 23: Notranjost vulvinega stožca deteljne ogorčice, *Heterodera trifolii*, v ospredju: podmost, v ozadju: bule.

Slika 24: Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca deteljne ogorčice (Hržič).

Slika 25: Notranjost vulvinega stožca zebrotave ogorčice (*Heterodera galeopsidis*) – podmost.

Slika 26: Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca zebrotave ogorčice (Hržič).

Slika 27: Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca zeljne ogorčice (Hržič).

Slika 28: Notranjost vulvinega stožca grahove ogorčice (*Heterodera göttingiana*).

Slika 29: Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca grahove ogorčice (Hržič).

Slika 30: Notranjost vulvinega stožca hmeljeve ogorčice (*Heterodera humuli*).

Slika 31: Bilateralna (II) in dorzoventralna (dv) projekcija modela vulvinega stožca hmeljeve ogorčice (Hržič).

Slika 32: Notranje površine ovojnice ciste korenčkove ogorčice (*H. carotae*).

Slika 33: Spolno analni predel vrste *Punctodera punctata*.

Slika 34: Spolno analni predel vrste *G. achilleae*.

Slika 35: Ciste krompirjeve ogorčice (*Globodera rostochiensis*).

Slika 36: Krompirjeva ogorčica (*Globodera rostochiensis*) - spolno analni predel ciste.

Slika 37: Spolno analni predel cist in bodala drugostopenjskih ličink štirih vrst rodu *Globodera*.

Slika 38: Posledice napada krompirjeve ogorčice.

Slika 39: Rezultati mrežnega vzorčenja.

Slika 40: Rumena krompirjeva ogorčica je v Sloveniji navzoča na Koroškem, Gorenjskem in Primorskem.

Slika 41: Fotografija agaroznega gela s produkti dupleks PCR reakcije za identifikacijo vrst *Globodera rostochiensis* in *G. pallida*. V skrajno levi koloni DNA lestvica 100 bp Plus (Fermentas) (oznaka M), vzorec 1: proga velikosti 434 bp, značilna za *G. rostochiensis*, vzorec 2: proga velikosti 265 bp značilna za *G. pallida*, vzorec 3: progi velikosti 434 bp in 265 bp potrjujeta prisotnost *G. rostochiensis* in *G. pallida*, vzorec 4: negativna kontrola, namesto matrične DNA je v reakcijo dodana voda.

Slika 42: Grafični prikaz naraščanja fluorescences med reakcijo PCR v realnem času predstavlja pomnoževanje matrične molekule DNA pri vzorcih z razredčeno genomsko DNA, ki ga uporabljamo pri določanju občutljivosti metode.

Slika 43: Vrh disociacijske krivulje 87.0 ± 0.5 °C pomeni zastopnost vrste *G. rostochiensis*, 83.3 ± 0.5 °C pa zastopnost vrste *G. pallida* v vzorcu.

Slika 44: Fotografija agaroznega gela s PCR-RFLP vzorci ITS regije za vrste *G. rostochiensis* (1), *G. pallida* (2), *G. tabacum* (3) in *G. achilleae* (4). DNA lestvica 100 bp Plus (Fermentas), uporabljeni restrikcijski encimi *AluI*, *HinfI*, *MboI*, *MseI*, in *RsaI*.

Slika 45: Grafični prikaz določanja strukture DNA molekule, imenovan kromatogram prikaže pozicijo nukleotidov v DNA molekuli (A, C, G, T).

Slika 46: Fotografija poliakrilamidnega gela prikazuje IEF vzorec vseh proteinov iz posamezne ciste pri vrstah *G. pallida* (kolone 1, 2, 3, 4, 5) in *G. rostochiensis* (kolone 8, 9, 10, 11, 12), kalibracijski komplet za širok spekter izoelektričnih točk (pI) (koloni 6, 7). Z A in B so označene razlike v pI.

Slika 47: Prirejen bat za drobljenje cist.

Slika 48: Grafični prikaz entropije za določena DNA zaporedja parazitskih genov *G. rostochiensis* *expB2* (A), *sod* (B) in *peI2* (C) razkriva raznolikost vzdolž zaporedij. Organizacija preučevanih odsekov genov je predstavljena pod vsakim grafom entropije; črna polja predstavljajo eksone, bela introne, siva neprepisane sekvence, ki so predstavljeni v

pravilnem sorazmerju, številke označujejo dolžino intronov in eksonov v baznih parih pri reprezentativnem klonu.

Slika 49: Dendrogram na osnovi 40 reprezentativnih zaporedij dela gena *expB2* pri vrsti *G. rostochiensis* prikazuje enako razporeditev in tendence kot dendrogram vseh 138 določenih zaporedij. Zaporedja evropskih populacij in venezuelske populacije se prepletajo, zaporedja bolivijskih populacij pa tvorijo ločeno, manj sorodno skupino. Zaporedja dveh testiranih slovenskih populacij ne tvorijo ločene skupine.

Slika 50: Primerjava gena *expB2* med *G. rostochiensis* in *G. pallida* razkriva odsotnost intronov pri vrsti *G. pallida*.

Slika 51: Razmejeno območje na območju Žabnice leta 2004

Slika 52: Pridelek krompirja pri različnih sortah krompirja

Slika 53: Skupno število cist ogorčice *G. rostochiensis* / 100 cm³ vzorca zemlje (začetna populacija $P_i = 208 \pm 50$).

Slika 54: Skupno število viabilnih jajčec ter ličink druge stopnje vrste *G. rostochiensis* / 100 cm³ vzorca tal (začetna populacija $P_i = 7013 \pm 2340$).

12 SEZNAM TABEL

Tabela 1: Število odvzetih vzorcev, analiziranih na prisotnost vrst iz rodov *Globodera*, *Punctodera* in *Heterodera*, v obdobju 1980 - 2002.

Tabela 2: Izmere čist in ličink ogorčice *Globodera rostochiensis* po različnih avtorjih.

Tabela 3: Diagnostične izmere za ogorčice *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *G. tabacum* in *G. achilleae* (po Flemingu in Powersu, 1998) v primerjavi z izmerami, opravljenimi na osebkih, najdenih pri nas. Izmere so v mikronih, dodane pa so tudi njihove srednje vrednosti.

Tabela 4: Vrste, ki smo jih določili na osnovi nukleotidnega zaporedja dela rDNA molekule, s pripadajočimi številskimi DNA zaporedij v javni bazi NCBI GenBank.

Tabela 5: Določitev bioloških ras oziroma patotipov krompirjevih ogorčic (*G. rostochiensis* in *G. pallida*) (po Kortu s sod., 1977 prilagodil Seinhorst, 1986) (Seinhorst, 1986).

Tabela 6: Relativna občutljivost kultivarjev krompirja na določen patotip krompirjevih ogorčic.

13 STVARNO KAZALO

abulata: 9, 18, 19, 62, 65, 68
Achillea abrotanoides: 77
Achillea millefolium: 75, 77
Adenophorea: 23, 24, 26, 29
Aethionema: 63
Afenestrata: 3, 5, 24
Agrostis capillaris: 74
Agrostis palustris: 74
Agrostis stolonifera: 74
ambifenestralni tip: 14, 15, 50
amfidelfičen: 8, 23
analna odprtina: 8, 9, 43, 76, 82
angleška ljuljka: 74
Anthemis cotula: 77
anus: 13, 82
Aphelenchida: 27
Apiaceae: 71
Ascaridida: 27
asimetrična cista: 16, 57
Asperula arvensis: 66
Atalodera: 24
Avena sativa: 74
avirulentni dejavnik: 102
banana: 4
bela detelja: 58, 59, 61
bela krompirjeva ogorčica: 79, 82, 88, 108
Bellodera: 24
Beta vulgaris var. *saccharifera*: 59
Bidera: 53
bifenestralni tip: 14, 53, 54
bilateralna projekcija: 15, 16, 17, 50, 57, 62, 64, 65, 68

- Bilobodera*: 24
 biološka rasa: 3, 54, 98, 99, 112
 bob: 66
Brassica: 62, 63
Brevicephalodera: 24
 brstični ohrovt: 63
 bula: 9, 20
 bulata: 9, 18, 19
Bursadera: 23
Cactodera: 3, 5, 26
Camelodera: 24
Cannabis sativa: 69
 Cephalobidae: 27
 cerviks: 20
Chenopodium: 58, 61
Chromadorida: 26
Chrysanthemum macrophyllum: 77
Cicer arietinum: 66
 cirkumfenestralni tip: 13, 14, 72, 76, 80, 82
 cista: 7, 11, 13, 15, 16, 19, 20, 32, 34, 38, 39, 40, 42, 43, 51, 52, 54, 56, 58, 60, 66, 70, 75, 76, 77, 82, 85, 88
 cistotvorne ogorčice: 3, 4, 8, 13, 23, 31, 53, 79, 101, 106
 Compositae: 77, 82
Cryphodera: 24
 cvetača: 63
 črna detelja: 58, 59
Daucus carota: 70, 71
Daucus pulcherrimus: 71
 detelja: 3, 58
 deteljna ogorčica: 56, 57, 58, 59
Dianthus: 58, 59
Dianthus caryophyllus: 59
 Diplogasteria: 23
 Diplogasterida: 27
 divja oljka: 71
 DNA: 25, 26, 27, 28, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 104, 106, 107
 DNA polimeraza: 89, 94
Dolichodera: 3, 5, 24
 Dorylaimida: 26, 27
 dorzoventralna projekcija: 15, 16, 17, 50, 57, 60, 62, 64, 65, 68
 Ekphyatodera: 24
 ekson: 104
 enoletna latovka: 74
 Enoplida: 24
Escherichia coli: 203
 Fabaceae: 66
 fenestra: 12, 13, 14, 15, 50, 65, 80, 82
 fenestracija: 76, 82
 Fenwickova posoda: 39
Festuca rubra: 74
 filogenetsko drevo: 25
 filogenija: 25
 fižol: 58
Galeopsis speciosa: 61
Galeopsis tetrahit: 59, 61
 gelska elektroforeza: 89
Globodera: 3, 5, 9, 10, 13, 20, 24, 33, 34, 35, 36, 75, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 85, 89, 92, 93
Globodera achilleae: 34, 36, 75, 76, 77, 78, 82, 83, 84, 94
Globodera artemisia: 82
Globodera pallida: 34, 79, 82, 107, 108
Globodera rostochiensis: 4, 34, 36, 79, 80, 81, 90, 92, 107, 113
Globodera tabacum: 13, 82, 84, 94
Globodera tabacum solanacearum: 82
Globodera tabacum tabacum: 82
Globodera tabacum virginiae: 82
Glycine max: 66
 grah: 3, 58, 64, 66, 67
 grahor: 66
 grahova ogorčica: 66, 67

- Granekovo razmerje: 13, 76, 82
 grenkoslad: 86
Hesperis: 63
Heterodera: 3, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 31, 33, 34, 35, 36, 39, 44, 53, 61, 66, 75, 77, 78
Heterodera amygdali: 4
Heterodera avenae: 4, 8, 9, 11, 14, 19, 34, 39, 53, 54
Heterodera cacti: 11
Heterodera carotae: 3, 10, 14, 36, 63, 69, 70, 71, 72
Heterodera cruciferae: 4, 8, 9, 11, 18, 36, 61, 62, 63
Heterodera ficif: 14
Heterodera galeopsidis: 7, 10, 12, 14, 15, 18, 36, 59, 60
Heterodera glycines: 4, 56
Heterodera göttingiana: 3, 9, 10, 14, 18, 34, 61, 64, 65, 66
Heterodera humuli: 8, 10, 14, 18, 36, 67, 68, 69
Heterodera leptonepia: 7
Heterodera oryzae: 4
Heterodera pseudorostochiensis: 34
Heterodera sacchari: 4
Heterodera schachtii: 3, 9, 12, 14, 18, 34, 36, 49, 50, 51, 53, 61
Heterodera trifolii: 4, 11, 13, 18, 34, 36, 56, 58, 59, 69, 77
Heterodera zaeae: 4
 Heteroderidae: 3, 5, 23
 Heteroderinae: 22, 24, 32
 hmelj: 14, 59, 67, 69
 hmeljeva ogorčica: 67, 68
Hordeum vulgare: 74
Humulus lupulus: 69
Hylonema: 24
Hyoscyamus niger: 86
 IEF: 96
 intron: 104, 105, 106, 107
 izoelektrično fokusiranje: 96
 jajčevce: 86
 jajčna vrečka: 11
 japonska oklobnica: 71
 ječmen: 3, 53, 55, 56
 kalota: 17
 kamnice: 63
 kobulnice: 71
 korenček: 71
 korenčkova ogorčica: 69, 71, 72
 koruza: 55
 križnice: 63
 krompir: 3, 4, 33, 59, 79, 80, 86, 87, 88, 89, 98, 99, 100, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113
 krompirjev rak: 34
 krompirjeva ogorčica: 29, 33, 34, 80, 82, 83, 87, 88, 102
 Lamiaceae: 63
 lasasta šopulja: 34
 lateralne linije: 50, 53, 57, 62, 64, 67, 70, 72, 75, 76, 80, 82
Lathyrus: 66
 lečnata grašica: 66
Lens culinaris ssp. *culinaris*: 66
Lolium perenne: 74
Lotus: 58
 lucerna: 58, 66
Lupinus albus: 66
Lupinus luteus: 66
 mandelj: 4
 mangold: 61
Matricaria chamomilla: 77
Matricaria indera: 77
Matthiola: 63
Medicago sativa: 66
Melilotus: 58
Meloidodera: 24
Meloidogyne: 11
 Mermithida: 26
 metuljnice: 58, 59, 66
 modificiran Oostenbrinkov postopek izločanja cist: 41

- monogenska odpornost: 111
- Mononchida: 26
- most: 12, 13, 14, 15, 20, 50, 54, 57, 60, 62, 65, 70
- mRNA: 103
- Mulveyev most: 20
- navadna čičerika: 66
- navadna konoplja: 69
- navadna leča: 66
- navadni grah: 66
- navadni hmelj: 69
- navadni rman: 75
- navadni zebkrat: 59, 61
- Nemata: 23, 24, 26, 27, 29
- Nematoda: 23, 26, 27, 29
- njivska oklobnica: 71
- njivska perla: 66
- nočnice: 63
- nukleotidno zaporedje DNA: 89, 93, 94, 95, 104, 105
- Olea europaea* L. subsp. *europaea*: 71
- ornamentacija: 8, 23
- oves: 74
- ovojnica ciste: 10, 11, 50, 57, 60, 76
- ovsova ogorčica: 53, 54, 55, 56
- Oxyurida: 27
- Panagrolamidae: 27
- paradižnik: 86, 108, 109, 110
- parazit: 3, 4, 23, 24, 27, 59, 61, 63, 64, 71, 74, 89, 90, 101, 103, 104, 109
- parazitski dejavnik: 102
- parazitski gen: 101
- pasje zelišče: 86
- patogenost: 52, 102
- patotip: 98, 99, 104, 105, 107, 111
- PCR: 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 97, 103, 113
- PCR v realnem času: 89, 91, 92, 93
- PCR-RFLP: 93, 94, 95, 113
- pesna ogorčica: 3, 4, 49, 50, 51, 52, 63
- Pisum sativum*: 64, 66
- Pisum sativum* var. *arvense*: 66
- plazeča šopolja: 74
- Poa annua*: 74
- Poa pratensis*: 74
- Poaceae: 55, 59
- podmost: 12, 19, 20, 44, 50, 54, 56, 57, 60, 62, 65, 70, 73
- poligeno dedovanje: 111
- polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov: 93
- polokno: 13
- Polygonum*: 58
- prodelfičen: 8, 23
- protein: 25, 89, 90, 91, 96, 102, 103, 104, 113
- proteinsko zaporedje: 25, 104
- Prunus*: 4
- pšenica: 53, 55, 56, 72, 74
- ptičja grašica: 66
- Punctodera: 3, 5, 8, 9, 13, 24, 35, 36, 72, 77
- Punctodera chalconensis*: 72
- Punctodera matadorensis*: 72
- Punctodera punctata*: 8, 9, 36, 72, 73, 75, 78
- razhudniki: 82, 86
- rdeča bilnica: 74
- rdeča detelja: 61
- rDNA: 25, 26, 29, 90, 93, 94, 95, 99, 113
- relativna občutljivost kultivarja: 100
- rezistenca: 102
- RFLP: 89
- Rhabditida: 27
- Rhigonematida: 27
- Rhizonema: 24
- riž: 4
- rmanova ogorčica: 77
- RNA: 25
- Rotylenchulus*: 11

- rumena krompirjeva ogorčica: 34, 79, 80, 87, 88
- Rumex*: 58, 61
- rž: 55
- Saponaria officinalis*: 61
- Sarisodera*: 24
- Secernentea: 23, 24
- Semifenestra: 13, 14, 19, 20
- semifenestralni tip: 13, 14
- sincicij: 54, 74, 101
- sladkorna pesa: 3, 4, 49, 59, 61, 79, 110
- sladkorni trs: 4
- snopast organ: 20, 50, 57, 60
- soja: 58, 66
- Solanaceae: 79, 86
- Solanum*: 59, 82, 86, 98, 110, 113, 114
- Solanum dulcamara*: 86
- Solanum gourlayi*: 110
- Solanum kurtzianum*: 110
- Solanum multidisectum*: 111
- Solanum nigrum*: 86
- Solanum spegazzini*: 110
- Solanum tuberosum*: 59, 114
- Solanum tuberosum* sub sp. *andigena*: 110, 111
- Solanum vernei*: 110, 111
- Spinacea: 58
- Spirurida: 27
- spolni dimorfizem: 8
- spomladanska cvetača: 63
- spomladansko zelje: 63
- Steirnomatidae: 27
- Stellaria media*: 61
- Strongyloididae: 27
- subkristalina plast: 11, 13
- Synchytrium endobioticum*: 34, 107
- šeboji: 63
- taksonomija: 25
- Thecaverniculatus*: 24, 89
- Torilis arvensis*: 71
- Torilis japonica*: 71
- Torilis leptophylla*: 71
- trave: 55, 59, 74
- travna ogorčica: 32, 74, 75
- travniška latovka: 74
- Trifolium pratense*: 58
- Trifolium repens*: 58
- Triplonchida: 26, 27
- tritikala: 55
- Trophonema: 11
- Tylenchida: 23, 24, 27, 29
- Tylenchina: 23
- Tylenchoidea: 23
- Tylenchulus*: 11
- Urtica dioica*: 63
- ustnatic: 63
- vagina: 12, 19, 20, 50
- velika kopriva: 69
- verižna reakcija s polimerazo: 89, 91
- Veronica agrestis*: 61
- Verutus*: 24
- Vicia benghalensis*: 66
- Vicia calcarata*: 66
- Vicia cracca*: 66
- Vicia ervilia*: 66
- Vicia faba*: 66
- Vinca*: 58
- virulenca: 99, 102
- volčji bob: 66
- vrtna pesa: 61
- vrtni nagelj: 59
- vulvin most: 13, 14, 15, 54, 62, 70
- vulvin stožec: 9, 12, 15, 16, 17, 20, 43, 44, 50, 57, 60, 73
- vulvina špranja: 57, 60

začetni oligonukleotidi: 25, 89, 90, 93, 94, 97, 103, 104, 106

zebratova ogorčica: 59, 61

zelje: 61, 63

zeljna ogorčica: 61, 62, 63

zobnik: 6

želatinski matriks: 9, 11

žita: 55, 56



Sodelavci nematološkega laboratorija Kmetijskega inštituta Slovenije; od leve proti desni: Polona Strajnar (mlada raziskovalka), Tadej Galič, dr. Saša Širca, dr. Barbara Gerič Stare, doc. dr. Gregor Urek.

Izdal in založil:
Kmetijski inštitut Slovenije

Direktor:
dr. Andrej Simončič

Uredil:
dr. Gregor Urek

Tehnično pregledala:
Lili Marinček

Jezikovno pregledala:
Marjanka Panker Černoš

Oblikoval in tehnično uredil:
Eduard Čehovin

Recenzenta:
prof. dr. Lea Milevoj
prof. dr. Stanislav Trdan

Tisk:
Cicero

Leto natisa in izdelave:
2009

Število natisnjenih ivodov:
250 izvodov

Reproduciranje v obliki tiskanja, kopiranja in distribuiranja ni dovoljeno brez soglasja avtorjev.