

# Utjecaj azadiraktina i entomopatogenih nematoda na kukuljice maslinine muhe (*Bactrocera oleae*)

---

Mesarić, Marcela

Master's thesis / Diplomski rad

2023

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:*

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:402854>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-18**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical  
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of  
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marcela Mesarić

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer: Zaštita bilja

**Utjecaj azadiraktina i entomopatogenih nematoda na kukuljice maslinine  
muhe (*Bactrocera oleae*)**

Diplomski rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Marcela Mesarić

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer: Zaštita bilja

**Utjecaj azadiraktina i entomopatogenih nematoda na kukuljice maslinine  
muhe (*Bactrocera oleae*)**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Ankica Sarajlić, predsjednik
2. prof.dr.sc. Ivana Majić, mentor
3. prof.dr.sc. Vesna Rastija, član

Osijek, 2023.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	2
2.1. Maslina ( <i>Olea europaea</i> ).....	2
2.2. Maslinina muha ( <i>Bactrocera oleae</i> ).....	5
2.3. Morfologija maslinine muhe .....	5
2.4. Biologija i ekologija maslinine muhe.....	6
2.5. Simptomi napada maslinine muhe.....	8
3. SUZBIJANJE MASLININE MUHE.....	9
4. ZNAČAJ AZADIRAKTINA .....	12
4.1. Mehanizam djelovanja azadiraktina kod suzbijanja štetnika .....	14
4.1.2. Utjecaj na ishranu kukaca .....	15
4.1.3. Utjecaj na razmnožavanje kukaca .....	16
4.3. Dostupnost sredstava za zaštitu bilja na bazi azadiraktina .....	16
4.2. Učinkovitost azadiraktina u suzbijanju štetnih kukaca.....	17
5. ENTOMOPATOGENE NEMATODE.....	19
5.1. Učinkovitost entomopatogenih nematoda u suzbijanju maslinine muhe .....	20
5.2. Prednosti i nedostaci primjene entomopatogenih nematoda u suzbijanju maslinine muhe .....	22
6. MATERIJALI I METODE.....	24
6.1. Prikupljanje uzoraka i ocjena oštećenja plodova masline od maslinine muhe.....	24
6.2. Postavljanje pokusa .....	26
6.3. Entomopatogene nematode - <i>Steinernema feltiae</i> .....	27
6.4. Azadiraktin .....	27
<b>7. REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
<b>8. RASPRAVA .....</b>	<b>28</b>
<b>9. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>33</b>
10. POPIS LITERATURE.....	34
11. SAŽETAK.....	38
12. SUMMARY .....	39
13. POPIS SLIKA .....	40
14. POPIS TABLICA.....	41
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	42
BASIC DOCUMENTATION CARD .....	43

## 1. UVOD

Svijet koji danas poznajemo zasigurno ne bi bio isti da čovjek nije koristio, pripitomio te kultivirao maslinu. Maslina se smatra simbolom mira, ljubavi, plodnosti, postojanosti. Spominje se u bibliji, nalazimo je u bezbroj antičkih umjetnina. Razlog tolike povezanosti antičkog čovjeka Mediterana i masline nalazimo u mnogim primjerima. Ulje dobiveno iz masline bio je najvažniji izvor masni u prehrani, razlog tome što nije bilo lako dostupnih drugih izvora masnoća. Poznato je da civilizacije iz susjednih krajeva Mediteran nisu bile napredne poput mediteranskih, razlog tome možemo naći u nutritivnoj vrijednosti ploda masline. Naime, maslina je bogata Omega-3-masnim kiselinama, te ostalim esencijalnim masnim kiselinama. Zbog neupitnog značaja masline na ljudsko zdravlje, te potrebe čovjeka za zdravom hranom imperativ je proizvodnja plodova masline i maslinovog ulja uz minimalnu upotrebu kemijskih tvari kako bi smo očuvali maksimalnu kvalitetu krajnjem potrošaču. Značajne štete na maslini uzrokuje maslinina muha. Taj štetnik značajno može smanjiti prinos plodova maslina, a ličinka maslinine muhe utječe na kvalitetu ulja. Štete čini ubušujući se i hraneći u plodu masline, osim toga izlučuje izmet u plodove. Uslijed toga dolazi do oksidacije ulja te ostalih kemijskih procesa koji nepovoljno utječu na kvalitetu ulja. Najčešća mjera za suzbijanje maslinine muhe su kemijski insekticidi. Rezidue insekticida mogu zaostati u plodu te se naći u ulju. Štetni kukci često razvijaju otpornost na kemijska sredstva za zaštitu bilja. Na tržištu je mali broj registriranih kemijskih sredstava za zaštitu masline, pa je nužno istražiti i ocijeniti učinkovitost bioracionalnih pesticida i bioloških mjera zaštite masline.

Azadiraktin je kemijski spoj koji nalazimo u biljci neem i dokazan je insekticidni učinak s dugom perzistencijom, a ne djeluje štetno na oprašivače. Entomopatogene nematode (EPN) su beskralježnjaci, prirodni neprijatelji koji parazitiraju maslininu muhu u svim stadijima razvoja, a nisu štetne za okoliš. Cilj istraživanja je ocijeniti oštećenje ploda masline i utvrditi utjecaj bioracionalnog pesticida te bioloških sredstava za zaštitu bilja na kukuljice maslinine muhe.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Maslina (*Olea europaea*)

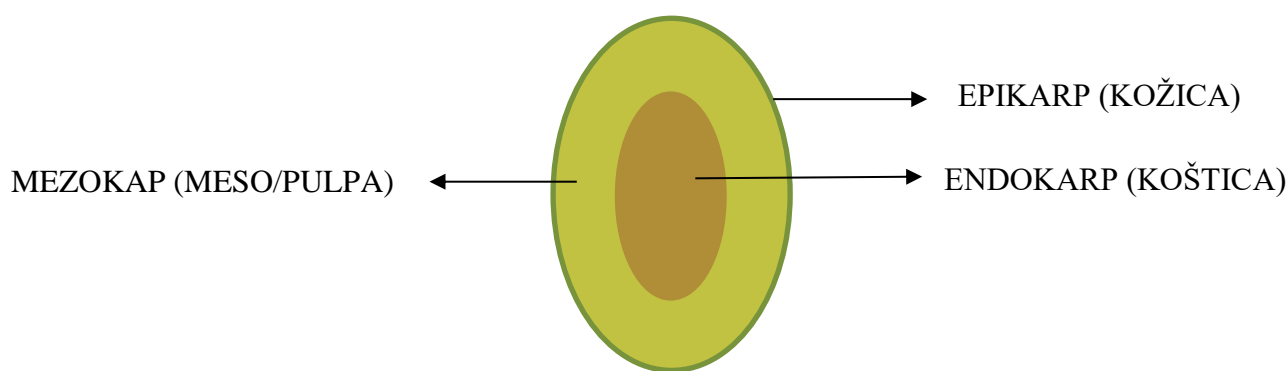
Maslina (*Olea europaea* L.) predstavlja jednu od najdrevnijih poljoprivrednih drvenastih kultura širom svijeta. Ova biljka pripada porodici maslina (Oleaceae) i širi se duž Sredozemlja. Njeni počeci datiraju s istočne obale Sredozemnog mora, nakon čega se širi prema zapadu i sjeveru Mediterana. U Hrvatskoj, masline rastu duž obale, od Istre do juga Dalmacije, uključujući otoke. Glavni razlog uzgoja masline leži u eksploataciji njenih plodova, posebno za proizvodnju ulja, iako se također koriste i njeni plodovi u prehrani. U hrvatskom jeziku, maslina se naziva različitim imenima poput uljika, uljenka, uljavica, zelenka, pizulja, obljica, ponturica. Maslina je zimzelena biljka koja može narasti do visine od 3 do 13 metara. Jedno stablo masline može donijeti između 15 i 40 kilograma plodova, što se pretvara u 3 do 8 kilograma ulja. Na područjima poput naših, masline obično rastu do visine od 8-10 metara, dok u područjima koja su bolje zaštićena od vjetra mogu doseći veće visine, kao što je slučaj u Španjolskoj i Italiji (Guo i sur., 2018.).

Maslina se dijeli u dvije skupine, na pitome i divlje masline. Divlje masline sadrže okrugle listove i plodove s velikom košticom, manje u odnosu na kultivirane masline. Najznačajnija razlika kultiviranih i divljih maslina je površina koštice ploda (Miljković, 2011.).

Izuzetno prilagodljiva biljka, maslina najbolje napreduje u područjima s umjerenom klimom gdje su zime tople i vlažne, a ljeta duga i suha. Njezin korijen je vretenast, razgranat i visoko razvijen, obično dosežući dubinu od samo 90-120 cm u tlu. U početku (do otprilike 10. godine), kora korijena je glatka i sivkasta, dok s vremenom postaje hrapava s dubokim brazdama, dobivajući gotovo crnu boju. Listovi su kožnati, ovalni, nasuprotno raspoređeni i obično duljine od 2-8 cm. Gornja strana lista je maslinasto zelena, dok je donja strana bjelkasto-srebrnasta boje; ova boja varira ovisno o starosti lista i njegovom položaju u krošnji. Cvjetovi su dvospolni, jednodomni, pravilni, sitni i ugodnog mirisa, skupljeni u labave cvatove koji podsjećaju na metlicu, rastući iz pazušaca listova. Osim toga, grupirani su u cvatove slične grozdovima i imaju bijelu boju. Pupoljci na maslini prekriveni su sivkastim dlačicama. Konačan broj cvjetnih pupoljaka varira ovisno o okolišnim uvjetima, dostupnoj prehrani, hormonalnoj ravnoteži i procesima fotosinteze (Škarica i sur., 1996.).

Cvjetove posjećuju pčele te sakupljaju pelud, dok je plod mesnata, jajasta koštunica, duga 1-3 cm, široka do 2 cm. U početku je zelena, dozrijevanjem postane tamno modra, crna ili smeđezelena. Dozrijeva u rujnu i listopadu. Ovisno o sorti masline plodovi se razlikuju u boji, obliku, veličini i sadržaju ulja. Maslina ulazi u rod nakon sedam, a najveći urod daje tek nakon dvadeset godina.

Plod masline sačinjava kožica (epikarp), mesnati dio (mezokarp), te drvenasta koštica (endokarp) (Slika 1.). Plod sadrži ulje (22%), vodu (50%), bjelančevine (1,6 %), ugljikohidrate (19,1%) , celulozu (5,8 %), i minerale(1,5 %) (Franulović, 2020.).



Slika 1: Prikaz dijelova ploda masline (Autor: Mesarić Marcela, 2023.)

Prva asocijacija koja nam obično pada na pamet kada razmišljamo o maslini je njezina upotreba u prehrambene svrhe, posebno prerada plodova u ulje i konzumacija plodova samih. Međutim, osim što je važna u prehrambenoj industriji, maslina ima široku primjenu i u drugim područjima, kao što je kozmetika, zbog svojih hranjivih i ljekovitih svojstava. Osim plodova, listovi masline također imaju značajnu ulogu. Beru se tijekom cijele godine i koriste se za smanjenje visokog krvnog tlaka, kao diuretik i za regulaciju razine šećera u krvi (Debicka i sur., 2018.).

Štetnici i biljne bolesti koji najčešće napadaju maslinu su, maslinin moljac, crni medič, crna uš, potkornjaci, rak masline, siva pjegavost (paunovo oko) i čađavica te maslinina muha o kojoj će biti više riječi u nastavku rada.

Brojnim su istraživanjima dokazane prednosti korištenja EPN u odnosu na kemijske pripravke: djeluju brzo i učinkovito dulje vremensko razdoblje, imaju široku listu domaćina, jednostavno se uzgajaju i primjenjuju, nisu štetne za druge žive organizme i za okoliš, nema opasnosti od rezidua, nije potrebno čekati od primjene do sjetve ili sadnje i prilikom aplikacije nije potrebna zaštitna oprema (Oštrec, 2001.).

Drvo Neem (*Azadirachta indica*) je stoljećima poznato kao čudotvorno drvo Indije, a koristi se više od 2.000 godina kao ljekovita biljka. Neem sadrži alkaloidne i limonoide s mnoštvom medicinskih svojstava dok se jedan od limonoida, azadiraktin, pokazao izuzetno uspješnim kada se koristi kao pesticid ili insekticid. Upravo se azadiraktin koristi kao aktivna tvar u sklopu raznih bioloških insekticida koja pak onda na ekološki i prirodan način suzbija štetnike. Važno je napomenuti da učinkovitost neem ulja može varirati ovisno o koncentraciji ulja, uvjetima primjene i specifičnoj osjetljivosti populacije maslinine muhe. Također, neem ulje obično djeluje kao manje toksična alternativa konvencionalnim kemijskim insekticidima, što može biti privlačno za one koji žele smanjiti upotrebu kemikalija u poljoprivredi.

Objе metode pokazale su se kroz istraživanje kao vrlo uspješne kod suzbijanja štetnika maslinine muhe te se u znanstvenim krugovima smatraju vrlo dobrim alternativnim uobičajenom suzbijanju štetnika sa insekticidima.



## 2.2. Maslinina muha (*Bactrocera oleae*)

Maslinina muha (Slika 2.) je član reda Diptera (dvokrilci), podredu Cyclorrhapha (muhe) i porodici Tephritidae (voćne muhe) (Maceljski, 2002.). Maslinina muha najvažniji je štetnik maslina u našem kraju. Štetnik se javlja svake godine i o njegovom uspješnom suzbijanju uvelike ovisi prinos maslina i kakvoća ulja. Osim što znatno stvara velike gubitke prinosa, zaraza muhe jako utječe na smanjenje kakvoće ulja jer povećava sadržaj kiselina (Malheiro, 2015.).



Slika 2: Odrasla maslinina muha (Izvor: Bjeliš, 2005.)

## 2.3. Morfologija maslinine muhe

Duljina tijela maslinine muhe je od četiri do pet milimetara koji je žutosmeđe boje. Glava muhe je svjetlija od tijela i na njoj se nalaze krupne, sjajne oči zelenkaste boje. Prsište muhe s trbušne strane je smeđe, a hrpteno je sive boje s tri uzdužne crte koje kod pojedinih primjeraka izgledaju poput točkica. Na štitiću se nalazi bijela trokutasta pjega (Barić i Pajač, 2012.). Krila su joj prozirna, sjaja poput bisera, a na vrhu krila je tamna točka (Katalinić i sur., 2009.). Noge su žutosmeđe, a zadak crvenkasto smeđ s dvije do osam tamnih pjega koje mogu nedostajati kod nekih primjeraka. Zadak je ovalan u mužjaka, dok je kod ženki okrugao i završava leglicom (Barić i Pajač, 2012.). Jaja su duguljasta, bijela, veličine 0,7

mm dužine i promjera 0,2 mm (Barić i Pajač, 2012.). Tijelo ličinke dugo je do osam milimetara, valjkasto, naprijed zašiljeno i bijele je boje. Na prvom segmentu prsišta, na bočnim stranama, nalazi se po jedna crvenkasta izraslina (papila), a na predzadnjem segmentu sa svake strane po tri papile. Kukuljica maslinine muhe ima bačvasti oblik, smeđe boje i dužine oko četiri milimetra (Barić i Pajač, 2012.)

#### **2.4. Biologija i ekologija maslinine muhe**

Maslinina muha (slika 3.) u našim uvjetima najčešće prezimi u stadiju ličinke u plodu ili kukuljice u plodu ili tlu. Homodinamičan je kukac, čiji razvoj ovisi o temperaturi, zračnoj vlazi i prisutnosti plodova masline, pogodnih za reprodukciju. Ovisno o području, najčešće se od sredine lipnja, mogu javiti prve odrasle muhe. Nakon određenog razdoblja dopunske ishrane i sazrijevanja počinju polagati jaja u plodove masline (Bjeliš, 2009.). Ženka maslinine muhe može odložiti do 300 jaja. Ženka leglicom ulaže jaje u plod masline i nakon što se ličinka razvije u plodu masline možemo pronaći samo jednu ličinku. Oleuropein iz ploda masline privlači ženke koje odlažu jaja u krupnije plodove tijekom ljeta, dok u jesen ženke odlažu jaja u manje zrele plodove (Barić i Pajač, 2012.).

Ličinka iz jaja izlazi nakon pet do šest dana (Katalinić i sur., 2009.). U svom razvoju prolaze kroz tri međustadija (Bjeliš, 2009.). Zrela ličinka nakon 12 do 13 dana svog razvoja, prije kukuljenja, proširuje kraj hodnika stvarajući na taj način oblu komoricu. Komorica se nalazi tik do pokožice ploda i u toj komorici se zakukulji.

Pokožica ploda poviše kukuljičine komorice se osuši, raspukne i kroz taj otvor nakon deset dana razvoja kukuljice izlazi van odrasli oblik maslinine muhe (Katalinić i sur., 2009.). S obzirom da odrasle muhe žive dugo i tijekom svog života mogu položiti veliki broj jaja, dolazi do preklapanja generacija roditelja i generacija potomstva pa je otežano govoriti o razdobljima pojave pojedinih generacija, pa čak i o broju generacija na pojedinim područjima. Uzimajući u obzir elemente sume temperatura potrebnih za ostvarenje razvojnog ciklusa, mogu se potencijalno razviti tri do pet generacija ovisno o području (Bjeliš, 2009.). Brzina razvoja muhe ovisi o abiotским čimbenicima, najviše temperaturi i vlazi zraka. Smatra se da je optimalna temperatura za razvoj i preživljavanje maslinine muhe 27 °C uz relativnu vlagu zraka od 55 do 75 % te tada razvoj traje 22 dana (Dminić Rojnić, 2013.). Često u suhim i toplim mjesecima u lipnju i srpnju izostaje šteta od maslinine muhe

zbog niske relativne vlage zraka (Barić i Pajač 2012.). Termalni prag razvoja za jaje je približno 6,3 °C, a za kukuljicu i imago 8 – 10 °C (Dminić Rojnić, 2013.). Odrasli su aktivni pri temperaturi između 20 i 30 °C, ali iznad te temperature muhe se kreću teže i polaganje jaja je otežano, dok pri temperaturi od 35 °C aktivnost staje. Smrtnost ličinki je navodno visoka kad temperatura raste iznad 30 °C, posebno kod mlađih razvojnih stadija (Wang i sur. 2009.).



Slika 3: Prikaz razvojnih stadija maslinine muhe (Izvor: Hojsak, 2021.; <https://dabar.srce.hr/islandora/object/agr%3A2112>)

## 2.5. Simptomi napada maslinine muhe

Štete prave ličinke maslinine muhe. One svojom aktivnošću smanjuju količinu i kakvoću maslinovog ulja. Do smanjenja količine dolazi uslijed smežuranja i otpadanja napadnutih plodova u sušnom, a truljenja u vlažnom vremenskom razdoblju. Hraneći se, ličinka pojede od 50 do 150 mg mesa ploda rezultat toga je i promjena boje ploda masline u ljubičasto smeđe nijanse. Do smanjenja kakvoće maslinovog ulja dolazi uslijed prodora raznih mikroorganizama u ličinkom oštećeni plod, koji svojim djelovanjem negativno utječu na sve bio-kemijske procese u maslininom plodu. Kao posljedica navedenog, maslinovo ulje ima povećane slobodne masne kiseline i oksidacijski broj, čime se smanjuje kvaliteta i rok trajanja. Sorte masline različito su osjetljive na napad ovog štetnika. One koje imaju krupnije plodove, mekši epikarp i kod kojih su plodovi manje obloženi voskom, privlačnije su ženka maslinine muhe.



Slika 4: Ličinka maslinine muhe u plodu masline (Izvor: Brkić Terzanović, 2021.;

<https://zir.nsk.hr/en/user/profile/mbz/125056>)

### 3. SUZBIJANJE MASLININE MUHE

Kemijski insekticidi predstavljaju snažan alat u poljoprivredi za suzbijanje štetnika i očuvanje usjeva. Njihove glavne prednosti uključuju brzu i efikasnu eliminaciju štetnika što može značajno povećati prinos usjeva i osigurati opstanak poljoprivredne proizvodnje. Osim toga, kemijski insekticidi često nude dugotrajnu zaštitu, smanjujući potrebu za čestim tretiranjem polja. Ova metoda također omogućuje selektivno ciljanje specifičnih štetnika, minimizirajući štetu na korisnim organizmima poput pčela. Kroz kontrolirano doziranje, kemijski insekticidi mogu biti prilagođeni različitim uvjetima i vrstama kukaca, što omogućuje preciznost u primjeni i učinkovitu kontrolu širenja bolesti koje prenose kukci. Osim toga, kemijski insekticidi često zahtijevaju pažljivo rukovanje, skladištenje i primjenu kako bi se izbjegla kontaminacija i slučajna izloženost ljudi. Ove tvari zahtijevaju strogo poštivanje sigurnosnih smjernica i propisa, što može predstavljati izazov za poljoprivrednike i radnike u poljoprivredi (Oberemok i sur., 2015.).

U kontekstu održivosti, kemijski insekticidi degradiraju tlo i smanjuju biološku raznolikost. Upotreba tih kemikalija često rezultira gubitkom korisnih mikroorganizama u tlu, što dugoročno može smanjiti plodnost tla. Osim toga, ispiranje kemikalija iz polja može zagađivati okoliš, uključujući vode, što ima ozbiljne ekološke posljedice. Kako bi se izbjegli ovi negativni utjecaji, sve veći naglasak stavlja se na razvoj i primjenu održivijih alternativa, kao što su biološko suzbijanje štetnika, razvoj bioracionalnih pesticida, rotacija usjeva i uzgoj otpornih sorti biljaka, genetički inženjering biljaka i dr. metode. Ove metode naglašavaju važnost očuvanja prirodnih ekosustava i potiču integrirani pristup poljoprivredi, koji promiče ravnotežu između zaštite usjeva i očuvanja okoliša. Dok kemijski insekticidi pružaju trenutna rješenja za suzbijanje štetnika, njihova dugoročna održivost i utjecaj na okoliš i ljudsko zdravlje potiču potragu za inovativnijim, sigurnijim i ekološki prihvatljivijim metodama kontrole štetnika u poljoprivredi. Integrirani pristup, koji kombinira različite tehnike i tehnologije, predstavlja ključnu strategiju za očuvanje produktivnosti poljoprivrede uz minimalan utjecaj na okoliš (Oberemok i sur., 2015.).

Insekticidi su pripravci koji se koriste za suzbijanje štetnih kukaca, koji se hrane biljkom u uzgoju. Insekticide možemo podijeliti na više kategorija koje su određene prema tome na koji stadij kukca djeluju, način na koji prodiru u organizam i prema načinu na koji djeluju. Prema stadiju kukca na kojeg djeluju možemo ih podijeliti na adultacide, larvicide i ovice,

a prema načinu prodiranja u organizam dijele se na kontaktne insekticide, želučane insekticide, kontaktno-želučane, inhalacijske insekticide, regulatore rasta i razvoja te repelente. Sistemici i nesistemici su insekticidi podijeljeni prema načinu djelovanja gdje sistemici djeluju tako da ga biljka upija putem lista ili korijena te se širi biljkom putem provodnog sustava u ostale ograde, a nestistemici su sredstva koje biljka pak ne upija, nego ostaje na površini biljke stvarajući prevlaku preko površine kojom se kukac kreće ili se njome hrani.

Insekticidi koji su zakonom dopušteni za korištenje prodaju se u originalnim pakiranjima i različitim formulacijama. Na pakiranjima se mora nalaziti naziv insekticida, njegova djelatna tvar i kratica formulacije. Potrebno je posebno obratiti pažnju na upute koje dolaze u pakiranju s insekticidima jer je važno pravilno tretirati zaražene biljke. Važan je i ekonomski prag štetnosti kojim je određena brojnost štetnika dovoljno velika da bi se pristupilo mjerama zaštite. Ako brojnost štetnika ne prelazi ekonomski prag štetnosti, tada korištenje insekticida nije potrebno jer kukci nisu u dovoljno velikom broju da bi izazvali velike štete na uzgoju. Koje ćemo sredstvo odabrati također je važno kako bi suzbijanje bilo učinkovito. Prilikom primjene insekticida važno je koristiti zaštitnu opremu da bi se izbjegle negativne posljedice na ljudski organizam. Pravilnom primjenom SZB ne ugrožavamo okoliš u kojem se nalaze tretirane biljke, a osigurana je i zaštita pčela. Zbrinjavanje ambalaže važno je učiniti onako kako je propisano zakonskim odredbama i potrebno je voditi evidenciju o uporabi sredstava za zaštitu bilja (SZB). SZB moraju biti pravilno uskladištena u prostoru u kojem neće doći do kontakta s hranom, pićem ili hranom za životinje i u kojem će biti izvan dohvata djece i osoba koje nisu stručne

Prednosti primjene kemijskih insekticida su brzina djelovanja i visoka učinkovitost. Nedostaci primjene kemijskih insekticida su razvoj otpornosti štetnika na kemijske insekticide, što znači da postanu manje osjetljivi ili potpuno otporni na kemikalije. To zahtijeva veću dozu ili promjenu insekticida, što može povećati troškove i otežati suzbijanje štetnika, te negativan utjecaj kemijskih insekticida na okoliš, životinje i ljude.

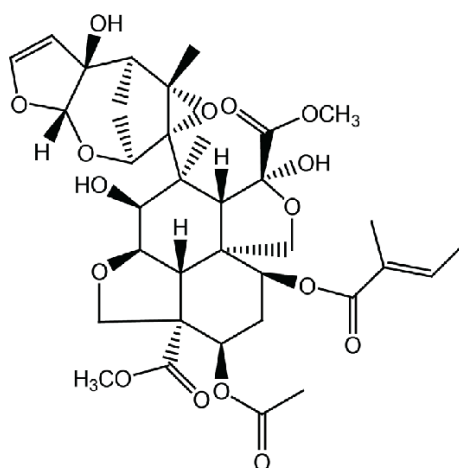
U istraživanju zaštite maslina od maslinine muhe, primjena različitih kemijskih sredstava igra ključnu ulogu. Međutim, važno je naglasiti da konkretna sredstva koja su dozvoljena za ovu svrhu variraju ovisno o lokalnim zakonima i propisima. Navedene informacije podložne su promjenama, stoga je od ključne važnosti konzultirati se s lokalnim poljoprivrednim stručnjacima ili nadležnim tijelima za poljoprivredu kako bi se dobile najnovije i

najpreciznije informacije o dozvoljenim kemikalijama za zaštitu maslina od maslinine muhe u specifičnom području istraživanja. Ti stručnjaci imaju ažurirane podatke o registriranim sredstvima koja se mogu primijeniti, a ta informacija je ključna s obzirom na česte promjene u zakonodavstvu i dozvolama. Trenutno je u Republici Hrvatskoj prema fitosanitarnom informacijskom sustavu dozvoljeno i registrirano 13 sredstava za zaštitu bilja. Puni popis sredstava dostupan je na sljedećoj poveznici (<https://fis.mps.hr/fis/javna-trazilica-szb/>) sastavljenoj od insekticida i hranidbenog atraktanta namijenjena za privlačenje i suzbijanje maslinine muhe (*Bactrocera oleae*) na maslini. Ostala sredstva uključuju:

- DECIS 2,5 EC
- SUCCES BAIT
- ECO-TRAP
- DECIS 100 EC
- POLECI PLUS
- SCATTO
- ROTOR SUPER
- DEMETRINA 25 EC
- SIVANTO PRIME
- DELTAGRI
- KARATETRAP B
- DELMUR TRAP DACUS

#### 4. ZNAČAJ AZADIRAKTINA

Azadiraktin je prirodni biopesticid koji se ekstrahira iz sjemena indijskog neema (*Azadirachta indica*), tropskog drveta koje je domaćin u južnoj i jugoistočnoj Aziji. Povijest azadiraktina datira tisućama godina unatrag, s korisničkom praksom koja seže u drevnu indijsku medicinu i tradicionalnu poljoprivredu. Neem drvo, poznato i kao "čudesno drvo" ili "farmaceutsko drvo", ima važnu ulogu u indijskoj medicini poznatoj kao Ayurveda. Neem je u Ayurvedi poznat kao "Sarva Roga Nivarini" što znači "liječi sve bolesti". Prema Ayurvedi, različiti dijelovi neem drveta, uključujući koru, lišće, cvjetove, voće i sjeme, imaju ljekovita svojstva (Schmutterer, 1995.). Kemijski gledano, azadiraktin pripada skupini prirodnih spojeva poznatih kao limonoidi. Njegov kemijski sastav može varirati, ali osnovna struktura azadiraktina uključuje kompleksan lanac ugljikovih atoma s mnogo funkcionalnih skupina (Slika 5.) (Pasquoto -Stigliani i sur., 2017.).



Slika 5: Kemijska struktura azadiraktina

(Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Azadirachtin>)

Azadiraktin je spoj koji ometa rast i razvoj kukaca, posebno u stadiju ličinki, te tako sprječava njihovo sazrijevanje i razvoj. Osim što djeluje kao insekticid, azadiraktin također ima fungicidno, antibakterijsko i antivirusno djelovanje, što ga čini svestranim sredstvom zaštite bilja.

Azadiraktin je ekološki prihvatljiv pesticid u organskoj poljoprivredi zbog svoje niske toksičnosti za ljude, domaće životinje i korisne kukce poput pčela. Osim toga, njegova biološka razgradivost i niska štetnost za okoliš čine ga atraktivnim izborom za održivo



poljoprivredno gospodarstvo. Nastavak istraživanja i razvoj novih formulacija ovog prirodnog pesticida doprinose razumijevanju i poboljšanju njegove učinkovitosti, čime se unaprjeđuje poljoprivredna proizvodnja i smanjuje negativan utjecaj kemijskih pesticida na okoliš (Schmutterer, 1995.).

Znanstvena istraživanja o azadiraktinu u zaštiti bilja započela su u drugoj polovici 20. stoljeća. Znanstvenici su počeli proučavati ovu kemikaliju zbog njezine sposobnosti suzbijanja kukaca na ekološki prihvatljiv način. Njegova primjena u poljoprivredi postala je posebno važna s porastom svijesti o štetnosti konvencionalnih pesticida na okoliš i zdravlje ljudi. Danas je azadiraktin priznat kao ekološki prihvatljiva alternativa konvencionalnim pesticidima. Njegova primjena proširila se diljem svijeta, uključujući zemlje u kojima se neem ne nalazi u prirodnom okolišu. Osim poljoprivrede, azadiraktin se koristi i u proizvodnji ekološki prihvatljivih kozmetičkih proizvoda, sapuna i šampona. Njegova povijest nije samo priča o jednom prirodnom spoju, već i priča o tradicionalnom znanju koje je evoluiralo i prilagodilo se suvremenim potrebama. Njegova široka primjena i kontinuirano znanstveno istraživanje čine ga ključnim alatom u području ekološke poljoprivrede i održive proizvodnje (Chaudhary i sur., 2017.).

Prednosti primjene azadiraktina su (Kilani-Morakchi i sur., 2021.):

- Ekološka održivost - prirodni insekticid, ekološki prihvatljivi i manje štetan za okoliš u usporedbi s konvencionalnim pesticidima;
- Niska toksičnost za ljude, ptice, ribe i okoliš;
- Selektivno djelovanje i minimalni utjecaj na korisne organizme poput pčela i drugih oprašivača;
- Otpornost na razvoj rezistencije. Zbog svoje kompleksne strukture, azadiraktin otežava razvoj otpornosti kod štetnika, što ga čini dugoročno održivim rješenjem za kontrolu štetočina;
- Različite biološke aktivnosti i primjene - Osim kao insekticid, azadiraktin ima i fungicidna i antibakterijska svojstva, što ga čini višenamjenskim sredstvom u poljoprivredi.

Međutim, ipak postoje i određeni nedostaci (Kilani-Morakchi i sur., 2021.):

- Sporo djelovanje u usporedbi s bržim djelovanjem nekih kemijskih pesticida;

- Potreba za ponovljenom primjenom kako bi se postigla zadovoljavajuća učinkovitost;
- Učinkovitost azadiraktina ovisi o pravilnoj primjeni, koncentraciji i doziranju. Azadiraktin je insekticid koji djeluje kontaktno, što znači da mora doći u dodir sa štetnikom kako bi bio učinkovit. To može rezultirati slabijom učinkovitošću ako se štetnici skrivaju ili su zaštićeni drugim biljnim strukturama.
- Azadiraktin je često skuplji od nekih sintetičkih pesticida, što predstavlja dodatni financijski teret za poljoprivrednika.

#### **4.1. Mehanizam djelovanja azadiraktina kod suzbijanja štetnika**

##### *4.1.1. Regulator rasta i razvoja*

Na molekularnoj razini, azadiraktin uzrokuje promjene ili sprječava transkripciju i/ili ekspresiju nekoliko proteina. Kada ličinke moljca *Ostrinia furnacalis* u trećem stadiju unesu azadiraktin u koncentraciji od 10 ppm, dolazi do značajnog utjecaja na masno tijelo, ometajući ekspresiju proteina povezanu s hemolimfnim lipidima. Utvrđeno je da azadiraktin smanjuje ekspresiju gena koji kodira kutikularni protein i amilazu, dok istodobno pojačava ekspresiju gena za protein vezan uz mirise Obp99b, kod voćne muhe *Drosophila melanogaster*. Povećanje ekspresije može biti povezano s razvojnim procesima, problemima kod presvlačenja kukaca iz jednog stadija u drugi, te na fiziološke procese vezane uz probavni sustav (Lai i sur., 2014.).

Azadiraktin je poznat kao regulator rasta i razvoja kukaca. Utvrđeno je da ima sposobnost regulacije razvoja štetnika kukuruza *Spodoptera frugiperda* tako što utječe na put sinteze hitina kukca, na način da smanjuje ekspresiju 31 proteina kutikule i nekoliko drugih gena koji kontroliraju važne enzime uključene u biosintezu hitina insekata. Ovi geni uključuju enzime kao što su trehalaza, hitin-sintaza, hitin deacetilaza i hitinaza, ključni za sintezu hitina i hormona kod insekata. Smanjenjem proizvodnje hitina, esencijalne komponente za rast i razvoj egzoskeleta kukaca, ograničava se rast populacije ovog štetnika (Shu i sur., 2020.). Inhibicija ekspresije biosinteze hitina i gena za kutikulu azadiraktinom mogla bi predstavljati molekularnu osnovu za usporavanje presvlačenja i rasta kukaca.

Azadiraktin također utječe na aktivnost superoksid dismutaze (SOD) i razinu malondialdehida (MDA) kod voćne muhe *D. melanogaster*, inducirajući antioksidativne

enzime kao što su SOD, katalaza (CAT) i glutation S-transferaza (GST). Ovi enzimi reguliraju ekspresiju gena kako bi zaštitili organizam od oksidativnih oštećenja izazvanih povećanim i nakupljanjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) uzrokovanih stresnim uvjetima zbog prisutnosti azadiraktina. Nadalje, azadiraktin inhibira ekspresiju gena za feritin i tioredoksin peroksidazu u kod štitastih moljaca (*Bemisia tabaci*), što ukazuje na njegovu zaštitnu ulogu protiv oksidativnog stresa kod ovog štetnika (Barbosa i sur., 2015.).

Precizni mehanizma insekticidnog djelovanja azadiraktina na molekularnoj razini ispitan je na štetniku bora *Monochamus alternatus*. Utvrđen je utjecaj u 50 različitih bioloških procesa. Zabilježeno je da je 920 gena bilo značajno povećano, dok je 9984 gena bilo značajno smanjeno. Ova detaljna analiza gena, koja se provodi radi razumijevanja unutarnjih mehanizama koji omogućuju apsorpciju azadiraktina kod *M. alternatusa*, može značajno doprinijeti razvoju učinkovitih biljnih pesticida koji se temelje na azadiraktinu (Lin i sur., 2016.).

#### 4.1.2. Utjecaj na ishranu kukaca

Azadiraktin ima značajan utjecaj na ishranu kukaca, posebno štetnih kukaca. Kada kukci dođu u dodir s azadiraktinom, njihova ishrana i metabolizma su narušeni. Azadiraktin prvenstveno ometa normalan rast i razvoj kukaca, posebno ličinki. Također, azadiraktin djeluje kao snažan repelent, tjeraći kukce dalje od biljaka koje su tretirane ovim spojem.

Ako kukci ipak konzumiraju tretirane biljke, azadiraktin uzrokuje oštećenja probavnog trakta, smanjuje sposobnost normalne probave i apsorpcije hranjivih tvari te može potaknuti proces apoptoze u stanicama crijeva kukaca. Koristi se u suzbijanju ili odbijanju štetnika iz rodova Coleoptera, Heminoptera, Diptera, Orthoptera i Isoptera (Morgan, 2009.). Toksičnost azadiraktina razlikuje se među redovima kukaca i na nju utječu različite stope prodiranja i aktivnosti enzima za detoksikaciju.

#### *4.1.3. Utjecaj na razmnožavanje kukaca*

Azadiraktin ima značajan utjecaj na fiziološke procese kukaca. Ovaj prirodni spoj sprječava normalan razvoj reproduktivnih organa kukaca, što rezultira smanjenom plodnošću i sposobnošću polaganja jaja. Često smanjuje fekunditet kukaca, odnosno broj jaja koje kukci polažu. Azadiraktin utječe na hormone kukaca, ometajući normalan proces sazrijevanja jajašaca i smanjujući sposobnost ženki kukaca za polaganje jaja. Osim toga, kada ženke kukaca uspiju položiti jaja, ličinke koje se izlegu često imaju oštećenja i poremećaje u razvoju, što dovodi do smanjenog preživljavanja (Karnavar, 1987.).

Azadiraktin također može smanjiti plodnost mužjaka kukaca i oštećenje reproduktivnih organa mužjaka, smanjujući njihovu sposobnost za oplodnju jaja. Smanjuje se broj oplođenih jaja, što dovodi do smanjenja populacije budućih generacija štetočina. Takav utjecaj na reprodukciju kukaca ima dugoročne posljedice na populaciju štetočina. Smanjenjem broja novih jedinki, populacija se s vremenom smanjuje, što pridonosi dugoročnoj kontroli štetočina u poljoprivredi (Chaudhary, 2017.).

#### **4.3. Dostupnost sredstava za zaštitu bilja na bazi azadiraktina**

Neki od najpoznatijih proizvoda na bazi azadiraktina u svijetu su:

- AzaGuard,
- AzaSol,
- AzaSol WSP,
- Debug,
- Debug Turbo,
- Molt-X,
- Neemix.

U Republici Hrvatskoj registrirana su sljedeća sredstva na bazi azadiraktina (Ministarstvo poljoprivrede, 2023.):

- NEEMAZAL-T/S; registracijski broj - UP/I-320-20/18-03/53; vlasnik registracije – Trifolio-M GmbH;

- AZATIN EC; registracijski broj – UP/I-320-20/22-03/108; vlasnik registracije - Mitsui AgriScience International S.A./N.V.

#### 4.2. Učinkovitost azadiraktina u suzbijanju štetnih kukaca

Budući da azadiraktin ima širok spektar djelovanja, može se koristiti za suzbijanje različitih vrsta kukaca. Neki od kukaca koji se uspješno mogu suzbiti azadiraktinom uključuju:

- Komarci: Azadiraktin može biti učinkovit protiv odraslih komaraca i njihovih ličinki. Azadiraktin ometa procese rasta i razvoja komaraca. To znači da sprječava komarčeve ličinke da se normalno razvijaju, čime se smanjuje njihova sposobnost za preživljavanje i reprodukciju. Azadiraktin ometa prehranbene procese kod komaraca. Kada komarac konzumira tretirane površine ili biljke, azadiraktin ometa njihovu sposobnost probave i apsorpcije hranjivih tvari. To dovodi do slabljenja komaraca i smanjenja njihove reproduktivne sposobnosti.
- Odrasle muhe: Uključujući muhe voćnjaka, kućne muhe i druge vrste muha. Azadiraktin ometa normalan razvoj ličinki voćnih muha, sprječavajući ih da se razvijaju u zrele odrasle muhe. To smanjuje brojnost populacije voćnih muha. Azadiraktin može ometati sposobnost odraslih muha da polože jaja unutar voća. Ako muhe ne mogu položiti jaja ili ako ličinke ne mogu preživjeti unutar ploda zbog izloženosti azadiraktinu, to smanjuje njihovu sposobnost za širenje i uzrokuje smanjenje populacije.
- Odrasli leptiri: Azadiraktin može ometati reprodukciju određenih vrsta leptira. Kada biljke tretirane azadiraktinom postanu izvor hrane za gusjenice, one dolaze u kontakt s ovim insekticidom. Azadiraktin ometa probavni sustav gusjenica, sprečavajući ih da apsorbiraju hranjive tvari iz hrane. Ovaj poremećaj u prehrani dovodi do slabljenja gusjenica i smanjuje njihovu sposobnost brzog rasta i razvoja. Osim toga, azadiraktin ometa procese metamorfoze gusjenica u leptire. Kada gusjenice pokušaju proći kroz proces preobražaja u kukuljicu i, naposljetku, u leptira, azadiraktin može uzrokovati deformacije, sprječavajući normalan razvoj leptira. Ova karakteristika značajno smanjuje brojnost populacije leptira. Nadalje, azadiraktin djeluje kao repelent koji odbija odrasle leptire. Kada se odrasli leptiri izlože

azadiraktinu, oni ga izbjegavaju, što smanjuje rizik od polaganja jaja na tretiranim biljkama.

- Skakavci: Azadiraktin može djelovati na odrasle skakavce i njihove ličinke. Prvo, azadiraktin ometa procese rasta i razvoja skakavaca. Kada skakavci konzumiraju biljke tretirane azadiraktinom, ovaj insekticid ometa njihovu sposobnost probave i apsorpciju hranjivih tvari. To dovodi do slabljenja skakavaca, usporava njihov rast i smanjuje njihovu sposobnost reprodukcije. Osim toga, azadiraktin djeluje na živčani sustav skakavaca. On ometa normalne živčane impulse, što dovodi do poremećaja u njihovom ponašanju i kretanju. Skakavci koji su izloženi azadiraktinu gube koordinaciju i sposobnost normalnog hranjenja, što ih čini manje učinkovitim u traženju hrane i reprodukciji.
- Štetočine voćnjaka: Azadiraktin može biti učinkovit protiv voćnih mušica i drugih štetočina voćnjaka.

Važno je napomenuti da učinkovitost azadiraktina može varirati ovisno o vrsti kukca, stadiju razvoja, koncentraciji proizvoda koji se koristi, uvjetima primjene i drugim čimbenicima.

## 5. ENTOMOPATOGENE NEMATODE

Entomopatogene nematode (EPN) su beskralježnjaci unutar koljena Nematoda, čija biologija i ekologija igraju važnu ulogu u održavanju ravnoteže u ekosustavima te pružaju održiva rješenja za kontrolu štetnika u poljoprivredi. Nalaze se u tlu, osjetljivi su na UV zrake, te su paraziti su drugih beskralježnjaka. Porodice Heterorhabditidae i Steinernematidae se najčešće koriste u biološkoj kontroli štetnika i obuhvaćaju najveći broj utvrđenih vrsta EPN.

Entomopatogene nematode masovno se proizvode upotrebom *in vivo* (zaraženi kukci) ili *in vitro* (kruti ili tekuće fermentacije) metode. Najčešća formulacija entomopatogenih nematoda je vodena suspenzija. Formulacije su usavršene tako da je vrijeme preživljavanja EPN od 7 do 180 dana u vodi i kapsulama kalcijevog alginata prilikom skladištenja ili transporta. Chen i sur. (2016.) inkapsulirali su *Steinernema feltiae* te utvrdili da je 99,8% nematoda preživjelo više od 6 mjeseci na 23 °C i 100% relativne vlažnosti.

U svijetu se bilježi rastući trend istraživanja i komercijalizacije entomopatogenih nematoda. Ovaj rast je posljedica potrebe za učinkovitim sredstvima biološkog suzbijanja te zbog sve veće zabrinutosti zbog toksikoloških problema povezanih s kemijskim pesticidima. S obzirom na te čimbenike, važno je proučiti nematode iz raznih geografskih područja. Također, bitno je usporediti lokalne vrste s komercijalnim sojevima kako bi se utvrdio njihov potencijal u programima biokontrole u specifičnim regijama. Vrste koje potječu iz različitih regija imaju lokalne prilagodbe i mogu varirati u svojim reprodukcijским svojstvima, sposobnosti infekcije, spektru domaćina i uvjetima preživljavanja, što je važno dokumentirati. Majić i sur. (2018.) navode priustvo EPN vrste *Steinernema feltiae* (koja je korištena u ovom diplomskom radu) u RH i široku rasprostranjenost u nekoliko zemalja jugoistočne Europe, kao što su Slovenija, Bosna i Hercegovina, Srbija, Bugarska, Grčka i Albanija.

Infektivne ličinke EPN aktivno traže potencijalne domaćine kukaca u tlu iz različitih redova, a najčešće su to kukci iz redova Lepidoptera, Coleoptera i Diptera. Nakon što pronađu domaćina, EPN ulaze u tijelo kroz prirodne otvore i oslobađaju bakterije iz svojih crijeva, najčešće vrsta *Photorhabdus*, *Xenorhabdus* i *Serratia*. Unutar tijela domaćina, bakterije proizvode toksine koji ubijaju domaćina u roku od 48 do 72 h nakon infekcije domaćina. Ove bakterije izazivaju septikemiju kukca, potiču razgradnju tijela domaćina i osiguravaju

hranu za razvoj nematoda. Nematode se hrane unutarnjim organima i tkivima domaćina dok se razgrađuje. Kada je domaćin potpuno razgrađen, nematode prolaze kroz više razvojnih stadija, uključujući odrasle oblike i spolno zrele jedinke. Njihovi potomci postaju infektivne ličinke koje napuštaju tijelo domaćina, spremne za traženje novog domaćina i nastavak svog životnog ciklusa (Gazit i sur., 2000.).

Nematode iz porodica Heterorhabditidae su u simbiotskom odnosu s bakterijama iz roda *Photorhabdus*, a Steinernematidae s bakterijama iz roda *Xenorhabdus* koje se nalaze u crijevima nematoda, a koje igraju ključnu ulogu u ubijanju domaćina (Majić i sur., 2019.).

Entomopatogene nematode, osim što pružaju prirodno rješenje za suzbijanje štetočina, imaju važnu ulogu i u ekološkim ciklusima tla. Nematode potiču razgradnju organskih tvari u tlu, što doprinosi povećanoj raznolikosti mikroorganizama u tlu, što poboljšava plodnost tla i omogućuje optimalne uvjete za rast biljaka. Također, ostaci razgrađenih štetočina i nematoda obogaćuje tlo hranjivim tvarima.

Entomopatogene nematode djeluju na specifičan način, ciljajući isključivo štetočine. Ova ciljana kontrola štetočina doprinosi očuvanju korisnih organizama u tlu, kao što su gujavice i korisni kukci, čime se održava ekološka ravnoteža u poljoprivrednim ekosustavima. Smanjenje potrebe za pesticidima dovodi do smanjenja troškova proizvodnje, što može povećati profitabilnost poljoprivrednih operacija prilikom korištenja EPN u proizvodnji odnosno prilikom suzbijanja štetnika (Usmar i sur., 2020.).

Znanstvenici nastoje poboljšati učinkovitost EPN i prilagodbu različitim uvjetima okoline. Ova istraživanja omogućuju razvoj novih formula i tehnika primjene. Entomopatogene nematode predstavljaju izuzetno vrijedan resurs u poljoprivredi i ekologiji (Sirjani i sur., 2009.)

### **5.1. Učinkovitost entomopatogenih nematoda u suzbijanju maslinine muhe**

Učinkovitost entomopatogenih nematoda u suzbijanju maslinine muhe (*B. oleae*) ovisi o različitim čimbenicima kao što su vrsta nematoda, uvjeti okoline, koncentracija primjene, stadij muhe i brojnost populacije muha. Istraživanja su pokazala da neki sojevi EPN, posebice iz roda *Steinernema* i *Heterorhabditis*, mogu biti korisni u suzbijanju ličinki maslinine muhe u tlu. Kada se primijene na tlo, entomopatogene nematode traže ličinke



maslinine muhe i prodiru kroz prirodne otvore na tijelu larvi, poput otvora za disanje i usta. Unutar tijela ličinki, nematode oslobađaju bakterije (*Xenorhabdus* ili *Photorhabdus*) čiji metaboliti su toksični za kukca. Bakterije također pridonose razgradnji tijela ličinki, stvarajući povoljne uvjete za razvoj nematoda. Ovaj proces dovodi do smrti ličinki maslinine muhe (Sirjani i sur., 2009.).

Mortalitet voćne muhe iz istog roda *Bactrocera*, vrsta *Bactrocera dorsalis* uzrokovan *Heterorhabditis taysearae* varirao je od 51,2% do 96,1%, ovisno o izolatu (Godjo i sur., 2016.). S obzirom na ovu značajnu varijaciju, pronalaženje najučinkovitije vrste ili izolata postaje izuzetno važno, no izazovno je s obzirom na velik broj već opisanih vrsta EPN. Nadalje, kontinuirano se otkrivaju nove vrste. Tijekom posljednjih pet godina, opisane su najmanje dvije vrste unutar porodice Heterorhabditidae i osam unutar porodice Steinernematidae, dok su poznate vrste pronađene na novim geografskim lokacijama. Ponekad se otkrivaju i nove vrste bakterija, poput *Photorhabdus heterorhabditis*, simbionta *Heterorhabditis zealandica* (Godjo i sur., 2016.). Laboratorijsko ispitivanje je od izuzetne važnosti za identifikaciju vrsta i sojeva s niskom virulencijom. Međutim, budući da na terenu uspjeh često ovisi o više čimbenika osim virulencije, preporučuje se testiranje više virulentnih sojeva na terenu.

Važno je osigurati da tlo bude dovoljno vlažno za aktivnost nematoda te da temperatura tla bude optimalna za njihovu aktivnost. Također, pravilna primjena, uključujući koncentraciju nematoda, igra ključnu ulogu u postizanju željenih rezultata. Međutim, važno je napomenuti da je potrebno provesti pažljiva istraživanja i praćenja na terenu kako bi se utvrdila stvarna učinkovitost entomopatogenih nematoda u specifičnim uvjetima maslinika. S obzirom na promjenjive uvjete okoline i biološke osobine maslinine muhe, metode integrirane zaštita, koji uključuje različite metode suzbijanja je najučinkovitiji način za suzbijanje ovog štetnika. Osim entomopatogenih nematoda, to uključuje i druge biološki agense, primjerice prirodni predatori maslinine muhe, te uporaba feromonskih zamki za praćenje populacija muhe. Također, uz primjenu nematoda, važno je razmotriti i primjenu drugih ekološki prihvatljivih metoda kao što su biljni ekstrakti i prirodni spojevi koje mogu repelentno djelovati na maslininu muhu (Torrini i sur., 2017.).

Važno je također educirati poljoprivrednike o pravilnoj primjeni nematoda i drugih ekoloških metoda, kao i o važnosti integrirane zaštite masline.

## **5.2. Prednosti i nedostaci primjene entomopatogenih nematoda u suzbijanju maslinine muhe**

Primjena entomopatogenih nematoda u suzbijanju maslinine muhe donosi niz značajnih prednosti koje podržavaju održivu poljoprivredu i očuvanje okoliša (Usman i sur., 2001.):

- Ekološka održivost – sigurne su za okoliš i pomažu u očuvanju bioraznolikosti tla i drugih korisnih organizama u masliniku.
- Specifičnost domaćina za određene vrste štetnika - ne utječu na druge organizme i ne narušavaju prirodnu ravnotežu ekosustava.
- Smanjena upotreba kemikalija – smanjuje se izlaganje poljoprivrednika kemijskim pesticidima i smanjuje se onečišćenje tla i voda.
- Niska razina rezistencije – kukci rijetko razvijaju otpornost na EPN, što je često kod kemijskih pesticida što ih čini dugoročno održivom opcijom za suzbijanje maslinine muhe.
- Kompatibilnost - mogu se miješati i kombinirati s drugim biološkim agensima, kao što su prirodni predatori ili parazitoidi, te kemijskim pesticidima pr. herbicidi.
- Dugotrajno djelovanje – preživljavaju u tlu dulje vrijeme, osiguravajući dugotrajno suzbijanje populacija maslinine muhe.

Iako EPN imaju mnoge prednosti u suzbijanju štetnika u poljoprivredi, uključujući i suzbijanje maslinine muhe, postoje i određeni nedostaci koji trebaju biti uzeti u obzir (Torrini i sur., 2020.):

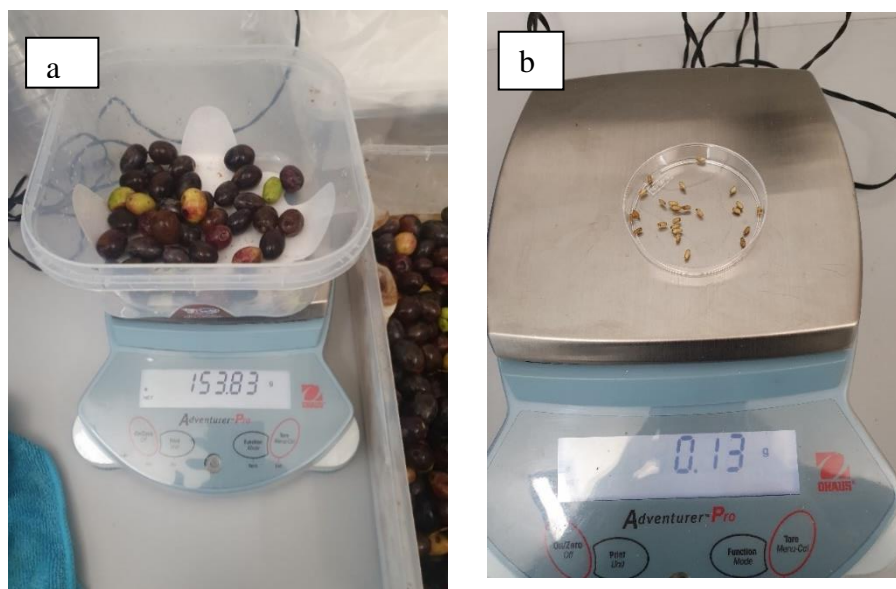
- Ovisnost o okolišnim uvjetima - Učinkovitost entomopatogenih nematoda često ovisi o odgovarajućim uvjetima okoline, uključujući vlažnost tla i optimalne temperature. Ako uvjeti nisu povoljni, nematode mogu imati smanjenu aktivnost, što dovodi do smanjene učinkovitosti.
- Smanjena učinkovitost za nadzemne štetnike - moraju pronaći štetnika u tlu ili na površini tla jer su osjetljive na UV zrake, te zahtijevaju određenu razinu vlage.
- Dugotrajnost i postojanost - osjetljive su na promjene u uvjetima tla i mikroorganizmima u okolišu. Stoga, ponovna primjena može biti potrebna kako bi se održala kontinuirana kontrola štetnika.

- Znanje - Učinkovita primjena entomopatogenih nematoda zahtijeva tehničko znanje i pažljivo planiranje, uključujući pravilno odabiranje vrsta nematoda, doziranje i vrijeme primjene.
- Skuplji u odnosu na kemijske pesticide.
- Sporo djelovanje i slabija učinkovitost u odnosu na kemijske insekticide – potrebno je najmanje 48 do 72 h od trenutka primjene da EPN usmrte kukca.

## 6. MATERIJALI I METODE

### 6.1. Prikupljanje uzoraka i ocjena oštećenja plodova masline od maslinine muhe

Masline su skupljene iz maslinika u rujnu 2021. godine s područja južne Dalmacije. Prikupljanje je obavljeno metodom slučajnog odabira za toplog i sunčanog razdoblja. Uzorci ploda masline su nakon prikupljanja stavljeni u plastične vrećice koje su obilježene datumom, mjestom i vremenom uzorkovanja (Slike 8-11). Uzorci su sadržavali od 50 do 300 plodova masline. Zatim su uzorci preneseni u Laboratorij za entomologiju i nematologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Ukupno je prikupljeno 14 uzoraka s 14 lokacija. Svaki uzorak masline je detaljno vizualno pregledan. Zabilježena je težina i broj maslina u svakom uzorku, te oštećenje ploda masline o maslinine muhe (*Bactrocera oleae*) (Slika 6). Iz svakog uzorka, dvadeset nasumično odabranih plodova maslina je izrezano skalpelom i detaljno pregledano kako bi se utvrdilo prosječno oštećenje plodova masline. Ocjenjeno je oštećenje na pokožici ploda u vidu tamnijih točkica, lezija ili osušenih područja koje nastaje nakon ovipozicije muhe, odnosno aktivnosti ličinke muhe, te su izdvojene i prebrojane ličinke ili kukuljice maslinine muhe. Iz svih ostalih plodova masline koji su imali simptome napada maslinine muhe izdvojene su ličinke i kukuljice muhe (Slika 6).



Slika 6a i 6b: Vaganje uzoraka plodova masline i kukuljica maslinine muhe (Snimila: M. Mesarić, 2023.)



Slika 7: Uzorak Vrana 1 (Snimila: M. Mesarić, 2023.)



Slika 8: Uzorak Vrana 2 (Snimila: M. Mesarić, 2023.)



Slika 9: Uzorak Brač (Snimila: M. Mesarić, 2023.)



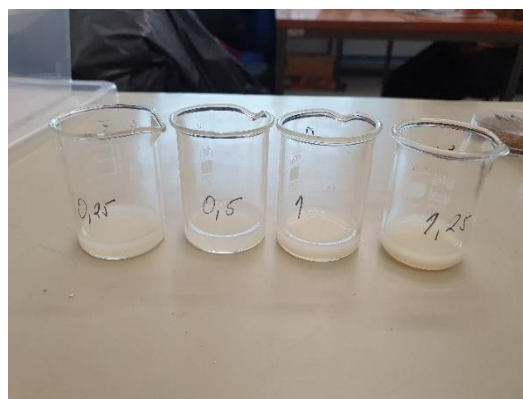
Slika 10: Uzorak Hvar (Snimila: M. Mesarić, 2023.)

## 6.2. Postavljanje pokusa

Za pokus su se koristile male plastične Petrijeve zdjele, pincete, vaga, mikropipete i drugi sitni laboratorijski pribor (Slika 16. i 17.). Pokus je postavljen u Petri posudama u kojima je postavljen vlažan vermikulit. Kako bi se postigla potrebna razina vlažnosti od 25 %, oko 125 mL destilirane vode pomiješano je s 500 g vermikulita. U svaku Petri zdjelu stavljeno je 5 g vlažnog vermikulita i 24 kukuljica maslinine muhe (Slika 18 i Slika 19). Svaka Petri zdjela je obilježena brojem tretmana, brojem ponavljanja i datumom. Svaki tretman u pokusu je postavljen u pet ponavljanja. Prvi tretman je bio negativna kontrola (voda). Drugi tretman je azadiraktin u koncentraciji od 0,25 %. Treći tretman je azadiraktin u koncentraciji od 0,5 %. Četvrti tretman je azadiraktin u koncentraciji od 1 %. Peti tretman tretiran je azadiraktin u koncentraciji od 1,25 %. Šesti tretman su entomopatogene nematode *S. feltiae* (300 IL/kukuljica). Sedmi i osmi tretman je pozitivna kontrola, kemijsko sredstvo za zaštitu bilja Actara (djelatna tvar tiametoksam 250 g kg<sup>-1</sup>) u koncentraciji 0,04 i 0,08 g L<sup>-1</sup>



Slika 11: Pipetiranje nematoda i neem ulja (Snimila: M. Mesarić)



Slika 12: Pripremljene otopine Neem ulja (Snimila: M. Mesarić)

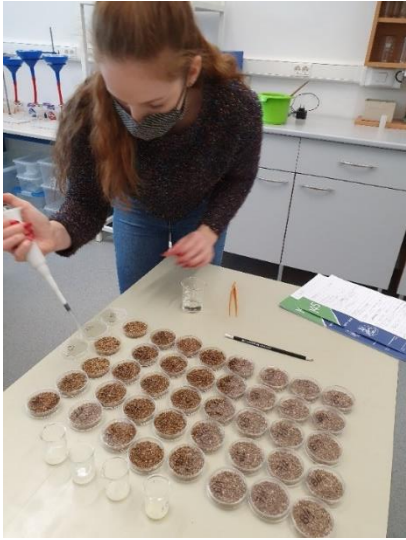
### 6.3. Entomopatogene nematode - *Steinernema feltiae*

Laboratorijski pokusi su provedeni u Laboratoriju za entomologiju, Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku tijekom listopada i studenog 2021. godine. Cilj pokusa je bio utvrditi utjecaj azadiraktina i biološkog sredstva za zaštitu bilja, entomopatogene nematode *Steinernema feltiae* (ISO16) na razvoj kukuljica maslinine muhe (*Bactrocera oleae*). *Steinernema feltiae* su autohtona vrsta entomopatogene nematoda. Ova vrsta je pronađena prvi puta u Hrvatskoj 2016. godine, te se od tada uzgaja na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek (Majić i sur., 2018.). Za potrebe pokusa EPN *S. feltiae* su uzgajane na gusjenicama velikog vosokovog moljca (*Galleria mellonella*). Infektivne ličinke nematoda su nakon izdvajanja iz uginulih gusjenica pregledane pod stereomikroskopom kako bi se utvrdila njihova vitalnost, te su čuvane u vodi do trenutka korištenja u pokusu. Infektivne ličinke su bile stare oko dva tjedna prije primjene u pokusu. Nematode su pomoću centrifuge koncentrirane u konusu Falcon tubice, a potom pomoću mikropipete prenešene izračunata je prosječna koncentracija nakon prebrojavanja nematoda u 10 kapljica 20  $\mu\text{L}$ . Konačna koncentracija nematoda je napravljena u fiksacijskoj posudi razrjeđivanjem kapljice nematoda iz Falcon tube s vodom. Po kukuljici je primjenjeno 50 infektivnih ličinki EPN.

### 6.4. Azadiraktin

U pokusu je upotrijebljeno ulje neema (Ozoneem, Proizvođač Ozone Biotech, Indija, koncentracija aktivne tvari azadiraktina 2,5 – 3  $\text{g L}^{-1}$ ) (Slika 14.). Ulje neem-a je razrjeđeno s vodom uz dodatak emulgatora Triton X-100 kako bi se dobila koncentracija od 25 %, 50 %, 80 %, i 100 % azadiraktina po mL otopine.

Pokus je postavljen 8.12.2021. godine, rezultati su se pratili dva, pet, sedam i devet dana nakon pokusa. Petri posude su čuvane na sobnoj temperaturi (oko 23°C) u mraku. Razvoj odraslih stadija maslinine muhe je praćen tijekom 10 dana nakon postavljanja pokusa.



Slika 13: : Tretiranje kukuljica  
maslinine muhe (Snimila: M.Mesarić)



Slika 14: Postavljen pokus  
(Snimila: M.Mesarić)



## 7. REZULTATI

Laboratorijsko istraživanje je provedeno kako bi se utvrdila prosječna oštećenost plodova masline od maslinine muhe u 2021. godini te utjecaj azadiraktina i entomopatogenih nematoda na razvoj kukuljica maslinine muhe. Uzorci ploda masline su prikupljeni u južnoj Dalmaciji, a rezultati oštećenja ploda su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Oštećenje ploda masline od maslinine muhe (*Bactrocera oleae*)

Uzorak broj	Datum uzorkovanja	Lokacija	Prosječna težina ploda masline (g)	broj ličinki po plodu masline	broj kukuljica po plodu masline	Oštećenje ploda masline (%)
1.	23.9.2021.	Vrana 1	3,17	0	0	0
2.	23.9.2021.	Vrana 2	3,20	0	0	0
3.	13.9.2021.	Brač	4,66	0	0	0
4.	13.9.2021.	Kaštel Štafilčić	4,48	0	0	0
5.	20.9.2021.	Hvar 1	3,74	0	<1	1
6.	20.9.2021.	Hvar 2	6,08	<1	<1	20
7.	20.9.2021.	Hvar 3	6,03	0	<1	25
8.	20.9.2021.	Hvar 4	3,86	<1	0	1
9.	20.9.2021.	Hvar 5	7,17	0	<1	5
10.	20.9.2021.	Hvar 6	3,39	<1	1	30
11.	20.9.2021.	Hvar 7	6,23	0	<1	5
12.	20.9.2021.	Hvar 8	5,89	0	1	5
13.	20.9.2021.	Hvar 9	4,85	<1	1	25
14.	28.9.2021.	Slivno	3,86	<1	0	5

Prosječna težina 24 kukuljice je iznosila 0,13 grama (Slika 7b). Prosječna težina ploda masline iz analiziranih uzoraka je iznosila 4,75 g. U tablici 1 je vidljivo da se oštećenje ploda

masline kretalo od minimalno 0 do 30 % pregledanih plodova masline. Naveće oštećenje plodova masline, od 1 do 30 %, utvrđeno je u uzorcima prikupljenim na otoku Hvaru. U Uzorcima Vrana 1, Vrana 2, Brač i Kaštel Štafilić nisu pronađeni simptomi oštećenja niti su pronađene kukuljice ili ličinke muhe.

U svim uzorcima je pronađen mali broj kukuljica i ličinki. Kukuljice i ličinke su pronađene u posudi i u vrećicama u kojoj su masline bile uskladištene prije analize. Oštećeni plodovi masline imali su jasne simptome napada maslinine muhe, a detaljnom analizom ploda utvrđeni su tragovi ishrane ličinke i kukuljice (Slika 16. i 17.).



Slika 15: Simptomi oštećenja ploda masline od maslinine muhe (Snimila: M. Mesarić)



Slika 16: Kukuljice maslinine muhe izdvojene iz ploda masline (Snimila: M.



Slika 17: Odrasli stadij maslinine muha utvrđen u tretmanu negativne kontrole (Snimila: M. Mesarić)

U tablici 2 su prikazani rezultati utjecaja svih tretmana na razvoj odraslih stadija maslinine muhe, odnosno utjecaj tretmana na razvoj kukuljice maslinine muhe. Najveći broj odraslih

stadija, tj. muha u svim tretmanima osim pozitivne kontrole (Actara) utvrđen je deveti dan nakon posatvljanja pokusa. Najveći broj muha je utvrđen u negativnoj kontroli, odnosno u vermikulitu koji je tretiran običnom vodom. Oba tretmana s kemijskim sredstvom za zaštitu bilja su spriječila razvoj kukuljica u potpunosti, s obzirom da nije došlo do pojave odraslog stadija maslinine muhe, te se može smatrati uspješnom pozitivnom kontrolom već pri niskim koncentracijama od 0,04 g aktivne tvari L<sup>-1</sup>. Različite koncentracije azadiraktina različito su utjecale na razvoj štetnika. Svi tretmani azadiraktina osim tretmana s 1,25 % aktivne tvari po mL otopine su imali su zamjetan ali slabi učinak na razvoj kukuljica u usporedbi s negativnom kontrolom. Tretman azadiraktina 1,25 % imao je jednako visoku učinkovitost kao i entomopatogene nematode. Uspoređujući s pozitivnom kontrolom, gotovo jednaka učinkovitost je utvrđena kod ova dva tretmana. Samo jedan imago se razvio nakon devet dana pokusa.

Tablica 2. Utjecaj tretmana na pojavu odraslih stadija maslinine muhe (*Bactrocera oleae*)

Tretman	Dan poslije tretmana				
	2	5	7	9	Ukupno
Kontrola (voda)	0	0	0	6	6
Azadiraktin 0,25% d.t.	0	0	0	3	3
Azadiraktin 0,5% d.t.	0	0	0	3	3
Azadiraktin 1 % d.t.	1	0	0	3	4
Azadiraktin 1,25 % d.t.	1	0	0	0	1
EPN ( <i>S. feltiae</i> ) (50 IL kukuljica <sup>-1</sup> )	0	0	0	1	1
Actara 0,04 g L <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0
Actara 0,08 g L <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0

## 8. RASPRAVA

U ovom diplomskom radu utvrđeno je prosječno oštećenje plodova masline od maslinine muhe (*Bactrocera oleae*), te je ispitan utjecaj različitih koncentracija azadiraktina i entomopatogenih nematoda na kukuljice ovog štetnika. Suzbijanje masline muhe može se provoditi mehaničkim, kemijskim i biološkim mjerama. Sve je veća potražnja za ekološki proizvedenim maslinovim uljem. Takav proizvod na tržištu razvijenih europskih zemalja postiže znatno veću cijenu, stoga se uz konvencionalnu metodu zaštite, danas sve više koriste ekološki prihvatljivije metode suzbijanja maslinine muhe. Uspoređujući dobivene rezultate s drugim istraživanjima, Abd El-Salam i sur. (2018.) su utvrdili da azadiraktin smanjuje hranjenje ličinka, stvara nepravilno oblikovane kukuljice i imaga, sterilna jaja i smanjenu plodnost štetnika. U navedenom istraživanju ispitali su proizvode Entomax i Neem Azal na maslininoj muhi u stadiju ličinke. Obavljena su četiri prskanja na deset stabala masline tijekom četiri tjedna. Entomax je primjenjem u količini od 3 mL L<sup>-1</sup>. Neem Azal primjenjem je u količini od 1 mL L<sup>-1</sup> na deset nasumično tretiranih stabala masline starosti pet godina. Djelatna tvar azadiraktin u bazi Entomaxa je sadržavao 0,15%, a kod Nemm Azal 1%. Utvrđen je 93,2% mortalita tijekom četiri tretmana Entomaxa, dok je za Neem Azal mortalitet iznosio 70,64%. U ovom diplomskom radu utvrđen je slabiji utjecaj azadiraktina u odnosu na prethodna istraživanja. U odnosu na kontrolu, azadiraktin je smanjio populaciju maslinine muhe za 50 – 66 % ovisno o koncentraciji. Različiti rezultati mogu biti jer su kukuljice otporniji stadij u odnosu na tretirane ličinke u uspoređenom istraživanju. Također, u diplomskom radu korištena je samo jedna primjena azadiraktina, a moguće je da bi se ostvarila veća učinkovitost azadiraktina na razvoj odraslih stadija maslinine muhe da je bila ponovljena primjena nakon nekoliko dana. Nawaz i sur. (2023.) su istraživali učinkovitost insekticida tiametoksam na maslininu buhu (*Euphyllura olivina*) koja je također bio testiran u ovom diplomskom radu. Tiametoksam je primjenjen u koncentraciji od 0,2 g L<sup>-1</sup>. Utvrđeno da je za tjedan dana nakon tretiranja tiametoksamom mortalitet imaga maslinove buhe iznosio 49 %. U ovom diplomskom su primjenjene dvije različite doze od dva tretmana tretirane Actarom 25% iste djelatne tvari. U vrlo niskoj koncentraciji od 0,04 g L<sup>-1</sup> mortalitet kukuljica je bio 100 %, kao i u većoj koncentraciji tiametoksama. Što ukazuje da su kukuljice maslinine muhe osjetljive na ovaj insekticid i preporuča ga se u integriranoj zaštiti masline.

## 9. ZAKLJUČAK

U zaključku ovog diplomskog rada možemo istaknuti da su istraživane metode suzbijanja maslinove muhe (*Bactrocera oleae*) s upotrebom azadiraktina (aktivne tvari iz OzoNeem ulja) i entomopatogenih nematoda pokazale značajnu učinkovitost u smanjenju populacije ovog štetnika. Ove metode predstavljaju ekološki prihvatljiviju alternativu konvencionalnim kemijskim insekticidima i pružaju niz prednosti u kontroli maslinove muhe. Sve ispitane koncentracije azadiraktina su imale značajan utjecaj na razvoj maslinine muhe. No entomopatogene nematode su imale bolju učinkovitost. Entomopatogene nematode *S. feltiae* u koncentraciji od 50 infektivnih ličinki nematoda po kukuljici štetnika su se pokazale više od 90 % učinkovitima u suzbijanju maslinove muhe. Njihova primjena rezultirala je visokim postotkom mortaliteta kukuljica maslinove muhe, čime su pridonijele smanjenju populacije štetnika. Azadiraktin djeluje na različite načine, uključujući repelentno djelovanje, inhibiciju razvoja ličinki, djelovanje na probavni sustav i ishranu štetnika, te na razmnožavanje. Uzimajući u obzir sve ove činjenice, zaključujemo da su azadiraktin iz OzoNeem ulja i entomopatogene nematode dobra rješenja za suzbijanje maslinine muhe. Ovi rezultati podržavaju potrebu za ekološki prihvatljivijim pristupom suzbijanju štetnika u maslinicima, što može doprinijeti proizvodnji ekološki proizvedenog maslinovog ulja i smanjenju upotrebe kemikalija u poljoprivredi.

## 10. POPIS LITERATURE

1. Abd El-Salam, A.M.E., Salem, S. A., El-Kholy, M.Y., Abdel-Rahman, R.S. (2014.): The repellent and toxic effects of some eco-friendly formulations against the important olive tree insects in Egypt. *Bioscience Research*, 15(4):3914-3925.
2. Alfonso, M.B., Jones, O. (2002.): Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *Biological and Biotechnical methods*, 1(4):200-208.
3. Barbosa, W. F., De Meyer, L., Guedes, R. N., Smagghe, G. (2015.): Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology* 24, 130–142 doi: 10.1007/s10646-014-1365-9.
4. Barić, B., Pajač, I. (2012.): Maslinina muha. *Glasilo biljne zaštite*, 1(1):304-307.
5. Bjeliš, M. (2005.): *Zaštita masline u ekološkoj proizvodnji*. Solin: Vlastita naklada.
6. Barić, B., Pajač, I. (2012.): Maslinina muha (*Bactrocera oleae*), *Glasilo biljne zaštite*, 1(1):208-216.
7. Chaudhary, S., Kanwar, R.K., Sehgal, A., Cahill, D.M., Barrow, C.J., Sehgal, R. Kanwar, J.R. (2017.): Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. *Front. Plant Sci.* 8(1):610-616.
8. Chen, S. (2016.): Proteomic analysis of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* IS-6 IJs under evaporative and osmotic stresses. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145(1):195–204.
9. Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., Gorska-Ponikowska, M. (2018.): Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *International journal of molecular sciences*, 19(3): 686-697.
10. Dminić Rojnić, I. (2013.): *Biologija i ekologija maslinine muhe (Bactrocera oleae Gmelin) i maslininog moljca (Prays oleae Bern.) u Istarskoj županiji: doktorski rad*. Zagreb: Vlastita naklada.
11. Farshid, O. Sirjani, E.E., Lewis, H.K. (2009.): Evaluation of entomopathogenic nematodes against the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*. 48(3):274-280.
12. Franulović, L. (2020.): *Osjetljivost sorti masline na pojavu gljivičnih bolesti plodova masline tijekom berbe i skladištenja. Doktorska disertacija*. Zagreb: Vlastita naklada.

13. Gazit, Y., Rossler, Y., Glazer, I. (2000.): Evaluation of Entomopathogenic Nematodes for the Control of Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae), *Biocontrol Science and Technology*, 10(2):157-164.
14. Torrini, G., Mazza, G., Benvenuti, C., Roversi, P.F. (2017.): Susceptibility of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) pupae to entomopathogenic nematodes. *J. Plant Protect.* 57(3):318–320.
15. Godjo A., Zadji L., Decraemer W., Willems A., Afouda L. Pathogenicity of indigenous entomopathogenic nematodes from Benin against mango fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) under laboratory conditions. *Biol. Control.* 2018;117:68–77.
16. Guo, Z., Jia, X., Zheng, Z., Lu, X., Zheng, Y., Zheng, B., Xiao, J. (2018.): Chemical composition and nutritional function of olive (*Olea europaea* L.): A review. *Phytochemistry Reviews*, 17(1):1091-1110.
17. Hojsak, L. (2021). Osjetljivost domaćih i udomaćenih sorti masline na napad maslinine muhe u maslinicima na području Vodnjana i Benkovca. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. Zagreb.
18. Karnavar, G.K. (1987.): Influence of azadirachtin on insect nutrition and reproduction. *Proc. Ind. Acad. Soc.* 96(3):341-347.
19. Kilani-Morakchi, S., Morakchi-Goudjil, H., Sifi, K. (2021.): Azadirachtin-Based Insecticide: Overview, Risk Assessments, and Future Directions. *Front. Agron.* 3(1):208-216.
20. Lai, D., Jin, X., Wang, H., Yuan, M., and Xu, H. (2014.): Gene expression profile change and growth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin. *Biotechnology* 185(1):51–56. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.06.014
21. Lin, T., Liu, Q., and Chen, J. (2016.): Identification of differentially expressed genes in *Monochamus alternatus* digested with azadirachtin. *Sci. Rep.* 6:33484. doi: 10.1038/srep33484.
22. Maceljiski, M. (2002.): Poljoprivredna entomologija. Čakovec: Zrinski
23. 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 *Lasioptera rubi*. *Plant Protection Science* 55(2):134-141.
24. Majić, I., Sarajlić, A., Lakatos, T., Tóth, T., Raspudić, E., Zebec, V., Šarić, G.K., Kovačić, M., Laznik, Ž. (2018): First Report of Entomopathogenic Nematode

25. *Steinernema Feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) from Croatia. *Helminthologia*. 28(3):256-260. doi: 10.2478/helm-2018-0024.
26. Malheiro, R., Casal, S., Baptista, P., Pereira, J. A. (2015.): A review of *Bactrocera oleae* (Rossi) impact in olive products: From the tree to the table. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2):226-242.
27. Bjeliš, M. (2005.): *Zaštita masline u ekološkoj proizvodnji*. Solin: Vlastita naklada.
28. Miljković, I., Gašparec-Skočić, Lj., Milat, V., Strikić, F., Oplanić, M., Bjeliš, M., Čelar, I., Petričević, S., Jurišić, Z., Verbanac, D., Poljuha, D., Tratnik, M., Katalinić, I., Ševar, M., Bičak, L., Šimunović, V., Niskota, J., Orenda, J., Skakelja, S., Deur, M., Bolić, J., Bulimbašić, S., Milat, I., Brkan, B. (2011). *Maslina i maslinovo ulje: Božji dar u Hrvata*, Mavi d.o.o., Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zagreb.
29. Arabi Awan, M., Husnain Nawaz, H., Akhtar, N., Ali Awan, A. (2023.): A Behavioral Study of Different Chemicals for the Management of Olive Psyllids. *Pakistan Journal Agriculture*. 36(1):46-51.
30. Usman, M., Gulzar, S., Wakil, W., Wu, S., Piñero, J.C., Leskey, T.C. (2020.): Virulence of Entomopathogenic Fungi to *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) and Interactions With Entomopathogenic Nematodes, *Journal of Economic Entomology*, 113(6):2627–2633.
31. Oberemok, V. V., Laikova, K. V., Gninenko, Y. I., Zaitsev, A. S., Nyadar, P. M., & Adeyemi, T. A. (2015.): A short history of insecticides. *Journal of Plant Protection Research*, 55(3):201-211.
32. Sirjani, F. O., Lewis, E. E., Kaya, H. K. (2009.): Evaluation of entomopathogenic nematodes against the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 48(3), 274-280.
33. Škarica, A., Žužić, I., Bonifačić, M. (1996.): *Maslina i maslinovo ulje visoke kakvoće u Hrvatskoj*, Tipograf d.d., Rijeka.
34. Torrini, G., Mazza, G., Benvenuti, C., Roversi, P. F. (2017.): Susceptibility of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) pupae to entomopathogenic nematodes. *Journal of Plant Protection Research*, 57(3):98-107.
35. Torrini, G., Mazza, G., Benvenuti, C., Simoncini, S., Landi, S., Frosinini, R., Roversi, P. F. (2020.): Entomopathogenic nematodes as potential biocontrol agents against *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science and Technology*, 30(9):909-919.



36. Usman, M., Wakil, W., Shapiro-Ilan, D. I. (2021). Entomopathogenic nematodes as biological control agent against *Bactrocera zonata* and *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 163(1):104706.

#### POPIS INTERNETSKIH IZVORA

1. <https://rezistentnost-szb.hr/stetnici/agronomija/maslinina-muha> (datum pristupa: 22.9.2023.)
2. <https://www.agroklub.com/kolumna/kuca-je-prokleta-ako-se-posjece-maslina/20640/> (datum pristupa: 22.9.2023.)
3. <https://alchetron.com/Olive-fruit-fly> (datum pristupa: 22.9.2023.)
4. [https://www.inaturalist.org/taxa/326609-Bactrocera-oleae/browse\\_photos](https://www.inaturalist.org/taxa/326609-Bactrocera-oleae/browse_photos) (datum pristupa: 22.9.2023.)
5. <https://www.savjetodavna.hr/2017/09/01/maslinina-muha-bactrocera-oleae-gmel/?print=print>. (datum pristupa: 28. 10. 2023.)
6. <https://www.savjetodavna.hr/2017/09/01/maslinina-muha-bactrocera-oleae-gmel/?print=print> (datum pristupa: 22.9.2023.)
7. <https://www.savjetodavna.hr/2017/09/01/maslinina-muha-bactrocera-oleae-gmel/?print=print> (datum pristupa: 22.9.2023.)
8. <https://repositorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr%3A2112/datastream/PDF/vie> (datum pristupa: 23.9.2023.)
9. <https://www.chromos-agro.hr/maslinina-muha-bactrocera-oleae/> (datum pristupa: 23.9.2023.)
10. <https://www.savjetodavna.hr/product/maslinina-muha/> (datum pristupa: 23.9.2023.)
11. <https://www.agroklub.com/eko-proizvodnja/kako-koristiti-neem-ulje/85083/> (datum pristupa: 23.9.2023.)
12. [https://www.orozpharm.hr/proizvodi/dokumenti/1508232673\\_2017101711311341.pdf](https://www.orozpharm.hr/proizvodi/dokumenti/1508232673_2017101711311341.pdf) (datum pristupa: 24.9.2023.)
13. <https://rezistentnost-szb.hr/stetnici/agronomija/maslinina-muha> (datum pristupa: 24.9.2023.)
14. <https://hrcak.srce.hr/pretraga?q=maslinina+muha> (datum pristupa: 24.9.2023.)
15. <https://www.countyofnapa.org/DocumentCenter/View/3134/Olive-Fruit-Fly-Control-Strategies-PDF?bidId> (datum pristupa: 24.9.2023.)

## 11. SAŽETAK

Suzbijanje masline muhe može se provoditi mehaničkim, kemijskim i biološkim mjerama. Zbog sve veće potražnje za ekološki proizvedenim uljem, te zbog pojave rezistentnosti štetnika na kemijska sredstva, danas sve više ispituju ekološki prihvatljivije metode suzbijanja maslinine muhe. Cilj rada utvrditi prosječno oštećenje plodova masline od maslinine muhe (*Bactrocera oleae*), te je ispitan utjecaj različitih koncentracija azadiraktina i entomopatogenih nematoda na kukuljice ovog štetnika. Plodovi masline su skupljeni iz maslinika u rujnu 2021. godine s područja južne Dalmacije. Ocjenjeno je oštećenje na pokožici ploda u vidu tamnijih točkica, lezija ili osušenih područja koje nastaje nakon ovipozicije maslinine muhe, odnosno aktivnosti ličinke muhe, te su izdvojene, izvagane i prebrojane ličinke ili kukuljice maslinine muhe. Oštećenje plodova masline se kretalo do najviše 30 % pregledanih plodova masline, a ovislo je najviše o lokaciji. Tako je na lokacijama na otoku Hvaru utvrđeno najveće oštećenje ploda masline. Laboratorijski pokus je proveden na kukuljicama maslinine muhe koje su postavljene u vlažni vermikulit. Vermikulit je tretiran s četiri različite koncentracije azadiraktina (OzoNeem), entomopatogenim nematoda *Steinernema feltiae*, uz pozitivnu (Actara 25%, tiametoksam) i negativnu (voda) kontrolu. Svi tretmani su značajno utjecali na razvoj kukuljica, odnosno na pojavu odraslih stadija maslinine muhe. U odnosu na negativnu kontrolu, tretman s entomopatogenim nematoda je bio najučinkovitiji. U usporedbi s kemijskim insekticidom, rezultati istraživanja pokazuju da su azadiraktin i entomopatogene nematode dobra rješenja za suzbijanje maslinine muhe, te se preporučuje njihovo uključivanje u metode integrirane zaštite masline. Ovo istraživanje potvrđuje učinkovitost ekološki prihvatljivih metoda zaštite maslina, smanjenje upotrebe kemikalija u poljoprivredi.

Ključne riječi: *Bactrocera oleae*, Neem ulje, nematode, maslina, regulatori rasta i razvoja kukaca

## 12. SUMMARY

Management of the olive fly can be carried out by mechanical, chemical and biological measures. Due to the increasing demand for ecologically produced olive oil, and due to the increased pest resistance to chemical agents, biocontrol of olive fruit fly has been tested intensively. The aim of the work was to determine the average damage to olive fruits by the olive fly (*Bactrocera oleae*), and the influence of different concentrations of azadirachtin and entomopathogenic nematodes (*Steinernema feltiae*) on the pupae of this pest. Olive fruits were collected from olive groves in September 2021 from the area of southern Dalmatia. The damage on the skin of the fruit in the form of darker spots, lesions or dried areas that occurs after the oviposition of the olive fly, i.e. the activity of the fly larvae, was assessed. The larvae or pupae of the olive fly were separated, weighed and counted. The damage to the olive fruits ranged up to a maximum of 30% of the olive fruits examined, and it depended mostly on the location of collected olive fruits. Thus, on the locations on the island of Hvar, the greatest damage to the olive fruit was determined. The laboratory experiment was carried out on olive fly pupae that were placed in moist vermiculite. Vermiculite was treated with four different concentrations of azadirachtin (OzoNeem), an entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*, with positive (Actara 25%, thiamethoxam) and negative (water) controls. All treatments had a significant effect on the development of pupa i.e on the appearance of the adult stages of the olive fly. Compared to the negative control, the treatment with entomopathogenic nematodes was the most effective. Compared to chemical insecticides, research results show that azadirachtin and entomopathogenic nematodes are good solutions for olive fly control, and their inclusion in integrated olive protection methods is recommended. This research confirms the effectiveness of ecologically acceptable methods of olive protection, reducing the use of chemicals in agriculture.

Keywords: *Bactrocera oleae*, Neem oil, nematodes, insect growth regulator

### **13. POPIS SLIKA**

**Slika 1.:** Prikaz dijelova ploda masline

**Slika 2.:** Odrasla maslinina muha

**Slika 3.:** Prikaz razvojnih stadija maslinine muhe

**Slika 4.:** Ličinka maslinine muhe u plodu masline

**Slika 5.:** Kemijska struktura azadiraktina

**Slika 6a.:** Vaganje uzoraka plodova masline i kukuljica maslinine muhe

**Slika 6b.:** Vaganje uzoraka plodova masline i kukuljica maslinine muhe

**Slika 7.:** Uzorak Vrana 1

**Slika 8.:** Uzorak Vrana 2

**Slika 9.:** Uzorak Brač

**Slika 10.:** Uzorak Hvar

**Slika 11.:** Pipetiranje nematoda i neem

**Slika 12.:** Pripremljene otopine neem ulja

**Slika 13.:** Tretiranje kukuljica maslinine muhe

**Slika 14.:** Postavljen pokus

**Slika 15.:** Simptomi oštećenja ploda masline od maslinine muhe

**Slika 16.:** Kukuljice maslinine muhe izdvojene iz ploda masline

**Slika 17.:** Odrasli stadij maslinine muhe utvrđen u tretmanu negativne kontrole

## 14. POPIS TABLICA

**Tablica 1.** Oštećenje ploda masline od maslinine muhe (*Bactrocera oleae*)

**Tablica 2.** Utjecaj tretmana na pojavu odraslih stadija maslinine muhe (*Bactrocera oleae*)

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

### Utjecaj azadiraktina i entomopatogenih nematoda na kukuljice maslinine muhe (*Bactrocera oleae*)

Sažetak: Suzbijanje masline muhe može se provoditi mehaničkim, kemijskim i biološkim mjerama. Zbog sve veće potražnje za ekološki proizvedenim uljem, te zbog pojave rezistentnosti štetnika na kemijska sredstva, danas sve više ispituju ekološki prihvatljivije metode suzbijanja maslinine muhe. Cilj rada utvrditi prosječno oštećenje plodova masline od maslinine muhe (*Bactrocera oleae*), te je ispitan utjecaj različitih koncentracija azadiraktina i entomopatogenih nematoda na kukuljice ovog štetnika. Plodovi masline su skupljeni iz maslinika u rujnu 2021. godine s područja južne Dalmacije. Ocjenjeno je oštećenje na pokožici ploda u vidu tamnijih točkica, lezija ili osušenih područja koje nastaje nakon ovipozicije maslinine muhe, odnosno aktivnosti ličinke muhe, te su izdvojene, izvagane i prebrojane ličinke ili kukuljice maslinine muhe. Oštećenje plodova masline se kretalo do najviše 30 % pregledanih plodova masline, a ovislo je najviše o lokaciji. Tako je na lokacijama na otoku Hvaru utvrđeno najveće oštećenje ploda masline. Laboratorijski pokus je proveden na kukuljicama maslinine muhe koje su postavljene u vlažni vermikulit. Vermikulit je tretiran s četiri različite koncentracije azadiraktina (OzoNeem), entomopatogenim nematoda *Steinernema feltiae*, uz pozitivnu (Actara 25%, tiametoksam) i negativnu (voda) kontrolu. Svi tretmani su značajno utjecali na razvoj kukuljica, odnosno na pojavu odraslih stadija maslinine muhe. U odnosu na negativnu kontrolu, tretman s entomopatogenim nematoda je bio najučinkovitiji. U usporedbi s kemijskim insekticidom, rezultati istraživanja pokazuju da su azadiraktin i entomopatogene nematode dobra rješenja za suzbijanje maslinine muhe, te se preporučuje njihovo uključivanje u metode integrirane zaštite masline. Ovo istraživanje potvrđuje učinkovitost ekološki prihvatljivih metoda zaštite maslina, smanjenje upotrebe kemikalija u poljoprivredi.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Ivana Majić

Broj stranica: 43

Broj grafikona i slika: 17

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 50

Broj priloga: /

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Bactrocera oleae*, Neem ulje, nematode, maslina, regulatori rasta i razvoja kukaca

Datum obrane: 29.9.2023.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ankica Sarajlić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor
3. prof. dr. sc. Vesna Rastija, član

Rad je pohranjen u: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

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

Graduate thesis

### **The effect of azadirachtin and entomopathogenic nematodes on the pupae of the olive fly (*Bactrocera oleae*)**

Summary: Management of the olive fly can be carried out by mechanical, chemical and biological measures. Due to the increasing demand for ecologically produced olive oil, and due to the increased pest resistance to chemical agents, biocontrol of olive fruit fly has been tested intensively. The aim of the work was to determine the average damage to olive fruits by the olive fly (*Bactrocera oleae*), and the influence of different concentrations of azadirachtin and entomopathogenic nematodes (*Steinernema feltiae*) on the pupae of this pest. Olive fruits were collected from olive groves in September 2021 from the area of southern Dalmatia. The damage on the skin of the fruit in the form of darker spots, lesions or dried areas that occurs after the oviposition of the olive fly, i.e. the activity of the fly larvae, was assessed. The larvae or pupae of the olive fly were separated, weighed and counted. The damage to the olive fruits ranged up to a maximum of 30% of the olive fruits examined, and it depended mostly on the location of collected olive fruits. Thus, on the locations on the island of Hvar, the greatest damage to the olive fruit was determined. The laboratory experiment was carried out on olive fly pupae that were placed in moist vermiculite. Vermiculite was treated with four different concentrations of azadirachtin (OzoNeem), an entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*, with positive (Actara 25%, thiamethoxam) and negative (water) controls. All treatments had a significant effect on the development of pupa i.e on the appearance of the adult stages of the olive fly. Compared to the negative control, the treatment with entomopathogenic nematodes was the most effective. Compared to chemical insecticides, research results show that azadirachtin and entomopathogenic nematodes are good solutions for olive fly control, and their inclusion in integrated olive protection methods is recommended. This research confirms the effectiveness of ecologically acceptable methods of olive protection, reducing the use of chemicals in agriculture.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Ivana Majić

Number of pages: 43

Number of figures: 17

Number of tables: 2

Number of references: 50

Number of appendices: /

Original in: Croatian

Key words: *Bactrocera oleae*, Neem oil, nematodes, insect growth regulator

Thesis defended on date: 29.9.2023.

Reviewers:

1. Dr Ankica Sarajlić, associate professor, chair
2. Dr Ivana Majić, full professor, mentor
3. Dr. Vesna Rastija, full professor, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Science Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek