

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Alenka Tambolaš, univ. bacc. ing. agr.

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo smjer Zaštita bilja

**UTJECAJ TEMPERATURE NA BIOLOŠKE OSOBINE HRVATSKIH SOJEVA
ENTOMOPATOGENIH NEMATODA *STEINERNEMA FELTIAE***

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Alenka Tambolaš, univ. bacc. ing. agr.

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo smjer Zaštita bilja

**UTJECAJ TEMPERATURE NA BIOLOŠKE OSOBINE HRVATSKIH SOJEVA
ENTOMOPATOGENIH NEMATODA *STEINERNEMA FELTIAE***

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof.dr.sc. Emilija Raspudić, predsjednik
2. izv.prof.dr.sc. Ivana Majić, mentor
3. izv.prof.dr.sc. Anita Liška, član

Osijek, 2019.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE.....	2
2.1. Razvojni ciklus entomopatogenih nematoda	3
2.2. Značaj entomopatogenih nematoda u poljoprivrednoj proizvodnji.....	4
2.3. Utjecaj biotskih i abiotskih čimbenika na entomopatogene nematode.....	7
2.4. Utjecaj temperature na entomopatogene nematode	7
2.5. Kestenjasti brašnar (<i>Tribolium castaneum</i> Herbst.)	10
3. MATERIJAL I METODE	11
4. REZULTATI.....	15
5. RASPRAVA	21
6. ZAKLJUČAK	24
7. POPIS LITERATURE	25
8. SAŽETAK	28
9. SUMMARY	29
PRILOZI.....	
POPIS TABLICA	
POPIS SLIKA	
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Naziv nematoda potječe od grčkih riječi *nematos* (konac, nit) i *eidos* (slično). Prva saznanja o nematodama datiraju još iz 17. stoljeća kada su u kukcima pronađeni „dugački crvi“ (Poinar, 1975.), ali istraživanja na tu temu počela su tek od 1929. godine. Nematode nastanjuju mnoge ekosustave, mogu parazitirati biljke, životinje, ali i ljude (Lacey i Georgis, 2012.).

Sistematski se klasificiraju u razred Nematoda, odnosno oblići. Nematode imaju bilateralno simetričan oblik tijela, koje nije segmentirano, bijele je do svijetložute boje. Tijelo nematoda može biti različitog oblika (okruglo, končasto, vretenasto, limunasto, cilindrično, kruškoliko). Nematode su jednostavni organizmi mikroskopskih veličina, te se njihovo prisustvo u tlu može utvrditi uzimanjem uzoraka tla i pregledavanjem pod mikroskopom. Brojnost nematoda u tlu ovisi o više čimbenika kao što je način života nematoda, brzina i sposobnost razmnožavanja, način obrade tla, količina dostupne hrane za nematode, predkultura, temperatura tla i vlaga, godišnje doba, prozračnost tla, količina organske tvari u tlu, biljni pokrov, itd. (Ivezić, 2014.).

Nematode imaju sposobnost ukazati na negativne ili pozitivne događaje u tlu. Fitoparazitske ili biljno parazitske nematode su nematode koje su štetne za biljke. Takve nematode imaju razvijen usni ustroj u kojem je smješten stilet (bodlja) pomoću kojega nematoda probija epidermu biljke i hrani se sadržajem biljnih stanica. Stanište biljno parazitskih nematoda može biti tlo, a mogu živjeti na ili u korijenu biljke, stabljici, listu i plodovima. Razlikujemo cistolike nematode čije se tijelo ženke razvija u cistu okruglog oblika. U toj cisti jaja i ličinke mogu preživjeti duži niz godina ako su uvjeti za izlazak iz ciste i daljnji razvitak nematoda nepovoljni. U zaštićenim prostorima česta su pojava nematode korijenovih kvržica koje izazivaju hipertrofiju stanica korjena u vidu kvržica, te nematode smeđe pjegavosti korijena koje izazivaju smeđe nekrotične lezije na korijenu. U tlu su prisutne i druge trofičke grupe nematoda: omnivori, fungivori, bakterivori i predatori. Uz ove trofičke grupe, u tlu se nalaze i nematode koje su u asocijacijama s kukcima, tj. entomofilne ili entomopatogene (Majić i sur., 2019.). Cilj ovog rada je utvrditi utjecaj temperature kao stresnog čimbenika okoline na patogenost, virulentnost i reproduktivnu sposobnost entomopatogenih nematoda *Steinernema feltiae* hrvatskih sojeva ISO16 i ISO18 u laboratorijskim uvjetima.

2. PREGLED LITERATURE

Entomopatogene nematode se svrstavaju u tri najznačajnije porodice koje su letalne za kukce (Slika 1.). Nematode iz porodice Steinernematidae, Heterorhabditidae i Mermithidae su značajne u biološkom suzbijanju štetnih kukaca na biljkama. U komercijalnoj proizvodnji se danas koriste entomopatogene nematode *Steinernema carpocapse*, *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema kushidai*, *Steinernema riobrave*, *Steinernema scapterisci*, *Heterorhabditis indica* i *Heterorhabditis megidis* (Nježić, 2016.). Navedene vrste se koriste za suzbijanje ličinki pipa, muha, tripsa, gusjenica leptira, mušica, žilogriza, ličinki hrušta, sovice i mnogih drugih štetnika (Oštrec, 2001.).



Slika 1. Entomopatogene nematode *Heterorhabditis bacteriophora* izlaze iz tijela kukca

Izvor: <https://veterina.com.hr/?p=62649>

Entomopatogene nematode su vrlo jednostavni organizmi koji u sebi imaju simbiotske bakterije. Infektivne ličinke entomopatogenih nematoda aktivno prodiru kroz kutikulu ili otvore u tijelo štetnika, najčešće kroz njegove prirodne tjelesne otvore: usta, traheje ili anus, ali može se dogoditi da uđu pasivno, putem hrane. Nakon što je nematoda ušla u tijelo štetnika, izbacuje iz svog probavnog trakta simbiotske bakterije (*Xenorhabdus* i

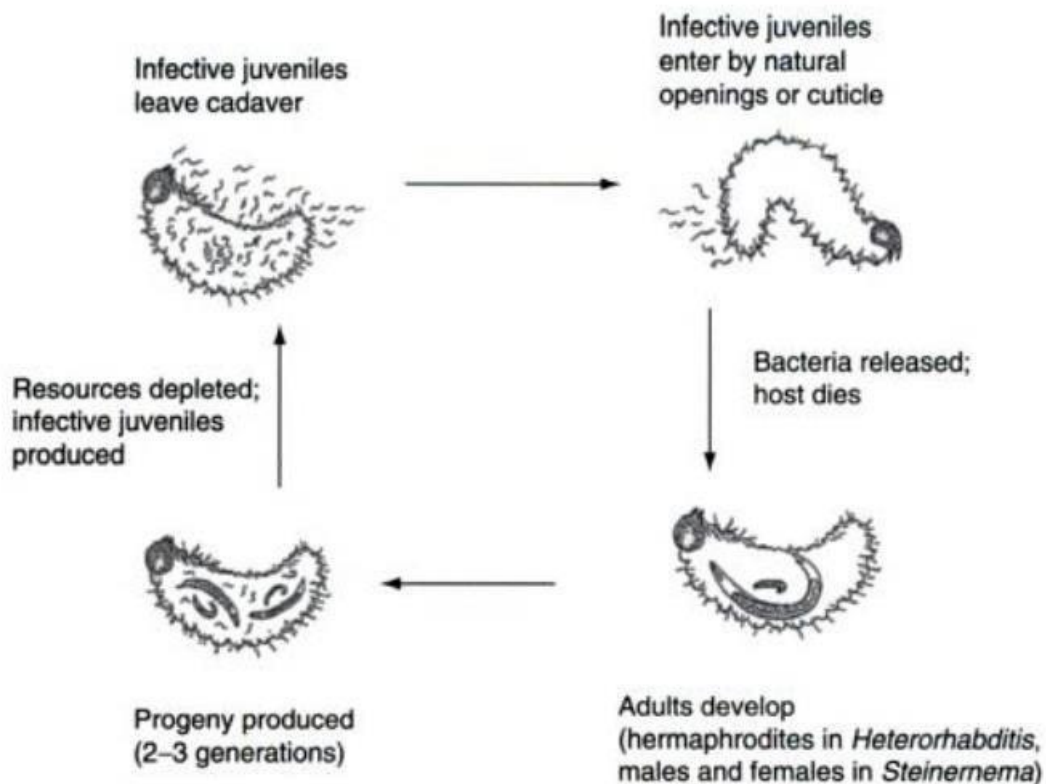
Photorhabdus) i vrlo brzo se razmnožavaju. Nematode pomoću tih bakterija razlažu domaćina i unutar njega stvaraju nove generacije, koje nakon što su uništile domaćina hraneći se njime, odlaze u tlo gdje će tražiti novog domaćina.

2.1. Razvojni ciklus entomopatogenih nematoda

Entomopatogene nematode iz porodice Heterorhabditidae i Steinernematidae su rasprostranjene na svim kontinentima i mogu živjeti u različitim tipovima tala. Infektivne ličinke entomopatogenih nematoda su ličinke trećeg stadija i one mogu u tlu preživjeti od nekoliko dana do nekoliko mjeseci. U tlu nematode traže uglavnom ličinke kukaca po osjećaju topline i ugljičnog dioksida kojeg otpuštaju. Nakon prodora infektivne ličinke u crijeva kukca, oslobađaju bakterije koje su same unijele u tijelo kukca. Unutar kukca se infektivne ličinke presvlače i prelaze u ličinke četvrtog stadija iz kojeg se razvijaju odrasli spolno zreli oblici prve generacije. Ženke prve generacije nakon kopulacije odlažu jaja u kojima se razvijaju ličinke prvog stadija, potom slijedi presvlačenje i razvoj ličinki drugog, trećeg i četvrtog stadija, te razvoj mužjaka i ženki druge generacije. Svi stadiji entomopatogenih nematoda se hrane hemolimfom i tkivima kukaca, ličinke kasnog drugog stadija prestaju s ishranom, unose bakterije u svoj probavni sustav, presvlače se i iz njih se razvijaju ličinke trećeg stadija (infektivne ličinke), koje potom napuste uginulog kukca i odlaze u tlo gdje traže novog domaćina, te se time zatvara razvojni ciklus entomopatogenih nematoda (Slika 2.).

Razvojni ciklus ulaska infektivnih ličinki u domaćina i njihov izlazak iz domaćina može biti različit, to ovisi o vrsti nematode i kukca domaćina, o ekološkim čimbenicima, posebno o temperaturi.

Većina entomopatogenih nematoda živi u simbiozi s bakterijama iz porodice Enterobacteriaceae. Bakterije se nalaze u prednjem dijelu probavnog sustava kod nematoda, ali i u tjelesnim šupljinama kukaca. Svrha simbiotskih bakterija je osiguravanje hrane entomopatogenim nematodama tijekom njihovog razvoja unutar kukca, ali najznačajnija je proizvodnja toksina pomoću kojih ubijaju kukca 24 ili 48 sati nakon parazitiranja. Ako nematoda napadne bez prisutnosti bakterija smrt domaćina nastupi tek za nekoliko dana ili tjedana (Oštrec, 2001).



Slika 2. Životni ciklus entomopatogenih nematoda

Izvor: <https://www.researchgate.net>

2.2. Značaj entomopatogenih nematoda u poljoprivrednoj proizvodnji

Kako bi se kvalitetno upravljalo tlom važno je poznavanje organizama koji se nalaze u tlu, koji nam mogu biti pokazatelj događanja u tlu, a posebice nam mogu ukazati na dostupnost hraniva i ekološku zagađenost tla. Prisutnost nematoda u tlu može biti pokazatelj u kakvom je tlo stanju. Ekološki značaj nematoda je u njihovoj brojnosti i pripadnosti određenoj trofičkoj grupi. Trofička klasifikacija slobodno živućih nematoda u tlu sastoji se najčešće od šest grupa: biljno parazitske nematode, bakterivore, fungivore, omnivore, predatori. Također, nematode su svrstane, prema Bongers (1990.), na kolonizere (c) i perzistere (p) koji su rangirani na skali od 1-5, a ukazuju na uznemirenost tla. Kolonizerima se smatraju organizmi koji se lako prilagođavaju uznemirenim i obogaćenim sredinama, njihova prisutnost ukazuje na raspoloživost resursa u tlu. Perzisteri su nematode čija prisutnost u određenim sredinama upućuje na stabilne ekosustave. Na brojnost nematoda u tlu, na njihovu pojavu u određenoj trofičkoj grupi i nizu čimbenika može utjecati različit način

poljoprivredne proizvodnje, pa tako njihovu brojnost i određene trofičke grupe na nekom području mogu objasniti dodaci organskih ili mineralnih gnojiva u poljoprivrednoj proizvodnji, različita obrada tla, kalcizacija, drenaža i mnogi drugi čimbenici (Benković-Lačić i sur., 2013.).

Funkcija korisnih nematoda u tlu je razlaganje organske tvari, poput ostataka životinja i biljnog tkiva. Bakterivore i fungivore mogu doprinijeti održavanju potrebne količine dušika potrebnog biljkama.

Na temelju mnogih laboratorijskih i poljskih pokusa dokazano je da entomopatogene nematode imaju visoki učinak u suzbijanju štetnih kukaca. Da bi suzbijanje štetnih kukaca bilo uspješno, potrebno je osigurati veliku populaciju nematoda. Nematode su se pokazale učinkovitima u suzbijanju japanskog pivca (*Popillia japonica*), ličinki i kukuljica nekih vrsta pipa (Curculionidae), ličinki kupusne muhe (*Delia radicum*), ličinki sovice i mnogih drugih. Da bi se učinkovito suzbili zemljišni kukci potrebno je primijeniti više milijuna entomopatogenih nematoda po jutru zemlje, odnosno 250 000 m⁻² (Gaugler, 1992.).

Danas se entomopatogene nematode masovno proizvode u laboratorijima zbog nedovoljne populacije u prirodnim staništima (biljka, tlo, voda i kukci). Entomopatogene nematode se mogu uzgajati *in vivo*, odnosno u domaćinima ili *in vitro*, na krutoj ili tekućoj podlozi. Uzgojene nematode se isporučuju u plastičnim vrećicama ili u posudicama na vlažnoj spužvi, pijesku ili piljevini gdje se drže na temperaturi od 5 °C.

Zbog smanjene prirodne populacije nematoda u tlima raznim nepravilnim gospodarenjem, nematode se apliciraju u tlo. Primjena entomopatogenih nematoda se vrši putem standardnih mehanizacijskih priključaka koji se koriste i za aplikaciju kemijskih sredstava, također mogu se aplicirati i pomoću sustava za navodnjavanje ili se apliciraju običnim zalijevanjem. Ovisno o kulturi i štetniku koji obitava u nasadu, primjenjuje se ciljana aplikacija. Treba voditi računa o miješanju, tipu mlaznica, pritisku i temperaturi. Zbog specifične gustoće tijela nematoda koja iznosi 1,05 g cm⁻³ one se talože na dno pa je zbog toga potrebno osigurati stalno miješanje. Temperatura vode i mlaznica ne smije biti veća od 30 °C, a kod aplikacije nematoda u tlo važno je osigurati dovoljnu vlagu u tlu, obzirom da su nematode vodeni organizmi, čime se pospješuje njihovo djelovanje i aktivnost (Nježić, 2016.). Da bi entomopatogene nematode bile učinkovite mora se zadovoljiti nekoliko uvjeta, a to su gustoća populacije nematoda i procjena populacije domaćina, patogenost nematoda, reprodukcijaska sposobnost i razvojni stadiji nematoda i njihovih domaćina, te optimalni

ekološki čimbenici. Entomopatogene nematode mogu se aplicirati u tlo zajedno s nekim vrstama kemijskih pripravaka kako bi pospješile suzbijanje štetnika. U toj prvoj fazi, neposredno nakon primjene, javljaju se najveći gubici, od 40-80%. Čimbenici koji uzrokuju te gubitke mogu biti različiti, a najvažnijih su ultraljubičasto zračenje i dehidracija. Preostale preživjele nematode se prilagođavaju uvjetima u tlu, ali se njihov broj postupno smanjuje za 5-10 % dnevno. U većini slučajeva, nakon 2-6 tjedana od primjene ostane živo 1 % entomopatogenih nematoda. U tom postotku entomopatogene nematode mogu ostati nekoliko godina aktivne, zahvaljujući obnavljanju populacije u domaćinu (Smits, 2010.).

Kukce zaražene nematodama u tlu je teško pronaći i izdvojiti, jer pomoću simbiotskih bakterija nakon hranjenja razlože leš kukca.

Temeljem dugogodišnjih istraživanja i promatranja nematoda, dokazano je da nematode nemaju štetan utjecaj na ljude koji se bave proizvodnjom ili aplikacijom nematoda, te nisu štetne za ekosustav. Nematode nemaju negativan utjecaj na neciljane organizme u okolini. Unesene nematode mogu privremeno potisnuti populaciju autohtonih nematoda zbog kompeticije za domaćina (Nježić, 2016.).

Dokazane su neke od prednosti primjene entomopatogenih nematoda u odnosu na kemijska sredstva:

- Djelovanje im je brzo i učinkovito kroz duže vremensko razdoblje (sposobnost razmnožavanja i samoobnavljanja);
- Visok potencijal razmnožavanja;
- Nemaju nikakvu štetnost za okoliš ni za druge žive organizme;
- Nema opasnosti od rezidua;
- Jednostavna primjena;
- Vrijeme od primjene do sjetve/sadnje nije uvjetovano;
- Mogu se primjenjivati s mnogim kemijskim pripravcima.

2.3. Utjecaj biotskih i abiotskih čimbenika na entomopatogene nematode

Mnoga istraživanja nematofaune u posljednjih 20 godina dokazala su sposobnost prilagodbe nematoda na promjene ekoloških procesa u tlu, uslijed različitog načina poljoprivredne proizvodnje.

Na brojnost nematoda mogu utjecati abiotski i biotski čimbenici. Abiotski čimbenici u vidu erozije tla, ispiranja tla, te suša mogu drastično smanjiti populaciju nematoda u tlu na nekom području, dok biotski čimbenici kao što su antropogenizacija pojedinih područja i primjena raznih kemijskih sredstava uništavajući štetnika, uništava i populaciju nematoda koje ostaju bez glavnog izvora hrane i na koje kemijska sredstva također mogu djelovati negativno (Ivezić, 2014.). Nematode su vodena bića čija su staništa ekosustavi s određenom vlagom, zato pri nedostatku vlage one doživljavaju stres i prestaju biti aktivne (Ivezić, 2008.).

2.4. Utjecaj temperature na entomopatogene nematode

Na brojnost nematoda u tlu mogu utjecati razni čimbenici, a jedni od najvažnijih su vlaga i temperatura tla.

Temperatura ima značajan utjecaj na sve aspekte biologije nematoda, utječe na njihov razvoj, disanje, preživljavanje, sposobnost kretanja i rasprostranjenost, pronalazak domaćina i infektivnost. Kod laboratorijskog načina uzgoja nematoda pokušava se prilagoditi nematode na oscilacije viših i nižih temperatura prije aplikacije u tlo. Prvo se determiniraju autohtone vrste koje su prilagođene uvjetima u tlu, zatim slijedi selektivni uzgoj i optimizacija uvjeta prije primjene (Griffin, 1993.).

Grant i Villani (2003.) su proveli laboratorijsko istraživanje kojem je cilj bilo utvrditi virulentnost nekoliko vrsta entomopatogenih nematoda u tlima s različitim sadržajem vlage i temperature. Istraživanja su obuhvatila entomopatogene nematode: *H. bacteriophora*, *S. glaseri*, *S. feltiae* i *S. carpocapse*. Nematode su bile aplicirane u pjeskovito ilovastim tlima koja su sadržavala vlažnost ispod točke uvenuća biljaka, te gotovo do potpune saturacije tla vlagom. Istraživanje je pokazalo da virulentnost entomopatogenih nematoda raste s povećanjem vlage u tlu, smrtnost kukaca je bila veća povećanjem vlage u tlu, dok utjecaj temperature nije bio od velikog značaja u slučaju niske vlažnosti tla.

U uvjetima nižih temperatura, smrtnost kukaca bila je veća od tretmana na višim temperaturama tla. Niska temperatura je abiotički faktor koji najčešće izaziva smanjenje aktivnosti metabolizma ili pokretljivost kod nematoda. Uočeno je da otpornost entomopatogenih nematoda na visoke i niske temperature mogu biti posljedica genetskih promjena, kao rezultat umjetne selekcije ili procesa toplinske prilagodljivosti izazvane okolišnim čimbenicima. Važno je prilikom apliciranja infektivnih ličinki entomopatogenih nematoda u tlo zaštititi ih od ekstremnih vrućina, jer je važno da tolerancija na visoke temperature ne ograničava njihovu sposobnost u suzbijanju štetnih organizama u usjevima.

S druge strane, istraživanja Hazir i sur. (2001.) pokazala su da se entomopatogene nematode mogu razvijati i razmnožavati u temperaturnom rasponu od 8 do 25 °C u ličinkama voskovog moljca koje su bile parazitirane entomopatogenim nematodama *Steinernema feltiae* porijeklom iz pet geografskih različitih regija. Na temperaturi od 15 °C zabilježeni je najveći razvoj infektivnih ličinki entomopatogenih nematoda. Temperatura od 28 °C značila je prestanak razmnožavanja.

Steinernema feltiae je vrsta koja je najčešće izolirana iz hladnijih predjela. Prvotno je izolirana iz tla na jugu Francuske, te je optimalna temperatura za njeno razmnožavanje 18,5 °C (Grewal i sur., 1996.).

Istraživanje provedeno na kupusnoj muhi (*Delia radicum*) pokazalo je da je smrtnost tog štetnika bila značajna uz prisutnost entomopatogenih nematoda, pokus se provodio na različitim temperaturama od 10, 15 i 20 °C. Za sve vrste entomopatogenih nematoda dokazano je da je smrtnost kupusne muhe na temperaturi od 20 °C bila veća nego na 15 i 10 °C. *S. feltiae* je bila jedina vrsta entomopatogenih nematoda koja se pokazala jednako učinkovitom na sve tri temperature, jednako nakon dva i četiri dana nakon parazitiranja kupusne muhe. Za razliku od *S. feltiae*, dva dana nakon parazitiranja kupusne muhe infektivne ličinke *S. arenarium*, *S. carpocapse* i *H. megidis* bile su sposobne ubiti ličinke kupusne muhe na 15 °C i 20 °C, a *H. bacteriophora* bila je sposobna ubiti kupusnu muhu samo na 20 °C. Na svim temperaturama *S. feltiae* se pokazala najvirulentnijom, dok se *H. bacteriophora* pokazala kao najmanje virulentna. Također je dokazano da je temperatura utjecala i na pokretljivost nematoda svih vrsta. Pokretljivost nematoda je bila smanjena na niskim temperaturama. Na pokretljivost nematoda je utjecala i prisutnost domaćina kod *S. feltiae*, *S. arenarium* i *H. megidis*, dok kod *S. carpocapsae* nije bilo značajnijeg utjecaja, kao ni kod *H. bacteriophora*. S obzirom da se kupusna muha javlja u rano proljeće, kada je prosječna temperatura tla 10

°C, važna je prilagodljivost entomopatogenih nematoda na niske temperature kako bi bile što učinkovitije u suzbijanju kupusne muhe, kao i ostalih štetnika koji se javljaju u prvom dijelu godine kada su temperature tla niske (Chen i sur., 2003.).

Grewal i sur. (1996.) su dokazali učinkovito djelovanje entomopatogenih nematoda *S. feltiae* na niskim temperaturama. Oni su selekcijom nekoliko generacija dokazali da se *S. feltiae* prilagođava uvjetima u kojima se dugotrajno nalazi. Dokazali su da je patogenost *S. feltiae* dobra na niskim temperaturama, te je smrtnost ličinki uzrokovana *S. feltiae* bila veća od onih koje su prouzročile prethodne generacije na 8 °C, također je utvrđeno da je vrijeme smrtnosti ličinki kraće na 10 °C, u odnosu na prethodne generacije. Takozvana „hladna selekcija“ je poboljšala utvrđivanje temperaturnih razmjera na koje se tijekom selekcije prilagođavaju ličinke *S. feltiae*. Rezultati su pokazali da selekcija nematoda utječe na njihovu sposobnost prilagodbe razmnožavanja na različitim rasponima temperatura.

Kung i sur. (1990.) su ispitali sposobnost preživljavanja entomopatogenih nematoda *S. carpocapsae* i *S. glaseri*. Istraživanje je provedeno na četiri različite temperature tla od 5, 15, 25 i 30 °C u trajanju od 96 dana. Pokusom je dokazano da *S. carpocapsae* preživljava značajno bolje na nižim temperaturama od 5, 15 i 25 °C, nego na temperaturi od 35 °C. Optimalna temperatura za preživljavanje je bila 25 °C, zatim 15 °C, 5 °C, a najmanja na 35 °C. Dok je s druge strane preživljavanje entomopatogenih nematoda *S. glaseri* bilo znatno veće na visokim temperaturama od 15, 25 i 35 °C, nego na temperaturi od 5 °C. Za *S. glaseri* najpovoljnija temperatura za preživljavanje je bila 25 °C, potom 35 °C, 15 °C i najmanje na 5 °C.

2.5. Kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum* Herbst.)

Kestenjasti brašnar pripada porodici Tenebrionidae (mračnjaci), te je jedan od najraširenijih skladišnih štetnika među žitaricama, uljaricama, leguminozama i sušenom voću. Najčešće je svrstan u grupu sekundarnih štetnika žitarica, ne oštećuje zdravo zrno. Može biti i primarni štetnik samo u uvjetima kada je zrno vlažno, jer se tada može hraniti njime.

Tijelo odraslog oblika je dužine od 3-4 mm, spljošteno i crvene do tamnosmeđe boje (Slika 3). Ličinke kestenjastog brašnara duge su 6-7 mm i žućkaste su boje. Imago može preživjeti i do dvije godine (Slika 4), a ženka može imati veliku sposobnost reprodukcije. Kestenjasti brašnar ima dvije generacije godišnje.



Slika 3. Imago kestenjastog brašnara



Slika 4. Ličinke kestenjastog brašnara

Izvor: <https://bib.irb.hr>

(Foto: Tambolaš, A., 2019.)

Kod viših temperatura bolje se razmnožava i ima veći broj generacija, što znači da spada u termofilne kukce. Optimalni uvjeti za razvoj i razmnožavanje su temperatura zraka od 32,5 °C, te relativna vlažnost zraka 70 %. Ženka tijekom svog životnog vijeka može odložiti 300-900 jaja, u prosjeku ženka odlaže 11 jaja dnevno (Ivezić, 2008.).

3. MATERIJAL I METODE

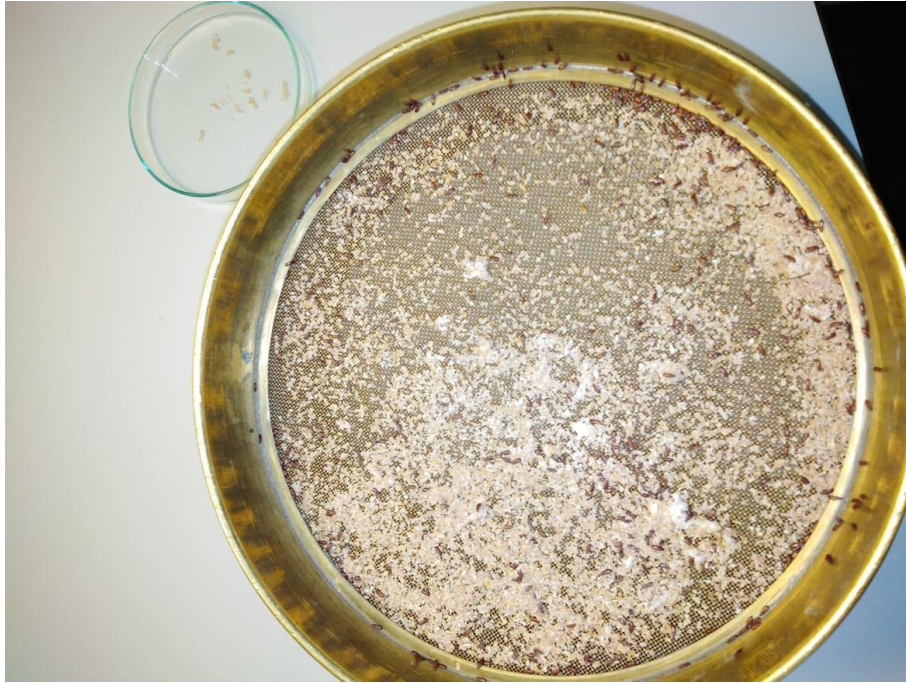
Pokus u trajanju od 10 dana postavljen je u Laboratoriju za entomologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Promatrao se utjecaj temperature na patogenost entomopatogenih nematoda *S. feltiae*, koje su aplicirane na ličinke kestenjastog brašnara (*T. castaneum*). Pokus je proveden u svibnju 2019. godine.

Za pokus su se koristile ličinke trećeg stadija, odnosno infektivne ličinke entomopatogenih nematoda *S. feltiae*, hrvatski sojevi ISO 16 i ISO 18. Ličinke *S. feltiae* uzgajaju se u laboratoriju na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek na ličinkama voskovog moljca prema Majić i sur. (2019.), a do korištenja su čuvane u pufernoj otopini (M9), te se skladište u hladnjaku na temperaturi od 4 °C.

Prije postavljanja pokusa nematode iz posudice za uzgoj stavljene su u Falcon tubicu od 15 mL i pomoću centrifuge odstranili višak vode, jer su nematode zbog sile gravitacije pale na dno tubice.

Automatskom pipetom uzeli smo 20 µL otopine u kojoj su se nalazile nematode, te smo potom odredili koncentraciju nematoda kojima smo tretirali ličinke kestenjastog brašnara. Na predmetno stakalce stave se tri kapljice u kojima se nalazile nematode, te ih u svakoj kapljici prebrojali. Potom je izračunat prosjek nematoda u kapljicama i preračunata potrebna koncentracija nematoda za pokus.

Za postavljanje pokusa bilo je potrebno 24 plastične Petrijeve zdjelice, promjera 3 cm. U Petrijeve zdjelice se stavljao filter papir iste veličine. U svaku Petrijevu zdjelicu dodalo se 10 ličinki kestenjastog brašnara koji su prethodno pomoću sita bili izdvojeni iz brašna (Slika 5), a koji se uzgajaju u Laboratoriju za skladištenje poljoprivrednih proizvoda, Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek.



Slika 4. Izdvajanje ličinki kestenjastog brašnara

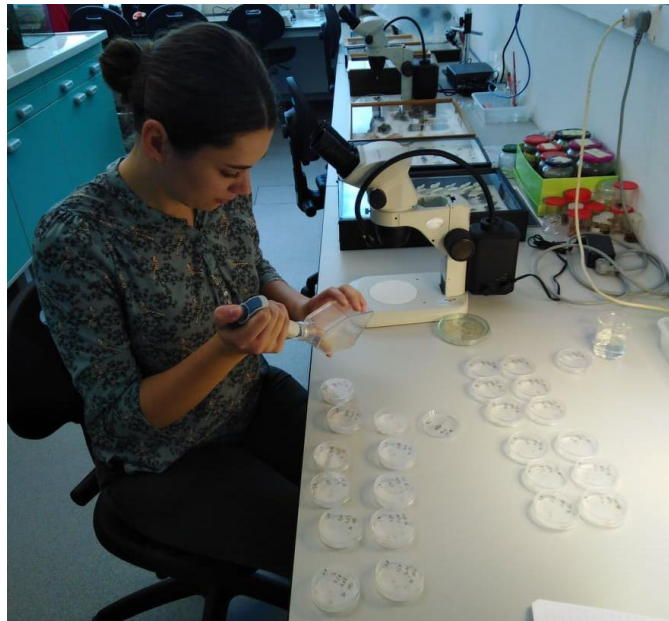
(Foto: Tambolaš, A., 2019.)

Pokus je proveden na temperaturama od 10 °C i 27 °C, te relativnoj vlažnosti zraka od 80%, jednako za soj ISO 16 i ISO 18. Za kontrolu temperature koristile su se klimastat komore, jedna u Laboratoriju za entomologiju, a druga u Laboratoriju za fitopatologiju, Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek.

U svaku Petrijevu zdjelicu dodano je na filter papir 450 μL vode, te 50 μL otopine u kojoj su bile nematode (Slika 6). U kontrolnom tretmanu dodana je jednaka količina vode (500 μL), ali bez prisutstva nematoda. U svaku Petrijevu zdjelicu dodano je po 10 ličinki kestenjastog brašnara. Sve Petrijeve zdjelice bile su poslagane u kartonske kutije da bi se stvorio efekt mraka koji bolje odgovara nematodama. Petrijeve zdjelice koje su išle u klimastat komore na 27 °C bile zatvorene parafilmom da ne bi došlo do pretjeranog isparavanja vode.

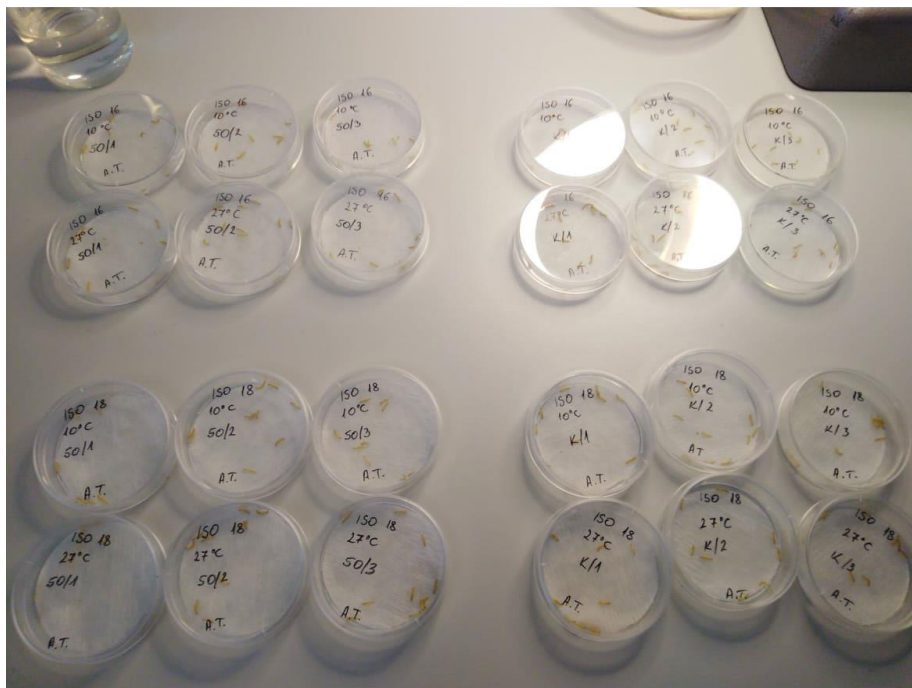
Pokus je postavljen u tri ponavljanja za svaki tretman na obje temperature (Slika 7).

Vrlo važan čimbenik pokusa bio je dodavanje vode, tj. svaki drugi dan nakon postavljanja pokusa, dodavala se jednaka količina vode (100 μL). Razlog dodavanja vode je taj što je nematodama oko tijela nužan film vode kako bi preživjele i kretale se.



Slika 5. Tretiranje s nematodama

(Foto: Tambolaš, A., 2019.)



Slika 6. Postavljen pokus

(Foto: Tambolaš, A., 2019.)

Svaki drugi dan praćen je utjecaj temperature na patogenost nematoda, na način da je očitana mortalitet ličinki kestenjastog brašnara. Uginule ličinke izdvajane su na *White-ove* zamke (orig. *White trap*) (White, 1927).

White-ove zamke smo napravili pomoću staklene Petrijeve zdjelice u koju smo stavili poklopac manje staklene Petrijeve zdjelice. Na okrenutu manju Petrijevu zdjelicu stavili smo izrezani filter papir koji je bio dovoljno velik da dodiruje dno velike Petrijeve zdjelice u koju smo dodali malo vode, u tolikoj količini da prekrije dno veće Petrijeve zdjelice. Na filter papir smo stavljali uginule ličinke, pritom smo dobro morali voditi računa da se ne miješaju ličinke koje su zaražene nematodama soja ISO 16 s nematodama soja ISO 18, zato što se mogu međusobno pariti. Nakon 10 dana pod mikroskopom su se jasno mogle vidjeti nove infektivne ličinke nematoda koje su napustile ličinke kestenjastog brašnara jer se više nisu imale čime hraniti, te su se spustile na dno velike Petrijeve zdjelice.



Slika 7. Postavljanje uginulih ličinki kestenjastog brašnara na White-ovu zamku

(Foto: Tambolaš, A., 2019.)

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

4. REZULTATI

U tablici 1 prikazana je analiza rezultata mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara. Prema rezultatima GLM analize vidljivo je da nema statistički značajnog učinka kod temperature kao pojedinačnog faktora, te interakcije temperature i koncentracije, dok je utvrđena značajnost rezultata na razini od 99 % kod koncentracije nematoda koje su bile patogene za ličinke kestenjastog brašnara.

Tablica 1. GLM analiza mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara

	Dan nakon postavljanja pokusa				Ukupno
	2.	5.	7.	9.	
Koncentracija	***	n.s	n.s	n.s.	**
Temperatura	**	n.s	n.s	n.s	n.s
Koncentracija*Temperatura	n.s	*	n.s	n.s	n.s

*značajnost na razini 95% vjerojatnosti (P<0,05)

**značajnost na razini 99% vjerojatnosti (P<0,01)

***značajnost na razini 99,99% vjerojatnosti (P<0,001)

U tablici 2 prikazani su rezultati mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara u pokusu koji je proveden na kontroliranoj temperaturi pri 10 °C. Iz analize nisu utvrđene statistički značajne razlike na temperaturi od 10 °C, osim drugog dana od postavljanja pokusa kada je utvrđena razlika uginulih ličinki kod koncentracije od 50 nematoda po ličinki u odnosu na kontrolu .

Tablica 2. Srednje vrijednosti mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara pri temperaturi od 10 °C u tretmanu sa *Steinernema feltiae*

Koncentracija nematoda	Dan nakon tretmana			
	2.	5.	7.	9.
0	11,67 a	11,67 a	10,00 a	10,00aa
50	36,67 b	46,67 a	6,67 a	5,00 a

Vrijednosti u stupcu označene različitim slovima statistički značajno se razlikuju (Tukey, P<0,05).

U tablici 3 prikazani su rezultati utjecaja entomopatogenih nematoda na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara u kontroliranim uvjetima pri temperaturi od 27 °C. Analizom je utvrđeno da se rezultati drugog dana od tretiranja ličinki nematodama razlikuju. Značajna razlika u mortalitetu ličinki kestenjastog brašnara utvrđena je već drugi dan u koncentraciji od 50 nematoda po kukcu, u odnosu na kontrolu u kojoj nije bilo nematoda. Peti, sedmi i deveti dan analizom nisu utvrđene značajnije razlike u mortalitetu ličinki kestenjastog brašnara.

Tablica 3. Srednje vrijednosti mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara pri temperaturi od 27 °C ukupno za oba soja *Steinernema feltiae*

Koncentracija nematoda	Dan nakon tretmana			
	2	5	7	9
0	23,33 a	30,00 a	6,67 a	10,00 a
50	75,00 b	16,67 a	5,00 a	3,33 a

Vrijednosti u stupcu označene različitim slovima slovima statistički značajno se razlikuju (Tukey, $P < 0,05$).

U tablici 4 prikazani su ukupni rezultati utjecaja temperature na patogenost *S. feltiae* na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara. Analizom je utvrđeno da je kod temperature od 10 °C utvrđena statistički značajna razlike između mortaliteta ličinki koje su tretirane nematodama u koncentraciji od 50 jedinki po ličinki kestenjastog brašnara u odnosu na mortalitet ličinki kestenjastog brašnara koje nisu bile tretirane nematodama, odnosno kontrola.

Tablica 4. Utjecaj temperature okoline na patogenost ukupno za oba soja *Steinernema feltiae* i mortalitet (%) ličinki kestenjastog brašnara

Temperatura (°C)	Koncentracija nematoda	
	0	50
10	43,33 aA	95,00 bB
27	70,00 aA	75,00 bB

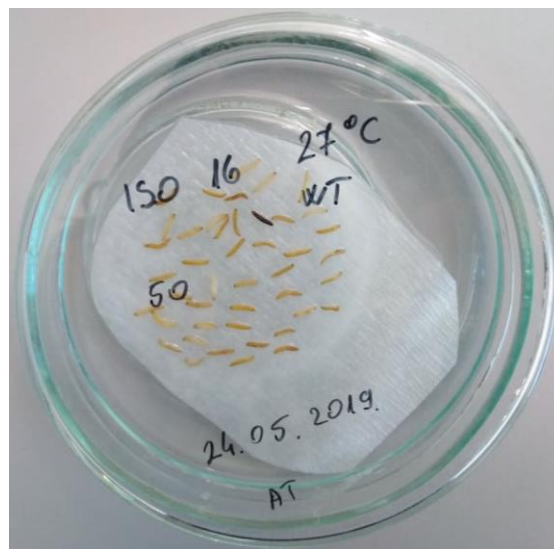
Vrijednosti u redu označene različitim malim slovima statistički značajno se razlikuju (Tukey, $P < 0,05$).

Vrijednosti u stupcu označene različitim velikim slovima statistički značajno se razlikuju (Tukey, $P < 0,05$).

Isto tako, statistički značajne razlike su utvrđene u rezultatu kod temperature od 27 °C gdje se pokazalo da je veća stopa mortaliteta bila kod onih ličinki kestenjastog brašnara koje su bile tretirane nematodama, u odnosu na kontrolni tretman.

Hrvatski sojevi entomopatogenih nematoda *S. feltiae* bolje su prilagođeni nižim temperaturama. Iako nisu utvrđene statistički značajne razlike, pri 10 °C razlika između kontrole i tretmana s nematoda je bila u gotovo 50% većem mortalitetu ličinki kestenjastog brašnara. Dok je pri 27 °C razlika bila statistički značajna, ali tek 5 % je utvrđena razlika u mortalitetu. U kontrolnom tretmanu je utvrđen visok prirodni mortalitet ličinki kestenjastog brašnara pri višim temperaturama. Ovaj rezultat nije očekivan, s obzirom da je poznato da je kestenjasti brašnar termofilna vrsta. Vjerojatno su se ličinke iz uzgoja lakše prilagodile na niže temperature u prisustvu vode, u odnosu na iste uvjete pri višim temperaturama.

Kod svakog očitavanja mortaliteta uginule ličinke su se izdvajale na *White-ove* zamke, odakle su izlazile nove generacije infektivnih ličinki entomopatogenih nematoda. Izlazak tih infektivnih ličinki entomopatogenih nematoda se povremeno pratio pomoću mikroskopa. Izdvojene nematode su prikupljene u laboratorijsku staklenu čašu ispiranjem *White-ove* zamke i Petrijeve zdjelice. Nakon završetka pokusa, 10. dan od postavljanja pokusa, pomoću mikroskopa utvrđena je velika brojnost infektivnih ličinki entomopatogenih nematoda, što potvrđuje da su entomopatogene nematode uzrok smrti ličinki kestenjastog brašnara (Slika 8).



Slika 8. Nematodama parazitirane ličinke kestenjastog brašnara
(Foto: Tambolaš, A., 2019.)

U tablici 5 prikazan je mortalitet ličinki kestenjastog brašnara u kontrolnom tretmanu, pri temperaturi od 27 °C i mortalitet kestenjastog brašnara koji je bio parazitiran entomopatogenim nematoda *S. feltiae*, hrvatski soj ISO 16, također pri temperaturi od 27 °C. Usporedbom kontrolnog tretmana s tretmanom u kojem su ličinke *T. castaneum* zaražene entomopatogenim nematodama *S. feltiae* vidljivo je da je prisutnost entomopatogenih nematoda povećala mortalitet ličinki kestenjastog brašnara, ali razlika između kontrolnog tretmana i tretmana s entomopatogenim nematodama *S. feltiae* nije statistički značajna.

Tablica 5. Srednja vrijednost mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara u tretmanima s entomopatogenim nematodama *Steinernema feltiae* ISO 16 na 27 °C

Dan nakon tretmana	Kontrola	<i>S. feltiae</i> ISO16 (50 IL / kukac)
2	40,00 a	76,67 b
5	36,66 a	13,33 a
7	10,00 a	3,33 a
9	0,00 a	6,67 a
UKUPNO	86,67 a	100,00 a

Vrijednosti u redu označene različitim slovima statistički značajno se razlikuju (Tukey, $P < 0,05$).

U tablici 6 prikazana je usporedba srednjih vrijednosti mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara bez prisutstva entomopatogenih nematoda *S. feltiae* pri temperaturi od 10 °C u tri ponavljanja s mortalitetom ličinki kestenjastog brašnara pri koncentraciji od 50 infektivnih ličinki po jednoj ličinki kestenjastog brašnara entomopatogene nematode *S. feltiae*, soj ISO 16. Usporedbom srednjih vrijednosti mortaliteta u kontrolnom tretmanu sa srednjim vrijednostima mortaliteta zaraženih ličinki kestenjastog brašnara sa *S. feltiae* vidljivo je da je ukupni mortalitet ličinki kestenjastog brašnara podjednako velik na temperaturi od 10 °C, te razlika mortaliteta u tretmanima nije statistički značajna.

Tablica 6. Srednja vrijednost mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara u tretmanima s entomopatogenim nematodama *Steinernema feltiae* ISO 16 na 10 °C

Dan nakon tretmana	Kontrola	<i>S. feltiae</i> ISO16 (50 IL / kukac)
2	23,33 a	33,33 a
5	23,33 a	43,33 a
7	20,00 a	10,00 a
9	16,67 a	6,67 a
UKUPNO	83,33 a	93,33 a

Vrijednosti u redu označene različitim slovima statistički značajno se razlikuju (Tukey, $P < 0,05$).

U tablici 7 prikazana je usporedba mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara bez prisutstva entomopatogenih nematoda *S. feltiae* pri temperaturi od 10 °C u tri ponavljanja s mortalitetom ličinki kestenjastog brašnara pri koncentraciji od 50 infektivnih ličinki entomopatogene nematode *S. feltiae* po jednoj ličinki kestenjastog brašnara. Usporedbom mortaliteta u kontrolnom tretmanu s mortalitetom ličinki kestenjastog brašnara zaraženih *S. feltiae* može se zaključiti da je mortalitet ličinki kestenjastog brašnara bio vrlo mali pri temperaturi od 10 °C u kontroli, za razliku od ličinki kestenjastog brašnara koje su bile parazitirane entomopatogenim nematodama *S. feltiae* soj ISO 18. Iz ove tablice je vidljivo da je došlo do statistički značajnih rezultata srednjih vrijednosti u mortalitetu kod tretmana s entomopatogenim nematodama u odnosu na kontrolu.

Tablica 7. Srednja vrijednost mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara u tretmanima s entomopatogenim nematodama *Steinernema feltiae* ISO 18 na 10 °C.

Dan nakon tretmana	Kontrola	<i>S. feltiae</i> ISO16 (50 IL / kukac)
2	0,00 a	40,00 b
5	0,00 a	50,00 b
7	0,00 a	3,33 a
9	3,33 a	3,33 a
UKUPNO	3,33 a	96,67 b

Vrijednosti u redu označene različitim slovima statistički značajno se razlikuju (Tukey, $P < 0,05$).

Tablica 8. Srednja vrijednost mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara u tretmanima s entomopatogenim nematodama *Steinernema feltiae* ISO 18 na 27 °C

Dan nakon tretmana	Kontrola	<i>S. feltiae</i> ISO16 (50 IL / kukac)
2	6,67 a	73,33 b
5	23,33 a	20,00 a
7	3,33 a	6,67 a
9	20,00 a	0,00 b
UKUPNO	53,33 a	100 b

Vrijednosti u redu označene različitim slovima statistički značajno se razlikuju (Tukey, $P < 0,05$).

U tablici 8 prikazana je usporedba mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara u kontrolnom tretmanu, bez prisutstva entomopatogenih nematoda *S. feltiae*, pri temperaturi od 27 °C u tri ponavljanja s mortalitetom ličinki kestenjastog brašnara pri koncentraciji od 50 infektivnih ličinki entomopatogene nematode *S. feltiae* po jednoj ličinki kestenjastog brašnara, također na temperaturi od 27 °C. Uspoređujući srednje vrijednosti mortaliteta u kontrolnom tretmanu i tretmanu s entomopatogenim nematodama *S. feltiae* soj ISO 18 može se zaključiti da je ukupni mortalitet ličinki kestenjastog brašnara manji pri temperaturi od 27 °C bez prisutstva entomopatogenih nematoda za razliku od ličinki kestenjastog brašnara koje su bile parazitirane entomopatogenim nematodama *S. feltiae* ISO18, gdje je ukupno uginulo svih 10 ličinki kestenjastog brašnara.

5. RASPRAVA

Kestenjasti brašnar se ubraja u sekundarne štetnike, premda se u povoljnim uvjetima ponaša kao primarni štetnik. Prisutnost ovog štetnika uzrokuje kvarenje uskladištenih žitarica te one poprimaju miris plijesni. Kestenjasti brašnar pri vlazi zrna od 12 % može prodrijeti u neoštećena zrna i tako pričinjavati štetu (Hamel, 1993.).

Mahroof i sur. 2003. su utvrdili utjecaj fizikalnih mjera suzbijanja kestenjastog brašnara, primjenom visokih temperatura od 40 do 60 °C na svim stadijima ovog štetnika. Pokusom su utvrdili da porastom temperature, smrtnost svih stadija kestenjastog brašnara se povećavala. Kod ličinki kestenjastog brašnara iznad 50 °C bila je dovoljna izloženost najmanje 7,2 h da bi se ubilo 99% ličinki, a za ostale stadije je u prosjeku bilo potrebno 1,8 h. U usporedbi s našim pokusom na ličinkama kestenjastog brašnara na 27 °C u kontrolnim uvjetima smrtnost 10. dan od postavljanja pokusa u prvom ponavljanju bila je 86,66 %. U tretmanima s entomopatogenim nematoda *S. feliae* soj ISO 16 na 27 °C, 10. dan nakon postavljanja pokusa mortalitet je bio 100 %. Kod entomopatogenih nematoda soj ISO 18 na 27 °C također je mortalitet bio 100 %, a u kontrolnim uvjetima 53,33 %.

Kramarz i sur. (2014.) proučavali su reakciju kestenjastog brašnara izloženog toksičnom bakru nakon što su ih parazitirale entomopatogene nematode *S. feltiae*. U pokusu su bile praćene neke osobine kukca kao što su disanje, rast, preživljavanje, hranjenje, te koncentracija bakra unutar tkiva kestenjastog brašnara. Samo u tretmanima s entomopatogenim nematodama *S. feltiae* utvrđene su značajne promjene u disanju kod kestenjastog brašnara. Disanje je bilo znatno otežano, te je pokusom dokazano da je preživljavanje bilo najniže kod kestenjastog brašnara zaraženog entomopatogenim nematodama, bez obzira na izloženost bakru.

Ramos-Rodriguez i sur. (2006.) su proveli istraživanje na skladišnim štetnicima s entomopatogenim nematodama. Za pokus su korištene ličinke, kukuljice i odrasli 6 vrsta štetnika (*Plodia interpunctella*, *Ephestia kuehinella*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tenebrio molitor*, *T. castaneum* i *Trogoderma variabile*), te imago dvije vrste *Sitophilus oryzae* i *Rhyzopertha dominica*. Istraživanjem je dokazano da je *S. riobrave* bila ili najviše patogena ili slične patogenosti kao i *S. carpocapsae*, te *S. feltiae*. Koncentracija od 10 infektivnih ličinki *Steinernema riobrave* uzrokovala je mortalitet od 80 % ili više kod ličinki *P. interpunctella*, *E. kuehniella*, *T. castaneum* i *O. surinamensis*, kukuljica *T. castaneum* i *T.*

molitor, te imaga *T. molitor*. Svi stadiji vrste *Trogoderma* imali su mortalitet od 70 % ili više, dok je imago *S. oryzae* i *R. dominica*, otporniji te je mortalitet bio 15% i 35%.

Zbog sve veće važnosti bioloških mjera suzbijanja štetnika, entomopatogene nematode se koriste sve više. Pa su brojna istraživanja pokazala na njihovu prilagodljivost raznim okolišnim uvjetima. Jedan od ključnih čimbenika za razvoj i razmnožavanje entomopatogenih nematoda je temperatura (Jagdale i Gordon, 1997.). Temperatura utječe na sposobnost pronalaska domaćina, patogenost, razvoj, razmnožavanje i preživljavanje. Niske temperature utječu na smanjenje enzimatske aktivnosti i pokretljivosti infektivnih ličinki entomopatogenih nematoda, te su im smanjene metaboličke sposobnosti (Chen i sur., 2003.). Jagdale i Gordon (1997.) proveli su istraživanje u trajanju od dvije godine na četiri izolata Steinernematidae. Ispitali su tolerantnost nematoda na temperaturama okoline od 25, 20, 15 i 10 °C. S porastom temperature rasla je i smrtnost infektivnih ličinki. *S. riobravis* je pokazala najveću smrtnost, dok je *S. feltiae* pokazala najmanju smrtnost, svi sojevi entomopatogenih nematoda *S. carpocapsae* su pokazali intermedijarni stupanj tolerancije na visoke temperature. Mjerenjem tolerancije entomopatogenih nematoda na smrzavanje, na temperaturi od -5 °C, utvrđen je mortalitet od 50% infektivnih ličinki nematoda. Infektivna sposobnost preživjelih ličinki entomopatogenih nematoda bila je 90%, u odnosu na kontrolu. Dva soja entomopatogenih nematoda *S. feltiae* pokazala su se najtolerantnijima na niske temperature, od svih ispitivanih izolata. Infektivne ličinke entomopatogenih nematoda imaju sposobnost oporavka u tlu od različitih klimatskih promjena na nekom području. One se mogu prilagoditi na dnevne ili sezonske promjene u temperaturama, na načina da se premjeste u dublje slojeve tla kako nepovoljne temperature ne bi ugrozile njihovu egzistenciju, ili se s vremenom aklimatiziraju na te promjene (Jagdale, 1997.). Kod ispitivanja entomopatogenih nematoda na niske temperature nije zabilježena smrtnost infektivnih ličinki ni u jednoj kontroli na 0 °C. To je dokaz da se netom sakupljene nematode mogu čuvati na temperaturi od 0 do 5 °C do 48 h uz neznatan gubitak (1 %) nematoda. Razmnožavanje *S. feltiae* na temperaturi od 10 °C nije se promijenilo, također, svi sojevi infektivnih ličinki *S. feltiae* su preživjeli na temperaturi od -5 °C kao i sojevi *S. carpocapsae*. Ovim istraživanjem Jagdale i Gordon (1997.) dokazali su da temperature mogu utjecati na razmnožavanje entomopatogenih nematoda, a takva prilagodljivost na temperaturne razlike ograničena je genetskim razlikama između izolata. U našem istraživanju je utvrđeno suprotno, ličinke *S. feltiae* hrvatskih sojeva ISO 16 i ISO 18 su patogenije pri temperaturi okoline od 10 °C u odnosu na 27 °C.

Prema Jagdale i Gordon (1997.) infektivne ličinke *S. feltiae* bolje su se prilagodile uvjetima u hladnijim klimatima, a kako bi se zadržao visok stupanj tolerancije na niske temperature i time poboljšala učinkovitost infektivnih ličinki na suzbijanje štetnika u usjevima treba ih čuvati i održavati na temperaturama od 10 do 15 °C ili niže. Naša istraživanja potvrđuju navedeno. Za razliku od *S. feltiae*, entomopatogene nematode *S. riobravis* i *S. carpocapsae* imaju veću toleranciju na visoke temperature (20-25 °C) te su učinkovitije u subtropskim i tropskim klimatima.

6. ZAKLJUČAK

Ovim laboratorijskim pokusom ispitan je utjecaj temperature na patogenost entomopatogenih nematoda *S. feltiae* kojima smo parazitirali ličinke skladišnog štetnika kestenjastog brašnara (*T. castaneum*).

Istraživanje je provedeno na dvije temperature od 10 °C i 27 °C. Pokusom je utvrđeno da temperatura ima utjecaj na patogenost *S. feltiae*, no nisu utvrđene statistički značajne razlike. Hrvatski sojevi entomopatogenih nematoda *S. feltiae* bolje su prilagođeni nižim temperaturama. Utvrđena je dobra prilagodljivost nematoda na promjenu temperature, te su podjednako učinkovite na nešto višim i nižim temperaturama.

Entomopatogene nematode *S. feltiae* su se pokazale vrlo dobre u suzbijanju skladišnog štetnika kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum*) pri temperaturi okoline od 10 °C, te bi u budućnosti primjena entomopatogenih nematoda kao biološkog sredstva bila jedan od alata kao integrirana metoda suzbijanja ovog štetnika

7. POPIS LITERATURE

1. Benković- Lačić, T., Brmež, M. (2013.): Nematode - bioindikator promjena u agroekosustavu. *Agronomski glasnik*, (1): 43-50.
2. Benković-Lačić, T., Brmež, M., Haramija, J. (2014.): Uloga nematoda u hranidbenom lancu tla i mineralizaciji hranjiva. *Agronomski glasnik*, (3): 137-149.
3. Chen, S., Li, J., Han, X., Moens, M. (2003): Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to *Delia radicum*. *BioControl* 48: 713-724.
4. Kramarz, E., Mordarska, P., Mroczka, A., M. (2014.): Response of *Tribolium castaneum* to elevated copper concentrations is influenced by history of metal exposure, sex-specific defences, and infection by the parasite *Steinernema feltiae*. *Ecotoxicology*, 23 (5): 757-766.
5. Grant, J. A., Villani, M.G. (2003.): Soil Moisture effects on entomopathogenic nematodes. *Environmental entomology*, 32 (1): 80-87.
6. Grewal, P., S., Gaugler, R., Wang, Y. (1996.): Enhanced cold tolerance of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* through genetic selection. *Ann. appl. Biol* (1996.). 129: 335-341.
7. Griffin, C.,T., (1993.): Temperature responses of entomopathogenic nematodes implications for the success of biological control programmes. U: Bedding R., Akhurst, R., Kaya, H. (ur.) *Nematodes and the biological control of insect pests*. CSIRO Publications, East Melbourne, Australia.
8. Hamel, D. (1993.): Problem skladišnih štetnika na uskladištenim sastojcima u tvornicama stočne hrane. *Krmiva*, 35 (1): 27-32.
9. Hazir, S., Stock, P. S., Kaya, H. K. , Koppenhofer, A., M., Keskin, N. (2001.): Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(4): 243-250.
10. Ivezić, M. (2008.): *Entomologija. Kukci i ostali štetnici u ratarstvu*. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 202.
11. Ivezić, M. (2014.): *Fitonematologija*. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 109.

12. Jagdale, G. B., Gordon, R. (1997.): Effects of propagation temperatures on temperature tolerances of entomopathogenic nematodes. *Fundam. Appl. Nematol.*, 21 (2): 177-183.
13. Kung, S.-P., Gaugler, R., Kaya, H. K. (1990): Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*. 57: 242-249.
14. Lacey, L. A., Georgis, R. (2012.): Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, 44, 218-225.
15. Mahroof, R., Subramanyam, B., E. Throne, J., Menon, A. (2003): Time-mortality relationships for *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) life stages exposed to elevated temperatures. *Journal of Economic Entomology*, 96 (4): 1345-1351.
16. Majić, I., Sarajlić, A., Lakatos, T., Tóth, Raspudić, E., Puškadija, Z., Kanižai Šarić, G., Laznik, Ž. (2019.): Virulence of new strain of *Heterorhabditis bacteriophora* from Croatia against *Lasioptera rubi*. *Plant Protection Science*, 55: 134-141.
17. Majić, I., Sarajlić, A., Lakatos, T., Tóth, T., Raspudić, E., Zebec, V., Kanižai Šarić, G., Laznik, Ž. (2018). First report of entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) from Croatia. *Helminthologia*, 55(3), 256-260.
18. Nježić, B. (2016.): Entomopatogene nematode u biološkoj zaštiti bilja. *Glasnik zaštite bilja* (4) 10-13.
19. Oštrec, Lj. (2001.): Biološko suzbijanje štetnih insekata entomopatogenim nematodama. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 66 (3): 179-185.
20. Poinar, O. G. (1975.): Description and biology of a new insect parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida, Heterorhabditidae n. fam.). *Nematologica*, 21(4), 463-470.
21. Ramos- Rodriguez, O., F. Campbell, J., B. Ramaswamy, S. (2006.): Pathogenicity of three species of entomopathogenic nematodes to some major stored- product insect pests. *Journal of Stored Products Research*, 42 (3): 241-252.
22. Smits, P. H. (2010.): Post- application persistence of entomopathogenic nematodes. *biocontrol science and technology*, 6 (3): 379-388
23. White, G. F. (1927.): A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, (66):302-303.

Jedinice s interneta:

1. <https://www.agroklub.com/eko-proizvodnja/entomopatogene-nematode-ekolosko-suzbijanje-zemljisnih-stetnika/42744/> (19. lipnja 2019.)

8. SAŽETAK

Cilj laboratorijskog istraživanja bio je utvrditi patogenost dvaju hrvatskih sojeva entomopatogenih nematoda *Steinernema feltiae*, soj ISO 16 i ISO 18 u suzbijanju ličinki kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum*). Kestenjasti brašnar je jedan od značajnih štetnika na uskladištenim proizvodima jer smanjuje njihovu vrijednost, oštećujući zrna. Pokus je postavljen u laboratorijskim uvjetima na temperaturama od 10 °C i 27 °C u koncentraciji od 50 nematoda po ličinki kestenjastog brašnara. Oba soja nematoda imala su slične rezultate. Utvrđena je zadovoljavajuća patogenost entomopatogenih nematoda *S. feltiae* od 95 % i 75 % mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara na temperaturama od 10 °C i 27 °C.

Ključne riječi: otpornost, patogenost, entomopatogene nematode, *Steinernema feltiae*, *Tribolium castaneum*, mortalitet

9. SUMMARY

The aim of the experiment was to determine the pathogenicity of the two strains of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* ISO 16 and ISO 18, in suppression of *Tribolium castaneum* larvae. *T. castaneum* is one of the most significant pests on stored products as it reduces their value by damaging the grain. The experiment was set up under laboratory conditions at temperatures of 10 and 27 °C, and 50 infective juvenile nematodes were applied per insect larvae. Both nematode strains proved similar result. Mortality of *T. castaneum* in range of 95 and 75% was observed at temperatures 10 and 27 °C, respectively was determined.

Key words: pathogenicity, tolerance, entomopathogenic nematodes, *Tribolium castaneum*, *Steinernema feltiae*, mortality

PRILOZI

POPIS TABLICA

Tablica 1. GLM analiza mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara, str. 15

Tablica 2. Srednje vrijednosti mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara pri temperaturi od 10 °C u tretmanu sa *Steinernema feltiae*, str. 15

Tablica 3. Srednje vrijednosti mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara pri temperaturi od 27 °C u tretmanu sa *Steinernema feltiae*, str. 16

Tablica 4. Utjecaj temp Utjecaj temperature okoline na patogenost ukupno za oba soja *Steinernema feltiae* i mortalitet (%) ličinki kestenjastog brašnara, str. 16

Tablica 5. Srednja vrijednost mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara u tretmanima s entomopatogenim nematodama *Steinernema feltiae* ISO 16 na 27 °C, str. 18

Tablica 6. Srednja vrijednost mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara u tretmanima s entomopatogenim nematodama *Steinernema feltiae* ISO 16 na 10 °C, str. 19.

Tablica 7. Srednja vrijednost mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara u tretmanima s entomopatogenim nematodama *Steinernema feltiae* ISO 18 na 10 °C, str. 20.

Tablica 8. Srednja vrijednost mortaliteta (%) ličinki kestenjastog brašnara u tretmanima s entomopatogenim nematodama *Steinernema feltiae* ISO 18 na 27 °C, str. 20.

POPIS SLIKA

Slika 1. Entomopatogene nematode <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> izlaze iz tijela kukca ..	2
Slika 2. Životni ciklus entomopatogenih nematoda	4
Slika 3. Imago kestenjastog brašnara	10
Slika 4. Izdvajanje ličinki kestenjastog brašnara	12
Slika 5. Tretiranje s nematodama	13
Slika 6. Postavljen pokus.....	13
Slika 7. Postavljanje uginulih ličinki kestenjastog brašnara na White-ovu zamku	14
Slika 8. Nematodama parazitirane ličinke kestenjastog brašnara.....	17

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

UTJECAJ TEMPERATURE NA BIOLOŠKE OSOBINE HRVATSKIH SOJEVA ENTOMOPATOGENIH NEMATODA *STEINERNEMA FELTIAE*

Alenka Tambolaš

Sažetak

Cilj laboratorijskog istraživanja bio je utvrditi patogenost dvaju hrvatskih sojeva entomopatogenih nematoda *Steinernema feltiae*, soj ISO 16 i ISO 18 u suzbijanju ličinki kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum*). Kestenjasti brašnar je jedan od značajnih štetnika na uskladištenim proizvodima jer smanjuje njihovu vrijednost, oštećujući zrna. Pokus je postavljen u laboratorijskim uvjetima na temperaturama od 10 °C i 27 °C u koncentraciji od 50 nematoda po ličinki kestenjastog brašnara. Oba soja nematoda imala su slične rezultate. Utvrđena je zadovoljavajuća patogenost entomopatogenih nematoda *S. feltiae* od 95 % i 75 % mortaliteta ličinki kestenjastog brašnara na temperaturama od 10 °C i 27 °C.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: izv.prof.dr.sc. Ivana Majić

Broj stranica: 30

Broj slika: 9

Broj tablica: 8

Broj literaturnih navoda: 25

Broj priloga: 2

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: otpornost, patogenost, entomopatogene nematode, *Steinernema feltiae*, *Tribolium castaneum*, mortalitet

Datum obrane: 30.9.2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof.dr.sc. Emilija Raspudić, predsjednik
2. izv.prof.dr.sc. Ivana Majić, mentor
3. izv.prof.dr. Anita Liška, član

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University Graduate Studies, Plant production, course Plant protection

Graduate thesis

EFFECT OF TEMPERATURE ON BIOLOGICAL TRAITS OF CROATIAN STRAINS OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES *STEINERNEMA FELTIAE*

Alenka Tambolaš

Summary

The aim of the experiment was to determine the pathogenicity of the two strains of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* ISO 16 and ISO 18, in suppression of *Tribolium castaneum* larvae. *T. castaneum* is one of the most significant pests on stored products as it reduces their value by damaging the grain. The experiment was set up under laboratory conditions at temperatures of 10 and 27°C, and 50 infective juvenile nematodes were applied per insect larvae. Mortality of *T. castaneum* caused by entomopathogenic nematodes of *S. feltiae* was 95 and 75% at temperatures 10 and 27 °C, respectively. Both nematode strains proved similar results, and can be concluded that tested strains adjust well at 10 and 27 °C.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: PhD Ivana Majić

Number of pages: 30

Number of figures: 9

Number of tables: 8

Number of references: 25

Number of appendices: 2

Original in: Croatian

Key words: pathogenicity, tolerance, entomopathogenic nematodes, *Tribolium castaneum*, *Steinernema feltiae*, mortality

Thesis defended on date: 30.9.2019.

Reviewers:

1. PhD Emilija Raspudić, full professor, chair
2. PhD Ivana Majić, associate professor, mentor
3. PhD Anita Liška, associate professor, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, University of Osijek, Vladimir Preloga 1, Osijek