Utjecaj hranidbenih atraktanata na insekticidno djelovanje entomopatogenih nematoda (Steinernema feltiae) u suzbijanju ličinki kestenjastog brašnara (Tribolium castaneum)

Dorić, Doris

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:592461

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Doris Dorić, apsolvent

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

UTJECAJ HRANIDBENIH ATRAKTANATA NA INSEKTICIDNO DJELOVANJE ENTOMOPATOGENIH NEMATODA (*Steinernema feltiae*) U SUZBIJANJU LIČINKI KESTENJASTOG BRAŠNARA (*Tribolium castaneum*)

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Doris Dorić, apsolvent

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

UTJECAJ HRANIDBENIH ATRAKTANATA NA INSEKTICIDNO DJELOVANJE ENTOMOPATOGENIH NEMATODA (*Steinernema feltiae*) U SUZBIJANJU LIČINKI KESTENJASTOG BRAŠNARA (*Tribolium castaneum*)

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Anita Liška, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor
3. doc. dr. sc. Ankica Sarajlić, član

Osijek, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PREGLED LITERATURE 3
2.1. ZNAČAJ ENTOMOPATOGENIH NEMATODA U BIOLOŠKOJ KONTROLI ŠTETNIH KUKACA 3
2.2. KESTENJASTI BRAŠNAR (*Tribolium castaneum*) 8
3. MATERIJALI I METODE 12
4. REZULTATI 17
5. RASPRAVA 22
6. ZAKLJUČAK 23
7. POPIS LITERATURE 24
8. SAŽETAK 27
9. SUMMARY 28
10. PRILOZI 29
10.1. POPIS TABLICA 29
10.2. POPIS SLIKA 30
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....
BASIC DOCUMENTATION CARD .....

1. UVOD

Ekonomski isplativa poljoprivredna proizvodnja svih kulturnih biljaka ovisna je o primjeni kemijskih pesticida. Ako se kemijski pesticidi ne koriste pravilno doći će do narušavanja i onečišćenja ekosustava tla, stoga je potrebno veliko zalaganje stručnjaka kako bi došli do boljeg rješenja za zaštitu od potencijalnih štetnika, bolesti i korova. Kukci su grupa životinjskog carstva koji postoje više od 400 milijuna godina prije čovjeka i bez kojih naš svijet ne bi bio isti (Ivezić, 2008.).

Europska uredba o regulaciji pesticida (EC) br. 1107/2009 potiče uporabu manje štetnih djelatnih tvari kemijskih pesticida. Biopesticidi imaju manji rizik od kemijskih pesticida, te se preporučuju za uporabu u integriranim sustavima zaštite bilja (Villaverde i sur., 2014.).

Integrirana zaštita bilja uključuje upotrebu svih raspoloživih mjera za sprječavanje gospodarskih šteta od kukaca, korova i uzročnika bolesti kako bi se očuvali prirodni neprijatelji i najmanje onečistili okoliš i poljoprivredni proizvodi. Kemijsko tretiranje se vrši samo ako je opravdano i nužno.

Dobra poljoprivredna praksa uskladištenih žitarica uključuje higijenu u skladištima. Kao što su povremeno prozračivanje, mogućnost kontroliranja temperature i vlažnosti zraka, dobra ventilacija za sušenje i hlađenje proizvoda. Također je potrebno obnavljati stara skladišta i graditi nova.

Semiokemikalije tj. uporaba feromonskih klopki ima veliko značenje u suzbijanju štetnih kukaca zbog izostanka uporabe pesticida i eventualnih štetnih ostatak pesticida. Najveći učinak semiokemikalija je postignut s atraktantima za masovno hvatanje, repelentima za odbijanje štetnika od uskladištenih proizvoda, sredstvima za ispiranje, ometačima za polaganje jaja i dr. (Cox, 2004.).

Sve veća je osviještenost ljudi o biološkim pesticidima kao alternativi za kemijske pesticide. Prednosti bioloških pesticida je mnogo: ne zagađuju okoliš, nisu opasni za organizme za koji nisu namijenjeni, imaju niže troškove razvoja i registracije, te smanjenu vjerojatnost otpornosti na štetnika (Carlton, 1996.).

Primjeri korisnih organizama koji se koriste kao biološki insekticidi u suzbijanju štetnika u svijetu su:

Parazitska osica *(Encarsia formosa)* za suzbijanje štitastog moljca *(Trialeurodes vaporariorum)*, predatorska grinja *(Amblyseius californicus)* za suzbijanje tripsa, božje ovčice (Coccinelidae) za suzbijanje lisnih ušiju, entomopatogene nematode za suzbijanje raznih vrsta kukaca i dr.

Ovim radom želimo prikazati biološki način zaštite uskladištene robe u zatvorenim prostorima. Učestalom uporabom pesticida dolazi do rezistentnosti, tj. otpornosti štetnika na kemijske insekticide (pr. fosfin - najrašireniji fumigant u skladištima i piretrin). Zbog toga nastaje veliki problem kod nas, ali i u svijetu. Potrebno je pronaći biološku metodu zaštite od štetnih kukaca koja neće biti štetna za proizvode, prirodne neprijatelje, okoliš i na kraju zdravlje ljudi.

Cilj istraživanja je utvrditi utjecaj entomopatogenih nematoda (*Steinernema feltiae*) na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum*) uz prisustvo hranidbenog atraktanta.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. ZNAČAJ ENTOMOPATOGENIH NEMATODA U BIOLOŠKOJ KONTROLI ŠTETNIH KUKACA

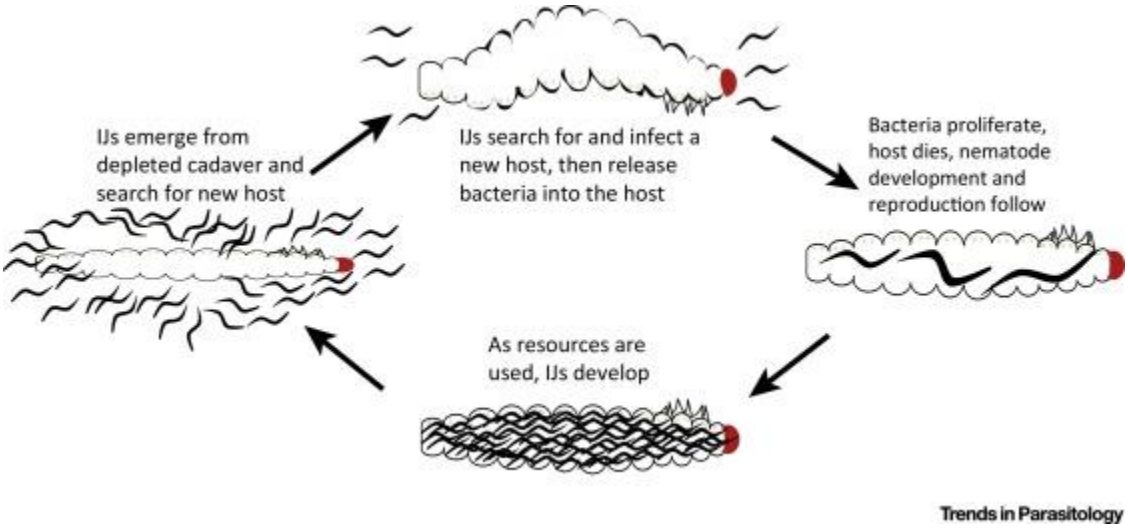
Znanstvena istraživanja s entomopatogenim nematodama započela su 1930. god. kada su Glaser i Fox pronašli nematode iz roda (*Steinernema*) u ličinkama japanskog pivca, a u 17. st. su Aldrovandi (1623.) i Lister (1671.) pronašli u kukcima crviće za koje se pretpostavljalo da su paraziti. Glaser je počeo vršiti prva testiranja sa *Steinernema glaseri* 1930. god. (Slika 1.). Do 1960. god. zanemareno je istraživanje entomopatogenih nematoda jer je počela masovna proizvodnja pesticida. U zadnjih 20-tak godina javlja se sve veća potreba za proizvodnjom nematoinsekticida.



Slika 1. Izlazak novih generacija *Steinernema glaseri* iz zaraženog kukca

Izvor: https://i.ytimg.com/vi/G16fLgYwS08/maxresdefault.jpg

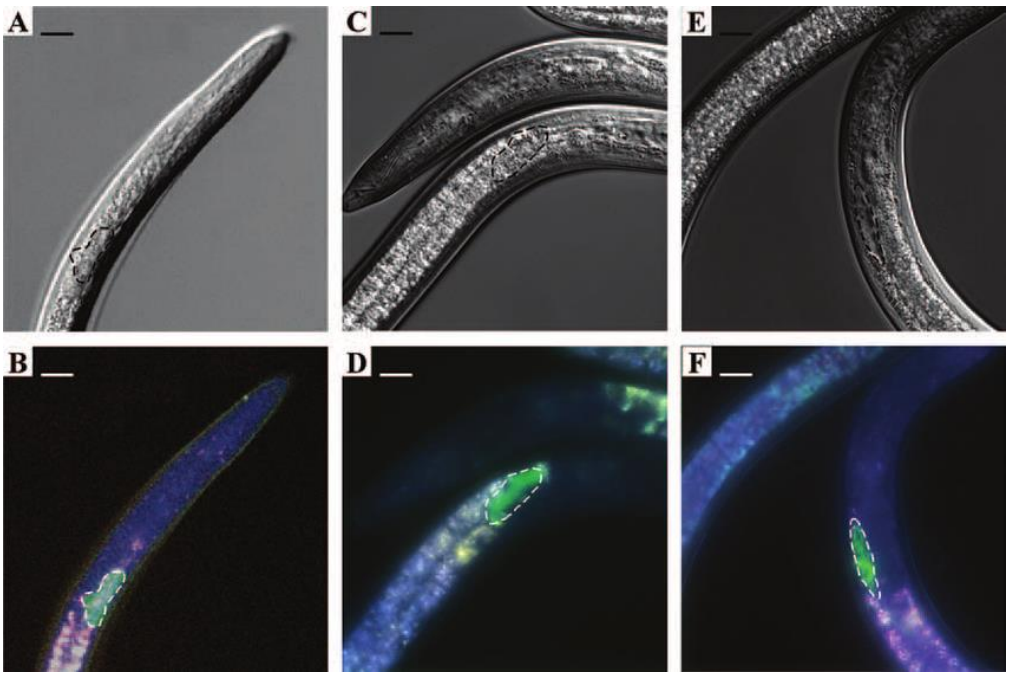
Entomopatogene nematode su korisne u zaštiti poljoprivrednih proizvoda jer parazitiraju kukce i koriste se kao biopesticidi (Slika 2.). Najznačajnije porodice su Steinernematidae i Heterorhabditiae. Porodica Steinernematidae ima dva roda*: Steinernema* i *Neosteinernema*. Tri najznačajnije vrste iz roda *Steinernema* su *S. carpocapsa, S. feltiae* i *S. scapterisici* (Oštrec, 2001.). Porodica Steinernematidae je rasprostranjena u tlima u cijelom svijetu.



Slika 2. Model preživljavanja i infekcije kukca s entomopatogenim nematodama

Izvor: https://www.cell.com

Steinernematidae i Heterorhabditiae su u simbiotskom odnosu s bakterijama iz roda *Xenorhabdus i Photorhabdus* koje imaju insekticidno djelovanje (Slika 3.).



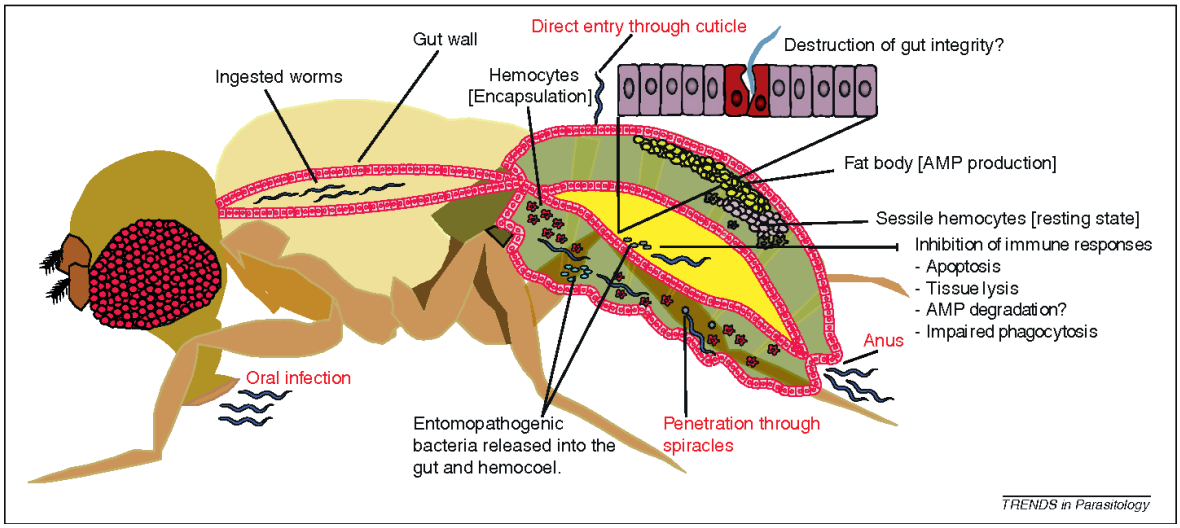
Slika 3. Bakterijski simbiont *Xenorhabdus* (obilježen zeleno ili crticama) naseljavaju utrobu entomopatogenih nematoda *Steinernema carpocapse*

Izvor: https://www.researchgate.net; Cowels i Goodrich Blair, 2008

Infektivne ličinke 3. stadija ulaze u kukca domaćina kroz usta, traheje, crijevni otvor i probijaju stjenku crijeva. Ulaze u hemocel kukca te u njega ispuste bakterije, koje se s vremenom razmnože, uzrokuju septikemiju (sepsa) koja ubije domaćina u roku od 48 sati. U domaćinu prelaze u ličinke 4. stadija, iz kojeg se razvijaju odrasli 1. generacije. Nakon kopulacije ženke odlažu jaja iz kojih se razvijaju ličinke 1. stadija, koje se presvlače u ličinke 2. 3. i 4. stadija. Kasni 2. stadiji ličinki se prestaju hraniti hemolimfom i tkivima kukca, unose bakteriju u organizam, prelazi u ličinku 3. stadija i napuštaju tijelo kukca (Oštrec, 2001.).

Najveća učinkovitost entomopatogenih nematoda iz porodice Steinernematidae i Heterorhabditiae je na mjestima gdje su nematode bile zaštićene od vanjskih, okolišnih ekstrema (Shapiro-Ilan i sur., 2006.).

Kao i s ostalim entomopatogenima, osjetljivost domaćina varira ovisno o vrsti i soju entomopatogenih nematoda. U slučaju kukca *Simulium vittatum* i nematode *Steinernema carpocapsae*, utvrđena je otpornost kukaca prema nematodama (Gaugler i Molloy, 1981.). Mnogi drugi kukci također su koevoluirali s nematodama iz porodice Steinernematidae i Heterorhabditiae, te su razvili mehanizme otpornosti (Slika 4.).



Slika 4. Načini inficiranja kukca s nematodama i sustav obrane kukca od parazita

Izvor: https://ai2-s2-public.s3.amazonaws.com

Uslijed genetskih promjena u prethodno osjetljivom domaćinu može doći do imunosti kukca na nematode i tako stvoriti otpornost i na bakteriju *Xenorhabdus* što bi rezultiralo vrlo

otpornim populacijama. U slučaju *Anopheles quadrimaculatus* otpornost se pojavila jer je domaćin pokušao fizički otkloniti parazite (Woodarda i Fukuda, 1977.).

Primjer je balegar (*Scarabeus sacer*) čije ličinke imaju šitaste ploče preko stigmi, koji sprečavaju ulazak nematoda i samim time sprječavaju infekciju. Istraživanja o otpornosti na nematode su provedeni s *Popillia japonica* gdje se proučavalo kako dvije različite vrste nematoda napadaju i inficiraju kukce. *Steinernema glaseri* i *Heterorhabditis bacteriophora* su korištene u pokusima, utvrđena je osjetljivost ovog kukca na obje vrste nematoda. *H. bacteriophora* je imala slabiju toleranciju na domaćinovu crijevnu tekućinu. Uspješno ju je izbjegla ranijim ispuštanjem bakterije. *S. glaseri* je bila otpornija na domaćinov imunološki sustav. Na kutikuli *S. glaseri* se nalazi protein koji usporava i inhibira imunološki sustav kukca. Kod odraslog kukca, obrambeni mehanizam je trljanje nogu o dlakavi dio abdomene kako bi odstranio nematode (Wang i sur., 1995.).

Glavno ograničenje u primjeni entomopatogenih nematoda je njihova osjetljivost na okolišne čimbenike. Entomopatogene nematode se mogu primjenjivati u kombinaciji s drugim sintetičkim pesticidima, sa standardnom opremom za primjenu pesticida (Slika 5.).



Slika 5. Mogućnost korištenja standardne opreme za primjenu pesticida pri primjeni entomopatogenih nematoda

Izvor: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/entomopathogenic6L.jpg

Otpornost entomopatogenih nematoda *Steinernema feltiae* testirana je pri miješanju s 17 različitih pesticida i tri regulatora rasta biljaka. Od testiranih proizvoda bila su dva biofungicida *Streptomyces griseoviridis* i *Trihoderma harzianum*, te devet kemijskih fungicida (iprodion, tiofanat-metil, azoksistrobin, fludioxsonil, mefenoksam, triflumizol, i etridiazol). Od bioinsekticida testiran je *Bacillus thuringiensis*, te tri botanička sredstva. Od kemijskih insekticida testiran je diflubenzuron, acefat i fenoksikarb i jedan herbicid. Nematode su bile izložene najvećoj preporučenoj koncentraciji pesticida. Zapažanja o infektivnosti nematoda se provjeravalo nakon 4, 24 i 72 sata nakon izlaganja. Nakon 72 sata u više od 80% *S. feltiae* je ostalo aktivno. Samo je etridiazol smanjio infektivnost dok je s regulatorima rasta povećao infektivnost nematoda (De Nardo i Grewal, 2003.).

S. feltiae je ekološki sigurna alternativa za biološko korištenje protiv kukaca. Poznata je tehnologija proizvodnje, formulacije i skladištenje. Potvrđena je njihova sigurnost za okoliš, druge korisne organizme, životinje i ljude pri korištenje u integriranim sustavima zaštite bilja. Regulatorna politika trebala bi osigurati financijske osnove za daljnji razvitak i poduprijeti daljnje uvođenje entomopatogenih nematoda kao sredstva za biokontrolu štetnika.

2.2. KESTENJASTI BRAŠNAR (*Tribolium castaneum*)

Tribolium castaneum je polifagni štetnik, pripada redu Coleoptera (kornjaši) i porodici Tenebrionidae (mračnjaci). *T. castaneum* rasprostranjen je po cijelom svijetu. Primarni je štetnik uljarica, leguminoza, brašna i dr. (Ivezić, 2008.). Sekundarno se hrani u skladištima s lomom zrna, a ako je vlaga zrna 12,5% može oštetiti i cijela zrna (Rozman, 2010.). *T. castaneum* prolazi potpunu preobrazbu.

Imago je dužine 3-4 mm, crvene do tamnosmeđe boje sa spljoštenim tijelom (Slika 6.). Gornja krila ili pokrilja služe za održavanje ravnoteže, a stražnji par krila je opnenast i služi za letenje. Ticala se sastoje od 11 segmenata, a zadnja tri su mu veća od vrste *T. confusum* (Rozman, 2010.). Ima dvije generacije godišnje, a životni vijek mu traje do dvije godine. Termofilan je kukac što znači da u toplijim uvjetima (32,5ºC) i relativnoj vlažnosti zraka od 70% ženka daje veći broj generacija. Tijekom života može odložiti 300-900 jaja. Ličinka je dužine 6-7 mm i žućkaste je boje sa smeđom glavom (Ivezić, 2008.) (Slika 7.). Jaja su bjeličaste – prozirne boje i imaju ljepljivu površinu. Veličine su 0.61 x 0.35. Kukuljica je bijele boje, a sazrijevanjem postaje tamnija (Liška, 2011.) (Slika 8.).



Slika 6. *Tribolium castaneum*, odrasli oblik

Izvor: Doris Dorić, 2018.



Slika 7. *Tribolium castaneum*, ličinka

Izvor: Doris Dorić, 2018.



Slika 8. *Tribolium castaneum*, kukuljica

Izvor: Doris Dorić, 2018.

Za suzbijanje *Tribolium castaneum* koriste se:

1. KEMIJSKI INSEKTICIDI:

ORGANOFOSFORNI INSEKTICIDI

- Pirimifos – metil pripada u opasna sredstva. Dozvoljene su dvije primjene u istom praznom skladištu (Cvjetković, 2017.).

PIRETROIDI

- Deltametrin: dozvoljena je jedna primjena za tretiranje površina prije unošenja žitarica u skladište
- Cipermetrin: dozvoljena je jedna primjena u praznom skladištu ili jedna primjena na istom zrnu žitarica (Cvjetković, 2017.).

2. DIJATOMEJSKA ZEMLJA

Ubraja se u fizikalne insekticide. Oštećuje kutikulu kukca te kukac gubi vodu iz tijela i ugiba od dehidracije. Dijatomejska zemlja se sastoji od 90% nepirogene dijatomjeske zemlje i 10% silicijeve kiseline. Može se primijeniti za tretiranje praznog skladišta prije unosa žitarica. Tretira se samo zrnje s manje od 14,5% vlage jer je na vlažnijem zrnu smanjen učinak. Primjenjuje se preventivno (prije pojave štetnika) i kurativno (nakon pojave štetnika). Dozvoljeno je jedno tretiranje žitarica i 10 tretiranja praznog skladišta (Cvjetković, 2017.).

3. SREDSTVA ZA FUMIGACIJU

Fumiganti djeluju u plinovitom stanju. Zbog velike otrovnosti i specifičnog načina primjene taj posao može raditi samo osposobljeno i ovlašteno stručno osoblje.

- Aluminijev i magnezijev fosfid: on u dodiru sa zrakom stvara fosforovodik koji je uvršten u prvu skupinu otrova. Smije se tretirati samo prazno skladište (Cvjetković, 2017.).

4. BIOLOŠKI INSEKTICIDI

B. thuringiensis pripada skupini insekticida mikrobiološkog porijekla. Djelatna tvar ovih insekticida su spore i toksini bakterije *B. thuringiensis*. Soj *B. thuringiensis tenebrionis*

djeluje na ličinke kornjaša *T.castaneum*. Djeluju sporo tako da se moraju primijeniti na mlađe stadije ličinki, a na odrasle ličinke djelovanje je vrlo ograničeno.

5. BOTANIČKI INSEKTICIDI

Botanički insekticidi su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju insekticidno djelovanje. Esencijalno ulje iz sjemena kardamoma ima toksično djelovanje kada se koristi kao fumigant na odrasle i ličinke *T.castaneum.* Ličinke 10-16 dana starosti bile su osjetljivije od odraslih, ali ta osjetljivost se smanjivala s višim stadijem (Huang i sur. 2000.).

Veliki problem u svijetu predstavlja rezistentnost na pesticide. Kljajić i Perić (2005.) navode najveća rezistentnost na fosfin javlja se kod *T. castaneum i T. confusum,* zatim *Sitophilus oryzae, Rhyzopertha dominica* i *Plodia interpunctella.* U svijetu se javlja rezistentnost i na piretroide (deltametrin i cipermetrin) kod *T.castaneum.* Rezistentnost može utjecati na zdravlje ljudi, te ekoloških i ekonomskih posljedica zbog izostanka suzbijanja štetnika. Osjetljivost ili rezistentnost je sposobnost određenih jedinki neke vrste kukaca da prežive dozu koja je latentna za većinu jedinki. Nakon toga jedinke koje su preživjele nastavljaju se razmnožavati međusobno s rezistentnim i osjetljivim jedinkama, te dolazi do kombinacije genetskih materijala i zbog toga sve više jedinki postaje rezistentno.

3. MATERIJALI I METODE

U Laboratoriju za entomologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, postavljen je pokus s entomopatogenim nematodama *Steinernema feltiae* i kestenjastim brašnarom *(Tribolium castaneum)*. Pokus je proveden tijekom lipnja i srpnja 2018. godine.

U pokusu su korištene infektivne ličinke hrvatskog soja *S. feltiae*, iz kulture koja se uzgaja na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. Nematode su uskladištene u posudicama za uzgoj kultura u pufernoj otopini (M9) u hladnjaku na 4 °C. Kako bi pripremili koncentraciju infektivnih ličinki nematoda 3. stadija za pokus potrebno je:

- Automatska pipeta volumena od 20-200 µL;
- Predmetno stakalce;
- Stereo mikroskop.

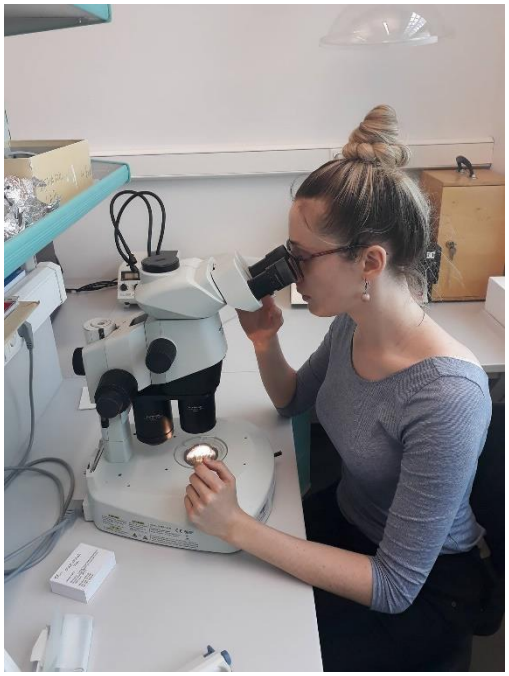
Pomoću automatske pipete iz uzgojnih posudica uzima se količina od 20 µL i stavlja 3 kapljice otopine na predmetno stakalce (Slika 9.). Tako pripremljeni preparat promatra se pod mikroskopom i broje žive infektivne ličinke nematoda iz svake kapi (Slika 10.). Proces se ponavlja četiri puta kako bi se dobio prosječan broj nematoda u 20 µL, te se izračunava količina otopine s nematodama radi utvrđivanja ukupnog broja živih nematoda.

Prije pripreme koncentracije nematoda, nematode su isprane u destiliranoj vodi. Proces se obavio pomoću centrifuge (Tehnica centrica) (Slika 11.). Otopina nematoda iz uzgojnih posudica presipana je u Falcon tubice od 15 ml. U centrifugu se uvijek stavlja paran broj Falcon tubica. Zbog sile gravitacije nematode će pasti na dno tubice. Nakon prve centrifuge pomoću pipete potrebno je izvaditi višak vode i dodati destiliranu vodu. Centrifuga se nastavlja s destiliranom vodom. Nakon toga se iz Falcon tubice pipetom izvadi višak vode. Iz konusnog dijela Falcon tubice ponovno se nekoliko puta pipetom uzima 20 µL otopine kako bi se utvrdila brojnost nematoda, te se razrjeđuje do potrebne koncentracije.



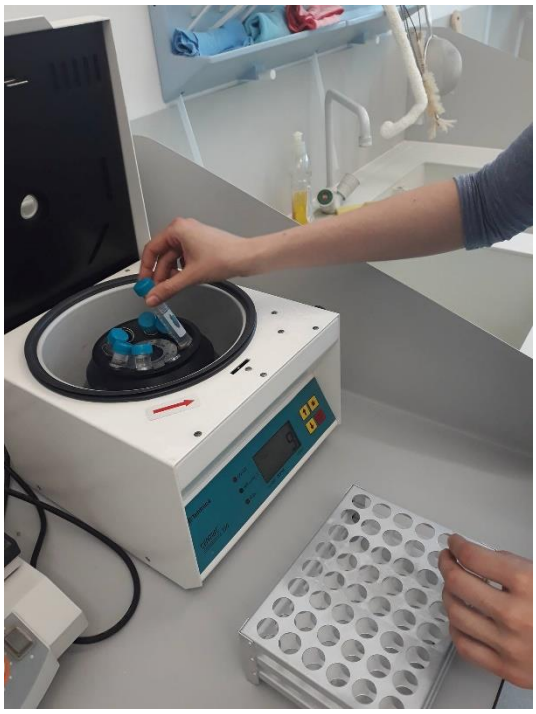
Slika 9. Pipetiranje otopine s nematodama na predmetno stakalce

Izvor: Doris Dorić, 2018.



Slika 10. Brojanje živih nematoda

Izvor: Doris Dorić, 2018.



Slika 11. Centrifugiranje nematoda

Izvor: Doris Dorić, 2018.

Pokus je postavljen u Petrijevim zdjelicama u kojem je bio položen filter papir. Kao hranidbeni atraktant za ličinke kestenjastog brašnara korišten je lom zrna pšenice. U svaku Petrijevu zdjelicu postavljeno je dvadeset izlomljenih zrna pšenice i deset ličinki kestenjastog brašnara (Slika 12.). Zrna pšenice izlomljena su ručno u mužaru. Ličinke kestenjastog brašnara prikupljene su iz kulture koja se uzgaja u Laboratoriju za skladištenje poljoprivrednih proizvoda.

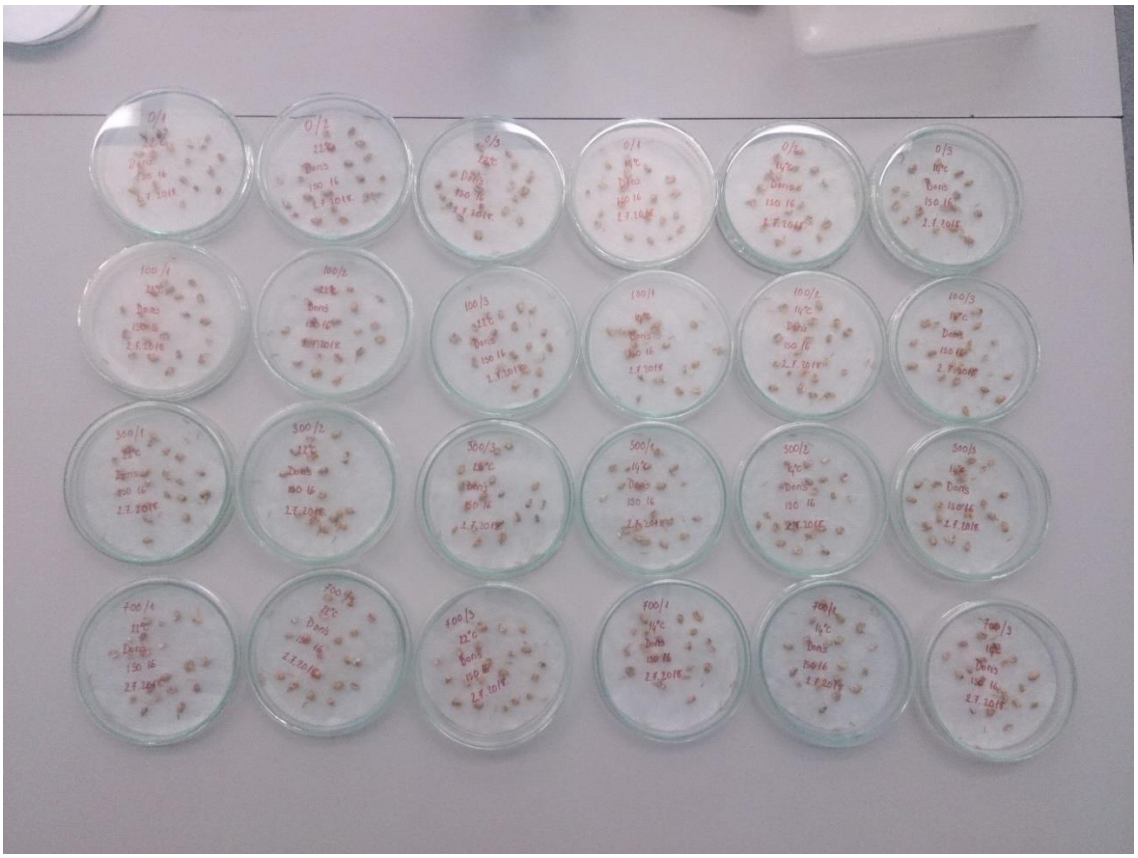
Pokus je postavljen s četiri tretmana u tri ponavljanja, te je proveden u mraku na dvije temperature (sobna 20-22º C i 14º C u klimastat komori).

U svaku Petrijevu zdjelicu dodano je 2 mL destilirane vode te potrebna koncentracija nematoda u 1 mL destilirane vode. U kontrolnom tretmanu dodana je jednaka količina vode bez nematoda.

Tretman 0 (kontrola) u kojem nije bilo nematoda, tretman 100 u kojem je bilo 100 infektivnih ličinki nematoda po jednoj ličinki kestenjastog brašnara, zatim 300 infektivnih ličinki nematoda po jednoj ličinki kestenjastog brašnara i 700 infektivnih ličinki nematoda po jednoj ličinki kestenjastog brašnara. Pomoću pipete se na svako zrno izlomljene pšenice

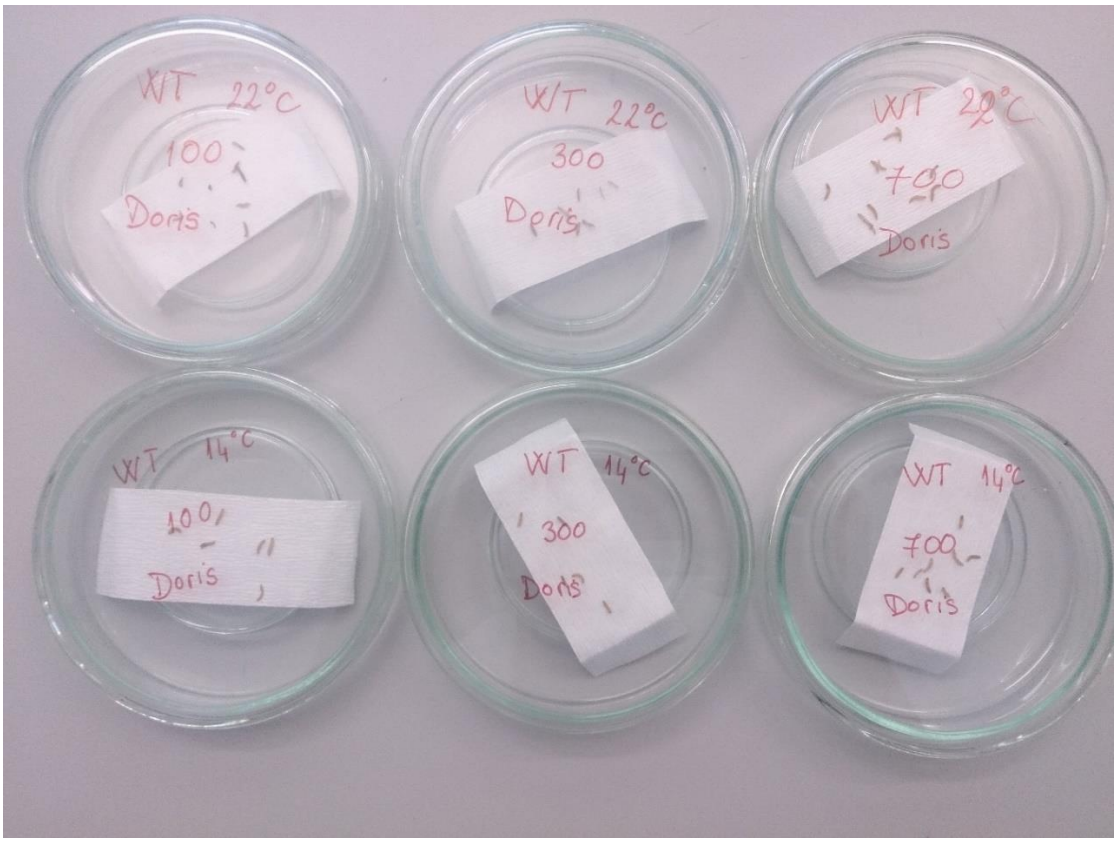
dodalo ovisno o tretmanima (100, 300 ili 700) mikro kapljice otopine s infektivnim ličinkama *S. feltiae*. Zatim su dodane ličinke kestenjastog brašnara s ciljem da pojede zrno na kojem se nalaze infektivne ličinke *S. feltiae*. Na taj način će nematoda ući u kukca i obaviti zarazu.

Mortalitet ličinki je praćen svaka 3 dana, tijekom perioda od 10 dana. Uginule ličinke izdvojene su i postavljene na tzv. *White*-ove zamke (White trap) (Slika 13.). Nakon 7 dana praćena je pojava nematoda izdvojenih iz bijelih zamki uginulih ličinki.



Slika 12. Postavljanje pokusa

Izvor: Doris Dorić, 2018.



Slika 13. White trap

Izvor: Doris Dorić, 2018.

Rezultati pokusa su obrađeni analizom varijance (ANOVA), a razlike između srednjih vrijednosti tretmana su testirane s Tukey HSD testom ($P<0,05$) u statističkom programu SAS 9.3.

4. REZULTATI

U tablici 1 prikazani su rezultati mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara u pokusu provedenom na kontroliranoj temperaturi. Pri temperaturi od 14º C nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana. Iako nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana, iz tablice možemo vidjeti da je u tretmanu 0 gdje nismo primijenili nematode, 3 dan bio manji mortalitet u odnosu na druge tretmane gdje smo primijenili nematode.

Tablica 1. Srednje vrijednosti mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara pri temperaturi od 14º C

Tretman (konc. nematoda)	Dan nakon postavljanja pokusa			
	3	7	10	Ukupno
0	3,33 a	16,61 a	46,67 a	66,61
100	20,00 a	13,33 a	50,00 a	83,33
300	16,67 a	23,33 a	36,67 a	76,67
700	26,67 a	33,33 a	26,67 a	86,67

Vrijednosti u koloni označene istim slovima , međusobno se ne razlikuju (P<0,05).

U tablici 2 su prikazani rezultati mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara pri temperaturi od 22 º C. Također nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana. No, iako nije bilo signifikantne značajnosti, entomopatogene nematode su izazvale dvostruko ili trostruko veći mortalitet ličinki kestenjastog brašnara nakon trećeg dana pokusa.

Tablica 2. Srednje vrijednosti mortaliteta pri temperaturi od 22 ºC

Tretman (konc. nematoda)	Dan nakon postavljanja pokusa			
	3	7	10	Ukupno
0	10,00 a	30,00 a	26,67 a	66,67
100	30,00 a	13,33 a	36,67 a	80,00
300	23,33 a	16,67 a	23,33 a	63,33
700	36,67 a	20,00 a	26,67 a	83,34

Vrijednosti u koloni označene istim slovima, međusobno se ne razlikuju (P<0,05).

U tablici 3 vidljivo je da temperatura nije imala značajna utjecaj na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara s obzirom da nije utvrđena statistički značajna razlika između tretmana s dvije temperature. No, nakon 3. i 7. dana pokusa utvrđen je veći mortalitet ličinki kestenjastog brašnara na sobnoj temperaturi.

Tablica 3. Utjecaj temperature na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara u kontrolnom tretmanu

	Dan nakon postavljanja pokusa			
Temperatura	3	7	10	Ukupno
14 ºC	3,33 a	16,67 a	46,66 a	66,66
22 ºC	10,00 a	30,00 a	26,66 a	66,66

Vrijednosti u koloni označene istim slovima , međusobno se ne razlikuju (P<0,05).

U tablici 4 prikazane su srednje vrijednosti mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara u tretmanu 100 nematoda po kukcu, gdje također nije utvrđen značaj temperature na učinkovitost nematoda u suzbijanju kestenjastog brašnara. Najveći mortalitet je utvrđen 10. dan nakon proučavanja patogenih nematoda, kada je 50% svih ličinki brašnara uginulo.

Tablica 4. Utjecaj temperature na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara u tretmanu 100 nematoda po kukcu

	Dan nakon postavljanja pokusa			
Temperatura	3	7	10	Ukupno
14 ºC	20,00 a	13,33 a	50,00 a	83,33
22 ºC	30,00 a	13,30 a	36,67 a	79,97

Vrijednosti u koloni označene istim slovima , međusobno se ne razlikuju (P<0,05).

U tablici 5 je prikazan utjecaj temperature na patogenost nematoda u tretmanu s 300 nematoda po kukcu. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između dvije temperature. Veći postotak smrtnosti bio je pri temperaturi 14º C za 13,34%.

Tablica 5. Utjecaj temperature na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara u tretmanu 300 nematoda po kukcu

	Dan nakon postavljanja pokusa			
Temperatura	3	7	10	Ukupno
14 ºC	16,67 a	23,33 a	36,67 a	76,67
22 ºC	23,33 a	16,67 a	23,33 a	63,33

Vrijednosti u koloni označene istim slovima , međusobno se ne razlikuju (P<0,05).

U tablici 6 je prikazan utjecaj temperature na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara u tretmanu s najvećom koncentracijom nematoda, a također nisu utvrđene statistički značajne razlike između dvije temperature.

Tablica 6. Srednje vrijednosti mortaliteta tretmana 700 pri temperaturi 14 ºC i 22 ºC

	Dan nakon postavljanja pokusa			
Temperatura	3	7	10	Ukupno
14 ºC	26,67 a	33,33 a	26,67 a	86,67
22 ºC	36,67 a	20,00 a	26,33 a	83,00

Vrijednosti u koloni označene istim slovima , međusobno se ne razlikuju (P<0,05).

Uginule ličinke kestenjastog brašnara vađene su, prilikom svakog ponavljanja iz tretmana i stavljane na white trap (Slika 14. i 15.). Izlazak novih generacija entomopatogenih nematoda pratio se tijekom 14 dana. Nakon 14 dana utvrđena je visoka populacija novih generacija. Što ukazuje da su ličinke uginule zbog infekcije namatodama. Zbog toga je kestenjasti brašnar dobar domaćin za reprodukciju u razvoju entomopatogenih nematoda.

Iz svih uginulih ličinki su se izdvojile nove generacije entomopatogenih nematoda, a što je utvrđenom velikim brojem novih infektivnih ličinki u *Whiteovoj* zamki.



Slika 14. Uginula ličinka na sobnoj temperaturi od 22º C

Izvor: Doris Dorić 2018.



Slika 15. Uginule ličinke u tretmanu 700 nematoda po jednom *T. castaneum*

Izvor: Doris Dorić 2018.

5. RASPRAVA

U istraživanju koje je proveo Athanassiou i sur. (2008.) primijenjene su entomopatogene nematode *S. feltiae* u laboratoriju na pšenici protiv *T. confusum*. Nematode su bile primijenjene u tri doze 100, 300, 900 nematoda po ličinki *T. confusum.* Mortalitet ličinki dosegla je 79-100% nakon 7 i 14 dana izlaganja najvećoj dozi nematoda, dok smrtnost odraslih nije prelazila 66%. U našem istraživanju utvrđeno je da je u tretmanu 700 nematoda po jednom *T. castaneum,* mortalitet ličinki je bio nakon 7 i 10 dana od 56,67 odnosno 86,67%, odnosno slični rezultati su utvrđeni

Ramos-Rodriguez i sur. (2007.) su proveli laboratorijska istraživanja o učinku *S. riobrave* na ličinke i odrasle *T. castaneum.* Pokus je postavljen na dvije temperature (25 ºC i 30 ºC) i relativnim vlažnostima zraka (43, 56, 75 i 100% RH), a koji nisu značajno utjecale na djelotvornost *S. riobrave*. Ovi rezultati su slični s našim rezultatima s obzirom da nije utvrđen statistički značajni utjecaj temperature na patogenost entomopatogenih nematoda *S. feltiae*.

Trdan i sur. (2006.) su testirali entomopatogene vrste *S. feltiae, S. carpocapsae, H. bacteriophora* i *H. megidis* i njihovu učinkovitost u kontroli odraslih kukaca *Sitophilus granarius* i *Oryzaephilus surinamensis.* Aktivnost bioloških tretmana određena je u 3 različite koncentracije (500, 1000 i 2000 infektivnih ličinki po jednom kukcu), te pri različitim temperaturama (15, 20 i 25 ºC). Navedeni autori su utvrdili da koncentracije nematoda su manje važan čimbenik koji utječe na biološku aktivnost nematoda kod odraslih kukaca. U ovom istraživanju, kod ličinki *T. castaneum* pomoću statističke analize pokazano je da nema razlike između tretmana, iako iz tablice srednjih vrijednosti možemo zaključiti kako je u tretmanu 0 manji mortalitet nego kod tretmana gdje su bile koncentracije nematoda. Dodavanjem hranidbenog atraktanta (zrna pšenice) u pokus, s ciljem poboljšanja patogenosti *S. feltiae* nije se pokazalo učinkovito u ostvarivanju mortaliteta kestenjastog brašnara.

6. ZAKLJUČAK

Ovim pokusom nisu utvrđene statističke značajne razlike između tretmana s entomopatogenim nematodama *S. feltiae* na mortalitet ličinki *T. castaneum* uz prisutnost hranidbenog atraktanta.

Nakon provedenog pokusa može se zaključiti da temperatura nije bila od velike važnosti za mortalitet *T. castaneum*. Ipak kod tretmana s nematodama utvrđene su različite srednje vrijednosti mortaliteta, a koje nisu bili statistički značajne. U kontrolnom tretmanu tijekom tri dana nakon postavljanja pokusa mortalitet ličinki *T. castaneum* bio je 0-10%, dok je u ostalim tretmanima bilo između 10-60%. Nakon desetog dana izloženosti ličinki kestenjastog brašnara nematodama *S. feltiae* u tretmanu s 700 nematoda po kukcu je utvrđeno više i od 80% uginulih ličinki kestenjastog brašnara. Hranidbeni atraktant nije pospješio infektivnost odnosno patogenost *S. feltiae*.

7. POPIS LITERATURE

Athanassiou, C. G., Palyvos, N. E., Kakouli-Duarte, T. (2008.): Insecticidal effect of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Steinernematidae) against *Tribolium confusum* du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Ephestia kuehniella* (Zeller)(Lepidoptera: Pyralidae) in stored wheat. Journal of stored products research, 44(1): 52-57.

Carlton, B. C. (1996.): Development and commercialization of new and improved biopesticides. Annals of the New York Academy of Sciences, 792(1): 154-163.

Cox, P. D. (2004.): Potential for using semiochemicals to protect stored products from insect infestation. Journal of Stored Products Research, 40(1): 1-25.

Cvjetković, B. (2017.): Glasilo biljne zaštite, Insekticidi, Hrvatsko društvo biljne zaštite. Zagreb.

De Nardo, E. A., Grewal, P. S. (2003.): Compatibility of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) with pesticides and plant growth regulators used in glasshouse plant production. Biocontrol Science and Technology, 13(4): 441-448.

Huang, Y., Lam, S. L., Ho, S. H. (2000.): Bioactivities of essential oil from *Elletaria cardamomum* (L.) Maton. to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research, 36(2): 107-117.

Gaugler, R., i Molloy, D. (1981): Instar susceptibility of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae*. Journal of nematology, 13(1), 1-5.

Glaser, R. W., i Fox, H. (1930.): A Nematode Parasite of the Japanese Beetle (*Popillia japonica*, Newm.). Science (Washington), 71(1827).

Ivezić, M. (2008.): Entomologija, Kukci i ostali štetnici u ratarstvu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku. 202.

Kljajić, P., i Perić, I. (2005.): Resistance of stored product insects to insecticides. Pesticidi i fitomedicina, 20(1): 9-28.

Liška A. (2011.): Insekticidna toksičnost 1,8- cineola, kamfora i eugenola na *T. castaneum* (Herbst), Doktorska disertacija, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.

Oštrec, LJ. (2001.): Biološko suzbijanje štetnih insekata entomopatogenim nematodama. Agriculturae conspectus scientificus, 66(3): 179-185.

Ramos-Rodríguez, O., Campbell, J. F., Ramaswamy, S. B. (2007.): Efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* against the stored-product insect pests *Tribolium castaneum* and *Plodia interpunctella*. Biological Control, 40(1): 15-21.

Rozman, V. (2010.): Prepoznavanje insekata u skladištima prema nastalim štetama. U: Cjelovito (integralno) suzbijanje štetnika hrane, uskladištenih poljoprivrednih proizvoda, predmeta opće uporabe te muzejskih štetnika, Korunić, J. (ur.), Zbornik predavanja, 63-88.

Shapiro-Ilan, D. I., Gouge, D. H., Piggott, S. J., and Fife, J. P. (2006.): Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. Biological Control, 38(1): 124-133.

Shelton, A. M., Roush, R. T., Wang, P., and Zhao, J. Z. (2007.): Resistance to insect pathogens and strategies to manage resistance: an update. In Field manual of techniques in invertebrate pathology (pp. 793-811). Springer, Dordrecht.

Trdan, S., Vidrih, M., & Valic, N. (2006.): Activity of four entomopathogenic nematode species against young adults of *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) under laboratory conditions. Journal of plant diseases and protection, 113(4): 168-173.

Villaverde, J. J., Sevilla-Morán, B., Sandín-España, P., López-Goti, C., and Alonso-Prados, J. L. (2014.): Biopesticides in the framework of the European pesticide regulation (EC) No. 1107/2009. Pest management science, 70(1): 2-5.

Wang, Y., Campbell, J. F., and Gaugler, R. (1995.): Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 66(2): 178-184.

Woodard, D. B., i Fukuda, T. (1977): Laboratory resistance of the mosquito *Anopheles quadrimaculatus* to the mermithid nematode *Diximermis peterseni*. Mosquito News, *37*(2): 192-195.

8. SAŽETAK

Štetni kukci u uskladištenim proizvodima su postali veliki problem zbog rezistentnosti na pesticide. Pojavljuje se sve veća potreba za biološkim preparatima. Cilj istraživanja je utvrditi utjecaj hranidbenih atraktanata kao mamaca s entomopatogenim nematodama (*Steinernema feltiae*) na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum*). Pokus je postavljen u Petrijevim zdjelicama, s lomom zrna pšenice u četiri tretmana i tri ponavljanja, te je proveden u mraku na dvije temperature. Nakon desetog dana izloženosti ličinki kestenjastog brašnara nematodama *S. feltiae* u tretmanu 700 nematoda po kukcu, utvrđen je najveći mortalitet, odnosno utvrđeno je više od 80% uginulih ličinki kestenjastog brašnara. No, nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana. Također, nije utvrđen statistički značajan utjecaj temperature u ovom pokusu. Hranidbeni atraktant nije pospješio infektivnost odnosno patogenost *S. feltiae*. Ličinke kestenjastog brašnara dobar su domaćin za *S. feltiae*, no potrebna su dodatna istraživanja koristeći druge metode ispitivanja patogenosti s obzirom da nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu.

Ključne riječi: *Steinernema feltiae*, patogenost, mortalitet, *Tribolium castaneum*

9. SUMMARY

Stored products insects pests have become a major problem in agriculture due to resistance to pesticides. There is an increasing need for biological control solutions. The aim of the study is to determine effect of food attractants on insecticidal efficacy of entomopathogenic nematodes (*Steinernema feltiae)* against *Tribolium castaneum* larvae. The experiment was set up in Petri dishes with wheat grain as food attractant in four treatments and three repetitions, and it was conducted in dark at two temperatures. The highest mortality was observed in treatment with 700 nematodes per insect larvae, where more than 80% of insect larvae were found dead. There were no statistical differences between the treatments, and no significant effect of temperature regime was observed. Food attractant did not enhance nematodes pathogenicity. The larvae of red flour beetle are susceptible and good host for *S. feltiae,* however different methods of testing their pathogenicity against their pest are needed to ensure significant results.

Key words: *Steinernema feltiae,* pathogenicity, mortality, *Tribolium castaneum*

10. PRILOZI

10.1. POPIS TABLICA

Tablica 1. Srednje vrijednosti mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara pri temperaturi od 14 ºC, str. 17

Tablica 2. Srednje vrijednosti mortaliteta pri temperaturi od 22 ºC, str. 18

Tablica 3. Utjecaj temperature na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara u kontrolnom tretmanu, str. 18

Tablica 4. Utjecaj temperature na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara u tretmanu 100 nematoda po kukcu, str. 19

Tablica 5. Utjecaj temperature na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara u tretmanu 300 nematoda po kukcu, str. 19

Tablica 6. Srednje vrijednosti mortaliteta tretmana 700 pri temperaturi 14 º C i 22 º C, str. 20

10.2. POPIS SLIKA

Slika 1. Izlazak novih generacija *Steinernema glaseri* iz zaraženog kukca, Izvor: https://i.ytimg.com/vi/G16fLgYwS08/maxresdefault.jpg, str. 3

Slika 2. Model preživljavanja i infekcije kukca s entomopatogenim nematodama, Izvor: https://www.cell.com, str. 4

Slika 3. Bakterijski simbiont *Xenorhabdus* (obilježen zeleno ili crticama) naseljavaju utrobu entomopatogenih nematoda *Steinernema carpocapse,* Izvor: https://www.researchgate.net; Cowels i Goodrich Blair, 2008., str. 4

Slika 4. Načini inficiranja kukca s nematodama i sustav obrane kukca od parazita, Izvor: https://ai2-s2-public.s3.amazonaws.com, str. 5

Slika 5. Mogućnost korištenja standardne opreme za primjenu pesticida pri primjeni entomopatogenih nematoda,

Izvor: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/nematode/entomopathogenic6L.jpg, str. 6

Slika 6. *Tribolium castaneum*, odrasli oblik. Izvor: Doris Dorić, 2018., str. 8

Slika 7. *Tribolium castaneum,* ličinka. Izvor: Doris Dorić, 2018., str. 9

Slika 8. *Tribolium castaneum,* kukuljica. Izvor: Doris Dorić, 2018., str. 9

Slika 9. Pipetiranje otopine s nematodama na predmetno stakalce. Izvor: Doris Dorić, 2018., str. 13

Slika 10. Brojanje živih nematoda. Izvor: Doris Dorić, 2018., str. 13

Slika 11. Centrifugiranje nematoda. Izvor: Doris Dorić, 2018., str. 14

Slika 12. Postavljanje pokusa. Izvor: Doris Dorić, 2018., str. 15

Slika 13. White trap. Izvor: Doris Dorić, 2018., str. 16

Slika 14. Uginula ličinka na sobnoj temperaturi od 22º C, Izvor: Doris Dorić 2018., str. 20

Slika 15. Uginule ličinke u tretmanu 700 nematoda po jednom *T. castaneum,* Izvor: Doris Dorić 2018., str. 21

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Diplomski rad**
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Zaštita bilja

UTJECAJ HRANIDBENIH ATRAKTANATA NA INSEKTICIDNO DJELOVANJE ENTOMOPATOGENIH NEMATODA (*Steinernema feltiae*) U SUZBIJANJU LIČINKI KESTENJASTOG BRAŠNARA (*Tribolium castaneum*)

Doris Dorić

Sažetak

Štetni kukci u uskladištenim proizvodima su postali veliki problem zbog rezistentnosti na pesticide. Pojavljuje se sve veća potreba za biološkim preparatima. Cilj istraživanja je utvrditi utjecaj hranidbenih atraktanata kao mamaca s entomopatogenim nematodama (*Steinernema feltiae*) na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum*). Pokus je postavljen u Petrijevim zdjelicama, s lomom zrna pšenice u četiri tretmana i tri ponavljanja, te je proveden u mraku na dvije temperature. Nakon desetog dana izloženosti ličinki kestenjastog brašnara nematodama *S. feltiae* u tretmanu 700 nematoda po kukcu, utvrđen je najveći mortalitet, odnosno utvrđeno je više od 80% uginulih ličinki kestenjastog brašnara. No, nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana. Također, nije utvrđen statistički značajan utjecaj temperature u ovom pokusu. Hranidbeni atraktant nije pospješio infektivnost odnosno patogenost *S. feltiae*. Ličinke kestenjastog brašnara dobar su domaćin za *S. feltiae*, no potrebna su dodatna istraživanja koristeći druge metode ispitivanja patogenosti s obzirom da nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu.

Ključne riječi: *Steinernema feltiae,* patogenost, mortalitet, *Tribolium castaneum*

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: izv.prof.dr.sc. Ivana Majić

Broj stranica: 30

Broj slika: 15

Broj tablica: 6

Broj literaturnih navoda: 20

Broj priloga: 2

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: patogenost, mortalitet, *Steinernema feltiae, Tribolium castaneum*

Datum obrane: 19.10.2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Anita Liška, predsjednik

2. izv. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor

3. doc. dr. sc. Ankica Sarajlić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek **Graduate thesis**
Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek
University Graduate Studies, Plant production, course Plant Protection

EFFECT OF FOOD ATTRACTANTS ON INSECTICIDAL EFFICACY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (*Steinernema feltiae)* AGAINST (*Tribolium castaneum*) LARVAE.

Doris Dorić

Summary:

Stored products insects pests have become a major problem in agriculture due to resistance to pesticides. There is an increasing need for biological control solutions. The aim of the study is to determine effect of food attractants on insecticidal efficacy of entomopathogenic nematodes (*Steinernema feltiae)* against *Tribolium castaneum* larvae. The experiment was set up in Petri dishes with wheat grain as food attractant in four treatments and three repetitions, and it was conducted in dark at two temperatures. The highest mortality was observed in treatment with 700 nematodes per insect larvae, where more than 80% of insect larvae were found dead. There were no statistical differences between the treatments, and no significant effect of temperature regime was observed. Food attractant did not enhance nematodes pathogenicity. The larvae of red flour beetle are susceptible and good host for *S. feltiae*, however different methods of testing their pathogenicity against their pest are needed to ensure significant results.

Key words: *Steinernema feltiae*, pathogenicity, mortality, *Tribolium castaneum*

Thesis performed at: Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek

Mentor: izv.prof.dr.sc. Ivana Majić

Number of pages: 30

Number of figures: 15

Number of tables: 6

Number of references: 20

Number of appendices: 2

Orginal in: Croatian

Key words: *Steinernema feltiae*, pathogenicity, mortality, *Tribolium castaneum*

Thesis defended on date: 19.10.2019.

Reviewers:

1. izv. prof. dr. sc. Anita Liška, predsjednik

2. izv. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor

3. doc. dr. sc. Ankica Sarajlić, član

Thesis deposited at: Library, Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek.