



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Ivana Pajač Živković, dipl.ing.

**BIOLOGY, ECOLOGY AND GENETICS OF
CODLING MOTH (*Cydia pomonella* L.)
POPULATIONS IN NORTH-WEST
CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012



Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Ivana Pajač Živković, dipl.ing.

**BIOLOGIJA, EKOLOGIJA I GENETIKA
POPULACIJA JABUKOVA SAVIJAČA
(*Cydia pomonella* L.) U
SJEVEROZAPADNOJ HRVATSKOJ**

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof. dr. sc. Božena Barić
prof. dr. sc. Ivan Pejić

Zagreb, 2012.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Ivana Pajač Živković, dipl.ing.

**BIOLOGY, ECOLOGY AND GENETICS OF
CODLING MOTH (*Cydia pomonella* L.)
POPULATIONS IN NORTH-WEST
CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Supervisors: prof. dr. sc. Božena Barić
prof. dr. sc. Ivan Pejić

Zagreb, 2012

Mentor:
Prof. dr. sc. Božena Barić

Prof. dr. sc. Božena Barić redovita je profesorica Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Koordinator je modula Sustavi suzbijanja štetnih organizama i Zaštita voćaka i vinove loze od štetočinja na preddiplomskim studijima, Načela integrirane zaštite bilja i Akarologija na diplomskim studijima, te modula Metode procjene ekološke kakvoće u sustavu integrirane zaštite na poslijediplomskom doktorskom studiju.

Diplomirala je 1980. na Agronomskom fakultetu, tadašnjem Fakultetu poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu, magistrirala 1990. i doktorirala 1998. na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanja koja je provodila tijekom magisterija odnosila su se na integriranu zaštitu kruške i faunu voćnjaka kruške u različitim sustavima proizvodnje.

Doktorski rad izradila je proučavajući faunu stjenica u intenzivnom uzgoju jezgričavih voćaka.

U znanstveno – istraživačkom radu bavi se problemima zaštite voćaka i vinove loze od štetnika, integriranom zaštitom voćaka i vinove loze, te mogućnostima uvođenja bioloških mjera u suzbijanju štetnih organizama. Bila je suradnica na nekoliko znanstveno-istraživačkih projekata, a trenutno je voditelj jednog znanstveno-istraživačkog projekta:

- Integrirane mjere zaštite od tehnoloških štetnika jabuke (178- 1782066 – 2081), 2007. – 2012. Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa RH.

Kao autor ili koautor objavila je 40 znanstvenih radova od kojih je 9 referirano u bazi ISI WoS. Koautor je u 3 knjige nacionalnog izdanja.

Član je međunarodne organizacije za integriranu i biološku zaštitu (IOBC) te aktivno sudjeluje na skupovima pojedinih sekcija ove organizacije.

Bila je mentor na dva magistarska rada i trenutno je mentor četiri disertacije. Poveznica na hrvatsku znanstvenu bibliografiju (CROSBİ): <http://bib.irb.hr/lista-radova?autor=192880>

Mentor:
Prof. dr. sc. Ivan Pejić

Prof. dr. sc. Ivan Pejić redoviti je profesor u trajnom zvanju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Koordinator je modula Oplemenjivanje bilja na preddiplomskom studiju, Oplemenjivanje voćaka i vinove loze i Molekularno oplemenjivanje bilja na diplomskim studijima, te modula Metode molekularnog oplemenjivanja bilja na poslijediplomskom doktorskom studiju.

Diplomirao je 1986. na Poljoprivrednom fakultetu Sveučilišta „Josip Juraj Strossmayer“ u Osijeku, a magistrirao (1992.) i doktorirao (1996.) na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dio istraživanja za svoju doktorsku disertaciju izvodio je 1994./95. na Sveučilištu Udine (Italija, 10 mjeseci) i Državnom sveučilištu Sjeverna Karolina 1994. (SAD, 3 mjeseca). Tijekom 1999. boravio je na poslijedoktorskom usavršavanju na Sveučilištu Hohenheim (Njemačka, 5 mjeseci).

U znanstveno-istraživačkom radu primarno se bavi primjenom molekularnih markera u oplemenjivanju bilja, posebice primjene DNA markera u analizi genetskog srodstva i identifikaciji sorata vinove loze, voćaka i ratarskog bilja, te genetske strukture populacija kulturnog bilja i vegetativno razmnažanih sorti. Bio je suradnikom ili koordinatorom više znanstveno-istraživačkih projekata, a trenutno je voditelj dva aktivna znanstveno-istraživačka projekta:

- Genetička identifikacija i genetska varijabilnost sorti vinove loze i voćaka (178-178844-1925), 2007. – 2012. Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta RH (voditelj)
- Preservation and establishment of true-to-type and virus free material of endangered grapevine cultivars in Croatia and Montenegro. SEE-ERA.NET Plus, 2010. – 2012. (koordinator)

Autor je većeg broja znanstvenih radova od kojih je 28 referirano u ISI WoS (ukupni broj citata: = 691, H-index = 11). Koautor je 2 knjige (nacionalno izdanje) i 2 poglavlja u knjizi (inozemno izdanje).

Dobitnik je državne nagrade za znanost 2003. godine; Priznanja Sveučilišta u Zagrebu (2006) za promicanje međunarodne suradnje u području visokog obrazovanja; Medalje Agronomskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2009. godine i Međunarodne nagrade za knjigu – kategorija “Monografije”: Maletic, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I. Vinova loza - ampelografija, ekologija, oplemenjivanje (2008) Školska knjiga Zagreb. International Organization for vine and wine - OIV), Paris (France).

Bio je mentorom jednog magisterija i četiri disertacije. Poveznica na hrvatsku znanstvenu bibliografiju (CROSBİ): <http://bib.irb.hr/lista-radova?autor=154216>

Ovu disertaciju ocijenilo je povjerenstvo u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Hrvoje Šarčević,
izvanredni profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
2. Prof. dr. sc. Emilija Raspudić,
redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta Sveučilišta u Osijeku
3. Prof. dr. sc. Zlatko Čmelik,
redoviti profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Disertacija je obranjena na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, 5.7.2012. pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Hrvoje Šarčević _____
izvanredni profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
2. Prof. dr. sc. Emilija Raspudić _____
redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta Sveučilišta u Osijeku
3. Prof. dr. sc. Zlatko Čmelik _____
redoviti profesor Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Zahvale

Prof. dr. sc. Boženi Barić zahvaljujem na odabiru teme kao i na velikoj pomoći i korisnim savjetima tijekom istraživanja i pisanja ovoga rada. Svojim entuzijazmom i znanjem uvelike je utjecala na moj istraživački rad te bez njezine podrške i velikodušnosti izrada ovoga rada ne bi bila moguća.

Prof. dr. sc. Ivanu Pejiću zahvaljujem na izuzetnoj ljubaznosti i značajnoj podršci, korisnim raspravama te savjetima koji su u velikoj mjeri utjecali na cjelokupan koncept rada.

Ovom prigodom želim zahvaliti svima onima koji su na bilo koji način doprinijeli stvaranju ovoga rada, posebice kolegama iz voćnjaka Belje d.d. Vladi Vasilju, dipl. ing., i Tomislavu Hajniću, dipl. ing., a isto tako, mr. sc. Tomislavu Tomšiću, Anđelku Horvatu, dipl. ing., i Ivani Jurčec, struč. spec. ing. iz Agromeđimurja d.d. Čakovec te Andreju Ciglaru, dipl. ing., na susretljivosti, ustupanju podataka o praćenju štetnika te pomoći oko skupljanja uzoraka.

Zahvalnost dugujem i Silviju Šimonu, dipl. ing., na pomoći tijekom molekularnih analiza te Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku Agronomskog fakulteta na ljubaznosti i korištenju laboratorija te aparature.

I na kraju, najveću zahvalnost upućujem roditeljima, sestri Martini i suprugu Ivanu za nesebičnu pomoć te bezuvjetnu potporu pri pisanju rada.

Ivana Pajač Živković

**BIOLOGIJA, EKOLOGIJA I GENETIKA POPULACIJA JABUKOVA SAVIJAČA
(*Cydia pomonella* L.) U SJEVEROZAPADNOJ HRVATSKOJ**

Ivana Pajač Živković

**Zavod za poljoprivrednu zoologiju
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet
Svetošimunska cesta 25, Zagreb**

SAŽETAK

Jabukov savijač (*Cydia pomonella* L.) najznačajniji je štetnik u proizvodnji jezgričavog voća koji najveće štete prouzrokuje u uzgoju jabuka. Izuzetno je prilagođen različitim klimatskim uvjetima pa je poznat po razvoju rezistentnosti na nekoliko kemijskih skupina insekticida. Pretpostavlja se da su se populacije jabukova savijača uslijed klimatskih promjena i čestih insekticidnih tretmana diferencirale na mnoge ekotipove različitih bioloških i fizioloških zahtjeva za razvoj.

Cilj ove disertacije bio je analizirati biologiju, ekologiju i genetiku triju populacija jabukova savijača uzorkovanih u voćnjacima jabuke (*Malus domestica* Borkh.) na području sjeverozapadne Hrvatske. Istraživanje je provedeno u dvama voćnjacima intenzivne proizvodnje i u jednom voćnjaku ekstenzivne proizvodnje jabuka s različitim agroekološkim uvjetima.

Jedna populacija nije suzbijana insekticidnim pripravcima (netretirana populacija), a druge dvije suzbijane su insekticidnim pripravcima (tretirane populacije).

U radu su istraživani učinci klimatskih prilika na ponašanje jabukova savijača u razdoblju od 1993. do 2010. godine te su uočene promjene u biologiji i ekologiji štetnika. U netretiranom voćnjaku opažena je kasnija pojava leptira jabukova savijača u proljeće, kasnije odlaganje jaja te kasnija pojava gusjenica u usporedbi s tretiranim voćnjacima. U netretiranom voćnjaku utvrđene su dvije generacije jabukova savijača godišnje, a u tretiranim je utvrđen razvoj treće generacije štetnika.

Izračunom korelacijskih koeficijenata između temperatura i ukupnog ulova leptira za tretirane voćnjake utvrđena je slaba, ali statistički značajna povezanost temperatura i ukupnog ulova leptira u razdoblju od 1993. do 2010. godine. Statistički značajne razlike u temperaturi i ukupnom ulovu leptira jabukova savijača u razdoblju od 1993. do 2010. godine upućuju na to da su se promjene u dinamici populacija djelomično dogodile zbog promjena temperature.

U istraživanju genetske strukture i protoka gena provedenom na tri populacije jabukova savijača korišteni su mikrosatelitni markeri (SSR). U procjeni genetske diferencijacije korišteni su samo mužjaci jabukova savijača ulovljeni pomoću ljepljivih podložaka feromonskih lovki. Pomoću 10 varijabilnih mikrosatelita utvrđene su snažne alelne varijacije. Broj alela (N_a) kretao se od 2 (na lokusima *Cyd 15* i *Cyd 14*) do 13 (na lokusu *Cp 2.39*), s prosječnom vrijednošću od 7,2 alela po lokusu. Opažena heterozigotnosti (H_o) po svim lokusima u tri populacije jabukova savijača kretala se od 0,5 do 0,76, dok se očekivana heterozigotnost (H_e) kretala od 0,10 do 0,84. Indeks genetske diferencijacije između populacija jabukova savijača ($F_{ST}=0,02-0,04$) bio je nizak pa nije bio statistički značajan nakon korekcije za višestruke usporedbe.

Analizom molekularne varijance (AMOVA) provedenom na tri populacije koje su bile podijeljene s obzirom na geografski položaj, tj. tip gospodarenja, nisu utvrđene statistički značajne razlike u genetskoj strukturiranosti populacija. Unatoč činjenici da razlike u genetskoj strukturiranosti populacija nisu bile statistički značajne, populacija jabukova savijača iz Beloslavca (netretirani voćnjak) imala je najveći prosječni broj alela te najveći broj jedinstvenih alela u usporedbi s populacijama jabukova savijača iz drugih lokaliteta (tretirani voćnjaci). Ovi rezultati upućuju na moguće snižavanje bogatstva alela štetnika uslijed primjene insekticidnih tretmana.

Testovi izolacije prema udaljenosti (IBD) nisu bili statistički značajni, što upućuje da drugi mehanizmi, kao što je širenje štetnika pomoću čovjeka, pomažu u kretanju štetnika na duže i kraće udaljenosti unutar uzgojnih područja jabuke u Hrvatskoj. Ovo istraživanje podupire hipotezu o međusobnoj razmjeni genetskog materijala između proučavanih populacija jabukova savijača.

Rezultati genetskih istraživanja upućuju na određene promjene u genetskoj strukturi populacija jabukova savijača iz tretiranih voćnjaka koje su utjecale na povećanje reproduktivne sposobnosti štetnika, a samim time i na promjene u njegovoj biologiji. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je u našoj zemlji moguć razvoj treće generacije štetnika u godinama u kojima je suma efektivnih temperatura veća od prosjeka te u

voćnjacima u kojima se provode mjere intenzivnog suzbijanja jabukova savijača primjenom kemijskih pripravaka.

Ključne riječi: jabukov savijač (*Cydia pomonella* L.), voćnjaci jabuke, temperatura, ukupni ulov, korelacije, SSR, genetske varijacije, F_{ST} , AMOVA, Tortricidae

(Stranica 113, slika 12, tablica 17, grafikona 16, literaturnih navoda 99, jezik izvornika hrvatski)

**BIOLOGY, ECOLOGY AND GENETICS OF CODLING MOTH
(*Cydia pomonella* L.) POPULATIONS IN NORTH-WEST CROATIA**

Ivana Pajač Živković

**Department for Agricultural Zoology
University of Zagreb Faculty of Agriculture
Svetošimunska cesta 25, Zagreb**

SUMMARY

Introduction

The codling moth (*Cydia pomonella* L.) is a key pest in pome fruit production with a preference for apple. The pest is very adaptable to different climatic conditions and is known for developing resistance to several chemical groups of insecticides. Because of these reasons, the populations of codling moth are differentiated in many ecotypes of various biological and physiological development requirements. The aim of this PhD thesis was to analyse the biology, ecology and genetics of three codling moth populations from apple (*Malus domestica* Borkh.) orchards in the Northwestern Croatia.

Material and methods

The study was conducted in two commercial orchards and in one extensive production orchard with different agro-ecological production conditions.

One population was free from chemical control treatment (untreated population), whereas the other two were subjected to chemical control (treated populations).

Biology and ecology of the pest was studied during the three growing seasons (2008, 2009 and 2010). The effects of current and past climate regimes on the behaviour of CM populations were investigated. Climatic data on the mean average daily temperatures were collected from LUFT climatological stations. It was used to calculate the expected emergence of each life stage of CM using the Wildbolz theoretical model.

For population genetic analysis during the 2008 growing season 86 specimens of male codling moths were collected from apple orchards. Total genomic DNA was extracted from

CM individuals using the GenElute™ Mammalian Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Germany). To assess genetic polymorphism, individuals of *C. pomonella* were genotyped at 10 microsatellite loci: Cp 1.60, Cp 1.62, Cp 2.39, Cp 2.129, Cp 3.169, Cp 3.180, Cp 5.24, Cyd 14, Cyd 15, Cyd 16. Amplification of PCR products was performed by following standardized procedures and visualization of fragments was done on 6% polyacrylamide gels followed by silver staining.

Results and discussion

Changes in biology and ecology of CM populations were observed. A later emergence of adult moths in the spring, later oviposition of eggs and later emergence of larvae occurred in the untreated orchard versus the treated orchards. In the untreated orchard, two generations of codling moth were observed per year, whereas an additional third flight period of the moths was observed in the treated orchards.

A correlation analysis of the temperature and the moth abundance from 1993 through 2010 for the treated orchards found a weak but significant relationship between temperature and moth abundance. Significant differences in temperature and in the overall abundance of the moths from 1993 through 2010 indicate changes in the population dynamics resulting partly from temperature changes.

Ten variable microsatellites revealed strong allelic variation. The number of alleles (N_a) varied from 2 (at loci Cyd 15 and Cyd 14) to 13 (at locus Cp 2.39), with an average value of 7.20 alleles per locus. The observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) per locus ranged from 0.5 to 0.76 and 0.10 to 0.84, respectively. The measures of pair-wise population genetic structure ($F_{ST}=0.02-0.04$) were low and insignificant in all of the comparisons (after correction for multiple comparisons).

Analysis of molecular variance (AMOVA) performed on the three populations, which were grouped geographically according to the type of management revealed no significant variance in the genetic structure. Despite the fact that the differences in genetic structure were not statistically significant, the codling moth population from Beloslavec (the untreated orchard) had the greatest average number of alleles and the largest number of private alleles compared to the other two locations (the treated orchards). This indicates that insecticide treatments potentially lower allelic richness.

The tests for isolation by distance (IBD) were insignificant, suggesting that other mechanisms, such as human-mediated codling moth transport, help in the movement of

this pests over long and short distances within the Croatian apple-growing regions. This study supports the hypothesis of genetic exchange in codling moths between orchards.

Conclusion

The results of genetic studies suggest certain changes in the genetic structure of codling moth populations which were subjected to chemical control treatments that have increased its reproductive capacity and have therefore caused changes in its biology.

The results of this study confirm the possibility that a third generation of the pest can develop in Croatia in years in which the sum of degree-day is higher than average and at locations that are subjected to intensive chemical control treatments.

Keywords: codling moth (*Cydia pomonella* L.), apple orchards, temperature, abundance, correlations, SSR, genetic variation, F_{ST} , AMOVA, Tortricidae

(Pages 113, figures 12, tables 17, charts 16, literature references 99, the original language: Croatian)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	4
3. PREGLED LITERATURE	5
3.1. Taksonomija i geografska rasprostranjenost.....	5
3.2. Biljke domaćini.....	6
3.3. Morfološke karakteristike.....	8
3.4. Životni ciklus.....	8
3.5. Štetnost.....	9
3.6. Fiziološko-biokemijske promjene u plodu jabuke uzrokovane napadom štetnika	12
3.6.1. Biljni hormoni.....	13
3.6.1.1. Etilen.....	13
3.6.1.2. Ostali biljni hormoni.....	15
3.6.2. Sinteza biljnih pigmenata.....	15
3.7. Mjere suzbijanja.....	16
3.7.1. Kemijske mjere.....	16
3.7.2. Biološke mjere.....	17
3.7.3. Biotehničke mjere.....	18
3.8. Rezistentnost na insekticide.....	19
3.9. Genetska struktura.....	20
3.10. Genetsko preinačavanje.....	21
3.11. Molekularni markeri u populacijskoj genetici.....	22
4. MATERIJALI I METODE	24
4.1. Terenska istraživanja.....	24
4.2. Praćenje biologije i ekologije.....	26
4.3. Skupljanje uzoraka za genetska istraživanja.....	27
4.4. Molekularna analiza populacija jabukova savijača (SSR).....	27
4.4.1. Priprema uzoraka za izolaciju DNA.....	27
4.4.2. Izolacija genomske DNA.....	27
4.4.3. Procjena količine i kvalitete izolirane DNA.....	29
4.4.4. SSR analiza.....	29
4.4.5. Očitavanje molekularnih podataka.....	31
4.5. Statistička obrada podataka.....	33

4.5.1. Obrada bioloških i ekoloških podataka.....	33
4.5.2. Obrada molekularnih podataka.....	34
5. REZULTATI.....	36
5.1. Rezultati istraživanja biologije i ekologije.....	36
5.1.1. Razvojni ciklus jabukova savijača u vegetacijskim sezonama 2008., 2009. i 2010.....	36
5.1.2. Dinamika leta leptira jabukova savijača.....	43
5.1.3. Štete od gusjenica u dozrijevanju plodova.....	47
5.1.4. Novi nalaz vrste <i>Pimpla turionellae</i> (L.), endoparazitoida jabukova savijača	48
5.1.5. Utjecaj temperatura i ukupnog ulova leptira jabukova savijača.....	51
5.1.6. Usporedba teoretskog modela za prognozu štetnika sa rezultatima terenskih istraživanja.....	54
5.2. Rezultati molekularnih istraživanja.....	56
5.2.1. Genetska struktura i raznolikost populacija.....	56
6. RASPRAVA.....	65
6.1. Biologija i ekologija populacija jabukova savijača.....	65
6.2. Genetika populacija jabukova savijača.....	68
7. ZAKLJUČCI.....	72
8. LITERATURA.....	74
9. PRILOZI.....	86
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

U Republici Hrvatskoj jabuka je najzastupljenija voćna vrsta. Prema Statističkom ljetopisu (2010.) jabuke se proizvode na 6.515 ha. Najintenzivnija proizvodnja jabuka po načelima integrirane proizvodnje odvija se u sjeverozapadnom dijelu Hrvatske.

Jabukov savijač (*Cydia pomonella* L.) ekonomski je najvažniji štetnik jabuke u Hrvatskoj i u svijetu. Izuzetno je prilagodljiv različitim klimatskim uvjetima što dokazuje njegova prisutnost u svim uzgojnim područjima jabuke (Thaler i sur., 2008.). Osim što napada jabuku, može se razvijati i na drugim voćnim vrstama (kruška, marelica, orah, kesten) te na šumskom drveću (hrast, bukva i dr.). Hrani se isključivo plodovima i sjemenkama te se ubraja u tehnološke štetnike (Ciglar, 1998.). Prema dosadašnjim podacima iz literature (Ciglar, 1998.) jabukov savijač u Hrvatskoj razvija dvije generacije godišnje tako da se prva javlja početkom svibnja, a druga početkom srpnja. Vrijeme pojave leptira ovisi o sumi efektivnih temperatura potrebnih za njegov razvoj (Ciglar, 1998.). Dužina razvoja štetnika ovisi o vanjskim čimbenicima gdje temperatura ima važnu ulogu.

Prognoza pojave štetnika i određivanje rokova suzbijanja provodi se temeljem praćenja ulova leptira na feromonske lovke i praćenjem srednjih efektivnih temperatura zraka pomoću klimatoloških stanica (Ciglar, 1998.). Insekticidi se primjenjuju kada je populacija štetnika iznad kritičnog broja (prema Ciglaru 5 leptira po feromonskoj lovci) u trenutku izlaženja gusjenica iz odloženih jaja, kod sume 90 °C efektivnih temperatura zbrajanih od ulova kritične populacije štetnika (Ciglar, 1998.). Ovakav model praćenja i određivanja rokova suzbijanja štetnika osiguravao je proizvodnju jabuka s manje od 1% plodova oštećenih savijačem, što se tolerira u mnogim zemljama Europe. No u praksi je postotak napadnutih plodova puno veći. Proizvođači jabuka u Americi, Europi pa tako i u Hrvatskoj posljednjih dvadesetak godina bilježe sve veće populacije štetnika koje su aktivne tijekom cijele vegetacijske sezone uzgoja jabuka, od zametanja plodova do početka berbe kasnog sortimenta. Velika brojnost štetnika u njegovu suzbijanju zahtijeva veliki broj tretiranja koji se u pojedinim voćnjacima kreću od 8 do 12 puta (Barić, 2008; Pajač i sur., 2011.).

Velik broj tretiranja insekticidima ima za posljedicu pojavu rezistentnosti na postojeće grupe insekticida (Franck i sur., 2007.) te povećanje troškova proizvodnje, što dovodi u pitanje rentabilnost proizvodnje jabuka. U zaštiti se često koriste neselektivni kemijski pripravci koji se zbog biologije štetnika (više generacija u jednoj godini) moraju primjenjivati više puta u sezoni (Lacey i sur., 2008.). Učestale aplikacije insekticida štetno

djeluju na ljudsko zdravlje, okoliš i korisne organizme. Negativne posljedice intenzivnog suzbijanja savijača odražavaju se i na samoga štetnika u vidu razvoja rezistentnosti na kemijske skupine insekticida (Sauphanor i sur., 2000.; Boivin i sur., 2001.; Bouvier i sur., 2001.; Brun-Barale i sur., 2005.), kao i promjene genetske strukture populacija jabukova savijača (Franck i sur., 2007.; Franck i Timm, 2010.).

Zbog štetnog posrednog i neposrednog djelovanja insekticidnih tretmana sve se više pozornosti pridaje alternativnim načinima suzbijanja jabukova savijača koji se temelje na poznatim i priznatim načelima integrirane zaštite bilja. U zaštiti se koriste ekološki i toksikološki prihvatljiviji pripravci, a razvijaju se i biotehničke metode suzbijanja, npr. primjenom feromona ("privuci i ubij" i metoda zbunjivanja) (Ciglar, 1998.; Maceljki, 2002.). Uvodi se biološka zaštita primjenom bioinsekticida na bazi bakterija (*Bacillus thuringiensis*), gljivica (*Beauveria basiana*), virusa (virus granuloze, Baculoviridae) te entomopatogenih nematoda (*Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis* spp.).

Nadalje, veliki nedovoljno istraženi potencijal u biološkom suzbijanju predstavljaju mnogobrojni predatori (pauci, grinje, ptice i kukci (stjenice, trčci, mravi, tripsi, uholaže)) i parazitoidi jabukova savijača (parazitske osice-Hymenoptera: Braconidae, Ichneumonidae) (Lacely i sur., 2003.; Lacey i Unruh, 2005.).

Iako je jabukov savijač u Hrvatskoj prisutan od početka uzgoja jabuka, biologija i ekologija štetnika nije se pratila nakon 1981. godine kada je Ciglar utvrdio kritični broj leptira za komercijalne voćnjake. Od tada do danas uvelike se promijenila tehnologija uzgoja jabuke i principi zaštite. Stoga će istraživanja biologije i ekologije jabukova savijača opisana u ovom radu biti izvor novih spoznaja o ovom najznačajnijem štetniku jabuke, što će omogućiti razradu novih, uspješnijih strategija suzbijanja. Podatci o istraživanju genetske strukture jabukova savijača na molekularnoj razini za područje Hrvatske ne postoje te će pomoću mikrosatelitnih markera (SSR) po prvi put biti opisani u ovom radu.

Razvojem molekularnih genetičkih tehnika tradicionalni pristup taksonomiji i sistematici kukaca značajno se promijenio. Zahvaljujući brzim i učinkovitim umnožavanjima dijelova DNA u procesu PCR-a te sekvencioniranju DNA, razvijeni su brojni molekularni markeri (RFLP RAPD, SSR, AFLP) koji su se pokazali izuzetno korisnim u procjenjivanju genetske raznolikosti i protoku gena između vrsta (Bruvo Mađarić., 2009.; Behura, 2006.). Primjenom DNA markera u posljednjih 15 godina značajno je porastao broj molekularnih studija na području mapiranja gena, genetske

srodnosti, filogenije te dinamike populacija kod kukaca (Kumar Jain i sur., 2010.). Markeri koji se najviše upotrebljavaju u populacijskoj genetici kod kukaca su mikrosateliti (SSR) (Capinera 2008., cit. Hoy, 2003.). Genotipizacija pomoću mikrosatelita u proteklih je desetak godina postala najvažnija metoda za proučavanje genetičke bioraznolikosti, a također se koristi u populacijskoj biologiji (razina srodnosti, genetička struktura populacija, protoka gena među populacijama, demografska prošlosti dr.), kod mapiranja genoma, kao biljeg za neke bolesti i sl. (Harcet i Četković 2007., prema Ambriović Ristov i sur., 2007.).

Primjenom mikrosatelitnih markera (SSR) utvrdit će se genetska struktura populacija jabukova savijača u Hrvatskoj te pokušati razjasniti jesu li promjene u ponašanju ovoga štetnika, uzrokovane učestalom primjenom insekticidnih tretmana, vidljive na genetskoj osnovi štetnika. Potvrdit će se mogućnost provođenja genetskih istraživanja na mužjacima leptira jabukova savijača, što će olakšati i pojednostavniti skupljanje uzoraka za buduća istraživanja genetske strukture populacija ovoga ili drugih štetnika.

2. HIPOTEZE I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Pretpostavlja se da je zbog klimatskih promjena, odnosno veće godišnje sume efektivnih temperatura, moguć razvoj treće generacije jabukova savijača u Hrvatskoj. Velik broj tretiranja insekticidima sa sličnim mehanizmom djelovanja u komercijalnim voćnjacima jabuke mogao je izazvati selekciju biotipova jabukova savijača koji se genetski razlikuju od onoga u ekstenzivnoj voćarskoj proizvodnji.

Ciljevi istraživanja su sljedeći:

1. Utvrditi dinamiku pojave, broj generacija i rokove pojave jabukova savijača u tri voćnjaka u agroekološkim uvjetima sjeverozapadne Hrvatske tijekom 2008., 2009. i 2010. godine.
2. Usporediti rokove pojave pojedinih razvojnih stadija sa sumom efektivnih temperatura te utvrditi mogućnost pojave treće generacije štetnika.
3. Pomoću specifičnih mikrosatelitnih markera utvrditi postoji li genetska razlika između populacija jabukova savijača u područjima intenzivne i ekstenzivne voćarske proizvodnje.

3. PREGLED LITERATURE

3.1. Taksonomija i geografska rasprostranjenost

Jabukov savijač (*Cydia pomonella* L.) najopasniji je štetnik u proizvodnji jabuka u Hrvatskoj i svijeta. Podrijetlom je iz Euroazije, no u procesu širenja uzgoja jabuke i kruške globalno se proširio zahvaljujući izuzetnoj prilagodljivosti različitim klimatskim uvjetima i velikom potencijalu razmnožavanja.

Podaci o njegovom podrijetlu, štetnosti i prisutnosti protežu se u daleku prošlost. Još 371. godine prije Krista opisuje ga Theophraste (Balachowsky & Mesnil, 1935.). U Europi je ovu vrstu prvi opisao Linnaeus (1758.) kao *Phalaena Tinea pomonella*.

Ime vrste ima dugu i složenu taksonomsku povijest koja uključuje slučajeve sinonimije i homonimije. U literaturi se najčešće spominje kao *Carpocapsa pomonella* (L.) u razdoblju od 1830. do 1960., *Laspeyresia pomonella* (L.) u razdoblju od 1960. do 1980. i kao *Cydia pomonella* (L.) što se u današnje vrijeme smatra jedinim ispravnim imenom vrste (Wearing i sur., 2001.).

Jabukov savijač je vrsta leptira iz reda Lepidoptera koja pripada porodici Tortricidae (savijači), potporodica Olethreutinae. Unutar potporodice Olethreutinae nalazi se pleme Grapholitini (tablica 1) koje broji oko 898 vrsta te uključuje 62 roda. Mnogi rodovi i vrste još nisu opisani te se pretpostavlja da je brojnost vrsta unutar ovog plemena mnogo veća.

U pripadnike plemena Grapholitini spadaju najznačajniji, ekonomski štetnici voća od kojih se u rodu *Cydia* kao najopasniji ističe jabukov savijač. Vrste pripadnici plemena Grapholitini rasprostrajene su širom svijeta, no po brojnosti se ističe Holarktičko područje (Rota i Brown, 2009.).

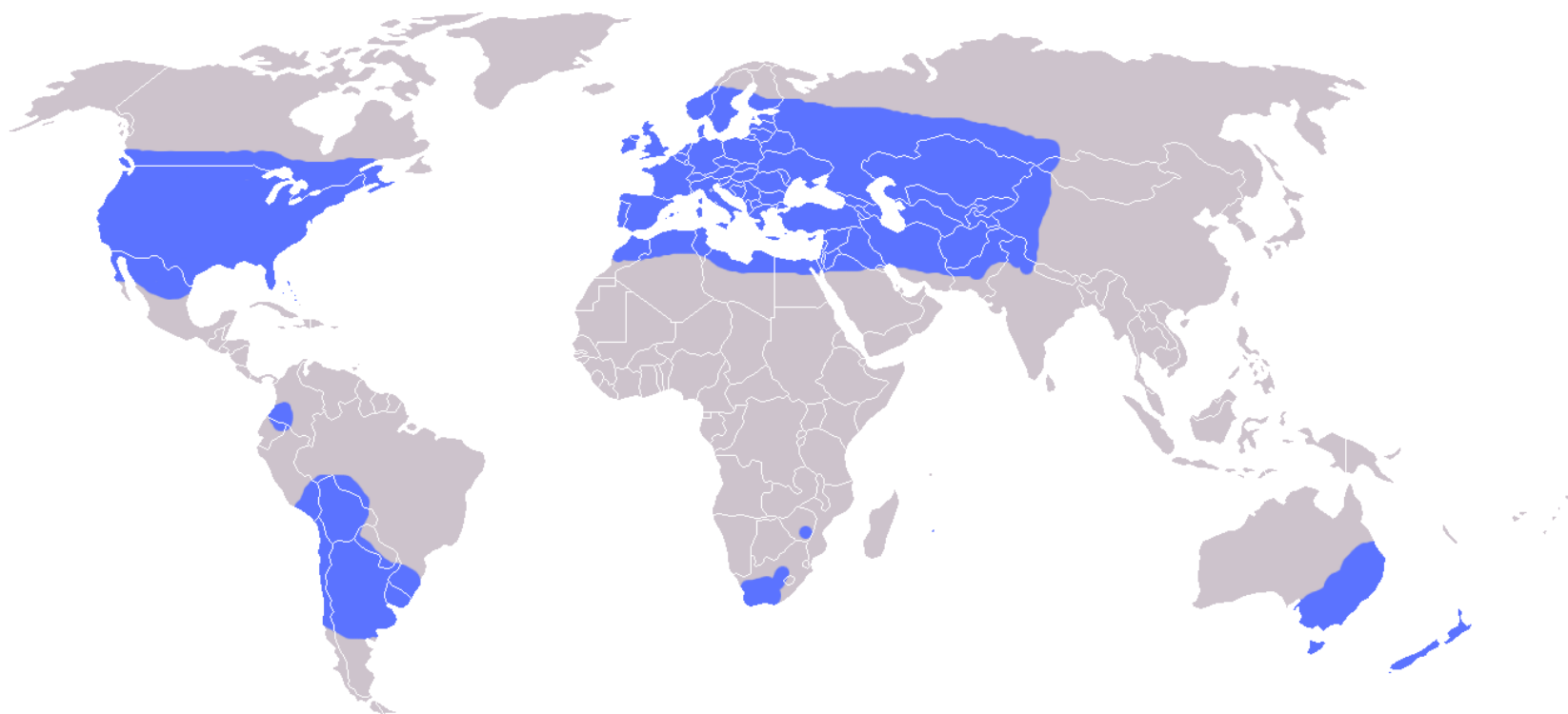
Tablica 1. Taksonomska pripadnost jabukova savijača (*Cydia pomonella* L.)

Klasifikacijska kategorija	Naziv
Red (<i>ordo</i>)	Lepidoptera Linnaeus, 1758.
Podred (<i>subordo</i>)	Microlepidoptera
Porodica (<i>familia</i>)	Tortricidae Latreille, 1803.
Potporodica (<i>subfamilia</i>)	Olethreutinae
Pleme (<i>tribus</i>)	Grapholitini
Rod (<i>genus</i>)	<i>Cydia</i> Hübner, 1825.
Vrsta (<i>species</i>)	<i>Cydia pomonella</i> (Linnaeus, 1758.)

Jabukov savijač rasprostranjen je na svim naseljenim kontinentima svijeta u području umjerene klime (slika 1). Prisutan je u istočnim i zapadnim zemljama SAD-a, Kanadi, Meksiku te u mnogim zemljama Južne Amerike gdje se uzgaja jezgričavo voće. Široko je rasprostranjen u Europi, sjevernoj Indiji, Kini i Africi. Pojavljuje se na otočju Madeira, Mauricijusu, Kanarskim otocima, a zabilježen je i u voćnom uzgojnom području Australije i Novog Zelanda. Izuzetno je prilagodljiv klimatskim prilikama koje pogoduju komercijalnom uzgoju jabuke i kruške pa se pretpostavlja da su ljudske migracije i seobe promicale njegovo širenje (Wearing i sur., 2001.).

3.2. Biljke domaćini

Jabukov savijač je oligofagna vrsta koja napada značajan broj voćnih vrsta, a većina ih pripada porodici Rosaceae. Biljke domaćini ovog štetnika su jabuka, kruška, orah, dunja, marelica, šljiva i neke druge vrste voćaka iz roda *Prunus* (Ciglar, 1998.). U svijetu je vrsta poznata kao značajan štetnik jabuke (*Malus domestica* Borkh.) i kruške (*Pyrus communis* L.) koji uzrokuje ekonomske gubitke u uzgoju. Ukoliko se u intenzivnom uzgoju voćnih vrsta ne upotrebljavaju kemijske mjere zaštite protiv ovog štetnika, gubitci u proizvodnji plodova iznose 30-80% (Wearing i sur., 2001.).



Slika 1. Rasprostranjenost jabukova savijača (Cydia pomonella L.) širom svijeta (foto Pajač Živković)

3.3. Morfološke karakteristike

Leptir jabukova savijača pepeljasto je sive boje s rasponom krila od 15-22 mm. Na vrhu prednjih krila nalazi se karakteristično veće smeđe ili tamnocrveno zlatno obrubljeno polje ("zrcalo"). Stražnja krila su tamno smeđe boje. Jaja su spljoštena, ovalna i promjera 1 mm. U početku razvoja djelomično su providna, a kasnije se nazire crvenkasti polukrug. Iz jaja se razvijaju gusjenice bjeličaste boje koja kasnije prelazi u blijedo ružičastu boju. Glava gusjenice je smeđe boje s tamnim pjegama, nadvratni štiti je svjetlosmeđe boje s crnim pjegama. Analni štiti je blijed, a analnog češlja nema. Na bokovima se nalaze male tamne bradavice s dlakama svjetlosmeđe boje. Odrasla gusjenica može narasti od 18 do 20 mm.

Kukuljica je 8-10 mm duga, žuto smeđe do tamno smeđe boje. Nalazi se u eliptičnom bijelom zapretku (Kovačević, 1947.; Kovačević, 1952.; Alford, 1984.; Ciglar, 1998.; Maceljki, 2002.) (slika 2 a-d).

3.4. Životni ciklus

Štetnik prezimi u obliku gusjenice u mirovanju ispod kore na deblu ili debljim granama. Gusjenica se kukulji u rano proljeće, najčešće u ožujku, pri proljetnim temperaturama višim od 10 °C. Ovisno o klimatskim uvjetima za razvoj leptira potrebna je suma efektivnih temperatura od 100 °C (Wildbolz, 1965., cit. Ciglar, 1998.) što se u našim uvjetima uzgoja događa već krajem travnja. Pojava leptira povezana je s klimatskim prilikama (temperaturom i vlagom) i s razdobljem cvatnje voćaka, odnosno s razvojem plodova. Mužjaci se javljaju prije ženki (protandrija). Oni žive od 8 do 15 dana, a ženke od 10 do 20 dana nakon izlaženja iz kukuljuce (Garcia de Otazo i sur., 1992.). Od sredine ili kraja svibnja let leptira prve generacije mnogo je intenzivniji, a traje sve do kraja lipnja. Leptiri su najaktivniji u sumrak na zalasku sunca i pred svitanje. U tom se periodu pare (kopulacija se odvija pri temperaturama zraka višim od 15 °C) te ženke odlažu po jedno jaje u blizini čaške ploda jabuke ili na list koji se dotiče s plodom. Jedna ženka može odložiti do 100 jaja. Nakon 7-14 dana iz jaja izlaze gusjenice koje se ubušuju u plodove. Hrane se unutrašnjošću ploda i dostižu puni rast za četiri tjedna. Nakon hranjenja napuštaju plod te se spuštaju prema deblu i debljim granama kako bi pronašle mjesto ispod kore gdje će se zakukuljiti.

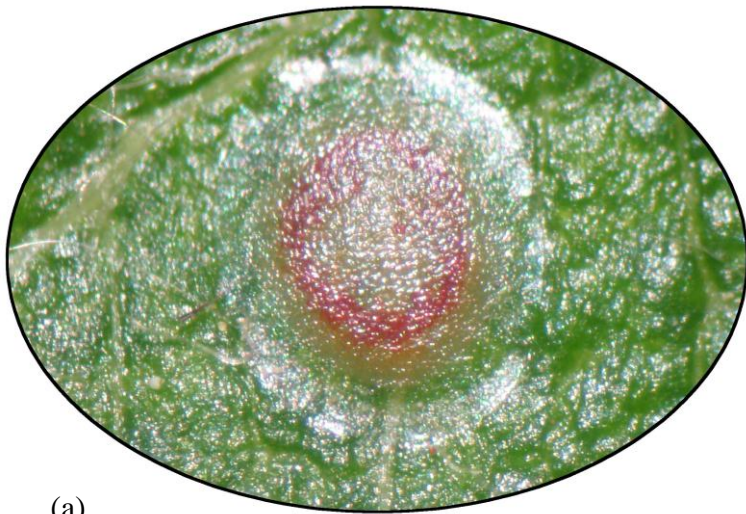
Za razvojni ciklus jedne generacije (od stadija jaja do pojave leptira) potrebna je suma efektivnih temperatura od 610 °C (Wildbolz, 1965., cit. Ciglar, 1998.).

Nakon desetak dana javlja se leptir druge generacije koji leti od polovice srpnja do polovice kolovoza, ponovno odlaže jaja na plodove te se ciklus razvoja gusjenica ponavlja.

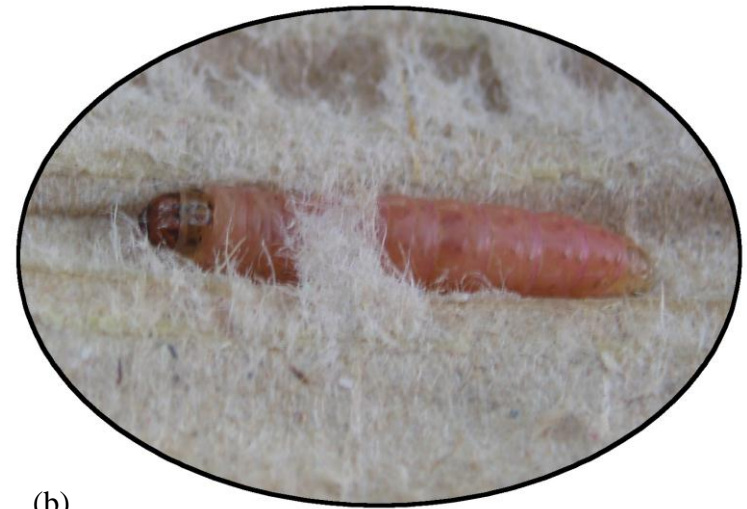
Štetnik u Hrvatskoj ima dvije generacije godišnje (Kovačević, 1952.; Alford, 1984.; Ciglar, 1998.; Maceljki, 2002.). Širenje vrste ovisi o letu odraslih leptira jer je kretanje gusjenica ograničeno na prostoru unutar nekoliko stabala voćaka (Schumacher i sur., 1997.a). Jabukov savijač se smatrao "sedentornom vrstom" (Geier, 1963.; Mani i Wildbolz, 1977. cit. Keil i sur., 2001.) . No istraživanja su pokazala kako neke jedinke mužjaka i ženki pokazuju sposobnost kraćih i dužih letova unutar nekog područja. Kapacitet širenja letom visoko varira te se smatra da je oko 10% jedinki više pokretno, tzv. dugi letači (*long-flyers*), a ostatak otpada na sedentorne primjerke, tzv. kratki letači (*short-flyers*) (Schumacher i sur., 1997.a; Schumacher i sur., 1997.b; Dorn i sur., 1999.; Gu i sur., 2006.). U poljskim uvjetima istraživanja zabilježen je najduži let od 11 km (Mani i Wildbolz, 1977., cit. Schumacher i sur., 1997.a). Jedinke koje imaju sposobnost leta na duge udaljenosti smatraju se zaslužnim za kolonizaciju novih staništa (Keil i sur., 2001.).

3.5. Štetnost

Gusjenica u procesu ishrane progriza kožicu ploda i ulazi u plod, hraneći se stvara spiralni hodnik koji vodi do sjemenjače ploda. Gusjenica se hrani sjemenkama te buši hodnik na suprotnu stranu od ulaznog otvora i napušta plod. Na kraju vegetacijske sezone jedna gusjenica može oštetiti više plodova prije nego dosegne puni rast i razvoj. Napadnuti plod prepoznaje se po ulaznom otvoru na kojem se nalazi izmet gusjenice. Stari se napad prepoznaje po relativno velikoj bušotini čiji se rubovi suše, a novi po površinskim oštećenjima oko ulaznog mjesta na plodu. Na mjestu oštećenja jasno se uočava crvenkasto polje. Iznad oštećenog mjesta stvara se plutasto tkivo preko kojeg ulazna rana može zarasti. Plodovi jabuke oštećeni rano u sezoni brže dozrijevaju te otpadaju prerano sa stabla. Kasnije napadnuti plodovi ostaju na stablu, ali je njihova unutrašnjost oštećena, tj. "crvljiva" (slika 3 a-c). Kod napada na orah zaraženi plodovi su bezvrijedni jer gusjenica djelomično ili potpuno izjeda unutrašnjost ploda. U intenzivnoj proizvodnji voća tolerira se napadaj do 1%, iako proizvođači mjerama zaštite pokušavaju spustiti udio napadnutih plodova ispod 0,5% (Kovačević, 1952.; Ciglar, 1998.).



(a)



(b)

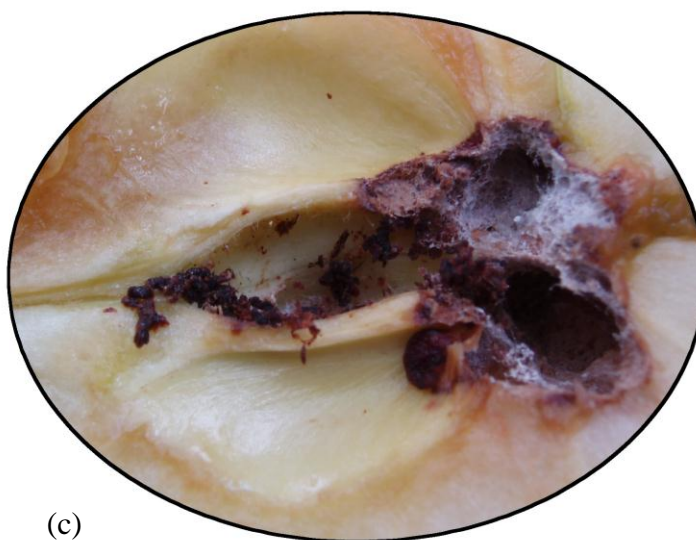
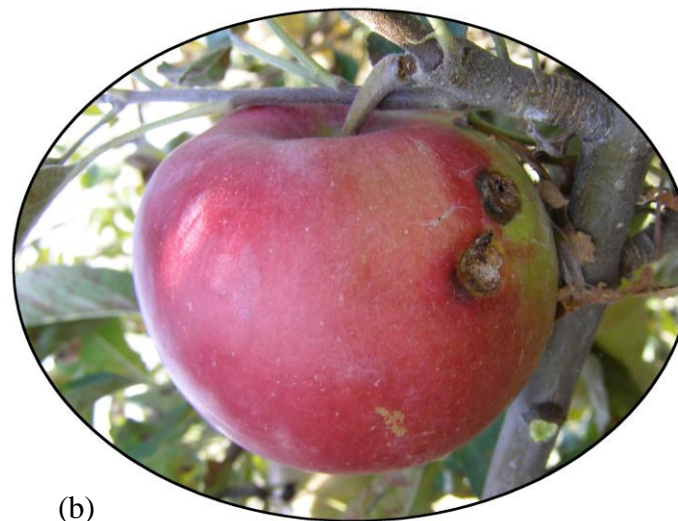


(c)



(d)

Slika 2. Razvojni oblici jabukova savijača; (a) jaje; (b) gusjenica; (c) kukuljica; (d) odrasli leptir (foto Pajač Živković)



Slika 3. Štete od jabukova savijača na plodovima jabuke; (a) i (b) bušotine na plodu ispunjene izmetom gusjenice; (c) oštećena unutrašnjost ploda jabuke (foto Pajač Živković)

3.6. Fiziološko-biokemijske promjene u plodu jabuke uzrokovane napadom štetnika

Zbog napada jabukova savijača biljka domaćin brani se pokretanjem tzv. sustava potaknute otpornosti. Pomoću ovog obrambenog sustava u biljci se kao odgovor na stres aktivira složeni mehanizam endogenih signalnih molekula koje reguliraju obranu. Najvažnije signalne molekule u obrani jesu biljni hormoni (fitohormoni) koji potiču ubrzano disanje te prijevremeno dozrijevanje plodova (Tuzun i Bent, 2006.).

Najvažniji biljni hormon koji utječe na dozrijevanje plodova je etilen. Pojačanom sintezom etilena u biljci se aktiviraju enzimi (kinaze, amilaze, hidrolaze i pektinaze) pod čijim se utjecajem mijenja boja kože ploda, neutraliziraju kiseline, škrob se hidrolizira u šećere, netopljivi protopektini se hidroliziraju u topljive pektinske tvari čime se omekšava tekstura ploda, neke organske tvari pretvaraju se u aromatične te se pojačava proces disanja i transpiracije vode iz plodova. Aktivacijom etilena i drugih biljnih hormona (apscizinske kiseline (ABA), jasmonata (JA) i salicilata (SA)) u napadnutim plodovima jabuke dodatno se pojačava disanje i ubrzano dozrijevanje jabuka.

Jabukov savijač napada biljku domaćina u dvije kritične faze rasta i razvoja. Prva kritična faza jest *formiranje plodova*, a ono se u našim uvjetima uzgoja najčešće odvija u mjesecu svibnju. Druga, voćarima štetnija, kritična faza jest *rast i razvoj plodova* koji se odvija krajem svibnja te traje sve do berbe plodova. Uslijed napada u fazi *formiranja plodova* gusjenica jabukova savijača hrani se mesom i sjemenkama plodova u kojima se sintetiziraju važni biljni hormoni (auksini, citokinini i giberelini) potrebni za diobu stanica i dalji razvoj ploda. Plod bez sjemenki ne može se normalno razvijati jer se u njemu više ne luče potrebni hormoni pa nastaje zastoj u rastu. Povratna reakcija biljke uočava se u vidu stvaranja odvajajućih plutastih stanica između peteljke i rodnog izboja, postupno popušta njihova međusobna veza te plod otpada sa stabla.

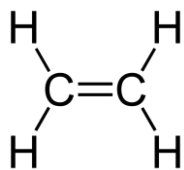
Štete u prvoj kritičnoj fazi, tj. fazi formiranja plodova, nisu zabrinjavajuće jer se na ovaj način djelomično prorijedi višak plodova, no mogu biti značajne uslijed slabije cvatnje, tj. produciranja manjeg broja generativnih pupova.

Mnogo opasniji napad jabukova savijača događa se u fazi *rasta i razvoja plodova* zbog toga što su tada plodovi veći i ulaze u period dozrijevanja. Slično kao i kod prvog sezonskog napada, gusjenica jabukova savijača ubušuje se u plod, hrani se mesom ploda te ga onečišćuje svojim izmetom. Kao odgovor na nastali stres, u napadnutom stablu jabuke aktivira se potaknuta sustavna otpornost u vidu složenih biokemijskih reakcija koje potiču

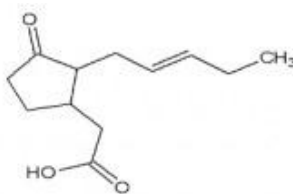
ubrzano disanje i dozrijevanje ploda. U biljnim stanicama odvija se niz međusobno ovisnih fizioloških procesa uvjetovanih pojačanim radom enzimskih sustava te sintetiziranje biljnih hormona.

3.6.1. Biljni hormoni

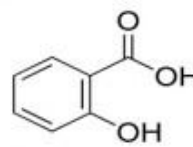
Biljni hormoni su organske molekule koje u vrlo malim količinama stimuliraju, inhibiraju ili na neki drugi način utječu na tijek biokemijskih procesa u biljci. Oni djeluju u tkivima u kojima nastaju ili se nakon sinteze translociraju u druge dijelove biljke gdje iskazuju svoj fiziološki učinak (Chesworth i sur., 1998.). Biljni hormoni koji se aktiviraju u procesu dozrijevanja ploda (slike 4, 5, 6) jesu: etilen, abscizinska kiselina (ABA), salicilna kiselina, jasmonska kiselina te peptidni hormoni. Etilen i jasmonska kiselina derivati su masnih kiselina koji potiču starenje ploda, dok peptidni hormoni, dodatno, uz salicilnu i jasmonsku kiselinu sudjeluju u obrani biljke uslijed napada patogena (Heldt, 2005.).



Slika 4. Etilen



Slika 5. Jasmonat



Slika 6. Salicilna kiselina

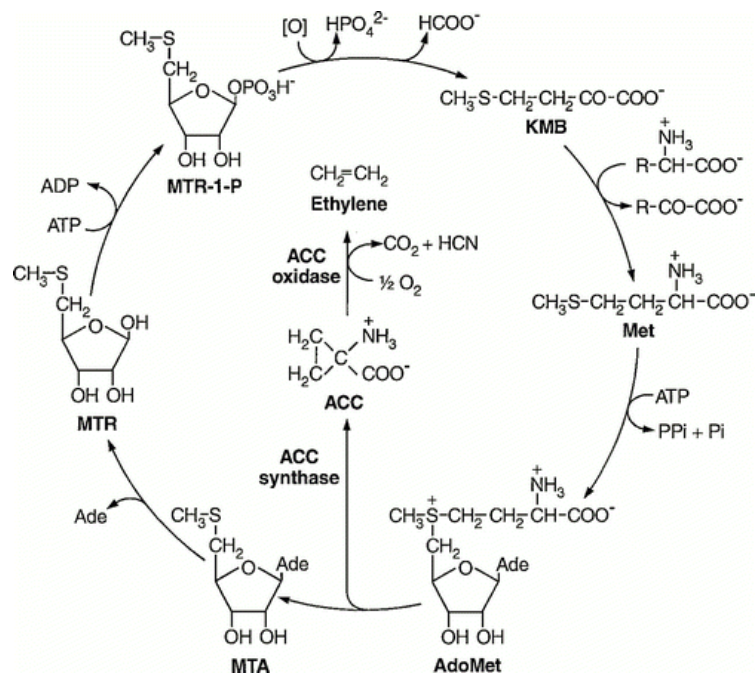
(www.tehnologijahrane.com)

3.6.1.1. Etilen

Postoji mnogo dokaza da dozrijevanje voća prije svega kontrolira etilen. U većini mesnatih plodova početku zrenja prethodi "eksplozija" proizvodnje etilena što stimulira disanje. Etilen može promijeniti propusnost membrana što dovodi do oslobađanja enzima potrebnih za zrenje. On isto tako može povećati sintezu proteina, uključujući proteine potrebne za hidrolizu staničnih komponenti te za povećanje disanja (Chesworth i sur., 1998.).

Polazna tvar za sintezu etilena jest aminokiselina metionin. Prva reakcija u sintezi etilena jest fosforilacija metionina i njegovo vezanje s adeninom u spoj AdoMet (S-

adenozil-metionin). Djelovanjem ACC-sintetaze izdvaja se metilno adenzin i 1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina. Posljednja reakcija u sintezi etilena jest pretvaranje 1-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline u etilen (slika 7) (Heldt, 2005.). Etilen se prenosi intercelularno (od stanice do stanice difuzijski), a vjerojatno i provodnim tkivima. Kod klasičnog mehanizma djelovanja etilen se veže za određeni receptor na plazmatskoj membrani te time prelazi u aktivi oblik koji inducira određeni odgovor stanice. Odgovor se očituje u izazivanju reakcija koje dovode do promjena u ekspresiji gena, što uvjetuje fiziološki efekt sazrijevanja ploda (Jašić, 2010.).



Slika 7. Sinteza etilena (Heldt, 2005.)

Pod djelovanjem etilena u plodu jabuke se aktiviraju enzimi (kinaze, amilaze, hidrolaze, pektinaze) koji pokreću procese:

- promjene boje kože ploda jer se zeleni pigment klorofil koji se akumulira u nezrelim plodovima zamjenjuje s pigmentima karotenoidima, flavonima i antocijanima te plodovi poprimaju narančastu, žutu i crvenu boju;
- neutralizacije kiselina u plodu;
- hidrolize škroba u šećere;

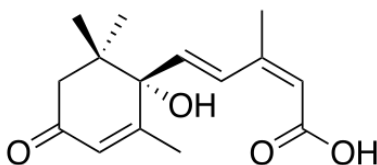
- hidrolize netopljivih protopektina u topljive pektinske tvari čime se omekšava tekstura ploda;
- pretvaranja nekih organskih tvari u aromatične tvari;
- pojačanog disanja te transpiracije vode iz plodova.

Navedeni procesi prirodno se odvijaju za vrijeme dozrijevanja plodova jabuke, no dodatno se intenziviraju uslijed stresa kao odgovor na napad štetnika.

3.6.1.2. Ostali biljni hormoni

Ostali biljni hormoni kao abscizinska kiselina (ABA), jasmonati (JA) i salicilati (SA) u malim koncentracijama isto tako uzrokuju određene ciljane procese u stanicama biljke te služe u reguliranju rasta, zrenja i dozrijevanja plodova jabuke.

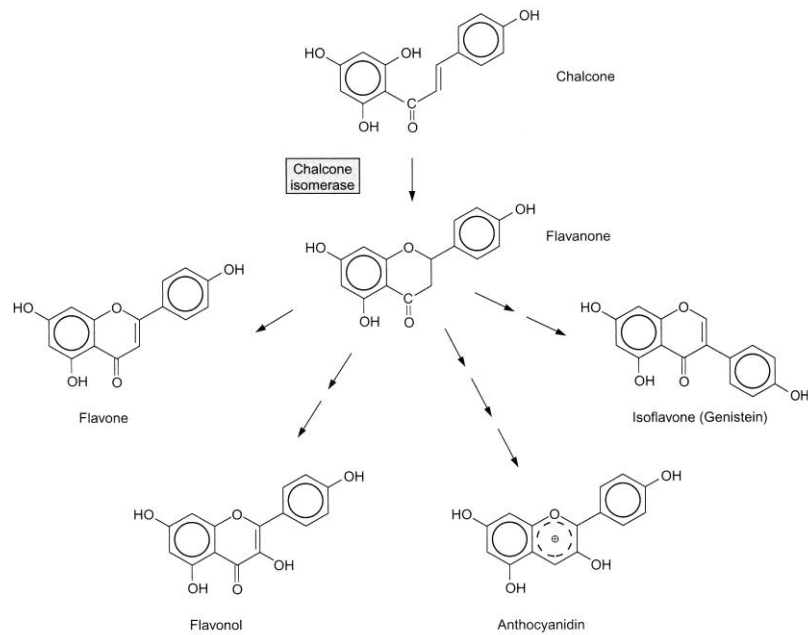
Apscizinska kiselina (slika 8) poznata i kao apscizin biljni je hormon koji prije svega inhibira procese rasta u biljci, no odgovoran je i za obranu biljke od napada patogenih mikroorganizama. U funkciji potaknute sustavne otpornosti aktivira se u oštećenim plodovima voća te zajedno s jasmonskom kiselinom inducira procese starenja (Jašić, 2010.).



Slika 8. Abscizinska kiselina (www.tehnologijahrane.com)

3.6.2. Sinteza biljnih pigmenata

Biljni pigmenti flavoni i antocijani flavonoidi su odgovorni za promjenu boje ploda u fazi dozrijevanja. Polazna je tvar za sintezu flavonoida aromatska aminokiselina fenilalanin. Fenilalanin se u putu šikiminske kiseline sintetizira u spoj halkon koji se dalje djelovanjem enzima halkon izomeraze sintetizira u flavonoide (flavon, izoflavon, flavonol i antocijanidin) (slika 9) (Heldt, 2005.). U interakciji s biljnim hormonima biljni su pigmenti uključeni u regulaciju fizioloških procesa rasta, zrenja i dozrijevanja plodova.



Slika 9. Sinteza biljnih pigmenata (Heldt, 2005.)

3.7. Mjere suzbijanja

3.7.1. Kemijske mjere

Klasično suzbijanje jabukova savijača podrazumijeva intenzivnu primjenu agresivnih kemijskih preparata, najčešće širokog spektra djelovanja, koji se zbog biologije štetnika (više generacija u jednoj godini) moraju primjenjivati više puta u sezoni (Lacey i sur., 2008.; Gonzalez, 2007.). Učestale aplikacije insekticida štetno djeluju na ljudsko zdravlje, okoliš i korisne organizme. Negativne posljedice intenzivnog suzbijanja savijača odražavaju se i na samog štetnika u vidu razvoja rezistentnosti na kemijske skupine insekticida (Sauphanor i sur., 2000.; Boivin i sur., 2001.; Bouvier i sur., 2001.; Brun-Barale i sur., 2005.), kao i promjene genetske strukture populacija jabukova savijača (Franck i sur., 2007.; Franck i Timm 2010.). Zbog štetnog posrednog i neposrednog djelovanja insekticidnih tretmana sve se više pozornosti pridaje alternativnim načinima suzbijanja jabukova savijača koji se temelje na poznatim i priznatim načelima integrirane zaštite bilja.

U integriranoj zaštiti kemijska sredstva primjenjuju se samo ako je to prijeko potrebno, a rokovi suzbijanja temelje se na praćenju štetnika. U odabiru sredstava za

zaštitu prednost se daje prirodnim, biološkim i biotehničkim pripravcima koji su manje opasni za prirodne neprijatelje i okoliš.

3.7.2. Biološke mjere

Entomopatogeni organizmi, predator i parazitoidi prirodni su neprijatelji jabukova savijača koji se koriste u biološkom suzbijanju. Prirodni su neprijatelji, uz klimatske prilike i postupke čovjeka, glavni regulator dinamike populacije svih štetnika. Stoga se svaka promjena u njihovoj brojnosti znatno odražava na intenzitet pojave štetnika (Igrc Barčić i Maceljki, 2001.). Jabukov savijač ima mnogo prirodnih neprijatelja, a neki od njih pokazuju vrlo dobar potencijal suzbijanja (Maceljki, 2002.). Entomopatogeni organizmi koji se koriste u suzbijanju su virusi (virus granuloze-CpGV), bakterije (*Bacillus thuringiensis-Bt pripravci*), gljivice (*Beauveria bassiana*), nematode (porodice Mermithidae i Steinernematidae), fitoplazme i protozoe. Iako se primjenom ovih organizama ne šteti okolišu, drugim korisnim organizmima u voćnjaku i ljudskom zdravlju, djelotvornost im je često upitna zbog njihove nestabilnosti. Najbolja učinkovitost postiže se primjenom virusa granuloze (CpGV) i entomopatogenih nematoda (EPNs). Virus granuloze je vrlo virulentan za mlade gusjenice jabukova savijača, no sunčeva svjetlost ga inaktivira te se često mora ponovno aplicirati. Entomopatogene nematode *Steinernema feltiae* i *S. carpocapsae* imaju vrlo dobar učinak na gusjenice u dijapauzi prezimljujuće generacije, ali zahtijevaju povoljne temperaturne uvjete (iznad 10 i 15 °C) i vlagu koja se u voćnjaku mora održavati i nekoliko sati nakon primjene (Lacey i Unruh, 2005.).

U predatore jabukova savijača ubrajaju se pauci, grinje, ptice, šišmiši i kukci. Kukci (stjenice, trčci, mravi, tripsi i uholaže) predstavljaju najmnogobrojniju skupinu predatora jabukova savijača. Stjenice iz porodica Anthocoridae (*Orius insidiosus* i *Anthocoris musculus*) i Miridae (*Hyaliodes harti*, *Blepharidopterus angulatus*, *Phytocoris* sp., *Diaphnidia* sp. i *Deraeocoris* spp.) predatori su jaja i mladih gusjenica, a vrste iz porodica Reduviidae i Nabidae hrane se odraslim gusjenicama. Trčci (Carabidae) i ostali kornjaši iz porodice Trogossitidae, Malachiidae, Staphylinidae, Cleridae, Cantharidae i Elateridae hrane se zakukuljenim gusjenicama, dok se mravi (Formicidae) hrane odraslim gusjenicama. Neke vrste tripsa (*Haplothrips faurei* i *Leptothrips mali*) i uholaža (*Forficula auricularia*) hrane se jajima (Lacey i sur., 2003.; Lacey i Unruh, 2005.).

Kod brojnih vrsta parazitoida (više od 100) uočen je određeni oblik parazitizma, no samo je kod nekih vrsta zabilježena visoka učinkovitost u suzbijanju savijača. Ose najeznice iz porodica Braconidae (*Ascogaster quadridentata* i *Microdes rufipes*), Ichneumonidae (*Mastrus ridibundus*, i *Liotryphon caudatus*) i Trichogrammatidae (*Trichogramma* sp.) najpoznatije su vrste parazitoida savijača. Parazitizam entomofagnih osica *Mastrus ridibundus* i *Ascogaster quadridentata* uspješno se primjenjuje u suzbijanju savijača u nekim državama SAD-a (Lacey i Unruh, 2005.). Vrste iz porodice Braconidae najčešće parazitiraju gusjenice, Ichneumonidae parazitiraju gusjenice i kukuljice, a Trichogrammatidae parazitiraju jaja. Osice najčešće pronalaze domaćina podražajem kemijskih tvari (kairomoni) koje izlučuje domaćin. Za razliku od parazita čiji domaćin nakon parazitacije ostaje na životu, parazitoidi žive na račun jednog razvojnog stadija domaćina (jaje, gusjenica, kukuljica, odrasli oblik) koji ugiba nakon što parazitoid dovrši svoj razvoj (Maceljski, 2002.).

3.7.3. Biotehničke mjere

Biotehničke mjere koje se koriste za suzbijanje jabukova savijača jesu metoda zbunjivanja (*mating disruption*) i metoda "privuci i ubij" (*attract and kill*). Obje se zasnivaju na primjeni feromona ženki jabukova savijača koji privlači mužjake na parenje (Maceljski, 2002.).

Metoda zbunjivanja sastoji se u distribuciji velikog broja feromona uklopljenih u plastične vrpce duge dvadesetak centimetara koje se ovijaju o grane voćaka. Mužjake zbunjuju sintetizirani izvori mirisa ženki pa ne mogu naći one prave, koje zbog toga ostaju neoplođene. Na ovaj način smanjuje se brojnost gusjenica štetnika (Igrc Barčić i Maceljski, 2001.). Ovakav način suzbijanja ekološki i toksikološki je povoljan, no nije posve učinkovit. Naime, neke jedinice savijača mogu uz primjenu ove metode ipak pronaći i oploditi ženke te stvoriti potomstvo (Chidawanyika, 2010.).

Metoda je manje učinkovita u voćnjacima u kojima su populacije savijača vrlo visoke, malim voćnjacima zbog doleta savijača iz susjednog okružja ili voćnjacima u čijoj se neposrednoj blizini nalaze drugi netretirani voćnjaci (Gharekhani, 2007.).

Primjenom metode "privuci i ubij", feromonski mamci koji se koriste za praćenje štetnika mogu na podlošku umjesto ljepila sadržavati insekticidni pripravak. Feromon u mamcu privlači mužjake savijača, a insekticid ih ubije (Maceljski, 2002.). Metoda isto tako

nije posve učinkovita jer neke jedinke savijača ne budu privučene, a samim time ni suzbijene.

3.8. Rezistentnost na insekticide

U intenzivnoj proizvodnji jabuka više od 70% ukupnih tretmana insekticidima koristi se za suzbijanje jabukova savijača. Uslijed čestih aplikacija kemijskih sredstava štetnik je razvio otpornost na različite kemijske skupine insekticida u SAD-u i Europi (Franck i sur., 2007.).

U Europi su se za suzbijanje jabukova savijača 80-ih i 90-ih godina prošlog stoljeća intenzivno koristili piretroidi te organo-fosforni insekticidi na koje je štetnik ubrzo stekao otpornost (Sauphanor i sur., 1997.a; Sauphanor i sur., 2000.; Bouvier i sur., 2001.; Stará i sur., 2006.). Pojavom rezistentnosti na dvije spomenute kemijske skupine insekticida, za suzbijanje su se počele koristiti neke druge grupe insekticida kao npr. regulatori razvoja kukaca za koje je također kasnije ustanovljeno da uzrokuju rezistentnost kod jabukova savijača (Sauphanor i sur., 2000.; Ioriatti i sur., 2007.). Na područjima gdje je ustanovljena rezistentnost drastično se smanjuje izbor registriranih insekticida koji imaju dozvolu za primjenu na jabukov savijač. Spektar insekticidnih grupa na koje je jabukov savijač stekao otpornost svakim se danom povećava te obuhvaća i pripravke iz skupine neonikotinoida te ekološki povoljnih bioloških insekticida, naturalita (*avermectins*) (Reyes i sur., 2007.).

Dodatni problem nastao je razvojem kros-rezistentnosti uslijed koje je štetnik postao otporan na nekoliko kemijskih skupina insekticida što zaštitu čini još kompliciranijom i težom (Sauphanor i sur., 1998.; Dunley i sur., 2000.; Reuveny i Cohen, 2004.).

Mehanizmi rezistentnosti su mnogobrojni, no njihovi samostalni ili zbirni učinci u pojedinoj populaciji još nisu do kraja razjašnjeni (Reyes i sur., 2007.).

Franck i sur. 2007. godine utvrdili su kako mehanizmi uključeni u nastanak nespecifične rezistentnosti uključuju aktivnost nekoliko metaboličkih enzima, kao što su citokrom P450 oksidaza ili glutathion-S-transferaza te promjene u mjestu djelovanja nekih insekticidnih grupa, osobito piretroida. Brun-Barale i sur. 2005. godine također su proučavali razvoj rezistentnosti jabukova savijača na piretroide. Na temelju saznanja da je obarajuća rezistentnost *knockdown resistance (kdr)* na piretroide povezana s točkastim mutacijama u genetskoj strukturi mnogih kukaca, razvijen je dijagnostički test na bazi PCR-a (*PASA*)

koji se koristi za proučavanje frekvencije *kdr* mutacija prirodnih populacija jabukova savijača. Franck i sur. 2007. godine koriste ga za procjenu varijabilnosti *kdr* alela na populacijama jabukova savijača uzorkovanih u tretiranim i netretiranim voćnjacima jabuke u Armeniji, Čileu, Francuskoj i Italiji. Iako su najveće proporcije *kdr* alela utvrđene u voćnjacima koji su se za vrijeme pokusa intenzivno tretirali sa piteroidnim insekticidima, sličan razmjer *kdr* alela utvrđen je i u voćnjacima koji su nekoliko godina bili u sustavu organske proizvodnje.

Boivin i sur. 2001. godine provodili su testove uspoređivanja kondicije osjetljivih i rezistentnih sojeva jabukova savijača. Usporedbom stope parenja, plodnosti, vremena razvoja, težine i životnoga vijeka odraslih leptira, ustanovljeno je da su rezistentni sojevi manje plodni, razvijaju se sporije, manje su težine i imaju kraći životni vijek od osjetljivih sojeva.

Pojavom rezistentnosti mnogi autori bave se testiranjima učinkovitosti insekticida na različite razvojne stadije jabukova savijača. Ovim testovima moguće je odrediti točne doze insekticida kod kojih jabukov savijač razvija rezistentnost na određenu kemijsku skupinu sredstva (Sauphanor i sur., 1998.; Sauphanor i sur., 1999.; Sauphanor i sur., 2000.; Boivin i sur., 2003.; Boivin i sur., 2004.; Boivin i sur., 2005.; Bouvier i sur., 2001.; Pasquier i Charmillot, 2003.; Reuveny i Cohen, 2004.; Ioriatti i sur., 2007.).

3.9. Genetska struktura

Unatoč ekonomskoj važnosti malo se zna o genetskoj diferencijaciji i protoku gena jabukovog savijača (Franck i sur., 2007.). Pretpostavlja se da su se populacije jabukovog savijača uslijed klimatskih promjena i čestih insekticidnih tretmana diferencirale na mnoge ekotipove različitih bioloških i fizioloških zahtjeva za razvoj (Thaler i sur., 2008.). Genetsku strukturu jabukova savijača proučavali su Buès i sur. 1995. godine elektroforetskom analizom proteina, tj. pomoću alozim markera, no primijećena je mala genetska diferencijacija proučavanih populacija.

Timm i sur. 2006. godine koristili su AFLP markere te uspješno utvrdili razlike između populacija uzorkovanih na malim geografskim udaljenostima. Rezultate ovog istraživanja potvrdili su 2008. godine Thaler i sur. koji su AFLP markere koristili za proučavanje molekularne filogenije i populacijske strukture jabukova savijača. Primjenom mitohondrijskih genetičkih markera utvrđena je nedavna evolucijska povijest jabukova

savijača (razdvajanje populacije u pleistocenu na dvije struje, ponovno kasnije križanje mitohondrijskih haplotipova u holocenu i, konačno, pod utjecajem čovjeka potpomognuto međusobno miješanje i razdvajanje populacije na mnogo lokalno prilagođenih populacija). Tijekom posljednjih godina za jabukovog savijača su razvijeni snažniji kodominantni markeri (mikrosateliti) (Franck i sur., 2005.; Zhou i sur., 2005.). Franck i sur. 2007. godine primjenjuju ih u Francuskoj za procjenu populacija jabukova savijača. Rezultati istraživanja pokazali su nisku genetsku diferencijaciju proučavanih populacija. Međutim, primijećen je marginalni utjecaj insekticidnih tretmana na bogatstvo alela štetnika. Fuentes-Contreras i sur. 2008. godine potvrđuju ove rezultate istraživanjem genetske strukture jabukovog savijača u Čileu. U proizvodnim i napuštenim voćnjacima skupljani su uzorci jabukova savijača te je utvrđeno samo 0,2% genetske varijabilnosti između proučavanih populacija. Oprečni rezultati dobiveni su primjenom istih mikrosatelitnih markera u Švicarskoj gdje su Chen i Dorn 2009. godine zabilježile značajnu genetsku diferencijaciju između populacija uzorkovanih sa različitih biljaka domaćina uz mogućnost razlikovanja lokalnih populacija uzorkovanih na istom domaćinu na udaljenosti manjoj od 10 km.

3.10. Genetsko preinačavanje

Genetska istraživanja jabukova savijača kreću se i u smjeru genetskih transformacija pomoću biotehnoloških metoda. Tijekom različitih projekata u posljednjih 40 godina mnogobrojni su štetnici, uključujući i jabukovog savijača, sterilizirani postupkom radijacije ili primjenom kemikalija (Hoy, 2003.). Ovakav pristup suzbijanja naziva se metoda ispuštanja sterilnih kukaca (*sterile insect release method* - *SIRM*) ili metoda sterilnih kukaca (*sterile insect technique* - *SIT*). Postupak uključuje masovni uzgoj željene vrste kukca, sterilizaciju primjenom gama zračenja te ispuštanje steriliziranih kukaca na željeno područje. Većinom se steriliziraju mužjaci. Ispušteni sterilni mužjaci pare se s plodnim ženka iz prirode. Kako se one ne oplode, ne produciraju potomstvo te se na taj način smanjuje prirodna populacija štetnika (Hoy, 2003.). Metoda sterilnih kukaca vrlo je sigurna jer se u njoj ciljano suzbija samo željena, štetna vrsta kukca za razliku od klasične kemijske metode zaštite kod koje se uz željeni organizam suzbiju i neki neželjeni, korisni kukci. Zbog uske specijaliziranosti metoda sterilnih kukaca može uspješno zamijeniti kemijsku metodu zaštite.

Navedena tehnika zaštite jedina je ekološki prihvatljiva metoda koja uspješno suzbija (eradica) štetnika na širem geografskom području. Ona se uspješno može primjenjivati u kombinaciji s biološkim metodama zaštite poput zaštite pomoću parazitoida, predatora te drugih patogenih organizama.

Klasično suzbijanje savijača primjenom insekticidnih pripravaka štetno djeluje na prirodne neprijatelje i druge korisne organizme, ostavlja rezidue insekticida u plodovima te šteti okolišu. Nasuprot kemijskom suzbijanju, metoda sterilnih kukaca zbog uske specijaliziranosti djeluje samo na štetnika te ne uzrokuje nikakve negativne posljedice na okoliš (Thistlewood i Judd, 2003.). Trenutno se u svijetu primjenom metode sterilnih kukaca na širem geografskom području provodi nekoliko programa suzbijanja štetnika (Dyck i Gardiner, 1992.; Judd i Gardiner, 2005.). Genetska kontrola štetnika predstavlja atraktivnu alternativnu metodu kemijskom suzbijanju u vidu sigurnosti, uske specijaliziranosti te ograničenih negativnih učinaka na okoliš (Hoy, 2003.).

3.11. Molekularni markeri u populacijskoj genetici

Razvitak i uporaba DNA markera temelji se na vrlo značajnim otkrićima molekularne genetike kao što su restrikcijski enzimi, lančana reakcija polimerazom (PCR), te mikrosateliti. Na temelju ovih otkrića razvijen je velik broj molekularnih tehnika (1. Polimorfizam dužine restrikcijskih ulomaka (*Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP*); 2. Slučajno amplificirana polimorfna DNA (*Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD*); 3. Polimorfizam dužine amplificiranih ulomaka (*Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP*) i 4. Ponavljajuće jednostavne sekvence (*Simple Sequence Repeat (SSR) ili Short Tandem Repeat (STR)*) koje su se pokazale izuzetno korisnim u procjenjivanju genetske raznolikosti i protoku gena između vrsta (Šatović, 1999.; Behura, 2006.; Bruvo Mađarić, 2009.).

Molekularni markeri imaju vrlo široku primjenu u genetskoj analizi kukaca (Kumar Jain i sur., 2010.). Koriste se za utvrđivanje genetske osnove određivanja spola, analiziranje različitih mehanizama ponašanja (npr. reagiranje na mirisne podražaje, sposobnost učenja, ponašanje kod parenja), dokazivanje sistematske pripadnosti vrsta i evolucijskih procesa populacija, proučavanje populacijske genetike i ekologije te za genetske modifikacije štetnih i korisnih organizama u poljoprivredi (transgeni organizmi).

Markeri koji se najviše upotrebljavaju u populacijskoj genetici kod kukaca jesu mikrosateliti (Capinera 2008., cit. Hoy, 2003.). Predstavljaju kratke ponavljajuće nukleotidne sekvence (od 2 do 6 nukleotida) ravnomjerno razdijeljene po genomu na više od sto tisuća lokusa (Weber i May, 1989.). Većinom su visoko polimorfni, što ih čini najinformativnijim genskim markerima (Weber i May, 1989.; Tautz, 1989.).

U izradi početnica za otkrivanje polimorfizma u dužini ponavljajućih sekvenci koriste se nukleotidne sekvence koje omeđuju ponavljajuću regiju. Nakon PCR umnožavanja pojavljuju se trake različite molekularne težine (Šatović, 1999.).

Kod člankonožaca mikrosateliti se najčešće sastoje od uzastopnih ponavljanja kratkih slijedova dinukleotida (AC, AT, AG), trinukleotida (AGC, AAC, AAT) ili tetranukleotida (ACAT, AAAT, AAAC) (Toth i sur. 2000., prema Hoy 2003.). Ova je tehnika vrlo ponovljiva i pouzdana, a razina polimorfizma koju je moguće otkriti vrlo je visoka.

Mikrosateliti se nalaze u protein kodirajućim i nekodirajućim regijama. Brzo mutiraju te igraju veliku ulogu u evoluciji genoma na način da stvaraju i održavaju genetske varijacije (Kashi i sur. 1997., prema Hoy 2003.).

Genotipizacija pomoću mikrosatelita u proteklih je desetak godina postala najvažnija metoda za proučavanje genetičke bioraznolikosti, a također se koristi u populacijskoj biologiji (razina srodnosti, genetička struktura populacija, protok gena među populacijama, demografska prošlost i dr.), kod mapiranja genoma, kao biljeg za neke bolesti itd.

Najvažnije karakteristike mikrosatelita koje ih čine toliko korisnima jesu:

- vrlo su učestali i nasumično raspoređeni u genomima eukariota
- prisutne su značajne varijacije u broju ponavljanja kratkih slijedova; varijabilniji su od većine drugih genetičkih markera
- varijacije se kodominantno nasljeđuju kroz generacije
- neutralni su markeri, tj. nisu pod utjecajem selekcije
- lako ih je umnožiti u postupku PCR-a
- dužinu alela moguće je precizno utvrditi pomoću visoko automatiziranih uređaja za određivanje slijeda nukleotida (Harcet i Četković, prema Ambriović Ristov i sur., 2007.).

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Terenska istraživanja

Istraživanje biologije, ekologije i genetike populacija jabukova savijača provedeno je u tri voćnjaka jabuke na području sjeverozapadne Hrvatske u kojima je smještena najveća integrirana proizvodnja jabuka u Hrvatskoj. Voćnjaci se razlikuju s obzirom na insekticidne tretmane koji se primjenjuju za suzbijanje jabukova savijača.

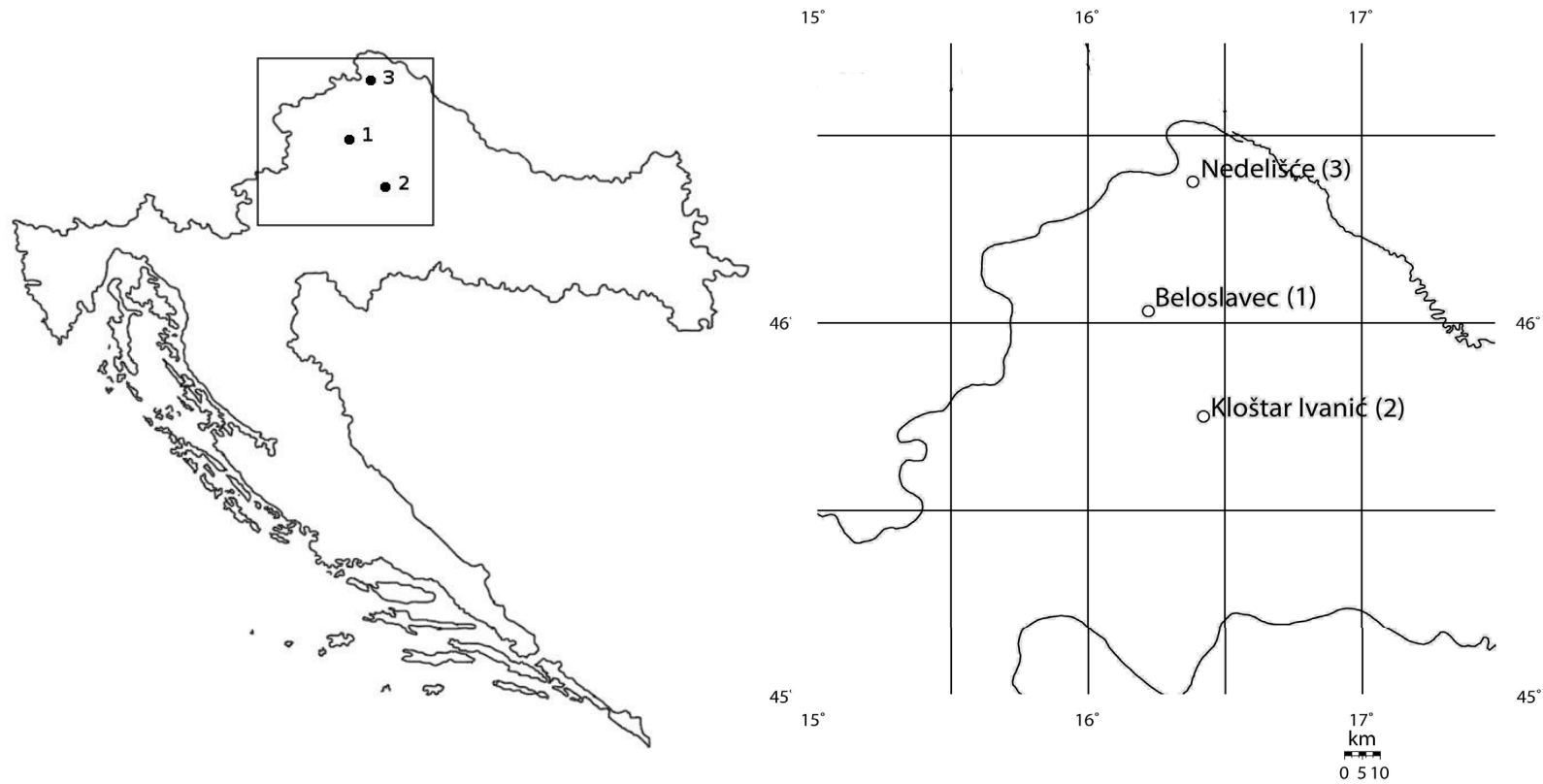
Voćnjak 1 (Beloslavec) karakterizira ekstenzivni tip proizvodnje jabuka. On se nalazi u okruženju prirodnih pašnjaka bez ikakve organizirane poljoprivredne proizvodnje pa se jabukov savijač ne suzbija insekticidnim pripravcima.

Voćnjak 2 (Kloštar Ivanić) i 3 (Nedelišće) karakterizira intenzivni tip proizvodnje jabuka po integriranim načelima (*IPM procedures*) (slika 10). Za suzbijanje jabukova savijača u vegetacijskoj se sezoni nekoliko puta koriste insekticidni pripravci iz skupine organofosfornih insekticida, regulatora rasta i razvoja kukaca (*insect growth regulator - IGR*) te neonikotinoida.

Na lokalitetu Kloštar Ivanić nalazi se voćnjak površine 240 ha na kojemu se uzgajaju sljedeće sorte jabuka: Idared, Zlatni delišez i Jonagold. Podatci o praćenju populacije jabukova savijača i njegovu suzbijanju vode se od 1999. godine.

Voćnjak Nedelišće veličine 70 ha istog je sortimenta, a podaci o populaciji štetnika i mjerama suzbijanja također datiraju od 1999. godine.

Voćnjak Beloslavec veličine je 0,5 ha, a u njemu se uzgajaju sorte Idared i Zlatni delišez. U ovom voćnjaku ne provode se nikakve mjere zaštite niti praćenja populacije štetnika. Zračna udaljenost između ovih triju lokaliteta izgleda ovako: Kloštar Ivanić-Beloslavec 55 km, Kloštar Ivanić-Nedelišće 110 km, Beloslavec-Nedelišće 60 km što je važno radi izoliranosti populacija štetnika.



Slika 10. Prikaz istraživanih lokaliteta na području sjeverozapadne Hrvatske (1 Beloslavec, netretirani voćnjak; 2 Kloštar Ivanić i 3 Nedelišće, tretirani voćnjaci) (foto Pajač Živković)

4.2. Praćenje biologije i ekologije

Istraživanje biologije i ekologije štetnika provodilo se tijekom tri vegetacijske sezone (2008., 2009. i 2010.) praćenjem svih razvojnih stadija jabukova savijača (jaja, gusjenica, kukuljica i odraslih).

Pojava odraslih bilježila se praćenjem dinamike ulova leptira na feromonske lovke (Csalomon[®]), postavljene na rubne dijelove i u središnji dio voćnjaka.

U Kloštru Ivaniću i Nedelišću koristile su se po 4 lovke, a u Beloslavcu zbog manje površine voćnjaka 3 lovke. One su postavljene prije teoretske mogućnosti izlaska leptira prve generacije, što je bilo u drugoj polovici mjeseca travnja.

Feromoni su se mijenjali svaka četiri tjedna, a praćenje provodilo do početka mjeseca listopada. Pregled ulova savijača po feromonskim lovkama provodio se svaka dva dana.

Odlaganje jaja pratilo se jednom tjedno tijekom cijele vegetacijske sezone vizualnim pregledima po 100 biljnih organa (listova i plodova jabuke).

U vrijeme dozrijevanja plodova sorte Idared obavljen je pregled plodova jabuka na napad gusjenica jabukova savijača. Pregledano je po 1000 plodova jabuke prema EPPO Standardima (2004.). Uzorci su uzimani slučajnim odabirom tako da su odabrana stabla potpuno obrana, prebrojani ukupni plodovi te savijačem oštećeni plodovi.

Prezimljujuća populacija savijača pratila se postavljanjem po 20 pojaseva od valovite ljepenke na debla voćaka te sakupljanjem ulovljenih gusjenica u dijapauzi.

Ljepenke su postavljene na rubne dijelove i u središnji dio voćnjaka. Sakupljene gusjenice stavljane su u kaveze na otvorenom koji su postavljeni u pokusnom voćnjaku na Zavodu za poljoprivrednu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kako bi se pratio njihov daljnji razvoj.

Budući da za jabukova savijača postoje modeli prognoze pojave određenih razvojnih stadija prema sumama efektivnih temperatura (Wildbolz, 1962.), rezultati praćenja uspoređivani su s modelom za prognozu štetnika.

U praćenju meteoroloških podataka (srednjih dnevnih temperatura zraka i dnevnih količina oborina) korištene su klimatološke stanice LUFT postavljene u voćnjake.

Očitani meteorološki podatci te grafovi o distribuciji leta izrađeni ovim istraživanjem uspoređivani su s distribucijama leta te meteorološkim podacima prikupljenim prije 10 godina.

Podatci praćenja iz prošlosti postoje samo za voćnjake koji su u sustavu integrirane proizvodnje (Kloštar Ivanić i Nedelišće) stoga ova usporedba ne uključuje ekstenzivni voćnjak (Beloslavec).

4.3. Sakupljanje uzoraka za genetska istraživanja

Da bi se provela genetska istraživanja sakupljeni su muški primjerci jabukova savijača ulovljeni tijekom 2008. godine pomoću ljepljivih podložaka feromonskih lovki iz središnjeg dijela voćnjaka.

Za svaku lokaciju (Beloslavec, Kloštar Ivanić i Nedelišće) metodom slučajnog odabira iz ljepljivih podložaka izdvojeno je po 30 jedinki koje predstavljaju jednu populaciju. Ukupno je prikupljeno 90 uzoraka/genotipova koji su svaki zasebno spremljeni u plastične posudice. Uzorci su označeni na način da se na plastične posudice zapisala lokacija, datum uzimanja uzoraka i redni broj genotipa. Označeni uzorci stavljeni su u PVC vrećice i dobro zatvoreni pohranjeni su u ručni prenosivi hladnjak na 4-10 °C. Ovako prikupljeni uzorci transportirani su unutar 12 sati do laboratorija, gdje su do početka analiza bili pohranjeni u ultra duboki zamrzivač na -80 °C.

4.4. Molekularna analiza populacija jabukova savijača (SSR)

4.4.1. Priprema uzoraka za izolaciju DNA

Neposredno prije izolacije DNA uzorci jabukova savijača vade se iz ultra dubokog zamrzivača (-80 °C) i tretiraju tekućim dušikom. Naglim smrzavanjem tekućim dušikom pri temperaturi od -196 °C tkivo kukca postaje lako lomljivo te se pomoću mikrohomogenizatora usitnjava u prah. Nakon homogenizacije usitnjeni su uzorci čuvani u hladnjaku na +4 °C.

4.4.2. Izolacija genomske DNA

Izolacija genomske DNA, kao i cjelokupna molekularna istraživanja, obavljena su u biotehnološkom laboratoriju Zavoda za oplemenjivanje bilja, genetiku, biometriku i eksperimentiranje Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Izolacija DNA izvedena je pomoću komercijalnog kompleta (kita) za izolaciju DNA iz tkiva sisavaca (GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka).

Postupak izolacije:

1. Uzorku usitnjenom pomoću tekućeg dušika dodaje se 20 µl proteinaze K i 180 µl otopine T za razgradnju staničnih stijenki.
2. Uzorak se pažljivo miješa izokretanjem kako bi se homogenizirao.
3. Nakon miješanja uzorak se inkubira na 55 °C u vodenoj kupelji u trajanju od 2-4 h uz povremeno miješanje pomoću vortex mješalice.
4. Nakon prvotnog inkubiranja uzorku se dodaje 20 µl RNase otopine A te se ponovno inkubira 2 min na sobnoj temperaturi.
5. Nakon završene inkubacije uzorku se dodaje 200 µl otopine C za lizu stanica te se snažno miješa pomoću vortex mješalice.
6. Slijedi inkubacija uzorka na 70 °C u vodenoj kupelji u trajanju od 10 min.
7. Za vrijeme inkubacije obavlja se priprema GenElute Miniprep kolone za vezivanje dodavanjem 500 µl otopine za vezivanje. Pripremljene kolone zatim se centrifugiraju 1 minutu na 12000 x g te se nakon završetka centrifugiranja profiltrirana tekućina izbacuje.
8. Sljedeći korak u izolaciji jest dodavanje 200 µl etanola (95-100%) u lizat te snažno miješanje pomoću vortex mješalice.
9. Nakon miješanja pažljivo se pipetira 600 µl mješavine na pripremljenu kolonu za vezivanje pa se mješavina centrifugira 1 minutu na 6500 x g te izbacuje profiltrirana tekućina.
10. Kolona za vezivanje zatim se prebacuje u novu tubicu te se dodaje 500 µl otopine za ispiranje na kolonu.
11. Slijedi centrifugiranje 1 minutu na 6500 x g te bacanje profiltrirane tekućine.
12. Nakon centrifugiranja uzorku se ponovno dodaje 500 µl otopine za ispiranje te ponovno slijedi centrifugiranje na maksimalnoj brzini u trajanju od 3 minute.
13. Kolona za vezanje zatim se prebacuje u novu tubicu te se uzorak ponovno centrifugira 1 minutu na 12000 x g.
14. Slijedi bacanje profiltrirane tekućine te prebacivanje kolone za vezanje u novu tubicu.
15. Na kolonu za vezanje zatim se dodaje 100 µl otopine za eluciju te slijedi inkubiranje na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 min.

16. Slijedi završno centrifugiranje u trajanju od 1 minute na 6500 x g. Dobiveni eluat sadrži čistu genomsku DNA.

Detaljno objašnjenim postupkom dobivena je otopina DNA koja je čuvana na +4 °C do daljnjih analiza.

4.4.3. Procjena količine i kvalitete izolirane DNA

Kakvoća i približna koncentracija izolirane DNA provjerena je elektroforezom na 0,8%-tnom agaroznom gelu (60 ml) na principu uspoređivanja jačine traga DNA poznate koncentracije (λ DNA) i traga DNA koja se ispituje. Kao standard korištena je λ DNA (Boehringer, Mannheim, Njemačka) u koncentraciji od 10, 50 i 100 ng/ μ l.

Elektroforeza traje oko 20 minuta na 90 V u 1 x TBE puferu. Svaki džepić gela puni se smjesom 7 μ l 1 x „stop-mixa“ (100 nM Na₂EDTA, 50% glicerol i 0,1% bromfenol plavi) i 1 μ l izolirane DNA nepoznate koncentracije. Agarozni gelovi bojaju se u otopini etidiumbromida (Pharmacia, Stockholm, Švedska) koncentracije 5 mg/l u trajanju 1 do 2 minute te se potom ispiru u dvostruko destiliranoj vodi (15-30 minuta). Fotografiranje gelova izvršeno je digitalnim GelDoc XR (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornija, SAD) sustavom za vizualizaciju gelova, pri trajanju ekspozicije 3 sekunde.

4.4.4. SSR analiza

Genotipizacija primjeraka jabukova savijača provedena je na 10 mikrosatelitnih markera (SSR) odabranih na temelju polimorfnosti (tablica 2).

Prva grupa markera (*Cp 1.60*, *Cp 1.62*, *Cp 2.39*, *Cp 2.129*, *Cp 3.169*, *Cp 3.180* i *Cp 5.24*) amplificirana je u postupku lančane reakcije polimerazom (PCR) slijedenjem protokola Francka i sur. (2005.). Druga je grupa markera (*Cyd 14*, *Cyd 15* i *Cyd 16*) amplificirana slijedenjem protokola Zhoua i sur. (2005.).

PCR reakcije za prvu grupu markera izvedene su u ukupnom volumenu od 10 μ l, a reakcija sadrži 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 μ M svakog dNTP-a, 0,4 μ M svake početnice, 0,5 U Taq DNA polimeraze (Sigma-Aldrich) i 20 ng izolirane DNA.

PCR reakcije provedene su u termo-cikličnom uređaju Verity 96-Well (Applied Biosystems®) prema sljedećim uvjetima: aktivacija enzima 2 min na 94 °C, 33 ciklusa

denaturacije od 30 sec. na 94 °C, 40 sec. nalijeganja na odgovarajućoj temperaturi za svaki par početnica, elongacija 40 sec. na 72 °C i završna elongacija za sve parove početnica 10 min na 72 °C. Temperatura nalijeganja za početnice *Cp 5.24*, *Cp 2.39* i *Cp 2.129* iznosila je 60 °C, 58 °C za početnice *Cp 3.180* i *Cp 1.62* i 57 °C za početnice *Cp 3.169* i *Cp 1.60*.

PCR reakcije za drugu grupu markera izvedene su u ukupnom volumenu od 25 µl, a reakcija sadrži 1x PCR pufer (Sigma-Aldrich), 2,0 mM MgCl₂, 200 µM svakog dNTP-a, 0,5 µM svake početnice, 0,5 U Taq DNA polimeraze (Sigma-Aldrich) i 20 ng izolirane DNA.

PCR reakcije provedene su u termocikličnom uređaju Verity 96-Well (Applied Biosystems®) prema sljedećim uvjetima: aktivacija enzima 5 min na 94 °C, 33 ciklusa denaturacije od 30 sec. na 95 °C, 30 sec. nalijeganja na 53 °C za početnice *Cyd 15* i *Cyd 16* i 44 °C za početnicu *Cyd 14*, elongacija 30 sec. na 72 °C i završna elongacija za sve parove početnica 10 min na 72 °C.

Tablica 2. Sekvence SSR markera korištenih za genotipizaciju jabukova savijača

Oznaka markera	Sekvenca početnice (5'-3')	Izvor
<i>Cp 1.60</i>	F: GAACCCAGGACCATCGAC R: GTGCCCTGTAGTTTGACAGC	Franck i sur. (2005.)
<i>Cp 1.62</i>	F: GTGTTCCAAATTAAGCTGACG R: GACATCCGCGAGAAACC	
<i>Cp 2.39</i>	F: ATCAACGCCCTGTGGAAG R: CCCAATCTTCTAAACTCGAACG	
<i>Cp 2.129</i>	F: TGCCGAGACTCTTCACTGC R: TCCAGGTCGCACAGAACC	
<i>Cp 3.169</i>	F: GTATGGTTTGGCTTATGAGG R: TGCTCTTTTCACAATTCAG	
<i>Cp 3.180</i>	F: GGCGAGAACGATTATTTCC R: ACATATTCTTCGGGCTTGC	
<i>Cp 5.24</i>	F: AGTAGCAGAGCATCAGCAAGC R: CATTCCACGTCTTTGTGTGG	
<i>Cyd 14</i>	F: GAACTGCAGGGATTTTAG R: CGAACATTTTACTTATTTAACA	
<i>Cyd 15</i>	F: AACCCCTTATAGGATCACTTTG R: TGTCGAAGCTTAGAAGATTG	
<i>Cyd 16</i>	F: TCACAAGTAGCTGGCGAGT R: TGCCAAAGAACCCATTAATA	

4.4.5. Očitavanje molekularnih podataka

Produkti dobiveni u postupku PCR-a razdvojeni su metodom vertikalne elektroforeze u 6 %-tnom poliakrilamidnom gelu (7 M urea) pomoću S2 sustava za vertikalnu elektroforezu (Gibco-BRL Life Technologies, Paisley, UK). Elektroforeza DNA u poliakrilamidnom gelu omogućava bolje razlučivanje DNA odsječaka sličnih duljina od razlučivanja u agaroznom gelu. Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom akrilamidnih monomera u duge poliakrilamidne lance, a dodatak N,N'-metilen-bisakrilamida učvršćuje poliakrilamidne lance poprečnim vezama. Mijenjanjem koncentracija tih dvaju sastojaka kontrolira se veličina pora u gelu koju je potrebno prilagoditi veličini molekula koje se

razdvajaju. Veća koncentracija akrilamida stvara manje pore u gelu i time se uspješnije razdvajaju manje molekule. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu provedena je u denaturirajućim uvjetima, u kojima se dvostruki lanci DNA razdvajaju i kroz gel prolaze u jednolančanom obliku.

Postupak vertikalne elektroforeze:

1. Pripremiti stakla za elektroforezu: dobro ih oprati deterdžentom, isprati destiliranom vodom i tehničkim etanolom. Posebno oprati "unutarnju stranu", odnosno onu koja će biti u neposrednom dodiru s gelom.
2. Osušiti stakla u digestoru i premazati otopinom za silaniziranje (5 x TBE pufer, 10 mM Tris-HCl i metakriloksi-propiltrimetoksisilan /Bind Silane, M-6514, Sigma/) kako bi se gel kasnije lakše odvojio od stakala. Ukloniti višak silana, premazati etanolom i sve osušiti.
3. Oprati razmaknice (*spacer*) i češalj deterdžentom, deH₂O i premazati etanolom.
4. Složiti stakla pomoću stezaljki.
5. Napraviti radnu otopinu gela (tablica 3).

Tablica 3. Radna otopina poliakrilamidnog gela

% gela/volumen radne otopine/volumen matične otopine akrilamida/urea 7M	volumen pufera 10 X TBE/volumen dest. H ₂ O/inicijacija polimerizacije
6%/180 mL/36 mL/55,6 g urea	36 mL/do 106 mL/1,2 mL 10% otopina amonijevog persulfata i 40 µL TEMED

6. Gel pažljivo izljevati u prostor između stakala i staviti češalj. Stakla s gelom pažljivo položiti na vodoravnu podlogu i pustiti da gel polimerizira.
7. Pripremiti pufer za nanošenje uzoraka (95% formamid, 20mM EDTA, 0,05% ksilen-cijanolo, 0,05% bromfenol-plavo). Pomiješati uzorak s puferom za nanošenje u omjeru 1:5-1:1, ovisno o gustoći uzoraka, dobro promiješati, denaturirati 3 min na 94 °C te uzorke držati na ledu do nanošenja na gel.
8. Izvaditi češalj iz gela te složiti stakla u aparat za elektroforezu. U kadice uliti pufer za elektroforezu i zagrijavati gel 30 min. Nakon zagrijavanja štrcaljkom s iglom isprati jažice puferom za elektroforezu da bi se uklonili tragovi nepolimeriziranog akrilamida.
9. Uzorke pažljivo nanositi u jažice. U zasebnu jažicu staviti standard za duljinu odsječaka DNA koji se prethodno pomiješa s puferom za nanošenjem uzoraka.

10. Voditi elektroforezu pod uvjetima snage struje od 45W. Elektroforeza traje 1,5-2h.

11. Nakon elektroforeze gel pažljivo odvojiti od stakla i bojati srebrom (Levanat 2007., prema Ambriović Ristov i sur., 2007.).

Bojenje srebrom vrlo je osjetljiva metoda za trajno bojenje nukleinskih kiselina i proteina u poliakrilamidnom gelu. Zbog razlika u oksidacijsko-redukcijskom potencijalu slika se razvija između područja gdje se nalazi DNA i ostatka gela. Specifično obojenje DNA u gelu nastaje ako je redoks-potencijal dijela gela u kome se nalazi DNA veći nego u okolnom području. Aktivne jedinice u reakciji bojenja su purinske baze (Levanat 2007., prema Ambriović Ristov i sur., 2007.).

Postupak bojenja srebrom:

1. Nakon završene elektroforeze u poliakrilamidnom gelu 20 min uroniti gel u kadu s 10% octenom kiselinom kako bi se odsječci DNA fiksirali u gelu.

2. Gel isprati 3 puta s reH₂O te ga uroniti u otopinu AgNO₃ i HCOH (po litri: 1g AgNO₃, 1.5 ml 37% HCOH) tijekom 20 min.

4. Gel isprati s reH₂O te dodati otopinu za razvijanje (po litri: 30 g Na₂CO₃, 1.5 ml 37% HCOH; 2 mg Na₂SO₃. 5 H₂O (10 °C)). Postupak razvijanja traje 2-5 min.

5. Reakciju taloženja srebra pratiti po intenzitetu razvijanja boje, zaustaviti je uklanjanjem otopine za razvijanje i dodavanjem 10% octene kiseline (10 °C). Fotografirati gel (Bassam i sur., 1993.).

Bojenjem u srebru produkti su vizualizirani te je na bazi prisutnosti i odsutnosti fragmenta napravljena binarna matrica koja čini ulazni sklop podataka za daljnju statističku obradu.

4.5. Statistička obrada podataka

4.5.1. Obrada bioloških i ekoloških podataka

Pomoću računalnog programa PASW Statistic version 18 (SPSS, IBM) obrađeni su meteorološki podatci te su izračunati korelacijski koeficijenti između temperatura i ukupnog ulova leptira za tretirane lokacije (Kloštar Ivanić i Nedelišće) u razdoblju od 1993. godine do 2010. godine.

Jednostruka analiza varijance (ANOVA) korištena je kako bi se ispitale razlike u temperaturama između proučavanih vegetacijskih sezona te razlike u ukupnom ulovu leptira jabukova savijača između pojedinih vegetacijskih sezona u periodu od 10 godina.

Razlike utvrđene ANOVA analizom dodatno su ispitane pomoću Tukey post hoc testa.

Iz prikupljenih meteoroloških podataka izračunate su sume efektivnih temperatura (>10 °C) potrebne za razvoj jabukova savijača te uspoređene s teoretskim modelom utvrđenim za razvoj ovog štetnika (Wildbolz, 1962.).

4.5.2. Obrada molekularnih podataka

Genetska struktura populacija jabukova savijača analizirana je izračunom parametara poput broja alela po lokusu, jedinstvenih alela (*private alleles*), učestalosti (frekvencije) alela, očekivane heterozigotnosti (H_E) i opažene heterozigotnosti (H_O), fiksacijskog indeksa (F_{is}) te izolacije prema udaljenosti (*isolation by distance*) pomoću računalnog programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001.).

Korištenjem računalnog programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout i sur., 2004.) testirana je prisutnost nul alela po lokusima i populacijama.

Odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE) te neravnoteže vezanosti gena (*linkage disequilibrium*) primjenom Markov chain metode (5 000 dememorizacija, 500 serija, 1 000 iteracija) izračunata su pomoću računalnog programa GENPOP 1.2 (Raymond i Rousset, 1995.).

Isto tako, isti računalni program korišten je za testiranje signifikantne diferencijacije (*Fisher exact test*) između populacija.

Signifikantni test diferencijacije korigiran je za višestruke testove (*multiple tests*) pomoću Bonferronijevog protokola (10,000 permutacija, Rice, 1989.).

Računalni program FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001) korišten je za izračun Weir i Cockerhamove (1984.) F_{ST} vrijednosti između populacija procijenjene kao θ vrijednost.

Analiza molekularne varijance (AMOVA, Excoffier i sur., 1992.) izračunata je pomoću računalnog programa GenALEx 6.2 (Peakall i Smouse, 2006.) korištenjem 9 999 permutacija. U tu svrhu populacije su podijeljene s obzirom na geografski položaj, tj. tip gospodarstva (tretirani i netretirani voćnjaci). Ukupna genetska varijacija stoga je podijeljena na tri razine: 1) između populacija; 2) unutar populacija i 3) unutar jedinki.

U izračunu izolacije prema udaljenosti pomoću računalnog programa FSTAT version 2.9.3 (Goudet, 2001.) korišten je Mantelov test kako bi se utvrdila prisutnost signifikantne pozitivne korelacije između matrica genetske diferencijacije (procijenjene pomoću F_{ST} ($1/F_{ST} - 1$)) i prirodnog algoritma (Ln) geografskih udaljenosti (km) između populacija jabukova savijača.

Efekt nedavnog genetskog "uskog grla" (*bottleneck*) testiran je pomoću računalnog programa BOTTLENECK 1.2 (Cornuet i Luikart, 1996.).

Ova analiza uključuje postupni mutacijski model (*stepwise mutation model - SMM*, Kimura i Ohta, 1978) te dvofazni model (*two-phase model - TPM*) (Di Rienzo i sur., 1994.) u kojem 90% mutacija pratiti SMM, a 10% čine višestruke promjene (Estoup i Cornuet, 1999.).

Wilcoxonov test rangiranja (*sign-rank tests*) (Luikart i sur., 1999.) korišten je kako bi se utvrdilo jesu li odstupanja od opažene heterozigotnosti bila značajna ($P < 0,05$). Kao indikator genetskog "uskog grla" korišten je model pomaka u distribuciji frekvencije alela (Luikart i sur., 1999.).

5. REZULTATI

5.1. Rezultati istraživanja biologije i ekologije

5.1.1. Razvojni ciklus jabukova savijača u vegetacijskim sezonama 2008., 2009. i 2010.

Rezultati trogodišnjih istraživanja razvojnih stadija jabukova savijača u tri voćnjaka jabuke (Beloslavec, Kloštar Ivanić i Nedelišće) prikazani su u tablicama 4a, 4b i 4c.

U netretiranom voćnjaku (Beloslavec) (tablica 4a) opažena je kasnija pojava leptira u proljeće u odnosu na druga dva tretirana voćnjaka (Kloštar Ivanić i Nedelišće) (tablica 4b i 4c). Prvi leptiri opaženi su krajem travnja (2009. i 2010.) ili početkom svibnja (2008.) S obzirom na kasniju pojavu leptira, uočeno je i kasnije odlaganje jaja prve generacije jabukova savijača (prvi tjedan svibnja) (tablica 4a).

Gusjenice su u prosjeku također kasnije opažene u netretiranom voćnjaku (Beloslavec) što je dovelo i do kasnije pojave druge generacije leptira jabukova savijača (prva polovica srpnja) (tablica 4a). Nekoliko dana kasnije opažena su prva jaja druge generacije jabukova savijača iz kojih su se sredinom srpnja (2009. i 2010.) ili krajem srpnja (2008.) razvile gusjenice.

U voćnjaku Beloslavec u trogodišnjem istraživanju nisu opaženi dodatni letovi leptira jabukova savijača pa se pretpostavlja da su gusjenice druge generacije nakon završenog razvoja otišle na prezimljavanje.

U tretiranom voćnjaku Kloštar Ivanić leptiri prve generacije u proljeće su se pojavljivali od prve polovice travnja (2009.), sredine travnja (2008.) te sve do kraja travnja (2010.) (tablica 4b). U skladu s ranijom pojavom leptira, opaženo je i ranije odlaganje jaja (druga polovica travnja ili kraj travnja). Gusjenice su opažene početkom svibnja te su se prvi leptiri druge generacije razvili polovicom lipnja (2008. i 2009.) ili krajem lipnja (2010.). Nekoliko dana kasnije opažena su jaja druge generacije jabukova savijača, a krajem lipnja (2008. i 2009.) ili početkom srpnja (2010.) opažene su prve gusjenice (tablica 4b).

U voćnjaku Kloštar Ivanić u sve tri proučavane vegetacijske sezone opažen je dodatni, potencijalni treći, let leptira jabukova savijača krajem srpnja (2008. i 2009.) ili početkom kolovoza (2010.) (tablica 4b).

U tretiranom voćnjaku Nedelišće leptiri prve generacije u proljeće su se također pojavljivali od prve polovice travnja (2009.), sredine travnja (2008.) te sve do kraja travnja (2010.). Znači, kao i u voćnjaku Kloštar Ivanić (tablica 4c).

U skladu s ranijom pojavom leptira, opaženo je i ranije odlaganje jaja (druga polovica travnja ili početak svibnja). Gusjenice su opažene početkom, sredinom i krajem svibnja te su se prvi leptiri druge generacije razvili već početkom lipnja (2009.). Nekoliko dana kasnije opažena su jaja druge generacije jabukova savijača, a ovisno o vegetacijskoj sezoni, gusjenice su opažene u drugoj polovici lipnja (2009.), drugoj polovici srpnja (2010.) i krajem srpnja (2008.). U voćnjaku Nedelišće u 2009. godini također je zabilježen dodatni let leptira jabukova savijača (početak kolovoza) (tablica 4c).

U voćnjacima Kloštar Ivanić i Nedelišće, kod kojih su zabilježeni dodatni letovi leptira jabukova savijača, opaženo je i dodatno odlaganje jaja te pojava gusjenica (tablice 4b i 4c). Gusjenice ove generacije spuštale su se na prezimljavanje prema debljim granama stabla i deblu.

Na temelju trogodišnjih praćenja razvojnih stadija jabukova savijača (jaja, gusjenica, kukuljica i odraslih) izrađene su tablice životnog ciklusa štetnika koje prikazuju prosjek razvoja populacija jabukova savijača u tri voćnjaka jabuke (Beloslavec, Kloštar Ivanić i Nedelišće) u razdoblju od tri vegetacijske sezone (2008., 2009. i 2010. godine) (tablice 5a,5b i 5c).

Tablica 4a. Usporedba teoretskog modela za prognozu štetnika (Wildbolz, 1962.) s rezultatima terenskih istraživanja (Beloslavec; 2008., 2009. i 2010. god.)

		2008.			2009.			2010.		
Razvojni stadij jabukova savijača		Opazanje (datum)	Σ efektivnih temp. (°C)	Teoretski model (Wildbolz)	Opazanje (datum)	Σ efektivnih temp. (°C)	Teoretski model (Wildbolz)	Opazanje (datum)	Σ efektivnih temp. (°C)	Teoretski model (Wildbolz)
I. generacija	Leptiri	07.05.	104,60	06.05.	27.04.	148,50	17.04.	30.04.	114,20	29.04.
	Jaja	09.05.	113,70		01.05.	162,80		03.05.	136,50	
	Gusjenice	23.05.	201,90	21.05.	14.05.	252,30	07.05.	23.05.	221,00	14.05.
II. generacija	Leptiri	13.07.	774,90	09.07.	03.07.	713,20	04.07.	08.07.	694,40	10.07.
	Jaja	15.07.	790,70		05.07.	737,50		10.07.	719,60	
	Gusjenice	25.07.	877,80	16.07.	15.07.	841,50	14.07.	16.07.	816,70	16.07.
Moguća III. generacija	Leptiri	*		03.09.	*		22.08.	*		07.09.
	Jaja	*			*			*		
	Gusjenice	*		11.09.	*		31.08.	*		24.09.
Ukupna Σ efektivnih temp. (01.01. – 30.09)		1.454,50			1.704,90			1.439,40		

* nije opaženo

Tablica 4b. Usporedba teoretskog modela za prognozu štetnika (Wildbolz, 1962.) s rezultatima terenskih istraživanja (Kloštar Ivanić, 2008., 2009. i 2010. god.)

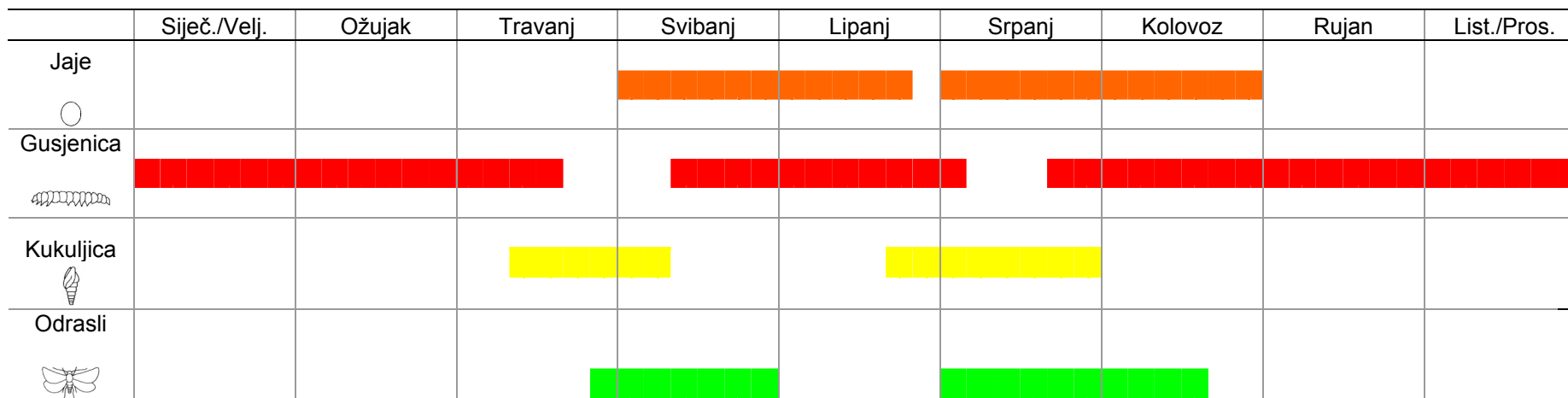
		2008.			2009.			2010.		
Razvojni stadij jabukova savijača		Opazanje (datum)	Σ efektivnih temp. (°C)	Teoretski model (Wildbolz)	Opazanje (datum)	Σ efektivnih temp. (°C)	Teoretski model (Wildbolz)	Opazanje (datum)	Σ efektivnih temp. (°C)	Teoretski model (Wildbolz)
I. generacija	Leptiri	16.04.	46,50	03.05.	14.04.	85,30	17.04.	23.04.	67,90	28.04.
	Jaja	19.04.	56,20		16.04.	97,20		26.04.	87,30	
	Gusjenice	07.05.	116,10	18.05.	07.05.	183,70	08.05.	10.05.	178,50	12.05.
II. generacija	Leptiri	10.06.	409,20	05.07.	15.06.	543,10	03.07.	23.06.	533,00	09.07.
	Jaja	12.06.	427,10		17.06.	566,70		26.06.	555,60	
	Gusjenice	22.06.	520,80	12.07.	28.06.	658,30	13.07.	04.07.	658,00	15.07.
Moguća III. generacija	Leptiri	28.07.	951,40	23.08.	27.07.	999,60	22.08.	11.08.	1.111,10	02.09.
	Jaja	29.07.	963,80		29.07.	1024,90		15.08.	1.162,40	
	Gusjenice	04.08.	1.049,10	02.09.	05.08.	1.121,40	30.08.	23.08.	1.252,10	18.09.
Ukupna Σ efektivnih temp. (01.01. – 30.09)		1.490,50			1.677,10			1.457,40		

Tablica 4c. Usporedba teoretskog modela za prognozu štetnika (Wildbolz, 1962.) s rezultatima terenskih istraživanja (Nedelišće, 2008., 2009. i 2010. god.)

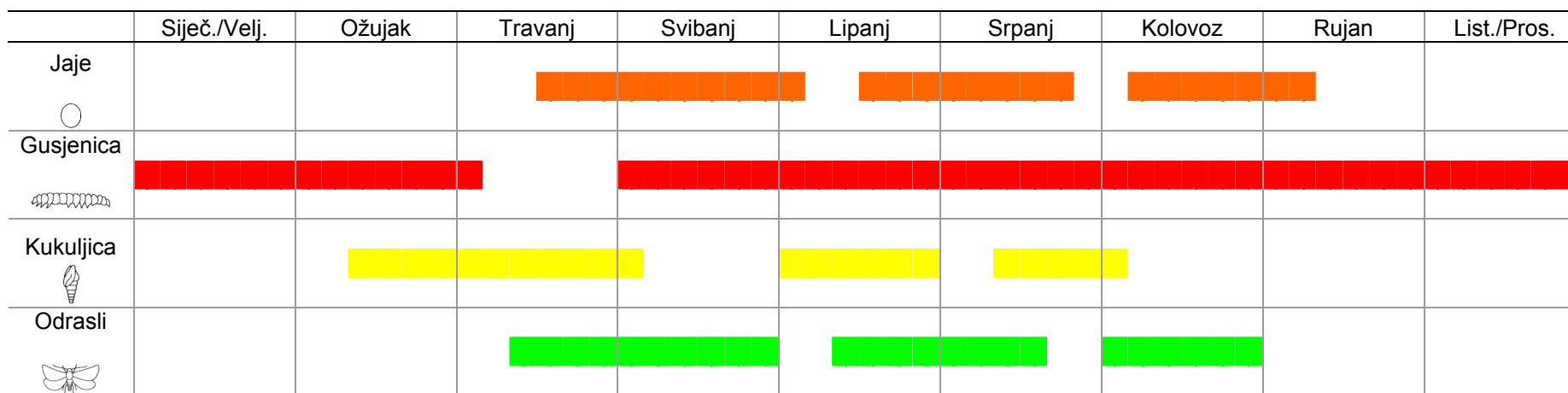
		2008.			2009.			2010.		
		Opazanje (datum)	Σ efektivnih temp. (°C)	Teoretski model (Wildbolz)	Opazanje (datum)	Σ efektivnih temp. (°C)	Teoretski model (Wildbolz)	Opazanje (datum)	Σ efektivnih temp. (°C)	Teoretski model (Wildbolz)
I. generacija	Leptiri	21.04.	36,80	13.05.	14.04.	56,50	27.04.	30.04.	77,50	04.05.
	Jaja	28.04.	49,70		16.04.	65,70		02.05.	93,60	
	Gusjenice	17.05.	138,00	26.05.	09.05.	156,80	14.05.	23.05.	180,40	24.05.
II. generacija	Leptiri	21.07.	794,30	22.07.	09.06.	397,90	21.07.	12.07.	674,90	21.07.
	Jaja	23.07.	804,50		11.06.	416,40		14.07.	704,70	
	Gusjenice	30.07.	884,10	31.07.	20.06.	506,90	29.07.	20.07.	787,90	31.07.
Moguća III. generacija	Leptiri	*		31.08.	11.08.	1.049,70	22.09.	*		
	Jaja	*			12.08.	1.061,00		*		
	Gusjenice	*		08.09.	20.08.	1.154,20	09.10.	*		
Ukupna Σ efektivnih temp. (01.01. – 30.09)		1.349,60			1.461,30			1.304,10		

* nije opaženo

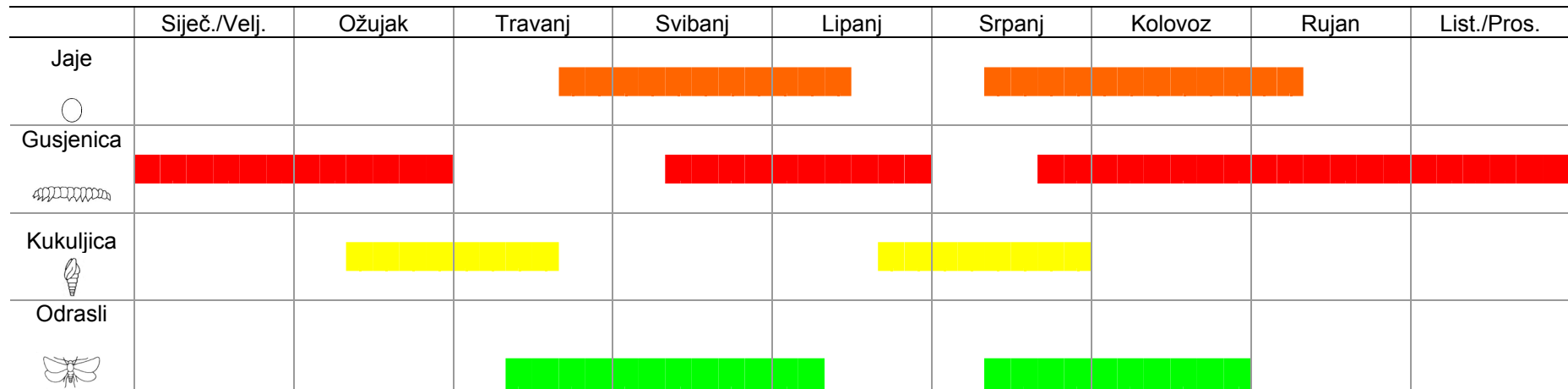
Tablica 5a. Životni ciklus jabukova savijača utvrđen praćenjem razvoja štetnika u voćnjaku Beloslavec



Tablica 5b. Životni ciklus jabukova savijača utvrđen praćenjem razvoja štetnika u voćnjaku Kloštar Ivanić



Tablica 5c. Životni ciklus jabukova savijača utvrđen praćenjem razvoja štetnika u voćnjaku Nedelišće

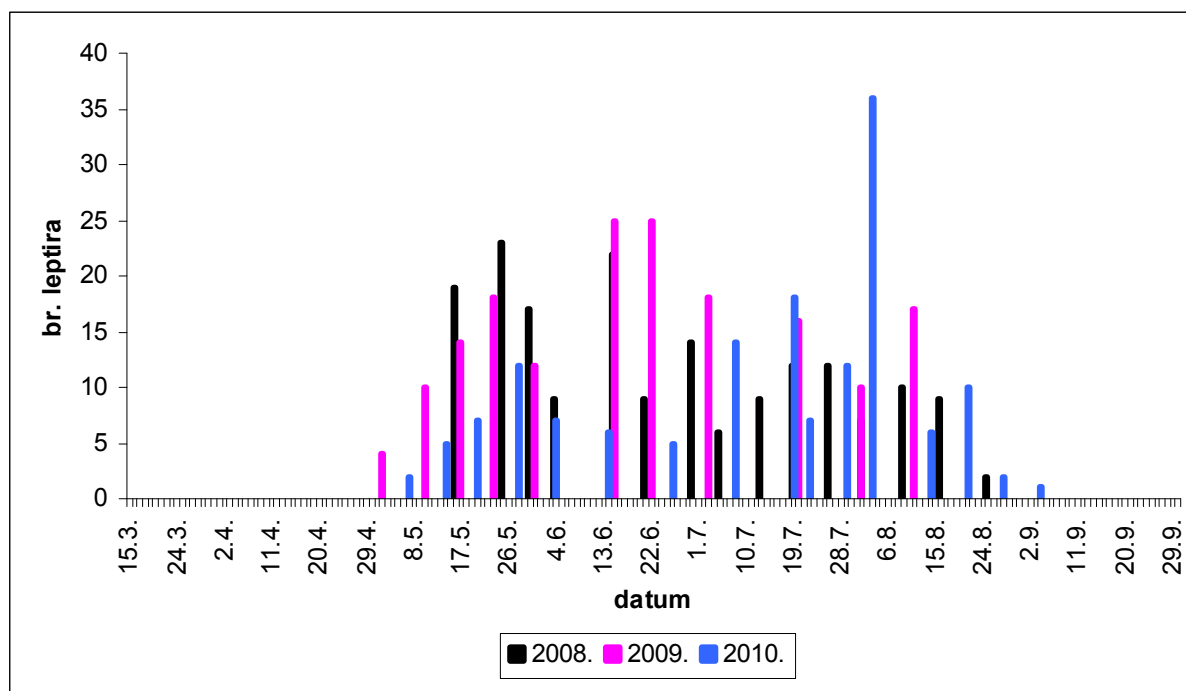


5.1.2. Dinamika leta leptira jabukova savijača

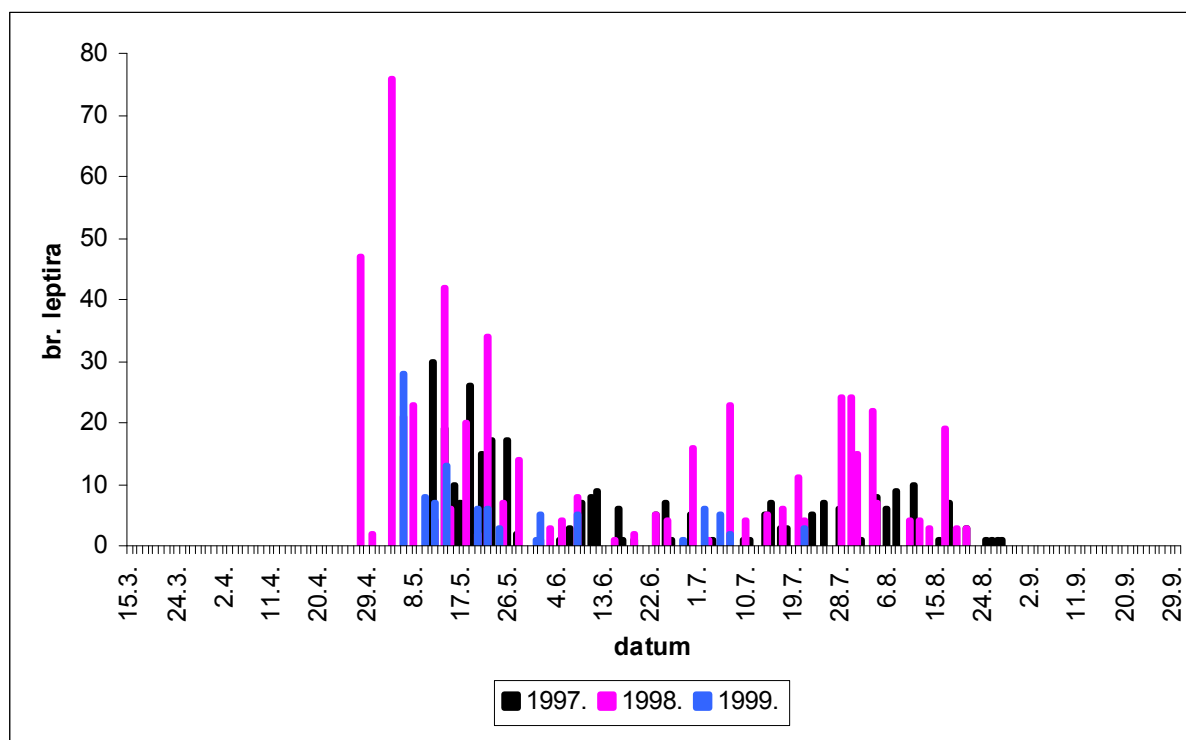
Dinamika leta leptira jabukova savijača prikazana je u grafikonima 1, 2, 3, 4 i 5 i prilogu 1a, 1b, 1c, 1d i 1e. Letovi leptira grupirani su prema godinama praćenja. U grafikonima 2 i 4 i prilogu 1b i 1d prikazane su godine praćenja leta leptira od prije 10 godina za voćnjake Kloštar Ivanić i Nedelišće. Ovi podatci, prikupljeni prije 10 godina, uspoređivani su s onima s istih lokaliteta prikupljenih ovim istraživanjem u vegetacijskim sezonama 2008., 2009. i 2010. godine (grafikoni 3 i 5, prilog 1c i 1e). Za netretirani voćnjak Beloslavec ne postoje podatci praćenja od prije 10 godina pa ova usporedba nije bila moguća.

Prije 10 godina letovi leptira su u prosjeku počinjali kasnije u odnosu na posljednje tri godine istraživanja. U prošlom desetljeću let je u prosjeku bio opažen početkom svibnja (grafikoni 2 i 4, prilog 1b i 1d), dok je u posljednje tri godine istraživanja opažen četiri do šest tjedana ranije, tj. sredinom travnja (grafikoni 3 i 5, prilog 1c i 1e). Prema podacima otprije 10 godina let leptira bi završavao sredinom kolovoza (grafikoni 2 i 4, prilog 1b i 1d), dok je u posljednje tri godine opaženo produženje leta leptira do kraja kolovoza ili do početka rujna (grafikoni 3 i 5, prilog 1c i 1e). Ovi podatci upućuju na promjene u distribuciji leta jabukova savijača u spomenutom periodu. Let leptira u posljednje tri godine počinje sve ranije te završava kasnije.

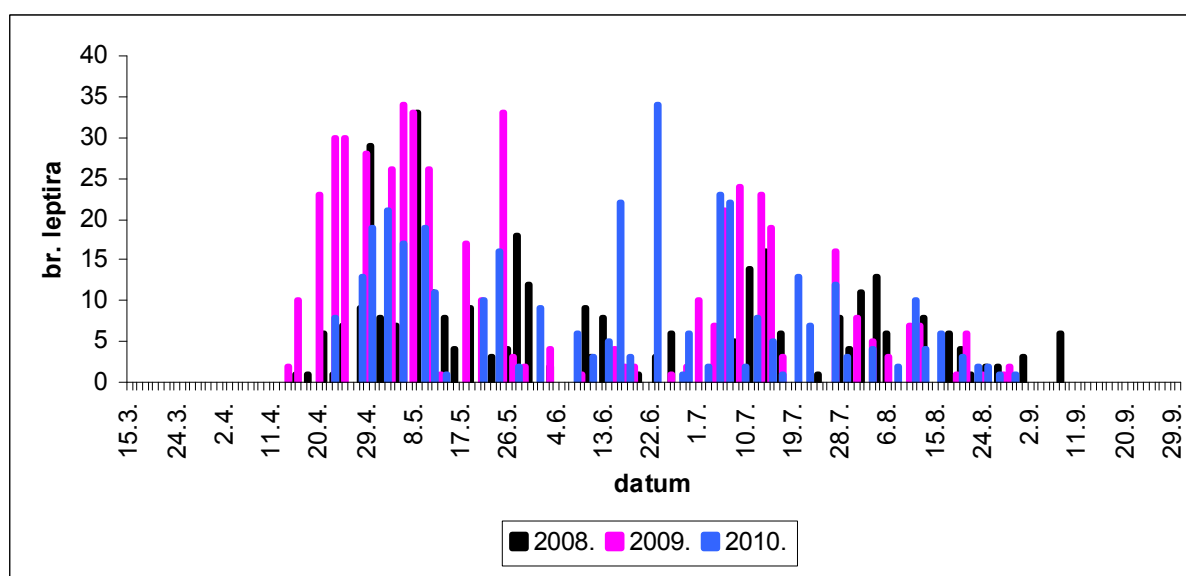
Promjene u distribuciji leta opažene su u istraživanim vegetacijskim sezonama 2008., 2009. i 2010. godine isto tako i između proučavanog netretiranog voćnjaka (Beloslavec) i tretiranih voćnjaka (Kloštar Ivanić i Nedelišće). Kod voćnjaka Beloslavec opažena je kasnija pojava leptira u proljeće (početak svibnja) s obzirom na voćnjake Kloštar Ivanić i Nedelišće (sredina i kraj travnja) (grafikoni 1, 3 i 5; prilog 1a, 1c i 1e).



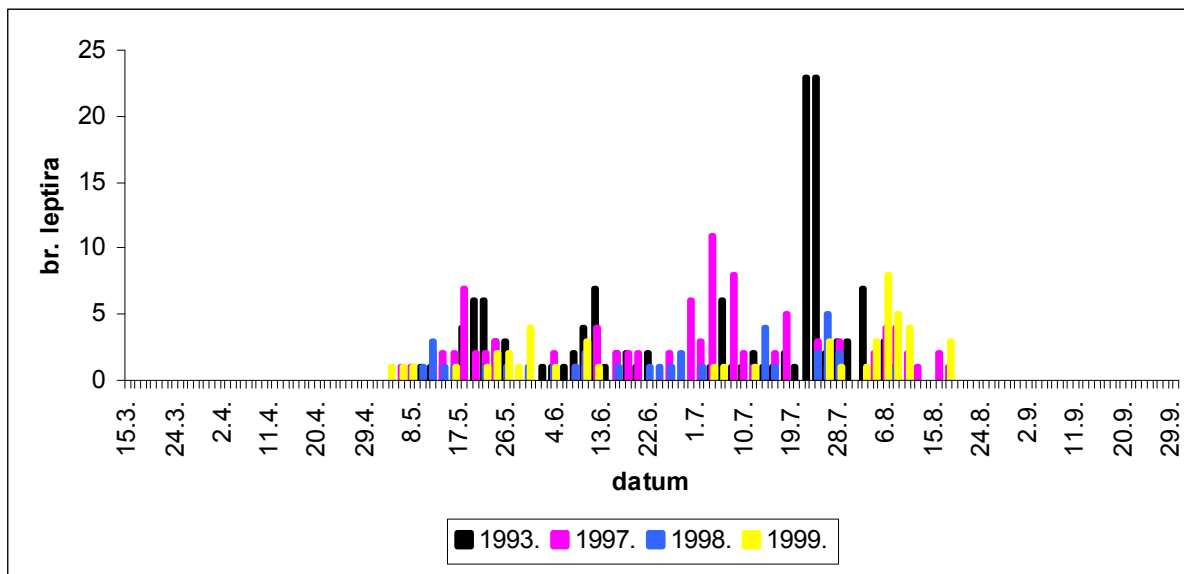
Graf. 1. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Beloslavec, 2008., 2009. i 2010. god.)



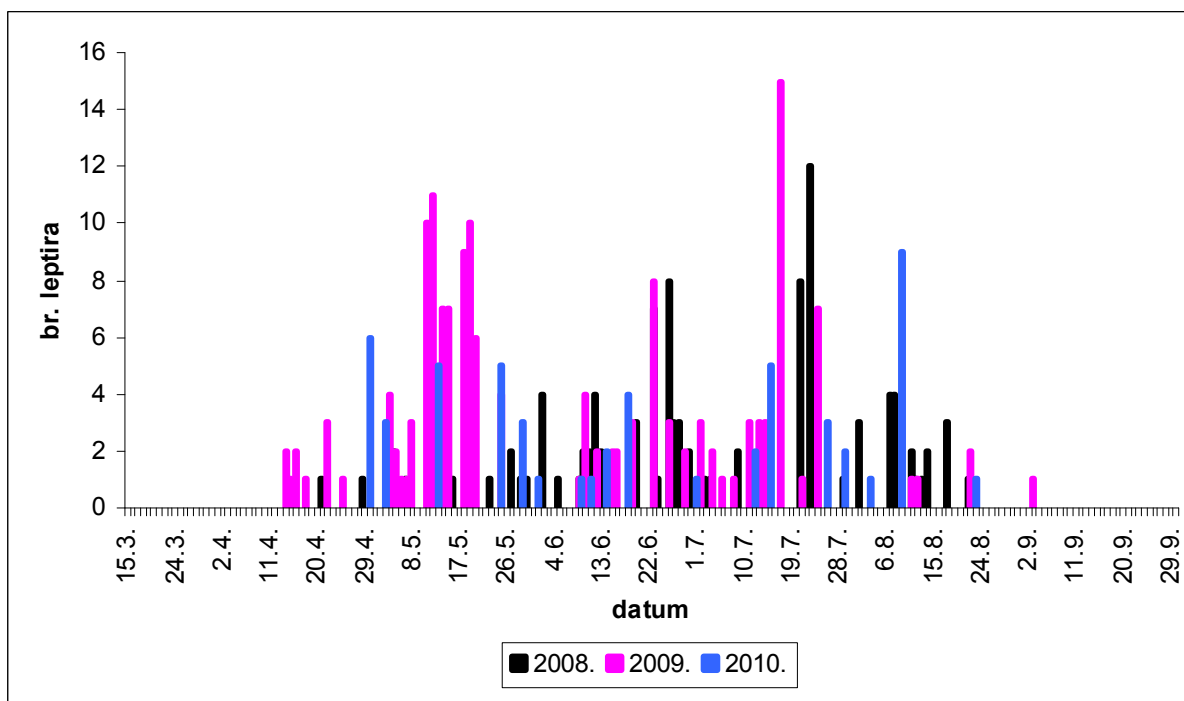
Graf. 2. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Kloštar Ivanić, 1997., 1998. i 1999. god.)



Graf. 3. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Kloštar Ivanić, 2008., 2009. i 2010. god.)



Graf. 4. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Nedelišće, 1993., 1997., 1998. i 1999. god.)



Graf. 5. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Nedelišće, 2008., 2009. i 2010. god.)

5.1.3. Štete od gusjenica u dozrijevanju plodova

U vrijeme dozrijevanja plodova sorte Idared, tijekom proučavanih vegetacijskih sezona (2008., 2009. i 2010. godine) u svakom voćnjaku obavljen je pregled plodova jabuke na napad gusjenica jabukova savijača. Na temelju ukupnog broja pregledanih plodova i broja oštećenih plodova izračunata je šteta izražena u postocima nastala ishranom gusjenica jabukova savijača (tablica 6). U vegetacijskoj sezoni 2008. godine u netretiranom voćnjaku Beloslavec ukupna šteta nastala ishranom gusjenica jabukova savijača iznosila je 4,94%, dok su se štete u tretiranim voćnjacima Kloštar Ivanić i Nedelišće kretale od 0,85 do 1,09% (tablica 6). U vegetacijskoj sezoni 2009. godine zabilježen je porast štete nastao ishranom gusjenica u voćnjaku Beloslavec (5,45%), dok su se štete u voćnjacima Kloštar Ivanić i Nedelišće kretale oko 1% (tablica 6). U vegetacijskoj sezoni 2010. godine štete nastale ishranom gusjenica bile su u skladu s rezultatima iz 2008. i 2009. godine pa je u voćnjaku Beloslavec ponovno zabilježena najveća šteta od 5% napadnutih plodova, dok su se štete u voćnjacima Kloštar Ivanić i Nedelišće kretale od 0,79 do 1,19% (tablica 6).

Tablica 6. Izračun šteta nastalih hranjenjem gusjenica jabukova savijača na plodovima jabuke sorte Idared

Vegetacijska sezona	Sorta Idared	Beloslavec	Kloštar Ivanić	Nedelišće
2008.	Br. pregledanih plodova	1032	1067	1010
	Br. oštećenih plodova	51	9	11
	Šteta (%)	4,94	0,85	1,09
2009.	Br. pregledanih plodova	1010	1075	1092
	Br. oštećenih plodova	55	15	11
	Šteta (%)	5,45	1,3	1,01
2010.	Br. pregledanih plodova	1001	1007	1012
	Br. oštećenih plodova	50	12	8
	Šteta (%)	5	1,19	0,79

5.1.4. Novi nalaz vrste *Pimpla turionellae* (L.), endoparazitoida jabukova savijača

Tijekom praćenja razvoja gusjenica jabukova savijača u kavezima pokusnog voćnjaka Zavoda za poljoprivrednu zoologiju Agronomskog fakulteta, u uzorcima iz voćnjaka Kloštar Ivanić 2010. godine pronađene su dvije parazitirane kukuljice jabukova savijača (slika 11). Nakon razvoja parazitoida, uzorci su determinirani (prof. dr. sc. Janko Kolarov, Plovdiv, Bugarska). Determinacijom je utvrđena vrsta parazitske osice *Pimpla turionellae* (L.) (♀-dužina tijela: 10,8 mm i ♂-dužina tijela: 9 mm) (slika 12).

Pimpla turionellae (L.) široko je rasprostranjena vrsta iz reda opnokrilaca (Hymenoptera) na području palearktičke regije te pripada porodici parazitskih osica (Ichneumonidae) (tablica 7). Solitarni je endoparazitoid mnogih vrsta kukaca iz reda leptira (Lepidoptera) koje obitavaju u šumama, živicama i voćnjacima (Meyer, 1925.; Jackson, 1937.; Führer, 1975.; Mani i sur., 1986.).

Ženke ove vrste odlažu jaja u izložene kukuljice ili kukuljice skrivene u biljnom tkivu (lišću, kori, pupovima i mladima) (Bogenschütz, 1978.). Iz jaja se razvijaju ličinke koje se hrane hemolimfom domaćina i biljnim nektarom (Wäckers i sur., 1996.).

Tablica 7. Taksonomska pripadnost vrste *Pimpla turionellae* (L.)

Klasifikacijska kategorija	Naziv
Red (<i>ordo</i>)	Hymenoptera Linnaeus, 1758.
Natporodica (<i>superfamilia</i>)	Ichneumonoidea Latreille, 1802.
Porodica (<i>familia</i>)	Ichneumonidae
Potporodica (<i>subfamilia</i>)	Pimplinae Wesmael, 1845.
Pleme (<i>tribus</i>)	Pimplini
Rod (<i>genus</i>)	<i>Pimpla</i>
Vrsta (<i>species</i>)	<i>Pimpla turionellae</i> (Linnaeus, 1758.)

Parazitoidi kukuljice u pronalaženju domaćina snažno se oslanjaju na kemijske tvari koje izlučuje napadnuta biljka, a ne sam domaćin. Domaćinovo kretanje unutar kukuljice strogo je ograničeno te on stoga ne proizvodi tvari prepoznatljive parazitoidu. Osice iz porodice Ichneumonidae specifične su po "aktivnom pronalaženju domaćina", tj. sustavu vibracijskog odjeka (*vibrational sounding*).

Ženke osice u pronalaženju skrivenih domaćina "skeniraju" podlogu tako da odašilju vibracije putem svojih ticala te primaju odbijajuće signale pomoću specifičnih organa smještenih u goljenici (*tibiae*). Ovaj oblik eho-lokacije na krutim podlogama omogućuje otkrivanje razlika u gustoći koje mogu biti uzrokovane skrivenim tijelom domaćina, njegovog hranidbenog tunela ili komore kukuljice (Fischer, 2002.). Sustav vibracijskog odjeka do sada je utvrđen u samo dvije vrste iz roda *Pimpla* (Henaut, 1990.; Wäckers i sur., 1998.). Vrsta *Pimpla turionellae* (L.) jedna je od njih (Otten, 2000.).

Prvi nalaz ove vrste u Hrvatskoj zabilježio je Hensch na području Krapinsko-zagorske županije (Krapina) 1929. godine (Kolarov, 2008.).

Stoga pronalazak vrste *Pimpla turionellae* (L.) na području Kloštra Ivanića predstavlja prvi nalaz ovog endoparazitoida na području Zagrebačke županije.

U suzbijanju jabukova savijača sve se više pozornosti pridaje biološkom načinu suzbijanja tako su istraživanja suzbijanja štetnika pomoću parazita i parazitoida od ekonomskog i ekološkog značaja (Monteiro i sur., 2008.).



Slika 11. Parazitirana kukuljica jabukova savijača (foto Pajač Živković)



(a)



(b)

Slika 12. Odrasli oblik vrste parazitske osice *Pimpla turionellae* (L.); (a) ♀; (b) ♂ (foto Pajač Živković)

5.1.5. Utjecaj temperatura i ukupnog ulova leptira jabukova savijača

Obradom meteoroloških podataka (srednjih dnevnih temperatura zraka) (prilog 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h, 2i, 2j, 2k, 2l, 2m, 2n, 2o i 2p) i podataka o ukupnom ulovu leptira u razdoblju od 1993. do 2010. godine (prilog 3a, 3b, 3c, 3d i 3e) izračunati su korelacijski koeficijenti između temperatura i ukupnog ulova leptira za tretirane lokacije (Kloštar Ivanić i Nedelišće). Rezultati obrade pokazali su slabu, ali statistički značajnu povezanost temperatura i ukupnog ulova leptira u razdoblju od 1993. do 2010. godine za voćnjak Nedelišće ($r=0.135$, $p<0.05$) te u razdoblju od 1997. do 2010. godine za voćnjak Kloštar Ivanić ($r=0.102$, $p<0.05$).

Jednostrukom analizom varijance (ANOVA) provedenom za ispitivanje razlika u temperaturama između proučavanih vegetacijskih sezona za voćnjak Nedelišće utvrđene su statistički značajne razlike u temperaturama u razdoblju od 1993. do 2010. godine ($F=2.0$; $df=6$, 1593; $p<0.05$). Post hoc Tukey HSD testom utvrđene su statistički značajne razlike u temperaturama između vegetacijskih sezona 1997. i 2009. godine u usporedbi s ostalim vegetacijskim sezonama. U ostalim vegetacijskim sezonama (1993., 1998., 1999., 2008. i 2010.) nisu utvrđene statistički značajne razlike u temperaturama (tablica 8).

Tablica 8. Razlike u srednjim dnevnim temperaturama zraka između proučavanih vegetacijskih sezona u voćnjaku Nedelišće utvrđene Tukey HSD testom

Nedelišće	
Vegetacijska sezona	
1997.	*
1998.	* *
1993.	* *
2010.	* *
2008.	* *
1999.	* *
2009.	*

Slični rezultati dobiveni su obradom temperaturnih podataka za voćnjak Kloštar Ivanić gdje su jednostrukom analizom varijance utvrđene statistički značajne razlike u temperaturama u razdoblju od 1997. do 2010. godine ($F=3.9$; $df= 5$, 1194; $p<0.05$).

Post hoc Tukey HSD testom isto su tako utvrđene statistički značajne razlike u temperaturama između vegetacijskih sezona 1997. i 2009. godine u odnosu na ostale proučavane vegetacijske sezone (1998., 1999., 2008. i 2010.) (tablica 9).

Tablica 9. Razlike u srednjim dnevnim temperaturama zraka između proučavanih vegetacijskih sezona u voćnjaku Kloštar Ivanić utvrđene Tukey HSD testom

Kloštar Ivanić		
Vegetacijska sezona		
1997.	*	
1998.	*	*
2008.	*	*
1999.	*	*
2010.	*	*
2009.		*

U netretiranom voćnjaku Beloslavec jednostrukom analizom varijance također su utvrđene statistički značajne razlike u temperaturama u razdoblju od 2008. do 2010. godine ($F=3.8$; $df= 2, 597$; $p<0.05$). Post hoc Tukey HSD testom utvrđene su razlike između vegetacijske sezone 2009. godine i ostalih godina (tablica 10).

Tablica. 10. Razlike u srednjim dnevnim temperaturama zraka između proučavanih vegetacijskih sezona u voćnjaku Beloslavec utvrđene Tukey HSD testom

Beloslavec		
Vegetacijska sezona		
2008.	*	
2010.	*	
2009.	*	*

Jednostrukom analizom varijance (ANOVA) provedenom za ispitivanje razlika u ukupnom ulovu leptira jabukova savijača između pojedinih vegetacijskih sezona za voćnjak Nedelišće utvrđene su statistički značajne razlike u ukupnom ulovu leptira u razdoblju od 1993. do 2010. godine ($F=4.0$; $df= 6, 1393$; $p<0.05$). Post hoc Tukey HSD testom utvrđene su statistički značajne razlike u ulovu između vegetacijskih sezona 1998., 1999., 2009. i 2010. godine u usporedbi s ostalim godinama. U ostalim vegetacijskim

sezonomama (1993., 1997., i 2008.) nisu utvrđene statistički značajne razlike u ukupnom ulovu leptira jabukova savijača (tablica 11).

Tablica 11. Razlike u ukupnom ulovu leptira između proučavanih vegetacijskih sezona u voćnjaku Nedelišće utvrđene Tukey HSD testom

Nedelišće		
Vegetacijska sezona		
1998.	*	
1999.	*	
2010.	*	
1997.	*	*
2008.	*	*
1993.	*	*
2009.		*

Statistički značajne razlike u ukupnom ulovu leptira utvrđene su u voćnjaku Kloštar Ivanić u razdoblju od 1997. do 2010. godine ($F=3.7$; $df= 5, 1194$; $p<0.05$).

Post hoc Tukey HSD testom utvrđene su razlike između 1998., 1999. i 2009. godine u usporedbi s ostalim godinama, dok se ukupni ulov između godina 1997., 2008. i 2010. nije statistički značajno razlikovao (tablica 12).

Tablica 12. Razlike u ukupnom ulovu leptira između proučavanih vegetacijskih sezona u voćnjaku Kloštar Ivanić utvrđene Tukey HSD testom

Kloštar Ivanić		
Vegetacijska sezona		
1999.	*	
1997.	*	*
2008.	*	*
2010.	*	*
2009.		*
1998.		*

Jednostrukom analizom varijance (ANOVA) provedenom za ispitivanje razlika u ukupnom ulovu leptira za netretirani voćnjak Beloslavec nisu utvrđene statistički značajne razlike u ulovu leptira u razdoblju od 2008. do 2010. godine ($F=0.089$; $df= 2, 597$; $p=0.915$).

5.1.6. Usporedba teoretskog modela za prognozu štetnika s rezultatima terenskih istraživanja

Teoretski model za prognozu štetnika (Wildbolz, 1962.) zasniva se na izračunu sume efektivnih temperatura potrebnih za razvoj određenog stadija jabukova savijača. Efektivne temperature računaju se tako da se od 1. siječnja sumiraju srednje dnevne temperature zraka više od 10 °C, koliko iznosi biološki minimum za razvoj jabukova savijača.

Štetnik se u proljeće javlja u stadiju leptira kod sume efektivnih temperatura od 100 °C. Za razvoj gusjenice iz jaja potrebna je suma efektivnih temperatura od 90 °C. Za razvoj jedne generacije jabukova savijača (od jaja od leptira) potrebna je suma efektivnih temperatura od 610 °C (tablica 13).

Teoretskim modelom za prognozu štetnika koriste se proizvođači kod utvrđivanja rokova suzbijanja, no njime je moguće utvrditi i odstupanja u razvoju štetnika u prirodi.

Tablica 13. Model prognoze pojave razvojnih stadija jabukova savijača prema sumama efektivnih temperatura (Wildbolz, 1962.)

Razvoj jabukova savijača	Suma efektivnih temp. (°C)
Pojava leptira u proljeće	100
Izlazak gusjenica iz jaja	90
Vrijeme razvoja generacije (jaje-odrasli)	610

Usporedbom teoretskog modela pojave razvojnih stadija jabukova savijača (Wildbolz, 1962.) i trogodišnjih terenskih praćenja razvoja ovog štetnika u voćnjaku Kloštar Ivanić utvrđena je ranija pojava prezimljujuće generacije štetnika u sve tri godine istraživanja u odnosu na teoretski očekivanu. Pojava leptira u proljeće opažena je kod suma efektivnih temperatura od 46,5 °C (2008.), 85,30 °C (2009.) i 67,90 °C (2010.) (tablica 4b). U sve tri godine promatranja utvrđena je i pojava treće generacije štetnika koja se može vidjeti i prema distribuciji leta leptira (grafikon 3 i prilog 1c) te prema ukupnim sumama efektivnih temperatura koje to omogućuju (tablica 4b).

U trogodišnjem istraživanju pojave razvojnih stadija jabukova savijača i usporedbe s teoretskom pojavom prema Wilbolzu (1962.) u voćnjaku Nedelišće također je u sve tri godine istraživanja utvrđena ranija pojava leptira prezimljujuće generacije od teoretski očekivane (sume efektivnih temp. kretale su se od 36,8 °C do 77,50 °C). Pojava gusjenica bila je u skladu s očekivanim sumama od 90 °C u sve tri godine istraživanja (tablica 4c). Treća generacija štetnika razvila se u 2009. godini, što je vidljivo i prema distribuciji ulova leptira (grafikon 5 i prilog 1e). U 2009. godini za pojavu treće generacije postoji i teoretska osnova (ukupna suma efektivnih temp. izračunata u razdoblju od 1. siječnja do 30. rujna iznosila je 1.461,30 °C) (tablica 4c).

Praćenjem razvoja jabukova savijača u netretiranom voćnjaku Beloslavec utvrđene su razlike u ponašanju ovog štetnika u odnosu na tretirane voćnjake (Kloštar Ivanić i Nedelišće). Iako su sume efektivnih temperatura bile povoljne za razvoj treće generacije jabukova savijača, ona se ipak nije razvila (tablica 4a, grafikon 1 i prilog 1a). Za razliku od tretiranih voćnjaka gdje su se leptiri prezimljujuće generacije pojavili prije nego što se teoretski očekivalo, na ovom su se lokalitetu leptiri javljali u skladu ili nešto kasnije od predviđenog (tablica 4a, grafikon 1 i prilog 1a).

5.2. Rezultati molekularnih istraživanja

5.2.1. Genetska struktura i raznolikost populacija

Nakon korekcije za višestruke usporedbe (*multiple comparisons*) ($n=86$), statistički značajna neravnoteža vezanosti (*linkage disequilibrium*) utvrđena je samo između lokusa *Cp2.129* i *Cp1.60* ($P < 0,01$).

Nakon korekcije za višestruke usporedbe ($n=3$, $P < 0,01$), statistički značajna odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE) opažena su kod lokusa *Cp 5.24*, *Cp 3.169*, *Cp 1.62* i *Cp 1.60* (tablica 14). Očekivana heterozigotnosti (H_E) po svim lokusima u tri populacije jabukova savijača kretala se od 0,10 do 0,84, dok se opažena heterozigotnost (H_O) kretala od 0,5 do 0,76 (Tablica 14).

Fiksacijski indeks (F_{IS}) po svim lokusima u tri populacije jabukova savijača kretao se između 0,1 i 0,79. Najveća srednja F_{IS} vrijednost zabilježena je u populaciji Kloštar Ivanić (0,22) (tablica 14).

Prisutnost nul alela utvrđena je kod lokusa *Cp 5.24* (Kloštar Ivanić), *Cp 1.60* (Nedelišće), *Cp 3.169* (Beloslavec i Kloštar Ivanić) i *Cp 1.62* (sve tri populacije).

Upotrebom 10 SSR markera u tri populacije jabukova savijača (Beloslavec, Kloštar Ivanić i Nedelišće) ukupno su detektirana 72 alela. Kod prve grupe SSR markera (*Cp 1.60*, *Cp 1.62*, *Cp 2.39*, *Cp 2.129*, *Cp 3.169*, *Cp 3.180* i *Cp 5.24*) utvrđen je veći broj alela u odnosu na drugu grupu SSR markera (*Cyd 14*, *Cyd 15* i *Cyd 16*) (tablica 14). Najveći broj alela (13 alela) utvrđen je kod netretirane populacije (Beloslavec) na lokusu *Cp 2.39*, dok je najmanji broj alela (dva alela) utvrđen na lokusima *Cyd 14* (sve tri populacije) i *Cyd 15* (Beloslavec i Kloštar Ivanić). Prosječan broj alela po svim lokusima iznosio je 7.20 (tablica 14).

Veći prosječni broj alela po lokusu utvrđen je kod netretirane populacije Beloslavec (6,2 alela) u usporedbi s tretiranim populacijama (Koštar Ivanić i Nedelišće) (5,3 alela) (tablica 14).

Kod netretirane populacije (Beloslavec) opaženo je veće bogatstvo alela (*allelic richness*) u odnosu na tretirane populacije (Kloštar Ivanić i Nedelišće). Prosječna vrijednost bogatstva alela kod netretirane populacije iznosila je 6,06, dok je kod tretiranih populacija iznosila 5,22 (Nedelišće) i 5,25 (Kloštar Ivanić) (tablica 14).

Tablica 14. Genetska struktura populacija jabukova savijača utvrđena pomoću 10 mikrosatelitnih markera [broj alela po lokusu (N_a); bogatstvo alela (AR); očekivana (H_E) i opažena (H_O) heterozigotnost i Weir i Cockerhamov (1984) fiksacijski indeks (F_{IS}); * statistički značajna odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE)]

Populacija		Mikrosatelitni marker										Srednja vrijednost
		<i>Cp 1.60</i>	<i>Cp 1.62</i>	<i>Cp 2.39</i>	<i>Cp 2.129</i>	<i>Cp 3.169</i>	<i>Cp 3.180</i>	<i>Cp 5.24</i>	<i>Cyd 14</i>	<i>Cyd 15</i>	<i>Cyd 16</i>	
Beloslavec (n=29)	Na	4	9	13	12	10	4	3	2	2	3	6,20
	AR	3,99	8,85	12,47	11,76	9,57	3,90	3,00	2,00	2,00	3,00	6,06
	H_E	0,43*	0,82*	0,84	0,81	0,79*	0,49	0,67*	0,13	0,43	0,54	0,59
	H_O	0,10	0,57	0,72	0,72	0,55	0,35	0,76	0,14	0,39	0,38	0,47
	F_{IS}	0,76	0,31	0,14	0,10	0,31	0,29	-0,14	-0,06	0,09	0,31	0,21
Kloštar Ivanić (n=28)	Na	5	7	10	8	9	3	4	2	2	3	5,30
	AR	5,00	6,92	9,91	7,85	8,85	3,00	3,93	2,00	2,00	3,00	5,25
	H_E	0,55*	0,75*	0,84	0,76	0,78	0,31	0,66*	0,10	0,44	0,47	0,57
	H_O	0,12	0,5	0,64	0,68	0,54	0,29	0,54	0,11	0,33	0,48	0,42
	F_{IS}	0,79	0,34	0,23	0,11	0,32	0,09	0,19	-0,04	0,25	-0,03	0,22
Nedelišće (n=29)	Na	5	8	10	9	6	3	4	2	3	3	5,30
	AR	5,00	7,85	9,88	8,78	5,99	2,90	3,93	2,00	2,90	3,00	5,22
	H_E	0,76*	0,75*	0,81	0,76	0,77	0,22	0,68	0,10	0,53	0,61	0,60
	H_O	0,33	0,48	0,69	0,59	0,56	0,10	0,75	0,11	0,52	0,64	0,48
	F_{IS}	0,56	0,36	0,15	0,23	0,28	0,53	-0,11	-0,04	0,01	-0,07	0,19
Sve populacije (n=86)	Na	5	12	13	14	12	4	4	2	3	3	7,20
	AR	4,97	8,38	10,61	10,28	8,89	3,30	3,52	1,98	2,31	3	5,72
	H_E	0,58*	0,77*	0,83	0,78	0,78	0,34	0,67	0,11	0,47	0,54	0,59
	H_O	0,19	0,52	0,68	0,66	0,55	0,24	0,68	0,12	0,42	0,50	0,46
	F_{IS}	0,71	0,34	0,17	0,15	0,30	0,31	-0,02	-0,04	0,12	0,07	0,21

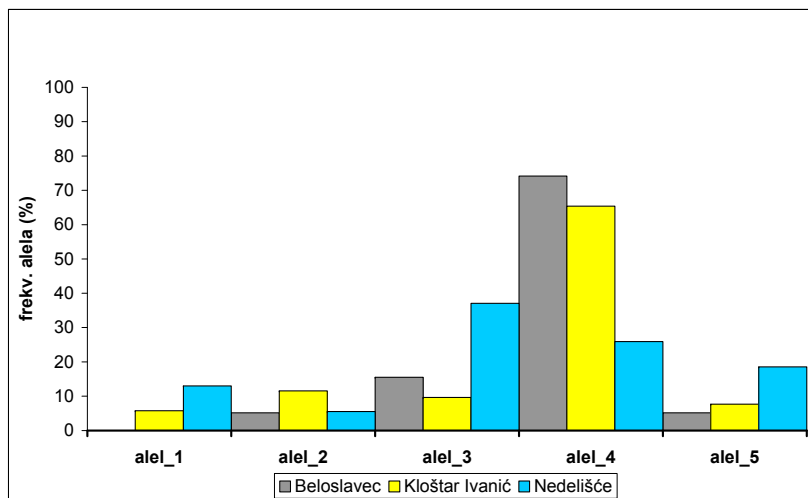
Učestalost (frekvencija) pojavljivanja pojedinog alela na 10 SSR markera zabilježena u tri populacije jabukova savijača (Beloslavec, Kloštar Ivanić i Nedelišće) prikazana je u grafikonima 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 i 15. Kod netretirane populacije (Beloslavec) na 10 SSR markera ukupno su utvrđena 62 alela, dok je kod tretiranih populacija (Kloštar Ivanić i Nedelišće) utvrđen jednak broj od 53 alela po populaciji.

Učestalost alela razlikuje se kod proučavanih populacija. Kod dva SSR markera (*Cp 1.60* i *Cp 5.24*) primijećena je pojava određenih alela samo kod tretiranih populacija (grafikoni 6 i 12). Na spomenutim SSR markerima utvrđen je jedan alel (*alel 1*) svojstven samo za tretirane populacije. Učestalost *alela 1* SSR markera *Cp 1.60* iznosila je 5,77% (Kloštar Ivanić) i 12,96% (Nedelišće) (Grafikon 6), dok je učestalost *alela 1* SSR markera *Cp 5.24* kod obadvije tretirane populacije bila jednaka te je iznosila 1,79% po populaciji (grafikon 12).

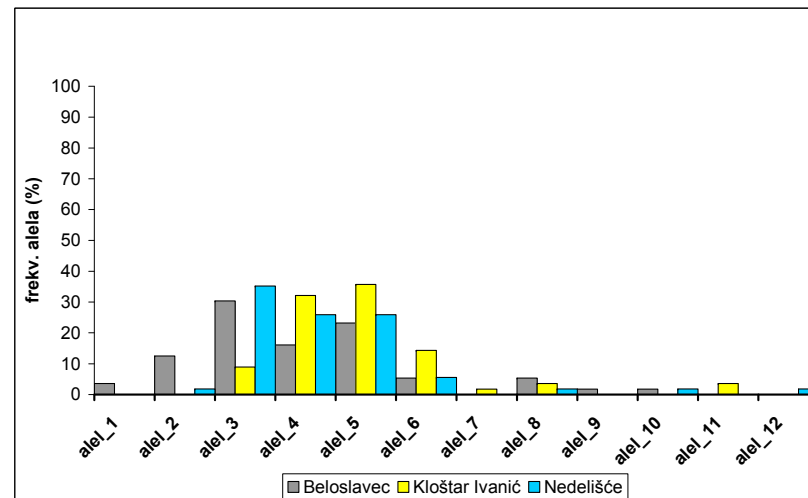
Kod četiri SSR markera (*Cp 1.62*, *Cp 2.39*, *Cp 2.129* i *Cp 3.180*) primijećena je pojava određenih alela samo kod netretirane populacije (grafikoni 7, 8, 9 i 11).

Na SSR markerima *Cp 1.62*, *Cp 2.39* i *Cp 2.129* utvrđena su po dva alela svojstvena samo za netretiranu populaciju. Učestalost alela SSR markera *Cp 1.62* iznosila je 3,57% (*alel 1*) i 1,79% (*alel 9*) (grafikon 7). Na SSR markerima *Cp 2.39* (*alel 11* i *13*) i *Cp 2.129* (*alel 3* i *10*) učestalost alela iznosila je 1,72% po alelu (grafikoni 8 i 9).

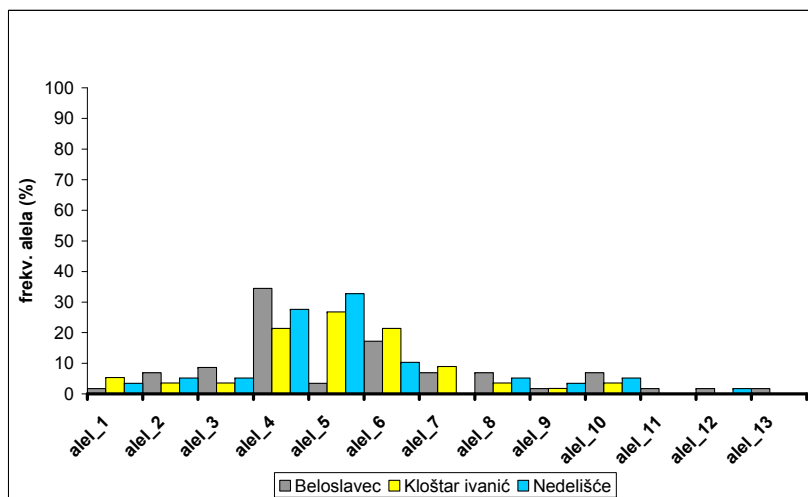
Na SSR markeru *Cp 3.180* opažena je pojava jednog alela (*alel 4*) svojstvenog za netretiranu populaciju. Učestalost *alela 4* iznosila je 1,72% (grafikon 11).



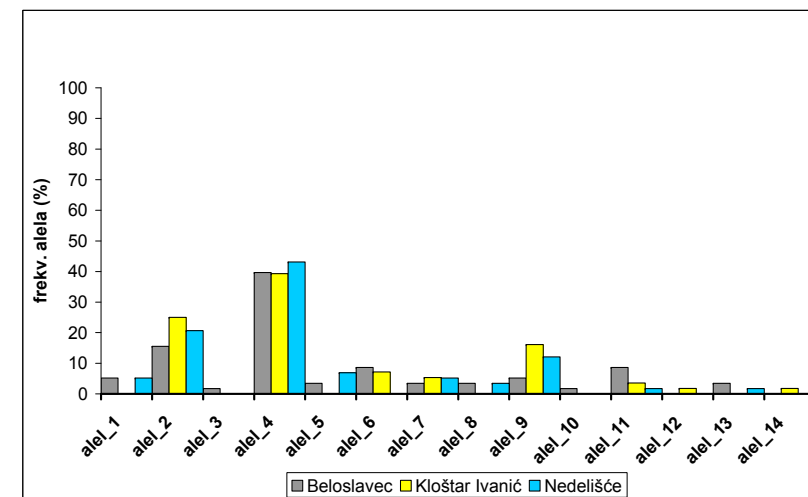
Graf 6. Histogram učestalosti alela SSR markera Cp 1.60



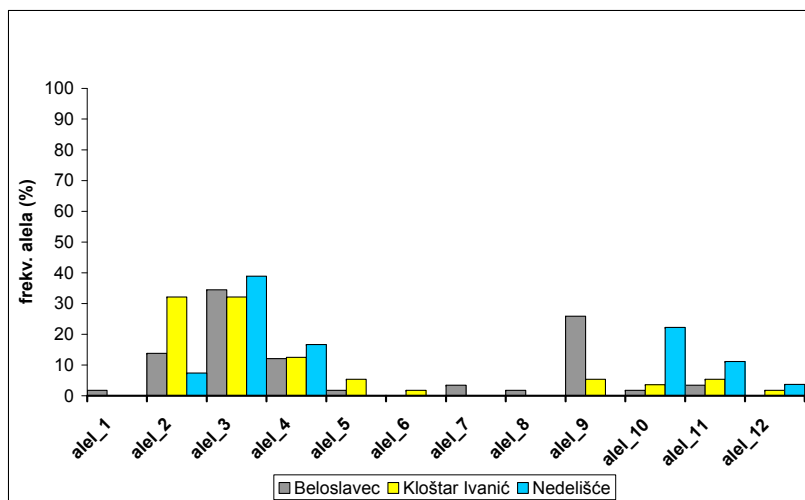
Graf 7. Histogram učestalosti alela SSR markera Cp 1.62



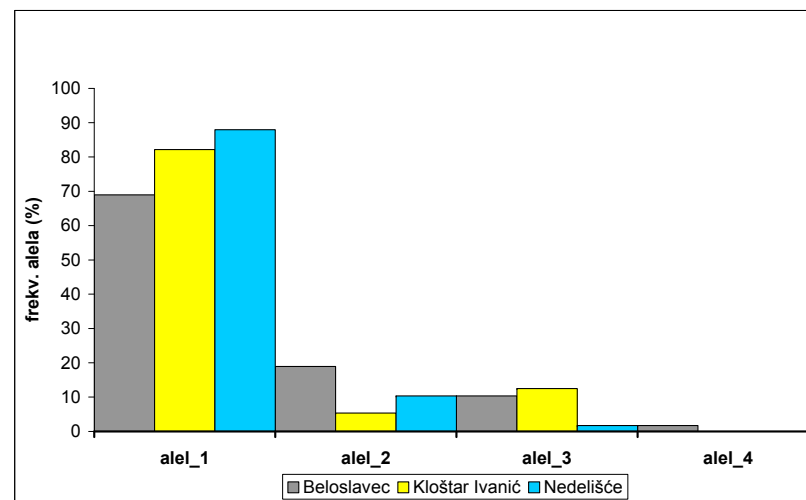
Graf 8. Histogram učestalosti alela SSR markera Cp 2.39



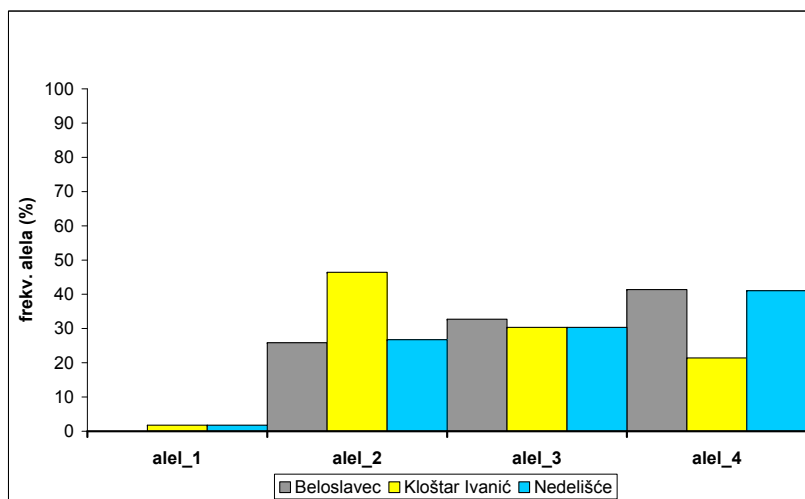
Graf 9. Histogram učestalosti alela SSR markera Cp 2.129



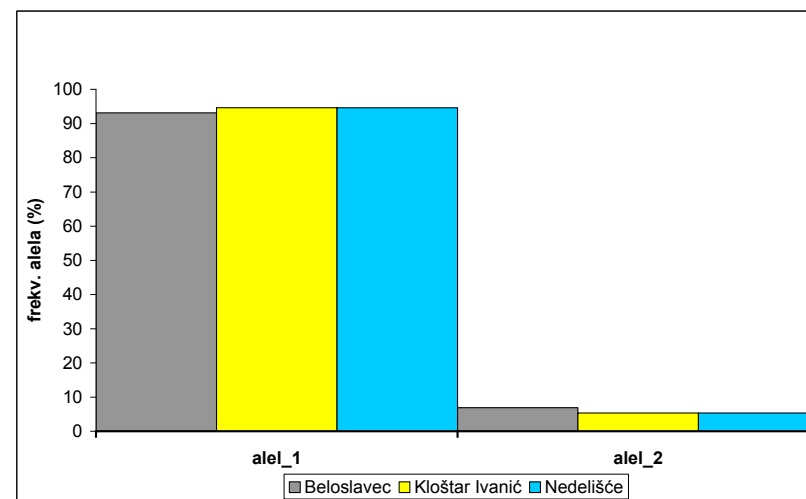
Graf 10. Histogram učestalosti alela SSR markera Cp 3.169



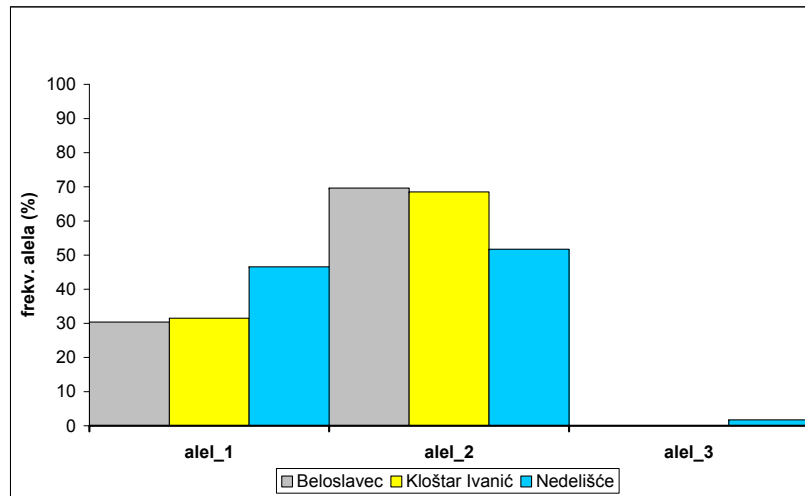
Graf. 11. Histogram učestalosti alela SSR markera Cp 3.180



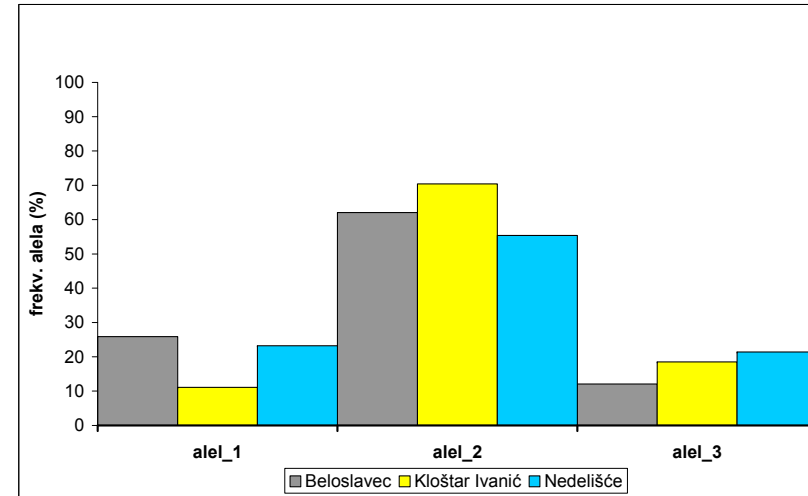
Graf 12. Histogram učestalosti alela SSR markera Cp 5.24



Graf 13. Histogram učestalosti alela SSR markera Cyd 14

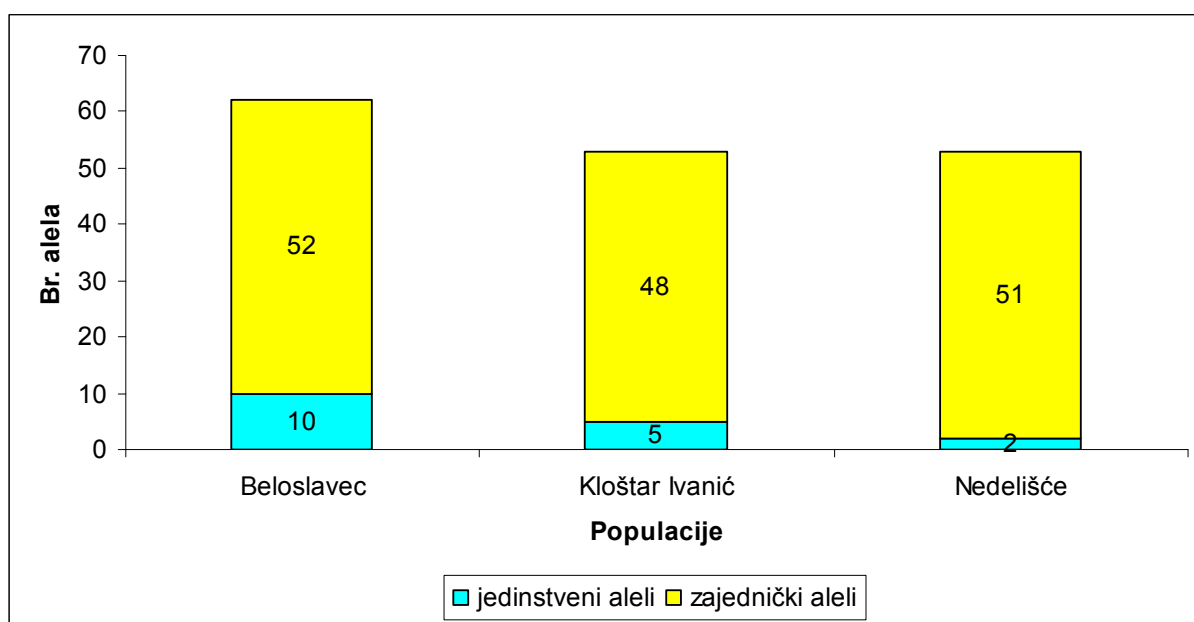


Graf 14. Histogram učestalosti alela SSR markera *Cyd* 15



Graf 15. Histogram učestalosti alela SSR markera *Cyd* 16

Ukupno 17 alela (23,61% od ukupnog broja alela dobivenih u analizi) umnoženo je u samo jednoj populaciji pa oni predstavljaju jedinstvene alele (*private alleles*). Ukupno 10 alela (13,89%) umnoženo je kod netretirane populacije (Beloslavec), kod tretirane populacije Kloštar Ivanić umnoženo je pet jedinstvenih alela (6,94%), dok su kod tretirane populacije Nedelišće umnožena dva jedinstvena alela (2,78%) (grafikon 16). Populacija Beloslavec posjeduje 52 zajednička alela, populacija Kloštar Ivanić 48 zajedničkih alela, a Nedelišće 51 zajednički alel (grafikon 16).



Graf. 16. Histogram broja jedinstvenih i zajedničkih alela utvrđenih u tri populacije jabukova savijača

U tablici 15 prikazani su SSR markeri s jedinstvenim alelima po populacijama. Na SSR markeru *Cp 1.62* ukupno je zabilježeno pet jedinstvenih alela. Na spomenutom markeru populacije Beloslavec i Kloštar Ivanić posjeduju po dva jedinstvena alela, a populacija Nedelišće jedan (tablica 15). Najveću frekvenciju jedinstvenih alela na SSR markeru *Cp 1.62* bilježe populacija Beloslavec (*alel 1*; 3,57%) i populacija Kloštar Ivanić (*alel 11*; 3,57%) (grafikon 7).

Na SSR markeru *Cp 2.39* jedinstveni aleli (*aleli 11 i 13*) zabilježeni su samo kod netretirane populacije (Beloslavec) u frekvenciji od 1,72% (tablica 15 i grafikon 8).

Populacije jabukova savijača na SSR markeru *Cp 2.129* imaju četiri jedinstvena alela. Na spomenutom markeru populacije Beloslavec i Kloštar Ivanić imaju po dva jedinstvena alela (tablica 15).

Na SSR markeru *Cp 3.169* zabilježena su četiri jedinstvena alela. Populacija Beloslavec posjeduje tri jedinstvena alela, a populacija Kloštar Ivanić jedan jedinstveni alel (tablica 15). Najveću frekvenciju jedinstvenih alela bilježi populacija Beloslavec (*alel 7*; 3,45%).

Na SSR markerima *Cp 3.180* i *Cyd 15* zabilježen je po jedan jedinstveni alel (tablica 15).

Tablica 15. Jedinstveni aleli SSR markera zabilježeni u tri populacije jabukova savijača

Mikrosatelitni marker	Jedinstveni alel	Populacija		
		Beloslavec	Kloštar Ivanić	Nedelišće
<i>Cp 1.62</i>	<i>alel 1</i>	*		
	<i>alel 7</i>		*	
	<i>alel 9</i>	*		
	<i>alel 11</i>		*	
	<i>alel 12</i>			*
<i>Cp 2.39</i>	<i>alel 11</i>	*		
	<i>alel 13</i>	*		
<i>Cp 2.129</i>	<i>alel 3</i>	*		
	<i>alel 10</i>	*		
	<i>alel 12</i>		*	
	<i>alel 14</i>		*	
<i>Cp 3.169</i>	<i>alel 1</i>	*		
	<i>alel 6</i>		*	
	<i>alel 7</i>	*		
	<i>alel 8</i>	*		
<i>Cp 3.180</i>	<i>alel 4</i>	*		
<i>Cyd 15</i>	<i>alel 3</i>			*

Svrha analize molekularne varijance (AMOVA) bila je utvrditi raspodjelu ukupne molekularne varijance utvrđene SSR markerima na sastavnice koje čine razlike između populacija, unutar populacija i unutar jedinki.

Rezultati su pokazali da je većina statistički značajne genotipske varijacije raspoređena unutar jedinki iz različitih tipova gospodarenja (tretirane populacije/netretirana populacija: 86% varijacije, $p < 0,01$) (tablica 16).

Mantelov test izolacije prema udaljenosti otkrio je neznatan negativan odnos između Slatkinove linearne F_{ST} vrijednosti ($F_{ST}(1/F_{ST}-1)$) i prirodnog algoritma (Ln) geografskih udaljenosti (km) u svim populacijama ($r = -0,53$; $df = 1$; $t = -0,66$; $p = 0,65$) što upućuje da postoji mala vjerojatnost za tip protoka gena (*gene flow*) između populacija opisan pomoću modela izolacije prema udaljenosti (*isolation by distance*-IBD). Isto tako, nema dokaza da su ispitivane populacije jabukova savijača bile izložene efektu genetskog "uskog grla" (*bottleneck*) jer je svaka populacija opisivala normalnu L alelnu distribuciju.

Tablica 16. Raspodjela raznolikosti između i unutar populacija te između jedinki jabukova savijača na temelju SSR markera pomoću Analize molekularne varijance (AMOVA)

Izvor	df	Sastavnice varijance	% Ukupne varijacije	R-Statistika
Između populacija	1	0,113	0	Rst = 0,266
Unutar populacija	84	4,241	14	Ris = 0,008*
Unutar jedinki	86	27,89	86	Rit = 0,007*

*, statistički značajno kod $P < 0,01$

Indeks genetske diferencijacije između populacija jabukova savijača, procijenjen kao F_{ST} , bio je nizak, kretao se od 0,02 do 0,04 te nije bio statistički značajan nakon korekcije za višestruke usporedbe ($n = 3$, $P < 0,01$) (tablica 17).

Tablica 17. Procjena Weir i Cockerhamove (1984) θ vrijednosti (F_{ST} ; ispod dijagonale) i udaljenosti (km; iznad dijagonale) između populacija jabukova savijača

Populacija	Beloslavec	Kloštar Ivanić	Nedelišće
Beloslavec	-	55	60
Kloštar Ivanić	0,02	-	110
Nedelišće	0,04	0,04	-

6. RASPRAVA

6.1. Biologija i ekologija populacija jabukova savijača

Istraživanjem biologije i ekologije jabukova savijača na području sjeverozapadne Hrvatske utvrđene su promjene u ponašanju ovog štetnika. One su opažene u razvojnem ciklusu štetnika između netretiranog voćnjaka (Beloslavec) i tretiranih voćnjaka (Kloštar Ivanić i Nedelišće). Leptiri jabukova savijača u proljeće su se u netretiranom voćnjaku pojavljivali kasnije u odnosu na tretirane voćnjake, razvoj jaja i gusjenica štetnika podudara se sa teoretskim modelom pojave (Wildbolz, 1962.), a istraživanjem su utvrđene dvije generacije štetnika godišnje što je u skladu sa literaturnim podacima (Ciglar, 1998.; Maceljski, 2002.).

Za razliku od netretirane populacije jabukova savijača kod koje su utvrđena dva leta leptira godišnje, kod tretiranih populacija utvrđen je i treći let, što upućuje na razvoj dodatne generacije štetnika. U voćnjaku Kloštar Ivanić dodatni let utvrđen je u sve tri godine istraživanja, a u voćnjaku Nedelišće samo u jednoj (2009.).

Nakon utvrđenih razlika u dinamici leta jabukova savijača između netretirane populacije (Beloslavec) i tretiranih populacija (Kloštar Ivanić i Nedelišće), podatci o dinamici leta u tretiranim voćnjacima uspoređivani su s onima s istih lokaliteta prikupljenima prije 10 godina. Rezultati su pokazali promjene u dinamici leta leptira koji u posljednje tri godine istraživanja (2008., 2009. i 2010.) počinje sve ranije te završava kasnije u odnosu na promatrane letove iz prošlog desetljeća.

Nadalje, primijećeno je i produženje leta leptira kod tretiranih populacija. Njime se produžuje i period odlaganja jaja što u konačnici dovodi do produženog razvoja gusjenica koje pričinjavaju štetu u dozrijevanju plodova te u proljeće sljedeće godine predstavljaju dodatni potencijal za razvoj leptira.

Uspoređujući podatke o dinamici leta leptira jabukova savijača iz tretiranih voćnjaka iz prošlog desetljeća s onima prikupljenim ovim istraživanjem u netretiranom voćnjaku (Beloslavec), primjećuje se sličnost u ponašanju štetnika. U tretiranim voćnjacima u prošlom desetljeću dinamika leta leptira odgovarala je današnjem ponašanju štetnika u netretiranoj populaciji (Beloslavec).

Ovi podatci upućuju na značajne promjene u distribuciji leta leptira u tretiranim voćnjacima (Kloštar Ivanić i Nedelišće) u spomenutom periodu.

Worner je 1991. godine ispitivanjem utjecaja klime na ponašanje populacija kukaca utvrdio značajni utjecaj vremenskih prilika na promjene kod kukaca. Klimatski čimbenici (temperatura, vlaga, svjetlo, zračna strujanja/vjetar) djeluju uvijek povezano i njihovo je ukupno djelovanje na kukce složeno i veoma važno. Njihova rezultanta nije zbroj pojedinačnih učinaka navedenih čimbenika, stoga organizam ne reagira pojedinačno na svaki čimbenik nego na njihovo ukupno djelovanje (Oštrec i Gotlin Čuljak, 2005.). U području umjerene klime temperatura se smatra najvažnijim čimbenikom koji utječe na razvoj, plodnost i smrtnost kukaca (Worner, 1992.).

Jednostrukom analizom varijance (ANOVA) provedenom za ispitivanje razlika u temperaturama između proučavanih vegetacijskih sezona za tretirane voćnjake utvrđene su statistički značajne razlike u temperaturama u razdoblju od 1993. do 2010. godine za voćnjak Nedelišće te u razdoblju od 1997. do 2010. godine za voćnjak Kloštar Ivanić. Nadalje, jednostrukom analizom varijance (ANOVA) provedenom za ispitivanje razlika u ukupnom ulovu leptira jabukova savijača između pojedinih vegetacijskih sezona također su utvrđene statistički značajne razlike u ukupnom ulovu leptira u razdoblju od 1993. do 2010. godine za voćnjak Nedelišće te u razdoblju od 1997. do 2010. godine za voćnjak Kloštar Ivanić.

Izračunom korelacijskih koeficijenata između temperatura i ukupnog ulova leptira za tretirane voćnjake (Kloštar Ivanić i Nedelišće) utvrđena je statistički značajna povezanost temperatura i ukupnog ulova leptira u razdoblju od 1993. do 2010. godine za voćnjak Nedelišće ($r=0.135$, $p<0.05$) te u razdoblju od 1997. do 2010. godine za voćnjak Kloštar Ivanić ($r=0.102$, $p<0.05$).

Statistički značajne razlike u temperaturi i ukupnom ulovu leptira jabukova savijača u razdoblju od deset godina pokazuju da su se promjene u dinamici populacija djelomično dogodile zbog klimatskih promjena, tj. zbog promjena temperature.

Klimatske promjene i globalno zatopljenje povoljno utječu na razvoj kukaca, na što upućuje i Svjetska zdravstvena organizacija (WHO). Globalno zagrijavanje može utjecati na raniju pojavu vrsta kukaca, njihovo širenje, povećanu reprodukciju, smanjenje prirodne smrtnosti, povećanje broja generacija te na druge elemente biotičkog potencijala kukaca (Oštrec i Gotlin Čuljak, 2005.).

Rafoss i Sæthre 2003. godine potvrdili su da povećanje temperature može izazvati velike promjene u ukupnoj brojnosti i štetnosti jabukova savijača što potvrđuju i rezultati ovog istraživanja.

Jabukov savijač značajan je štetnik u proizvodnji jabuka u područjima gdje temperaturni uvjeti osiguravaju cjelokupan razvojni ciklus štetnika, odnosno u područjima u kojima su sume efektivnih temperatura veće od 750 °C (Shel'deshova, 1967.).

U našoj zemlji vladaju povoljni uvjeti suma efektivnih temperatura koji osiguravaju cjelokupni razvojni ciklus štetnika dva puta u vegetacijskoj sezoni.

Prema modelu prognoze (Wildbolz, 1962.) leptiri prezimljujuće generacije u proljeće se pojavljuju kod sume efektivnih temperatura od 100 °C, no u tretiranim je voćnjacima pojava leptira utvrđena znatno ranije, tj. već kod sume efektivnih temperatura od 36,8 °C (Nedelišće, 2008.). Stoga se pretpostavlja da je za razvoj leptira potrebna manja suma efektivnih temperatura.

Nadalje, za razvoj jedne generacije štetnika potrebna je suma efektivnih temperatura od 610 °C, no u tretiranim voćnjacima utvrđen je cjelokupan razvoj štetnika već kod sume 397,90 °C (Nedelišće, 2009.). Osim što razvoj štetnika u tretiranim voćnjacima traje kraće, temperaturni uvjeti omogućili su i razvoj dodatne treće generacije štetnika što je vidljivo i prema distribuciji leta leptira.

Praćenjem razvoja jabukova savijača u netretiranom voćnjaku (Beloslavec) utvrđene su razlike u ponašanju štetnika u odnosu na tretirane voćnjake (Kloštar Ivanić i Nedelišće).

Za razliku od tretiranih voćnjaka gdje su se leptiri prezimljujuće generacije pojavili prije nego što se teoretski očekivalo, na ovom su se lokalitetu javljali u skladu s predviđenim ili nešto kasnije.

Tijekom trogodišnjih istraživanja nisu opaženi dodatni letovi pretpostavljene treće generacije štetnika u netretiranom voćnjaku (Beloslavec) unatoč sličnim klimatskim uvjetima koji su vladali u istraživanom području. Stoga možemo pretpostaviti da su insekticidni tretmani odgovorni za promjene u ponašanju ovog štetnika u tretiranim voćnjacima.

Pretpostavlja se da su se populacije jabukova savijača uslijed klimatskih promjena i čestih insekticidnih tretmana diferencirale na mnoge ekotipove različitih bioloških i fizioloških zahtjeva za razvoj (Thaler i sur., 2008.).

Uslijed čestih aplikacija kemijskih sredstava štetnik je razvio otpornost na različite kemijske skupine insekticida u SAD-u i Europi (Sauphanor i sur., 2000.; Boivin i sur., 2001.; Bouvier i sur., 2001.; Brun-Barale i sur., 2005.). Razvoj kros-rezistentnosti na regulatore razvoja kukaca, npr. tebufenozid i analoge juvenilnih hormona, utvrđen je kod populacija jabukova savijača u jugoistočnoj Francuskoj (Sauphanor i Bouvier, 1995.;

Sauphanor i sur., 2000.). Rezistentnost na različite skupine insekticida također je utvrđena kod populacija jabukova savijača u Italiji (Ioriatti i sur., 2000., 2005.).

Istraživanja rezistentnosti populacija jabukova savijača na insekticide nisu provedena ovim istraživanjem, ali može se pretpostaviti da se rezistentnost populacija pojavila uslijed intenzivne primjene insekticida. Znakovi rezistentnosti javili se u vidu smanjenog učinka insekticida unatoč pravovremenim rokovima primjene koji se temelje na praćenju razvoja štetnika (Barić, 2008; Pajač i sur., 2011.).

6.2. Genetika populacija jabukova savijača

Analizom molekularne varijance (AMOVA) provedenom na tri populacije jabukova savijača pomoću 10 SSR markera nisu utvrđene razlike u genetskoj strukturiranosti populacija unatoč razlikama u tipu gospodarenja (tretirani i netretirani voćnjaci) što upućuje na nisku razinu protoka gena (*gene flow*) između populacija. Genetska diferencijacija između proučavanih geografskih područja bila je niska (F_{ST} vrijednosti kretale su se od 0.02 do 0.04), što je u skladu sa genetskim istraživanjima jabukova savijača u Francuskoj (Buès i sur., 1995.; Franck i sur., 2007.; Franck i Timm, 2010.) i Čileu (Fuentes-Contreras i sur., 2008.).

Rezultati ovog istraživanja stoga su potvrda opće pretpostavke o nedostatku genetske diferencijacije između populacija štetnika iz reda Lepidoptera (Franck i sur., 2007.).

Unatoč činjenici da razlike u genetskoj strukturiranosti populacija nisu bile statistički značajne, populacija jabukova savijača iz netretiranog voćnjaka (Beloslavec) imala je najveći prosječni broj alela u usporedbi s onima iz tretiranih voćnjaka (Kloštar Ivanić i Nedelišće). Kod netretirane populacije (Beloslavec) na 10 SSR markera ukupno su utvrđena 62 alela, dok je kod tretiranih populacija (Kloštar Ivanić i Nedelišće) utvrđen jednak broj od 53 alela po populaciji.

Kod proučavanih populacija opažena je i razlika u učestalosti (frekvenciji) pojavljivanja pojedinih alela s obzirom na tip gospodarenja (tretirani i netretirani voćnjaci). Kod četiri SSR markera (*Cp 1.62*, *Cp 2.39*, *Cp 2.129* i *Cp 3.180*) primijećena je pojava određenih alela samo kod netretirane populacije, dok je kod dva SSR markera (*Cp 1.60* i *Cp 5.24*) primijećena pojava pojedinih alela samo kod tretirane populacije.

Ovi rezultati upućuju na moguće snižavanje bogatstva alela štetnika uslijed primjene insekticidnih tretmana. Rezultate ovog istraživanja potvrdili su 2007. godine Franck i sur. koji su istraživanjem populacija jabukova savijača u Francuskoj također utvrdili nisku

genetsku diferencijaciju proučavanih populacija te primijetili marginalni utjecaj insekticidnih tretmana na bogatstvo alela štetnika. Kod netretirane populacije (Beloslavec) utvrđen je i veći broj jedinstvenih alela (*private alleles*) (10 alela) u odnosu na tretirane populacije (Kloštar Ivanić: 5 alela, Nedelišće; 2 alela) što dodatno potvrđuje ovu pretpostavku.

Rezultati koji su suprotni ovom istraživanju utvrđeni su molekularnom analizom jabukova savijača u uzgojnim područjima jabuke na području Južne Afrike (Timm i sur., 2006.) i Švicarske (Chen i Dorn, 2009.) gdje su između populacija uzorkovanih na različitim geografskim područjima utvrđene statistički značajne genetske diferencijacije. Razlike u rezultatima istraživanja mogle su nastati zbog razlika u molekularnim markerima (npr. AFLP) koji su korišteni u istraživanju jabukova savijača u Južnoj Americi.

No istraživanja u Švicarskoj (Chen i Dorn, 2009.) provođena su pomoću istih mikrosatelitnih markera kojima su ranije otkrivene niske razine genetske varijacije između populacija jabukova savijača uzorkovanih u Francuskoj i Čileu (Franck i sur., 2007., Fuentes-Contreras i sur., 2008., Franck i Timm, 2010.).

Jabukov savijač smatrao se "sedentornom vrstom" (Keil i sur., 2001.), no istraživanja kapaciteta širenja letom pokazala su sposobnost širenja pojedinih jedinki i nekoliko kilometara unutar određenog područja (Schumacher i sur., 1997.a).

U ovom istraživanju nije utvrđen protok gena između populacija prema modelu izolacije prema udaljenosti (IBD), što je vidljivo i prema vrlo niskim utvrđenim F_{ST} vrijednostima. To upućuje na to da drugi mehanizmi, kao što je širenje štetnika pomoću čovjeka, pomažu u kretanju štetnika na duže i kraće udaljenosti unutar uzgojnih područja jabuke u našoj zemlji.

Čovjekovo posredovanje u širenju štetnika može biti djelotvoran način širenja rezistentnih populacija jabukova savijača. Na drvenoj ambalaži koja se koristi za prijevoz plodova jabuke često se kukulje gusjenice jabukova savijača čime se olakšava širenje štetnika na veće udaljenosti (Fuentes-Contreras i sur., 2008.).

Određena istraživanja pokazuju da su insekticidni tretmani, koji se primjenjuju za suzbijanje jabukova savijača, odgovorni za genetske varijacije populacija štetnika (Franck i sur., 2007.; Franck i Timm, 2010.) što potvrđuju i rezultati ovog istraživanja.

Unatoč sličnim klimatskim prilikama koje su vladale u istraživanim voćnjacima, razlike u gospodarenju (netretirani i tretirani voćnjaci) utjecale su na različito ponašanje štetnika što je utvrđeno i analizom genetske raznolikosti štetnika.

Boivin i sur. 2003. godine utvrdili su da je unutar populacijska raznolikost u sezonskoj regulaciji životnih ciklusa kukaca djelomično pod utjecajem genetskih promjena te su istraživanja potvrdila da rezistentnost na insekticide kod populacija jabukova savijača proizlazi iz alelnih zamjena na dva do tri lokusa kod populacija ovog štetnika u jugoistočnoj Francuskoj (Boivin i sur., 2003.). Međutim takav proces prilagodbe povezan je s prilagodbom štetnika na klimatske čimbenike, kao što je temperatura (Boivin i sur., 2003.).

Iako je jabukov savijač najznačajniji štetnik u proizvodnji jabuka u svijetu, do danas nisu otkriveni svi potencijali mehanizmi koji utječu na promjene u njegovu ponašanju. Štetnik je izuzetno prilagodljiv klimatskim prilikama koje pogoduju komercijalnom uzgoju jabuke i kruške, no najveći problem u uzgoju javio se s razvojem rezistentnosti jabukova savijača na grupe insekticidnih pripravka koji se koriste u njegovom suzbijanju. Spektar insekticidnih grupa na koje je jabukov savijač stekao otpornost svakim se danom povećava te obuhvaća i pripravke iz skupine neonicotinoida te ekološki povoljnih bioloških insekticida, naturalita (*avermectins*) (Reyes i sur., 2007.).

Mehanizmi rezistentnosti su mnogobrojni, no njihovi samostalni ili zbirni učinci u pojedinoj populaciji još nisu do kraja razjašnjeni (Reyes i sur., 2007.).

Franck i sur. 2007. godine utvrdili su kako mehanizmi uključeni u nastanak nespecifične rezistentnosti uključuju aktivnost nekoliko metaboličkih enzima, kao što su citokrom P450 oksidaza ili glutation-S-transferaza, te promjene u mjestu djelovanja nekih insekticidnih grupa, no geni rezistentnosti jabukova savijača na insekticide još uvijek nisu otkriveni.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je u našoj zemlji moguć razvoj treće generacije štetnika u godinama u kojima je suma efektivnih temperatura veća od prosjeka te u voćnjacima u kojima se provode mjere intenzivnog suzbijanja jabukova savijača primjenom kemijskih pripravaka.

Rezultati molekularnih analiza upućuju na određene razlike u genetskoj raznolikosti populacija jabukova savijača iz tretiranih voćnjaka koje su utjecale na povećanje reproduktivne sposobnosti štetnika, a samim time i na promjene u njegovoj biologiji.

Čovjekova selekcija otpornih jedinki jabukova savijača primjenom insekticidnih tretmana ozbiljno je ugrozila rentabilnost proizvodnje jezgričavog voća. Stoga bi se u budućnosti u zaštiti protiv ovog štetnika trebali razvijati ekološki i ekonomski povoljniji načini suzbijanja. Uvođenjem novih insekticidnih pripravaka u komercijalnu zaštitu, problem

rezistentnosti štetnika samo će se kratkoročno odgoditi zbog toga što će neke jedinke u populaciji ponovno razviti otpornosti na pripravke promjenom genetske strukture, tj. različitim genetskim mutacijama. Genetski promijenjene jedinke prenosit će genetsku informaciju otpornosti nasljeđivanjem na svoje potomstvo pa će se problem rezistentnosti na kemijske pripravke ponovno javiti.

U posljednjih 10 godina u zaštiti protiv ovog štetnika sve se više pozornosti pridaje genetskim transformacijama jabukova savijača pomoću biotehnoloških metoda te se smatra da će navedena metoda zbog svoje uske specijaliziranosti, tj. ciljanog učinka suzbijanja samo željene, štetne vrste kukca u budućnosti u potpunosti zamijeniti metodu zaštite pomoću kemijskih pripravaka.

Jabukov savijač u Hrvatskoj je prisutan od početka uzgoja jabuka, no biologija i ekologija štetnika nije se pratila nakon 1981. godine kada je Ciglar utvrdio kritični broj leptira za komercijalne voćnjake. Rezultati ovog istraživanja utvrdili su promjene u biologiji i ekologiji jabukova savijača. Stoga ovaj rad predstavlja doprinos poznavanju štetnika što će omogućiti razradu novih, uspješnijih strategija suzbijanja.

Molekularne analize jabukova savijača primjenom SSR markera prva su istraživanja genetske strukture ovog štetnika u našoj zemlji. Genetska istraživanja jabukova savijača potvrdila su mogućnost provođenja molekularnih analiza na mužjacima leptira štetnika što će olakšati i pojednostavniti sakupljanje uzoraka za buduća istraživanja genetske strukture populacija ovog ili drugih štetnika.

7. ZAKLJUČCI

1. Istraživanjem biologije i ekologije jabukova savijača na području sjeverozapadne Hrvatske utvrđene su promjene u ponašanju ovog štetnika. U netretiranom voćnjaku (Beloslavec) opažena je kasnija pojava leptira jabukova savijača u proljeće, kasnije odlaganje jaja te kasnija pojava gusjenica u usporedbi s tretiranim voćnjacima (Kloštar Ivanić i Nedelišće).
2. U netretiranom voćnjaku (Beloslavec) utvrđene su dvije generacije jabukova savijača godišnje, dok je u tretiranim voćnjacima (Kloštar Ivanić i Nedelišće) utvrđen razvoj dodatne, treće, generacije štetnika.
3. Izračunom korelacijskih koeficijenata između temperatura i ukupnog ulova leptira za tretirane voćnjake (Kloštar Ivanić i Nedelišće) utvrđena je statistički značajna povezanost temperatura i ukupnog ulova leptira u razdoblju od 1993. do 2010. godine. Statistički značajne razlike u temperaturi i ukupnom ulovu leptira jabukova savijača u razdoblju od deset godina upućuje na to da su se promjene u dinamici populacija djelomično dogodile zbog klimatskih promjena, tj. zbog promjena temperature.
4. Analizom populacija jabukova savijača provedenom pomoću 10 SSR markera nisu utvrđene razlike u genetskoj strukturiranosti populacija unatoč razlikama u tipu gospodarenja (tretirani i netretirani voćnjaci), što upućuje na nisku razinu protoka gena (*gene flow*) između populacija.
5. Unatoč činjenici da razlike u genetskoj strukturiranosti populacija nisu bile statistički značajne, populacija jabukova savijača iz netretiranog voćnjaka (Beloslavec) imala je najveći prosječni broj alela te najveći broj jedinstvenih alela u usporedbi s populacijama jabukova savijača iz tretiranih voćnjaka (Kloštar Ivanić i Nedelišće).
6. Kod četiri SSR markera (*Cp 1.62*, *Cp 2.39*, *Cp 2.129* i *Cp 3.180*) primijećena je pojava određenih alela samo kod netretirane populacije, dok je kod dvaju SSR markera (*Cp 1.60* i *Cp 5.24*) primijećena pojava pojedinih alela samo kod tretirane

populacije. Ovi rezultati upućuju na moguće snižavanje bogatstva alela štetnika uslijed primjene insekticidnih tretmana.

7. U ovom istraživanju nije utvrđen protok gena između populacija prema modelu izolacije prema udaljenosti (IBD), što upućuje na to da drugi mehanizmi, kao što je širenje štetnika pomoću čovjeka, pomažu u kretanju štetnika na duže i kraće udaljenosti unutar uzgojnih područja jabuke u našoj zemlji.
8. Rezultati istraživanja podupiru hipotezu o međusobnoj razmjeni genetskog materijala između proučavanih populacija jabukova savijača na umjerenom do potencijalno visokoj razini.
9. Rezultati molekularnih analiza upućuju na određene razlike u genetskoj raznolikosti populacija jabukova savijača iz tretiranih voćnjaka koje su utjecale na povećanje reproduktivne sposobnosti štetnika, a samim time i na promjene u njegovoj biologiji.
10. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je u našoj zemlji moguć razvoj treće generacije štetnika u godinama u kojima je suma efektivnih temperatura veća od prosjeka te u voćnjacima u kojima se provode mjere intenzivnog suzbijanja jabukova savijača primjenom kemijskih pripravaka.

8. LITERATURA

1. Alford D.V. (1984). A colour atlas of fruit pests their recognition, biology and controli. Wolfe Publishing Ltd., London: 170-171
2. Ambriović Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković H., Herak Bosnar M., Hranilović D., Katušić Hećimović S., Meštović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (2007). Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković: 211-496
3. Balachowsky A., Mesnil L. (1935). Les insectes nuisibles aux plantes cultivées. Ministère de L'agriculture, Paris: 130-158
4. Barić B. (2008). Usmeno priopćenje na 52. Seminaru zaštite bilja, Opatija.
5. Bassam B.J., Caetano-Anolles G. (1993). Silver-staining of DNA in poly- acrylamide gels. Appl. Biochem. Biotech. 42: 181-188
6. Behura S.K. (2006). Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. Molecular Ecology 15: 3087–3113
7. Bogenschütz H. (1978). Fortpflanzung der Schlupfwespe *Coccygomimus turionellae* (Ichneumonidae). Publikationen zu wissenschaftlichen Filmen des IWF, Sektion Biologie Serie 11: 1-14
8. Boivin T., Chabert d'Hières C., Bouvier J.-C., Beslay D., Sauphanor B. (2001). Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*. Entomologia Experimentalis et Applicata 99: 381-386
9. Boivin T., Bouvier J.-C., Chadoeuf J., Beslay D., Sauphanor B. (2003). Constraints on adaptive mutations in the codling moth *Cydia pomonella* (L.): measuring fitness trade-offs and natural selection. Heredity 90: 107-113

10. Boivin T., Bouvier J.-C., Beslay D., Sauphanor B. (2004). Variability in diapause propensity within populations of a temperate insect species: interactions between insecticide resistance genes and photoperiodism. *Biological Journal of the Linnean Society* 83: 341-351
11. Boivin T., Chadoeuf J., Bouvier J.-C., Beslay D., Sauphanor B. (2005). Modelling the interactions between phenology and insecticide resistance genes in the codling moth *Cydia pomonella*. *Pest. Manag. Sci.* 61:53-67
12. Bouvier J.-C., Buès R., Boivin T., Boudinhon L., Beslay D., Sauphanor B. (2001). Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. *Heredity* 87: 456-462
13. Brun-Barale A., Bouvier J.-C., Pauron D., Bergé J.-B., Sauphanor B. (2005). Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L., and development of a diagnostic test. *Pest Management Science* 61: 549-554
14. Bruvo Mađarić B. (2009). Molecular phylogenetic methods in entomology - new insights on the evolutionary relationships of hexapods and arthropods. *Entomol.Croat.* 13(2): 69-84
15. Buès R., Toubon J.-F., Poitout H. S. (1995). Variabilité écophysiological et enzymatique de *Cydia pomonella* L. en fonction de l'origine géographique et de la plante hôte. *Agronomie* 15: 221-231
16. Chen M. H., Dorn S. (2009). Microsatellites reveal genetic differentiation among populations in an insect species with high genetic variability in dispersal, the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research* 100: 75-85
17. Chesworth J. M., Stuchbury T., Scaife J.R. (1998). *An Introduction to Agricultural Biochemistry*. Chapman & Hall, UK: 120-490

18. Chidawanyika F. (2010). Thermal tolerance of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) under ecologically relevant conditions. Maser Thesis. Faculty of Agrisciences, University of Stellenbosch, Stellenbosch: 1-111
19. Ciglar I. (1998). Integrirana zaštita voćaka i vinove loze. Zrinski, Čakovec: 88-87
20. Cornuet J. M., Luikart G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014
21. Di Rienzo A., Peterson A. C., Garza J. C., Valdös A. M., Slatkin M., Freimer N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3166-3170
22. Dorn S., Schumacher P., Abivardy C., Meyhöfer R. (1999). Global and regional pest insects and their antagonists in orchards: spatial dynamics. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 73: 111-118
23. Dunley J. E., Welter S. C. (2000). Correlated insecticide cross-resistance in azinphosmethyl resistant codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of economic entomology* 93(3): 955-962
24. Dyck V. A., Gardiner M.G.T. (1992). Sterile-insect release programme to control the codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae) in British Columbia, Canada. *Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica* 27: 219–222
25. EPPO Standards (2004). Efficacy evaluation of plant protection product – insecticides & acaricides. Efficacy evaluation of insecticides – *Cydia pomonella*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 3: 4-6
26. Estoup A., Cornuet J. M. (1999). Microsatellite evolution: inferences from population data. In: Goldstein, D.B. and Schlötterer, C. (eds). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford: Oxford University Press. p. 49-65

27. Excoffier L., Smouse P. E., Quattro J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491
28. Fischer S. (2002). How parasitoids use vibrational sounding and vision in multisensory location of their concealed pupal hosts. Dissertation ETH No. 14985, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich: 1-105
29. Franck P., Guérin F., Loiseau A., Sauphanor B. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci in the codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae). *Molecular Ecology Notes* 5: 99-102
30. Franck P., Reyes M., Olivares J., Sauphanor B. (2007). Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers. *Molecular Ecology* 16: 3554–3564
31. Franck P., Timm A. E. (2010). Population genetic structure of *Cydia pomonella*: a review and case study comparing spatiotemporal variation. *J. Appl. Entomol.* 134, 191-200
32. Fuentes-Contreras E., Espinoza J. L., Lavandero B., Ramírez C. C. (2008). Population genetic structure of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from apple orchards in central Chile. *J. Econ. Entomol.* 101 (1): 190-198
33. Führer E. (1975). Ueber die physiologische Spezifität des polyphagen Puppenparasiten *Pimpla turionellae* L. (Hym., Ichneumonidae) und ihre oekologischen Folgen. *Centralblatt für das gesamte Forstwesen* 92: 218-227
34. Garcia de Otazo J., Sio J., Tora R., Tora M. (1992). Peral. Control Integrado de Plagas y Enfermedades. *Agrolatino, Barcelona (Spain)*: 1-239
35. Geier P. W. (1963). The Life History of Codling Moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera:Tortricidae), in the Australian Capital Territory. *Australian Journal of Zoology*, 11 (3): 323-367

36. Gharekhani G. (2009). Modeling Population dynamics and dispersion of Codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae). PhD Thesis. Faculty of Agricultural Science, Hohenheim University, Hohenheim – Stuttgart: 1-104
37. Gonzalez D.C. (2007). *Cydia pomonella* (L.) behavior and responses to host volatiles. PhD Thesis. Universitat de Lleida, Department de Quimica, Lleida: 1-150
38. Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3. Lausanne University. Lausanne, Switzerland. Dostupno na: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (pristupljeno 11.04.2011. godine)
39. Gu H., Hughes J., Dorn S. (2006). Trade-off between mobility and fitness in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Ecological Entomology* 31: 68-74
40. Heldt H-W. (2005). *Plant Biochemistry*. Elsevier Academic Press, USA: 82-315
41. Henaut A. (1990). Study of the sound produced by *Pimpla instigator* (Hymenoptera, Ichneumonidae) during host selection. *Entomophaga* 35: 127-139
42. Hoy M.A. (2003). *Insect Molecular Genetics, An Introduction to Principles and Applications*, Second Edition, Academic Press, Elsevier Science, USA: 75-530
43. Igrc Barčić J., Maceljski M. (2001). Ekološki prihvatljiva zaštita bilja od štetnika. Zrinski, Čakovec: 85-158
44. Ioriatti C., Saphanor B., Cainelli R., Rizzi C., Tasin M. (2000). *Cydia pomonella* L.: Primo caso di resistenza a difl ubenzuron in Trentino. *Atti Giornate Fitopatologiche* 1: 319-325
45. Ioriatti C., Charmillot P. J., Forno F., Mattedi L., Pasquier D., Rizzi C. (2005). Control of codling moth *Cydia pomonella* L. using insecticides: field efficacy in relation to the susceptibility of the insect. *IOBC WPRS Bull.* 28: 259-264

46. Ioriatti C., Tasin M., Charmillot P. J., Reyes M., Sauphanor B. (2007). Early detection of resistance to tebufenozide in field populations of *Cydia pomonella* L.: methods and mechanisms. *Journal of Applied Entomology* 131 (7): 453-459
47. Jackson D. J. (1937). Host-selection in *Pimpla examinator* F. (Hymenoptera). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London* 12: 81-91
48. Jašić M. (2010). Etilen i ostali biljni hormoni u procesima zrenja i dozrijevanja. Dostupno na: <http://www.tehnologijahrane.com/tehnologijavoca/etilen-i-ostali-biljni-hormoni-u-procesima-zrenja-i-dozrijevanja> (pristupljeno 11.04.2011. godine)
49. Judd G.J.R., Gardiner M.G.T. (2005). Towards eradication of codling moth in British Columbia by complimentary actions of mating disruption, tree banding and sterile insect technique: Five-year study in organic orchards. *Crop Protection* 24: 718–733
50. Keil, S., Gu, H., Dorn, S. (2001). Response of *Cydia pomonella* to selection on mobility: laboratory evaluation and field verification. *Ecol. Entomol.* 26: 495-501
51. Kimura M., Ohta T. (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2868-2872
52. Kolarov J. (2008). A Catalogue of the [former] Yugoslavian Ichneumonidae (Hymenoptera; Insecta). *Linzer biol. Beitr.* 40 (2): 1585-1739
53. Kovačević Ž. (1947). Bolesti i štetnici u voćnjacima i vinogradima. II. Dopunjeno izdanje, Hrvatska Seljačka Tiskara, Zagreb: 106-110
54. Kovačević Ž. (1952). Primijenjena entomologija. II. Knjiga Poljoprivredni štetnici, Sveučilište Zagreb, Zagreb: 312-319
55. Kumar Jain S., Neekhra B., Pandey D., Jain K. (2010). RAPD marker system in insect study: A review. *Indian Journal of Biotechnology.* 9: 7-12

56. Lacey L. A., Unruh T. R., Headrick H. L. (2003). Interactions of two idiobiont parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae) of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 230–239
57. Lacey L. A., Unruh T. R. (2005). Biological control of codling moth (*Cydia pomonella*, Lepidoptera: Tortricidae) and its role in integrated pest management, with emphasis on entomopathogens. *Vedalia* 12 (1): 33-60
58. Lacey L. A., Thomson D., Vincent C., Arthurs S. P. (2008). Codling moth granulovirus: a comprehensive review. *Biocontrol Science and Technology* 18(7): 639-663
59. Luikart G., Allendorf F.W., Cornuet J.M., Sherwin W.B. (1999). Distortion of Allele Frequency Distributions Provides a Test for Recent Population Bottlenecks. *J. Hered.* 89: 238-247
60. Maceljski M. (2002). Poljoprivredna entomologija. II. Izdanje, Zrinski, Čakovec: 302-309
61. Mani E., Riggenbach W., Schwaller F. (1986). Bedeutung von *Pimpla* (*Coccygomimus*) *turionellae* L. als Parasit des Apfelwicklers (*Cydia pomonella* L.) in der Ostschweiz. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 59: 297-301
62. Meyer N.F. (1925). Zur Biologie und Morphologie von *Pimpla examinator* Fabr. (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* X(1): 203-212
63. Monteiro L. B., Dor C., Franck P., Lavigne C., Sauphanor B. (2008). Pest management practices and environment factors affect natural regulation of the codling moth. *Proceedings of the 7th International Conference on Integrated Fruit Production, Avignon (France)*: 248-251

64. Oštrec Lj., Gotlin Čuljak T. (2005). Opća entomologija, Zrinski, Čakovec: 113-122
65. Otten H. (2000). Vibrational sounding: a sophisticated host-searching strategy of the pupal parasitoid *Pimpla turionellae*. Dissertation ETH No. 13588, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich: 3-4
66. Pajač I., Barić B., Šimon S., Mikac K. M., Pejić I. (2011). An initial examination of the population genetic structure of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in Croatian apple orchards. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 9 (3&4): 459-464
67. Pasquier D., Charmillot P.-J. (2003). Effectiveness of twelve insecticides applied topically to diapausing larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Pest Manag. Sci.* 60: 305-308
68. Peakall R., Smouse P.E. (2006). GenAlEx (version-6.2): population genetics software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288-295
69. Rafoss T., Sæthre M. G. (2003). Spatial and temporal distribution of bioclimatic potential for the Codling moth and the Colorado potato beetle in Norway: model predictions versus climate and field data from the 1990s. *Agricultural and Forest Entomology* 5: 75–86
70. Raymond M., Rousset F. (1995). Genepop (version-1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248- 249
71. Reuveny H., Cohen E. (2004). Resistance of the codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lep., Tortricidae) to pesticides in Israel. *J. Appl. Entomol.* 128 (9/10) doi: 10.1111/j.1439-0418.2004.00901.645–651
72. Reyes M., Franck P., Charmillot P.-J., Ioriatti C., Olivares J., Pasqualini E., Sauphanor B. (2007). Diversity of insecticide resistance mechanisms and

- spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Manag. Sci.* 63 (9): 890-902
73. Rice W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225
74. Rota J., Brown J. W. (2009). A new genus and species of Grapholitini (Lepidoptera, Tortricidae) from Florida, U.S.A. *ZooKeys* 23: 39-46
75. Shel'deshova G.G. (1967). Ecological factors determining distribution of the codling moth *Laspeyresia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae) in the northern and southern hemispheres. *Entomology Review* 46: 349–359
76. Sauphanor B., Bouvier J.-C. (1995). Cross resistance between benzoylureas and benzoylhydrazines in the codling moth, *Cydia pomonella* L. *Pestic. Sci.* 45: 369-375
77. Sauphanor B., Bouvier J.C., Brosse V. (1998). Spectrum of insecticide resistance in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in South-eastern France. *J. Econ. Entomol.* 91 (6): 1225-1231
78. Sauphanor B., Bouvier J. C., Brosse V. (1999). Effect of an ecdysteroid agonist, tebufenozide, on the completion of diapause in susceptible and resistant strains of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.* 90: 157-165
79. Sauphanor B., Brosse V., Bouvier J.-C., Speich P., Micoud A., Martinet C. (2000). Monitoring resistance to diflubenzuron and deltamethrin in French codling moth populations (*Cydia pomonella*). *Pest Management Science* 56: 74-82
80. Schumacher P., Weyeneth A., Weber D.C., Dorn S. (1997a). Long flights in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) measured by a flight mill: influence on sex, mated status and age. *Physiological Entomology* 22: 149-160

81. Schumacher P., Weber D.C., Hagger C., Dorn S. (1997b). Heritability of flight distance for *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85: 169-175
82. Stará J., Nadřová K., Kocourek F. (2006). Insecticide resistance in the codling moth (*Cydia pomonella*). *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14(3): 99-106
83. Šatović Z. (1999). Genetski biljezi i njihova uporaba u biljnoj genetici, oplemenjivanju i sjemenarstvu. *Sjemenarstvo: genetika, oplemenjivanje bilja, cvjećarstvo i rasadničarstvo* 16: 73-95
84. Statistički ljetopis Republike Hrvatske (2010). Proizvodnja voća u 2009. godini. Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, Zagreb
85. Tautz D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471
86. Thaler R., Brandstätter A., Meraner A., Chabicovski M., Parson W., Zelger R., Dalla Via J., Dallinger R. (2008). Molecular phylogeny and population structure of the codling moth (*Cydia pomonella*) in Central Europe: II. AFLP analysis reflects human-aided local adaptation of a global pest species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 838–849
87. Thistlewood H., Judd G. (2003). Area-wide management of codling moth, *Cydia pomonella*, at very low densities. *IOBC wprs Bull.* 26 (11): 103-110
88. Timm A. E., Geertsema H., Warnich L. (2006). Gene flow among *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) geographic and host populations in South Africa. *J. Econ. Entomol.* 99 (2): 341-348
89. Tuzin S. i Bent E. (2006). *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer, USA: 20-521

90. Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Willis D.P.M., Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotype errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4: 535-538
91. Wäckers F.L., Björnson A., Dorn S. (1996). A comparison of flowering herbs with respect to their nectar accessibility for the parasitoid *Pimpla turionellae*. *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society* 7: 177-182
92. Wäckers F.L., Mitter E., Dorn S. (1998). Vibrational sounding by the pupal parasitoid *Pimpla (Coccygomimus) turionellae*: an additional solution to the reliability-detectability problem. *Biological Control* 11: 141-146
93. Wearing C.H., Hansen J.D., Whyte C., Miller C.E., Brown J. (2001). The potential for spread of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) via commercial sweet cherry fruit: a critical review and risk assessment. *Crop Protection* 20: 465-488
94. Weber J. L., May P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44: 388-396
95. Weir B.S., Cockerham C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370
96. Wildbolz Th. (1962). Über die Möglichkeit der Prognose und der Befallsüberwachung und über Toleranzgrenzen bei der integrierten Schadlingsbekämpfung im Obstbau. *Entomophaga* 7: 273-83
97. Worner S.P. (1991). Use of models an applied entomology: The need for perspective. *Environmental Entomology* 20: 768–773

98. Worner S.P. (1992). Performance of phenological models under variable temperature regimes: consequences of the Kaufmann or rate summation effect. *Environmental Entomology* 21: 689–699

99. Zhou Y., Gu H., Dorn S. (2005). Isolation of microsatellite loci in the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Molecular Ecology Notes* 5: 226-227

9. PRILOZI

Prilog 1a. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Beloslavec); (a) 2008; (b) 2009; (c) 2010

Prilog 1b. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Kloštar Ivanić); (a) 1997; (b) 1998; (c) 1999

Prilog 1c. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Kloštar Ivanić); (a) 2008; (b) 2009; (c) 2010

Prilog 1d. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Nedelišće); (a) 1993; (b) 1997; (c) 1998; (d) 1999

Prilog 1e. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Nedelišće); (a) 2008; (b) 2009; (c) 2010

Prilog 2a. Srednje dnevne temp. zraka (Beloslavec, 2008. godina)

Prilog 2b. Srednje dnevne temp. zraka (Beloslavec, 2009. godina)

Prilog 2c. Srednje dnevne temp. zraka (Beloslavec, 2010. godina)

Prilog 2d. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 1997. godina)

Prilog 2e. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 1998. godina)

Prilog 2f. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 1999. godina)

Prilog 2g. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 2008. godina)

Prilog 2h. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 2009. godina)

Prilog 2i. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 2010. godina)

Prilog 2j. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 1993. godina)

Prilog 2k. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 1997. godina)

Prilog 2l. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 1998. godina)

Prilog 2m. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 1999. godina)

Prilog 2n. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 2008. godina)

Prilog 2o. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 2009. godina)

Prilog 2p. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 2010. godina)

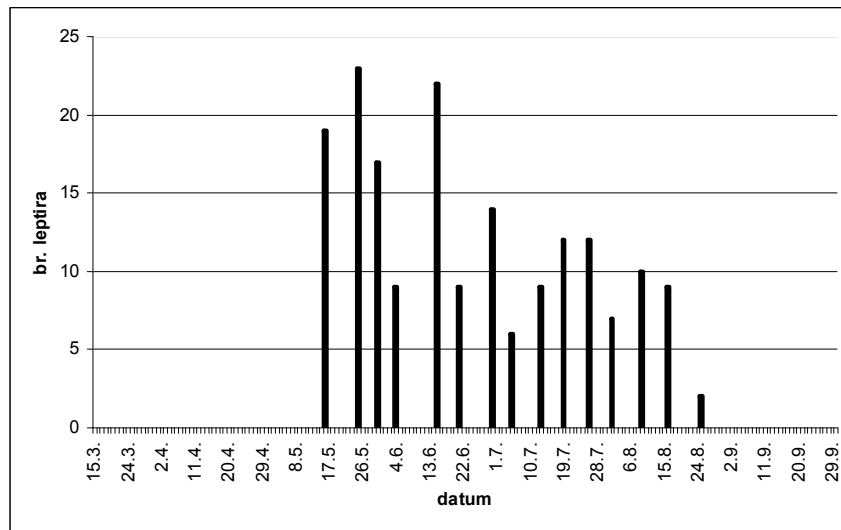
Prilog 3a. Godišnji ulov odraslih leptira u veg. sezonama 2008., 2009. i 2010. godine u voćnjaku Beloslavec

Prilog 3b. Godišnji ulov odraslih leptira u veg. sezonama 1997., 1998. i 1999. godine u voćnjaku Kloštar Ivanić

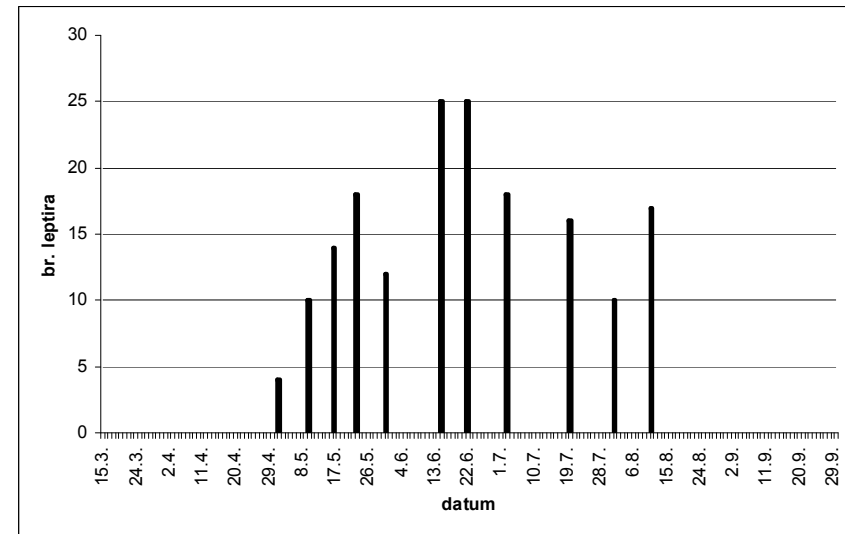
Prilog 3c. Godišnji ulov odraslih leptira u veg. sezonama 2008., 2009. i 2010. godine u voćnjaku Kloštar Ivanić

Prilog 3d. Godišnji ulov odraslih leptira u veg. sezonama 1993., 1997., 1998. i 1999. godine u voćnjaku Nedelišće

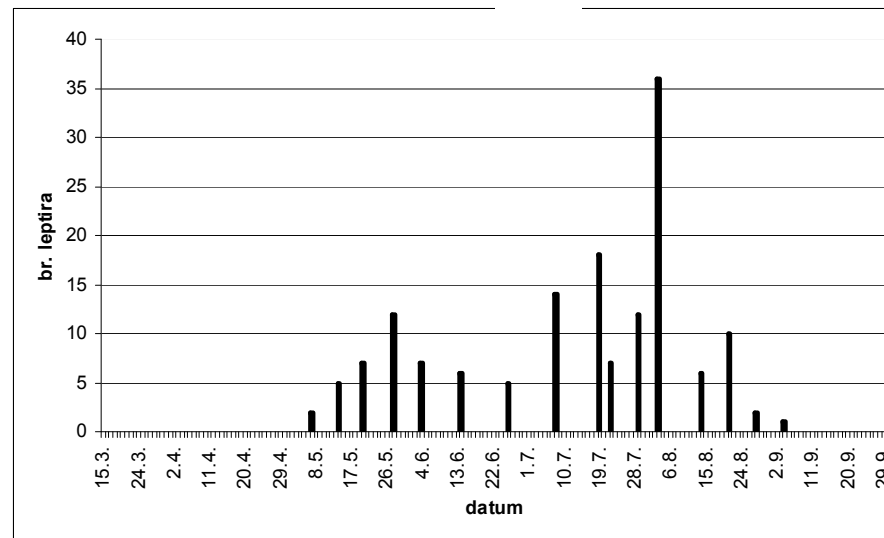
Prilog 3e. Godišnji ulov odraslih leptira u veg. sezonama 2008., 2009. i 2010. godine u voćnjaku Nedelišće



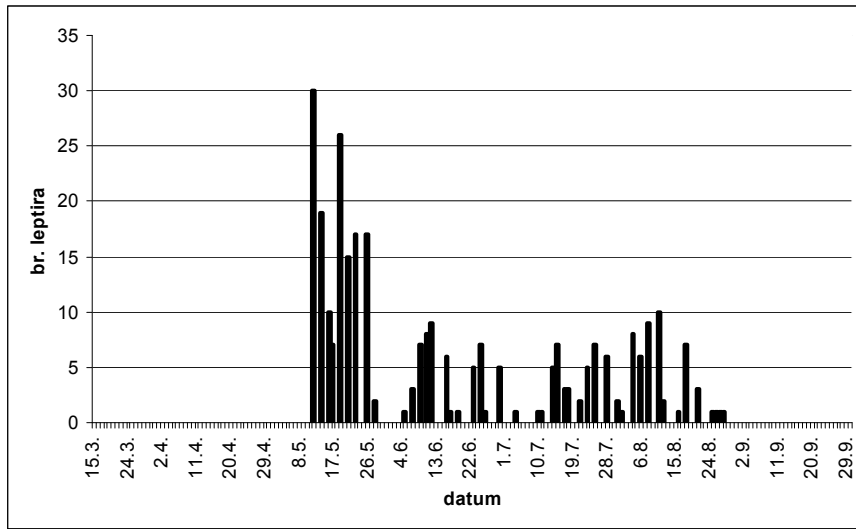
(a)



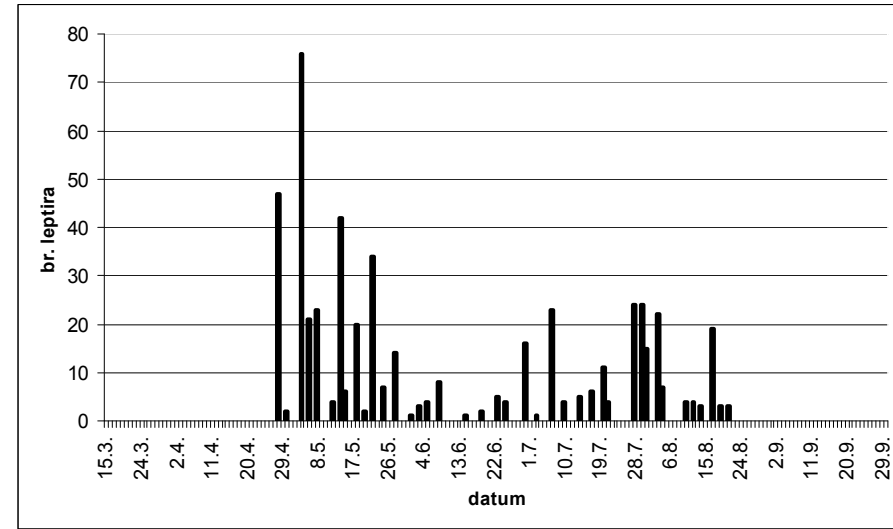
(b)



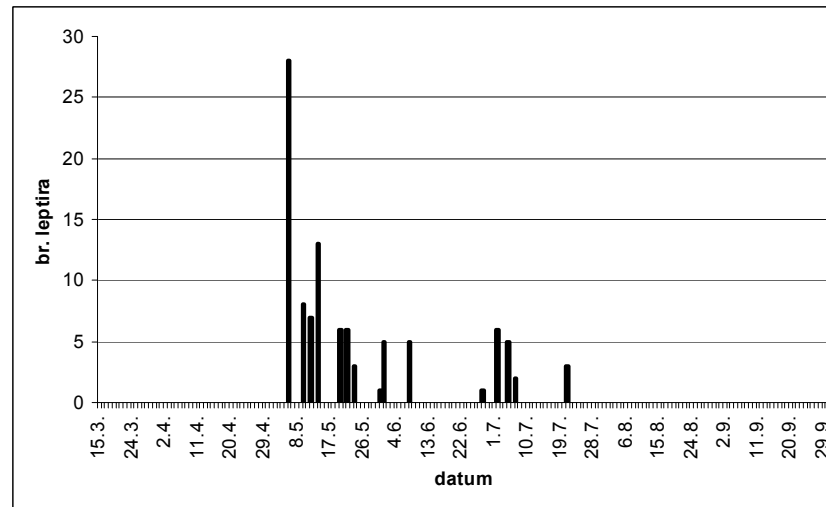
(c)



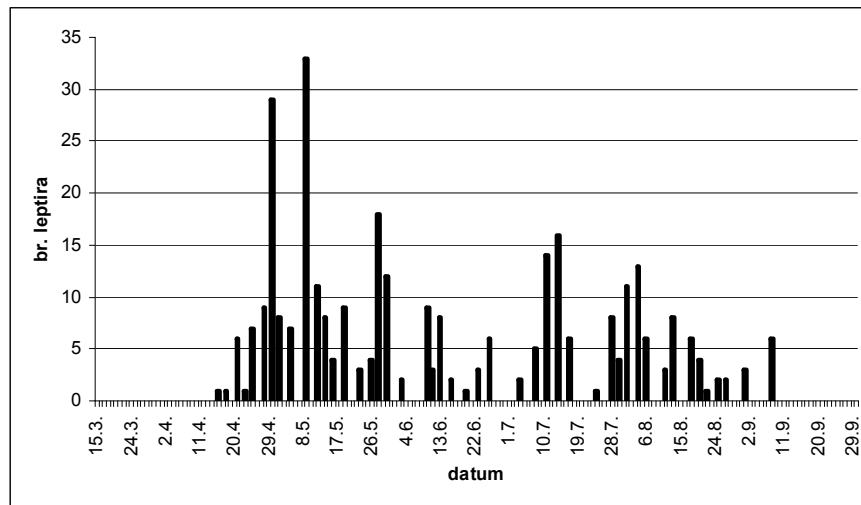
(a)



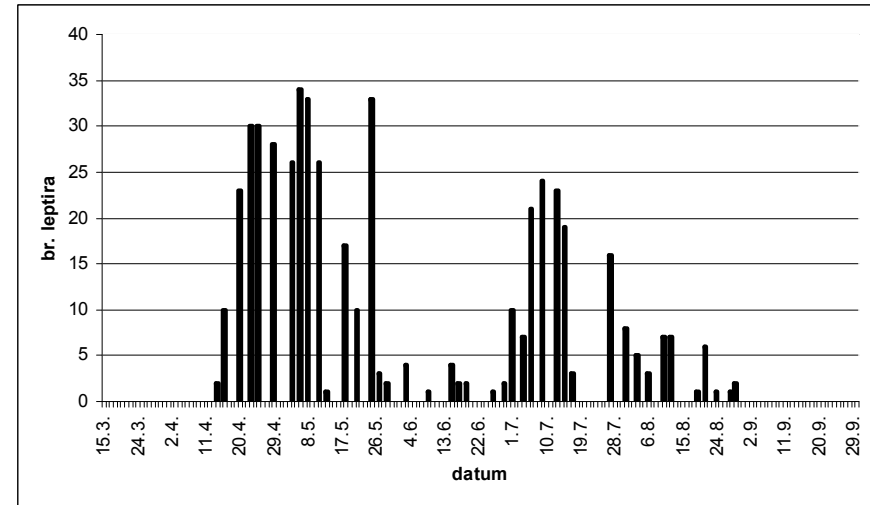
(b)



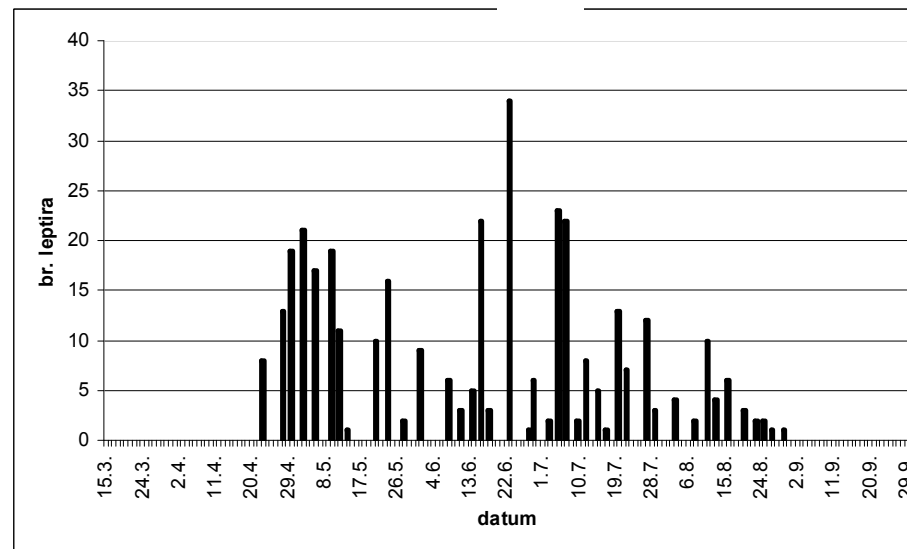
(c)



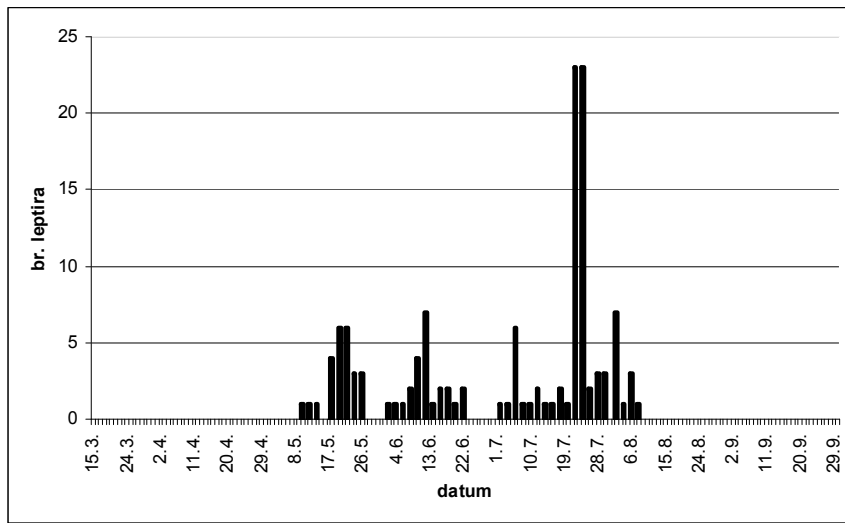
(a)



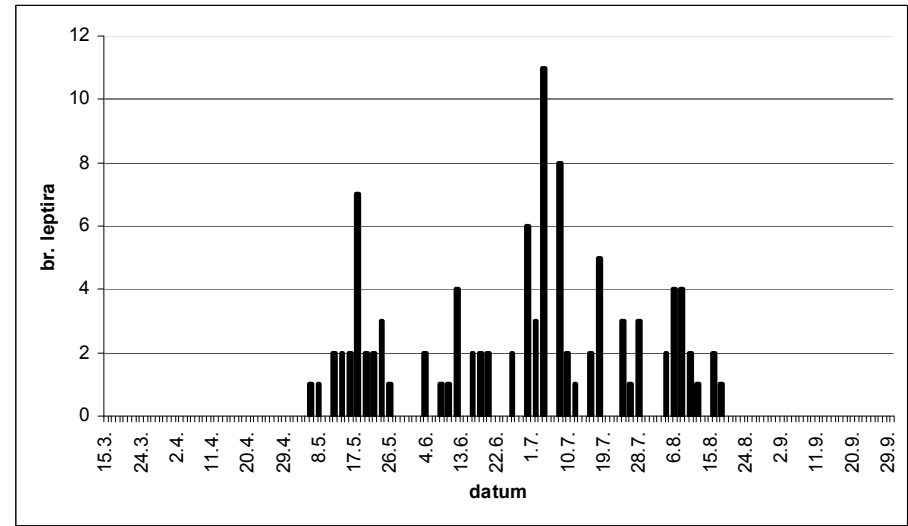
(b)



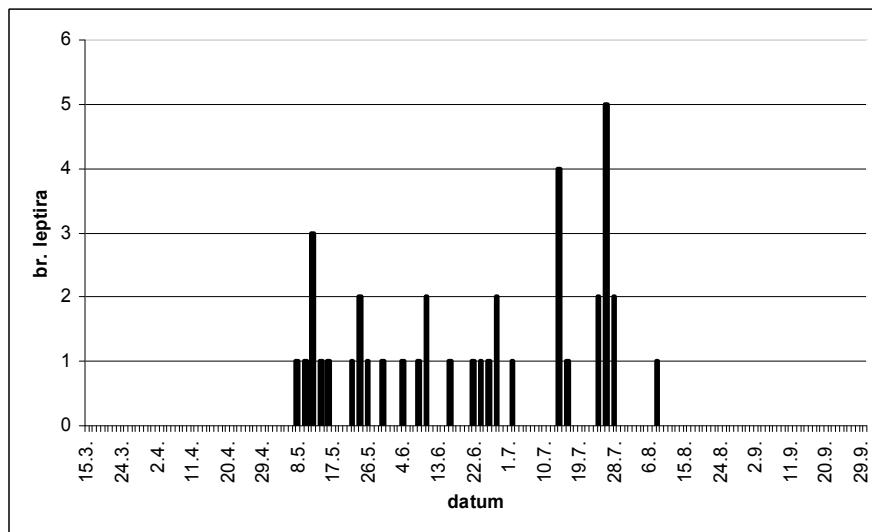
(c)



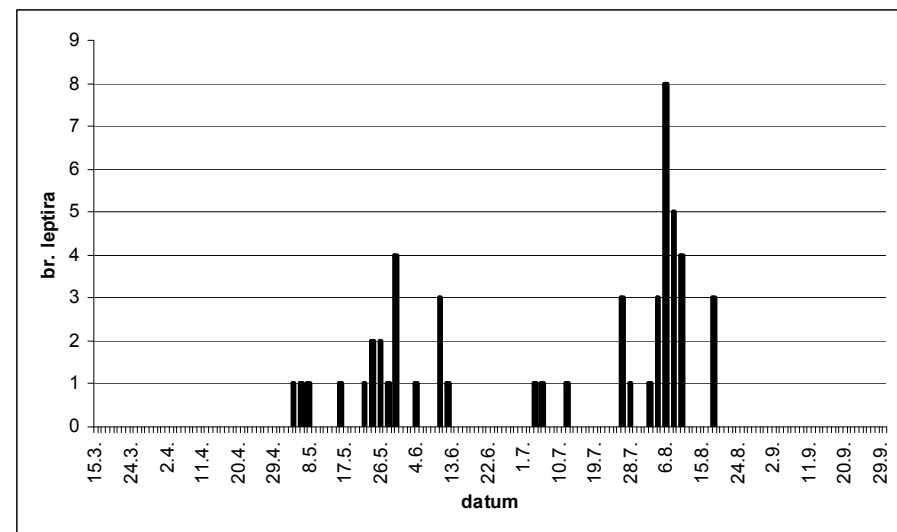
(a)



(b)

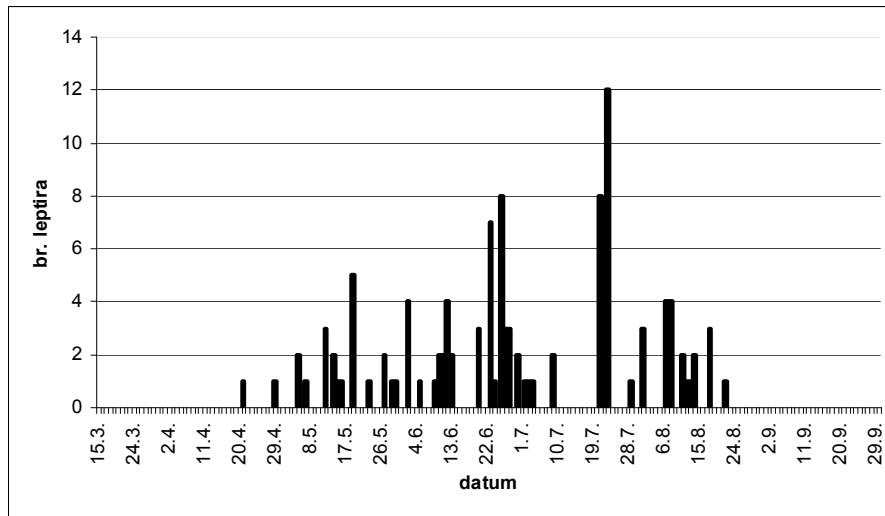


(c)

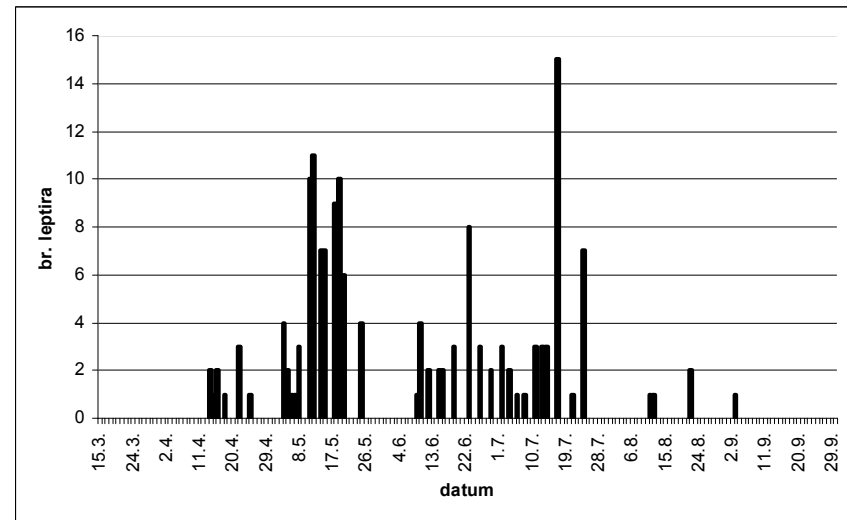


(d)

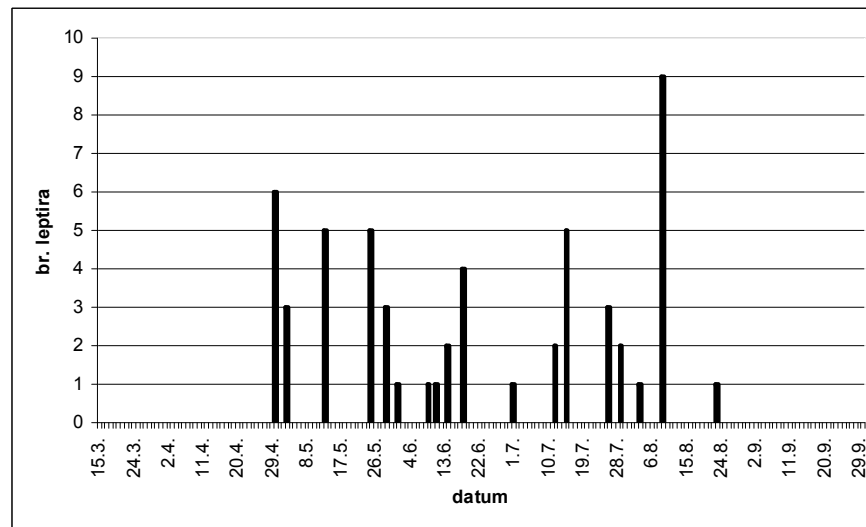
Prilog 1d. Dinamika leta leptira jabukova savijača (Nedelišće); (a) 1993; (b) 1997; (c) 1998; (d) 1999



(a)



(b)



(c)

Prilog 2a. Srednje dnevne temp. zraka (Beloslavec, 2008. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1		-1,2	5,8	11,5	12,4	13,4	22,2	23,4	25,7	17,6	15,4	14,1
2		-1,5	5,6	11,6	7,7	14,8	23	24,5	23,5	20,1	15,8	14,8	4,9
3		-3,2	4	13,7	9,1	15	20	25,1	24	22,7	12,9	12,2	4,7
4		-5,4	5,9	4,4	9,5	15,2	18,3	22,3	24,8	22,6	9,4	15,6	1,9
5		-3,6	7,3	2,1	8,6	13,2	17,2	20,6	22	23,1	11,3	14,4	8,5
6		0,5	4	1,6	10,6	13,5	16,8	24,1	21,6	24,4	14,5	13,4	5,4
7		0,6	6	2,7	9,2	13,6	16,7	26	22,8	23,2	14	12,7	4,3
8		-1,5	4,9	4,3	7,6	13,6	17,1	17,1	19,2	18,9	14,2	13,2	2,8
9		-1,8	4,6	7	14	15,5	19	19	18,8	19	16,4	11,7	1,3
10		-1,5	4,1	10	15,4	15,8	21,1	22	19	19,6	15,7	7,9	5,2
11		1,2	1,3	8,2	16	14,7	19,4	25,4	20,1	21	14	7,8	6,7
12		6,7	-0,3	10,2	9,4	16,1	17,4	25,5	22,9	19,9	12,6	7,7	3,4
13		5,4	-0,3	9,6	10,1	17,2	14,2	23,8	25,2	13	11,9	8,6	3,6
14		4,9	0	10,4	10,7	18,2	13,1	17,2	23,7	9,3	12,9	8,5	5
15		2,4	0,4	10	11,1	19,6	15,8	18,6	26,1	10,1	15,1	8,7	3,6
16		6,8	-1,7	12,4	10,2	19,2	16,4	22	15,5	9,5	15,7	6,3	5,6
17		6,9	-4,1	10,4	10,5	18,8	18,3	20,7	17,4	10,9	7,7	4,6	5,2
18		4,2	2,3	1,4	12	17,1	17,2	15,7	19,9	10,3	6,8	2	3,4
19		4,9	3,6	2,5	14,6	17,1	20,8	20,9	20,5	11	9	3,9	3,8
20		5,1	5,8	3,2	14,7	11	23,1	23,2	21,5	11,2	11,3	8,2	3,1
21		6,7	7,2	5,4	13,4	12,8	24,2	15,8	22,1	10,7	12,4	9,2	4,3
22		6,7	9	3,6	12,9	14,6	26,1	15,8	22,7	10,8	14,4	2,6	4,8
23		1,6	8,5	3,8	10,4	16	25,7	14,3	18,7	11,4	10,2	0,5	3,8
24		1,6	11,1	2,4	10,9	18	22,9	18,3	16,2	12,8	8,7	2,6	4
25		1,4	14,6	3,2	11,7	20	25,4	20,4	16,4	11,5	8,2	2,8	1
26		1,6	12	4,6	12,2	23,2	26,2	23	18,7	11,1	8,2	1,4	-0,9
27		4,4	11,6	8	13,2	23,8	22	24,4	21,2	11,9	9,5	-0,4	-0,6
28		5	8,4	10,4	13,9	26,8	21,4	23,7	21,8	11,3	14,7	0,1	-3,5
29		3,1	10,5	8,8	10,4	21,8	24,1	23,5	21,4	10,8	17,9	1,8	-3,5
30		1,5		9,2	13,6	21,9	22,4	23,2	18,7	12,8	12,2	4,2	-3,9
31		4,2		10,6		21,2		24,8	18,3		13,2		-4,9

Prilog 2b. Srednje dnevne temp. zraka (Beloslavec, 2009. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	-4,8	-0,6	9,4	11	16,6	15,2	22,4	26	21	19,5	3,2	9,5
2	-2,9	1,2	7,6	14,8	12,4	16,1	22,6	26,9	22,3	13,6	4,7	3,6	
3	-3,6	2,2	6,9	13,4	14,2	19,9	22	25,9	24	12,6	1	2,3	
4	-6,2	3,2	7,7	16,8	15	13	22,7	19,4	17,5	13,6	3	4,5	
5	-6,4	8,4	8	17	13,2	15,2	21,6	21	15,1	15,5	5,4	3,9	
6	-6,4	9,8	7,8	17,8	15,3	22,4	21,6	21,9	17,4	20,8	5,3	2,6	
7	-5	8,9	8	18,4	17,7	19,1	19,6	22,5	16,8	19,6	6,9	2,2	
8	-3,5	5,8	9,6	18,5	19,3	20,7	14,8	23,5	18	19,7	6,4	6,3	
9	-7,2	3,9	5,2	16,8	20	22,3	19,6	23,2	18,8	17	7,8	7,2	
10	-9,1	4,6	7	17,4	20,5	21,9	14,7	23,8	20,6	16,1	6,9	6,3	
11	-7,8	3,6	7,5	18,4	21,4	18,4	18,4	21,5	19,2	15	7,2	5,3	
12	-7,6	1,8	5	16,6	20,3	17,4	20,4	21,9	19,3	10,1	5,8	1,5	
13	-8	0,6	8,4	14,4	13,4	18,3	22,3	23,8	17,3	8,1	10,7	-0,6	
14	-3,4	1,8	9,2	13,5	16,8	22,4	25,9	19,5	16,4	6,6	12,6	-2,2	
15	-1	-1,4	9,1	15,5	16,7	25,4	26,7	21,6	18,9	6,4	11,4	-2,2	
16	-1,6	-0,7	8,4	15,4	17,5	23,5	26,4	23,2	20,6	6,4	13,7	-3,6	
17	-4,8	0,4	7,2	14,7	21,3	19,2	26,5	24,1	20,1	7,4	13	-5,4	
18	1,1	-2	7,2	14,6	24	21,5	18	24,9	18,3	5,6	12	-7,2	
19	4,2	-2,5	2,4	13,8	21,9	24,2	18,1	24,7	19,2	6	10	-8,4	
20	6,8	0	2,4	15	19,6	13,8	20,4	23,8	20,8	6,6	6,9	-9,8	
21	5,6	1,2	2,9	15,5	21,2	17,2	23,1	24,4	19,9	10,7	7	-4,7	
22	2,8	-0,7	7,5	14,6	21,8	12,9	24,5	22,5	19,4	14,3	7,1	3,4	
23	2,5	2	10,2	10,4	21,1	14,4	27,2	20	18,8	11,4	8,5	11,2	
24	3,2	0,6	4,3	13,2	21,4	17,3	26,4	19,6	20,1	10,9	11	12,5	
25	4,1	1,7	4,2	15,3	24,2	19	19,8	20,8	18,8	12,4	8,9	12,1	
26	4,9	3,3	5,3	15,4	24,7	20	19,6	23,2	18,1	12,6	11	6,4	
27	1,8	6,3	8,6	16,6	15,5	19,8	21	24,6	18,9	11,6	11,7	2,9	
28	1,6	7	12,6	13,7	16,2	20	22,4	25,6	18,5	10,7	6,6	-0,2	
29	1,2		10,9	11,9	10,8	20,2	23,4	17,1	17,8	10,7	7,4	2,9	
30	0,2		9,3	12,1	9,8	23	25,5	17	17,9	6,6	13	6,3	
31	-0,2		8,4		12,3		24,6	18,8		4,1		8,8	

Prilog 2c. Srednje dnevne temp. zraka (Beloslavec, 2010. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	5,7	-4,4	11,2	11,9	19,3	13,5	24,8	21,6	15,6	11,2	15,1	-1,1
2	3,4	-3,9	5,0	7,6	15,8	12,1	25,4	22,7	14,4	13,0	12,8	-0,1	
3	0,5	2,3	4,7	11,6	17,2	13,9	25,6	21,5	16,0	13,4	11,1	0,2	
4	-1,9	4,3	1,5	12,0	16,5	14,9	23,7	18,8	17,0	14,3	11,8	-2,6	
5	-1,6	4,1	-0,5	7,6	15,2	19,0	22,8	18,8	14,4	15,3	13,8	-2,0	
6	-1,2	-0,6	0,0	9,8	14,4	20,0	21,0	17,0	11,2	10,8	11,9	8,4	
7	0,0	-3,5	-1,8	10,0	14,1	21,9	18,6	19,0	11,6	11,0	12,0	12,2	
8	0,4	-4,7	-1,9	12,3	12,1	23,3	20,2	20,4	15,5	10,2	11,0	15,1	
9	1,0	-4,6	-0,1	15,0	15,5	23,5	21,9	19,8	17,8	8,0	9,0	2,0	
10	1,0	-2,0	-2,4	12,0	16,0	24,5	23,3	21,6	15,9	7,7	10,2	-2,8	
11	0,4	-1,5	-0,8	7,0	16,4	27,2	24,9	22,4	16,0	9,2	10,4	-3,1	
12	-0,7	-1,3	1,7	6,0	17,2	27,8	25,8	22,7	16,2	9,2	11,1	-3,1	
13	-0,6	0,2	4,2	7,8	13,1	24,7	24,8	22,7	17,2	12,0	13,4	-1,8	
14	-0,4	-0,4	6,0	8,7	14,8	22,4	26,7	23,2	16,6	11,0	14,2	-4,6	
15	0,2	-0,3	2,8	10,4	10,2	22,0	26,9	22,3	17,5	8,6	14,8	-3,8	
16	-0,3	-1,2	4,8	11,6	8,9	18,8	28,0	21,3	17,8	10,4	13,2	-5,1	
17	-1,3	1,7	7,7	11,3	11,9	18,6	28,9	20,5	14,1	7,8	10,3	-5,0	
18	-0,7	3,6	10,4	11,4	12,3	20,0	21,1	20,5	11,7	7,2	9,0	-5,9	
19	0,8	5,4	11,0	11,4	13,0	17,2	21,4	22,5	12,4	7,2	9,1	-6,6	
20	0,5	3,4	11,8	17,2	11,7	14,9	22,1	23,2	12,2	5,2	7,2	0,6	
21	-2,9	2,7	13,6	13,7	14,4	13,1	24,8	21,6	13,7	5,4	7,8	4,4	
22	-3,8	5,0	10,3	7,0	17,4	17,2	26,4	21,9	14,3	3,4	8,9	7,2	
23	-5,0	7,2	10,5	12,7	18,3	18,2	27,3	23,3	15,8	8,8	6,2	8,8	
24	-4,3	8,8	12,0	15,0	19,4	18,4	17,4	22,1	16,0	12,0	4,0	10,5	
25	-4,0	10,4	12,0	17,3	22,3	18,5	15,9	18,0	15,2	6,6	-0,9	1,8	
26	-6,4	6,9	15,2	18,0	20,3	18,3	17,3	21,6	12,3	5,9	-0,1	-2,0	
27	-6,3	8,9	8,1	17,8	22,4	21,5	16,7	23,2	12,8	5,1	1,0	-3,7	
28	-7,5	9,8	11,1	15,6	20,2	22,2	21,2	16,9	13,8	5,1	0,4	-4,5	
29	-3,4		14,4	16,5	19,9	24,2	19,6	14,8	12,3	6,4	3,9	-3,4	
30	0,2		14,2	21,2	18,2	24,9	15,0	11,8	11,1	9,8	1,5	-3,0	
31	-0,8		10,2		11,9		18,3	13,2		11,8		-5,6	

Prilog 2d. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 1997. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	-8,2	-1,7	6	8,8	13,4	13,2	19	13,6	19	11,9	3,7	6,5
2	-6	-2,4	8,5	12,7	15,5	10,9	20,4	17,8	20	18,2	2	6,4	
3	-3	-2,8	9,4	12,7	19	15,4	20,9	20,2	21,9	11,5	3,4	6,1	
4	-1,7	-2,2	5,6	7,5	20,8	16,3	23,8	20,4	21,7	11,1	3	3,8	
5	-0,3	5,2	6,3	5,4	17,7	17,6	21	23,4	20,1	14,1	4	1,1	
6	0,6	3	7,8	7,2	20,8	17,3	18,1	20,1	22,1	16,1	15,1	1,6	
7	-1,5	1,2	7,5	3,3	15,3	18,1	16,7	20,1	20,8	19,6	19	0	
8	-1	2,1	5,7	4,6	13,6	20,4	17	21,8	17,6	18,4	15,3	-0,8	
9	-0,5	2	5,9	4,6	14,8	20,1	20,6	21,6	20,2	20,2	14,4	-0,6	
10	-0,2	2,9	9,6	9,1	16	20,9	22,4	20,4	16,2	19,8	11,5	1,4	
11	-0,2	7,9	4,8	14,8	17,2	22,1	20	20,2	15,1	11,3	11,3	9,2	
12	-0,3	9,4	4,6	6,5	20,3	23,4	19,4	21	20	10,4	12,1	7,4	
13	-0,2	11,1	8,4	3,2	20,7	22,9	19,3	20,6	22,2	8,9	8,4	4,9	
14	0,6	5,8	8	6,8	20,9	22,9	21,4	20,5	13,9	6,7	7,6	4,7	
15	1,1	6,3	10,5	4,6	19,8	19,4	17,9	22,2	12,7	6,6	5,3	0	
16	0	3,6	9,8	1,2	21,2	21,8	18,9	21,7	12,2	8,8	2,9	-3,5	
17	-0,8	-0,1	5,8	4,2	21	20,1	20,6	22,4	13,6	7,9	3,8	-5,4	
18	-2,2	0,2	2,2	10,8	22,1	17,6	17,5	21,6	14	9,3	2,4	-3,2	
19	-2	4,4	3,1	11,6	21,9	18,5	18,8	19,4	14,6	5,8	0,3	-0,8	
20	1,1	6,5	3,8	3	22,2	18,3	18,8	18,8	11,2	5	-1,6	0,9	
21	0,8	8,9	3,4	2,3	16,5	20,2	19	20,1	11,6	5,4	-0,8	3,5	
22	0,3	10,7	3,8	4,2	12,9	23,8	22,3	20,4	10,8	6,1	1,8	4,1	
23	0,2	10,1	3	6,1	16,2	14,8	23,4	18,6	11,8	6,4	1,8	4	
24	0,6	10,6	4	8,6	15,9	16,2	23,4	19,5	12,2	7,8	3	3,9	
25	0,6	13	5,8	8,6	12,6	16,1	21	20,4	12,6	2,1	3,4	4,5	
26	-1,2	12,6	4,8	11,8	11,3	18,1	19,3	21,8	13,3	4,3	4,6	9,4	
27	-1,2	7,2	7,8	12	14,4	23,6	20,8	22,5	14,3	1,5	5,2	5,6	
28	-1,5	3,5	8,3	11,2	9,1	24,1	21,4	22,4	14,8	0,6	5,8	3,2	
29	-3,2		6,2	11,6	11	26	20,5	15,4	13,2	-0,6	6,7	2,8	
30	-1		5,3	12,4	12,4	21,4	19,3	16,6	14,3	1,8	7,2	-0,8	
31	-3		7,2		9,8		22,2	19,6		2,6		6,2	

Prilog 2e. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 1998. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	9,0	-4,0	2,4	14,6	14,8	19,4	24,0	24,4	17,5	16,8	12,4	0,6
2	9,0	-4,6	1,8	14,1	14,5	21,0	18,6	27,4	18,6	14,2	7,6	-0,6	
3	6,9	-0,6	8,9	15,2	13,2	22,4	20,0	27,7	19,6	12,7	13,7	-0,6	
4	7,2	0,0	12,8	16,4	12,0	22,6	18,8	26,1	16,1	12,4	16,5	-1,4	
5	5,0	-1,3	9,1	18,7	10,8	24,2	17,9	21,8	17,5	14,1	5,0	-1,8	
6	8,0	0,2	4,4	12,5	13,2	26,2	20,7	19,6	20,1	17,8	3,5	-4,4	
7	7,9	0,8	11,0	13,5	15,4	25,8	21,0	20,8	19,4	15,5	4,0	-7,7	
8	7,6	-0,1	7,0	14,4	17,9	21,6	14,4	22,0	17,2	15,1	1,0	-7,6	
9	5,2	1,8	2,8	11,5	17,3	18,7	15,5	23,2	16,5	14,6	5,6	-9,2	
10	3,5	3,9	1,7	12,4	19,4	21,7	19,6	22,7	16,7	15,0	9,0	-7,6	
11	2,4	5,2	-0,9	13,5	18,0	16,6	19,6	22,6	20,1	14,6	8,4	-4,0	
12	-0,7	6,9	0,9	9,3	19,6	16,1	18,0	22,9	17,8	13,4	4,4	-4,2	
13	6,7	12,2	4,6	7,3	20,2	12,2	24,9	23,4	12,5	11,0	1,9	-1,4	
14	9,4	8,8	8,3	6,6	15,6	15,4	16,3	22,1	9,9	9,8	3,5	-0,3	
15	4,9	10,7	5,8	9,9	15,3	18,1	16,6	23,2	13,2	12,2	3,2	2,4	
16	6,1	14,1	4,5	8,7	11,6	16,9	19,0	24,1	15,3	13,5	2,0	-1,0	
17	4,7	8,5	2,9	10,7	10,8	14,8	19,9	23,6	12,0	15,1	-0,2	-0,4	
18	1,9	3,7	5,6	8,8	12,7	16,8	22,7	24,5	11,9	15,0	-2,7	-3,1	
19	6,4	6,8	6,6	10,6	12,6	17,2	24,0	21,4	13,0	9,9	-3,4	-3,8	
20	4,0	6,2	3,9	10,1	17,0	21,0	26,0	21,7	13,0	7,3	-2,2	-1,8	
21	1,4	10,2	2,2	14,0	16,8	23,3	25,2	23,0	14,6	6,2	-3,6	1,0	
22	2,0	12,0	1,5	10,9	13,0	22,8	25,0	18,4	14,1	7,6	-1,6	-1,6	
23	1,7	10,6	1,0	12,8	14,2	18,5	26,2	16,3	12,5	9,0	0,6	-3,8	
24	0,1	9,0	3,4	12,6	13,8	21,8	25,5	20,4	11,9	8,2	1,6	-7,6	
25	-0,2	9,5	3,6	12,9	11,5	22,6	24,6	17,1	15,5	7,3	0,5	-7,4	
26	-1,7	8,0	3,3	14,4	14,6	24,1	22,3	16,9	18,3	7,8	0,8	-9,5	
27	-3,0	8,3	6,8	17,3	18,7	24,5	26,6	16,4	17,8	8,0	0,9	-5,8	
28	-4,1	11,2	9,0	16,4	19,7	22,9	19,8	13,2	15,0	14,1	0,2	0,7	
29	-2,7		10,5	14,1	18,4	21,5	20,2	13,9	15,3	14,5	1,5	-2,1	
30	-1,4		10,5	14,7	20,4	24,4	23,6	12,7	16,5	6,7	2,1	-0,4	
31	-1,4		11,4		20,1		24,9	14,7		7,2		-2,0	

Prilog 2f. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 1999. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	-3,3	-3,6	7,6	12,4	15,7	21,9	22	19,8	17	14	10,6	-2
2	0	-1,8	10,8	11,3	15,8	23,2	22,2	20	13,4	16	12,7	3,8	
3	0,4	2,8	11	12,6	16,6	23,2	22,8	21	15,9	17	13	6,4	
4	0,2	3,4	13,7	12,7	16,7	22	23,9	20,6	16,4	9	10,6	10,8	
5	2	7	8,6	12,6	11,2	18,2	25,8	22,1	18	12,2	11,2	3,3	
6	-0,1	4,6	8,7	13,2	10,7	23,1	26,8	23,8	17,2	10,3	12,5	0,2	
7	6,2	4,4	6,3	12,9	10,3	21,2	19,6	23,9	18	7,5	9,6	1,5	
8	3	0,3	5	11,6	14,2	19	18,7	24,5	20	7,5	8	4,8	
9	1,8	0,6	9	9,7	15,3	18,8	18,3	26,4	20,1	9,6	6,6	10,3	
10	0	-2,3	11,1	10,1	16,7	20,8	20,2	24,1	20,8	13,4	6,5	8	
11	1,7	-3,3	10,2	11,1	18,5	17,2	21,2	20,1	19,5	12,7	5,2	5,4	
12	4,7	-2,6	8,6	11,8	16,2	18,4	21,8	19,1	20,9	12,5	6	5,4	
13	3,3	-2,9	9	9,9	17,7	18,6	23,4	16	19,4	13,4	5,8	3,9	
14	3,4	-2	6,7	12,6	18,2	18,8	21,9	17	18,5	11	2,4	3,7	
15	-0,2	-3,1	8	14,4	15,4	18,5	21	20,9	19,5	8	1,1	3,9	
16	5,1	0,2	4,5	10,6	12,9	20,6	20,4	23,4	20,5	5,5	1	0,3	
17	7,4	2,9	2,8	12,4	12,4	17,7	21	21	21,1	4,3	0,6	-0,3	
18	4,5	-0,2	3,3	5,3	13,6	19,4	21,8	22,2	18,1	4,7	0,4	3,7	
19	1,8	2,2	3,5	5,7	16,6	16,8	21,6	23,3	20,2	4,2	0	7,2	
20	0,6	7,2	5,5	6,6	17,1	21,5	24,2	21,3	21,5	5,2	-1,7	-0,2	
21	-0,4	4,5	7,2	11,4	15,7	16	23,1	18,2	17,3	8,3	-1,5	-1,2	
22	-0,8	3,5	8,1	13	15,1	11,6	19,6	16,9	18,9	7,5	-1,6	-3	
23	-1,7	1,8	6,6	11,6	14,7	15,6	17,6	16,2	20,9	10,2	-2,2	-5,7	
24	-2,8	3,7	8,3	12	15,8	14,5	18,8	17,5	20,6	16,1	-1,2	-7,4	
25	-2,7	2,1	12,3	12,6	16,8	18,9	18,9	17,5	21,2	19,1	1,3	-4,9	
26	-2,2	5	12,6	13,4	15,2	17,6	20,6	19,2	22,2	17	1,6	3,7	
27	0,7	10,4	12,1	13,7	18,6	21,2	22	18,4	17,8	12,1	-1,5	3,7	
28	1,4	7,7	9,6	14,3	20,1	19,9	21,9	20,4	19,1	9,9	-1,8	2,5	
29	-1,2		9,4	17,2	21,5	21,1	21,6	19,4	18,2	10,3	-1,5	2,3	
30	-5		9,8	16,7	20,2	21,9	19,6	14,3	20	7,8	-2,3	0,8	
31	-3,8		11,2		20,4		20,2	17,3		12,4		-0,1	

Prilog 2g. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 2008. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	-1,3	6,4	9,8	11,6	14,2	22,0	24,0	25,1	17,5	15,5	14,1	8,8
2	-1,6	6,4	12,0	8,7	13,8	22,8	24,8	23,1	19,7	16,9	14,8	6,8	
3	-2,8	4,2	13,0	9,2	14,4	19,6	25,4	23,2	22,2	14,3	12,9	5,4	
4	-4,5	7,5	4,8	9,8	13,2	19,0	22,4	25,2	23,0	9,5	15,3	2,9	
5	-2,7	6,8	3,3	8,7	13,9	18,4	21,0	22,5	23,2	9,8	14,4	10,0	
6	0,0	6,1	0,6	10,5	13,9	16,8	22,8	22,0	24,7	13,7	14,0	7,0	
7	1,2	4,8	2,7	10,7	13,6	17,7	25,6	22,0	24,3	13,4	13,9	3,8	
8	-0,9	3,0	4,3	9,3	14,0	17,7	18,8	20,7	19,2	13,7	13,2	2,4	
9	-1,0	3,8	7,6	14,0	14,6	19,3	19,4	19,6	19,2	15,2	12,2	3,4	
10	-1,8	4,2	9,7	15,8	14,8	20,8	22,2	18,9	19,0	15,1	8,1	4,9	
11	0,8	0,5	9,6	15,9	13,8	20,0	24,6	19,4	20,3	12,8	7,6	8,3	
12	9,1	0,6	12,0	10,0	15,4	17,9	25,3	23,0	20,8	13,0	9,5	5,2	
13	5,1	-1,0	8,6	10,4	16,0	15,4	24,0	25,0	14,6	12,6	9,5	5,2	
14	4,0	-0,4	9,6	11,6	18,4	13,9	18,6	24,5	10,6	12,6	9,1	5,4	
15	3,2	0,7	11,2	11,4	19,6	16,4	17,8	26,6	10,0	14,6	9,5	4,7	
16	8,0	-2,1	13,0	10,5	19,8	17,8	20,7	17,4	10,0	16,7	4,1	6,1	
17	6,6	-4,2	9,9	11,0	19,5	20,0	21,8	17,9	11,1	8,8	6,3	6,4	
18	4,6	1,8	2,5	12,1	18,7	17,9	16,6	19,8	9,8	7,0	1,0	4,3	
19	5,8	5,2	3,5	16,6	17,7	20,4	19,8	21,0	9,1	9,2	2,2	4,4	
20	3,2	5,7	3,0	16,4	11,9	22,7	24,4	21,8	11,5	11,0	9,4	2,4	
21	5,3	7,0	6,4	15,0	13,4	23,9	17,0	21,8	10,4	13,8	9,0	4,0	
22	6,2	8,0	5,2	14,1	16,2	25,3	15,5	22,7	10,7	14,4	2,4	4,6	
23	1,7	10,5	4,6	11,5	17,2	26,0	14,1	18,8	12,0	9,3	2,1	2,1	
24	0,2	11,0	3,9	10,4	19,0	26,2	17,8	16,6	12,4	9,1	5,0	3,8	
25	0,2	14,7	2,8	11,8	20,2	24,8	19,6	16,5	11,9	7,8	3,4	0,7	
26	0,4	12,6	5,8	11,8	22,4	26,0	22,2	18,0	11,1	7,9	3,0	0,0	
27	3,9	10,6	8,8	12,6	25,2	24,6	23,2	20,2	11,0	10,6	0,0	-0,3	
28	5,3	8,9	10,8	14,2	25,1	23,1	23,2	21,3	11,6	15,5	0,0	-2,5	
29	1,0	10,6	9,4	11,3	22,6	24,3	22,4	21,5	10,1	20,8	0,5	-2,8	
30	2,0		9,7	13,8	22,4	23,0	23,9	18,8	12,9	13,5	5,2	-3,1	
31	3,0		12,1		21,1		24,8	18,1		15,3		-4,0	

Prilog 2h. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 2009. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	-3,7	0,8	9,0	11,0	16,6	15,8	21,9	25,0	19,4	19,1	1,5	9,7
2	-2,2	2,0	8,6	13,0	11,0	15,9	21,8	26,8	22,4	13,8	5,0	3,5	
3	-4,2	2,9	7,8	13,6	12,7	19,0	23,6	25,4	23,7	11,0	1,8	2,8	
4	-7,4	3,4	8,4	15,3	13,7	13,1	23,2	20,2	20,2	12,1	3,9	5,7	
5	-6,7	9,6	8,4	15,8	13,9	17,6	22,5	21,0	15,1	15,5	5,4	4,9	
6	-5,4	11,4	8,7	16,6	15,3	22,8	21,9	22,6	15,1	19,6	6,4	4,1	
7	-5,0	10,8	6,2	15,9	17,2	18,1	19,6	21,9	14,6	19,3	5,3	2,9	
8	-3,8	5,8	8,6	17,7	18,6	20,8	16,6	23,4	15,9	20,0	6,7	6,8	
9	-8,3	3,2	4,6	16,8	19,2	22,1	20,0	22,8	18,9	17,2	7,7	7,4	
10	-7,3	6,2	6,7	16,9	21,0	21,8	15,6	23,0	18,4	15,8	7,1	5,6	
11	-5,8	4,1	7,6	17,9	20,8	19,1	17,6	21,6	17,6	15,8	7,4	5,8	
12	-6,6	1,4	4,8	16,7	18,8	18,4	19,4	21,7	19,8	9,5	5,9	2,4	
13	-7,1	0,0	9,0	14,0	13,4	19,2	22,5	23,9	17,6	8,2	9,2	0,1	
14	-3,2	1,7	8,6	14,4	18,0	21,9	25,6	20,4	17,4	5,2	12,7	-1,5	
15	-1,5	-0,9	9,7	15,1	18,2	25,0	26,8	21,0	18,5	5,9	12,4	-2,4	
16	-1,8	0,4	8,9	16,8	20,1	23,8	25,0	22,6	21,4	5,2	14,4	-2,8	
17	-4,0	1,0	7,0	14,8	20,8	19,8	25,8	23,6	19,9	7,2	13,4	-6,2	
18	2,0	-1,2	7,4	13,6	23,4	21,5	18,4	24,4	18,0	5,4	11,8	-8,2	
19	6,2	-2,3	2,6	13,9	22,6	24,0	18,6	24,5	18,8	5,4	8,4	-8,2	
20	10,7	0,7	2,1	14,9	20,1	14,3	20,6	24,0	18,5	6,4	8,4	-10,5	
21	4,8	1,9	3,3	15,2	20,7	17,3	22,6	23,0	18,0	12,5	7,0	-1,2	
22	3,2	-0,8	6,0	14,2	22,0	13,4	24,9	23,4	17,3	14,2	6,9	7,3	
23	3,2	2,1	9,8	10,4	21,6	14,4	26,8	20,2	16,9	12,1	8,0	15,1	
24	4,9	2,0	4,1	13,1	21,4	17,6	27,1	20,0	17,1	10,1	9,6	16,1	
25	4,2	2,4	4,4	14,5	24,4	19,9	20,3	20,7	17,8	11,9	8,0	13,9	
26	4,4	4,2	5,2	15,0	25,4	19,2	18,6	22,8	16,5	12,9	10,9	6,4	
27	2,6	6,8	9,6	16,8	17,5	19,8	20,8	25,1	17,0	11,2	12,2	3,2	
28	1,2	10,0	14,0	14,6	15,8	20,2	22,3	24,7	16,4	9,2	6,2	0,8	
29	0,7		12,8	12,8	11,8	20,6	23,0	17,8	16,4	10,1	9,2	3,5	
30	0,6		9,4	12,3	10,5	22,6	24,1	17,0	17,1	7,7	16,0	9,6	
31	0,2		8,8		12,7		24,0	17,9		3,4		10,1	

Prilog 2i. Srednje dnevne temp. zraka (Kloštar Ivanić, 2010. godina)

	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Dan	1	6,5	-4,4	11,4	11,6	19,6	12,0	23,6	21,0	14,4	11,8	12,5	0,1
	2	3,7	-5,8	5,0	7,8	16,5	12,4	24,0	22,8	13,9	13,3	11,6	1,8
	3	-0,2	1,8	4,9	11,6	18,4	15,0	25,0	21,6	15,6	13,4	11,4	1,7
	4	-0,7	5,4	1,8	12,6	17,8	15,1	23,2	20,0	17,4	15,7	12,2	-1,4
	5	-0,7	6,3	0,8	7,8	16,0	18,9	22,8	21,3	14,5	15,4	13,8	-0,9
	6	-0,4	-0,5	0,2	10,2	14,6	19,6	21,7	17,3	11,6	11,1	11,3	10,0
	7	0,5	-3,3	-0,3	9,7	14,8	22,8	18,2	19,6	12,6	9,5	15,0	14,1
	8	0,8	-4,1	-0,8	12,6	12,5	23,6	19,4	20,6	16,5	8,5	11,9	15,5
	9	0,9	-3,6	0,7	13,0	15,8	25,0	21,2	20,8	18,5	7,4	10,4	3,4
	10	0,9	-1,6	-2,0	10,0	16,6	25,2	22,8	21,8	15,6	7,4	11,4	-2,7
	11	0,6	-1,2	-0,6	7,8	16,8	26,0	24,2	22,7	15,5	8,0	10,4	-2,9
	12	0,5	-1,5	1,6	7,2	17,4	26,5	25,2	22,6	17,0	9,0	11,5	-2,7
	13	0,6	-0,4	3,3	8,8	14,2	25,3	25,0	21,6	17,4	12,0	13,6	-2,1
	14	0,7	-0,3	3,6	9,2	16,5	23,2	26,4	23,8	16,4	10,6	15,8	-4,4
	15	0,8	-2,0	2,6	11,4	10,2	22,8	28,1	23,3	17,5	9,4	15,3	-3,2
	16	0,0	0,0	5,6	11,1	9,3	20,8	28,2	20,2	17,8	8,4	13,0	-4,6
	17	-0,2	2,1	7,9	11,6	12,0	20,5	28,2	20,2	15,4	8,4	9,4	-4,0
	18	-0,4	4,0	9,8	12,6	12,5	21,0	21,6	20,4	12,6	8,2	9,0	-7,2
	19	0,7	5,1	11,4	13,4	14,0	17,6	21,4	21,5	12,4	7,9	10,4	-6,4
	20	1,4	2,5	12,1	15,6	12,5	15,4	23,3	23,0	11,5	6,4	9,0	1,0
	21	-2,0	4,0	14,1	15,4	14,5	13,0	25,0	22,0	12,6	5,1	8,6	4,9
	22	-2,9	6,0	10,9	8,8	18,3	17,1	25,6	21,1	13,6	4,2	8,8	4,4
	23	-3,0	7,9	10,4	13,8	17,1	17,4	27,4	21,3	14,7	10,4	6,8	5,0
	24	-3,0	8,6	11,1	15,4	19,5	17,5	18,6	22,9	16,0	12,5	3,5	10,2
	25	-3,5	9,2	11,2	16,6	22,0	18,3	16,4	19,0	15,6	7,4	0,2	2,8
	26	-5,4	9,6	15,6	17,4	20,4	16,8	17,2	21,0	12,8	5,5	0,8	-1,9
	27	-5,5	7,5	10,0	18,0	21,2	20,5	19,3	23,8	13,2	3,1	1,8	-4,0
	28	-7,7	11,3	10,8	15,4	19,8	21,0	20,5	17,1	14,3	3,1	0,8	-4,6
	29	-3,2		14,2	15,7	19,8	22,3	21,4	15,7	12,4	4,4	4,4	-3,2
	30	0,4		15,2	19,5	18,3	22,8	15,3	12,0	11,9	9,9	2,7	-2,3
	31	-0,8		11,7		11,3		19,2	12,6		10,8		-6,0

Prilog 2j. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 1993. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1		-5,6	-4,8	1,5	7,8	14,2	18,6	17,1	18,7	12,4	15,2	5,2
2		-8,0	-2,6	0,0	5,4	16,6	22,2	19,2	21,7	14,6	15,7	5,7	-5,4
3		-7,8	-0,5	-0,1	4,4	15,9	16,1	22,8	22,6	14,6	13,4	7,5	-6,6
4		-10,0	-0,1	-2,6	5,4	15,5	19,3	24,6	24,1	13,4	10,0	9,2	-7,7
5		-15,8	-3,4	-5,0	8,3	10,8	21,0	25,2	23,4	12,2	13,3	9,2	-3,0
6		-10,9	0,9	-2,8	7,8	12,7	22,1	15,8	21,0	11,8	16,4	10,7	-2,5
7		-4,2	3,2	1,0	10,0	14,4	22,5	15,4	18,8	16,2	15,4	12,6	-2,6
8		1,8	1,0	1,0	7,8	15,8	20,9	16,6	20,1	20,0	17,3	10,9	0,7
9		1,9	-0,8	0,0	7,0	15,0	20,3	21,0	16,8	20,6	13,5	9,6	4,4
10		1,0	-1,1	1,1	7,2	15,4	23,6	22,9	19,9	18,4	15,0	6,4	-1,4
11		9,6	-0,2	4,0	5,0	15,2	24,4	18,8	17,5	16,6	17,2	5,9	2,0
12		10,6	-1,0	5,0	5,2	15,2	17,8	14,4	18,8	15,4	19,4	0,4	-5,3
13		7,0	-0,9	5,4	9,1	17,2	16,1	13,1	21,0	19,2	20,0	-2,0	3,5
14		6,8	0,1	5,8	11,5	17,1	16,8	15,7	21,7	17,6	17,0	-1,6	5,6
15		3,4	-0,1	5,8	8,2	16,6	18,2	19,4	21,5	17,2	13,6	0,4	2,6
16		3,4	-1,6	6,9	10,7	16,3	16,9	19,8	21,3	18,7	13,3	2,6	4,6
17		3,2	-2,2	10,0	7,8	16,0	16,5	23,6	23,0	15,3	13,8	0,7	2,3
18		2,4	1,8	12,0	9,8	17,8	16,5	21,5	20,6	12,2	6,4	-3,4	2,0
19		1,0	1,0	11,5	12,8	20,1	21,9	22,6	18,7	13,9	7,2	-6,3	7,0
20		1,2	0,9	9,8	10,4	21,0	23,7	19,4	20,6	13,2	8,0	-5,1	12,1
21		4,4	1,8	15,8	14,5	21,7	19,9	15,6	22,9	14,6	8,6	-4,4	10,9
22		6,1	-1,8	13,2	16,1	17,8	22,7	17,2	27,4	15,2	8,3	-4,8	4,7
23		7,1	-2,3	14,6	15,6	15,6	24,5	17,4	24,9	17,9	12,6	-4,6	4,3
24		9,4	-0,8	6,2	15,5	16,6	15,6	19,8	20,0	17,5	10,9	-2,6	6,2
25		6,9	-1,6	4,8	17,6	18,7	15,6	24,4	12,8	14,1	8,2	-1,5	-0,2
26		1,9	-1,2	3,3	15,6	22,0	14,5	14,0	14,5	13,6	5,6	-4,8	-0,2
27		2,6	0,8	2,8	12,3	23,6	15,2	17,2	15,4	11,6	3,0	-6,1	-0,2
28		1,3	1,4	3,4	14,8	20,8	15,0	20,8	15,0	12,9	2,8	-6,1	-2,9
29		0,5		1,8	13,6	17,8	14,7	21,7	13,2	11,2	3,4	-4,2	-10,2
30		-3,7		1,9	14,9	21,4	18,0	24,4	13,3	10,2	2,8	-1,3	-8,1
31		-5,0		6,5		18,3		24,3	13,4		2,2		3,4

Prilog 2k. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 1997. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1		-8,6	-3,2	5,8	8,9	13,4	12,8	18,1	14,1	17,7	13,0	1,0
2		-6,6	-5,7	7,2	10,4	13,0	13,2	20,6	16,3	19,0	16,3	0,4	6,0
3		-3,3	-5,9	9,6	12,0	19,6	17,0	22,4	19,0	19,0	11,4	3,8	4,9
4		-1,1	-6,2	4,6	7,2	20,0	16,9	22,6	19,9	19,0	9,7	0,4	2,9
5		-1,3	4,7	4,4	5,6	18,2	19,1	18,7	22,4	18,9	13,5	5,6	0,2
6		-1,5	0,9	6,3	8,1	19,6	18,8	16,0	17,7	20,4	16,1	15,1	-1,9
7		-2,9	0,6	6,6	3,0	15,4	16,5	15,3	19,6	19,2	19,8	17,7	-0,2
8		-1,7	0,2	4,7	3,3	9,9	18,0	18,3	21,2	16,6	15,6	14,1	1,0
9		-1,3	0,7	4,1	6,3	13,6	19,8	19,9	20,4	18,8	20,6	10,8	0,7
10		-1,3	-0,2	7,0	10,9	15,0	20,0	20,8	18,8	15,1	20,1	9,6	2,2
11		0,2	3,9	4,2	10,0	16,8	21,0	18,6	19,0	13,5	12,0	10,4	8,7
12		-2,4	7,6	3,4	6,1	21,1	22,5	17,2	19,4	19,6	11,0	11,8	5,3
13		-0,4	8,1	8,6	1,5	21,7	20,0	18,9	20,4	22,2	5,5	8,1	4,9
14		-1,2	4,5	6,8	8,3	20,5	20,8	20,0	21,8	13,1	6,2	7,0	2,5
15		-3,2	6,0	8,7	6,0	19,8	20,1	18,3	21,8	11,2	5,0	2,8	-0,8
16		-1,6	2,8	9,5	1,7	20,1	22,2	20,1	19,6	11,1	7,8	2,4	-4,5
17		-2,4	-0,9	5,6	5,4	20,3	19,3	21,4	20,8	12,0	6,5	4,9	-6,4
18		-2,9	0,7	2,3	9,6	22,7	16,0	17,7	20,0	12,6	5,5	2,3	-3,8
19		-2,4	2,9	2,8	11,5	21,7	16,7	17,6	19,8	14,0	4,5	-1,0	-0,4
20		-0,4	5,1	3,0	2,6	22,6	18,0	18,3	18,9	10,4	4,7	-2,2	0,6
21		0,8	8,1	3,4	3,2	20,6	20,6	18,9	19,9	8,9	6,0	-1,6	1,7
22		0,5	7,8	2,6	5,7	12,9	23,3	19,1	19,6	10,1	6,0	0,0	3,0
23		0,4	8,2	2,7	6,0	15,8	16,4	21,9	18,6	10,7	4,0	0,8	1,2
24		0,5	10,1	2,9	7,0	14,2	15,9	21,0	18,8	12,4	5,8	1,9	3,4
25		0,1	12,5	5,4	11,3	11,8	15,8	20,0	19,2	12,8	2,2	3,3	5,5
26		-2,5	11,2	4,3	11,2	12,2	18,7	19,9	20,5	12,5	2,6	3,4	9,5
27		-2,2	7,1	7,1	11,2	14,6	22,1	19,2	20,0	12,6	-0,4	4,1	4,9
28		-2,3	3,4	9,1	10,5	10,6	22,5	20,8	22,9	12,3	-1,4	5,6	3,2
29		-3,7		4,6	11,6	12,4	24,7	17,0	15,4	11,7	-2,8	4,4	1,9
30		-4,0		5,1	13,2	13,7	22,2	19,5	17,4	14,4	-0,6	6,0	0,4
31		-1,4		6,2		11,0		20,6	17,7		1,8		6,9

Prilog 21. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 1998. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	4,1	-6,7	0,5	13,8	14,0	16,4	23,0	22,8	16,2	16,0	11,1	-0,4
2	8,7	-4,7	1,0	13,2	13,8	19,8	17,1	25,5	17,1	14,5	4,8	-1,7	
3	8,2	-2,4	7,7	15,1	14,0	22,5	17,6	25,3	18,9	11,4	11,6	-1,1	
4	8,1	-4,2	12,6	16,0	11,4	21,7	18,6	24,0	16,3	10,5	9,5	-2,1	
5	3,0	-3,6	9,2	16,3	10,0	23,7	17,4	20,8	17,0	13,0	3,6	-4,4	
6	6,6	-1,3	7,5	10,4	11,4	25,7	20,0	18,7	16,8	16,0	2,4	-7,9	
7	7,2	-0,6	11,4	13,4	14,1	25,6	19,6	18,8	17,6	17,0	3,4	-8,4	
8	4,0	-0,1	6,9	13,4	16,6	21,4	14,3	21,2	16,6	14,4	2,6	-7,8	
9	2,5	0,2	1,7	7,5	17,0	19,5	14,2	22,4	16,6	14,1	7,0	-10,1	
10	3,1	3,2	0,0	12,0	18,0	21,8	18,1	20,8	16,4	15,4	7,9	-6,8	
11	2,1	4,6	-1,9	12,0	19,9	16,5	19,4	21,0	19,0	12,3	7,6	-4,6	
12	-0,1	6,3	0,5	9,1	19,5	13,5	17,1	21,8	16,8	11,9	1,1	-7,1	
13	5,8	10,5	2,7	6,4	21,5	11,8	22,7	23,0	11,7	8,8	0,5	-0,3	
14	5,3	7,0	6,3	5,1	13,8	14,7	15,1	20,0	9,4	9,3	3,3	2,0	
15	3,0	10,0	4,4	7,5	14,6	18,5	16,9	21,2	13,6	13,3	3,0	1,4	
16	5,8	12,4	3,0	6,7	12,4	15,2	18,7	22,2	15,2	12,3	3,5	-1,5	
17	3,6	8,0	2,6	9,4	8,9	13,4	19,1	22,2	11,2	16,8	0,8	0,1	
18	1,6	1,5	6,0	8,3	11,6	15,6	20,4	22,4	11,8	13,8	-1,1	-3,5	
19	2,9	5,0	5,9	10,2	12,6	15,5	23,1	21,5	12,6	9,3	-2,4	-3,0	
20	4,6	4,2	3,8	9,8	16,2	20,8	23,7	20,9	14,0	6,9	-1,9	-1,2	
21	2,2	10,8	0,6	13,2	16,2	23,2	23,8	22,4	14,9	5,3	-4,2	1,0	
22	2,2	12,1	1,2	10,4	11,4	23,2	24,2	17,5	11,6	6,3	-3,1	-3,1	
23	1,3	9,3	-0,4	11,3	13,8	16,2	24,9	15,9	11,1	7,7	-0,1	-4,3	
24	-1,5	7,9	2,1	13,6	11,6	18,7	23,3	19,0	11,2	5,5	1,3	-7,0	
25	-1,4	9,2	2,8	13,0	11,7	21,0	23,8	16,2	15,8	9,0	0,9	-6,4	
26	-2,2	5,3	1,5	15,2	15,2	23,3	21,8	16,9	18,8	6,5	0,8	-8,0	
27	-3,4	7,2	4,0	16,6	17,8	22,0	24,3	15,9	18,2	8,5	-1,2	-3,8	
28	-4,0	7,7	8,1	16,2	19,1	21,4	18,2	12,5	14,8	14,3	-0,5	1,4	
29	-0,6		9,4	14,2	18,8	20,8	19,8	12,3	14,5	13,5	0,6	-2,2	
30	-2,0		7,7	14,2	20,2	23,1	20,8	12,3	15,7	6,7	1,8	-0,2	
31	-1,0		8,7		21,2		23,3	14,2		6,2		-1,4	

Prilog 2m. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 1999. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	-3,3	-3,1	7,2	11,2	15,4	21,2	21,4	19,5	15,8	12,6	10,1	-3,5
2	-0,9	-0,4	10,2	11,6	16,5	23,1	22,5	18,4	13,2	15,8	12,6	-3,6	
3	-0,2	3,2	10,1	13,6	16,8	23,0	23,2	19,6	15,7	19,2	11,9	2,0	
4	-0,2	4,2	13,1	11,4	16,4	16,2	24,6	20,0	16,3	9,7	9,0	8,0	
5	1,3	5,2	7,8	11,9	9,9	18,9	24,8	22,5	14,5	11,8	11,2	1,4	
6	0,8	0,6	6,1	12,5	11,4	22,2	26,6	21,8	14,9	9,4	12,0	-1,8	
7	-1,0	2,4	5,0	14,6	10,8	22,2	16,6	22,0	16,6	7,7	9,8	-0,5	
8	0,1	-0,2	4,4	9,6	16,8	17,6	18,6	24,0	18,6	7,1	6,8	4,5	
9	-0,2	0,0	8,8	10,3	14,0	16,9	18,2	26,3	20,6	10,5	5,0	8,2	
10	-1,6	-2,5	11,7	10,8	16,7	18,3	19,7	22,2	18,6	13,8	4,8	8,0	
11	0,5	-3,5	7,4	12,4	17,5	19,1	20,4	19,8	17,4	11,7	5,5	3,4	
12	2,6	-3,0	6,8	10,5	15,3	18,7	21,4	18,0	17,9	11,1	7,0	5,6	
13	1,0	-2,6	7,2	9,3	17,7	17,2	23,5	15,5	16,9	12,9	6,0	3,3	
14	1,3	-3,0	5,1	11,9	14,3	18,9	22,0	16,3	16,9	10,4	6,0	3,7	
15	1,2	-10,0	7,0	14,8	15,9	18,6	20,5	20,6	17,1	7,2	1,6	2,0	
16	4,4	-2,2	3,4	10,8	11,5	19,3	19,3	18,5	17,6	5,9	0,3	0,2	
17	6,6	0,4	2,0	9,6	13,0	19,6	19,8	18,6	17,5	3,4	0,1	-0,6	
18	0,8	-5,8	1,6	7,3	12,4	18,5	20,4	20,0	17,6	5,2	0,5	4,5	
19	0,4	2,0	3,0	4,4	15,8	16,8	20,4	21,2	17,8	4,5	-0,2	3,7	
20	-0,8	5,8	5,7	7,1	15,7	20,0	22,8	19,0	20,6	5,7	-8,1	-1,8	
21	-1,4	2,4	4,8	11,3	14,0	14,4	24,0	16,0	16,8	7,9	-4,0	-2,3	
22	-1,8	2,3	7,6	11,2	16,0	12,4	18,8	16,8	16,3	7,8	-1,9	-8,1	
23	-1,6	0,0	6,7	11,1	15,5	14,5	16,1	15,5	17,4	11,6	-5,7	-10,5	
24	-2,0	1,2	8,8	12,4	15,0	15,6	18,0	16,1	18,0	15,4	-1,6	-7,6	
25	-2,0	1,1	11,4	12,8	17,0	16,1	17,2	15,4	19,6	18,5	1,5	-3,8	
26	-2,4	2,2	12,8	12,8	18,3	18,7	19,2	18,3	21,9	14,5	-1,9	-3,1	
27	0,4	8,8	11,7	15,2	20,2	20,9	21,5	18,2	15,6	12,4	-2,5	0,7	
28	2,0	6,5	8,4	14,4	20,8	20,4	21,1	18,5	16,4	10,5	-3,8	1,5	
29	-1,8		9,6	16,7	20,4	20,4	19,3	18,9	14,6	9,9	-4,2	-1,7	
30	-5,4		10,3	14,4	23,2	21,2	19,2	15,9	18,8	8,2	-4,4	-2,9	
31	-3,8		9,3		24,1		18,3	17,8		12,6		-4,6	

Prilog 2n. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 2008. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	-1,0	6,6	10,0	12,4	13,4	22,3	22,6	23,9	16,2	14,1	11,8	6,4
2	-1,7	6,3	10,8	7,6	12,9	22,3	22,4	22,3	17,9	14,5	10,6	5,8	
3	-2,2	3,6	12,2	8,0	13,2	19,6	25,5	23,0	21,2	11,8	11,3	2,1	
4	-4,6	5,9	5,1	9,5	13,1	19,6	21,6	23,5	21,8	8,4	12,9	-0,3	
5	-4,5	4,5	3,2	7,5	13,0	17,8	20,8	20,4	23,3	7,3	13,6	8,7	
6	0,6	5,4	1,3	9,6	13,3	17,5	23,5	21,2	25,1	10,0	13,0	3,4	
7	0,1	5,0	2,8	9,3	13,0	18,0	25,7	22,0	23,3	11,9	12,7	3,4	
8	0,0	3,1	4,2	6,6	14,2	17,6	15,6	20,1	17,8	11,9	11,4	0,1	
9	-2,4	2,6	7,2	13,6	14,2	19,0	19,6	17,9	17,6	13,6	10,7	2,2	
10	-1,2	3,5	10,0	15,4	13,8	20,6	20,2	18,4	18,0	13,2	8,6	4,6	
11	4,4	0,4	7,3	16,7	13,0	20,2	24,0	19,4	19,1	11,6	5,8	4,8	
12	7,8	-1,6	10,3	10,0	13,7	17,3	24,0	24,2	19,9	11,2	7,2	3,2	
13	4,7	-1,6	8,0	9,1	15,4	14,7	22,1	25,1	13,2	10,6	8,4	3,6	
14	4,4	-0,4	7,4	10,2	17,6	13,7	15,4	22,9	9,6	12,1	8,4	4,7	
15	5,3	0,2	8,9	9,2	20,0	16,7	17,7	24,5	9,8	12,7	5,4	4,0	
16	7,4	-3,8	11,8	9,5	19,9	16,8	20,2	15,4	9,6	15,9	2,8	5,2	
17	5,4	-5,5	8,3	10,2	19,0	18,1	20,8	16,6	10,4	6,5	3,0	5,4	
18	4,2	1,7	1,7	11,8	17,6	16,8	15,8	19,3	8,6	5,7	0,0	2,1	
19	5,0	2,4	2,4	12,7	16,6	20,9	19,9	20,1	9,4	6,6	2,5	4,0	
20	4,1	4,5	1,0	14,5	11,0	21,9	23,0	20,7	11,6	8,0	8,2	3,2	
21	5,1	5,2	5,1	13,1	12,8	23,4	17,8	20,2	10,8	10,2	8,3	2,8	
22	4,4	6,2	1,6	12,8	15,2	25,9	15,8	21,4	10,6	11,4	0,2	3,1	
23	1,0	8,6	4,6	10,2	15,8	25,8	14,4	18,8	11,9	8,5	0,0	2,1	
24	1,0	9,6	3,0	10,2	17,8	23,5	18,2	15,5	11,3	7,5	3,0	2,4	
25	0,0	9,3	3,0	10,6	19,1	24,9	20,1	16,0	11,1	8,1	1,2	-0,2	
26	0,5	10,6	4,1	11,4	21,6	24,6	22,7	18,4	11,6	7,4	0,9	-0,8	
27	8,2	10,2	7,5	12,3	25,0	22,0	22,8	19,2	11,5	8,5	-0,2	-0,9	
28	4,8	6,8	9,1	15,4	25,2	21,4	22,2	20,4	9,2	14,5	-0,6	-3,8	
29	1,2	9,2	8,7	11,8	19,6	22,9	22,0	20,6	8,0	16,4	0,6	-2,9	
30	0,6		7,4	13,8	22,0	21,5	21,6	17,0	11,9	12,2	5,9	-4,2	
31	1,7		10,3		21,5		23,8	16,2		14,2		-4,6	

Prilog 2o. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 2009. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1		-4,4	-0,4	6,9	10,2	16,6	14,9	21,5	22,7	18,5	17,9	-1,0
2		-2,2	0,4	5,8	13,8	12,4	15,2	20,7	26,2	20,9	13,1	3,2	3,7
3		-6,2	0,9	6,4	11,6	13,2	18,7	22,0	22,6	23,2	9,6	1,2	3,9
4		-6,4	1,8	8,2	14,1	13,2	13,0	22,6	17,8	16,5	10,8	2,4	5,0
5		-7,1	8,4	7,1	15,1	12,2	14,2	21,5	19,6	14,3	14,7	5,9	2,6
6		-4,5	9,6	7,0	13,8	15,2	22,0	21,8	20,7	13,6	18,9	5,4	0,4
7		-4,3	8,6	5,7	14,8	16,2	17,0	19,6	21,2	13,9	17,0	6,4	2,2
8		-4,9	5,1	6,6	15,8	18,5	19,8	14,6	21,8	15,8	17,5	5,6	6,0
9		-8,0	2,4	4,5	14,0	18,0	22,7	17,4	20,2	17,7	14,6	7,8	7,5
10		-8,2	5,4	6,5	15,4	19,5	20,7	14,1	22,0	18,2	15,3	7,0	6,3
11		-6,8	3,1	6,2	16,3	21,0	17,8	16,6	20,7	18,0	15,4	7,1	5,0
12		-6,5	0,5	4,0	13,8	16,8	17,0	19,2	21,3	18,1	11,2	4,7	1,5
13		-6,9	0,4	6,7	12,9	13,1	16,7	22,0	22,4	16,8	7,2	9,2	-0,9
14		-3,1	1,4	6,9	12,2	16,0	22,3	25,2	19,3	14,8	4,9	12,8	-2,7
15		-0,4	-1,6	6,2	13,6	16,6	24,4	25,6	20,0	17,6	4,2	9,7	-2,4
16		-0,6	0,0	8,0	15,6	17,6	22,0	24,2	21,9	19,6	5,2	11,5	-3,7
17		-7,0	0,8	5,6	13,0	19,2	18,7	24,3	23,0	19,0	6,8	12,0	-6,0
18		1,6	-1,5	6,5	14,6	22,1	20,6	17,6	23,4	17,0	3,6	7,4	-9,4
19		3,8	-2,9	1,2	12,4	20,6	24,0	18,4	21,7	17,4	5,2	6,2	-9,0
20		10,2	-0,6	1,6	14,2	19,0	14,0	19,8	21,5	16,9	5,8	6,1	-19,0
21		4,0	0,4	2,8	15,0	20,8	15,9	22,3	21,3	15,7	10,4	3,7	-1,3
22		1,1	-0,8	5,2	13,0	20,5	12,8	25,3	21,5	15,8	15,0	7,5	5,4
23		2,2	2,4	9,4	9,3	18,8	13,8	27,5	18,0	16,6	10,5	4,9	9,4
24		2,4	0,3	4,0	11,6	19,9	16,8	24,8	17,6	16,0	10,2	9,1	10,6
25		2,0	0,6	4,2	13,0	23,0	19,6	17,6	19,2	17,2	11,2	9,0	11,3
26		2,5	3,0	4,1	14,2	22,2	18,0	17,7	20,5	14,3	12,2	10,7	4,7
27		1,2	4,1	9,2	15,2	15,1	19,2	19,3	22,9	14,2	10,9	10,6	2,2
28		0,8	7,6	12,5	13,2	15,8	18,7	21,0	23,4	14,7	10,2	4,8	0,6
29		1,0		9,4	12,8	12,8	18,9	22,2	16,3	16,5	7,8	9,1	0,7
30		0,4		7,8	13,4	9,3	22,4	24,2	15,5	15,9	4,9	14,0	7,7
31		-0,8		8,5		13,2		21,4	16,2		1,0		8,7

Prilog 2p. Srednje dnevne temp. zraka (Nedelišće, 2010. godina)

Dan	Mjesec	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
	1	4,3	-6,7	9,7	10,2	20,1	12,4	23,2	20,6	13,0	10,1	11,6	-1,6
2	2,8	-5,1	5,0	5,8	16,0	12,6	23,2	22,7	13,9	12,9	9,4	-0,8	
3	-1,7	3,1	3,3	9,8	15,8	14,5	24,8	21,0	13,7	12,6	9,2	-0,5	
4	-2,4	1,7	1,6	11,4	15,7	14,8	22,8	19,9	14,4	13,4	9,3	-6,0	
5	-2,4	2,8	0,2	8,0	13,4	17,0	21,8	18,3	12,4	13,0	10,8	-1,0	
6	-1,5	-0,6	-0,6	9,0	13,8	19,3	21,6	17,4	9,4	10,8	7,6	6,1	
7	-0,6	-4,8	-1,9	7,4	14,1	21,0	17,7	18,2	12,2	9,0	12,0	7,7	
8	0,0	-3,7	-2,0	9,2	13,2	22,8	18,7	20,0	15,5	7,4	11,0	12,9	
9	0,6	-4,3	-1,3	11,8	15,5	24,1	20,9	18,5	16,6	6,0	9,4	1,8	
10	0,6	-1,8	-1,7	9,3	16,3	25,5	22,0	20,0	16,4	6,0	9,5	-4,7	
11	-0,2	-2,2	-1,1	6,8	17,3	26,0	23,9	20,2	16,2	6,2	7,7	-3,2	
12	-1,4	-1,5	-1,6	5,8	15,5	25,5	24,8	21,0	14,6	6,5	11,8	-2,1	
13	-1,1	-2,0	5,3	8,2	14,2	24,2	23,8	21,2	15,8	9,6	14,3	-3,3	
14	-0,8	-1,4	3,2	8,6	14,8	22,2	26,0	22,1	15,2	6,3	15,6	-4,8	
15	-0,1	-5,2	0,0	10,6	10,0	21,1	27,3	21,0	18,2	6,4	15,7	-5,5	
16	-1,2	-0,4	3,7	10,9	9,1	17,3	26,2	19,8	16,8	8,5	11,2	-5,6	
17	-1,5	0,8	5,9	9,2	12,2	19,1	26,9	19,2	14,3	7,7	9,6	-4,7	
18	0,0	2,2	6,9	9,0	12,3	19,7	21,0	20,3	12,2	7,4	9,0	-11,6	
19	1,1	2,0	11,7	11,5	13,2	17,8	20,2	20,2	12,4	7,5	6,5	-7,1	
20	0,7	2,3	12,4	16,0	12,0	14,5	21,6	21,0	10,5	4,1	5,2	3,8	
21	-3,4	2,0	13,3	13,9	14,4	13,4	23,9	20,9	11,6	3,5	7,4	-0,5	
22	-4,2	4,7	9,3	8,2	16,8	16,7	25,4	19,8	12,2	3,6	8,7	5,0	
23	-4,7	7,6	8,4	12,4	16,3	17,6	26,4	22,8	12,8	9,4	3,9	5,3	
24	-4,7	8,5	10,4	14,3	19,6	17,9	17,9	21,6	14,7	12,3	1,6	5,2	
25	-6,0	7,0	11,8	14,2	22,2	18,0	16,2	16,7	15,0	6,5	-0,2	2,1	
26	-6,9	7,5	14,5	16,7	20,6	18,4	17,4	21,6	12,6	3,4	-1,0	-2,0	
27	-9,0	6,6	7,1	15,7	20,1	20,7	18,4	22,5	12,7	1,4	-1,0	-3,7	
28	-7,8	10,6	9,3	13,0	20,3	20,6	19,8	16,8	13,8	1,8	0,0	-3,8	
29	-2,2		13,9	14,0	18,3	22,1	20,1	14,4	11,7	4,7	2,0	-4,5	
30	0,4		12,8	19,5	17,3	21,9	15,8	11,4	10,8	10,8	0,2	-5,0	
31	-2,9		8,4		12,0		18,7	12,9		11,0		-4,5	

Prilog 3a. Godišnji ulov odraslih leptira u veg. sezonama 2008., 2009. i 2010. godine u voćnjaku Beloslavec

2008.		2009.		2010.	
Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)
16.05.	19	13.07.	9	02.05.	4
25.05.	23	19.07.	12	10.05.	10
30.05.	17	26.07.	12	17.05.	14
04.06.	9	01.08.	7	23.05.	18
15.06.	22	09.08.	10	28.05.	12
21.06.	9	16.08.	9	04.06.	7
30.06.	14	23.08.	2	14.06.	6
05.07.	6			22.06.	25
				26.06.	5
				03.07.	18
				08.07.	14
				19.07.	18
				22.07.	7
				29.07.	12
				03.08.	36
				14.08.	6
				21.08.	10
				28.08.	2
				04.09.	1
				20.07.	16
				01.08.	10
				11.08.	17

Prilog 3b. Godišnji ulov odraslih leptira u veg. sezonama 1997., 1998. i 1999. godine u voćnjaku Kloštar Ivanić

1997.		1998.		1999.	
Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)
12.05.	30	11.07.	1	28.04.	47
14.05.	19	14.07.	5	07.07.	23
16.05.	10	15.07.	7	10.07.	4
17.05.	7	17.07.	3	04.05.	76
19.05.	26	18.07.	3	14.07.	5
21.05.	15	21.07.	2	06.05.	21
23.05.	17	23.07.	5	17.07.	6
26.05.	17	25.07.	7	08.05.	23
28.05.	2	28.07.	6	20.07.	11
05.06.	1	31.07.	2	21.07.	4
07.06.	3	01.08.	1	12.05.	4
09.06.	7	04.08.	8	14.05.	42
11.06.	8	06.08.	6	28.07.	24
12.06.	9	08.08.	9	15.05.	6
16.06.	6	11.08.	10	30.07.	24
17.06.	1	12.08.	2	31.07.	15
19.06.	1	16.08.	1	20.05.	2
23.06.	5	18.08.	7	03.08.	22
25.06.	7	21.08.	3	04.08.	7
26.06.	1	25.08.	1	22.05.	34
30.06.	5	26.08.	1	25.05.	7
04.07.	1	27.08.	1	28.05.	14
10.07.	1	28.08.	1	01.06.	1
				03.06.	3
				05.06.	4
				08.06.	8
				15.06.	1
				19.06.	2
				23.06.	5
				25.06.	4
				30.06.	16
				03.07.	1
				17.08.	19
				19.08.	3
				21.08.	3
				06.05.	28
				10.05.	8
				12.05.	7
				14.05.	13
				20.05.	6
				22.05.	6
				24.05.	3
				31.05.	1
				01.06.	5
				08.06.	5
				28.06.	1
				02.07.	6
				05.07.	5
				07.07.	2
				21.07.	3

Prilog 3c. Godišnji ulov odraslih leptira u veg. sezonama 2008., 2009. i 2010. godine u voćnjaku Kloštar Ivanić

2008.		2009.		2010.	
Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)
16.04.	1	20.06.	1	14.04.	2
18.04.	1	23.06.	3	16.04.	10
21.04.	6	26.06.	6	20.04.	23
23.04.	1	04.07.	2	23.04.	30
25.04.	7	08.07.	5	25.04.	30
28.04.	9	11.07.	14	29.04.	28
30.04.	29	14.07.	16	04.05.	26
02.05.	8	17.07.	6	06.05.	34
05.05.	7	24.07.	1	08.05.	33
09.05.	33	28.07.	8	11.05.	26
12.05.	11	30.07.	4	13.05.	1
14.05.	8	01.08.	11	18.05.	17
16.05.	4	04.08.	13	21.05.	10
19.05.	9	06.08.	6	25.05.	33
23.05.	3	11.08.	3	27.05.	3
26.05.	4	13.08.	8	29.05.	2
28.05.	18	18.08.	6	03.06.	4
30.05.	12	20.08.	4	09.06.	1
03.06.	2	22.08.	1	15.06.	4
10.06.	9	25.08.	2	17.06.	2
11.06.	3	27.08.	2	19.06.	2
13.06.	8	01.09.	3	26.06.	1
16.06.	2	08.09.	6	29.06.	2
				01.07.	10
				04.07.	7
				06.07.	21
				09.07.	24
				13.07.	23
				15.07.	19
				17.07.	3
				27.07.	16
				27.07.	16
				31.07.	8
				03.08.	5
				06.08.	3
				10.08.	7
				12.08.	7
				19.08.	1
				21.08.	6
				24.08.	1
				28.08.	1
				29.08.	2
				23.06.	34
				28.06.	1
				29.06.	6
				03.07.	2
				05.07.	23
				07.07.	22
				23.04.	8
				28.04.	13
				30.04.	19
				03.05.	21
				06.05.	17
				10.05.	19
				12.05.	11
				14.05.	1
				21.05.	10
				24.05.	16
				28.05.	2
				01.06.	9
				08.06.	6
				11.06.	3
				14.06.	5
				16.06.	22
				18.06.	3
				27.08.	1
				30.08.	1

Prilog 3d. Godišnji ulov odraslih leptira u veg. sezonama 1993., 1997., 1998. i 1999. godine u voćnjaku Nedelišće

1993.		1997.		1998.		1999.					
Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)				
10.05.	1	22.06.	2	06.05.	1	30.06.	6	08.05.	1	04.05.	1
12.05.	1	02.07.	1	08.05.	1	02.07.	3	10.05.	1	06.05.	1
14.05.	1	04.07.	1	12.05.	2	04.07.	11	12.05.	3	08.05.	1
18.05.	4	06.07.	6	14.05.	2	08.07.	8	14.05.	1	16.05.	1
20.05.	6	08.07.	1	16.05.	2	10.07.	2	16.05.	1	22.05.	1
22.05.	6	10.07.	1	18.05.	7	12.07.	1	22.05.	1	24.05.	2
24.05.	3	12.07.	2	20.05.	2	16.07.	2	24.05.	2	26.05.	2
26.05.	3	14.07.	1	22.05.	2	18.07.	5	26.05.	1	28.05.	1
02.06.	1	16.07.	1	24.05.	3	24.07.	3	30.05.	1	30.05.	4
04.06.	1	18.07.	2	26.05.	1	26.07.	1	04.06.	1	04.06.	1
06.06.	1	20.07.	1	04.06.	2	28.07.	3	08.06.	1	10.06.	3
08.06.	2	22.07.	23	08.06.	1	04.08.	2	10.06.	2	12.06.	1
10.06.	4	24.07.	23	10.06.	1	06.08.	4	16.06.	1	04.07.	1
12.06.	7	26.07.	2	12.06.	4	08.08.	4	22.06.	1	06.07.	1
14.06.	1	28.07.	3	16.06.	2	10.08.	2	24.06.	1	12.07.	1
16.06.	2	30.07.	3	18.06.	2	12.08.	1	26.06.	1	26.07.	3
18.06.	2	02.08.	7	20.06.	2	16.08.	2	28.06.	2	28.07.	1
20.06.	1	04.08.	1	26.06.	2	18.08.	1	02.07.	1	02.08.	1
		06.08.	3					14.07.	4	04.08.	3
		08.08.	1					16.07.	1	06.08.	8
								24.07.	2	08.08.	5
								26.07.	5	10.08.	4
								28.07.	2	18.08.	3
								08.08.	1		

Prilog 3e. Godišnji ulov odraslih leptira u veg. sezonama 2008., 2009. i 2010. godine u voćnjaku Nedelišće

2008.		2009.		2010.	
Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)	Datum	Ulov leptira (br.)
21.04.	1	24.06.	1	14.04.	2
29.04.	1	26.06.	8	15.04.	1
05.05.	2	27.06.	3	16.04.	2
07.05.	1	28.06.	3	18.04.	1
12.05.	3	30.06.	2	22.04.	3
14.05.	2	02.07.	1	25.04.	1
15.05.	1	03.07.	1	04.05.	4
16.05.	1	04.07.	1	05.05.	2
19.05.	5	09.07.	2	06.05.	1
23.05.	1	21.07.	8	07.05.	1
27.05.	2	23.07.	12	08.05.	3
29.05.	1	29.07.	1	11.05.	10
30.05.	1	01.08.	3	12.05.	11
02.06.	4	07.08.	4	14.05.	7
05.06.	1	08.08.	4	15.05.	7
09.06.	1	11.08.	2	18.05.	9
10.06.	2	12.08.	1	19.05.	10
11.06.	2	13.08.	1	20.05.	6
12.06.	4	14.08.	2	25.05.	4
13.06.	2	18.08.	3	09.06.	1
20.06.	3	22.08.	1	10.06.	4
23.06.	7			12.06.	2

ŽIVOTOPIS

Ivana Pajač Živković rođena je 18. kolovoza 1983. godine u Zagrebu. Osnovno i gimnazijsko školovanje završila je u Svetom Ivanu Zelini. Na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer "Zaštita bilja", diplomirala je 2007. godine. Zaposlila se 2009. godine na Zavodu za poljoprivrednu zoologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kao stručni suradnik. Poslijediplomski doktorski studij "Poljoprivredne znanosti" na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je u akademskoj godini 2008/09. Radi kao suradnik na MZOŠ projektu "Integrirane mjere zaštite od tehnoloških štetnika jabuke" te VIP projektu "Primjena biološke zaštite od važnih štetnika jabuke i vinove loze u Međimurju". Područje njezina znanstveno-istraživačkog rada jest entomologija, integrirana zaštita voćnjaka i vinove loze, taksonomska identifikacija stjenica, štetnici voćaka i vinove loze, molekularna identifikacija vrsta te genetika jabukova savijača (*Cydia pomonella* L.). Sudjelovala je na nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih i stručnih skupova. Dobitnica je Dekanove nagrade za najbolji studentski rad u akademskoj godini 2005/06. Znanstveno se usavršavala na Institutu "Ruđer Bošković". Tajnik je HED-a (Hrvatsko entomološko društvo) i tehnički urednik znanstvenog časopisa "*Entomologia Croatica*" (EC).

PUBLIKACIJE:

Izvorni znanstveni radovi u CC časopisima:

1. Pajač I., Barić B., Šimon S., Mikac K. M., Pejić I. (2012.). New insights into the biology and ecology of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from apple orchards in Croatia. *Bulletin of Insectology* 65 (2) (prihvaćen za objavljivanje)
2. Pajač I., Barić B., Šimon S., Mikac K. M., Pejić I. (2011.). An initial examination of the population genetic structure of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) in Croatian apple orchards. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 9 (3&4): 459-464

3. Barić B., Pajač I., Franin K. (2009.). Russeting on apple fruits caused by pest control. *Cereal Research Communications* Vol. 37 (Suppl.): 651-654
4. Barić B., Karoglan Kontić J., Pajač I. (2008). Influence of the green cover as ecological infrastructure on the vineyard insect complex. *Cereal Research Communications* Vol. 36 (Suppl. 5 Part 1): 35-38

Znanstveni radovi u drugim časopisima (A2):

1. Pajač I., Barić B. (2012). The behaviour of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in the Croatian apple orchards. Subgroups ‘‘Pome fruit arthropods’’ and ‘‘Stone fruits’’. *IOBC/wprs Bulletin* 74: 79-82
2. Pajač I., Barić B. (2012). Maslinina muha [*Bactrocera oleae*] Gmelin]. *Glasilo biljne zaštite* (4): 304-307
3. Pajač I., Barić B., Pejić I. (2011). Codling Moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) - Major Pest in Apple Production: an Overview of its Biology, Resistance, Genetic Structure and Control Strategies. *Agriculturae Conspectus Scientificus (ACS)* 76 (2): 87-92
4. Barić B., Pajač I. (2011). Štetne stjenice na kupusu i njihovo suzbijanje. *Glasilo biljne zaštite* (3): 214-217
5. Pajač I., Barić B. (2010). *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) – potencijalni štetnik koštičavog voća u Hrvatskoj. *Pomologia Croatica* 16 (1-2): 43-49
6. Pajač I., Barić B., Božičević M., Piljek D., Pintar S. (2010). Vrste listorožaca (Coleoptera: *Cetoniinae*) u gradu Zagrebu. *Entomologia Croatica* 14 (3-4): 33-44
7. Pajač I., Barić B., Milošević B. (2010). Katalog stjenica (Heteroptera: Miridae) Hrvatske. *Entomologia Croatica* 14 (1-2): 23-76

8. Barić B., Pajač I., Bertić D. (2010). Harmful and beneficial entomofauna in Croatian orchards and vineyards. Pesticides and Beneficial Organisms. IOBC/wprs Bulletin 55: 113-115
9. Pajač I., Barić B. (2009). Novoutvrđene vrste Miridae (Heteroptera) u zbirci Franje Košćeca. Entomologia Croatica 13 (2): 21-31

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom:

1. Barić B., Pajač I. (2008). Miridae (Heteroptera) u zbirci Franje Košćeca. U: Vargović E, Bregović A (ur.) Zbornik radova sa znanstvenog skupa "Franjo Košćec i njegovo djelo 1882.-1968.", Varaždin, 221-232

Sažetci u zbornicima skupova:

1. Pajač I., Barić B. (2012). Jabukov savijač *Cydia pomonella* – u voćarstvu sve opasniji štetnik. U: Pospišil M (ur.) Zbornik sažetaka 47. hrvatskog i 7. međunarodnog simpozija agronoma, Opatija, 268-269
2. Barić B., Pajač I. (2012). Vrste savijača iz porodice Tortricidae prisutne u voćnjacima jabuke. U: Cvjetković B (ur.) Knjiga sažetaka 56. Seminara biljne zaštite, Opatija, 48-49
3. Pajač I., Barić B. (2011). Random collection of true bugs (Heteroptera) by Csalomon ® VARb3 funnel traps at the science-educational station Jazbina in Zagreb. U: Previšić A, Bregović A, Mičetić Stanković V (ur.) Knjiga sažetaka 22. Međunarodnog skupa entomologa Srednje Europe (SIEEC 22), Varaždin, 42
4. Barić B., Pajač I. (2011). Sadašnjost i budućnost integrirane zaštite voćaka u Hrvatskoj. U: Čuljat V (ur.) Zbornik sažetaka 6. Znanstveno-stručnog savjetovanja hrvatskih voćara s međunarodnim sudjelovanjem, Ilok, 20
5. Pajač I., Barić B. (2010). Tortrix pests in IPM apple orchards in Croatia. In: De Cristofaro A, Di Palma A, Escudero-Colomar L A, Ioriatti C, Molinari F (eds)

IOBC Working Group "Integrated Protection of Fruit Crops", Book of Abstracts, Vico del Gargano, Italy, 78

6. Pajač I., Šimon S., Pejić I., Barić B. (2010). Genetic polymorphism of Codling Moth in Croatia assessed by SSR markers. *In*: Dabrowski Z T, Dorn S, Hoffmann K H, Johnson S, Lieutier F, Vásárhelyi T (eds) IX th European Congress of Entomology, Book of Abstracts, Budapest, Hungary, 79
7. Barić B., Pajač I. (2010). Štetočinje agruma i mogućnosti integrirane proizvodnje *U*: Čuljat V (ur.) Zbornik sažetaka 5. Znanstveno-stručnog savjetovanja hrvatskih voćara s međunarodnim sudjelovanjem, Opuzen, 48
8. Barić B., Pajač I. (2010). *Grapholita lobarzewski* savijač kože ploda jabuke. *U*: Cvjetković B (ur.) Knjiga sažetaka 54. Seminara biljne zaštite, Opatija, 39
9. Barić B., Pajač I. (2009). Jabukov savijač *Cydia pomonella* – u voćarstvu sve opasniji štetnik. *U*: Pospišil M (ur.) Zbornik sažetaka 44. hrvatskog i 4. međunarodnog simpozija agronoma, Opatija, 265-266
10. Barić B., Pajač I. (2008). The current issue codling moth control in the Croatian apple orchards. *In*: Cross J, Brown M, Fitzgerald J, Fountain M, Yohalem D (eds). 7th International conference on Integrated Fruit Production, Book of Abstracts, Avignon, France, 232
11. Barić B., Grubišić D., Pajač I. (2008). Nove strategije u suzbijanju jabukovog savijača. *U*: Cvjetković B (ur.) Knjiga sažetaka 52. Seminara biljne zaštite, Opatija, 11
12. Barić B., Grubišić D., Pajač I. (2008). Jabukov savijač – sve veći problem u integriranoj proizvodnji jabuka. *U*: Čuljat V (ur.) Zbornik sažetaka 3. Znanstveno-stručnog savjetovanja hrvatskih voćara s međunarodnim sudjelovanjem, Sv. Martin na Muri, 30

13. Barić B., Pauković M., Bertić D., Pajač I. (2007). Impact of Success Bait (a.i. spinosad) against *Rhagoletis cerasi* on insect fauna in field test. *In*: Vogt H, Jansen J-P, Vinuela E, Medina P (eds) IOBC Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms", Book of Abstracts, Berlin, Njemačka, 11
14. Vitasović Kosić I., Pajač M., Pajač I. (2007). Vaskularna flora pokušališta "Jazbina". *U*: Britvec M, Škvorc Ž (ur.) 2. hrvatski botanički kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Knjiga sažetaka, Zagreb, 57-57

Stručni radovi:

1. Voigt E., Šubić M., Barić B., Pajač I., Tóth M. (2012). A szintetikus táplálkozási csalétek fontossága gyümölcskárosító fűrőlegyek (*Rhagoletis* spp.) csapdázásában. *Agrofórum extra* 43 (siječanj): 82-86
2. Pajač I. (2011). Integrirana proizvodnja voća. *Gospodarski list* (15. kolovoza): 51-52
3. Pajač I. (2011). Ose štetnici voća u zrenju. *Gospodarski list* (1. srpnja): 41
4. Pajač I. (2011). Štetnici plodova voćaka. *Gospodarski list* (1. srpnja): 38-40
5. Pajač I. (2011). Prvi pregled voćaka na crvenog voćnog pauka. *Gospodarski list* (1. travnja): 21
6. Barić B., Pajač I. (2011). Sadašnjost i budućnost integrirane zaštite voćaka u Hrvatskoj. *Nova zemlja, Revija za vrt, obitelj i agrar. Osijek*, (63): 14-15
7. Pajač I. (2011). Vinska muha pjegavih krila – novi štetnik. *Gospodarski list* (15. veljače): 17-18
8. Pajač I. (2010). Filoksera prilagodljiva različitim uvjetima. *Gospodarski list* (23./24. prosinca): 56

9. Pajač I. (2010). Staklokričke – štetnici drva voćaka. *Gospodarski list* (15. studenoga): 29
10. Pajač I. (2010). Zlatne mare - ozbiljni štetnici u voćarskoj proizvodnji. *Gospodarski list* (1. rujna): 20
11. Pajač I. (2010). Zlatooke – indikatori štetnosti insekticida. *Gospodarski list* (20. srpnja): 18
12. Pajač I. (2010). Suzbijanje jabukovog savijača bez kemijskih preparata. *Gospodarski list* (1. svibnja): 23-24
13. Barić B., Pajač I. (2010). Štetočinje agruma i mogućnosti integrirane proizvodnje. *Nova zemlja, Revija za vrt, obitelj i agrar*, (56): 30-31