

Prof. dr. sc. Vlatka Rozman¹, Dr. sc. Zlatko Korunić², Doc. dr. sc. Anita Liška¹

¹ Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Zavod za zaštitu bilja, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

² Diatom Research and Consulting Inc., Toronto, Canada

Rezistentnost štetnika na fosfin i biotestovi

Općenito o rezistentnosti

Rezistentnost predstavlja otpornost jedinki u populaciji štetnika da prežive izloženost letalnim dozama primjenjenog sredstva. Stručna grupa koja prati pojave rezistencije insekata u svijetu (IRAC- Insecticide Resistance Action Committee) objašnjava rezistentnost kao nasljedne promjene u osjetljivosti populacije štetočinja na određeni kemijski spoj, tj. na pesticide. Nasljedne promjene nastale su kao posljedica mutacije gena kod pojedinih jedinki populacije uslijed raznih faktora. Treba istaknuti da se ta mutacija dogodila prije bilo kakve uporabe određenog pesticida, tj. insekticida. Jedinke u populaciji koje imaju takve mutirane gene postaju otporne na pesticide. Nakon izlaganja populacije insekata s jedinkama koje imaju mutirane gene, jedinke bez tog gena ugibaju, a jedinke s mutiranim genom prežive i daju potomstvo u kojem se nalazi još veći broj jedinki s mutiranim genom. Svakom daljnom generacijom broj otpornih jedinki raste i uporaba istog pesticida i iste doze, tj. koncentracije postaje sve više neučinkovitija.

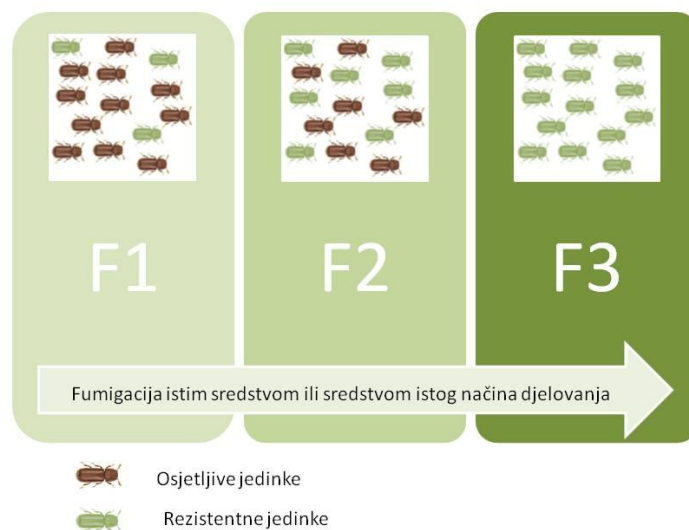
Rezistentne jedinke u populaciji štetnika ne razlikuju se po svom vanjskom izgledu (fenotipu) u odnosu na normalno osjetljive jedinke.

Osim genetski uvjetovane otpornosti, postoji i otpornost nastala kao posljedica morfološke različitosti jedinki ili razlike u ponašanju jedinki iste populacije.

Unakrsna rezistentnost (eng. «cross resistance») je sposobnost toleriranja učinkovitosti dvije vrste sredstava iz različitih kemijskih skupina istog mehanizma djelovanja.

Višestruka rezistentnost (eng. “multiple resistance”) je sposobnost toleriranja na više sredstava iz više od jedne kemijske skupine.

Na terenu, možemo primjetiti da primjenjivano sredstvo postupno gubi svoju učinkovitost, a nastaje nakon što je populacija štetnika bila tijekom dužeg razdoblja tretirana istim sredstvom ili sredstvom istog načina djelovanja, čime se ubija većina osjetljivih jedinki, dok rezistentne preživljavaju iz generacije u generaciju (Slika 1.). Nakon nekoliko generacija, rezistentne jedinke u populaciji prevladaju i primjenjivano sredstvo više nije učinkovito.



Slika 1. Prikaz nastanka rezistencije (izvor: original)

Rezistentnost na fosfin

Fosfin je široko rasprostranjen fumigant koji se koristi u kontroli štetnih insekata gotovo pola stoljeća (Price i Mills, 1988.; Chaudhry, 2000.). Rezistentnost na fosfin je sve veći problem praktično u cijelom svijetu (Champ i Dyte, 1976.; Price i Mills, 1988.). Prvo globalno istraživanje prema podacima koje je objavila FAO 1972./1973. godinu potvrđuje da 10% prikupljenih populacija štetnika sadrži fosfin rezistentne jedinke. Danas se zna da je rezistentnost na fosfin prisutna kod najmanje 11 vrsta skladišnih insekata u 45 zemalja te da lista i dalje raste.

Fosfin je daleko najrašireniji fumigant prvenstveno zbog svoje niske cijene, brzog djelovanja (difuzije u zraku), kao i zbog nedovoljno podataka o reziduama (Chaudhry, 2000.). Međutim, dugoročno uporaba ovog fumiganta povećava rizik od razvoja fosfin rezistentnih populacija (Benhalima *et al.*, 2004.). Značajno se uporaba fosfina povećala i zbog ukidanja uporabe metilbromida. Osim toga, neadekvatni hermetički uvjeti prilikom fumigacije objekata često su uzrok neuspjeha, čime se povećava učestalost aplikacije (Pacheco *et al.*, 1990.; Chaudhry, 2000.; Benhalima *et al.*, 2004.). Takav način čestog ponavljanja fumigacije pogoduje razvoju fosfin rezistentnih populacija (Chaudhry, 1997., 2000.).

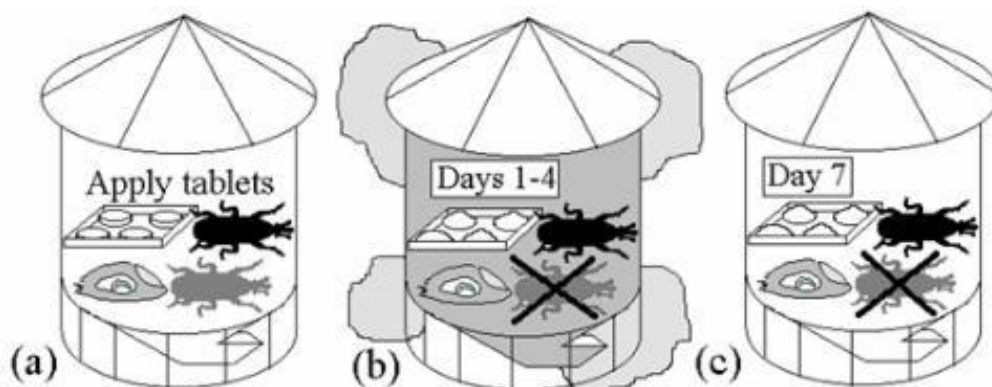
Specifičnost rezistencije na fosfin je u tome što R insekti (rezistentni insekti) u pravilu apsorbiraju vrlo male količine fosfina u odnosu na normalno osjetljive jedinke u populaciji. To ukazuje da mehanizam rezistencije uključuje „aktivno isključenje“ fosfina (Price, 1984.). Prema genetičkim istraživanjima, potvrđeno je da je za rezistentnost na fosfin odgovorno najvjerojatnije dva gena te se pretpostavlja da većina fosfina kojeg su inhalirali R insekti nikada ne stiže na mjesto djelovanja i detoksira se negdje dalje ili je to mjesto neosjetljivo na fosfin.

Toksičnost fosfina se razlikuje u odnosu na ostale fumigante. U pravilu, produžena ekspozicija fosfina daje bolje efekte u suzbijanju insekata nego povišene koncentracije, jer povišene koncentracije dovode većinu insekata u stanje narkoze, što ih može štititi od toksičnog efekta. Istraživanja su dokazala da R insekti mogu preživjeti povišene koncentracije fosfina kroz neko vrijeme, ali ne mogu preživjeti i produžene ekspozicije čak pri nižim koncentracijama. Stoga je glavna strategija postizanja maksimalne učinkovitosti fosfina u suzbijanju svih razvojnih stadija insekata (uključujući i rezistentne jedinke) produženje vremena ekspozicije uz dobru hermetizaciju, a nikako nepotrebno povećanje koncentracije.

Detaljna studija je dokazala da ekspozicija najmanje 0.33 mg^{-1} (240 ppm) fosfina kroz 14 dana u tropskim uvjetima je dovoljna za kompletnu kontrolu skladišnih insekata, uključujući i one rezistentne na fosfin (Mahmood *et al.*, 1991.).

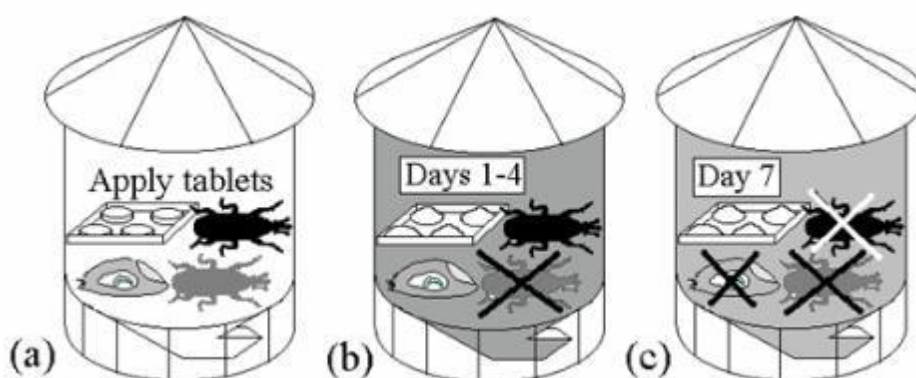
Efektivni način produženja ekspozicije je fumigacija hermetički zatvorenih prostora (Graver i Annis, 1994.). Također je moguće postići produženje ekspozicije fosfina i u polu-hermetičkim uvjetima, no tada se povećavanjem gubitaka plina povećavaju i troškovi same fumigacije.

O utjecaju hermetizacije prostora tijekom fumigacije fosfinom (Slike 2. i 3.) na nastanak rezistentnih populacija opisano je šematskim prikazima australskog DAFF-a (The Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Queensland Government). Uočljivo je da produžena ekspozicija i konstantna koncentracija plina u dobro hermetiziranom objektu osigurava sigurno suzbijanje svih razvojnih stadija insekata, kao i rezistentnih populacija.



Slika 2. Primjer fumigacije fosfinom kod nehermetiziranog silosa (Izvor: Department of Primary Industries and Fisheries, http://www.dpi.qld.gov.au/26_4820.htm):

- a - primjena fosfin tableta u silosu sa živim odraslim insektima i nezrelim razvojnim stadijima (jajašca, ličinke, kukuljice) unutar zrna
- b - tijekom prvih par dana, tablete oslobađaju plin fosfin koji brzo ubija osjetljive odrasle insekte (siva boja), ali ne jajašca i kukuljice unutar zrna, kao niti rezistentne insekte (crna boja), dok plin fosfin izlazi iz silosa
- c - nakon 7 dana zaostaje vrlo malo fosfina u silosu, a jajašca, kukuljice i rezistentni insekti preživljavaju



Slika 3. Primjer fumigacije fosfinom kod dobro hermetiziranog silosa (Izvor: Department of Primary Industries and Fisheries, http://www.dpi.qld.gov.au/26_6467.htm):

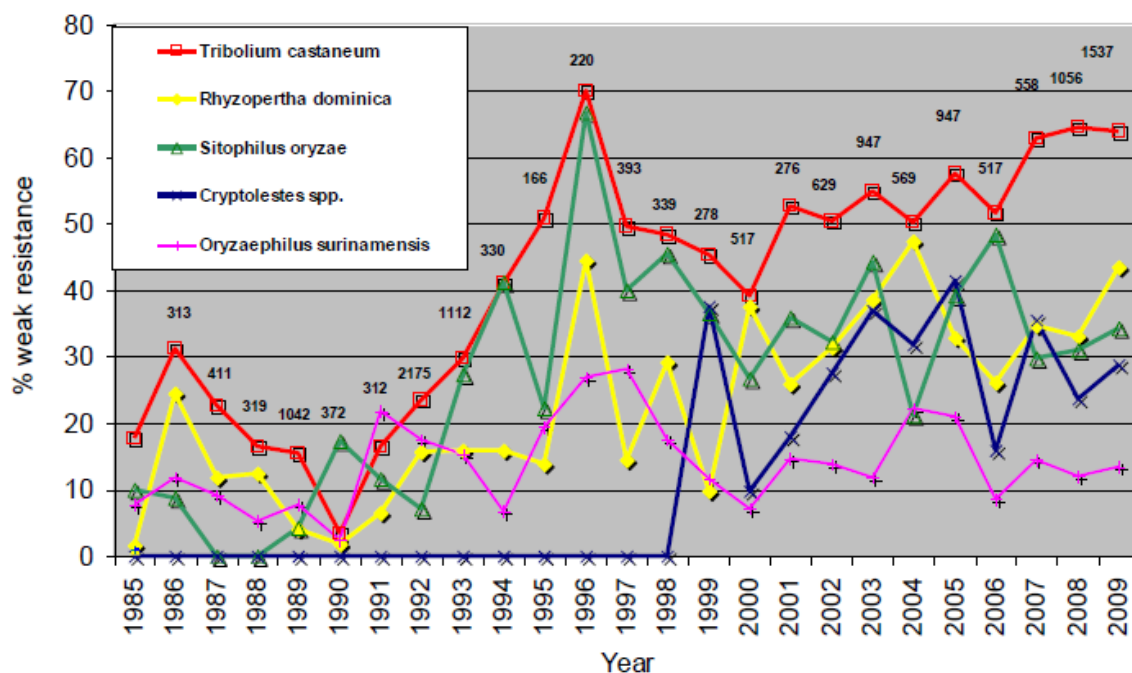
- a - primjena fosfin tableta u silosu sa živim odraslim insektima i nezrelim razvojnim stadijima (jajašca, ličinke, kukuljice) unutar zrna
- b - tijekom prvih par dana, tablete oslobađaju plin fosfin koji brzo ubija osjetljive odrasle insekte (siva boja), ali ne jajašca i kukuljice unutar zrna, kao niti rezistentne insekte (crna boja)
- c - nakon 7 dana, plin fosfin zaostaje u silosu u dovoljno visokoj koncentraciji i ubija jajašca, kukuljice i rezistentne insekte

Detaljnije pojava rezistentnosti na fosfin i druge registrirane fumigante u svijetu (primjeri iz svijeta)

Najveći svjetski izvoznici žitarica, kao što su Australija, Kina, SAD i Brazil suočeni su sa sve većom pojavom rezistentnih vrsta na fosfin, s obzirom da se radi o zemljama koje fosfin najviše i koriste u svojoj praksi.

U Australiji je izrazita rezistentnost na fosfin prvi put otkrivena kod žitnog kukuljičara *Rhyzopertha dominika* (F.), potom kod rđastog brašnara *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Collins, 1998) te kasnije kod surinamskog brašnara, *Oryzaephilus surinamensis* (L.) i kestenjastog brašnara *Tribolium castaneum* (Herbst).

Da se radi o uzlaznom trendu porasta rezistentnih populacija glavnih skladišnih štetnika, najbolje govore noviji podaci za Zapadnu Australiju (Slika 4.), gdje je evidentno da je najveći broj rezistentnih populacija detektiran kod kestenjastog brašnara. Stoga je australska vlada u zakonskoj regulativi definirala modele strategije koji će limitirati razvoj i distribuciju rezistentnih vrsta na fosfin (Newman, 2010.).



Slika 4. Razvoj rezistentnosti na fosfin na skladišnim vrstama štetnika Zapadne Australiji od 1985 – 2009. (izvor: Newman, 2010.)

U Brazilu je prema prvim službenim podacima (Pimentel *et al.*, 2009.) od 22 ispitivane populacije kukuruznog žiška *Sitophilus zeamais* (Motsch.) čak 20 populacija rezistentno na fosfin i to u rasponu od 1,1 do 86,6 puta.

Također, značajna osobina R insekata je i sposobnost toleriranja učinaka nekoliko fumiganata, što znači da ako su rezistentni na jedan fumigant mogu biti, i u nekim slučajevima i jesu, rezistentni i na druge fumigante (Tablica 1.). Vidljivo je da su žitni žišci selektirani metilbromidom također rezistentni na nekoliko drugih fumiganata i da su sve razine "cross-resistance" značajne u smislu praktičnog suzbijanja. Ipak, ovakva "cross-resistance" nije utvrđena u insekata selektiranih fosfinom (Monro *et al.*, 1972.) ili etilen dibromidom (Bond, 1973.).

Tablica 1. Reakcija metilbromid rezistentnog žitnog žiška na šest drugih fumiganata. Doziranje u mg/l za 5h, pri 25 °C nužnih za 50 % mortalitet (Monro *et al.*, 1961.).

FUMIGANT	REZISTENTNOST	NORMALNO	STOPA TOLERANTNOSTI
Metilbromid	19.7	3.6	5.5
HCN	16.4	8.2	2.0
Akronitril	4.9	1.05	4.7
Etilen oksid	20.1	4.1	4.8
Klorpikrin	6.6	3.9	1.7
Fosfin	13.0	2.2	5.9
Etilen dibromid	8.5	2.85	3.0

Od navedenih fumiganata u Tablici 1. u nas dozvolu za uporabu u skladištima ima samo fosfin. Europska komisija je donijela odluku o neuvrštanju na Aneks I. Direktive 91/414/EEC nizu sredstava

za zaštitu bilja čiji se promet zabranjuje, tj. kojima prestaje valjanost rješenja o registraciji. Sukladno navedenom i Odjel sredstava za zaštitu bilja Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske donosi rješenja (Klasa: 320-20/08-01/392 i Klasa: 320-20/08-01/392, Urbroj: 525-02-08-1 od 31.12.2008.) kojim se odredilo da je metilbromid bio dopušten za prodaju i primjenu krajnim korisnicima u Republici Hrvatskoj do 1. listopada 2010. godine.

Kako bi se bolje razradili modeli i mogućnosti upravljanja rezistentnošću, u svijetu se determinacija vrsta sve više ispituje na molekularnoj razini te se prave svjetske baze za gen karte bioraznolikosti i identificiraju molekularni markeri za pojedine vrste štetnika i njihovih rezistentnih oblika. Trenutno se najviše molekularnih istraživanja provodi na kestenjastom brašнару *Tribolium castaneum* Herbst. i prašnim ušima (*Psocoptera*) (IWCSPP, 2010.; Yang *et al.*, 2011.).

Kako utvrditi rezistentnost na fosfin

Za nadzor i detekciju početne pojave rezistentnosti u prirodnim populacijama štetnika potrebno je primijeniti *diskriminativnu dozu* fosfina za koju se očekuje da će uništiti sve osjetljive primjerke. Diskriminativna doza odgovara dozi nešto iznad LD(99.9). U Tablici 2. prikazani su podaci koji potvrđuju pretpostavku o mogućoj pojavi rezistentnosti pojedinih skladišnih štetnika na fumigante u nas.

Tablica 2. Normalna osjetljivost za fosfin s diskriminativnim dozama (Busvine, 1980.)

FOSFIN (ekspozicija - 20 sati)	LD (50)	LD (99.9)	Diskriminativne doze
	mg/l		
<i>Sitophilus oryzae</i> (L.)	0.011	0.039	0.04
<i>S. zeamais</i> (Motsch.)	0.007	0.013	0.04
<i>S. granarius</i> (L.)	0.013	0.041	0.07
<i>Rhyzopertha dominica</i> (F.)	0.008	0.028	0.03
<i>Tribolium castaneum</i> (Herbst)	0.009	0.028	0.04
<i>T. confusum</i> (Duv.)	0.011	0.029	0.05
<i>Oryzaephilus surinamensis</i> (L.)	0.012	0.036	0.05
<i>O. mercator</i> (Fauv.)	0.011	0.034	0.05

Kod primjene diskriminativnog testa s fumigantima uvijek se savjetuje napraviti pripremu za abnormalne koncentracije. Ako je dobivena koncentracija manja od diskriminativne koncentracije to će biti otkriveno abnormalnim preživljavanjem osjetljive referentne vrste. Alternativni pristup je korištenje tri doziranja, jedno s diskriminativnom dozom, jedno na razini s oko LD(90) i drugo na ekvivalentnoj razini iznad diskriminativne doze.

Redovni nadzor treba detektirati čak i mali broj prisutnih R insekata. Po uzorku bi trebalo biti minimum 100 insekata (2 x 50). Ako, postoji sumnja ozbiljne rezistentnosti, jedan test s malim brojevima (10 do 20) mogu osigurati neprocjenjivu ranu indikaciju.

Ovi insekti su izloženi diskriminativnoj dozi za odgovarajuće razdoblje na uobičajen način. Ako su svi ovi insekti uništeni na kraju razdoblja održavanja podtretmana, uzorak može biti klasificiran kao „neutvrđena rezistentnost“, a medij u kojem se čuvaju smješta se u zagrijanu pećnicu kako bi se uništila kultura. S druge strane, prisutnost preživjelih insekata na kraju ovog testa treba smatrati kao dokaz moguće rezistentnosti i dalje istraživati.

Opis biotestova, zašto su potrebni

Biotestovi predstavljaju testove dokazivanja postojanja rezistentnosti. Ponekad pojava insekata na koje nije bilo utjecaja u diskriminativnom testu može biti posljedica prisutnosti neuobičajeno tolerantnih jedinki normalne populacije. Ukoliko su uvjeti ekspozicije, fiziološki status insekata i doziranje konzistentni, vjerojatnost jednog insekta u seriji od 100 na kojeg ne bi bilo utjecaja je manja od 0.1, tj. manje od jednog u 10 testova. Važno je utvrditi je li necjelovita reakcija posljedica ovakvih uzroka ili prave rezistentnosti. To se može provjeriti na sljedeći način:

- Test je moguće ponoviti uporabom drugih uzoraka iste populacije insekata s tog mjesta. Mogućnosti slučajne pogreške kao reakcija određene jedinice u svakom od sukcesivnih testova progresivno opada (manje od 0.01, 0.001, 0.0001 itd.). Stoga se kontinuirana pojava omjera jedinki na koje nije bilo utjecaja može razmatrati kao dokaz rezistentnosti.
- Alternativno se insekte na koje nije bilo utjecaja u diskriminativnom testu može zadržati i koristiti za uzgoj budućih generacija. Ako je u pitanju rezistentnost, značajno veći omjer njihovog potomstva neće reagirati na diskriminativnu dozu.
- Ako ovi testovi potvrde postojanje R insekata, treba provesti opsežno testiranje radi utvrđivanja stupnja rezistentnosti, što podrazumijeva sljedeće:
 1. Stvaranje baze podataka iz poznatih rezistentnih populacija
 2. Uporaba diskriminativnih koncentracija za određivanje rezistentnih sojeva
 3. Cjelovito definiranje rezistentnosti i usporedba rezultata mortaliteta na serije koncentracija fumiganta rezistentnih i osjetljivih sojeva.

Načini izbjegavanja rezistentnosti

1. Što bolja implementacija svih načela integriranih mjera zaštite u praksu.
2. Što manje uporaba fumiganata u praksi (samo ako je krajnje nužno).
3. Gdje je nužna fumigacija, treba provoditi temeljit nadzor nad provedbom, kako ne bi došlo do propusta (npr. prilikom hermetizacije).
4. 100 % mortalitet svih insekata u tretmanu najbolje je jamstvo protiv rezistentnosti.
5. Poželjna produžena ekspozicija fosfina uz potpunu hermetizaciju.
6. **Mjera koja nije preporučljiva je povećanje doziranja pri rješavanju problema rezistentnosti.** Svaki insekt koji je preživio povećane doze može razviti čak i viši stupanj rezistentnosti od one koja bi se pojavila uz uobičajeno preporučeni tretman.

Literatura

- Benhalima H., Chaudhry M. Q., Mills K. A., Price N. R., 2004. Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. *Journal of Stored Products Research* 40, 241-249.
- Bond E. J., 1973. increased tolerance to ethylene dibromide in a field population of *Tribolium castaneum* (Herbst.). *Journal of Stored Product Research*, 9:61-63.
- Busvine J. R., 1980. Statistical Principles of the Detection and Measurement of Resistance Correction for control Mortality. Towards integrated commodity and pest management in grain storage, Section 8. A Training Manual for application in humid tropical storage systems, Department of Agriculture, June 6-18, 1988, Philippines. www.fao.org/docrep/x5048e/x5048E00.htm#Contents
- Carvalho M. O., Fields P. G., Adler C. S., Arthur F. H., Athanassiou C. G., Campbell J. F., Fleurat-Lessard F., Flinn P. W., Hodges R. J., Isikber A. A., Navarro S., Noyes R., Riudavets T., J., Sinha K. K., Thorpe G. R., Timlick B. H., Trematerra P., White N. D. G., 2010. „Proceedings of the 10th International Working Conference on Stored Product Protection“ IWCSPP 2010. Izdavač: Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI)

- Champ B. R., Dyte C. E., 1976. Report on the FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. FAO Plant Protection and Production Services No. 5, FAO, Rome.
- Chaudhry M. Q., 1997. A review of the mechanisms involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored-product insects. *Pesticide Science* 49, 213-228.
- Chaudhry M. Q., 2000. Phosphine resistance. *Pesticide Outlook* 3, 88-91.
- Collins P. J., 1998. Resistance to grain protectants and fumigants in insect pests of stored products in Australia. H. J. Banks, E. J. Wright, K. A. Damcevski (Eds.), *Stored Grain in Australia. Proceedings of the Australian Post-harvest Technical Conference. Canberra, 26–29 May 1998, CSIRO, Canberra, Australia (1998)*, pp. 55–57.
- FAO, 1975. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. 16: Tentative method for adults of some stored cereals, with methyl bromide and phosphine. *FAO Plant Protection Bulletin* 23, 12-25.
- Graver J. Van S., Annis P. S., 1994. Suggested recommendations for the fumigation of grain in the ASEAN Region: Part 3. Phosphine fumigation of bag-stacks in plastic enclosures: an operations manual, ASEAN Food Handling Bureau (AFHB), Kuala Lumpur, Malaysia, 79pp.
- IRAC - Insecticide Resistance Action Committee: Resistance Management for Sustainable Agriculture and Improved Public Health. <http://www.iraconline.org/about/resistance/>
- Mahmood T., Ahmed M.S., Javed M. A., Iqbal M., 1991. Determination of phosphine dosage for the control of resistant stored grain insect pests in Pakistan, in *Proc. Bulk Wheat Handling and Storage Conference, Lahore, Pakistan, June 17-19, 1991*, pp 155-169, Kansas State University Food and Feed Grain Institute, Kansas USA.
- Monro H. A. U., Musgrave A. J., Upitis E., 1961. Induced tolerance of stored product beetles to methyl bromide. *Ann. Appl. Biol.*, 49:373-377.
- Monro H. A. U., Upitis E., Bond E. J., 1972. Resistance of laboratory strains of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera, Curculionidae), to phosphine. *Journal of Stored Product Research*, 8: 199-202.
- Newman C. R., 2010. A novel approach to limit the development of phosphine resistance in Western Australia. *Proceedings of the 10th International Working Conference on Stored Product Protection – IWCSPP 2010*. Izdavač: Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI):1040-1046.
- Pacheco I. A., Sartori M. R., Taylor R. W. D., 1990. Levantamento de resistência de insetos-praga de grãos armazenados à fosfina, no estado de São Paulo. *Coletânea do ITAL* 20, 144-154.
- Pimentel M. A. G., Faroni L. R. D' A., Guedes R. N. C., Sousa A. H., Tótola M. R., 2009. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Journal of Stored Products Research*, Volume 45, Issue 1, pp. 71-74.
- Price N. R., 1984. Active exclusion of phosphine as a mechanism of resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research* 20, 163-168.
- Price L. A., Mills K. A., 1988. The toxicity of phosphine to the immature stages of resistant and susceptible strains of some common stored product beetles, and implications for their control. *Journal of Stored Products Research* 24, 51-59.
- Queensland Government, The Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (DAFF) 2012. Resistance of grain storage insects to phosphine fumigant and protectant insecticides. http://www.dpi.qld.gov.au/26_4801.htm
- Yang Q., Li, Kučerová Z., Kalinović I., Stejskal V., 2011. Diagnosis of *Liposcelis entomophila* (Psocodea: Liposcelididae) – comparison of morphological characters and sequences of 16S rDNA and COI. *Zbornik radova seminara DDD i ZUPP 2011 – prva linija borbe protiv zaraznih bolesti, Pula 22.-25.03.2011, KORUNIĆ d.o.o. Zagreb*, str: 283-293.