

Anita Liška<sup>1\*</sup>, Vlatka Rozman<sup>1</sup>, Pavo Lucić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d, 31000 Osijek, Republika Hrvatska

## **Predstavljanje znanstveno istraživačkog projekta: „Procjena rezistentnosti *Tribolium castaneum* (Herbst) na fosfin“**

### **Sažetak**

*U ovome radu predstavljen je znanstveno istraživački projekt pod naslovom: „Procjena rezistentnosti *Tribolium castaneum* (Herbst) na fosfin“. Projekt je odobren i financiran od strane Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u trajanju od 12 mjeseci. Opći cilj projekta je unaprijediti čuvanje žitarica, uljarica i drugih proizvoda. Nadalje intencija nam je provjeriti ima li na užem području Slavonije i Baranje rezistentnih populacija *T. castaneum* - kestenjastog brašnara te ukoliko nema odrediti najniže učinkovite koncentracije fosfina za suzbijanje svih razvojnih stadija kestenjastog brašnara. Projektom se planiraju prikupiti populacije štetnika u uskladištenoj robi s nekoliko različitih lokacija Slavonije i Baranje. Testiranje rezistentnosti obavit će se na F1 generaciji u stadiju imaga, primjenom diskriminativne doze, prema FAO standardnoj metodi. Ukoliko među populacijama brašnara ne bude preživjelih jedinki nakon izlaganja diskriminativnoj dozi, izvršit će se testiranje najniže doze fosfina potrebne za suzbijanje nerezistentnih populacija brašnara. Ovim istraživanjem prvenstveno želimo dobiti odgovor na to kakvo je stanje s osjetljivošću kestenjastog brašnara na fosfin. Obzirom da još nisu rađena istraživanja ovoga tipa na području Slavonije i Baranje, rezultati će biti vrlo vrijedni za određivanje postupaka suzbijanja rezistentnih populacija kestenjastog brašnara u nas.*

**Ključne riječi:** *Tribolium castaneum*, fumigacija, fosfin, rezistentnost, Slavonija i Baranja, uskladištene žitarice i uljarice.

### **Uvod**

Fosfin kao fumigant u praksi ima povijest od skoro 80 godina te je kroz to razdoblje vrlo dobro afirmiran kao sredstvo za fumigaciju uskladištene robe na svjetskoj razini (Taylor R.W.D., 1989.; Lorini I. *et al.*, 2007.). Tijekom globalnog istraživanja senzibilnosti na pesticide koje je provela FAO organizacija pri UN (Champ B.R. i Dyte C.E., 1976.) uočena je rezistencija štetnika uskladištenih proizvoda u 33 od 82 zemlje. Globalno, situacija se zadnja dva desetljeća dodatno pogoršala i u frekvenciji i u razini

---

\* e-mail adresa: [aliska@pfos.hr](mailto:aliska@pfos.hr)

rezistencije (Mills K.A., 1983., Taylor R.W.D., 1989., Zettler J.L., 1997., Nayak M.K. *et al.*, 2003., Collins P.J. *et al.*, 2005., Lorini I. *et al.*, 2007). Chaundry M.Q. (2000.) je utvrdio da postoji 11 vrsta štetnika uskladištenih proizvoda koje su bile rezistentne na fosfin do 2000. godine.

Fosfin je daleko najrašireniji fumigant prvenstveno zbog svoje niske cijene i brzog djelovanja na insekte kako u praznom prostoru tako i u zrnu robe (Chaudhry M.Q., 2000.). Međutim, dugoročna uporaba ovog fumiganta povećava rizik od razvoja fosfin rezistentnih populacija (Benhalima H. *et al.*, 2004.). Značajno se uporaba fosfina povećala i zbog zabrane uporabe metilbromida. Osim toga, nepotpuni hermetički uvjeti prilikom fumigacije objekata često su uzrok neuspjeha, čime se povećava učestalost aplikacije (Pacheco I.A. *et al.*, 1990.; Chaudhry M.Q., 2000.; Benhalima H. *et al.*, 2004.). Takav način čestog ponavljanja fumigacije pogoduje razvoju fosfin rezistentnih populacija (Chaudhry M.Q., 1997., 2000.).

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 dominica* (F.), potom kod hrđastog brašnara *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Collins P.J., 1998.) te kasnije kod surinamskog brašnara, *Oryzaephilus surinamensis* (L.) i kestenjastog brašnara *Tribolium castaneum* (Herbst). U Brazilu je prema prvim službenim podacima (Pimentel M.A.G. *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. Na području SAD, Oklahoma autori Opit G.P. *et al.* (2012.) su ispitivali rezistentnost na fosfin kod 9 različitih populacija *T. castaneum* i 5 populacija *R. dominica* prikupljenih s nekoliko različitih lokaliteta. U svom istraživanju su testiranjem s diskriminativnom dozom utvrdili da u osam od devet populacija *T. castaneum* i u svih pet populacija *R. dominica* postoje fosfin rezistentne jedinice i to s najvišim frekvencijama rezistentnosti od 94%, odnosno 98%.

Svrha ovoga projekta je dobiti odgovore o budućnosti primjene fosfina kao trenutno jedinog fumiganta primijenjivog za suzbijanje skladišnih štetnika u Hrvatskoj. S druge strane kestenjasti brašnar je po brojnosti i šteti koju uzrokuje na uskladištenoj robi, postao jedan od vodećih skladišnih štetnika u Hrvatskoj, stoga moramo pomno voditi računa o njegovoj osjetljivosti na trenutno jedino dostupno fumigantno sredstvo za njegovu suzbijanje.

Prema sadašnjim podacima iz baze podataka o rezistentnosti artropoda na pesticide (Arthropod Pesticide Resistance Database (ARPD) ([www.pesticideresistance.com](http://www.pesticideresistance.com); 28.11.2013.), *T. castaneum* je razvio rezistentnost na 31 različitu aktivnu tvar, što je daleko više od svih skladišnih štetnika prijavljenih u ovoj bazu. Što se tiče rezistentnosti na fosfin, dokazani su slučajevi rezistentnih populacija *T. castaneum* u 19 država, na više različitih lokaliteta.

Praćenje promjena u osjetljivosti ovoga, i općenito svakog štetnika, važno je za borbu protiv rezistentnosti. Kroz praćenje osjetljivosti moguće je procijeniti uspješnost trenutnih načina suzbijanje štetnika, a sve u svrhu zadržavanja ili pak usporavanja pojave rezistentnosti.

Opći cilj projekta je unaprijediti čuvanje žitarica, uljarica i drugih proizvoda. Nadalje intencija nam je provjeriti ima li na području Slavonije i Baranje rezistentnih populacija kestenjastog brašnara te ukoliko nema odrediti najniže učinkovite koncentracije fosfina za suzbijanje svih razvojnih stadija kestenjastog brašnara.

## Materijal i metode rada

Projekt je financiran od strane Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, u trajanju od 12 mjeseci.

### Tim projekta:

Dr. sc. Anita Liška – glavni istraživač, voditelj; Prof. dr. sc. Vlatka Rozman – suradnik; Pavo Lucić mag. ing. agr. – suradnik; Dr. sc. Zlatko Korunić – konzultant; Nikola Puškarić – tehničar.

### Prikupljanje štetnika i uzgoj:

Populacije kestenjastog brašnara *Tribolium castaneum* (Herbst) će se prikupljati na nekoliko različitih lokaliteta Slavonije i Baranje. Prikupljeni štetnici će se uzgajati u kontroliranim uvjetima (25 °C, 70% relativne vlage zraka, u tami) na hranjivoj podlozi od mješavine oštrog pšeničnog brašna i 5% kvasca).

Uzgoj populacija kestenjastog brašnara će se obavljati na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku, u Laboratoriju za posliježetvene tehnologije.

### Testiranje rezistentnosti:

Za testiranje toksičnosti koristit će se F1 generacija brašnara u stadiju imaga, starosti 8-10 tjedana, pomiješanog spola (Benhalima H. *et al.*, 2004.). Za detekciju rezistencije na fosfin primijenit će se diskriminativna doza prema preporuci FAO organizacije (FAO, 1975.) (0,04 mg L<sup>-1</sup> u formulaciji phostoxin peleta) pri ekspoziciji od 20 sati. Po 50 odraslih jedinki brašnara stavit će se u kaveze (5,5 cm visine i 2,5 cm širine) od mlinske svile, s nešto hranjive podloge kako bi se izbjegao utjecaj izglednjivanja test kukaca. Kavezi s jedinkama brašnara će se staviti u plastične kontejnere (96 cm visine i 60 cm širine) ispunjene zrnom pšenice (do 70 cm visine kontejnera) i to u sredinu zrnate mase. Kontejneri će se nakon uvođenja peleta fosfina u masu zrna hermetički zatvoriti te na taj način simulirati fumigacija u skladišnom prostoru. Svaki tretman će se raditi u najmanje tri ponavljanja. Nakon završetka ekspozicije fosfinom, kontejneri će se držati otvorenima na zraku oko 1 sat kako bi se fumigirani materijal s test kukcima prozračio. Prije procjene mortaliteta, test kukci će se ostaviti na hranjivoj podlozi naredna dva tjedna u kontroliranim uvjetima (25 °C, 70% relativne vlage zraka, u tami) u laboratoriju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku.

### Testiranje najniže doze:

Ukoliko među populacijama brašnara ne bude preživjelih jedinki nakon izlaganja diskriminativnoj dozi, radit će se testiranje najniže doze potrebne za suzbijanje svih razvojnih stadija brašnara, istom metodom kao i kod testiranja rezistentnosti, samo s nižim koncentracijama fosfina. Za kontrolu će se koristiti populacije brašnara koje su uzastopno uzgajane u laboratorijskim uvjetima tijekom 20-ak godina. Kako bi se tijekom izvođenja testiranja izbjegao mogući utjecaj vanjske temperature na populaciju brašnara iz laboratorija, provest će se i kontrola istih brašnara na vanjske uvjete, bez aplikacije fosfinom.

### Provjera rezultata:

Izračunavat će se korekcija mortaliteta u odnosu na kontrolne uzorke (i kod testa rezistencije i kod testiranja najniže doze) prema formuli: Korekcija mortaliteta =  $100 \left[ \frac{\text{mortalitet tretiranih kukaca} - \text{mortalitet kontrolnih kukaca}}{100 - \text{mortalitet}} \right]$

kontrolnih kukaca)] (Abbott W.S., 1925.). Nakon korekcije, mortaliteti će se obraditi jednosmjernom analizom varijance, a značajnost razlika će se utvrditi Tukey's testom na razini vjerojatnosti 0,05 (SAS 2013.-2014.)

## Rezultati

Ovim istraživanjem prvenstveno želimo dobiti odgovor na to kakvo je stanje s osjetljivošću kestenjastog brašnara na fosfin. Ovaj podatak bi bio vrlo vrijedan obzirom da još nisu rađena istraživanja ovoga tipa na području Slavonije i Baranje.

Kod nas se u praksi za zaštitu uskladištenih proizvoda primjenjuje fumigacija i to već nekoliko desetljeća sredstvom iste aktivne tvari. Stoga očekujemo da će među nekim populacijama brašnara biti i jedinki koje su neosjetljive na diskriminativne doze, odnosno moći ćemo ih smatrati mogućim rezistentnim populacijama. Ukoliko ishod istraživanja bude prema našim očekivanjima, obavljat će se daljnje testiranje na neosjetljivim populacijama kako bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da su one zaista rezistentne.

## Rasprava i zaključak

Obzirom da do sada na našem području nisu rađena istraživanja ovoga tipa te nemamo nikakvih informacija o postojanju rezistentnosti skladišnih štetnika na fosfin, predloženo istraživanje je vrlo značajno za praksu. Ključ uspješne borbe s rezistencijom na fosfin je upravo njena rana detekcija. Australija tako ima razvijen nacionalni program monitoringa rezistencije još od 1980. godine. Osim što daje industriji informaciju o novom razvoju rezistencije, ovaj program monitoringa prati i godišnji trend frekvencije rezistentnosti na cijelom području Australije i to testiranjem svih prikupljenih štetnika u samo tri laboratorija. Kako postoje dvije razine rezistencije, „niska“ i „visoka“, od velike je važnosti otkriti na vrijeme postojanje „niske“ razine kod neke vrste štetnika na određenom lokalitetu. Naime, nakon što frekvencija „niske“ rezistencije prijeđe 80% populacije određene vrste štetnika na pojedinom lokalitetu, postoji velika mogućnost razvoja „visoke“ rezistencije te vrste. To je već i potvrđeno s vrstom *T. castaneum* na području Zapadne Australije (Newman C.R., 2010.).

Kako se u Hrvatskoj za fumigaciju uskladištenih proizvoda uglavnom koristi fosfin, od velike je važnosti uključiti i monitoring rezistencije na fosfin kod štetnika koji po brojnosti i šteti zauzima vodeće mjesto. Naime, prekasna detekcija „visoke“, rezistencije ne pomaže u održivosti fosfina kao što bi rana detekcija pomogla u eradikaciji rezistentnih populacija te osigurala vrijeme za razvoj novih protokola fumigacije.

Rezultati istraživanja predloženi u ovom projektu imali bi velike koristi direktno za praksu vezano za skladištenje poljoprivrednih proizvoda i industriju prerade žitarica. Osim toga izvoditelji fumigacije ovlaštenih tvrtki dobili bi podatke s kojima bi mogli eventualno promijeniti dosadašnju praksu primjene fosfina. Svima od njih, je u interesu aplicirati što manju koncentraciju, a ujedno imati garanciju da će ista u potpunosti suzbiti štetnika u uskladištenoj robi. Na taj način bi se odgodila ili usporila eventualna pojava rezistencije na fosfin. Ukoliko bi se testiranjem utvrdilo postojanje rezistencije, tada bi ovlaštene službe dobile detaljan naputak o načinu fumigiranja (koncentracije, ekspozicija, izmjena djelatne tvari ...). Na taj način bi se produžio vijek primjene i djelotvornosti fosfina, što je u interesu

svih uključenih u industriji žitarica, uključujući proizvođače, skladištare, privrednike, kao i izvođače fumigacije. Trenutno stanje u zaštiti uskladištenih poljoprivrednih proizvoda je takvo da su alternativni tretmani daleko skuplji, a neki još uvijek nisu široko prihvaćeni na tržištu.

## Literatura

- Abbott W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide, *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- 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.
- Champ B.R. and Dyte C.E., 1976. Report on the FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests, FAO Plant Protection 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. In: *Stored grain in Australi, Proceedings of the Australian Post-harvest Technical Conference*, (Edited by Banks, H.J., Wright, E.J. and Damcevski, K.A.), 1998. Canberra, Australia, 55-57.
- Collins P.J., Daghli G.J., Pavic H., Kopittke R.A., 2005. Response of mixed-age cultures of phosphine-resistant and susceptible strains of lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*, to phosphine at a range of concentrations and exposure periods, *Journal of Stored Products Research*, 41: 373-385.
- 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.
- Lorini I., Collins P. J., Daghli G. J., Nayak M. K., and Pavic H., 2007. Detection and characterisation of strong resistance to phosphine in Brazilian *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae), *Pest Management Science* 63: 358–364.
- Mills K.A., 1983. Resistance to the fumigant hydrogen phosphide in some stored product insect species associated with repeated inadequate treatments, *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie*. 4: 98–101.
- Nayak M.K., and Collins P.J., 2008. Influence of concentration, temperature and humidity on the toxicity of phosphine to the strongly phosphine resistant psocid *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae), *Pest Management Science* 64: 971–976.
- Newman C.R., 2010. A novel approach to limit the development of phosphine resistance in Western Australia. In: 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.T., Riudavets J., Sinha K.K., Thorpe G.R., Timlick B.H., Trematerra P., White N.D.G. (Eds), *Stored Products Protection*.

- Proceedings of the 10th International Working Conference on Stored Product Protection, 27 June to 2 July 2011, Estoril, Portugal, pp. 1040-1046.
- Opit G.P., Phillips, T.W., Aikins M.J., Hasan M.M., 2012. Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from stored wheat in Oklahoma, *Journal of Economic Entomology* 105(4):1107-1114.
- Pacheco I.A., Sartori M.R., Taylor R.W.D., 1990. Levantamento de resistência de insecto-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 (Coleoptera: Curculionidae), *Journal of Stored Products Research*, 45: 71-74.
- SAS 9.3 Copyright (c) 2013-2014 by SAS Institut Inc., Cary, NC, USA (Licensed to POLJOPRIVREDNI FAKULTET OSIJEK T/R, Site 70119033.
- Taylor R.W.D. 1989. Phosphine: a major fumigant at risk, *International Pest Control* 31: 10–14.
- Zettler J.L., 1997. Influence of resistance on future fumigation technology, pp. 445–454. *In* Donahaye E.J., Navarro S., and Varnava A. (eds.), *Proceedings of the International Conference on Controlled Atmospheres and Fumigation in Stored Products*, 21–26 April 1996, Nicosia, Cyprus. Printco Ltd. Nicosia, Cyprus.
- Arthropod Pesticide Resistance Database (ARPD) ([www.pesticideresistance.com](http://www.pesticideresistance.com); 28.11.2013.).

Anita Liška<sup>1\*</sup>, Vlatka Rozman<sup>1</sup>, Pavo Lucić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture in Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d, 31000 Osijek, Croatia

## **Presentation of scientific project: „Resistance evaluation of *Tribolium castaneum* (Herbst) to phosphine“**

### **Abstract**

In this paper we presented a research project entitled 'Evaluation of resistance of *Tribolium castaneum* (Herbst) to phosphine'. The project is approved and funded by the University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek for the period of 12 months. The overall objective of the project is to improve storage of grains, oilseeds and other products. Furthermore, our intentions are to check if there are resistant populations of *T. castaneum* – the red flour beetle in the regions of Slavonia and Baranja. If the resistant populations are not present, to determine the lowest effective concentration of phosphine for the suppression of all developmental stages of red flour beetle. With this project we plan to collect populations of pests in stored material from several locations in the regions of Slavonia and Baranja. Resistance testing will be performed on F1 generation at the adult stage, applying discriminatory doses, according to the FAO standard method. If there are no surviving specimens among red flour beetle populations after exposure to discriminatory dose, we will test the lowest required dose of phosphine for control of non resistant populations of red flour beetle. With this study we primarily want to find out if the resistant populations of the red flour beetle to phosphine are present in Slavonia and Baranja. Since there have been no researches of this type on the regions of Slavonia and Baranja, that information would be very valuable to establish an effective strategy of the control of the resistant red flour populations.

**Key words:** *Tribolium castaneum*, fumigation, phosphine, resistance, Slavonia and Baranja, stored cereals and oilseeds.

---

\* e-mail address: aliska@pfos.hr