

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Damjan Veselovac, apsolvent

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

UČINKOVITOST ENTOMOPATOGENIH NEMATODA (*Steinernema feltiae*) U  
SUZBIJANJU KESTENJASTOG BRAŠNARA (*Tribolium castaneum*)

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Damjan Veselovac, apsolvant

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

UČINKOVITOST ENTOMOPATOGENIH NEMATODA (*Steinernema feltiae*) U  
SUZBIJANJU KESTENJASTOG BRAŠNARA (*Tribolium castaneum*)

**Diplomski rad**

**Osijek, 2019.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Damjan Veselovac, apsolvent  
Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo  
Smjer Zaštita bilja

UČINKOVITOST ENTOMOPATOGENIH NEMATODA (*Steinernema feltiae*) U  
SUZBIJANJU 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, 2019.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	2
2.1. Kukci u skladišnim prostorima.....	2
2.2. Biološki insekticidi.....	3
2.3. Značaj entomopatogenih nematoda u biološkoj kontroli štetnih kukaca.....	5
2.4. Kestenjasti brašnar ( <i>Tribolium castaneum</i> ).....	9
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Uzgoj nematoda i određivanje koncentracije entomopatogenih nematoda.....	12
3.2. Utvrđivanje mortaliteta kestenjastog brašnara.....	13
4. REZULTATI.....	18
5. RASPRAVA.....	23
6. ZAKLJUČAK.....	26
7. POPIS LITERATURE.....	27
8. SAŽETAK.....	31
9. SUMMARY.....	32
10. PRILOZI.....	33
10.1. Popis tablica.....	33
10.2. Popis slika.....	34
10.3. Popis grafikona.....	35

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

## 1. UVOD

Poljoprivredna proizvodnja u svijetu, pa tako i u Hrvatskoj, ima veliki značaj za ljudsku prehranu. Kako bi se mogla proizvoditi hrana biljnog porijekla, poljoprivredne kulture treba zaštititi od velikog broja štetnika. Posljednjih godina poljoprivreda se bazira na sve većem korištenju kemijskih pripravaka. Proizvođači problem sa štetnicima najčešće rješavaju kemijskim putem. Zbog toga veliki broj štetnika brzo razvije otpornost na kemijske insekticide. Danas se u poljoprivredi sve više primjenjuje integrirana zaštita bilja koja podrazumjeva kombinaciju svih raspoloživih mjera zaštite bilja. Integriranom zaštitom bilja smanjuje se zagađenje okoliša u vidu smanjenja ostatka pesticida jer se sve više koriste biološki pesticidi u zaštiti bilja.

Cilj istraživanja bio je utvrditi učinkovitost hrvatskog soja entomopatogenih nematoda vrste *Steinernema feltiae* u suzbijanju ličinki i odraslih stadija *Tribolium castaneum*.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Kukci u skladišnim prostorima

Najbrojnije skupine životinja u svijetu su kukci i nematode, a manji broj od ukupnog broja vrsta ih se ubraja u štetnike poljoprivrednih kultura. Da bi se kukci mogli nesmetano razvijati, u njihovim staništima moraju vladati povoljni uvjeti za život. Jedno od takvih staništa je skladište poljoprivrednih proizvoda. U skladištima poljoprivrednih proizvoda razvijaju se razni štetnici iz carstva Animalia, a to su najčešće kukci, grinje i glodavci. Skladišta u kojima se čuva velika količina poljoprivrednih proizvoda, štetnicima osigurava povoljne uvjete za razmnožavanje i razvoj. Zaštićeni su od prirodnih neprijatelja i nepovoljnih uvjeta vanjske sredine. Zbog povoljnih uvjeta u skladištima vrlo brzo dolazi do pojave velikih populacija kukaca. Najbrojniji štetnici u skladištima su leptiri i kornjaši. Najčešći kornjaši u skladištima kod nas su žitni (*Sitophilus granarius*) i rižin žičak (*Sitophilus oryzae*), hrđasti brašnar (*Cryptolestes ferrugineus*), surinamski (*Oryzaephilus surinamensis*), mali (*Tribolium confusum*) i kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum*). Štetnici u skladištima poljoprivrednih proizvoda oštećuju proizvode na različite načine. Oni smanjuju težinu proizvoda, ishranom i prisustvom smanjuju kvalitetu proizvoda, povisuju vlagu proizvoda (povoljni uvjeti za razvoj mikroorganizama), smanjuju klijavost sjemena i dr. Kukci se prema načinu oštećenja dijele na primarne i sekundarne štetnike. Primarni štetnici oštećuju zdravo zrno žitarica i leguminoza (žišci, žitni kukuljičar, moljci), dok sekundarni ne prave štete na zdravom zrnju (hrđasti brašnar, mali brašnar, kestenjasti brašnar i surinamski brašnar). Oni se hrane različitim primjesama ili usitnjenom i polomljenom robom (Igrc i Maceljski, 1991.).

Štetnost kemijskih insekticida u poljoprivredi ima niz nedostataka od kojih je veliki problem zagađenje okoliša i toksičnost za ljude i životinje. Danas postoje direktive kojima je glavni cilj postizanje održive uporabe pesticida u zemljama Europske unije, te smanjenje rizika i utjecaja pesticida na zdravlje ljudi i na okoliš (Direktiva 2009/128/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 21. listopada 2009.). U direktivama se navodi i veće korištenje integriranih mjera zaštite bilja. Ove direktive usvojene su 2009. godine.

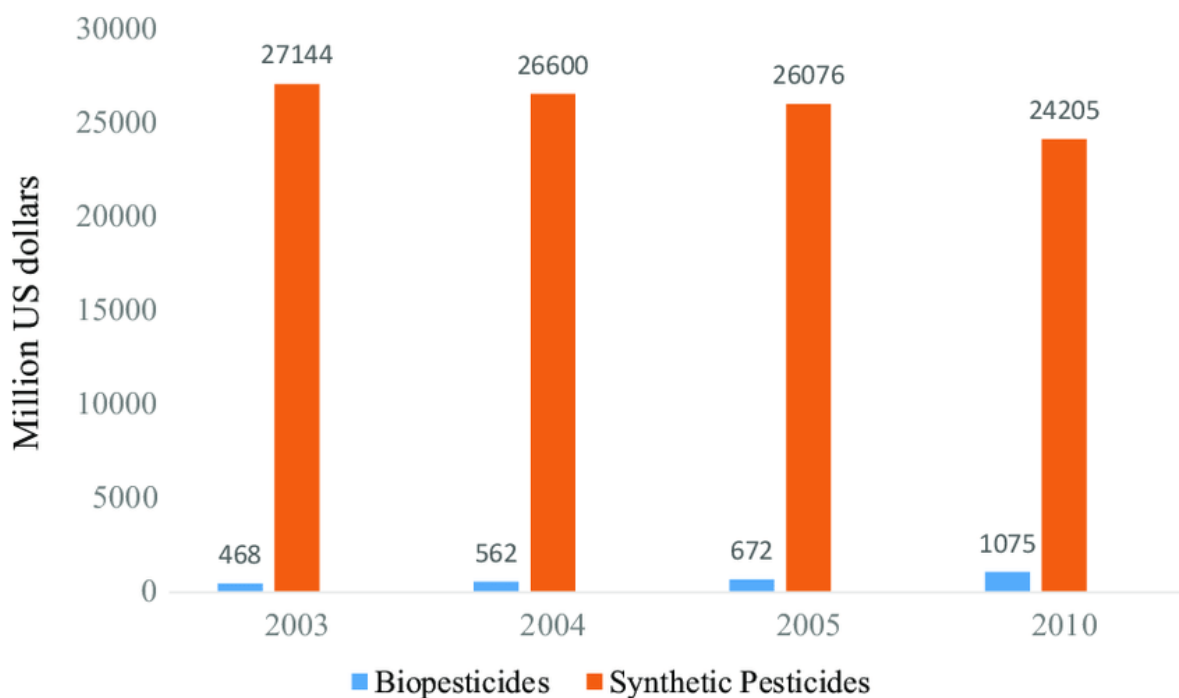
## 2.2. Biološki insekticidi

Zbog mnogih nedostataka kemijskih insekticida i ograničavanja njihove upotrebe zbog toksikoloških posljedica, sve više se primjenjuju biološke mjere protiv štetnih organizama u poljoprivrednoj proizvodnji (Tablica 1).

Tablica 1. Prednosti i nedostaci kemijskih insekticida

NEDOSTACI	PREDNOSTI
Zagađenje okoliša	Visoka učinkovitost
Toksičnost za ljude i okoliš	Jednostavna primjena
Zagađenje tla (ostaci pesticida)	Relativno niska cijena
Ispiranje u površinske i podzemne vode	
Rezistentnost	
Smanjenje bioraznolikosti	
Karenca	

Biološke mjere suzbijanja štetnih organizama su alternativa za kemijske insekticide. Takve mjere često uključuju korištenje živih organizama protiv štetnika. Neki kukci mogu se koristiti i za biološko suzbijanje štetnih korovnih vrsta (Igrc i Maceljki, 1991.). Pod biološkom zaštitom bilja podrazumjevamo korištenje prirodnih neprijatelja kao što su parazitoidi i grabežljivci, ali i drugih korisnih organizama i mikrobioloških insekticida na bazi virusa, bakterija, gljiva i nematoda (Forić i sur., 2018.). Iz grafikona 1. može se vidjeti porast korištenja biopesticida u svijetu od 2003. do 2010. godine.



Grafikon 1. Biopesticidi u svijetu

(izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Global-biopesticides-and-synthetic-pesticides-market-46\\_fig1\\_316141839](https://www.researchgate.net/figure/Global-biopesticides-and-synthetic-pesticides-market-46_fig1_316141839))

Najpoznatiji korisni kukci koji se koriste kao biološke mjere protiv štetnih kukaca su božje ovčice (Coccinellidae). Hrane se jajima, ličinkama, a ponekad i kukuljicama štetnih kukaca. Poznati su prirodni neprijatelji lisnih ušiju. Imago ili odrasla ličinka mogu pojesti do 30 lisnih uši na dan. Većina kukaca iz porodice Carabidae ili trčaka su korisne vrste. Oni su grabežljivci. Uz entomopatogene gljive, najvažniji su prirodni neprijatelji žičnjaka budući žive u tlu. Odrasli trčak može pojesti od 2 do 4 žičnjaka dnevno. Stjenice se mogu ubrojiti u fitofagne, zoofagne (korisne, grabežljive ili predatorske) ili hematofagne kukce. Najvažnije grabežljive stjenice koje se hrane kukcima (gusjenicama, lisnim ušima, resičarima, ličinkama leptira) pripadaju u porodice Nabidae, Miridae i Anthocoridae (Igrc i Maceljki, 1991.).



### 2.3. Značaj entomopatogenih nematoda u biološkoj kontroli štetnih kukaca

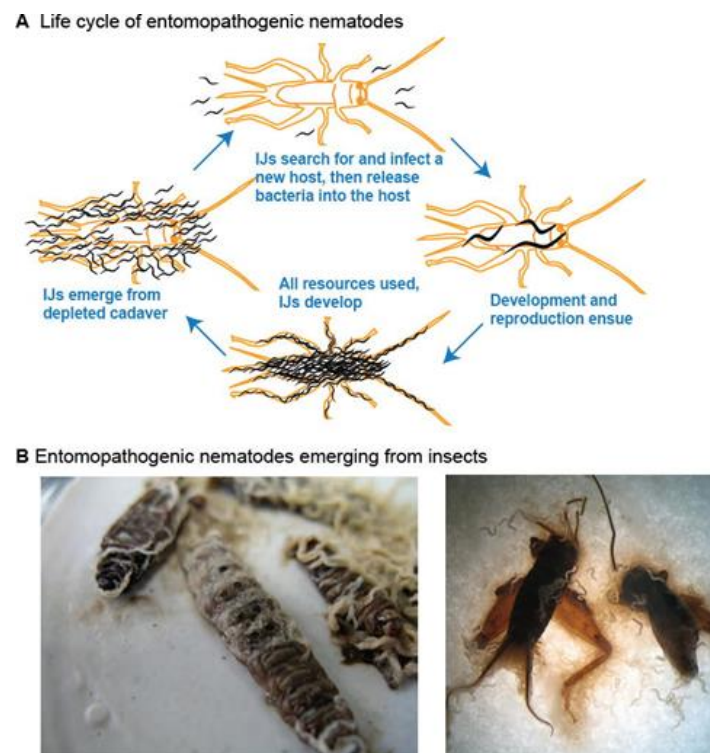
Nematode su vrlo važni organizmi za poljoprivrednu proizvodnju, a žive u svim ekološkim sustavima na kopnu, slatkoj vodi ili u moru. To su sitne životinje različitog oblika tijela, najčešće končastog, ponekad ovalnog, okruglog i drugih oblika. Njihova dužina kreće se najčešće od 0,5 do 2 mm. Boja njihova tijela je bjelkasta do žukaste. Postoji veliki broj vrsta nematoda. Općenito se mogu podijeliti u skupine čiji životni ciklus ovisi o biljkama, životinjama ili drugim organizmima. Biljnoparazitske nematode se hrane na biljkama – sisanjem biljnih sokova. Postoji grupa nematoda koje parazitiraju na životinjama, pa tako i na kukcima. Nematode koje su neprijatelji kukaca nazivamo entomopatogene. One se mogu koristiti u obliku bioloških pripravaka za suzbijanje kukaca (Majić i sur., 2013.).

Najpoznatije porodice entomopatogenih nematoda, letalne za kukce su Steinernematidae, Heterorhabditidae i Mermithidae. Steinernematidae predstavlja porodicu unutar koje se nalazi jedan od značajnijih rodova entomopatogenih nematoda. To je rod *Steinernema* unutar kojeg je opisano oko 25 vrsta nematoda koji su obligatni i smrtonosni paraziti kukaca. Nematode iz ove porodice žive u raznim tipovima tala i mogu se naći gotovo na svim kontinentima. Najčešća vrsta nematode iz roda *Steinernema* koja se koristi za biološko suzbijanje kukaca je *Steinernema feltiae* (Majić i sur., 2018.).

Većina entomopatogenih nematoda živi u simbiozi s bakterijama iz porodice Enterobacteriaceae koje se nalaze u prednjem dijelu njihova probavila. Bakterije nematodama služe kao izvor hrane dok se one razvijaju unutar kukaca. U takvim uvjetima, parazitirani kukac ugiba za samo 24 do 48 sati nakon zaraze s nematodama. Unutar nematode, bakterije su zaštićene od vanjskih nepovoljnih uvjeta, pomažu nematodama što brže usmrtniti domaćina i inhibiraju razvoj drugih bakterija (Nježić, 2016.). Same bakterije ne mogu preživjeti nepovoljan utjecaj vanjske sredine bez domaćina entomopatogenih vrsta nematoda. (Gaugler i sur. 2002.).

Ličinke entomopatogenih nematoda koje su infektivne (treći stadij) u tlu mogu preživjeti i do nekoliko mjeseci, a zatim ulaze u kukca kroz različite otvore (usta, analni otvor, traheje i dr.) ili pasivno putem hrane. U tijelo kukca nematode unose bakterije kojima se hrane. Odrasli spolno zreli oblici nematoda prve generacije razvijaju se iz ličinki četvrtog stadija. Ličinke prvog stadija razvijaju se nakon što ženka odloži jaja. Nakon toga dolazi do

presvlačenja i razvoja ličinki drugog, trećeg i četvrtog stadija. Razvijaju se mužjaci i ženke druge generacije. Ponovno dolazi do kopulacije, odlaganja jaja, te razvoja ličinki prvog i drugog stadija. Nematode svih stadija u tijelu kukca hrane se tkivima i hemolimfom kukca. Ličinke drugog stadija prestaju se hraniti, dolazi do unosa bakterija u vlastiti probavni sustav, presvlačenja i razvoja ličinki trećeg stadija. Takva ličinka (treći stadij) izlazi iz uginulog kukca te odlazi u okolno tlo. U tlu dolazi do novog domaćina kojeg parazitira (Majić i sur., 2018.) (Slika 1.). Provedeno je istraživanje kako temperatura utječe na infektivnost pet izolata nematode *S. feltiae* (Hazir i sur., 2001.). Svi izolati pokazali su najveći broj potomstva na temperaturi od 15 °C. Nije zabilježena infektivnost nematode na temperaturi od 30 °C. Istraživači su došli do zaključka da ova vrsta nematoda bolje podnosi niže temperature.



Slika 1. Životni ciklus entomopatogenih nematoda  
(izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4662870/>)

U svijetu se sve više primjenjuju sredstva za zaštitu bilja na bazi entomopatogenih nematoda (Slika 2.). Entomopatogene nematode mogu se nazvati biopesticidima koji su sposobni kontrolirati veliki broj ekonomski važnih, štetnih kukaca (Shapiro i sur. 2002.). Najviše se njihova primjena može iskoristiti kod suzbijanja štetnika u povrćarstvu i cvjećarstvu. Nažalost, ovi pripravci na bazi nematoda skuplji su od uobičajenih kemijskih pripravaka. U mnogim zemljama danas su komercijalizirana sredstva na bazi nematode *S. feltiae* uz pomoć koje se uspješno suzbijaju različite vrste kukaca (pipe, zlatice, gusjenice leptira, ličinke muha i dr.)

Primjena entomopatogenih nematoda ima niz prednosti u odnosu na kemijske insekticide. Djeluju brzo i učinkovito (mogu se same obnavljati - razmnožavati), imaju širok krug domaćina, mogu se jednostavno uzgajati in vivo (u kukcima) ili in vitro (uzgoj na tekućoj ili krutoj podlozi), imaju jednostavnu primjenu, za razliku od kemijskih insekticida nema opasnosti od rezidua u tlu i zraku, s različitim kemijskim sredstvima su kompatibilne, kod njihove primjene nije potrebna zaštitna oprema (Oštrec, 2001.). Također, nisu štetne za druge žive organizme niti za okoliš. Entomopatogene nematode ne mogu biti dugo aktivne i zato nemaju negativan utjecaj na ne ciljane organizme (Nježić, 2016.). Slabija učinkovitost u odnosu na kemijske insekticide, te cijena entomopatogenih nematoda su glavni nedostaci ovih biopesticida.

Pripravci koji sadrže entomopatogene nematode (Tablica 2) mogu se primjenjivati standardnim uređajima koji se koriste kod tretiranja biljaka kemijskim pripravcima. Mogu se aplicirati uređajima za navodnjavanje. Nematode se apliciraju u sumrak ili kada je oblačno vrijeme jer ih može oštetiti ultraljubičasto zračenje. Jedan od jednostavnijih načina je taj da se nematode mogu primjeniti i zalijevanjem (Nježić, 2016.).

Tablica 2. Ponuda bioloških pripravaka na bazi entomopatogenih nematoda

	Tvrтка	Naziv sredstva / nematoda	Kukac kojeg parazitira
1.	PRO-ECO	NEMACEL ( <i>Steinernema feltiae</i> )	( <i>Bradysia</i> spp., <i>Lycoriella</i> spp.) Ličinke male crne mušice
2.	PRO-ECO	NEMAFLOR ( <i>Steinernema feltiae</i> )	( <i>Frankliniella occidentalis</i> ) Kalifornijski trips
3.	PRO-ECO	NEMAPOM ( <i>Steinernema feltiae</i> )	( <i>Cydia pomonella</i> ) Ličinke jabučnog savijača
4.	PRO-ECO	NEMAGREEN ( <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> )	( <i>Bradysia</i> spp., <i>Lycoriella</i> spp.) Ličinke male crne mušice
5.	PRO-ECO	NEMASTAR ( <i>Steinernema carpocapsae</i> )	rovac ( <i>Gryllotalpa Gryllotalpa</i> ), ozima sovica ( <i>Agrotis segetum</i> ), sovica ipsilon ( <i>Agrotis ipsilon</i> ), proljetna sovica ( <i>Euxoa temera</i> ) i livadni komar ( <i>Tipula paludosa</i> )
6.	AGRICHEM	NEMATOP ( <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> )	( <i>Otiorhynchus sulcatus</i> ) Ličinke pipe
7.	KOPPERT	ENTONEM, SCIARID ( <i>Steinernema feltiae</i> )	(Scarabidae) Šampinjonske mušice
8.	KOPPERT	LARVANEM ( <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> )	( <i>Otiorhynchus sulcatus</i> ) Crna vinova pipa

(izvor: <http://www.proeco.hr/kategorija-proizvoda/entomopatogene-nematode>;

<http://agrichebio.com/en/producto/nematop>;

<https://www.koppert.com/products/products-pests-diseases/entonem/> )



Slika 2. Primjer pakiranja bioloških pripravaka na bazi entomopatogenih nematoda

(izvor: <http://www.proeco.hr/kategorija-proizvoda/entomopatogene-nematode/>)

#### 2.4. Kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum*)

Kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum*) je jedan od najvažnijih štetnika uskladištenih poljoprivrednih proizvoda. Pripada redu Coleoptera (kornjaši) u porodicu Tenebrionidae (mračnjaci). Štetnik je brašna, lomljenog zrna, uljarica i u tvornicama stočnog brašna. Pripada u grupu sekundarnih štetnika žitarica, a to znači da ne oštećuje zdravo zrno nego se hrani ranije oštećenim zrnima. Kukac postaje primarni štetnik ako je zrno vlažno, tada ga može oštećivati. Najčešće ima dvije generacije godišnje. Kestenjasti brašnar (Slika 3.) je termofilni kukac i pri višim temperaturama može imati veći broj generacija. Boja tijela štetnika je crvenkasto smeđa, a dužina tijela imaga je od 3 do 4 mm. Ličinka (Slika 4.) je žućkasta, duga do 6 mm i živi unutar zrna ili proizvoda. Ženka brašnara na temperaturi od 32 °C i vlažnosti zraka od 70% može odložiti do 11 jaja (Slika 5.) na dan. Jaja polaže u zrna ili proizvode. Kada temperatura zraka iznosi +7 °C kukci ugibaju za 25 dana, a ako je temperatura zraka -6 °C ugibaju za samo jedan dan (Ivezić, 2008.).



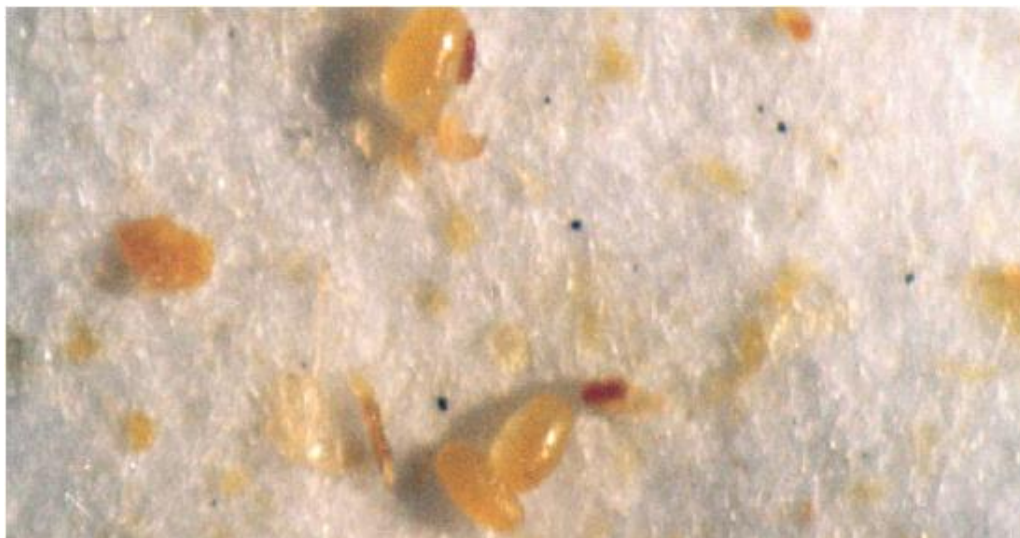
Slika 3. Imago *Tribolium castaneum*

(foto: Veselovac, D. 2018.)



Slika 4. Ličinka *Tribolium castaneum*

(izvor: [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red\\_flour\\_beetle.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red_flour_beetle.htm))



Slika 5. Jaja *Tribolium castaneum*

(izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Eggs-of-Tribolium-castaneum-stained-with-01-N-iodine-solution-standard-AACC-method\\_fig4\\_235247751](https://www.researchgate.net/figure/Eggs-of-Tribolium-castaneum-stained-with-01-N-iodine-solution-standard-AACC-method_fig4_235247751))

*T. castaneum* je štetnik koji najviše oštećuje suhi materijal životinjskog i biljnog podrijetla, a od toga najčešće žitarice i njihove prerađevine. Rasprostranjen je po cijelom svijetu a naročito u tropskim krajevima dok se ostale vrste brašnara nalaze samo u nekim zemljama svijeta. Kukac ima vrlo visok ekonomski značaj. Odrasli kornjaš je dugog životnog vijeka (Rozman, 2011.).

Danas su štetnici zbog značajnog korištenja pesticida u praksi stekli određenu rezistentnost. Pojam rezistentnosti podrazumijeva otpornost jedinki u populaciji štetnika da prežive izloženost letalnim (smrtnim) dozama nekog pesticida. Primjena insekticida u poljoprivredi česta je mjera suzbijanja štetnika i zato je danas rezistentnost jedan od glavnih globalnih problema (Rozman i Liška, 2017.). *T. castaneum* stekao je rezistentnost na 31 različitu djelatnu tvar što se navodi u podacima iz baze podataka o rezistentnosti člankonožaca na pesticide (Arthropod Pesticide Resistance Database -ARPD) (Liška i sur., 2015.).

Zbog rezistentnosti na pesticide kukci se mogu suzbijati i na druge način. Jedan od takvih načina je primjena eteričnih ulja. Eterična ulja mogu na kukce djelovati antifidantno. Kemijski spojevi koji narušavaju ili inhibiraju ishranu kukaca te im ta hrana postaje neatraktivna ili neukusna nazivaju se antifidanti. Takvi spojevi, kada se primjenjuju narušavaju normalnu ishranu, oslabljuju kukce i oni postaju osjetljivi na insekticide. Eterična ulja mogu djelovati i repelentno. Tvari koje od tretiranog materijala odbijaju kukce, biljnog su podrijetla i sigurni su u kontroli štetnika, nazivaju se repelentima. U nekim istraživanjima eterično ulje bosiljka pokazalo se kao snažan repelent protiv vrste *T. castaneum*. Eterično ulje luka, klinčića i lovora uspješan je repelent protiv kestenjastog brašnara (Malešević i sur., 2015.).

Provedeno je testiranje djelotvornosti lavandina u obliku praha cvijeta s listom stabljike te eteričnog ulja i mješavine praha s dijatomejskom zemljom (Lucić i sur., 2015.). Dijatomejska zemlja je silicijska sedimentna stijena koju izgrađuju ostaci jednostaničnih biljnih organizama, dijatoma koji su srodni algama (Korunić i sur., 2009). Najveći mortalitet kod kestenjastog brašnara izaziva eterično ulje lavandina. Lucić i sur. 2015. zaključili su da lavandin u kombinaciji s dijatomejskom zemljom može poslužiti kao prirodni insekticid u zaštiti proizvoda u skladištu.

### 3. MATERIJALI I METODE

Entomopatogene nematode *Steinernema feltiae* ISO18, a koje su korištene u pokusu, izdvojene su u 2016. godini, iz uzoraka tla s đakovačkog područja. Od tada se nematode uzgajaju i čuvaju u laboratoriju Katedre za entomologiju i nematologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Nematode se čuvaju u posudici za uzgoj kultura u pufernoj otopini M9.

#### 3.1. Uzgoj nematoda i određivanje koncentracije entomopatogenih nematoda

Nematode korištene u pokusu uzgajane su prema Stock i Goodrich-Blair (2012.) te nisu bile starije više od dva tjedna nakon izdvajanja iz malog voskovog moljca (*Achroia grisella*). Nakon izdvajanja iz malog voskovog moljca, nematode su prikupljene u Falcon tubice od 15 mL, te su površinski sterilizirane s 1%-tnom otopinom varikine. Takva otopina stavlja se u centrifugu (Tehrica centrica) (Slika 6.). U centrifugi uvijek mora biti paran broj Falcon tubica kako bi se ujednačila ravnoteža. Zbog sile gravitacije za vrijeme okretaja nematode padaju na dno Falcon tubice, a višak vode može se odvaditi do potrebne količine. Varikina se uz pomoć pipete odbacuje i dodaje se destilirana voda. Ponavlja se postupak centrifuge s destiliranom vodom sve dok se otopina s nematodama osjeti po kloru. Na kraju, otopina s nematodama prebacuje se u posudicu za uzgoj kultura i sprema na 4 °C.



Slika 6. Postavljanje Falcon tubica u centrifugu

(foto: Veselovac, D. 2018.)



Posudica za uzgoj kultura veličine je 45 mL. Kako bi se utvrdila koncentracija nematoda potrebna za pokus trebalo je prvo izbrojati koliko nematoda ima u 20  $\mu$ L otopine iz uzgojne posudice. Za to smo koristili stereo zoom mikroskop (Olympus SZX 16), predmetno stakalce i automatsku pipetu volumena od 20 do 200  $\mu$ L. Automatskom pipetom na stakalce stavlja se po tri kapi (Slika 7.) otopine od 20  $\mu$ L s nematodama. Uz pomoć mikroskopa prebrojava se ukupan broj živih i uginulih infektivnih ličinki entomopatogenih nematoda (Slika 8.). Postupak ponavljamo tri do četiri puta kako bi utvrdili prosječan broj infektivnih ličinki nematoda u 20  $\mu$ L, te se preračunava i priprema potrebna koncentracija nematoda u 1 mL destilirane vode.



Slika 7. Pipetiranje nematoda  
(foto: Veselovac, D. 2018.)



Slika 8. Brojanje nematoda  
(foto: Veselovac, D. 2018.)

### 3.2. Utvrđivanje mortaliteta kestenjastog brašnara

Za pokus je bilo potrebno 48 petrijevih posuda od čega je 24 posude za odrasle jedinke (Slika 9.), a 24 posude za ličinke *T. castaneum*. Prvi dio pokusa s odraslim kukcima postavljen je 16.5.2018. godine. Pokus je imao 4 tretmana s 3 ponavljanja te je proveden na dvije temperature: 22 °C (sobna temperatura) i 14 °C (klimastat komora Bodalec). Posudice su označene na način da se na poklopac posudice upisuje tretman, broj ponavljanja, temperatura, stadij kukca (odrasli ili ličinka), ime voditelja pokusa i datum postavljanja pokusa (Slika 13.). Nakon označavanja u posudicu se stavlja dva filter papira (Whatman br. 1) koja su izrezana u obliku kruga točno do ruba posudice (Slika 10.). Na filter papir automatskom pipetom stavlja se oko 1 mL vode, te 1 mL koncentrirane otopine

s nematodama (Slika 14.). Tretmani su bili s koncentracijama od 100, 300 i 700 nematoda po kukcu te kontrolni tretman. Nakon toga u svaku petrijevu posudu se postavlja 10 odraslih kukaca (Slika 12.). Jednaka metoda je primjenjena i za ličinke *T. castaneum*. Pokus s ličinkama i entomopatogenim nematodama je postavljen 29.6.2018. godine. Kestenjasti brašnar prikupljen je iz uzgoja pri Katedri za zaštitu uskladištenih proizvoda i poslijezetvne tehnologije na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. Odrasli stadij koji je korišten za pokus bio je star 30 dana, dok su ličinke posljednjih stadija razvoja izabrane. Svakog drugog dana provjeravana je vlažnost filter papira na sobnoj temperaturi (22 °C) i u komori (14 °C). Ako nema dovoljno vlage, dodaje se voda (Slika 11.).



Slika 9. Priprema pokusa  
(foto: Veselovac, D. 2018.)



Slika 10. Postavljanje filter papira  
(foto: Veselovac, D. 2018.)



Slika 11. Dodavanje vode  
(foto: Veselovac, D. 2018.)



Slika 12. Izdvajanje deset kukaca  
(foto: Veselovac, D. 2018.)

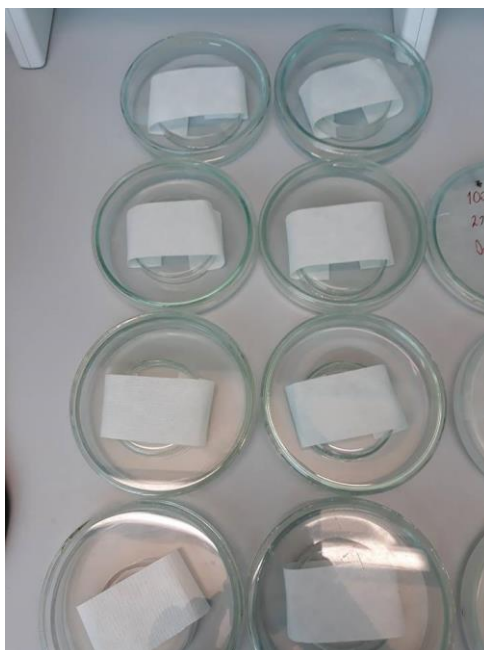


Slika 13. Označene petrijeve posudice  
(foto: Veselovac, D. 2018.)

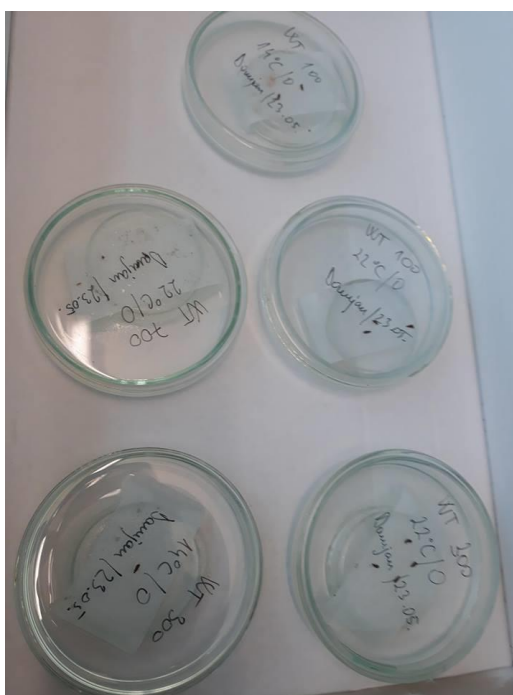


Slika 14. Infekcija s nematodama  
(foto: Veselovac, D. 2018.)

Tjedan dana nakon postavljanja pokusa pregledava se svaka petrijeva posuda kako bi se odvojile uginule jedinice odraslih stadija (Slika 17.), dok je mortalitet ličinki utvrđen treći i sedmi dan nakon postavljanja pokusa. Uginuli kukci postavljeni su na tzv. *White trap* (White-ova zamka) (Slika 16.) (Majić i sur., 2019.). Nakon određenog vremena iz uginulih kukaca izdvajaju se nove generacije entomopatogenih nematoda na White-ovoj zamki (Slika 18.). Za svaki tretman, te za svaku temperaturu, napravljen je jedan *White trap* (Slika 15.). Filter papir se reže u obliku pravokutnika i stavlja preko manje petrijeve posude koja je položena u veću petrijevku.



Slika 15. Priprema *White trap*  
(foto: Veselovac, D. 2018.)



Slika 16. Izdvajanje *S. felitiae* iz *T. castaneum* (*White trap*)  
(foto: Veselovac, D. 2018.)



Slika 17. Uginuli odrasli stadij *T. castaneum*  
(foto: Veselovac, D. 2018.)



Slika 18. *S. feltiae* koja je izašla iz *T. castaneum*  
(foto: Veselovac, D. 2018.)

Rezultati pokusa su analizirani u statističkom programu SAS 9.3., analizom varijance (ANOVA), a razlike između srednjih vrijednosti tretmana su testirane s Tukey HSD testom ( $P < 0,05$ ). Prije analize varijance provedena je analiza Proc GLM, kako bi se utvrdio učinak pojedinih varijabli na mortalitet kukaca.

#### 4. REZULTATI

U tablici 3 prikazana je GLM analiza mortaliteta *T. castaneum*. Za uspoređivanje srednjih vrijednosti analiziranih varijabli korišten je prag značajnosti  $P < 0,05$ . Koncentracija nematoda koja je primjenjena u pokusu pokazuje se statistički značajnom jer je manja od praga značajnosti 0,05. Izrazito visoku statističku značajnost u pokusu možemo vidjeti uspoređujući stadije kukaca (ličinke i odrasli) budući da je utvrđena velika razlika između mortaliteta gdje su odrasli u odnosu na ličinke pokazali veliku otpornost prema nematodama *S. feltiae*. Temperatura je također imala statistički značajan utjecaj na mortalitet kestenjastog brašnara sa *S. feltiae*. Interakcije između analiziranih varijabli nisu bile statistički značajne.

Tablica 3. GLM analiza rezultata utjecaja *Steinernema feltiae* na mortalitet *Tribolium castaneum*

	DF	KSS	F vrijednost	P > F
<b>Koncentracija nematoda</b>	3	288,88	3,58	0,0234
<b>Stadij kukca</b>	1	81675,00	1011,90	<,0001
<b>Temperatura</b>	1	833,33	10,32	0,0028
<b>Koncentracija nematoda*stadij</b>	3	97,22	1,20	0,3224
<b>Koncentracija nematoda*temperatura</b>	3	188,88	2,34	0,0902
<b>Stadij kukca*temperatura</b>	1	208,33	2,58	0,1171

U tablici 4 prikazani su rezultati mortaliteta ličinki *T. castaneum* pri temperaturi od 22 °C.

Tablica 4. Mortalitet (%) ličinki *Tribolium castaneum* u tretmanima s različitim koncentracijama *Steinernema feltiae* pri temperaturi od 22 °C

Tretman	n	Dan nakon infekcije		Ukupno
		3.	7.	
0	10	60,00 ab	23,33 a	83,33 a
100	10	76,67 a	23,33 a	100 a
300	10	60,00 ab	36,66 a	96,66 a
700	10	46,66 b	50,00 a	96,66 a

Vrijednosti u stupcima obilježene s različitim slovima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ )

Treći dan od infekcije najveći mortalitet bio je u tretmanu 100. U kontroli i tretmanu 300 mortalitet ličinki je 16% manji nego u tretmanu 100. Suprotno očekivanju, najmanji mortalitet bio je u tretmanu 700 gdje je primjenjeno najviše nematoda.

Sedmi dan nakon infekcije utvrđen je najveći mortalitet od 50% u tretmanu 700. U kontroli i tretmanu 100 mortalitet je jednak. U posljednjem stupcu tablice prikazan je ukupan mortalitet ličinki na kraju pokusa. Može se vidjeti da je u tretmanu 100 postignut najveći mortalitet ličinki (100%), a najmanji u kontrolnom tretmanu. U tretmanima 300 i 700 mortalitet ličinki je jednak.

Trećeg dana nakon infekcije ličinki s nematodama na temperaturi od 22 °C utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u mortalitetu između tretmana. Pregledom ličinki sedmog dana nakon infekcije nema statistički značajne razlike u mortalitetu između tretmana.

U tablici 5 prikazani su rezultati mortaliteta ličinki *T. castaneum* na kontroliranoj temperaturi (14 °C). Možemo vidjeti da je u kontrolnom tretmanu mortalitet treći dan nakon pregleda bio najveći. Na kraju pokusa može se zaključiti da je ukupni mortalitet u svim tretmanima veći od 70%.

Tablica 5. Mortalitet (%) ličinki *Tribolium castaneum* u tretmanima s različitim koncentracijama *Steinernema feltiae* pri temperaturi od 14 °C

Tretman	n	Dan nakon infekcije		Ukupno
		3.	7.	
0	10	60,00 a	20,00 b	80,00 a
100	10	50,00 a	46,66 a	96,66 a
300	10	56,66 a	16,66 b	73,32 a
700	10	53,33 a	23,33 b	76,66 a

Vrijednosti u stupcima obilježene s različitim slovima su statistički značajno različite (P<0,05)

Nije utvrđena statistički značajna razlika u mortalitetu između tretmana treći dan nakon postavljanja pokusa. Sedmog dana pregleda poslije infekcije utvrđena je statistički značajna razlika između tretmana. Najveći mortalitet utvrđen je u tretmanu gdje je primjenjeno 100 nematoda po kukcu. Iz ovih rezultata možemo zaključiti da je potrebno raditi preglede i poslije trećeg dana nakon infekcije jer se mogu utvrditi statistički značajne razlike između tretmana kao što je to utvrđeno u ovom pokusu.

Iz tablica mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara vidi se da je na obje temperature (14 i 22 °C) najveći mortalitet bio u tretmanu 100. Po ovim rezultatima pokusa možemo reći da se koncentracija u kojoj je primjenjeno 100 nematoda po ličinki kestenjastog brašnara pokazala najučinkovitijom za suzbijanje ovog kukca.

Simptomi zaraze s *S. feltiae* prikazani su na slici 19. Razvili su se tipični simptomi (smeđa boja) koje uzrokuju nematode iz porodice Steinernematidae, a ličinke su ostale do kraja pokusa mumificirane, odnosno nisu se razložile.



Slika 19. Simptomi zaraze s entomopatogenim nematodama na ličinkama *T. castaneum*

(foto: Veselovac, D. 2018.)



U tablici 6 prikazani su rezultati mortaliteta odraslih kukaca kestenjastog brašnara na sobnoj temperaturi. Mortalitet odraslih jedinki pregledan je sedmi i četrnaesti dan od infekcije nematodama vrste *S. feltiae*. Iz tablice možemo vidjeti da u kontroli nema uginulih jedinki. U tretmanu 700 mortalitet je jednak i iznosi 3,33%. Najveći mortalitet od 13,33% bio je u tretmanu 300. Iz ovih rezultata vidljivo je da nema statistički značajne razlike u mortalitetu između svih tretmana.

Tablica 6. Mortalitet (%) odraslih *Tribolium castaneum* u tretmanima s različitim koncentracijama *Steinernema feltiae* pri temperaturi od 22 °C

Tretman	n	Dan nakon infekcije		Ukupno
		7.	14.	
0	10	0,00 a	0,00 a	0,00 a
100	10	10,00 a	0,00 a	10,00 a
300	10	10,00 a	3,33 a	13,33 a
700	10	3,33 a	3,33 a	6,66 a

Vrijednosti u stupcima obilježene s različitim slovima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ )

U tablici 7 prikazani su rezultati mortaliteta odraslih stadija kestenjastog brašnara na kontroliranoj temperaturi od 14 °C. U kontroli i tretmanu 300 mortalitet je iznosio 3,33%. Najveći mortalitet bio je u tretmanu 100 i veći za 3,33% nego u kontroli i tretmanu 300. U tretmanu gdje je primjenjeno najviše nematoda nema uginulih kukaca.

Tablica 7. Mortalitet (%) odraslih *Tribolium castaneum* u tretmanima s različitim koncentracijama *Steinernema feltiae* pri temperaturi od 14 °C

Tretman	n	Dan nakon infekcije		Ukupno
		7.	14.	
0	10	0,00 a	3,33 a	3,33 a
100	10	6,66 a	0,00 a	6,66 a
300	10	3,33 a	0,00 a	3,33 a
700	10	0,00 a	0,00 a	0,00 a

Vrijednosti u stupcima obilježene s različitim slovima su statistički značajno različite ( $P < 0,05$ )

Nije utvrđena statistički značajna razlika između srednjih vrijednosti mortaliteta između tretmana pri 14 °C. Iako nisu utvrđene statistički značajne razlike, na višoj temperaturi (22 °C) utvrđeni najveći mortalitet je dvostruko veći nego onaj utvrđen pri temperaturi od 14 °C. Iako su nematode iz roda *Steinernematidae* poznate po visokoj aktivnosti na hladnijim temperaturama, u ovom istraživanju se pokazalo da je za veću učinkovitost *S. feltiae* potrebna temperatura od 22 °C. Odrasli stadiji kestenjastog brašnara vrlo su otporni na infekciju s *S. feltiae*.

U tablici 8 možemo vidjeti razliku u mortalitetu između ličinki i odraslih kukaca kestenjastog brašnara.

Tablica 8. Srednje vrijednosti mortaliteta *Tribolium castaneum* (%) ovisno o stadiju razvoja kukca pri različitim koncentracijama *Steinernema feltiae*

<b>Koncentracija</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>300</b>	<b>700</b>
<b>Ličinke</b>	81,66 a	98,33 a	85,00 a	86,67 a
<b>Odrasli</b>	1,66 b	8,33 b	8,33 b	3,33 b

Vrijednosti u stupcima obilježene s različitim slovima su statistički značajno različite (P<0,05)

Ovisno o stadiju razvoja kukca pri različitim koncentracijama *S. feltiae*, mortalitet u kontrolnim tretmanima kod oba stadija kukaca je najmanji, ali su statistički značajno različiti. Visok mortalitet ličinki u kontroli vjerovatno je rezultat nekog propusta u metodologiji (npr. prevlažna okolina). Kod svih tretmana je utvrđena statistički značajna razlika u mortalitetu ovisno o stadiju razvoja kukca. Entomopatogene nematode *S. feltiae* ISO18 imaju slabu učinkovitost u laboratorijskim uvjetima prema odraslim stadijima kestenjastog brašnara.

## 5. RASPRAVA

Shahina i sur. (2011.) utvrdili su slične rezultate kao u ovom pokusu, te su zaključili da su odrasli stadiji kestenjastog brašnara manje osjetljivi na infekciju s *S. feltiae* u odnosu na ličinke. U pokusu su navedeni autori ispitali učinkovitost sedam vrsta entomopatogenih nematoda u suzbijanju odraslih i ličinki kestenjastog brašnara. Njihov pokus sličan je ovome jer su radili s istim štetnikom, a od entomopatogenih nematoda koje su bile korištene u pokusu bila je i vrsta *S. feltiae*. Pokus je proveden na temperaturi od 30 °C. Radili su s četiri različite koncentracije (100, 200, 300 i 400 nematoda po kukcu). Mortalitet brašnara bio je veći u tretmanima nego u kontroli što je i očekivani rezultat. Sve entomopopogene nematode pokazale su bolji rezultat mortaliteta kod stadija ličinki osim nematode *S. feltiae*, gdje je mortalitet bio znatno manji. Isto je bilo i kod stadija odraslih kukaca. Shahina i sur. navode da je manji rezultat mortaliteta moguć zbog toga jer je *S. feltiae* nematoda koja bolje tolerira niže temperaturne vrijednosti oko 20°C.

U istraživanju koje su proveli Ramos-Rodriguez i sur. (2007.) također je kao i u našem pokusu bio korišten *T. castaneum*. Radili su na ličinkama i odraslim stadijima, ali mortalitet je ispitan s drugom vrstom entomopatogene nematode *Steinernema riobrave*. U pokusu su imali dvije temperature (20 i 30°C) i četiri različite vlažnosti zraka - 43, 56–57, 75 i 100%. Nakon pregleda mortaliteta najosjetljivije su bile ličinke kao i u našem pokusu, a odrasli stadiji kestenjastog brašnara pokazali su srednju osjetljivost na infekciju sa *S. riobrave*. Mortalitet ličinki je bio 80%, a u našem pokusu mortalitet kod dvije temperature kretao se između 70 i 100%. Autori su naveli da se nedostatak značajnog utjecaja entomopatogenih nematoda na odrasle stadije *T. castaneum* može pripisati nižoj osjetljivosti kukaca na infekciju s nematodama. Nakon provedenog pokusa rezultati su pokazali da temperatura i relativna vlažnost zraka nemaju značajan utjecaj na djelovanje *S. riobrave* u suzbijanju *T. castaneum*, ali nematode se pokazuju kao dobar biološki insekticid protiv ovog skladišnog štetnika.

Laznik i sur. (2009.) radili su istraživanje s drugim vrstama ekonomski značajnih skladišnih štetnika. U laboratorijskim uvjetima su ispitali kako tri vrste entomopatogenih nematoda iz roda *Steinernema* djeluju na odrasle jedinke rižinog žiška (*Sitophilus oryzae*). Koristili su četiri različite temperature (15, 20, 25 i 30 °C) i pet različitih koncentracija nematoda (125, 250, 500, 1000 i 2000) po odraslom kukcu. Mortalitet su pregledavali

četvrti, šesti i osmi dan nakon infekcije. Najveći mortalitet rižinog žiška bio je na temperaturi od 25 °C (42-72% smrtnosti) pri najvećoj koncentraciji nematoda. Najmanji mortalitet bio je na temperaturi od 30 °C (6 - 11%). Za razliku od našeg pokusa gdje mortalitet kod odraslih kukaca na obje temperature nije prelazio 7% u ovom je pri najvišoj koncentraciji nematoda mortalitet kukaca bio najveći.

Trdan i sur. (2005.) istraživali su kakvu učinkovitost imaju četiri vrste entomopatogenih nematoda (*S. feltiae*, *Steinernema carpocapsae*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis megidis*) u suzbijanju također značajnog skladišnog štetnika, žitnog žiška (*Sitophilus granarius*). U ovom pokusu samo je kod *S. feltiae* utvrđen statistički značajan utjecaj interakcije između temperature i koncentracije nematoda za razliku od našeg pokusa gdje interakcije između ispitivanih varijabli nisu pokazale statističku značajnost. Pokus je proveden u laboratoriju na tri temperature (15, 20 i 25 °C). Primjenili su tri koncentracije nematoda (500, 1000 i 2000) po kukcu. Mortalitet su pregledavali sedmi dan poslije infekcije. Rezultati nisu pokazali značajne razlike u mortalitetu kukaca između tretmana. Najveći mortalitet bio je na temperaturama 20 i 25 °C. Na kraju pokusa zaključili su da je koncentracija nematoda u tretmanima manje važna u suzbijanju *S. granarius*.

Athanassioua i sur. (2008.) proveli su istraživanje o insekticidnom djelovanju entomopatogene nematode *S. feltiae* na također značajnog skladišnog štetnika *Tribolium confusum* (mali brašnar). U pokusu su imali tri tretmana s dozama 100, 300 i 900 nematoda po jednom kukcu. Mortalitet kukaca pregledavali su sedmi i četrnaesti dan nakon infekcije s nematodama. Kod najveće doze primjenjenih nematoda (900) nakon obavljenih pregleda, mortalitet ličinki je iznosio 79 i 100%. Najveći mortalitet kod odraslih brašnara iznosio je 66%. Mortalitet odraslih stadija i u našem je pokusu bio manji nego kod stadija ličinki. U ovom pokusu je za razliku od našeg kod koncentracije gdje je primjenjeno najviše nematoda mortalitet bio najveći. U našem pokusu je najveći mortalitet bio u tretmanima gdje je primjenjeno 100 nematoda po ličinki. Autori su zaključili da je zbog nedostatka podataka o djelovanju entomopatogenih nematoda na ove štetnike i dalje potrebno raditi istraživanja jer ove nematode mogu biti obećavajući biološki insekticidi.

U istraživanju koje su proveli Rumbos i sur. (2012.) ispitan je insekticidni učinak *H. bacteriophora*, *H. megidis* i dvije vrste *S. carpocapsae* i *S. feltiae* na *T. confusum* i *Lasioderma serricorne* (duhanar) u laboratorijskim uvjetima. Ličinke malog brašnara u

ovom pokusu pokazale su veliku otpornost prema entomopatogenim nematodama pri najvišoj koncentraciji gdje mortalitet nije prelazio 23%. U našem pokusu kod ličinki kestenjastog brašnara mortalitet je pri najvišoj koncentraciji nematoda iznosio 76 do 97%. Za razliku od našeg pokusa u ovom je kod odraslih kukaca mortalitet pri najvišoj koncentraciji bio znatno veći. Nematode su primjenili u 6 različitih koncentracija (0, 10, 100, 500, 1000 i 2000) po kukcu. Njihova infektivnost ispitana je na temperaturi od 27 °C i 70% relativne vlage zraka. Mortalitet kukaca je pregledavan četvrti i osmi dan nakon infekcije. Najveći mortalitet od 15.6 i 58.9% uzrokovala je *S. carpocapsae* kod odraslih duhanara i to u tretmanu gdje je primjenjeno najviše nematoda. Mortalitet ličinki duhanara nije prelazila 19%. Mortalitet ličinki *T. confusum* iznosio je 15,2 i 22,4% pri najvišoj koncentraciji nematoda.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata može se zaključiti da je *T. castaneum* ovisno o stadiju, različito otporan na djelovanje entomopatogenih nematoda *S. feltiae*. Mortalitet odraslih kukaca i ličinki neovisno o temperaturi okoline statistički se značajno razlikuje. Sedam dana nakon infekcije mortalitet ličinki kestenjastog brašnara na kontroliranoj temperaturi (14 °C) iznosio je od 70 do 96%, dok je na sobnoj temperaturi mortalitet bio od 80 do 100%. Za razliku od ličinki, kod odraslih *T. castaneum* mortalitet nije prelazio 13,33%. Na kontroliranoj temperaturi u tretmanu gdje je primjenjeno najviše nematoda (700 po kukcu) nije pronađen niti jedan odrasli uginuli *T. castaneum*. Kod većine istraživanja mortalitet ličinki bio je veći u odnosu na mortalitet odraslih kukaca kao i u ovom pokusu. Koncentracija u kojoj je primjenjeno 100 nematoda po ličinki *T. castaneum* bila je najučinkovitija jer je postignut najveći mortalitet. Entomopatogene nematode *S. feltiae* učinkovitije su za suzbijanje ličinki nego odraslih jedinki *T. castaneum* jer se prema rezultatima pokusa može vidjeti da su odrasli stadiji otporniji. Budući da se poljoprivredni proizvodi na kojima se hrani i koje oštećuje *T. castaneum* čuvaju u skladištima na nižim temperatura, a *S. feltiae* je nematoda koja bolje podnosi niže temperature, ona može biti odgovarajući biološki insekticid protiv ličinki ovog ekonomski značajnog skladišnog štetnika.

## 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.

Forić, N., Sarajlić, A., Vrandečić, K., Majić, I. (2018.): Potential of entomopathogenic fungi *Metarhizium* spp. in control of insects pest, Glasnik zaštite bilje, 30-30

Hazir, S., Stock, S. P., Kaya, K. H., Koppenho, A. M. and Keskin, N. (2001.): Developmental Temperature Effects on Five Geographic Isolates of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae), Journal of Invertebrate Pathology 77, 243–250

Igrc, J., Mceljski, M. (1991.): Entomologija, Štetne i korisne životinje u ratarskim usjevima, Sveučilišna naklada, Zagreb

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

Korunić, Z., Rozman, V., Halamić, J. (2009.): Dijatomejska zemlja u Hrvatskoj, Zbornik radova i seminara, DDD i ZUPP slijedimo li svjetski razvoj, Zadar: 325-333

Laznik, Ž., Tóth, T., Lakatos, T., Vidrih, M., Trdan, S. (2009.): The activity of three new strains of *Steinernema feltiae* against adults of *Sitophilus oryzae* under laboratory conditions, Journal of Food, 150-154.

Liška, A., Rozman, V., Lucić, P., Halil, S. (2015.): Procjena rezistentnosti kestenjastog brašnara *Tribolium castaneum* (Herbst) na fosfin, Zbornik radova i seminara DDD i ZUPP, 203-211

Lucić, P., Liška, A., Rozman, V., Baličević, R., Đumlić, M. (2015.): Potencijal uporabe lavandina (*Lavandula x intermedia*) u zaštiti uskladištene pšenice protiv skladišnih kukaca, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Majić, I., Ivezić, M., Stošić, M., Jug, D., Brmež, M., Sarajlić, A. (2013.): Free-living and plant parasitic nematodes under conventional tillage and no-tillage treatments in wheat and soybean, 2nd International Scientific Conference, Soil and Crop Management, 288-293

Majić, I., Sarajlić, A., Lakatos, T., Toth, T., Raspudić, E., Zebec, V., Kanižai Šarić, G., Kovačić, M., Laznik, Ž. (2018.): First report of entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) from Croatia, Institute of Parasitology, Helminthologia 55: 256-260

Majić, I., Sarajlić, A., Lakatos, T., Toth, T., Raspudić, E., Puškadija, Z., Kanižai Šarić, G., Laznik, Ž. (2019.): Virulence of new strain of *Heterorhabditis bacteriophora* from Croatia against *Lasiopoda rubi*, Plant Protection Science, 55: 134-141

Malešević, S., Grdiša, M., Carović – Stanko, K. (2015.): Uporaba eteričnog ulja u zaštiti uskladištenog sjemena, Agronomski glasnik 1 – 2, 41-59

Nježić, B. (2016.): Entomopatogene nematode u biološkoj zaštiti bilja, Glasnik zaštite bilja 4, 10-14

Oštrec, Lj. (2001.): Biološko suzbijanje štetnih insekata entomopatogenim nematodama, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Agriculturae Conspectus Scientificus, 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, 15-21

Rozman, V. (2011.): Rezistencija štetnika na pesticide, Zbornik predavanja DDD Trajna edukacija za izvoditelje obvezatnih mjera dezinfekcije, dezinsekcije i deratizacije i osobe u nadzoru – Osnovni principi provedbe DDD mjera u praksi, Zagreb, 63-68



Rozman, V., Liška, A. (2017.): Razvoj rezistentnosti skladišnih štetnika na fumigante, Glasilo biljne zaštite 5, 480-484

Rumbos, C., I., Athanassiou. C., G. (2012.): Insecticidal effect of six entomopathogenic nematode strains against *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae) and *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae), Journal of Stored Products Research, 21-26

Shahina, F., Salma, J. (2011.): Pakistani strains of entomopathogenic nematode as a biological control agent against stored grain pest *Tribolium castaneum*, Pakistan, Pak. J. Nematol., 29 (1): 25-34

Shapiro – Ilan, D. I., Gaugler, R., Tedderes, W. L., Brown, Ian., Lewis, E. E. (2002): Optimization of Inoculation for In Vivo Production of Entomopathogenic Nematodes, Rutgers University, New Brunswick, 343–350.

Shapiro – Ilan, D. I., Gaugler, R. (2002): Production technology for entomopatogenic nematodes and their bacterial symbionts, Journal of Industrial Microbiology and Biotehnology, 137-146

Stock, S. P., Goodrich-Blair, H. (2012.): Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance, Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition), 373-426

Trdan, S., Valič, N., Urek, G., Milevoj, L. (2005.): Concentration of suspension and temperature as factors of pathogenicity of entomopathogenic nematodes for the control of granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), Acta agriculturae Slovenica, 85 - 1, 117 - 124

Internet stranice:

1. <http://www.proeco.hr/kategorija-proizvoda/entomopatogene-nematode/> 10.09.2018.
2. <http://agrighbio.com/en/producto/nematop/> 10.09.2018.
3. <https://www.koppert.com/products/products-pests-diseases/entonem/> 15.10.2018.
4. [https://www.researchgate.net/figure/Global-biopesticides-and-synthetic-pesticides-market-46\\_fig1\\_316141839](https://www.researchgate.net/figure/Global-biopesticides-and-synthetic-pesticides-market-46_fig1_316141839) 03.11.2018.
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4662870/> 20.09.2018
6. <http://www.proeco.hr/kategorija-proizvoda/entomopatogene-nematode/> 22.11.2018.

## 8. SAŽETAK

Cilj istraživanja je utvrditi učinkovitost entomopatogenih nematoda *Steinernema feltiae* ISO18 u suzbijanju ličinki i odraslih stadija *Tribolium castaneum*. Danas se u poljoprivredi sve više koriste biološki pripravci u zaštiti bilja protiv štetnih kukaca kao što su entomopatogene nematode. *T. castaneum* je značajan skladišni štetnik jer oštećuje poljoprivredne proizvode i smanjuje njihovu vrijednost. Pokus je proveden na dvije temperature (22 i 14 °C) u tretmanima s četiri različite koncentracije entomopatogenih nematoda hrvatski soj *Steinernema feltiae* ISO18 (0, 100, 300 i 700). Na temperaturi od 22 °C mortalitet ličinki iznosio je više od 80% dok je na temperaturi od 14 °C mortalitet bio veći od 70%. Najveći mortalitet kod odraslih kukaca iznosio je 13,33% u tretmanu s 300 nematoda po kukcu na temperaturi od 22 °C. Utvrđena je statistički značajna razlika u mortalitetu između stadija kukca. Zadovoljavajuća insekticidna učinkovitost *S. feltiae* ISO18 je utvrđena kod ličinki pri temperaturi od 14 °C. Odrasli kukci su vrlo otporni na entomopatogene nematode *S. feltiae* ISO18.

**Ključne riječi:** *Steinernema feltiae*, *Tribolium castaneum*, mortalitet, biološki insekticidi, entomopatogene nematode

## 9. SUMMARY

The aim of the research is to evaluate the effectiveness of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* ISO18 in control of *Tribolium castaneum* larvae and adults. Biological pest control measures, such as entomopathogenic nematodes are getting more attention and importance in plant protection programs due to the toxicological issues of chemical pesticides. *T. castaneum* is economically important pest of stored grain products. The experiment was conducted under laboratory conditions at two temperatures regimes (22 i 14 °C) and four different nematode concentrations of Croatian strain *Steinernema feltiae* ISO18 (0, 100, 300 i 700 nematodes per insect). Mortality of larvae at 22 °C was in average more than 80%, and more than 70% at temperature of 14 °C, respectively. The highest mortality of adults was 13,33%, and it was achieved in treatment with 300 nematodes per insect at 22 °C. Statistically significant differences are observed between the larval and adult stages. *S. feltiae* ISO18 proved satisfactory insecticidal properties against larval stage at 14 °C. Adult *T. castaneum* are very resistant to entomopathogenic nematodes *S. feltiae* ISO18.

**Key words:** *Steinernema feltiae*, *Tribolium castaneum*, mortality, biopesticide, entomopatogenic nematodes

## 10. PRILOZI

### 10.1. Popis tablica

Tablica 1. Prednosti i nedostaci kemijskih insekticida

Tablica 2. Ponude bioloških pripravaka na bazi entomopatogenih nematoda

Tablica 3. GLM analiza rezultata utjecaja *Steinernema feltiae* na mortalitet *Tribolium castaneum*

Tablica 4. Mortalitet ličinki *Tribolium castaneum* u tretmanima s različitim koncentracijama *Steinernema feltiae* pri temperaturi od 22 °C

Tablica 5. Mortalitet ličinki *Tribolium castaneum* u tretmanima s različitim koncentracijama *Steinernema feltiae* pri temperaturi od 14 °C

Tablica 6. Mortalitet odraslih *Tribolium castaneum* u tretmanima s različitim koncentracijama *Steinernema feltiae* pri temperaturi od 22 °C

Tablica 7. Mortalitet odraslih *Tribolium castaneum* u tretmanima s različitim koncentracijama *Steinernema feltiae* pri temperaturi od 14 °C

Tablica 8. Srednje vrijednosti mortaliteta *Tribolium castaneum* (%) ovisno o stadiju razvoja kukca pri različitim koncentracijama *Steinernema feltiae*

## 10.2. Popis slika

Slika 1. Životni ciklus entomopatogenih nematoda, izvor:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4662870/>

Slika 2. Primjer pakiranja bioloških pripravaka na bazi entomopatogenih nematoda, izvor:

<http://www.proeco.hr/kategorija-proizvoda/entomopatogene-nematode/>

Slika 3. Imago *Tribolium castaneum*, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 4. Ličinka *Tribolium castaneum*, izvor:

[http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red\\_flour\\_beetle.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red_flour_beetle.htm)

Slika 5. Jaja *Tribolium castaneum*, izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Eggs-of-Tribolium-castaneum-stained-with-01-N-iodine-solution-standard-AACC-method\\_fig4\\_235247751](https://www.researchgate.net/figure/Eggs-of-Tribolium-castaneum-stained-with-01-N-iodine-solution-standard-AACC-method_fig4_235247751)

Slika 6. Postavljanje Falcon tubica u centrifugu, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 7. Pipetiranje nematoda, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 8. Brojanje nematoda, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 9. Priprema pokusa, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 10. Postavljanje filter papira, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 11. Dodavanje vode, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 12. Izdvajanje deset kukaca, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 13. Označene petrijeve posudice, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 14. Infekcija s nematodama, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 15. Priprema *White trap*, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 16. Izdvajanje *S. feltiae* iz *T. castaneum* (*White trap*), izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 17. Uginuli odrasli stadij *T. castaneum*, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 18. *S. feltiae* koja je izašla iz *T. castaneum*, izvor: Veselovac, D. 2018

Slika 19. Simptomi zaraze s entomopatogenim nematodama na ličinkama *T. castaneum*, izvor: Veselovac, D. 2018

### **10.3. Popis grafikona**

Grafikon 1. Biopesticidi u svijetu, izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Global-biopesticides-and-synthetic-pesticides-market-46\\_fig1\\_316141839](https://www.researchgate.net/figure/Global-biopesticides-and-synthetic-pesticides-market-46_fig1_316141839)

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Zaštita bilja

### UČINKOVITOST ENTOMOPATOGENIH NEMATODA (*Steinernema feltiae*) U SUZBIJANJU KESTENJASTOG BRAŠNARA (*Tribolium castaneum*)

Damjan Veselovac

#### Sažetak:

Cilj istraživanja je utvrditi učinkovitost entomopatogenih nematoda *Steinernema feltiae* ISO18 u suzbijanju ličinki i odraslih stadija *Tribolium castaneum*. Danas se u poljoprivredi sve više koriste biološki pripravci u zaštiti bilja protiv štetnih kukaca kao što su entomopatogene nematode. *T. castaneum* je značajan skladišni štetnik jer oštećuje poljoprivredne proizvode i smanjuje njihovu vrijednost. Pokus je proveden na dvije temperature (22 i 14 °C) u tretmanima s četiri različite koncentracije entomopatogenih nematoda hrvatski soj *Steinernema feltiae* ISO18 (0, 100, 300 i 700). Na temperaturi od 22 °C mortalitet ličinki iznosio je više od 80% dok je na temperaturi od 14 °C mortalitet bio veći od 70%. Najveći mortalitet kod odraslih kukaca iznosio je 13,33% u tretmanu s 300 nematoda po kukcu na temperaturi od 22 °C. Utvrđena je statistički značajna razlika u mortalitetu između stadija kukca. Zadovoljavajuća insekticidna učinkovitost *S. feltiae* ISO18 je utvrđena kod ličinki pri temperaturi od 14 °C. Odrasli kukci su vrlo otporni na entomopatogene nematode *S. feltiae* ISO18.

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Ivana Majić

**Broj stranica:** 35

**Broj grafikona i slika:** 20

**Broj tablica:** 8

**Broj literaturnih navoda:** 24

**Broj priloga:** 3

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** *Steinernema feltiae*, *Tribolium castaneum*, mortalitet, biološki insekticidi, entomopatogene nematode

**Datum obrane:** 17.04.2019.

#### 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 u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek



**BASIC DOCUMENTATION CARD****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Graduate thesis****Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek****University Graduate Studies, Plant production, course Plant protection****EFFICACY OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES (*Steinernema feltiae*) IN CONTROL OF THE FLOUR  
BETTLER (*Tribolium castaneum*)**

Damjan Veselovac

**Summary:**

The aim of the research is to evaluate the effectiveness of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* ISO18 in control of *Tribolium castaneum* larvae and adults. Biological pest control measures, such as entomopathogenic nematodes are getting more attention and importance in plant protection programs due to the toxicological issues of chemical pesticides. *T. castaneum* is economically important pest of stored grain products. The experiment was conducted under laboratory conditions at two temperatures regimes (22 i 14 °C) and four different nematode concentrations of Croatian strain *Steinernema feltiae* ISO18 (0, 100, 300 i 700 nematodes per insect). Mortality of larvae at 22 °C was in average more than 80%, and more than 70% at temperature of 14 °C, respectively. The highest mortality of adults was 13,33%, and it was achieved in treatment with 300 nematodes per insect at 22 °C. Statistically significant differences are observed between the larval and adult stages. *S. feltiae* ISO18 proved satisfactory insecticidal properties against larval stage at 14 °C. Adult *T. castaneum* are very resistant to entomopathogenic nematodes *S. feltiae* ISO18.

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek**Mentor:** izv.prof.dr.sc. Ivana Majić**Number of pages:** 35**Number of figures:** 20**Number of tables:** 8**Number of references:** 24**Number of appendices:** 3**Original in:** Croatian**Key words:** *Steinernema feltiae*, *Tribolium castaneum*, mortality, biopesticide, entomopatogenic nematodes**Thesis defended on date:** 17.04.2019.**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, University of Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek