

IZVORNI ZNANSTVENI RAD

Kontaktna toksičnost komponenata eteričnih ulja na imago kestenjastog brašnara *Tribolium castaneum* (Herbst)

Anita Liška, Pavo Lucić, Vlatka Rozman

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d, Osijek, Hrvatska (e-mail: aliska@pfos.hr)

Sažetak

Rad opisuje laboratorijska ispitivanja kontaktne toksičnosti komponenata eteričnih ulja (1,8-cineola, eugenola i kamfora) na imago kestenjastog brašnara *Tribolium castaneum* (Herbst). Cilj istraživanja je iznalaženje novih organskih insekticida za imago ispitivane vrste skladišnog štetnika. Izolati su testirani u 4 doze: 0,2, 1,0, 5,0 i 10,0 µl/imago, a mortalitet imaga je očitavan kroz tri ekspozicije (2, 4 i 24 h). Ostvaren je 100%-tni mortalitet komponentom 1,8-cineol i to s najnižom koncentracijom. Komponentom eugenol postignut je maksimalni mortalitet tek nakon ekspozicije od 24 h, dok je kamforom postignut najniži mortalitet kod imaga, i to statistički značajno u odnosu na ostale dvije komponente.

Cljučne riječi: kontaktna toksičnost, *Tribolium castaneum*, 1,8-cineol, eugenol, kamfor

Uvod

Kemijsko suzbijanje je efektivna strategija koja se koristi u praksi kontrole skladišnih štetnika. Međutim, raširena uporaba sintetičkih pesticida dovela je do mnogo negativnih posljedica (Pavela, 2008.); oštećenje ozonskog sloja (metil bromid), fitotoksičnost, ostaci pesticida u hrani, sve veća rezistentnost štetnika i ostalo. Pesticidne biljke kao i njene komponente prisutne su milijunima godina u prirodi bez bolesti i negativnih utjecaja na ekosustav (Isman, 2000.). Fitokemikalije se razgrađuju brzo i vrlo je mala vjerojatnost da se zadrže u tlu. Također često imaju smanjen utjecaj na ne ciljane populacije stoga su vrlo važna komponenta integriranog sustava kontrole štetnika, korišteni od strane uzgajivača koji se bave organskim uzgojem. Iz tih razloga znanstvenici su svoja istraživanja vezana za kontrolu štetnika, jednim dijelom usmjerili u potrazi za aktivnim prirodnim proizvodima iz biljkaka kao alternativu konvencionalnim insekticidima (Isman, 2008.). Eterična ulja su među najpoznatijim tvarima testirana protiv kukaca (Pitasawat i sur., 2007.). Komponente eteričnih ulja djeluju fumigantno (Choi i sur., 2006.), kontaktno (Tang i sur., 2007.), repelentno (Islam i sur., 2009.) i protuizjedajuće (Gonzalez-Coloma i sur., 2006.). Jedna od najatraktivnijih značajki eteričnih ulja je da su proizvodi niskog rizika. Njihova toksičnost prema sisavcima je vrlo niska te su vrlo dobro eksperimentalno i klinički proučeni, prvenstveno zbog njihove uporabe u medicinske svrhe (Regnault-Roger i sur., 2012.). Ovim istraživanjem ispitali smo kontaktno djelovanje 3 komponente eteričnih ulja: 1,8-cineol, eugenol i kamfor na razvojni stadij imaga vrste kestenjastog brašnara *Tribolium castaneum* (Herbst) starosti 2-4 tjedna.

Materijal i metode

Komponente 1,8-cineol, eugenol i kamfor nabavljene su od proizvođača „Sigma-Aldrich“ i „Fluka“. Eugenol i 1,8-cineol su u tekućem obliku, a kamfor u kristalnom, koji je otopljen u 96%-tnom alkoholu (etanolu) u omjeru 1:1 g ml⁻¹ (Bećirević-Laćan i Jug, 2007.). Kontaktna toksičnost obavljena je modificiranom procedurom prema Obeng-Ofori i sur. (1998.) na stadij imaga vrste kestenjastog brašnara starosti 2-4 tjedna. Komponente 1,8-cineol, eugenol i kamfor su aplicirane „Kartell“ mikropipetom na toraks imaga u 4

koncentracije: 0,2; 1,0; 5,0 i 10,0 μl na svaku jedinku pojedinačno (100 imaga po uzorku). Kontrola relevantna za suspenziju kamfora obavljena je sa slijedećim koncentracijama etanola (0,2; 0,5; 2,5 i 5,0 μl), a za 1,8-cineol i eugenol bez aplikacije ulja u istim uvjetima. Kontaktni efekt određen je ekspozicijom djelovanja komponenata po letalnim koncentracijama nakon 2, 4 i 24 h (Huang i sur., 2000.).

Pokus je postavljen po potpuno slučajnom planu u 4 ponavljanja za svaku komponentu, za sve testirane koncentracije te kontrolu bez aplikacije ulja i kontrolu s etanolom. Statistička obrada prikupljenih podataka provedena je programom Statistica, Release 8 (1984.-2008.). Mortalitet ispitivanih jedinki imaga izražen je u postotku i prikazan vremenskim serijama (h) djelovanja komponenata i pripadajućih koncentracija. Rezultati kontaktne učinkovitosti komponenata statistički su obrađeni analizom varijance ANOVA, a značajnost razlika utvrđena je LSD testom na razini vjerojatnosti 0,05.

Rezultati i rasprava

Testiranje kontaktne učinkovitosti komponenta na stadij imaga *T. castaneum* rezultiralo je različitim osjetljivošću testiranih jedinki ovisno o komponenti, koncentraciji i vremenu ekspozicije. Komponenta 1,8-cineol je pri najnižoj koncentraciji (0,2 $\mu\text{l}/\text{imago}$) te u najkraćem vremenu ekspozicije (2 h) postigala 100%-tni mortalitet imaga (Tablica 1.).

Komponenta eugenol je postigala značajno viši mortalitet imaga u odnosu na svoju kontrolu (Tablica 2.), a mortalitet se kretao od 74,75% - 100%, ovisno o koncentraciji i vremenu ekspozicije.

Također, statistički opravdane razlike dokazane su između kamfora i kontrole s etanolom u svim primijenjenim koncentracijama (Tablica 3.).

Uspoređujući prosječnu učinkovitost pojedinih komponenata (Tablica 4.) nakon kontaktne primjene, vidljivo je da je s 1,8-cineolom postignut najbolji mortalitet (100%) imaga *T. castaneum* već nakon 2 h ekspozicije, pri najnižoj koncentraciji (0,2 $\mu\text{l}/\text{imago}$). Po prosječnoj učinkovitosti slijedi eugenol, dok je kamforom postignut prosječno najniži mortalitet imaga i nakon 24 h ekspozicije. S eugenolom je 100%-tni mortalitet imaga postignut tek produženom ekspozicijom od 24 h pri 0,2 $\mu\text{l}/\text{imago}$. Brže djelovanje komponente eugenol (nakon 2 h ekspozicije), postignuto je povišenjem koncentracije s 0,2 μl na 10 $\mu\text{l}/\text{imago}$, čime je zadržan mortalitet imaga u rangu visoke učinkovitosti. Nakon 2 h ekspozicije, komponenta kamfor je u svim primijenjenim koncentracijama imala statistički niži mortalitet u odnosu na prve dvije komponente. Osim toga, komponenta kamfor je imala i sporije djelovanje što pokazuje da je tek produženjem ekspozicije s 2 na 24 h (0,2 $\mu\text{l}/\text{imago}$) postignut mortalitet istog ranga kao i s komponentom eugenol nakon 2 h (0,2 $\mu\text{l}/\text{imago}$). Povećanjem koncentracije kamfora s 0,2 na 10 $\mu\text{l}/\text{imago}$, niti nakon 24 h nije rezultiralo statistički višim mortalitetom imaga *T. castaneum*.

Tablica 1. LSD-test kontaktne učinkovitosti 1,8-cineola za stadij imaga *T. castaneum* u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$)

Komponenta /kontrola	Koncentracija ($\mu\text{l}/\text{imago}$)	Mortalitet imaga <i>T. castaneum</i> (%)*		
		Ekspozicija		
		2 h	4 h	24 h
		$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$	$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$	$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$
1,8-cineol	0,2	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a
1,8-cineol	1,0	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a
1,8-cineol	5,0	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a
1,8-cineol	10,0	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a
Kontrola \emptyset	-	0,00 \pm 0,00 b	0,00 \pm 0,00 b	0,00 \pm 0,00 b

* srednje vrijednosti s istim slovom nemaju statistički značajne razlike na nivo $P < 0,05$; usporedba je po kolonama

Tablica 2. LSD-test kontaktne učinkovitosti eugenola za stadij imaga *T. castaneum* u odnosu na kontrolu (P<0,05)

Komponenta/ kontrola	Koncentracija ($\mu\text{l}/\text{imago}$)	Mortalitet imaga <i>T. castaneum</i> (%)*		
		Ekspozicija		
		2 h	4 h	24 h
		$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$	$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$	$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$
eugenol	0,2	74,75 \pm 5,15 c	87,50 \pm 5,60 bc	100,00 \pm 0,00 a
eugenol	1,0	82,00 \pm 1,15 c	93,00 \pm 1,00 b	100,00 \pm 0,00 a
eugenol	5,0	91,00 \pm 1,91 b	98,00 \pm 1,15 a	100,00 \pm 0,00 a
eugenol	10,0	95,00 \pm 1,00 b	98,00 \pm 1,15 a	100,00 \pm 0,00 a
Kontrola \emptyset	-	0,00 \pm 0,00 d	0,00 \pm 0,00 d	0,00 \pm 0,00 d

* srednje vrijednosti s istim slovom nemaju statistički značajne razlike na nivo P<0,05; usporedba je po kolonama

Tablica 3. LSD-test kontaktne učinkovitosti kamfora za stadij imaga *T. castaneum* u odnosu na kontrolu s etanolom (P<0,05)

Komponenta	Mortalitet imaga <i>T. castaneum</i> (%)*		
	Ekspozicija		
	2 h	4 h	24 h
	$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$	$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$	$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$
Koncentracija 0,2 $\mu\text{l}/\text{imago}$			
Kamfor	5,00 \pm 1,22 a	13,25 \pm 3,49 a	68,00 \pm 2,16 a
Kontrola ¹	0,00 \pm 0,00 b	0,25 \pm 0,25 b	2,75 \pm 1,10 b
Koncentracija 1,0 $\mu\text{l}/\text{imago}$			
Kamfor	7,75 \pm 0,85 a	20,25 \pm 1,10 a	74,75 \pm 6,34 a
Kontrola ²	0,5 \pm 0,28 b	1,25 \pm 0,69 b	4,75 \pm 1,18 b
Koncentracija 5,0 $\mu\text{l}/\text{imago}$			
Kamfor	7,25 \pm 0,47 a	19,00 \pm 0,70 a	74,25 \pm 3,35 a
Kontrola ³	0,00 \pm 0,00 b	0,00 \pm 0,00 b	2,00 \pm 1,08 b
Koncentracija 10,0 $\mu\text{l}/\text{imago}$			
Kamfor	6,25 \pm 1,37 a	18,00 \pm 0,00 a	78,50 \pm 6,84 a
Kontrola ⁴	0,50 \pm 0,50 b	0,75 \pm 0,75 b	3,00 \pm 0,57 b

* srednje vrijednosti s istim slovom nemaju statistički značajne razlike na nivo P<0,05; usporedba je po kolonama za svaku koncentraciju posebno

¹Kontrola s etanolom koncentracije 0,2 $\mu\text{l}/\text{imago}$; ²Kontrola s etanolom koncentracije 0,5 $\mu\text{l}/\text{imago}$; ³Kontrola s etanolom koncentracije 2,5 $\mu\text{l}/\text{imago}$; ⁴Kontrola s etanolom koncentracije 5,0 $\mu\text{l}/\text{imago}$

Tablica 4. LSD-test kontaktne učinkovitosti komponenata nakon 2, 4 i 24 h ekspozicije za stadij imaga *T. castaneum* (P<0,05)

Komponenta	Koncentracija ($\mu\text{l}/\text{imago}$)	Mortalitet imaga <i>T. castaneum</i> (%)*		
		Ekspozicija		
		2 h	4 h	24 h
		$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$	$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$	$\bar{X} \pm \text{Std.E.}$
1,8-cineol	0,2	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a
1,8-cineol	1,0	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a
1,8-cineol	5,0	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a
1,8-cineol	10,0	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a
eugenol	0,2	74,75 \pm 5,15 c	87,50 \pm 5,60 b	100,00 \pm 0,00 a
eugenol	1,0	82,00 \pm 1,15 b	93,00 \pm 1,00 b	100,00 \pm 0,00 a
eugenol	5,0	91,00 \pm 1,91 b	98,00 \pm 1,15 a	100,00 \pm 0,00 a
eugenol	10,0	95,00 \pm 1,00 ab	98,00 \pm 1,15 a	100,00 \pm 0,00 a
kamfor	0,2	5,00 \pm 1,22 e	13,25 \pm 3,49 de	68,00 \pm 2,16 c
kamfor	1,0	7,75 \pm 0,85 e	20,25 \pm 1,10 d	74,75 \pm 6,34 c
kamfor	5,0	7,25 \pm 0,47 e	19,00 \pm 0,70 d	74,25 \pm 3,35 c
kamfor	10,0	6,25 \pm 1,37 e	18,00 \pm 0,00 d	78,50 \pm 6,84 bc

* srednje vrijednosti s istim slovom nemaju statistički značajne razlike na nivo P<0,05; usporedba je po kolonama

Testirane tri komponente su prisutne u eteričnim uljima različitih biljnih vrsta uzgajanih u našoj zemlji (lavande - *L. angustifolia*, ružmarina - *R. officinalis*, timijana - *T. vulgaris*, lovora - *L. nobilis*). Kontaktnom aplikacijom, u našem istraživanju, ostvareni su pozitivni rezultati za sve tri testirane komponente na imago *T. castaneum*. Najbolji učinak pokazuje komponenta 1,8-cineol s maksimalnim mortalitetom (100%), pri najnižoj koncentraciji (0,2 $\mu\text{l}/\text{imago}$) i u najkraćem vremenu (2 h nakon ekspozicije). Po učinkovitosti slijedi komponenta eugenol (100%-tni mortalitet pri 0,2 $\mu\text{l}/\text{imago}$; ekspozicijom od 24 h), te komponenta kamfor (78,50% pri 10 $\mu\text{l}/\text{imago}$; ekspozicijom od 24 h). Slične rezultate učinkovitosti komponente 1,8-cineola, dobili su i znanstvenici Tripathi i sur. (2001.), gdje je imago *T. castaneum* pokazao osjetljivost na kontaktnu aplikaciju 1,8-cineola (LD_{50} i LC_{50} vrijednosti od 108,4 $\mu\text{g mg}^{-1}$ tjelesne težine imaga; odnosno 1,52 mg L^{-1} zraka). Nešto drukčije rezultate u odnosu na naše, dobili su autori Abdelgaleil i sur. (2009.), koji navode da je 1,8-cineol zajedno s drugim testiranim komponentama (kamfen, kamfor i mircen) imao vrlo slabo kontaktno djelovanje na imago *T. castaneum*. Gotovo iste rezultate kontaktne učinkovitosti eugenola, dobili su i autori Mondal i Khalequzzaman, (2010.), koji su u svom istraživanju, također dobili 100%-tni mortalitet imaga s najnižom koncentracijom (0,013 cm^{-1}) i pri najdužoj ekspoziciji (48 h). Kineski znanstvenici Qiantai i Yongcheng, (1998.) testirali su kontaktnu učinkovitost kamfora protiv vrsta *R. dominica*, *S. zeamais* i *T. castaneum*, te su zaključili da je kamfor efikasan za suzbijanje žitnog kukuljičara i žiška, dok za vrstu *T. castaneum* ima samo repelentno djelovanje ali ne i insekticidno. Primijenjenom metodikom u našem istraživanju, dokazano je kako komponenta kamfor ipak ima letalno djelovanje na imago *T. castaneum*, rezultirajući mortalitetom od 78,50% (pri koncentraciji od 10 $\mu\text{l}/\text{imago}$ nakon 24 h ekspozicije).

Zaključak

Ovim radom je utvrđena insekticidna učinkovitost 1,8-cineola, kamfora i eugenola na stadij imaga vrste kestenjastog brašnara *T. castaneum* pri starosti 2-4 tjedna. Redosljed komponenata po učinkovitosti je slijedeći: 1,8-cineol>eugenol>kamfor.

Napomena

Ovo istraživanje je provedeno unutar znanstvenog projekta «Bioaktivnost komponenti eteričnih ulja u zaštiti uskladištenih žitarica» (079-0790570-0430) financiranog od strane MZOŠ RH.

Literatura

- Abdelgaleil, S. A. M., Mohamed, M. I. E., Badawy, M. E. I., El-arami, S. A. A. (2009.): Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *Journal of Chemical Ecology* 35: 518-525.
- Bećirević-Lačan, M., Jug, M. (2007.): Oblikovanje lijekova, praktikum, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-beiokemijski fakultet, Zagreb.
- Choi W-S., Park B-S., Lee Y-H., Jang D. Y., Yoon H. Y., Lee S-E. (2006.): Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults; *Crop Protection*, 25 (2006.), pp. 398-401.
- Gonzalez-Coloma, A., Martin-Benito, D., Mohamed, N., Garcia-Vallejo, M. C., Soria, A. C. (2006.): Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different populations of *Lavandula luisieri* L.; *Biochemical Systematics and Ecology*, 34 (2006.), pp. 609-616.
- Huang, Y., Lam, S. L. and Ho, S. H. (2000.): Bioactivities of essential oil from *Elletaria cardamomum* (L.) Maton. to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Product Research* 36(2): 107-117.

- Islam, M. S., Hasan, M. M., Xiong, W., Zhang, S. C., Lei, C. L. (2009.): Fumigant and repellent activities of essential oil from *Coriandrum sativum* (L.) (Apiaceae) against red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae); *Journal of Pest Science*, 82 (2009.), pp. 171-177.
- Isman (2000.): MB. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protect.* 2000.;19:603-08.
- Isman (2008.): MB. Perspective botanical insecticides: For richer, for poorer. *Pest manag Sci.* 2008.;64:8-11.
- Mondal, M., Khalequzzaman, M. (2010.): Toxicity of naturally occurring compounds of essential oil against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Biological Sciences* 10(1): 10-17.
- Obeng-Ofori, D., Reichmuth, CH., Bekele, A.J., Hassanali, A. (1998): Toxicity and protectant potential of camphor, a major component of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum*, against four stored product beetles. *International Journal of Pest Management* 44(4): 203-209.
- Pavela, R. (2008.): Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 102 (2008.), pp. 555-559.
- Pitasawat, B., Champakaew, D., Choochote, W., Jitpakdi, A., Chaithong, U., Kanjanapothi, D., Rattanachanpichai, E., Tippawangkosol, P., Riyong, D., Tuetun, B., Chaiyasit, D. (2007.): Aromatic plant-derived essential oil: An alternative larvicide for mosquito control; *Fitoterapia*, 78 (2007.), pp. 205-210.
- Qiantai, L., Yongcheng, S. (1998.): Studies on effect of several plant materials against stored grain insects. *Proceedings of 7th International Working Conference on Stored – product Protection*, Beijing, China 1:870-874.
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., Arnason, J. T. (2012.): Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu Rev Entomol.* 2012.;57:405-24.
- Statistica Release 8, StatSoft Inc. 1984.-2008.
- Tang, G. W., Yang, C. J., Xie, L. D. (2007.): Extraction of *Trigonella foenum-graecum* L. by supercritical fluid CO₂ and its contact toxicity to *Rhyzopertha dominica* (Fabricus) (Coleoptera: Bostrichidae); *Journal Pest Science*, 80 (2007.), pp. 151-157.
- Tripathi, A. K., Prajapati, V., Aggarwal, K. K., Kumar, S. (2001.): Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1,8-cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum*. *Journal of Economic Entomology* 94(4): 979-983.

Contact toxicity of essential oil components against *Tribolium castaneum* (Herbst) imago

Abstract

The paper provides an explanation of laboratory tests on contact toxicity of essential oil components (1,8-cineole, eugenol, camphor) on red flour beetle adult *Tribolium castaneum* (Herbst). The aim of the research is to find new organic insecticide for the adult of tested species of stored pest. Isolates were tested in four doses: 0,2, 1,0, 5,0 and 10,0 µl/imago and the mortality rate was determined through three reading exposures (2, 4 and 24 h). The component 1,8-cineole reached a 100% mortality rate even with the lowest concentration (0,2 µl/imago). Eugenol has reached the maximum mortality rate but only after exposure of 24 h, while camphor showed the lowest mortality rate and also pointed out a statistically significant difference in mortality compared to other two isolates.

Key words: contact toxicity, *Tribolium castaneum*, 1,8-cineole, eugenol, camphor