

**Sveučilište u Zagrebu**

**Agronomski fakultet**

**Karla Neral, Borna Nađ**

**Učinak botaničkog insekticida azadirachtin na intenzitet ishrane i smrtnost različitih  
razvojnih stadija krumpirove zlatice**

**Zagreb, 2017**

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za poljoprivrednu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Renata Bažok i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017. godini.

## SADRŽAJ RADA

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>6</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Sakupljanje i uzgoj kukaca.....</b>	<b>7</b>
<b>3.2. Korišteni insekticid.....</b>	<b>8</b>
<b>3.3. Postavljanje pokusa.....</b>	<b>9</b>
<b>3.4. Očitavanje pokusa i analiza rezultata.....</b>	<b>12</b>
3.4.1. Intenzitet ishrane odraslih i ličinki.....	12
3.4.2. Učinkovitost pripravaka.....	13
3.4.3. Obrada podataka.....	14
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Učinkovitost pripravaka.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2. Učinak na intenzitet ishrane .....</b>	<b>17</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>20</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>24</b>
<b>7. ZAHVALE.....</b>	<b>25</b>
<b>8. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>26</b>
<b>SAŽETAK.....</b>	<b>29</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>30</b>

## 1. UVOD

Štete od biljnih nametnika mogu se podijeliti na izravne i neizravne. Izravne štete očituju se smanjenjem vrijednosti proizvodnje uslijed sniženja količine i kvalitete biljnih proizvoda. Suprotno od izravnih šteta, neizravne štete očituju se kao popratni učinci pojave biljnih nametnika. Kemijska sredstva za zaštitu bilja (SZB), iako su vrlo korisna jer sprječavaju napad štetnih organizama, izazivaju i štetan utjecaj na okoliš, te ih zbog toga treba primjenjivati samo kada je potrebno. Brojne su negativne nuspojave sintetičkih (kemijskih) insekticida primijećene u modernim poljoprivrednim sustavima: razvoj otpornosti kukaca, prekomjerni ostatci SZB na hrani, ostatci u okolišu, narušavanje prirodne ravnoteže i negativan utjecaj na neciljane organizme te njihova potencijalna otrovnost za čovjeka. Kao jedna od alternative stihijskoj primjeni sredstava za zaštitu bilja, razvijena je integrirana zaštita bilja (IZB). Sa svrhom unaprjeđena IZB danas se provode intenzivna istraživanja različitih alternativnih mjera u suzbijanju populacija štetnika te se nastoji što je moguće više koristiti sredstva za zaštitu bilja prirodnog porijekla (Grdiša i Gršić, 2013).

Nova Regulativa (EU 1107/2009) od 21. listopada 2009. o stavljanju u promet SZB zamjenjuje postojeću Direktivu (EU 91/414/EEZ). Ona pokriva registraciju, kontrolu i primjenu SZB. Također, nova Regulativa propisuje detaljnu ocjenu rizika i registraciju djelatne tvari i SZB koja te djelatne tvari sadrže. Za registraciju djelatne tvari treba dokazati da je ona sigurna što se tiče zdravlja ljudi (uključujući ostatke pesticida u hrani), zdravlja životinja i okoliša. Proizvođači moraju posjedovati opsežnu dokumentaciju (dossier) o znanstvenim istraživanjima aktivne tvari kojom se to dokazuje. Na razini EU uspostavljena je tzv. Pozitivna lista aktivnih tvari što znači da države članice EU mogu registrirati i staviti u promet samo one aktivne tvari koje su uvrštene na tu Listu (CROCPA, 2016). Sve navedeno dovelo je do smanjenja broj djelatnih tvari kemijskih SZB koje su dozvoljene za suzbijanje štetnih organizama, pri čemu je posebno smanjen broj djelatnih tvari insekticida.

### **Biljni insekticidi**

Alternativa kemijskim insekticidima su biološke mjere suzbijanja štetnih organizama odnosno izravno ili neizravno korištenje različitih organizama i njihovih proizvoda za suzbijanje štetnika, a uključuju korištenje mikroorganizama; najčešće su formulirani u obliku posebnih pripravaka sličnih kemijskim sredstvima za zaštitu bilja (virusi, bakterije, gljive) i makroorganizama (kukci, nematode, grinje) (Igrc Barčić i Maceljski, 2001). U biopesticide osim prirodnih spojeva biljaka ubrajamo i spojeve životinja, primjerice morskih crva i

škorpiona. Slične, ali sintetske spojeve i derivate, primjerice piretroide i nereis toksine, ubrajamo u kemijska, a ne u biološka sredstva za zaštitu bilja (Igrc Barčić i Maceljki, 2001).

Najzastupljeniji su biljni (botanički) insekticidi koji se dijele na industrijske proizvode i proizvode kućne proizvodnje. Biljni insekticidi prva su korištena grupa insekticida koja se koristila u povijesti čovječanstva. Spominju se još u egipatskim, kineskim, grčkim i rimskim drevnim tekstovima. Glede proizvodnje biljnih insekticida, neki od problema su: dug i skup istraživački put od laboratorijskih rezultata do njihove primjene u praksi jer je djelotvornost ekstrahiranih supstancija samo jedan od parametara za uvođenje biljnih insekticida u komercijalnu proizvodnju i u praksu. Značajno je da biljni insekticid treba ispunjavati i druge kriterije kao što su biološki kriteriji (toksičnost za sisavce, minimalni utjecaj na prirodu), dovoljni izvori biljnog ekstrakta, standardizacija proizvodnje i kontrola kakvoće djelotvornih supstancija u supstratu, problemi oko patentiranja biljnog insekticida, udovoljavanje zahtjevima za registracijom biljnih insekticida (Isman, 1997). Nedovoljno je istražena njihova razgradnja u tlu, interakcija s prirodnim neprijateljima, interakcija s okolišom ovisno o dozama, učinkovitost na štetne kukce te broj štetnika na koje iskazuju djelotvornost. Najčešći industrijski proizvedeni biljni (botanički) insekticidi su neem, pyrethrum, rotenone, sabadilla, quassia, ryania, esencijalna ulja te drugi izvori s insekticidnim učincima.

### **Azadirachtin**

Indijski jorgovan ili **neem** (*Azadirachta indica* A. Juss) sistematiziran je u porodicu Meliaceae (Siddiqui i sur., 2004. cit. Grdiša i Gršić, 2013). Porijeklom je iz južne i jugoistočne Azije, danas se uzgaja u tropskim i subtropskim područjima Afrike, Sjeverne i Južne Amerike i Australije (Schmutterer, 1990. cit. Grdiša i Gršić, 2013). Glavni aktivni sastojak neem-a je azadirachtin, tetranortriterpenoid limonoid (Mordue i Blackwell, 1993. cit. Grdiša i Gršić, 2013). Azadirachtin je prisutan u manjim količinama u svim dijelovima stabla, ali najveća koncentracija nalazi se u sjemenkama (0,2-0,6 %) (Govindchari, 1992. cit. Grdiša i Gršić, 2013). Azadirachtin, kao biljni insekticid ima povoljniji utjecaj na okoliš, zdravlje ljudi i životinja u odnosu na kemijske insekticide pa njegovo korištenje pokazuje pozitivan trend. Azadirachtin ima široki spektar djelovanja na štetne kukce; djeluje repelentno, ometa ishranu, djeluje kao regulator rasta i razvoja (IGR), ometa ovipoziciju, utječe na plodnost i utječe na pokretljivost kukaca (Schmutterer, 1990. cit. Grdiša i Gršić, 2013). Danas se djelatne tvari na osnovi neem-a za komercijalnu upotrebu prodaju pod trgovačkim nazivima poput NeemGold,

NeemAzal, Econeem, Neemark, Neemcure i Azatin u mnogim zemljama poput SAD-a, Indije, Njemačke i nekih latinoameričkih zemalja (Silva-Aguayo, 2016).

Azadirachtin djeluje na mnogo vrsta kukaca, djelovanje mu je kratkotrajno, brzo se razgrađuje te je vrlo malo otrovan za čovjeka (Ševar, 2015).

Većina literaturnih izvora navodi kako je porijeklo neema iz Azije, negdje se spominje sjeverni Myanmar i regija Assam u Indiji (Stoney, 1997 cit. Csurhes, 2008).

Toksikologija azadirachtina podrazumijeva utjecaj na ljude koji mogu biti izloženi insekticidima (pesticidima) unoseći ih putem hrane, respiratornog sustava, dermalno (putem kože) i u kontaktu odnosno doticajem s očima. Oznake na pripravcima sadrže uputstva za upotrebu kako bi se održala niska izloženost aktivnoj tvari odnosno pripravku koji se primjenjuje (NPIC, 2016). Točne doze pri kojima dolazi do toksičnosti kod ljudi, još nisu poznate (Dhongade i sur., 2008). Azadirachtin se smatra netoksičnim za sisavce (kod oralne primjene na štakorima akutni LD50 je >5000 mg/kg), ribe i oprašivače (Isman, 2006). Azadirachtin nije opasan i otrovan za ribe ako se primjenjuje sukladno uputama (Miller i Uetz, 1998. cit. Korunić i Rozman, 2012).

Ekotoksikologija azadirachtina podrazumijeva njegovo ponašanje u tlu, otrovnost i opasnost za pčele te učinak na prirodne neprijatelje. Ponašanje azadirachtina u tlu odnosi se na adsorpciju i desorpciju istog. Adsorpcija i desorpcija azadirachtina proučavana je na pH 4.0 i 7.0 u steriliziranom i nesteriliziranom pješčanom šumskom tlu. Adsorpcija azadirachtina u tlu nije bila visoka te se smanjivala usporedno s povećanjem pH tla. Ako mikrobna razgradnja nije intenzivna, desorbirani azadirachtin može se ispirati u niže horizonte tla (Sundaram i sur., 1995). Prema ranije navedenom, u ekotoksikologiju ubrajamo i otrovnost i opasnost za pčele, koje su uz ostale neciljane člankonošce izuzetno važne u oprašivanju poljoprivrednih kultura te je temeljem navedenog posebno važno da primjena pesticida ne šteti populacijama istih. Radi zaštite pčela kod folijarne primjene i kod sjetve tretiranog sjemena Pravilnikom o uspostavi akcijskog okvira za postizanje održive uporabe pesticide propisane su mjere i postupci za smanjenje rizika. Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) procjenjuje se da od 100 biljnih vrsta od kojih se proizvodi 90 % hrane u svijetu, 71 biljna vrsta oprašuje se pčelama. Glavnina kultura koje se uzgajaju u Republici Hrvatskoj ovisi o oprašivanju pčelama i drugim oprašivačima. Uz navedeno, oprašivanje ima i nemjerljivi doprinos za očuvanje biološke raznolikosti (Ministarstvo poljoprivrede, 2016). Općenito, „prirodni“ proizvodi među koje pripada i azadirachtin imaju nižu persistentnost u

okolišu te su stoga smatrani ekološki i toksikološki sigurniji od trenutno korištenih sintetskih pesticida (Copping i sur., 2000, Duke i sur., 2010. cit. Xavier i sur., 2015). Uz ponašanje azadirachtina u tlu, otrovnost i opasnosti za pčele, važan segment ekotoksikologije azadirachtina također je i učinak istog na prirodne neprijatelje; korisni kukci u poljoprivredi imaju važnu ulogu u održavanju populacije štetnih kukaca. Korištenje sintetskih i botaničkih insekticida za posljedicu ima štetan utjecaj na prirodne neprijatelje u agroekoustavu. Pesticidi smanjuju pojavu parazitoida iz parazitiranih jaja domaćina te uzrokuju mortalitet. Stoga su pesticidi (insekticidi) potencijalna prijetnja biološkoj kontroli. U slučaju smanjene populacije prirodnih neprijatelja dolazi do prenamnažanja štetnika odnosno povećanja populacije istih, iz razloga smanjene brojnosti prirodnih neprijatelja koji će omogućiti biološku kontrolu/ravnotežu štetnika (Ndakidemi i sur., 2016). Sintetski i botanički pesticidi uzrokuju akutnu otrovnost i blage subletalne učinke na korisne organizme (prirodne neprijatelje) koji su važni u biološkom suzbijanju štetnika. Mogući negativni učinci botaničkih insekticida od velike su važnosti jer bi mogli ograničavati biološko suzbijanje. Botanički insekticidi često se kategoriziraju kao ekološki sigurni i prihvatljivi, ali njihova primjena u suzbijanju štetnih kukaca trebala bi se sagledavati uz određenu razinu opreza. Procjena potencijalnih rizika primjene pesticida na neciljane organizme od presudne je važnosti u ravnoteži ekosustava (biološko suzbijanje štetnika i oprašivanje) što posljedično doprinosi većim prinosima u poljoprivredi (Ndakidemi i sur., 2016).

Azadirachtin je registriran u Sjedinjem Američkim Državama kao pesticid za opću upotrebu koji je relativno netoksičan (Neemuses, 2016). U Švicarskoj je registriran za upotrebu u ekološkoj proizvodnji (Ecogrape, 2016). Azadirachtin pod različitim trgovačkim nazivima danas je registriran u cca 20-tak zemalja svijeta. Primjenjuje se samostalno ili u kombinacijama s drugim sredstvima za zaštitu bilja (FAO, 2016). NeemAzal je formulacija azadirachtina koja je registrirana u mnogim zemljama širom svijeta. S obzirom da je NeemAzal sistemični insekticid širokog spektra koji djeluje na sve štetnike koji grizu i sišu biljni sok, koristi se u suzbijanju štetnika na raznim kulturama i ima široku primjenu koja se odnosi na voće osim kruške (protiv lisnih uši, lisnih minera, cikada, tripsa i štitastih moljaca), vinovu lozu (protiv grozdovog moljca, cikada i tripsa), krumpir (protiv krumpirove zlatice, krumpirovog moljca i lisnih uši), povrtlarske kulture (protiv cikada, lisnih uši, lisnih minera, štitasti moljci, sovice), ukrasno bilje; staklenik (lisni minerer, lisne uši, bijele mušice, tripsi, cikade i štitasti moljci) i maslinu (tripsi i maslinov moljac) (Agroklub, 2016). Primjenu azadirachtina možemo usmjeriti i prema ostalim štetnicima u poljoprivrednoj proizvodnji,

među kojima su značajne i nematode; *Meloidogyne incognita* (Kofoid i White), *Meloidogyne javanica* (Treub) i *Pratylenchus* spp. (Proeco, 2017). Konačni oblik sredstva za zaštitu bilja u kojem se on stavlja u promet odnosno formulacija azadirachtina u kojoj dolazi na tržište je tekuće sredstvo (koncentrat) za emulziju (EC) (Proeco, 2017).

### **Krumpirova zlatica**

Krumpirova zlatica najvažniji je štetnik merkantilnoga krumpira. Taj je štetnik pridošlica u entomofaunu Hrvatske. Iz SAD-a u Europu (u Francusku) stigla je tijekom Prvog svjetskog rata. Brzo se proširila po cijeloj Europi osim po Engleskoj. Već 1946. godine otkrivena je u Sloveniji kod Krškoga, a 1947.g. nađena je u Zaprešiću (Maceljski, 2002). Vrlo brzo zlatica se udomaćila kao član entomofaune i postala najvažniji štetnik u proizvodnji merkantilnog krumpira. Dozvolu za suzbijanje krumpirove zlatice u RH ima veliki broj insekticida (Bažok, 2017). Većina ih je skupine organofosfornih insekticida i piretroida za koje je dokazana rezistentnost krumpirove zlatice u područjima sjeverno od Kupe i Save (Bezjak i sur., 2006). Stoga se za suzbijanje krumpirove zlatice preporučaju oni insekticidi na koje zlatica nije razvila rezistentost, mikrobiološki insekticidi ili njihove kombinacije s klasičnim kemijskim insekticidima u subletalnim dozama (Dobrinčić, 1996), naturaliti, inhibitori regulatora rasta i razvoja kukaca (Dobrinčić & Igrc Barčić, 1998). Svi oni djeluju na ličinke. Bezjak i sur. (2006) smatraju da su biljni insekticidi na osnovi azadirachtina i piretrina unatoč nešto nižoj polučenoj učinkovitosti preporučljivi u programima ekološke zaštite krumpira od krumpirove zlatice.

S obzirom da je krumpirova zlatica najvažniji štetnik merkantilnog krumpira u Republici Hrvatskoj, a da rezultati prethodnih istraživanja govore o tom da osim izravnog učinka na mortalitet krumpirove zlatice, azadirachtin ima i druge popratne učinke, odlučeno je utvrditi učinkovitost tri različite koncentracije azadirachtina na imaga i ličinke 1. i 3. razvojnog stadija krumpirove zlatice te učinak na intenzitet ishrane.



## **2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA**

Hipoteza ovog rada je da biljni insekticid azadirachtin djeluje kao regulator rasta i uzrokuje mortalitet krumpirove zlatice te da svojim repelentnim djelovanjem pridonosi smanjenju šteta. O razvojnem stadiju kukca ovisi učinkovitost azadirachtina a osim izravnog mortaliteta, azadirachtin može značajno smanjiti štete od ishrane svih razvojnih stadija. Nakon aplikacije azadirachtina različiti razvojni stadiji krumpirove zlatice različito reagiraju bilo u pogledu mortaliteta ili prestanka ishrane. Stoga je cilj istraživanja bio utvrditi učinak tri različite koncentracije azadirachtina na imaga i ličinke 1. i 3. razvojnog stadija krumpirove zlatice na mortalitet i intenzitet ishrane.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Laboratorijski pokusi provedeni su tijekom lipnja 2016. godine na Zavodu za poljoprivrednu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### **3.1. Sakupljanje i uzgoj kukaca**

Odrasli oblici krumpirove zlatice su za potrebe postavljanja pokusa sakupljeni u dva navrata, krajem svibnja i početkom lipnja 2016. na području Bjelovarsko-bilogorske županije. Biljke krumpira su za potrebe postavljanja pokusa djelomično uzgojene u vrtu Zavoda za poljoprivrednu zoologiju, a djelomično su donesene iz polja pri čemu se uvijek pazilo da se donesu netretirane biljke.

Nakon sakupljanja, odrasle zlatice donesene su u laboratorij 31.05.2016. i 5. lipnja 2016. Zlatica sakupljene 31. svibnja iskorištene su za zasnivanje uzgoja ličinki potrebnih za pokuse. Zlatice su smještene u dva entomološka kaveza u koja je prethodno postavljena dovoljna količina lisne mase krumpira u bočicama s vodom. Biljke su na vrhu bočice omotane pamučnom vatom da bi se spriječilo ulazak zlatica u bočicu. U svaki entomološki kavez postavljeno je dvadeset imaga krumpirovih zlatica (Slika 1.). Nakon što su zlatice počele odlagati jaja na biljke u kavezima, bočice s biljkama na kojima su bila jaja su premještene u nove kaveze u kojima nije bilo odraslih čime je spriječeno da zlatica u nedostatku hrane pojede list zajedno s jajima. Zlaticama u kavezima dodavane su svaki dan nove bočice s hranom. Pokusi s ličinkama 1. i 3. razvojnog stadija (L1 i L3) provedeni su nakon što je uzgojen dovoljan broj ličinki određenog razvojnog stadija.

Zlatice sakupljene 5. lipnja korištene su odmah nakon donošenja u laboratorij za pokuse s odraslima.



**Slika 1.** Entomološki kavezi s biljkama krumpira i odraslim oblicima krumpirove zlatice

(original)

### 3.2. Korišteni insekticid

U pokusima je korišten pripravak NeemAzal koji sadrži djelatnu tvar azadirachtin. Na hrvatskom tržištu distribuira ga tvrtka Pro-eco (Slika 2.).



**Slika 2.** Pripravak NeemAzal (EC) (original)

U pokusima su korištene tri doze insekticida, 2 l/ha, 3 l/ha i 4 l/ha i netretirana kontrola.

Pripravak NeemAzal T/S formuliran je kao koncentrat za emulziju (EC), sadrži 10 g/l azadirachtina, a prema uputama proizvođača (Proeco, 2017) koristi na velikom broju kultura kao što su povrće, agrumi, vinova loza, koštičavo i jezgričavo voće (osim kruške), malina, kupina, borovnica, ribiz, ogrozd, jagoda, maslina, smokva i dr. za suzbijanje lisnih uši, štitastih moljaca, muha lisnih minera, sovice, tripsa, krumpirove zlatice, lukove muhe, leptira, lisnih minera agruma, groždanih moljaca, cvrčaka, malog mrazovca, medećeg cvrčka, maslinovog moljca, stjenica i dr. Preporuča se uporaba u dozi od 3 l/ha.

### **3.3. Postavljanje pokusa**

Pokusi su uključivali slijedeće varijante

1. Kontrola- netretirano
2. NeemAzal 2 l/ha
3. NeemAzal 3 l/ha
4. NeemAzal 4 l/ha

Pokus s odraslim zlasticama postavljen je 6. lipnja, pokus s L1 ličinkama 7. lipnja, a pokus s L3 ličinkama 9. lipnja 2016. Pokus s odraslima uključivao je u svakoj varijanti 10 ponavljanja s jednim kukcem po ponavljanju. Pokusi s ličinkama uključivali su u svakoj varijanti četiri ponavljanja sa po 10 ličinki po ponavljanju.

Prije tretiranja listovima krumpira izmjerena je lisna površina nakon čega su tretirani insekticidom te kao hrana ponuđeni odraslim i ličinkama krumpirove zlatice. Tretiranje biljaka krumpira provedeno je za svaki pokus zasebno metodom umakanja listova krumpira u posudu sa škropivom. Koncentracija insekticida u škropivu pripremljena je tako da odgovara dozama od 2, 3 i 4 l/ha, a preračunata je pod pretpostavkom utroška škropiva od 1.000 l/ha. Listovi koji su ponuđeni zlasticama na netretiranoj varijanti kao hrana bili su umakani u čistu vodu.

Petrijeve posudice su za potrebe pokusa pripremljene tako da je na dno posudica postavljen filter papir, a na poklopac je flomasterom napisan broj varijante i redni broj ponavljanja. Nakon pripreme posudica pristupilo se tretiranju listova.

Nakon što je obavljeno tretiranje u svaku je petrijevu posudicu dodan list tretiranog krumpira i na njega određeni broj krumpirovih zlatice. U pokusu s odraslima to je bila jedna zlatica po petrijevoj posudici (Slika 3.), a u pokusima s ličinkama po 10 ličinki (Slika 4. i 5.) koje su pažljivo uz pomoć kista prenesene s biljaka krumpira na kojima su do tada uzgajane.



**Slika 3.** Postavljen pokus s odraslim oblicima krumpirove zlatice

(original)



**Slika 4.** Postavljen pokus s ličinkama prvog razvojnog stadija krumpirove zlatice

(original)



**Slika 5.** Postavljen pokus s ličinkama trećeg razvojnog stadija krumpirove zlatice

(original)

Petrijeve posudice čuvane su u prostoru laboratorija na sobnoj temperaturi koja se cijelo vrijeme trajanja pokusa nije spuštala ispod 20°C i nije prelazila 28°C.

### 3.4. Očitavanje pokusa i analiza rezultata

#### 3.4.1. Intenzitet ishrane odraslih i ličinki

Intenzitet ishrane na svakom ponavljanju u pokusu utvrđen je svakodnevno tijekom 96 sati od postavljanja pokusa. Lisna površina svakog lista krumpira postavljenog u pokuse izmjerena je uz pomoć milimetarskog papira prije tretiranja. Pojedinačni listovi su postavljeni na milimetarski papir te je ucrtavana lisna površina (Slika 6.). Brojanjem kvadratića na milimetarskom papiru izmjerena je lisna površina pri čemu se jedan kvadrat sastoji od sto manjih kvadratića odnosno predstavlja ekvivalent od 100 mm<sup>2</sup>. Svaka 24 sata postupak je ponovljen na način da je na isti papir ucrtavana nova kontura lista, a razlika od prethodnog dana predstavljala je lisnu površinu koju su konzumirali kukci u petrijevoj zdjelici. Ukoliko je procijenjeno da su oštećenja na lisnoj površini veća od 80 % isti list se uklanjao te se nadomještao novim čija je površina prethodno ucrtana na milimetarski papir.



**Slika 6.** Ucertavanje cjelovitog lista na milimetarski papir

(original)

### 3.4.2. Učinkovitost pripravaka

Pokusi su očitavani svakodnevno tijekom četiri dana (96 sati) ili do uginuća svih jedinki u pokusu. Za vrijeme očitavanja utvrđen je broj živih jedinki u svakoj petrijevoj posudici. Uz pomoć kista kukci su podražavani na reakciju te su temeljem reakcije razvrstavani kao živi ili mrtvi (Slika 7.). Mrtve ličinke su uklanjane iz petrijevih posudica (Slika 8.).



**Slika 7.** Očitavanje pokusa s odraslim oblicima (original)



**Slika 8.** Očitavanje pokusa sa ličinkama (original)

Temeljem utvrđenog broja mrtvih i živih jedinki u ponavljanju izračunat je mortalitet kukaca, a temeljem izračunatog mortaliteta na svim varijantama uključujući i netretiranu kontrolu izračunata je učinkovitost pri čemu je za izračun korištena formula Schneider-Orelli (1947).



$$\% \text{ učinkovitosti} = \frac{\text{mortalitet na tretmanu}(\%) - \text{mortalitet na kontroli}(\%)}{100 - \text{mortalitet na kontroli}(\%)} \times 100$$

Utvrđena konzumirana lisna površina u svakom ponavljanju bila je osnova za izračun učinkovitosti pripravaka u smanjenju intenziteta ishrane. Učinkovitost je izračunata prema formuli Abbotta (1925).

$$\% \text{ učinkovitosti} = \frac{\text{konzumirana lisna površina na kontroli (mm)} - \text{konzumirana lisna površina na tretmanu(mm)}}{\text{konzumirana lisna površina na kontroli (mm)}} \times 100$$

### 3.4.3. Obrada podataka

Podatci o konzumiranoj lisnoj površini, mortalitetima i učinkovitosti obrađeni su statistički uz pomoć analize varijance (ANOVA) i rangirani pomoću Duncanovog testa rangova uz pomoć programskog paketa ARM 9® (Gylling Data Management, 2015). Izračunu učinkovitosti pristupilo se samo za one varijante i datume očitavanja kod kojih je utvrđena statistički opravdana razlika između netretirane kontrole i varijanti u pokusu. U slučaju neravnomjerne distribucije podataka oni su transformirani uz pomoć  $\log(x+1)$  transformacije.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Učinkovitost pripravaka

Na pokusu s odraslim zlasticama mrtve jedinice utvrđene su u vrlo malom broju. Utvrđeni mortalitet na varijantama pokusa bio je između 10 i 30 %, a utvrđen je podjednako na tretiranim varijantama kao i na netretiranoj kontroli. Stoga se nije pristupilo izračunu učinkovitosti.

Statistički obrađeni podaci o mortalitetu ličinki u pokusima i razlike među njima na razini 5 % prikazani su u tablicama 1. i 2.

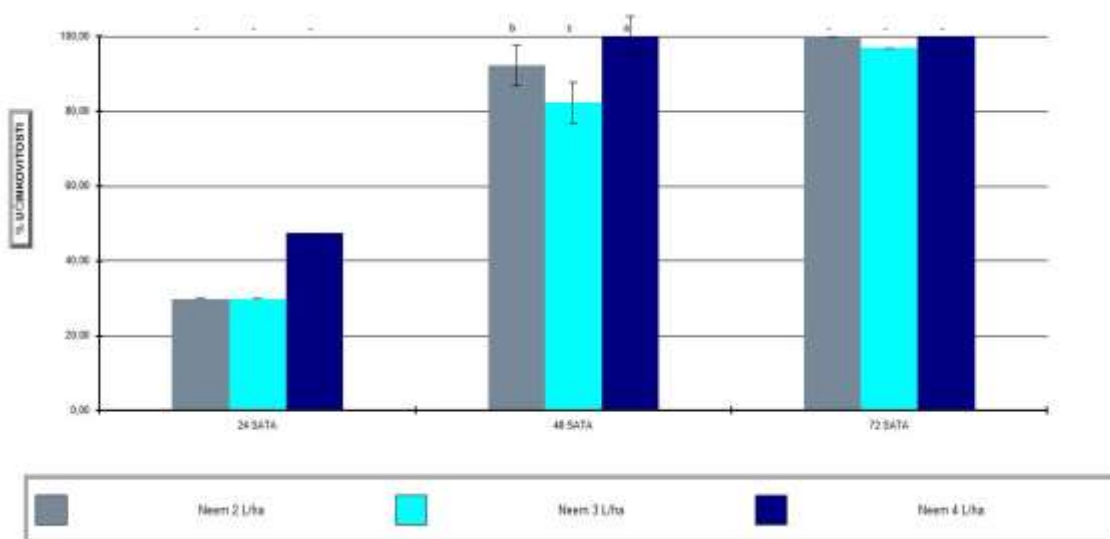
**Tablica 1.** Mortalitet ličinki prvog razvojnog stadija (L1) po danima, Zagreb, lipanj, 2016.

VARIJANTA	MORTALITET U % NAKON DANA		
	1.dan	2. dan	3. dan
1. NeemAzal 2 l/ ha	30,35±1,18	96,14±5,81 a	100,00±0,0 a
2. NeemAzal 3 l/ ha	31,82±1,05	92,22±9,69 a	97,22±5,56 a
3. NeemAzal 4 l/ ha	37,88±3,78	100,00±0,0 a	100,00±0,0 a
4. Kontrola	6,30±1,27	12,50±5,0 b	20,00±14,14 b
<b>LSD P= 5%</b>	<b>NS</b>	10,614	13,389

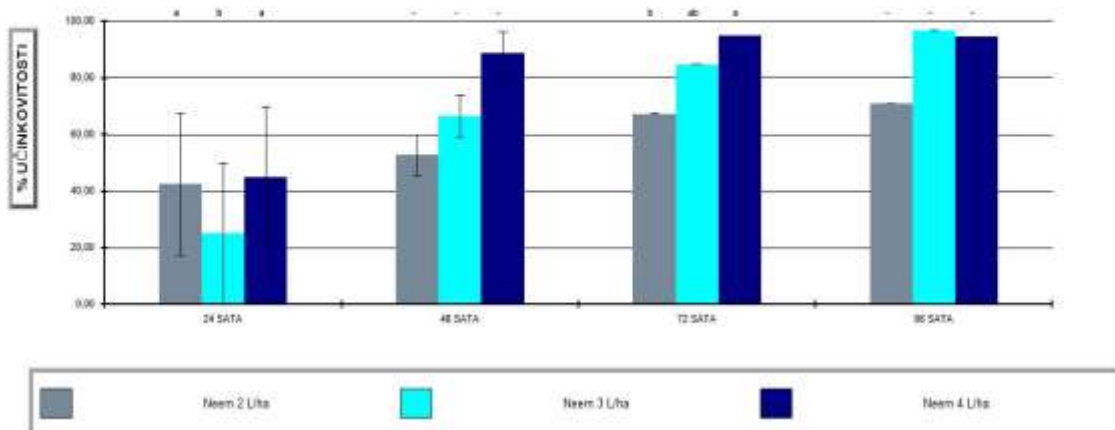
**Tablica 2.** Mortalitet ličinki trećeg razvojnog stadija (L3) po danima, Zagreb, lipanj, 2016.

VARIJANTA	MORTALITET U % NAKON DANA			
	1.dan	2. dan	3. dan	4. dan
1. NeemAzal 2 l/ ha	38,38±2,34 a	57,50±28,72 b	67,50±22,17 b	77,50±17,08 b
2. NeemAzal 3 l/ ha	24,37±1,4 a	72,22±20,31 ab	87,50±9,57 a	97,50±5,0 a
3. NeemAzal 4 l/ ha	43,04±1,62 a	90,00±11,55 a	95,00±10,0 a	100,00±0,0 a
4. Kontrola	0,00±0,0 b	10,00±11,5 c	12,50±15,0 c	22,50±17,08 c
<b>LSD P= 5%</b>	21,925	28,551	18,518	15,602

Slikama 9. i 10. prikazana je učinkovitost različitih doza insekticida NeemAzal na ličinke prvog i trećeg razvojnog stadija krumpirove zlatice utvrđena u laboratorijskim pokusima.



**Slika 9.** Učinkovitost tri doze insekticida NeemAzal na ličinke 1. razvojnog stadija krumpirove zlatice



**Slika 10.** Učinkovitost tri doze insekticida NeemAzal na ličinke 3. razvojnog stadija krumpirove zlatice

## 4.2. Učinak na intenzitet ishrane

Tablicama 3 do 5 prikazana je količina lisne površine koju su konzumirali kukci različitih razvojnih stadija (ličinke i imaga) tijekom trajanja pokusa.

**Tablica 3.** Prosječna količina lisne površine (mm<sup>2</sup>) koju je konzumirala ličinka 1. razvojnog stadija (L1) nakon 1. i 3. dana od postavljanja pokusa, Zagreb, lipanj, 2016.

Varijanta	24 sata	72 sata
1. NeemAzal 2 l/ ha	1,14 ± 0,08 b	0,0 ± 0,0 b
2. NeemAzal 3 l/ ha	1,44 ± 0,1 b	0,0 ± 0,0 b
3. NeemAzal 4 l/ ha	1,17 ± 0,09 b	0,0 ± 0,0 b
4. Kontrola	9,73 ± 0,13 a	15,58 ± 4,51 a
LSD P= 5%	1,007	3,608

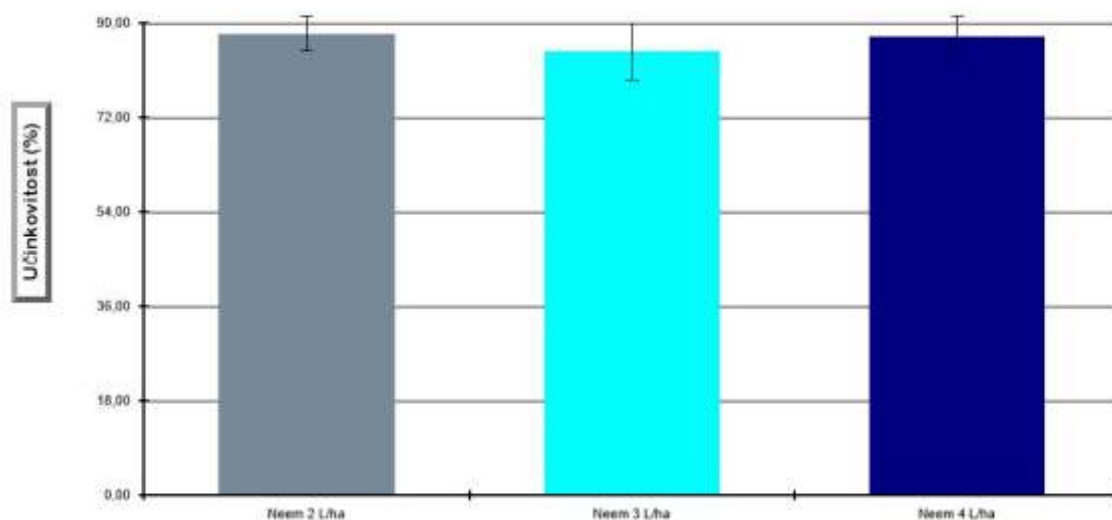
**Tablica 4.** Prosječna količina lisne površine (mm<sup>2</sup>) koju je konzumirala ličinka 3. razvojnog stadija (L3) tijekom trajanja pokusa, Zagreb, lipanj, 2016.

Varijanta	Sati nakon tretiranja		
	24 sata	48 sata	72 sata
1. NeemAzal 2 l/ ha	3,60 ± 0,22	1,91 ± 0,23 bc	2,33 ± 2,39 b
2. NeemAzal 3 l/ ha	4,11 ± 0,15	2,77 ± 0,24 b	0,08 ± 0,15b
3. NeemAzal 4 l/ ha	4,14 ± 0,14	0,91 ± 0,26 c	0,18 ± 0,21b
4. Kontrola	8,29 ± 0,70	40,28 ± 0,28 a	75,92 ± 37,56 a
LSD P= 5%	ns	1,349 - 17,080	29,882

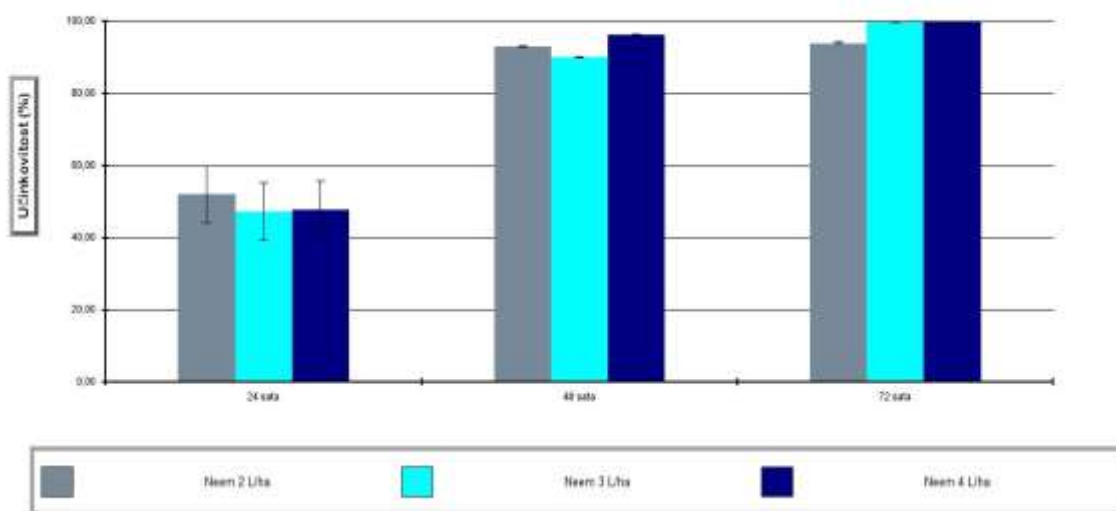
**Tablica 5.** Prosječna lisna površina (mm<sup>2</sup>) koju konzumira 1 zlatica kroz 24 sata tijekom trajanja pokusa, Zagreb, lipanj, 2016.

Varijanta	Sati nakon tretiranja			
	24 sata	48 sata	72 sata	96 sati
1. NeemAzal 2 l/ ha	213,90 ± 6,88 b	62,62 ± 7,32	118,79 ± 3,75 b	162,53 ± 0,32
2. NeemAzal 3 l/ ha	314,00 ± 3,16 b	68,23 ± 5,71	90,76 ± 2,37 b	178,23 ± 0,26
3. NeemAzal 4 l/ ha	329,10 ± 4,93 b	53,15 ± 3,97	60,09 ± 4,22 b	102,10 ± 0,33
4. Kontrola	590,82 ± 6,07 a	69,33 ± 6,06	290,68 ± 4,32 a	256,00 ± 0,44
LSD P= 5%	191,414	ns	62,673	ns

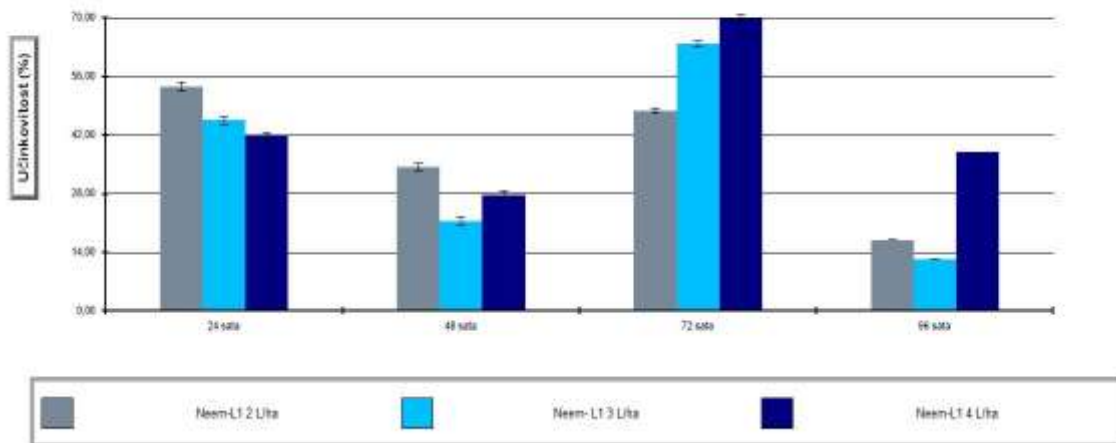
Učinkovitost azadirachtina u sprječavanju ishrane različitih razvojnih stadija krumpirove zlatice prikazana je slikama 11. do 13.



**Slika 11.** Učinkovitost različitih doza azadirachtina u sprječavanju ishrane na ličinke 1. razvojnog stadija krumpirove zlatice, Zagreb, lipanj 2016.



**Slika 12.** Učinkovitost različitih doza azadirachtina u sprječavanju ishrane na ličinke 3. razvojnog stadija krumpirove zlatice, Zagreb, lipanj 2016.



**Slika 13.** Učinkovitost različitih doza azadirachtina u sprječavanju ishrane imaga krumpirove zlatice, Zagreb, lipanj 2016.

## 5. RASPRAVA

Neem je prepoznat kao prirodni proizvod koji može mnogo ponuditi u rješavanju globalnih problema u poljoprivredi, okolišu i javnim zdravstvenim problemima. Neem se smatra vrijednim instrumentom za održivi razvoj. Istraživači širom svijeta danas su usredotočeni na važnost neem-a u poljoprivrednoj industriji.

U poljoprivredi se koriste plod neem-a, lišće i ekstrakti. Štiti od gljivičnih infekcija kao što su plijesan i hrđa (*Phragmidium mucronatum* Pers.), pepelnice (*Oidium*), uništava grinje, lisne uši, štitaste moljce, bijele mušice te djeluje na više od 200 vrsta kukaca i drugih štetnih organizama. Ujedno svojim gorkim okusom odbija štakore, miševe i žohare. Dokazano je da aktivni sastojci neem-a, kao što su azadirachtin, salannin i meliantriol imaju insekticidno djelovanje. Lako se prepoznaje po mirisu koji podsjeća na češnjak; vrlo je gorkog okusa. Navedeni gorki okus pomaže u eliminaciji štetnih kukaca koji se hrane biljkama. Neem ulje koristili su australski pastiri kako bi preradili vunu puno bolje kvalitete bez primjene pesticida (Nimprah, 2016). Azadirachtin odnosno pripravak NeemAzal ima široku primjenu u poljoprivrednoj proizvodnji. Njegova primjena vezana je za drvenaste kulture odnosno višegodišnje nasade pri čemu se koristi za suzbijanje lisnih uši, lisnih minera, tripsa i štitastih moljaca, grozdovih moljaca. Osim primjene u višegodišnjim drvenastim nasadima, primjenjuje se i u krumpiru za suzbijanje krumpirove zlatice kao najvažnijeg štetnika krumpira. Također, može se primjenjivati i u ukrasnom bilju te zaštićenim prostorima (Agroklub, 2016).

Prednosti azadirachtina u odnosu na kemijske (sintetske) pesticide mogu se analizirati sa stajališta ekotoksikologije, toksikologije, djelovanja na štetnike te učinka na tretirane biljke. Neem ima povoljan učinak na tlo (smanjuje pH gnojiva), nema značajnijeg štetnog utjecaja na okoliš, neotrovan je za čovjeka, životinje i korisne organizme (uključujući prirodne neprijatelje i oprašivače). Iako se navodi njegova niska toksičnost za životinje, Korunić i Rozman, (2012) navode da ekstrakt svježih listova neem-a dobiven izolacijom u hladnoj vodi može izazvati smrtnost guinea svinja i zečeva nakon 4-tjednog uzimanja hrane koja sadrži taj ekstrakt. Može se kombinirati s drugim pripravcima koji su dozvoljeni u ekološkoj proizvodnji radi poboljšavanja učinka djelovanja.

Na štetnike djeluje kao regulator rasta i razvoja kukaca (IGR), a „antifeedant“ svojstva uzrokuju prestanak hranjenja biljkom koja je cilj uzgoja. Štetnici ne razvijaju otpornost na neem, a osim što ima repelentno djelovanje, sprječava ovipoziciju uzrokujući sterilnost (Nimprah, 2016). Neem je topiv u vodi i pomaže rastu biljke.

Nedostaci azadirachtina kao i ostalih botaničkih insekticida manifestiraju se zbog brze razgradnje u okolišu. Brza razgradnja biljnih insekticida je povoljna sa stajališta zaštite okoliša i ljudskog zdravlja no često zahtijeva njihovu češću primjenu. Daljnji nedostaci odnose se na cijenu i dostupnost pripravka jer su botanički insekticidi u pravilu skuplji od sintetskih insekticida, a brojni nisu komercijalno dostupni zbog mnogih razloga uključujući i standardizaciju proizvodnje. Također, nedostaju podatci o dugotrajnoj djelotvornosti.

Zadovoljavajuća učinkovitost neema se može postići samo ako se primjenjuju preporučene doze i koncentracije pa je zato neobično važno pridržavati se uputa. Nedostatak koji se odnosi na nižu učinkovitost neema i njegovo kratko djelovanje mogli bi se otkloniti kombiniranjem s drugim botaničkim, ali i kemijskim insekticidima (Bezjak i sur., 2006). Pri tom je neobično važno istražiti učinkovitost svake pojedine kombinacije.

Uporabom kombinacija može se pojedinim komponentama u kombinaciji znatno smanjiti doza pa se na taj način smanjuju troškovi suzbijanja, a istovremeno se smanjuje onečišćenje okoliša i manje se remeti prirodna ravnoteža (Bažok i sur., 2008).

Prema ranije navedenom, azadirachtin ima široku primjenu na štetne kukce od kojih su najvažniji slijedeći; mali brašnari (*Tribolium confusum* Duv., *Tribolium castaneum* Hbst.), kukuruzna lisna uš (*Rhopalosiphum maidis* Fitch.), pamukova lisna uš (*Aphis gossypii* Glov.), žitni moljac (*Sitotroga cerealella* Ol.), veliki kupusar (*Pieris brassicae* El.), kupusni moljac (*Plutella xylostella* Curtis), žuta kukuruzna sovica (*Heliothis armigera* Hb.), duhanov moljac (*Ephestia elutella* Hlbn.), žitni kukuljičar (*Rhizopertha dominica* F.), krumpirova zlatica (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) (Agroklub, 2016), a primjenu azadirachtina možemo usmjeriti i prema ostalim štetnicima u poljoprivrednoj proizvodnji, među kojima su značajne i slijedeće nematode; *Meloidogyne incognita* Kofoid i White, *Meloidogyne javanica* Treub i *Pratylenchus* spp. Danas još nije dovoljno poznat učinak azadirachtina na većinu gljivičnih bolesti pa se u tom smislu može dodatno proširiti spoznaja o utjecaju na druge patogene.

Problemu suzbijanja krumpirove zlatice u današnje vrijeme proizvođači uglavnom pristupaju stihijski tako da se pristupa suzbijanju svih stadija (i odraslih i ličinki) i to u nekoliko navrata pri čemu se ne vodi računa o kritičnim brojevima, stadiju razvoja, a često niti o vrsti i toksikološkim svojstvima primijenjenog insekticida (Igrc Barčić, 2002).

Uspoređujući učinkovitost tri doze pripravka NeemAzal, na ličinke prvog razvojnog stadija (Tablica 1, Slika 9.) uočava se relativno brzo djelovanje na **ličinke prvog razvojnog** stadija. Učinkovitost nakon 24 sata kretala se od 25,66 do 33,70 % ovisno o dozi. Već nakon 48 sati učinkovitost je na svim primijenjenim dozama bila veća od 90 % što se može smatrati



zadovoljavajućim. Nakon 72 sata na dozama od 2 i 4 l/ha postignuta je 100 %-tna učinkovitost. Istovremeno ishrana ličinki je već nakon 24 sata bila signifikantno smanjena, a nakon 72 sata s obzirom da su ličinke uginule šteta na lisnoj površini nije bilo (Tablica 3., Slika 11.).

Učinkovitost sve tri doze na **treći razvojni stadij** (Tablica 2., Slika 10.) prvog dana pokusa bila je u rasponu od 38,38 do 43,04 %. Interesantno je da je učinkovitost azadirachtina 24 sata nakon tretiranja nešto veća na treći nego na prvi razvojni stadij ličinki što bi se moglo objasniti većom proždrljivošću ličinki trećeg razvojnog stadija u odnosu na one trećeg razvojnog stadija. Maceljski (2002) navodi da se proždrljivost ličinki povećava sa razvojnim stadijem. U slijedećim terminima očitavanja učinkovitost sve tri doze se progresivno povećavala te se nakon 48 sati kretala u rasponu od 52,77 do 88,88 %. U usporedbi s učinkovitošću na prvi razvojni stadij to je nešto niža učinkovitost što pak potvrđuje veću osjetljivost mlađih ličinki koju navode brojni autori (Bezjak i sur., 2006., Bažok i sur., 2008). Trećeg dana učinkovitost je iznosila od 62,85 do 94,28 % pri čemu se jasno vidi da učinkovitost raste s porastom doze. Četvrtog dana pokusa, odnosno 96 sati nakon tretiranja postignuta je učinkovitost u rasponu od 70,96 do 100,00 %. Istovremeno sve vrijeme trajanja pokusa uočava se da ličinke na tretiranim varijantama konzumiraju znatno manju količinu lisne mase (Tablica 4.) u odnosu na netretiranu kontrolu. No ne uočavaju se razlike u postotku smanjenja konzumirane lisne površine (Slika 12.) između različitih varijanti u pokusima. Smanjenje količine konzumirane lisne površine najmanje je prvi dan nakon postavljanja pokusa te se povećava tijekom razdoblja očitavanja sve do trećeg dana kada je konzumirana lisna površina na varijantama u pokusu 93 do 99 % manja u odnosu na kontrolu. To upućuje na činjenicu da za repelentno djelovanje azadirachtina nije presudna doza insekticida.

Učinkovitost azadirachtina na ličinke prvog i trećeg razvojnog stadija koja je postignuta u provedenim pokusima znatno je viša od one koju su u laboratorijskim pokusima utvrdili Bezjak i sur. (2006), a naročito od one koju su u laboratorijskim pokusima utvrdili Bažok i sur. (2008). U oba pokusa korišteni su pripravci Celaflor Neem i Neem extract pa je moguće da je razlika u učinkovitosti uzrokovana različitim sadržajem ekstrakta u pripravcima. Učinkovitost pripravka Celaflor Neem u poljskim pokusima koje su proveli Bezjak i sur. (2006) dosegla je između 55 i 88 % trećeg dana nakon tretiranja nakon čega se uslijed uvjeta u polju smanjuje. Povećani sadržaj djelatne tvari, ali i poboljšane formulacije mogu znatno pridonijeti boljem djelovanju sredstva. Također u uvjetima u polju primjena istih insekticida dovodi do niže učinkovitosti u usporedbi s učinkovitošću koja je utvrđena u laboratorijskim pokusima.

U provedenim pokusima insekticid NeemAzal nije polučio zadovoljavajuću učinkovitost na imaga krumpirove zlatice. Ovakav rezultat mogao bi se objasniti njegovim repelentnim djelovanjem zbog kojeg su se zlatice nešto manje hranile tretiranim lišćem. Odrasle zlatice zato nisu unijele u tijelo dovoljnu količinu insekticida. S druge strane dokazano je da zlatice mogu izdržati duži period bez hrane (Maceljki, 2002). Stoga nije došlo do njihova ugibanja na varijantama u pokusu. Suprotno izostanku učinka na smrtnost imaga uočava se učinak na količinu konzumirane lisne površine na varijantama koje su tretirane insekticidima u odnosu na netretiranu varijantu (Tablica 5., Slika 13.). Kod odraslih se ne uočava tako veliko smanjenje konzumacije lisne površine kao što je to slučaj s ličinkama. Ta učinkovitost se kreće oko 50 % prvi dan nakon tretiranja, 20 do 30 % drugi dan nakon tretiranja, 47 do 70 % treći dan nakon tretiranja i 12 do 38 % četvrti dan nakon tretiranja. Kao ni kod ličinki ne uočavaju se signifikantne razlike između različitih doza u % smanjenja konzumirane lisne površine. Stoga se može zaključiti da za repelentno djelovanje nisu bile presudne primijenjene doze insekticida.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Azadirachtin na kukce djeluje repelentno, uzrokuje odbijanje od ovipozicije, usporeni rast i razvoj premda biokemijska i molekularna osnova ovih učinaka nije poznata.
2. Azadirachtin je antagonist ekdisona te ometa presvlačenje kukaca, pa se po načinu djelovanja ubraja u regulatore razvoja kukaca.
3. Azadirachtin je malo otrovan za pčele te temeljem istog ima pozitivna ekotoksikološka svojstva.
4. Azadirachtin ima široku primjenu na sve štetnike koji grizu i sišu biljni sok te je ista vezana uz višegodišnje nasade, povrtne kulture te ukrasno bilje.
5. Nakon provedenih laboratorijskih pokusa pripravak NeemAzal pokazao je veću učinkovitost na ličinke prvog razvojnog stadija (L1) u odnosu na ličinke trećeg razvojnog stadija (L3), a nije izazvao mortalitet imaga. Uočava se da učinkovitost insekticida na ličinke oba razvojna stadija raste s porastom doze primijenjenog insekticida.
6. Utvrđeno je signifikantno smanjenje konzumirane lisne površine od strane svih istraživanih razvojnih stadija. Najbolji učinak postignut je kod ličinki prvog razvojnog stadija, a najslabiji kod imaga. Nije utvrđena razlika u smanjenju lisne površine uzrokovana dozama primijenjenog insekticida.
7. Pri vrednovanju bioloških sredstava za zaštitu bilja iznimno je važno uzeti u obzir i sekundarne učinke ovih pripravaka kao što su prestanak ili smanjenje ishrane jer oni pridonose ukupnom učinku pripravka na porast populacije kukaca i na smanjenje šteta.
8. Azadirachtin još uvijek ima neistražen i nedovoljno iskorišteni potencijal u suzbijanju štetnih kukaca i bolesti. Stoga bi u daljnjim istraživanjima bilo korisno detaljnije istražiti mogućnosti njegove primjene u kombinaciji s drugim metodama i tehnikama suzbijanja štetnika.

## **7. ZAHVALE**

Zahvaljujemo se mentorici prof. dr. sc. Renati Bažok na pruženoj prilici, neiscrpnom trudu, strpljenju te vremenu koje je izdvojila u proteklih godinu dana kako bi istraživanje koje smo provodili i rezultati istog ugledali svijetlo dana, te da bi rad bio prijavljen na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade.

Veliko hvala roditeljima na svesrdnoj, bezuvjetnoj i konstantnoj podršci tijekom cjelokupnog obrazovanja.

## 8. POPIS LITERATURE

1. Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
2. Agroklub (2016). Agroklub, <<http://www.agroklub.com/poljoprivredni-oglasnik/oglas/neemazalrts-insekticid-odobren-i-za-ekoloske-proizvodjace/7383/>>. Pristupljeno 01. studenog 2016.
3. Bažok, R. (2017). Pregled sredstava za zaštitu bilja u Hrvatskoj za 2017. godinu -zoocidi. *Glasiilo biljne zaštite*. XVII (1-2): 13-110.
4. Bažok, R., Đurek, I., Igrc Barčić, J., Gotlin Čuljak, T. (2008). Interakcije između ekološki prihvatljivih insekticida za suzbijanje krumpirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say, Coleoptera, Chrysomelidae). *Fragmenta phytomedica et herbologica*, Vol. 30, No 1-2: 47-61.
5. Bezjak, S., Igrc Barčić, J., Bažok, R. (2006). Učinkovitost biljnih insekticida u suzbijanju krumpirove zlatice. *Fragmenta phytomedica et herbologica*, Vol. 29, No 1-2: 13-24.
6. CROCPA (2016). CROCPA - Croatian Crop Protection Association, <[http://www.crocpa.hr/dokumenti/pdf/zakonska\\_regulativa\\_u\\_eu\\_szb.pdf](http://www.crocpa.hr/dokumenti/pdf/zakonska_regulativa_u_eu_szb.pdf)>. Pristupljeno 23. prosinac 2016.
7. Csurhes, S. (2008). Neem tree *Azadirachta indica*, <[https://www.daf.qld.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0006/63168/IPA-Neem-Tree-Risk-Assessment.pdf](https://www.daf.qld.gov.au/__data/assets/pdf_file/0006/63168/IPA-Neem-Tree-Risk-Assessment.pdf)>. Pristupljeno 16. studenog 2016.
8. Dhongade, K. R., Kavade, G. S., Damle, S. R. (2008). Neem Oil Poisoning, <<http://medind.nic.in/ibv/t08/i1/ibvt08i1p56.pdf>>. Pristupljeno 23. prosinac 2016.
9. Dobrinčić, R. (1996). Istraživanje interakcije različitih skupina insekticida u suzbijanju krumpirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineta* Say.). *Poljoprivredna znanstvena smotra*, vol. 61 (1/2): 23-43.
10. Dobrinčić, R., Igrc Barčić, J. (1998). Istraživanje klasičnih i novih generacija pripravaka u suzbijanju krumpirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say, Coleoptera, Chrysomelidae), *Fragmenta Herbologica at Phytomedica*, vol. 26 No 1-2 1998, 53-66.
11. EC 91/414/EEC (1991). DIRECTIVE of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (91/414/EEC). <<http://eur-lex.europa.eu/legal->

content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:01991L0414-20110801&from=EN>. Pristupljeno 18. ožujak 2017.

12. EC1107/2009 (2009). REGULATION (EC) No 1107/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Official Journal of the European Union <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1107&from=EN>>.

Pristupljeno 18. ožujak 2017.

13. Ecogrape (2016). Ecogrape, <<http://www.ecogrape.com/neemazal/>>. Pristupljeno 23. prosinac 2016.

14. FAO (2016). FAO - Food And Agriculture Organization, <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Specs/azadirachtin2006.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/azadirachtin2006.pdf)>. Pristupljeno 23. prosinac 2016.

15. Grdiša M., Gršić K. (2013). Botanical Insecticides in Plant Protection. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 78(2): 85-89.

16. Gylling Data Management (2015). ARM 9® GDM software, Revision 9. 2014. 7 January 28, 2015 (B=20741) Brookings, South Dakota, USA

17. Igrc Barčić, J. (2002). Integrirana zaštita krumpira na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu, <<http://www.savjetodavna.hr/adminmax/researches/0084006h.doc>>. Pristupljeno 16. lipnja 2016.

18. Igrc Barčić, J., Maceljki, M. (2001). Ekološki prihvatljiva zaštita bilja od štetnika. Zrinski, Čakovec

19. Isman, M. B. (1997). Neem and Other Botanical Insecticides: Barriers to Commercialization. *Phytoparasitica* 25(4): 339-344.

20. Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51: 45-66.

21. Korunić, Z., Rozman, V. (2012). Biljni insekticidi (Botanical insecticides), <[https://bib.irb.hr/datoteka/575199.Biljni\\_insekticidi.doc](https://bib.irb.hr/datoteka/575199.Biljni_insekticidi.doc)>. Pristupljeno 16. lipnja 2016.

22. Macelj M. (2002). Poljoprivredna entomologija. Zrinski, Čakovec
23. Ministarstvo poljoprivrede (2016). Nacionalni akcijski plan za postizanje održive uporabe pesticida za razdoblje 2013.-2023. Vlada Republike Hrvatske. Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb, 2013.
24. Ndakidemi, B., Mtei, K., Ndakidemi, A. P. (2016). Impacts of Synthetic and Botanical Pesticides on Beneficial Insects, <[http://file.scirp.org/pdf/AS\\_2016061715061431.pdf](http://file.scirp.org/pdf/AS_2016061715061431.pdf)>. Pristupljeno 16. studenog 2016.
25. Neemuses (2016). Neemuses, <<http://neemuses.com/azadirachtin.php>>. Pristupljeno 22. prosinca 2016.
26. Nimprah (2016). Nimprah, <<http://nimprah.com/drvo-nim/nim-poljoprivreda/>>. Pristupljeno 23. prosinac 2016.
27. NPIC (2016). NPIC - National Pesticide Information Center, <<http://npic.orst.edu/factsheets/neemgen.html>>. Pristupljeno 09. prosinac 2016.
28. Proeco (2017). - Proeco, <<http://www.proeco.hr/neemazalts-bioloski-insekticid-za-suzbijanje-stetnika/>>. Pristupljeno 22. siječnja 2017.
30. Schneider-Orelli, O., 1947. Entomologisches Praticum. HR Sauerlander and Co, Aarau.
31. Silva-Aguayo, G. (2016). Botanical insecticides. <<http://ipmworld.umn.edu/silva-aguayo-botanical>>. Pristupljeno 01. studenog 2016.
32. Sundaram, S., M., K., Curry, J., Landmark, M. (1995): Sorptive behavior of the neem-based biopesticide, azadirachtin, in sandy loam forest soil, <[www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03601239509372968](http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/03601239509372968)>. Pristupljeno 10. studenog 2016.
33. Ševar, M. (2015). Ekološka proizvodnja. Priručnik za sigurno rukovanje i primjenu sredstava za zaštitu bilja (urednici: D. Hamel, V. Novaković), Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb, 49-50.
34. Xavier, V. M., Message, D., Picanco, M. C., Chediak, M., Junior, P. A. S., Ramos, R. S., Martins, J. C. (2015). Acute Toxicity and Sublethal Effects of Botanical Insecticides to Honey Bees. Journal of Insect Science 15(1): 1-6.

## **Učinak botaničkog insekticida azadirachtin na intenzitet ishrane i smrtnost različitih razvojnih stadija krumpirove zlatice**

### **SAŽETAK**

Azadirachtin odnosno biljni insekticid dobiven iz biljke indijskog jorgovana ili neem-a djeluje kao regulator rasta te odbija i smanjuje ishranu štetnih kukaca. Kao i većina biljnih insekticida, azadirachtin se smatra ekotoksikološki vrlo prihvatljivim za suzbijanje štetnika. Krumpirova zlatica, *Leptinotarsa decemlineata* Say. (Coleoptera: Chrysomelidae) predstavlja najvažnijeg štetnika merkantilnog krumpira u Republici Hrvatskoj. Štete uzrokuju odrasli oblici i ličinke različitih razvojnih stadija izgrizajući lišće krumpira. Prekomjerna i nestručna uporaba klasičnih kemijskih insekticida dovela je do razvoja rezistentnosti krumpirove zlatice. Alternativu kemijskim insekticidima u današnje vrijeme predstavljaju biljni insekticidi. Osim što azadirachtin djeluje kao regulator rasta i uzrokuje mortalitet štetnika, uključujući i krumpirovu zlaticu, repelentnim djelovanjem pridonosi smanjenju šteta. Istraživanje polazi od pretpostavke da o razvojnom stadiju kukca ovisi učinkovitost azadirachtina te da osim izravnog mortaliteta azadirachtin može značajno smanjiti štete od ishrane svih razvojnih stadija. U laboratorijskim pokusima istražen je učinak tri doze pripravka NeemAzal na ličinke prvog i trećeg razvojnog stadija i imaga krumpirove zlatice. Utvrđen je mortalitet i intenzitet ishrane tretiranih jedinki. Pripravak NeemAzal pokazao je veću učinkovitost na ličinke prvog razvojnog stadija (L1) u odnosu na ličinke trećeg razvojnog stadija (L3), a nije izazvao mortalitet imaga. Uočava se da učinkovitost insekticida na ličinke oba razvojna stadija raste s porastom doze primijenjenog insekticida. Utvrđeno je da se svi istraživani razvojni stadiji signifikantno manje hrane tretiranim listom pri čemu je utjecaj na ishranu najveći kod ličinki prvog razvojnog stadija, a najslabiji kod imaga. Nije utvrđena razlika u smanjenju lisne površine uzrokovana dozama primijenjenog insekticida. Pri vrednovanju bioloških sredstava za zaštitu bilja iznimno je važno uzeti u obzir i sekundarne učinke ovih pripravaka kao što su prestanak ili smanjenje ishrane jer oni pridonose ukupnom učinku pripravka na porast populacije kukaca i na smanjenje šteta.

**Ključne riječi:** krumpirova zlatica, biljni insekticid, azadirachtin, mortalitet, razvojni stadiji



**THE EFFECT OF THE BOTANICAL INSECTICIDES AZADIRACHTIN ON THE INTENSITY OF FEEDING AND MORTALITY ON DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES OF COLORADO POTATO BEETLE**

**SUMMARY**

Azadirachtin or botanical insecticide derived from a plant of Indian lilac or neem acts as a plant growth regulator and refuses nourishment and reduces of harmful insects. As the most of botanical insecticides, azadirachtin is considered ecotoxicologically very acceptable for the pest control. Colorado potato beetle (CPB), *Leptinotasca decemlineata* Say. (Coleoptera: Chrysomelidae) is the most important pest of potatoes in Croatia. By chewing potato leaves, larvae and adult forms are reducing leaf area. Excessive and improper use of classical chemical insecticides has resulted in the development of the resistance CPB. An alternative to chemical insecticides today are botanical insecticides. In addition to azadirachtin acts as a growth regulator and causes mortality of pests, including the CPB, a repellent action contributes to the reduction of damage. The study assumes that the development stage of an insect is dependent effectiveness of azadirachtin and other than direct mortality azadirachtin can significantly reduce damage from feeding of all life stage. In laboratory experiments, we studied the effect of three doses the product NeemAzal on the larvae of the first and third larval stages and on adults of potato beetle. The mortality and intensity of feeding of treated individuals have been established. NeemAzal formulation showed greater effectiveness on the larvae of the first development stages (L1) in relation to the third stage (L3), and has not caused mortality of adults. It is noticeable that effectiveness of insecticides on the larvae both developmental stages increases with the increase the dose applied insecticide. It was determined that all investigated stages consumed significantly less food (treated leaf) where the impact on the feeding was highest on the 1<sup>st</sup> larval stage comparing to the 3<sup>rd</sup> larval stage, and the weakest on adult form. There were no differences in the reduction of feeding among the different doses of applied insecticide. When evaluating the biological plant protection products is extremely important to consider the secondary effects of these products, such as suspension or reduction feeding because they contribute to the overall effect the product on the increase the population of insects and on the reducing damages.

**Keywords:** Colorado potato beetle, botanical insecticide, azadirachtin, mortality, developmental stages