

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Корови и биопестициди
(део БИОПЕСТИЦИДИ)
Практикум

др Славица М. Вуковић и др Драгана Б. Шуњака

Нови Сад, 2020. године

ЕДИЦИЈА ПОМОЋНИ УЏБЕНИК

Оснивач и издавач едиције

Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет
Нови Сад, Трг Доситеја Обрадовића 8
Година оснивања 1954.

Главни и одговорни уредник едиције

др Недељко Тица, редовни професор
Декан Пољопривредног факултета

Чланови комисије за издавачку делатност

др Љиљана Нешић, редовни професор – председник
др Милица Рајић, редовни професор – члан
др Бранислав Влаховић, редовни професор – члан
др Нада Плавша, ванредни професор – члан

Аутори

др Славица М. Вуковић, ванредни професор
др Драгана Б. Шуњка, доцент

Главни и одговорни уредник

др Недељко Тица, редовни професор
Декан Пољопривредног факултета

Рецензенти

др Сања Лазић, редовни професор
др Петар Кљајић, научни саветник

Издавач

Универзитет у Новом Саду Пољопривредни факултет, Нови Сад

Забрањено прештампавање и фотокопирање. Сва права задржава
издавач.

Штампање овог уџбеника је одобрило Наставно научно веће
Пољопривредног факултета у Новом Саду, број одлуке 1000/0102
532/1, на седници од 11.06.2020 године,

Тираж

20 примерака

Место и година штампања

Нови Сад, 2020.

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

632.937(075.8)(076)

ВУКОВИЋ, Славица М., 1969-

Корови и биопестициди : (део биопестициди) : практикум / Славица М. Вуковић и Драгана Б. Шуњка. - Нови Сад : Пољопривредни факултет, 2020 (Београд : Донат граф). - 74 стр. : илустр. ; 30 см. - (Едиција Помоћни уџбеник)

На врху насл. стр.: Универзитет у Новом Саду. - Тираж 20. - Библиографија: стр. 71-74.

ISBN 978-86-7520-498-5

1. Шуњка, Драгана, фитомедицина [autor]
а) Биопестициди -- Заштита биљака -- Вежбе

COBISS.SR-ID 17914889



Фото: И. Турински

ПРЕДГОВОР

Издавањем првог Практикума из предмета Корови и биопестициди (део предмета који се односи на биопестициде) за студенте студијског програма Органска пољопривреда, Пољопривредног факултета Универзитета у Новом Сад, намера нам је била да уведемо савремени приступ и сазнања у поменутој области, да уврстимо једноставне и апликативне методе, усклађене са актуелним потребама, мерљивих и очигледних ефеката, које су пре свега, прилагођене релативно ограниченом времену едукације, као што су практичне вежбе студената.

Практикум садржи уводни део који се односи на основне дефиниције и поделе биопестицида, као и њихових формулација, 10 лабораторијских вежби из области биофунгицида и биоинсектицида, основне принципе и упутства за извођење биолошких експеримената, јасно дефинисане задатке, начин обраде података, формуле за обрачун резултата остварених у биотестовима, прилоге и библиографске јединице за потребе проширења знања и стицање додатних информација.

Осим студената Органске пољопривреде, практикум је намењен и студентима других студијских програма: Фитомедицина, Агроекологија и заштита животне средине, Воћарство и виноградарство, Ратарство и повртарство и Пејзажна архитектура, а свакако и онима који раде у настави, науци или привреди. Такође, овај уџбеник може послужити студентима Пољопривредних факултета других универзитета, у земљи и региону.

Захваљујемо се рецензентима, проф. др Сањи Лазић и др Петру Кљајићу, који су подржали објављивање овог уџбеника и повољно оценили рукопис. Посебну захвалност дугујемо нашим професорима фитофармације, изванредним менторима, педагозима и стручњацима.

Аутори ће бити захвални на свим сугестијама, критикама и указивању на могуће пропусте и грешке.

Нови Сад, април 2020. године

Аутори

САДРЖАЈ

1.	УВОД	1
1.1	БИОПЕСТИЦИДИ	3
1.1.1	Подела биопестицида.....	4
1.1.2	Формулације биопестицида.....	11
2.	ЛАБОРАТОРИЈСКЕ ВЕЖБЕ	15
2.1	Вежба 1. Одређивање количине препарата за припрему радних течности . Error! Bookmark not defined.	
2.2	БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА БИОФУНГИЦИДА	25
2.3	Вежба 2. Одређивање фитотоксичности методом по Gar-у	27
2.4	Вежба 3. Одређивање токсичности биофунгицида	30
2.5	Вежба 4. Одређивање ефикасности биофунгицида у сузбијању проузроковача горке трулежи (<i>Colletotrichum acutatum</i>) на плодовима јабуке	34
2.6	Вежба 5. Одређивање ефекта етарских уља на пораст тест гљива	38
2.7	Вежба 6. Одређивање ефикасности биофунгицида методом пливајућих дискова	40
2.8	БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА БИОИНСЕКТИЦИДА.....	43
2.9	Вежба 7. Одређивање токсичности инсектицида природног порекла за складишне инсекте.....	45
2.10	Вежба 8. Ефекти ботаничких инсектицида на гусенице губара (<i>Lymantria dispar</i> L.)	50
2.11	Вежба 9. Тест токсичности микробиолошких биоинсектицида за кромпирову златицу (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say)	54
2.12	Вежба 10. Ефекти етарских уља зависно од начина деловања (контактно, контактно - дигестивно и репелентно)	57
3.	ПРИЛОГ	62
3.1	Прилог 1. Листа регистрованих средстава за заштиту биља која се могу користити у органској пољопривредној производњи.....	63
3.2	Прилог 2. Табела за одређивање потребне количине/запремине препарата.....	67
3.3	Прилог 3. Трансформација процента морталитета у <i>probit</i> вредности.....	68
4.	ЛИТЕРАТУРА	70

1. УВОД



Фото: С. Богдановић

1.1 БИОПЕСТИЦИДИ

Као алтернатива примени конвенционалних синтетичких пестицида, последњих година расте интересовање за еколошки прихватљивије, природне производе, са израженим пестицидним деловањем. Осим неопходности њихове примене у органској пољопривредној производњи, тежи се увођењу ових једињења у интегралну, као и у конвенционалну пољопривреду.

Биопестициди су производи за заштиту биља на бази живих организама и производи које синтетишу живи организми. Предности биопестицида су бројне: природно порекло; мања токсичност од конвенционалних средстава за заштиту биља (СЗБ); утицај само на циљну групу штеточина за разлику од конвенционалних, који могу да утичу и на корисне инсекте, птице и сисаре; краћих су каренци и радних каренци; могу се примењивати у разним типовима биљне производње. Ова једињења се брзо разграђују у животној средини, а резултат су мања изложеност биљке пестициду и мање негативно деловање на животну средину, а самим тим доприносе очувању биодиверзитета, будући да су биопестициди селективнијег деловања од хемијских препарата.

Поред овог, примена биолошких агенаса у програмима интегралне заштите биља омогућава развој одрживе пољопривредне производње и смањује потребу за хемијским средствима. Врло је значајна и чињеница да су њихови механизми деловања обично другачији од механизма деловања конвенционалних СЗБ, чиме могу помоћи у сузбијању резистентних популација штетних организама, као и у припреми антирезистентне стратегије и управљању осетљивошћу сузбијаних врста на хемијска средства (Cawoy et al., 2011).

Осим предности, биопестициди поседују и одређене недостатке: теже се уводе у примену, имају ужи спектар деловања, спорије делују од хемијских средстава, делују превентивно (биофунгициди), имају краћи рок трајања и скупљи су, могу бити инкомпатибилни са другим једињењима, захтевају виšekратну примену и снижење прагова штетности.

Посебно је важно истаћи значај биопестицида у органској пољопривреди. Заштита биља у органској производњи не представља просту замену средстава за заштиту биља која се примењују у конвенционалној пољопривреди, онима дозвољеним у органској производњи (Миленковић, 2007). Примарни избор у сузбијању штетних организама у органској пољопривреди морају бити превентивне мере – правилно поступање са биљним остацима и одговарајуће мере хигијене, гајење отпорних

сорти, здрав репродукциони материјал, плодоред, корисни организми, мешање биљних врста, формирање заштитних појасева, одговарајуће време сетве, избор парцеле, и друге агротехничке, механичке и биолошке мере.

Све наведено примењује се у циљу одржавања нивоа штетних организама испод прага економске штетности, а тек уколико постоји оправдан разлог и неопходност примењују се биопестициди или хемијски пестициди који су дозвољени за примену у органској пољопривредној производњи.

1.1.1 Подела биопестицида

Биопестициди се могу поделити у три основне групе:

- микробиолошки пестициди (микроорганизми),
- биохемијски пестициди (природне материје добијене од живих организама),
- активатори отпорности биљака.

Микробиолошки пестициди садрже одабране родове одређених врста или мешавине различитих гљива, бактерија, вируса или протозоа. Ови корисни организми продукују и витамине, ензиме и биљне хормоне који могу деловати на имуни систем биљака, повећавајући њихову отпорност или представљајући конкуренцију штетним организмима. Постоји значајан интерес за експлоатацију природних организама, као што су бактерије, вируси и гљиве за сузбијање штеточина, проузроковача обољења и корова. Имају широку примену и чине око 30% укупне производње и продаје биопестицида. Специфичан механизам деловања биопестицида на бази микроорганизама заснован је на борби за простор и храну, директном антагонизму у односу на раст циљног организма и имунизацији биљке домаћина (Граховац, 2014).

Биохемијски пестициди су супстанце природног порекла које сузбијају штетне организме нетоксичним механизмима. Они поседују природне компоненте из биљака, животиња, минерала, инсеката итд. Представљају продукте метаболизма микроорганизама и биљака (токсини, кристали, споре и антибиотици), који штите гајене биљке делујући антагонистички на проузроковаче болести, штетне инсекте, нематодe и корове, при чему су безопасни по људе и еколошки безбедни. Најзначајнији биохемијски пестициди су ботанички пестициди, односно деривати биљака. Ботанички пестициди подразумевају примену биљних екстракта и етарских уља у заштити биља. Одавно је познато да биљке садрже бројне одбрамбене механизме, којима се штите од напада разних штеточина, а употреба биљних екстракта у сузбијању штетних организама сматра се старом колико и заштита биља (Zibae, 2011). Поједини механизми се базирају на постојању различитих супстанци са пестицидним својствима. Због тога, бројни истраживачи, како у свету

тако и код нас, проучавају потенцијалну пестицидну активност разних супстанци изолованих из различитих биљних делова или органа.

Етарска уља су природне материје односно комплексна мешавина липофилних, течних, мирисних и испарљивих компоненти лоцираних у секреторним структурама ароматичних биљака које су често одговорне за карактеристичан мирис или укус биљке. Есенцијална уља се накупљају у свим врстама вегетативних и репродуктивних органа као што су цвет, лист, кора, стабло, корен, ризом, плод и семе. Једињења која улазе у састав етарског уља припадају различитим хемијским класама: феноли, алкохоли, етри или оксиди, алдехиди, кетони, естри, амини, амиди. Биљни феноли чине једну од најчешћих група одбрамбених једињења, која играју главну улогу код одбијања инсеката (Miletić i sar., 2013). Приликом напада инсекта долази до квалитативне и квантитативне измене фенола и повећања активности ензима као одговора на напад. Лигнин, игра централну улогу у одбрани биљака од инсеката и патогена. Ограничава улазак патогена физичким блокирањем или повећавањем жилавости лишћа што смањује и храњење инсеката, а смањује и нутритивни садржај листа, смањује афинитет према третираној храни, то јест изазива *antifeeding* ефекат.

Једињења као што су флавоноли, флаволи, флавоноли, флавани и изофлавоноиди делују као репеленти и *antifeeding* једињења за многе врсте инсеката. Алкалоиди могу деловати токсично или репелентно на инсекте. Никотин је алкалоид који се производи у корену биљке дувана (*Nicotiana tabacum*) и транспортује се у лишће где се складишти у вакуолама, ослобађа се када инсекти пробију вакуоле усним апаратом (Bruneton, 1999; Ковачевић, 2004).

Активатори отпорности биљака су супстанце које биљке производе из генетичког материјала који је унет у биљку. Они делују тако што индукују системичну, стечену отпорност, активирањем одбрамбених механизма саме биљке.

Биопестициди се могу разврставати према групама живих организама који су у улози активне супстанце, на биопестициде на бази: гљива, бактерија, вируса, квасаца, етарских уља или биљних екстраката.

Такође, могу се поделити према врсти организама које сузбијају на: биофунгициде, биоинсектициде, биоакарициде, бионематоциде, биохербициде. Међутим, групе биопестицида које су највише заступљене у заштити биља су биофунгициди и биоинсектициди.



Фото: Д. Мочевих (Органска башта Иловице)

Биофунгициди

За сузбијање фитопатогених гљива у органској производњи примењују се биофунгициди, а пожељна је њихова примена и у другим облицима пољопривреде. Они могу бити на бази корисних гљива, бактерија и квасаца (инфестирају и контролишу развој биљних патогена), на бази етарских уља и биљних екстраката (Copping, 2009). Способност биофунгицида да заштити биљку домаћина од патогена, да се одржи на различитим биљкама у различитим условима, основ је њиховог комерцијалног успеха.

Разликују се следећи механизми деловања биофунгицида:

- директна конкуренција,
- антибиоза,
- предаторство или паразитизам,
- индукована отпорност домаћина.

Директна конкуренција подразумева насељавање корена биљака домаћина организмом који се примењује за биолошко сузбијање проузроковача болести (*Biological Control Organism, BCO*), пре него што дође до инфекције патогеном. Организам који се примењује мора бити присутан у великом броју ради конкуренције са патогеном, при чему производња токсина од стране биолошког агенса успорава раст патогена (антибиоза). *BCO* треба да поседује антибиотичка и антагонистичка својства. Предаторство или паразитизам подразумева да организам који се примењује за биолошку контролу напада патогени организам и њиме се храни. При оваквом механизму деловања, биолошки агенс мора бити присутан пре напада патогена. Индукована отпорност се јавља када се у нападнутој биљци активира одбрамбени систем и то не имуни, већ унутрашња борба за успоравање инфекције (Граховац и сар., 2009).

Биофунгициди се примењују за третирање семена, кртола кромпира пред садњу или складиштење, фолијарно, за потапање или прскање расада пре садње, заливањем биљака после расађивања и потапањем калема. Број гајених биљака које се штите биофунгицидима је велик, од ратарских, повртарских и воћарских врста, до украсног, лековитог и зачинског биља.

Највише заступљени биофунгициди су на бази микроорганизама, и то на бази гљива и бактерија. Најчешће се у улози активних супстанци биофунгицида јављају гљиве као што су: *Trichoderma* sp., *Pythium oligandrum*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium oxysporum*, *Talaromyces flavus* и друге. Од бактерија у биопрепаратима најчешће су присутне следеће врсте: *Streptomyces griseoviridis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens* и др.

Поред наведених микробиолошких фунгицида, најзначајнији ботанички фунгициди су алицин (испарљива супстанца коју ослобађају ћелије лука, након оштећења), берберин (алкалоид, изолован из ризома биљке *Berberis aristata*), карвакол или цимофенол, монотерпенски фенол заступљен у многим есенцијалним уљима, а највише у етарском уљу оригана, жутог кедре са Аљаске, мајорана (*Origanum majorana*) и мајчине душице (*Thymus vulgaris*), остол (кумаринска компонента, издвојена из сувих плодова биљака *Cnidium monnieri*, и *Angelica pubescens*), сангвинарин (биљни алкалоид, из групе изохинолинских алкалоида, изолованих из биљака које припадају *fam. Papaveraceae*), сантонин (биљни алкалоид изолован из цвасти биљке *Artemisia maritima*).

Осим ових, доказан је фунгицидни ефекат етарских уља изолованих из биљака цитронела (*Symbopogon winterianus*), цимет (*Cinnamomum ceylonicum*), нана (*Menta piperita* L.), босиљак (*Ocimum basilicum* L.), рузмарин (*Rusmarinus officinalis*), тимијан (*Thymus vulgaris* L.), чајно дрво (*Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel).

На тржишту Републике Србије регистровани су биофунгициди: Ekstrasol F (*Bacillus subtilis* сој Č13), Bacillomix aurum B (*Bacillus subtilis* сој ST1/III), Erwix (*Bacillus subtilis* сој Z3), Vintec (*Trichoderma atroviride* сој SC1), Polyversum (*Pythium oligandrum*) (микробиолошки) и Timorex gold (уље чајног дрвета *Melaleuca alternifolia*) (биохемијски).

Биоинсектициди

Биоинсектициди су средства која се користе за сузбијање штетних инсеката у пољопривреди, при чему не представљају опасност за људе, животиње и животну средину. Употреба природних једињења као инсектицида била је позната и у XVII веку када је биљни екстракт никотина коришћен за сузбијање шљивиног тврдокрилца (*Conotrachelus nenuphar*) и других штеточина (BPIA, 2017), док су 1835. године вршени експерименти са применом гљиве *Beauveria bassiana* у циљу сузбијања штеточина из рода *Lepidoptera* (Dara, 2018). Почетак XX века, када долази до експанзије истраживања у области пољопривреде, обележила је примена бактерије *Bacillus thuringiensis* (Bt) као биоинсектицида, који до данас држи статус најкоришћенијег инсектицида биолошког порекла (Ibrahim et al., 2010). У протеклој деценији рад на истраживању и примени биоинсектицида све више добија на значају, потенцирањем интегралне и органске пољопривредне производње.

Биоинсектициди као активну супстанцу у свом саставу садрже живи организам (макро или микробиолошки агенс) или природну супстанцу (Chandler et al., 2011). Поред директног, биолошки активан агенс може да испољава и деловање преко продуката метаболизма (токсини, кристали и антибиотици), или испољавањем позитивног утицаја на повећавање отпорности биљке (Copping and Menn, 2000).



Слика 1. Сузбијање биљних ваши (Aphididae) у органском засаду артичоке применом азадирахтина (Фото: Д. Мочевих)

Биолошки активни агенси могу бити бактерије (*Bacillus thuringiensis*), гљиве (*Beauveria bassiana*), вируси (*Cydia pomonella* granulovirus - CpGV), биљни екстракти и етарска уља (азадиррахтин – *Azadirachta indica*) (Слика 1), паразитоиди (*Encarsia formosa*), као и актиномицета (*Sacharopolyspora spinosa*), нематодe и друге (Chandler et al., 2011; Madduri et al., 2001; цит. Воšković i sar., 2018).

У Републици Србији регистровани су биоинсектициди: Lepinox plus, Forey 48 B (*Bacillus turigiensis* subspec. *kurstaki*), Naturalis Biogard (*Bauveria bassiana*), Carpovirusine evo 2 (*Cydia pomonella* granulovirus (CpGV-R5) Virus granuloze jabukinog smotavca izolat CpGV-R5), Madex twin (*Cydia pomonella* granulovirus (CpGV-V22)) (Anonymus, 2020).

Биохербициди

Међу највеће проблеме у органској пољопривредној производњи, када је реч о заштити биља, спада заштита усева од корова. У ову сврху се примењују механичке превентивне и директне мере, а у потпуности се искључују хемијске мере борбе. Тренутно на нашем тржишту не постоје регистровани биохербициди.

Примарним метаболизмом биљне ћелије се сматрају процеси фотосинтезе и након тога, трансформација настале глукозе у процесу гликолизе. Секундарни биљни метаболизам подразумева формирање једињења са снажним физиолошким, инхибиторним или стимулативним деловањем. Ово деловање односи се како на друге организме, тако неретко и на припаднике исте биљне врсте. Метаболити, који настају процесом секундарног метаболизма у биљном ткиву, налазе се као слободна и самостална једињења или долази до њихове реакције са другим састојцима биљног ткива када се стварају различити комплекси.

Најважније карактеристике секундарних метаболита биљака су:

- нискомолекулска једињења
- немају енергетски значај
- хемијска разноврсност
- биолошка и фармаколошка активност.

Дуго времена се веровало да су то споредни продукти без значаја за биљку. Данас је познато да оваква једињења представљају инактивирани облици и депое штетних продуката, да су саставни делови неких ензимских система, да поседују хормонску активност, имају заштитну улогу за биљку и регулишу односе биљке с другим биљкама. Ефекат деловања једних биљака на друге преко њихових излучевина назива се алелопатија, а једињења које луче су алелохемикалије (Dilday et al., 1998). Према дефиницији (International Allelopathy Society – IAS), алелопатија обухвата све процесе изазване секундарним метаболитима које производе биљке, алге, бактерије и гљиве, а који утичу на раст и развој пољопривредних и биолошких система (IAS, 2005).

Све алелохемикалије могу се сврстати у две групе једињења:

- фенолна једињења (прости феноли, флавоноиди и др.) и
- терпеноиди (монотерпеноиди, сесквитерпеноиди, лактони, дитерпени, квазиноиди, бензоксазиноиди, глукозинолати и др.).

Данас се увелико ради на екстракцији описаних органских једињења из различитих биљних врста, а нарочито се далеко одмакло у екстракцији етарских уља, с обзиром на њихову широку примену не само у пољопривреди. До сада је уочен читав низ органских једињења са врло jakim хербицидним деловањем.

Кумарин (честа материја код трава, легуминоза и цитруса), на пример, има стотину пута јаче деловање од фолне киселине (синтетски регулатор раста). Артемисин је сесквитерпеноид, који је изолован из биљака *Artemisia annua* L. и *A. vulgaris* L. За ову супстанцу утврђено је разарајуће деловање на другу биљку на тај начин што генерише масовно накупљање прекурсора фотосинтезе, који на светлости изазивају фитотоксичан ефекат, због чега је познат и као „ласерски хербицид“ (Ковачевић и сар., 2004). Сунцокрет (*Helianthus annuus* L.) је биљка која је позната по високом садржају алелопатских материја. Екстракцијом из листова, корена и стабла изоловано је неколико терпена и фенола: ануолид Е, лептокаприн, хелианолус, ануионон Е, хелианоул Л и др. (Macías, 2002). Истраживањима је доказано да дејством ових, потенцијално алелопатских материја долази до увенућа биљака *Chenopodium album* L., *Coronopus didymus* (L.) Sm., *Medicago polymorpha* L., *Rumex dentatus* L. и *Phalaris minor* Retz. у прилично високом проценту (Anjum et al., 2005). Етарско уље изоловано из листова еукалиптуса (*Eucalyptus citriodora* L.) при врло ниским концентрацијама доводи до потпуне инхибиције развоја семена биљке *Parthenium hysterophorus* L., док етарско уље тимидана (*T. vulagris*), тимол, инхибиторно делује на клијање врло проблематичних корова, као што је обична боца (*Xanthium strumarium* L.) и дивљи овас (*Avena sterilis* L.).

Линалол је најактивнија компонента етарског уља босиљка (*O. basilicum*) и лаванде (*Lavandula angustifolia* Mill.), а инхибира клијање *Phalaris brachystachys* Link. – fam. *Poaceae* (Uremis et al., 2009). Осим ових, хербицидну активност имају и етарска уља биљака коморач (*Foeniculum vulgare*) и сусам (*Sesamum indicum* L.), семе улане репице (*Brassica napus*), јојобе (*Simmondsia chinensis*) и лана (*Linum usitatissimum* L.), уље леске (*Corylus avellana*), маслиново уље (*Olea europaea*), сојино уље (*Glycine max*) и други (Vuković i sar., 2013).

Остала средства

Поред биопестицида, у заштити биља у органској пољопривредној производњи у Републици Србији, дозвољена је примена и неких хемијских средстава за заштиту биља, односно препарата формулисаних на бази бакра (бакар-хидроксид, бакар-оксид, бакар-оксихлорид, бакар-сулфат и бордовска чорба), сумпора, гвожђе-фосфата, парафинског уља, спиносада (Anonymus, 2020).

1.1.2. Формулације биопестицида

Формулисање биопестицида има за циљ да обезбеди стабилност организма, односно једињења које улази у састав препарата, током производње, дистрибуције и складиштења, приликом руковања и примене препарата. Поред овог, неопходно је заштитити биолошки агенс/једињење од утицаја спољашње средине, омогућити повећање активности организма приликом његове репродукције, контакта или интеракције са циљним организмима. Све наведено постиже се додавањем одговарајућих непестицидних једињења.

Формулисање оваквих производа представља изазов, с обзиром да такве формулације морају испунити низ циљева као што су ефикасност, еколошка прихватљивост, постојаност након примене, равномерна распоређеност. Ниво кисеоника, влаге, као и рН вредност у формулацијама морају бити усклађени како би се побољшао рок трајања, а додатан пробем може представљати експлозивност проузрокована гасовима које ослобађа микроорганизам (Burgas, 1998).

Од посебног значаја, када је комерцијални успех оваквих формулација у питању, је способност микроорганизама да преживи и задржи могућност размножавања у условима примене, способност једињења да задржи пестицидна својства, способност одржавања рока трајања и ефикасности, тржишна цена, једноставност руковања и примена (Keswani et al., 2016). Формулисање биопестицида је потребно прилагодити постојећој опреми за примену средстава за заштиту биља (Boyetchko, 1999), те се у већини случајева овај процес одвија на исти начин као производња синтетичких пестицида.

Примена етарских уља као биопестицида од изузетног је значаја, с обзиром на утврђену пестицидну активност етарских уља већег броја биљних врста. Међутим, имајући у виду њихову испарљивост, слабу растворљивост у води и способност оксидације, формулисање биопестицида на бази етарских уља представља велики изазов. Данас, ово је могуће превазићи увођењем одговарајућих помоћних супстанци у процесу формулисања (Ibrahim, 2019).

Развој нових носача микро и нано величина довео је до појаве средстава за микро и наноинкапсулацију активних једињења, а као најшире коришћени издвајају се полимери (природне или вештачке материје које се састоје од великих молекула сачињених од повезаних серија једноставних мономера).

На овај начин једињења се штите од разградње и губитака испаравањем, а очекује се и већа стабилност и ефикасност ових врста формулација, што се постиже инкапсулирањем етарских уља у наноемулзијама (Ibrahim, 2019). С друге стране, установљено је да наноформулације показују већу специфичност (ниска токсичност према нециљним организмима у поређењу са другим комерцијалним формулацијама), а повећањем перзистентности, односно постојаности активне супстанце на месту наношења препарата, смањује се и количина примене биопестицида.

С обзиром на њихово агрегатно стање, формулације биопестицида деле се у две основне групе – чврсте и течне.

Чврсте формулације се производе помоћу различитих технологија, као што су сушење распршивањем, сушење смрзавањем или сушење на ваздуху са или без употребе флуидног слоја. Производе се додавањем везива, средстава за дисперговање, оквашивача (Tadros, 2005; Knowles, 2008). Сваки тип формулације се производи на специфичан начин.

Најзначајније чврсте формулације:

- прашиво за запрашивање (DP),
- грануле (GR),
- микро грануле (MG),
- водо-дисперзибилне грануле (WG),
- квашљиви прашак (WP).

Док се биопестициди формулисани као DP, GR и MG директно примењују, примена водо-дисперзибилних гранула (WG) и квашљивог прашка (WP) подразумева њихово дисперговање у одговарајућој количини воде (Knowles, 2005).

Течне формулације биопестицида производе се на бази воде, уља, полимера или њихових комбинација. Међу најзначајније течне формулације спадају:

- концентрована суспензија (SC),
- уљна дисперзија (OD),

- суспо-емулзија (SE),
- суспензија капсула (CS),
- концентрат за емулзију (EC),
- концентровани раствор (SL).

Формулације на бази воде (SC, SE, CS, SL) захтевају додавање инертних састојака, попут стабилизатора, адхезита, површински активних материја, боје, једињења против смрзавања. С друге стране, формулације које садрже неиспарљиве раствараче, укључујући уља (као што је уљна дисперзија), помажу процес апликације и задржавања производа на третираном објекту и побољшавају везивање спора (Gašić and Tanović, 2013).

Након формулисања биопестицида изводе се лабораторијски и пољски огледи у циљу регистрације и стављања у промет на тржишту. У овом поступку испитује се ефикасност, фитотоксичност и физичко-хемијска својства формулисаног препарата, одређује количина, односно концентрација примене, дефинише комерцијални назив. Подаци о идентитету активне супстанце, било да се ради о организму или једињењу, садржај активне супстанце, тип формулације, комерцијални назив, концентрација/количина примене, организам који се сузбија, те време примене обавезно се налазе на етикети биопрепарата.



Фото: Д. Мочевих (Органска баишта Урошце)

2. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ ВЕЖБЕ

2.1. Вежба 1. Одређивање количине препарата за припрему радних течности

Већи број формулација биопестицида се непосредно пред примену разређује са водом до прописане концентрације. Мешавина биопестицида са водом назива се радна течност. У зависности од типа формулације препарата, додавањем воде се формирају суспензија, дисперзија, односно раствор или емулзија.

Припрема радне течности изводи се на начин прописан од стране произвођача, при чему је неопходно придржавати се декларисаних количина примене, односно концентрација примене.

Приликом израчунавања количине препарата потребне за припрему радних течности неопходно је познавати мере за површину, запремину и масу (Табела 1-3, Прилог 2), као и норму третирања, односно одговарајућу количину воде која се примењује по јединици површине, зависно од типа усева или засада (Табела 4).

Табела 1. Мерне јединице за површину

Назив и ознака	Конверзија
метар квадратни (m ²)	m ²
ар (a)	1 a = 10 × 10 m ² = 100 m ²
хектар (ha)	1 ha = 100 a = 10 000 m ²

Табела 2. Мерне јединице за запремину

Назив и ознака	Конверзија
литар (l)	l = 10 dl = 100 cl = 1000 ml

Табела 3. Мерне јединице за масу

Назив и ознака	Конверзија
килограм (kg)	kg = 100 dkg = 1000 g

Табела 4. Норма третирања - потребна количина воде за припрему радних течности

Врста усева или засада	Количина воде (l/ha)
Ратарски и повртарски усеви, украсно и лековито биље и усеви сличног хабитуса	200 - 400
Засади малине, купине, жбунастог воћа и засади сличног хабитуса	300 - 600
Воћњаци, виногради, хмељ, шуме и засади сличног хабитуса	600 - 1000

ЗАДАТАК 1.

Биоинсектицид на бази ентомопатогене гљиве *Bauveria bassiana* сој ATCC 74040 (OD), примењује се у засаду јабуке за сузбијање црвене воћне гриње (*Panonychus ulmi*), у количини од 1-1,5 l/ha. Неопходно је припремити 392 l радне течности.

Израчунати потребну количину препарата.

Познате вредности

Одабрана количина примене препарата, 1,25 l/ha
Количина радне течности, RT = 392 l

Непозната вредност

Потребна количина препарата, pr = ?

Прорачун

- У засаду јабуке примењује се 600-1000 l воде на ha. Приликом израчунавања користиће се 800 l/ha.
- 1,25 l препарата се примењује приликом припреме 800 l радне течности;
- Следи пропорција

1,25 l препарата : 800 l воде = x (непозната количина препарата) : 392 l

$$x (l) = \frac{1,25 l \times 392 l}{800 l} = \frac{490 l}{800} = 0,61 l \text{ препарата}$$

ЗАДАТАК 2.

Биоинсектицид на бази *Cydia pomonella* granulovirus (CpGVR5) изолат CpGV-R5 (SC), користи се у засаду јабуке за сузбијање јабукиног смотавца (*Cydia pomonella*). Примењује се пре почетка убушивања гусеница у плодове, у количини од 1 l/ha. Неопходно је третирати површину од 529 аг засада јабуке.

Израчунати потребну количину препарата.

Познате вредности

Површина под засадом јабуке, P = 529 аг

Непозната вредност

Потребна количина препарата, рг = ?

Прорачун

- 1,0 l препарата примењује се на површину од 1 ha, односно 100 аг; колико препарата је потребно за 529 аг?
- Следи пропорција:

1,0 l препарата : 100 аг = x (непозната количина препарата) : 529 аг

$$x \text{ (l)} = \frac{1,0 \text{ l} \times 529 \cancel{\text{ аг}}}{100 \cancel{\text{ аг}}} = \frac{529 \text{ l}}{100} = \mathbf{5,29 \text{ l} \text{ препарата}}$$



Фото: Д. Мочевих (Органска башта Иловице)

ЗАДАТАК 3.

Биофунгицид на бази *Bacillus subtilis* сој BS10 (SC), користи се у засаду јагоде, за сузбијање проузроковача сиве трулежи (*Botrytis cinerea*). Примењује се у концентрацији 0,5-2%.

Неопходно је припремити 523 l радне течности.

Израчунати потребну количину препарата.

Познате вредности

Одабрана концентрација примене препарата, $c = 1,5\%$

Потребна количина радне течности, $RT = 523 \text{ l}$

Непозната вредност

Потребна количина препарата, $pr = ?$

Прорачун

- Концентрација од 1,5% подразумева примену 1,5 l препарата при запремини од 100 l воде.
- Користећи познате вредности, следи пропорција:

1,5 l препарата : 100 l воде = x (непозната количина препарата) : 523 l

$$x \text{ (l)} = \frac{1,5 \text{ l} \times 523 \cancel{\text{l}}}{100 \cancel{\text{l}}} = \frac{784,5 \text{ l}}{100} = \mathbf{7,845 \text{ l препарата}}$$



Фото Д. Мочевий (Органска башта Иловице)

ЗАДАТАК 4.

Биоинсектицид на бази *Bacillus thuringiensis* subspec. *kurstaki* (WP) примењује за сузбијање памукове совице (*Helicoverpa armigera*) у усеву парадајза, у количини од 0,75 kg/ha. Неопходно је третирати површину од 4325 m² под усевом парадајза.

Израчунати потребну количину препарата.

Познате вредности

Површина под усевом парадајза, P = 4325 m²

Непозната вредност

Потребна количина препарата, pr = ?

Прорачун

- 0,75 kg препарата примењује се на 1 ha, односно 10 000 m²; колико препарата је потребно за 4325 m²?
- Следи пропорција:

0,75 kg препарата : 10 000 m² = x (непозната количина препарата) : 4325 m²

$$x \text{ (kg)} = \frac{0,75 \text{ kg} \times 4325 \text{ m}^2}{10\,000 \text{ m}^2} = \frac{3243,75 \text{ kg}}{10\,000} = \mathbf{0,32 \text{ kg} \text{ препарата}}$$

ЗАДАТАК 5.

Биобактерицид на бази *Bacillus subtilis* soj Z3 (WP), користи се за сузбијање проузроковача бактериозне пламењаче крушке (*Erwinia amylovora*). Примењује се у концентрацији од 0,5-1%. Неопходно је третирати 2,5 ха засада крушке.

Израчунати потребну количину препарата.

Познате вредности

Одабрана концентрација примене препарата, $c = 0,75\%$

Површина коју је потребно претирати, $P = 2,5$ ха

Непозната вредност

Потребна количина препарата, $pr = ?$

Прорачун

- Израчунати потребну количину воде за третирање 2,5 ха засада крушке

1 ха засада крушке : 800 l воде = 2,5 ха засада крушке : **x l** воде

$$x \text{ (l)} = \frac{800 \text{ l} \times 2,5 \text{ ха}}{1 \text{ ха}} = \mathbf{2000 \text{ l} \text{ воде}}$$

- Потребна запремина воде за примену у засаду крушке површине 2,5 ха износи 2000 l. Примена препарата у концентрацији од 0,75%, подразумева да се 0,75 l препарата примењује на 100 l воде.
- Следи пропорција:

0,75 l препарата : 100 l воде = x (непозната количина препарата) : 2000 l воде

$$x \text{ (l)} = \frac{0,75 \text{ l} \times 2000 \cancel{\text{л}}}{100 \cancel{\text{л}}} = \frac{1500 \text{ l}}{100} = \mathbf{15 \text{ l} \text{ препарата}}$$

2.2. БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА БИОФУНГИЦИДА

За испитивање проблема у заштити биља, примењују се лабораторијски и пољски огледи. Лабораторијски огледи обезбеђују основне принципе за нове методе сузбијања штетних организама, а изводе се под задатим условима (температура и светлост, одсуство кише и ветра), који се, према захтевима, могу мењати. С друге стране, циљ пољских огледа је да потврде резултате остварене у лабораторијским огледима. У пољским огледима, преовлађује комплекс природних фактора на које се не може утицати.

Према Finney-у (1962), биотест, у најширем смислу, је мерење интензитета неког стимулуса (физичког, хемијског, биолошког, физиолошког или психолошког), односно реакције или одговора које производи живи организам изложен одређеним експерименталним условима.

Резултати биолошких испитивања не могу се мерити са резултатима који се постижу хемијским анализама квантитативно, јер је тешко очекивати, ма како био хомоген биолошки материјал, да све јединке индентично реагују на присуство токсичних супстанци. То је, свакако, недостатак биолошких анализа у поређењу с хемијским. Међутим, и биолошке анализе имају својих предности над хемијским.

Основни методи су “*in vitro*” технике, које се користе у сврху одређивања фунгитоксичности испитиваног једињења, не водећи рачуна о самој употреби. Практични “*in vivo*” методи симулирањем услова примене у природи одређују стварне ефекте испитиваног једињења.

Основни тестови за испитивање фунгитоксичности могу се, према природи ефекта, разврстати на:

- тестове клијања спора (на предметном стаклу, на агару, клијање у потресаној култури и одређивање повећања волумена спора),
- тестове пораста гљиве,
- тестове респирације.

Насупрот методама “*in vitro*”, када се подаци о хемијској структури и токсичности добијају само из односа две компоненте: гљива-фунгицид, много подобнијим сматрају се “*in vivo*” методи, када се у систем укључује и трећа компонента: биљка или земљиште.

У пракси је ово, обично, друга фаза испитивања новосинтетизованих једињења и изводи се у заштићеном простору под тачно контролисаним условима типа земљишта, светлости, температуре и влажности. Овако гајене биљке се третирају

различитим концентрацијама потенцијалних фунгицида, као и биофунгицида, потом се на њих нанесу споре и резултати пореде са резултатима неког стандардног једињења чије су вредности у пољу већ познате.

Зависно од врсте паразита и средине у којој се испитују, дејство се оцењује преко

- остварених инфекција,
- никлих биљака,
- здравих биљака,
- интензитета остварених инфекција,
- оствареног обољења и
- оштећења.

У тестовима "*in vitro*" и "*in vivo*" при испитивању фунгицидних ефеката а зависно од циља испитивања користи се велики број гљива. Најчешће коришћене гљиве у огледима су: *Aspergillus parasiticus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Cercospora beticola*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. Solani*, *Helminthosporium sp.*, *Phytophthora infestans*, *P. nicotianae*, *Rhizoctonia solani*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma harzianum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae*, *Ustilago hordei*.

Тест гљива треба да је једноставна за узгој, да обилно и редовно спорулише, да је високе хомогености у одговорима на присуство фунгицидног једињења при чему треба водити рачуна и о могућностима настајања биотипова или раса различите осетљивости (Инђић и Вуковић, 2012).

2.3. Вежба 2. Одређивање фитотоксичности методом по Gar-y

Фитотоксичност је појава привременог или трајног оштећења вегетативних или генеративних органа, успоравања или потпуног заустављања клијавости те физиолошких и морфолошких промена (Слика 2), а догађа се након апликације једног или више средстава за заштиту биља (Вуковић и сар., 2014).



Слика 2. Симптоми фитотоксичности – соја, винова лоза и кукуруз
(Фото: Anonimus, 2020a)

Узроци који доводе до ових промена огледају се првенствено у неадекватној примени средстава за заштиту биља – неадекватан избор препарата, инкомпатибилност препарата, примена дозе веће од препоручене, неодговарајући квалитет препарата, неповољни климатски услови, неодговарајућа фенофаза гајене биљке, и сл.

Као последица фитотоксичности, долази до смањења приноса, а при интензивнијим оштећењима неопходна је поновна сетва или садња, што значајно поскупљује процес производње.

Одређивање фитотоксичности изводи се методом прскања или методом убода, односно методом по Garu (Gar, 1963; Šovljanski i Klokočar-Šmit, 1976), а заснива се на токсичности средстава за заштиту биља за биљке и мерењу промена (промена у боји, хлороза, некроза) на листовима тест биљака после наношења истих.

Одређивање фитотоксичности биофунгицида на бази етарских уља (оригана, босиљка и чајног дрвета) заснива се на њиховој потенцијалној токсичности за биљке и мерењу промена у боји (хлороза, некроза) на листовима тест биљака после наношења етарских уља одређене концентрације.

Биофунгицид

За одређивање фитотоксичности у лабораторијским условима методом убода, примениће се препарат Timogex gold (уље чајног дрвета 222,5 g/l препарата).

Материјал и прибор

За одређивање фитотоксичности користе се осетљиве биљне врсте (грашак, паприка, дуван, парадајз). Биљке се гаје у саксијама до фазе формирања правих листова, а неопходно је да буду потпуно здраве, без оштећења насталих услед присуства инсеката или других штетних агенаса (Слика 3).

1. Стаклени цилиндри (100 cm³)
2. Стаклене пипете (1 ml, 10 ml)
3. Саксије
4. Стерилна земља
5. Семе тест биљака
6. Пастерове пипете
7. Маказе
8. Етикете
9. Комора за узгој биљака (фитотрон)
10. Врећице (полиетиленске)
11. Стерилна вода
12. Милиметарска хартија
13. Термохигрометар
14. Апарат за мерење површине листа

Поступак

Оглед се поставља у најмање четири понављања. Потребно је припремити растворе препарата Timogex gold (уље чајног дрвета 222,5 g/l препарата) у концентрацијама 0,75, 1 и 2%. Претходно се одаберу биљке са уједначено развијеним листовима, а најмање четири листа се затим обележе самолепљивим етикетама.

Стерилном иглом на pokožици обележених листова направе се оштећења у виду раздеротина. На оштећена места се капаљком или стакленим штапићем наноси по једна кап одређене концентрације препарата Timogex gold, на најмање четири лиске. Контролну варијанту чине капи стерилне воде и оне се најпре наносе на листове тест биљака.

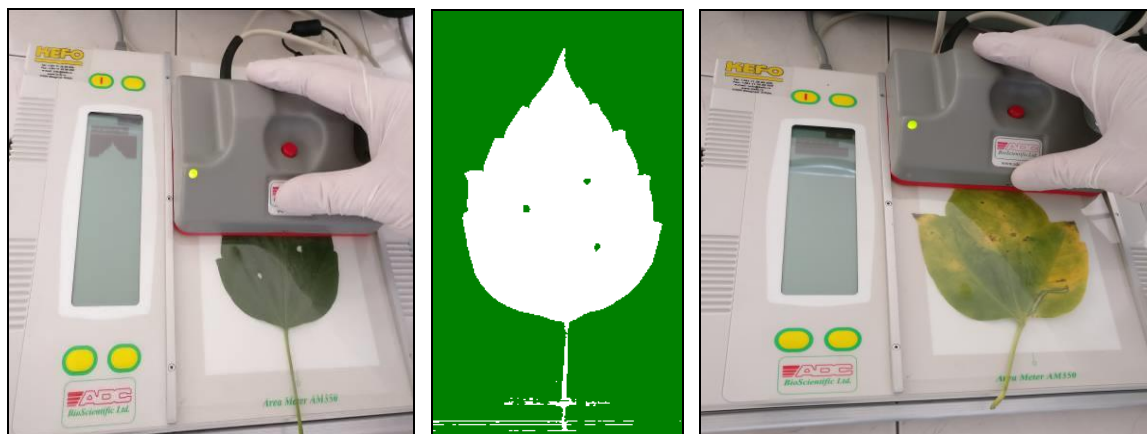
После наношења воде у контроли и наношења препарата у одређеним концентрацијама, биљке се изолују полиетиленским врећицама ради одржавања влажности, а потом одлажу у комору за узгој биљака.

Биљке се гаје у условима светлосног режима 16/8 h (дан/ноћ) при условима температуре 23 ± 2 °C. После 24 и/или 48 h (или дужи временски период) биљке се

прегледају. Најпре се прегледају контролне биљке, а потом оне где је нанет биофунгицид. У случају појаве промена одредити карактер (облик, боју) и површине (уз помоћ милиметарске хартије) промена, уколико није захваћен цео лист. Површина листа се одреди помоћу милиметарске хартије, а потребно је измерити површине хлоротичних промена на месту убода на сваком листу појединачно.

Фитотоксичност (F) се изражава процентом, односно израчунава се површина листа захваћена променом услед присуства биофунгицида, у односу на укупну површину листа, где је индекс фитотоксичности (IF):

$$IF (\%) = \frac{\text{средња вредност површине оштећења за варијанту са биофунгицидом (mm}^2\text{)}}{\text{средња вредност површине оштећења у контроли (mm}^2\text{)}} \times 100$$



Слика 3. Leaf area meter – поступак примене (Фото: С. Богдановић)

За одређивање фитотоксичности може се користити и апарат за мерење површине листа (*Leaf area meter*) (Слика 3). Овај инструмент функционише на принципу скенера, при чему се, на монитору рачунара повезаног са уређајем, очитава укупна површина листа и површина листа захваћена фитотоксичном променом, а на основу ових вредности израчунава се проценат оштећења (F), из формуле

$$F (\%) = \frac{\text{површина захваћена фитотоксичном променом (mm}^2\text{)}}{\text{укупна површина листа (mm}^2\text{)}} \times 100$$

2.4. Вежба 3. Одређивање токсичности биофунгицида

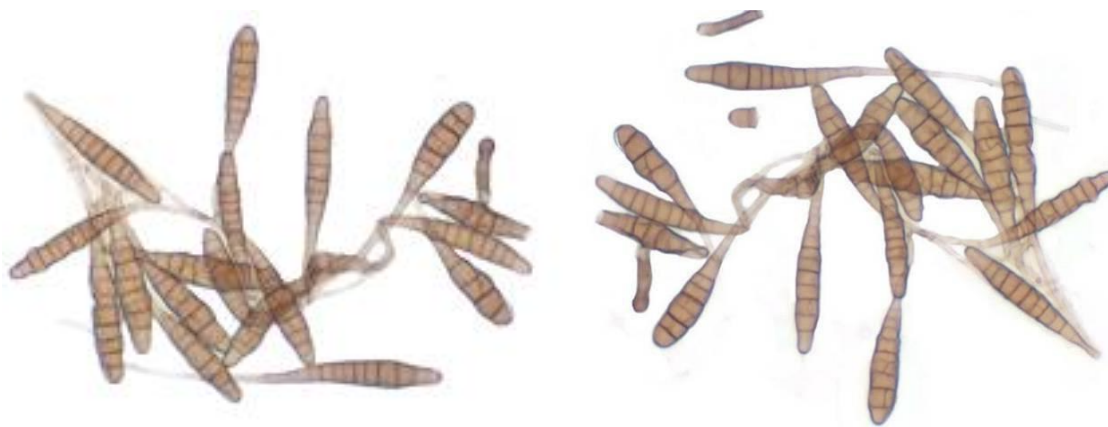
Одређивање токсичности биофунгицида заснива се на одређивању ED₅₀ или EC₅₀ (ефективна доза или концентрација), односно дозе или концентрације које редукују 50% клијавости спора фитопатогене гљиве (Blumer i Kundert, 1951; Šovljanski i Klokočar-Šmit, 1976).

Биофунгицид

За одређивање фунгитоксичности примениће се препарати Ekstrasol F (*Bacillus subtilis* сој Č13, формулисан као SL, 1×10^8 CFU/ml); Polyversum (на бази *Pythium oligandrum*).

Тест организам

При одређивању токсичности биофунгицида користиће се гљива *Alternaria solani* (Слика 4), проузроковач црне пегавости кромпира и парадајза. Гљива се гаји на воденом агару (1000 ml дестиловане воде и 20 g Vacto Agar-a) до обилније фруктификације, затим се припрема суспензија спора у стерилној води, тако да у једном видном пољу микроскопа при малом увећању буде 20-30 спора.



Слика 4. *Alternaria solani* (Фото: Anonymus, 2020b)

Материјал и прибор

1. Петри кутије ($r = 4,5$ cm)
2. Филтер хартија

3. Маказе
4. Водоотпорни маркери
5. Предметна стакла
6. Покровна стакла
7. Стерилна вода
8. Стаклени цилиндри (100 cm³)
9. Епрувете (10 cm³), гумени затварачи
10. Пламеник
11. Бактериолошка еза
12. Микроскоп
13. Капаљка (стаклени штапић)
14. Термохигрометар
15. Микроапликатор

Поступак

Припреми се серија концентрација (0,34; 0,67; 1,34; 2%) радних течности биофунгицида. Предметна стакла се испрскају помоћу микроапликатора радним течностима биофунгицида одређене концентрације (Слика 5). После сушења, предметна стакла се постављају у Петри кутије са навлаженом филтер хартијом на дну, а затим се наносе 1-2 капи водене суспензије спора *A. solani*. Контролна варијанта подразумева исти поступак али предметна стакла се испрскају само водом и после сушења се ставља суспензија спора. Петри кутије се унесу у влажну комору и држе 24 h на температури 20-22 °C. Оглед се поставља у најмање четири понављања.



Слика 5. Микроапликатор и серија радних течности (Фото: А. Жунџић)

Оцена токсичности се изводи после 24 h, бројањем клијалих и неклијалих спора у 10 видних поља микроскопа (најмање увећање), најпре у контроли, а затим и у свакој концентрацији, односно понављању.

Према Blumer i Kundert (1951) код испитивања ефикасности фунгицида у лабораторијским условима, уколико је у контроли клијавост конидија изнад 95%, може се сматрати да овај проценат у малој мери утиче на оцену ефеката испитиваног фунгицида и да се може занемарити. Када је клијавост у контроли испод 95%, мора се извршити корекција и у том случају се клијавост спора код испитиваног фунгицида израчунава на следећи начин:

$$K (\%) = \frac{T}{N} \times 100$$

K – коригована вредност за клијавост спора (%)

T – клијавост спора у третираној варијанти (%)

N – клијавост спора у контроли (%)

У случају да је клијавост спора у контроли испод 50%, оглед треба поновити или одабрати другу тест гљиву чија је клијавост задовољавајуће висока.

За одређивање токсичности биофунгицида проценат неклијалих спора се трансформише у Probit, а концентрације примењеног препарата у логаритме. Probit анализом конструишу се 1с-р линије и одређује токсичност биофунгицида (EC₅₀ или ED₅₀) за *A. solani* или другу врсту гљиве. На основу једначине регресионе праве или (Probit анализа), математички се одреди EC₅₀ или ED₅₀.

У Табели 5 приказан је решени пример математичког одређивања EC₅₀ биофунгицида. Осим на овај начин, EC₅₀ или ED₅₀ може да се одреди и помоћу софтверског програма Statistica 13.

Табела 5. Математичко одређивање EC₅₀ биофунгицида Ekstrasol F

Варијанта	Концен.	Log. кон. × 100 (x)	% неклијалих спора	Probit (y)	x ²	xy
1	1,34	2,12	91,5	6,372	4,494	13,508
2	0,67	1,83	58,2	5,207	3,349	9,529
3	0,34	1,53	26,4	4,369	2,341	6,685
Сума		Σ x=5,48		Σ y=15,95	Σ x²=10,18	Σ xy=29,72
Просек		x=1,83		y=5,32		

Помоћу једначине регресионе праве могуће је израчунати теоретски очекивано дејство за било који логаритам концентрације и/или дозе, при чему се помоћу пробит таблице, % неклијалих спора преводи у пробит вредност, обрнуто, за било коју вредност леталне дозе могуће је израчунати одговарајућу концентрацију или дозу примене. Једначина регресионе праве:

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) \qquad b = \frac{\sum xy - \bar{x} \sum y}{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}$$

Константа b – коефицијент правца регресионе праве. То је релативан број који показује за колико се пробит јединица повећава дејство када се логаритам повећа за јединицу.

$$b = \frac{29,72 - 1,83 \times 15,95}{10,18 - 1,83 \times 5,48} = \frac{0,5315}{0,1516} = 3,5059 \qquad \mathbf{b = 3,5059}$$

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x})$$

Израчунавање вредности x , при чему је $y = 5$

$$5 = 5,32 + 3,5059 (x - 1,83)$$

$$5 = 5,32 + 3,5059 x - 3,5059 \times 1,83$$

$$5 = 5,32 + 3,5059 x - 6,4158$$

$$x = \frac{5 - 5,32 + 6,4158}{3,5059}$$

$$x = \frac{6,0958}{3,5059}$$

$$x = 1,7387$$

- антилогаритам од x (1,7387) је 54,79

$$EC_{50} = \frac{54,79}{100} = 0,55\%$$

2.5. Вежба 4. Одређивање ефикасности биофунгицида у сузбијању проузроковача горке трулежи (*Colletotrichum acutatum*) на плодовима јабуке

Врсте рода *Colletotrichum* инфицирају велики број биљних врста пре бербе, али се економски најзначајнији губици јављају после бербе плодова. *Colletotrichum acutatum*, проузроковач горке трулежи јабука, постаје све доминантнија врста овог рода на ускладиштеним плодовима јабуке. За сузбијање складишних патогена у примени су најзаступљенији синтетички фунгициди. Међутим, њихова примена се ограничава због ризика по животну средину и токсиколошких својстава, као и све чешће појаве резистентности, те је примена фунгицида после бербе у многим земљама забрањена. Данас се у примену уводе биофунгициди на бази бактерије *Bacillus subtilis*. С обзиром да имају статус непатогених микроорганизама (Сауоу et al., 2011), врсте из рода *Bacillus* представљају најзначајнији извор потенцијалних микробиолошких пестицида.

Ефикасност биофунгицида у сузбијању проузроковача горке трулежи на плодовима јабуке одређује се на вештачки инокулисаним плодовима. Ефекти биофунгицида оцењују се на основу индекса јачине обољења (Disease Severity Index -DSI) (Тановић и сар., 2011).

Биофунгицид

Ekstrasol F (*Bacillus subtilis* сој Č13, формулисан као SL, 1×10^8 CFU/ml)

Тест организам

За одређивање ефикасности биофунгицида примениће се култура гљиве *Colletotrichum acutatum*, старости 7 до 10 дана, која је спорулисала на КДА подлози.

Материјал и прибор

Здрави плодови јабуке, без симптома присуства фитопатогених гљива и оштећења инсеката или других штетних агенаса.

1. Етанол (96%)
2. Вата, газа
3. Мензуре (100 cm^3)

4. Скалпел
5. Пластичне кутије
6. Водоотпорни маркери
7. Прибор за припрему исечака (бушач, R = 10 mm)
8. Оквашивач (Silwet L-77)
9. Стаклени штапић
10. Стерилна дестилована вода
11. Лабораторијске чаше (50 cm³, 250 cm³)
12. Микропипета (10-100 µl)
13. Алуминијумска или полиетиленска фолија
14. Калкулатор

Поступак

Плодове јабуке добро опрати, пребрисати алкохолом и поставити у пластичне кутије. Стерилним бушачем на свакој јабуци направити по два удубљења (дубине 2-3 mm). Јабуке поделити у четири групе (четири варијанте), сваку варијанту чини по четири јабуке, а свака јабука је једно понављање.

Припремити суспензију спора – у 10 ml стерилне дестиловане воде, додати једну кап оквашивача, измешати на магнетној мешалици, пренети у Петри кутију на колонију гљиве и скалпелом састругати споре. Добијену суспензију спора пренети у лабораторијску чашу, мешати стакленим штапићем (10 мин) и процедити кроз газу у другу лабораторијску чашу. Помоћу хемцитометра одредити густину суспензије спора, ово поновити пет пута и израчунати просечан број спора по 1 ml суспензије.

Припремити 100 ml радне течности биофунгицида у концентрацији двоструко већој од препоручене (0,4% варијанта БФ1) и 100 ml радне течности у концентрацији препорученој за примену (0,2% варијанта БФ2).

Оглед поставити у неколико варијанти:

радна течност БФ1+споре гљиве

радна течност БФ2+споре гљиве

стерилна дестилована вода + споре гљиве (К1)

стерилна дестилована вода (К2)

У отворе на јабукама најпре унети по 50 µl радне течности биофунгицида, а затим 50 µl суспензије спора (не испод густине $1,2 \times 10^6$ спора/ml). У контролним варијантама (К1 и К2) уместо биофунгицида се уноси стерилна дестилована вода. Резултате остварене у варијанти К1 користити при израчунавању ефикасности биофунгицида и у одређивању вирулентности изолата, док су резултати у варијанти К2 мерило здравственог стања употребљених плодова. Инокулисане плодове јабука ставити на инкубацију у влажну комору, на собној температури (Слика б).



Слика 6. Плодови јабуке инокулсани *Colletotrichum acutatum*
(Фото: С. Вуковић)

После седам дана, на основу скале 1-4, изводи се оцена насталих симптома (Табела 6).

Табела 6. Скала за оцену нивоа оштећења

Ниво оштећења	
1	Симптом одсутан или ширине < 0,3 cm
2	0,3 cm < симптом ширине < 0,5 cm
3	0,5 cm < симптом ширине < 1 cm
4	Симптом ширине > 1 cm

После оцењених симптома, израчунава се индекс интензитета обољења (DSI) за сваку варијанту:

$$DSI = \frac{\sum (nv)}{V}$$

DSI – индекс интензитета обољења

\sum – сума

n – степен инфекције према скали 1-4

v – број удубљења n-тог степена инфекције

V – укупан број прегледаних удубљења

На основу вредности DSI, применом формуле по *Abbott*-у израчунава се ефикасност биофунгицида.

Формула по *Abbott*-у:

$$E (\%) = \frac{DSI(k) - DSI(t)}{DSI(k)} \times 100$$

DSI(k) – индекс интензитета обољења у контроли

DSI(t) – индекс интензитета обољења у третману

Значајност разлика се тестира анализом варијансе применом *Duncan*-овог теста (Једнофакторијална анализа варијансе – Statistica 13).

2.6. Вежба 5. Одређивање ефекта етарских уља на пораст тест гљива

Етарска уља великог броја биљака позната су по различитом спектру антимикробног деловања (Wilson i sar., 1997; Tanović i sar., 2004). Добијају се екстракцијом из биљака, а њихова антифунгална активност потиче од производа секундарног метаболизма (монотерпенских фенола, нарочито тимола, карвакрола и еугенола) (Barrera-Necha et al., 2008), који се природно јављају у биљакама како би их штитили од напада патогена. Етарска уља су испарљиви производи ароматичних биљака, што ограничава и отежава њихову примену и чување. Ова једињења могу инхибирати раст патогена привремено (фунгистатично деловање) или трајно (фунгицидно деловање) (Abd-Alla i Haggag, 2013).

Предност примене етарских уља у заштити биља огледа се у чињеници да се они у природи разлажу до нетоксичних материја, а осим у органској пољопривредној производњи могу бити веома корисни у програмима интегралне заштите биља.

Одређивање ефекта етарских уља на пораст мицелије *Monilia sp.* и *Colletotrichum acutatum* заснива се на *in vitro* тесту, односно мерењу пречника колоније после излагања исте етарском уљу.

Тест организам

Гљива *Monilia sp.* или *Colletotrichum acutatum* гајена на КДА подлози старости 7 дана.

Материјал и прибор

1. Етанол (96%)
2. Етанолни раствор етарског уља (оригано, цимет, камилица, тимијан, чајно дрво, жалфија, мирођија, чичак или друге)
3. Вата
4. Прибор за припрему исечака (бушач, R = 3 mm)
5. Копљаста игла
6. Петри кутије (r = 4,5 cm)
7. Водоотпорни маркери
8. Микропипета (1-10 μ l)
9. Полиетиленска фолија

10. Ламинарна комора

11. Калкулатор

Поступак

Припреме се Петри кутије са КДА подлогом (15 ml) и исечци мицелије ($R=3$ mm) са обода колоније (јер се делови мицелије различите старости различито понашају). Старији делови мицелије (ближи центру колоније) спорије расту, односно бржи пораст имају они са обода колоније.

У сваку Петри кутију на већ припремљену подлогу, копљастом иглом асептично пренети по три исечка мицелије тако да се мицелија залепи за подлогу. Једну варијанту чине две кутије са по три исечка. Две засејане кутије које представљају контролне варијанте, се обележе и упакују у полиетиленску фолију.

На средишњи део унутрашње стране поклопца Петри кутије, окренутог на горе, пипетом се наноси оговарајућа количина (1-10 μ l/l ваздуха) етарског уља, а потом се поклопи доњи, засејани део Петри кутије.

Петри кутије се обележе, замотају полиетиленском фолијом и у истом положају оставе на инкубацију у термостат (23 °C) у трајању од седам дана.

После седам дана, мери се пречник колоније и умањује за пречник исечка (3 mm). Користећи ове податке, израчунава се инхибиција пораста (IP) за сваку варијанту према следећој формули:

$$IP (\%) = \frac{x_{sr} \times 100}{x_{sr.kont.} - 100}$$

IP – инхибиције пораста мицелије (%)

x_{sr} – просечна вредност пречника мицелије у третману (mm)

$x_{sr.kont.}$ – просечна вредност пречника мицелије у контроли (mm)

2.7. Вежба 6. Одређивање ефикасности биофунгицида методом пливајућих дискова

На дискове листова тест биљке који пливају у радним течностима биофунгицида наносе се споре тест гљиве. Оцена ефекта биофунгицида, се заснива на одређивању броја клијалих односно неклијалих спора на пливајућим дисковима.

Тест организм

Гљива (*Erysiphe/Blumeria graminis*, *Erysiphe cichoracearum*), са зараженог, свежег биљног материјала (биљке пшенице, јечма, краставца).

Биофунгицид

Ekstrasol F (*Bacillus subtilis* сој Č13, формулисан као SL, 1×10^8 CFU/ml)

Материјал и прибор

Биљне врсте као што су пшеница и јечам гаје се у саксијама до формирања правих листова, без оштећења од инсеката или других штетних агенаса.

1. Саксије
2. Стерилна земља
3. Семе једне од тест биљака
4. Стаклене пипете (1 ml, 2 ml, 10 ml)
5. Мензуре (100 cm^3)
6. Лабораторијске чаше (100 cm^3 , 250 cm^3)
7. Маказе
8. Четкица
9. Етикете
10. Петри кутије ($r = 4,5 \text{ cm}$)
11. Микроскоп
12. Термохигрометар

Поступак

Припреме се радне течности биофунгицида у препорученим количинама или концентрацијама (0,1 и 0,2%), као и у мањим и већим од препоручене (0,05; 0,075%;

0,4 и 0,6%). У обележене Петри кутије унесу се радне течности биофунгицида исте запремине.

Исеку се дискови (кругови) од здравих листова тест биљке на које се четкицом наносе конидије тест гљиве, потом се дискови поставе да пливају у радне течности фунгицида у Петри кутије. Постави се по четири диска у Петри кутије (Слика 7).

Контролна варијанта подразумева исти поступак али дискови пливају у води без фунгицида. Оглед се постави у четири или више понављања, на температури 21-25 °С при уобичајеном светлосном режиму (дан/ноћ).



Слика 7. Поступак извођења огледа (Фото: Д. Шуњка)

Оцена се изводи после четири дана, одређивањем клијалих и неклијалих од укупно 100 случајно одабраних конидија на најмањем увећању микроскопа. Резултати се коригују за проценат неклијалих спора у контроли и одређује се значајност разлика у ефикасности биофунгицида. Значајност разлика се тестира анализом варијансе применом *Duncan*-овог теста (Једнофакторијална анализа варијансе, Statistica 13).



Фото: Д. Мочевих (Органска башта Иловице)

2.8. БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА БИОИНСЕКТИЦИДА

Када је реч о одређивању токсичности и ефикасности биоинсектицида, теоретски, сваки инсект или тест организам који је осетљив на испитивану супстанцу може да се употреби у биотесту.

За рутински рад тест инсекти треба да поседују следеће особине:

- једноставно се гаје и одржавају,
- њима се лако рукује,
- способни да реагују на токсична једињења или њихове метаболите,
- да су високо осетљиви и
- што хомогенији у осетљивости, односно, униформни у одговорима или реаговању на инсектицид.

Најчешће коришћени инсекти у биотестовима су: *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegyptii*, *Anopheles quadrimaculatus*, *Culex quinquefasciatus*, *Musca domestica*, *Tribolium confusum*, *T. castaneum*, *Sitophilus granarius*, *S. oryzae*, *S. zeamais*, *Plutella maculipennis*, *Mamestra brassicae*, *Leptinotarsa decemlineata* и други.

Избор методе за мерење или одређивање токсичности условљен је особинама испитиваног једињења и својствима тест организма.

Деловање биоинсектицида на инсекате може бити:

- контактано
- дигестивно
- комбиновано (контактано-дигестивно)
- одбијајуће (репелентно, *antifeeding*)

Контактано деловање биоинсектицида подразумева излагање инсеката средини (земљиште, вода, уопштено животни простор) где инсекти долазе у контакт с токсичном материјом или агенсом.

У биотестовима биоинсектицид се може наносити непосредно на тело инсекта (топична апликација, потапање, прскање, запрашивање) или се инсекти доводе у контакт са претходно третираном површином.

Дигестивно деловање биоинсектицида остварује се уношењем инсектицида путем контаминираних хране у организам инсекта. Биоинсектициди (споре и кристали

Bacillus thuringiensis), изоловани из различитих сојева бактерије, делују на одређене врсте организама – *B. thuringiensis* var. *kurstaki* на гусенице неких Lepidoptera, а *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* на ларве тврдокрилаца (Coleoptera) и то тек по доспевању у пробавни тракт. При спорулацији, бактерија производи протеински кристал који није растворљив у води него се под утицајем алкалне средине у пробавном тракту инсекта разграђује, оштећујући слузокожу, затим ремети осмотску равнотежу, проузрокујући парализу пробавног тракта, чиме се зауставља исхрана и на крају проузрокује угинуће.

Комбиновано или контактано-дигестивно деловање биоинсектицида је у оним случајевима када је инсект у контакту са контаминираном средином, а истовремено се и храни контаминираном храном. Исхрана контаминираном храном може бити различите дужине или комбинована с неконтаминираном храном.

Одбијајуће (репелентно), маскирајуће и антифидно (antifeeding тест) деловање је промена у понашању код инсекта или смањење афинитета према третираној храни.

Принцип биолошке анализе биоинсектицида

У испитивањима биоинсектицида, ефекти токсичног једињења на инсекте могу бити угинуће (смрт, морталитет), одузетост (парализа) и фотомиграција. Под угулим подразумевају се јединке без знакова живота. Парализоване јединке дају знакове живота (покрети ногу, крила, антена), покрети су обично некоординирани, убрзани или успорени, не могу да заузму природан положај и нису у стању да оду са посматраног места. Фотомиграција представља реакцију инсеката на светло. Инсекти под дејством инсектицида постају непокретни и остају на светлу, а ван дејства светлости су покретљиви и брзо мигрирају.

Време оцене ефеката или читавање резултата, може бити различито, али унапред договорено, и увек једнако за све варијанте у огледу, пример после: 2, 6, 12, 24, 48 или 72 сата, сходно природи испитивања (иницијална токсичност, перзистентност и други), брзини деловања активне супстанце, тест организму и др.

Биолошка ефикасност инсектицида, укључујући и биоинсектициде, испитује се према стандардним методама утврђеним Упутствима Европске и медитеранске организације за заштиту биља (ЕРРО, 2004, vol. 1 и 3). Поменуте методе законом су прописане и у примени су и у Републици Србији, а односе се углавном на испитивање у пољским производним условима.

2.9. Вежба 7. Одређивање токсичности инсектицида природног порекла за складишне инсекте

Одређивање токсичности инсектицида природног порекла за складишне инсекте подразумева њихово излагање деловању инсектицида (различите количине) нанетих на зрна пшенице.

Морталитет, односно смртност инсеката, одређује се након одређеног времена експозиције, а на основу смртности, математички се одређује LD_{50} (*dosis letalis* - количина или доза инсектицида која проузрокује 50% смртности испитиване популације инсеката) и LT_{50} (време за које уине 50% испитиване популације инсеката, након примене одређене количине инсектицида) (Инђић и Вуковић, 2012).

Инсектициди природног порекла

1. Дијатомејска земља – 2000, 1000, 500, 100, 50, 25 g/t зрна
2. Protect-it – 1000, 500, 100, 50, 25, 12,5 g/t зрна.

Тест инсекти

Sitophilus sp. (*S. granarius* L.; *S. orizae* L.; *S. zeamais* Motsch), гајени на зрну пшенице и/или пиринча, кукуруза. Потребно је да су приближне старости (Слика 8а).

Tribolium sp. (*T. confusum* Du Val, *T. castaneum* Herbst, *T. madens* Charp), гајени на производима од житарица, зрнима пшенице, приближно исте старости (Слика 8б).



Слика 8. *Sitophilus orizae* L. (а) и *Tribolium confusum* Du Val. (б) (Фото: Д. Шуљка)

Материјал и прибор

1. Нетретирана зрна пшенице, кукуруза, пиринча, јечма
2. Стаклене тегле, Ерленмајер-тиквице или друге посуде ($V = 200, 300$ до 500 cm^3 или веће)
3. Стаклене плоче ($15 \times 15 \text{ cm}$ или веће површине)
4. Епрувете (пречника 1 cm , висине 16 cm) са сталком
5. Пластични или метални прстенови ($R = 5\text{--}6 \text{ cm}$)
6. Техничка и аналитичка вага
7. Меке пинцете за инсекте
8. Термохигрометар (собни или лабораторијски)
9. Сита ($R = 2\text{--}3 \text{ mm}$)
10. Штоперица или лабораторијски сат
11. Памучна вата, газа или ретко платно, гумице за повез
12. Термостат за узгој инсеката
13. Графитна оловка, лењир, милиметарска хартија, калкулатор

Поступак

На 500 g зрна меке пшенице се нанесе прописана количина препарата, и то низ од шест доза (напред наведених). Након ручног потресања у трајању од 30 s , свака тегла се оставља на механичкој мешалици 10 min . Следећег дана сваки узорак од 500 g пшенице се подели у четири дела, како би се обезбедила четири понављања за сваку дозу, и сваки део масе 125 g се ставља у стаклену теглу запремине 720 ml . Затим се у сваку теглу стави по 50 имага, поклопи са памучном тканином и причврсти гумицом. Пшеница у контроли се припреми на исти начин, али без присуства инсектицида природног порекла. Користити имага старости $2\text{--}5$ недеља, неодређеног односа полова.



Слика 9. Припрема огледа (Фото: Д. Шуњка)

Смртност (морталитет) се за примењени инсектицид природног порекла оцењује после 3, 6, 24 и 48 h од почетка излагања. По истеку овог времена, садржај тегле (третирана зрна и инсекти) се пренесе на сито где се зрна задрже а инсекти просеју. Затим се инсекти пинцетом пренесу на стаклену плочу унутар постављеног прстена и поклопе другом стакленом плочом (Слика 9). По истеку 30 минута очита се број живих и уинулих инсеката. Након тога се инсекти поново врате у тегле са зрном до завршетка огледа. Резултати за смртност се коригују за смртност у контроли.

Уколико морталитет у контроли не прелази 3% може да се занемари, јер нема већег утицаја на оцену ефеката испитиваног инсектицида. Међутим, морталитет у контроли не сме да буде ни сувише висок, сматра се да уколико прелази 25%, оглед треба поновити. У извесним случајевима може да се толерише и већи морталитет у контроли, на пример при испитивању ефикасности инсектицида у сузбијању штитастих ваши (Šovljanski i Klokočar-Šmit, 1976).

Када се за критеријум узима смртност (морталитет) користи се формула по Shneider – Orelli и гласи:

$$E (\%) = \frac{M_0 - M_k}{100 - M_k} \times 100$$

E – ефикасност (%)

M₀ – морталитет у огледу (%)

M_k – морталитет у контроли (%)

На основу ових података, Probit анализом одреде се ldp- линије (линија - лог. дозе или количине и Probit за смртност) и израчунају се вредности LD₅₀ инсектицида природног порекла математички, или применом програма Statistica 13.

Помоћу једначине регресионе праве могуће је израчунати теоретски очекивано дејство за било који логаритам концентрације и/или дозе, при чему се помоћу пробит таблице, проценат (%) морталитета преводи у rprobit вредност, обрнуто, за било коју вредност леталне дозе могуће је израчунати одговарајућу концентрацију или дозу примене. Једначина регресионе праве:

$$y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) \qquad b = \frac{\sum xy - \bar{x} \sum y}{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}$$

Константа *b* – коефицијент правца регресионе праве. То је релативан број који показује за колико се пробит јединица повећава дејство када се логаритам повећа за јединицу.

На решеном примеру одређивање токсичности дијатомејске земље за складишне инсекте у Табелама 7 и 8 приказано је израчунавање LD₅₀ и LT₅₀.

Табела 7. Математичко одређивање LD₅₀ Дијатомејске земље, после 48 h експозиције инсеката

Варијанта	Доза (g/t)	Log. дозе (x)	% уинулих инсеката	Probit (y)	x ²	xy
DZ	1000	3,0	87,0	6,126	9,0	18,378
DZ	500	2,699	75,5	5,690	7,285	19,662
DZ	100	2,0	56,8	5,171	4,0	10,342
DZ	50	1,699	28,5	4,432	2,887	7,529
Сума		Σ x=9,398		Σ y=21,42	Σ x²= 23,17	Σ xy=55,92
Просек		x=2,349		y=5,355		

$$b = \frac{55,92 - 2,349 \times 21,42}{23,17 - 2,349 \times 9,398} = \frac{5,60}{1,09} = 5,14 \quad \mathbf{b = 5,14}$$

Израчунавање вредности x

$$5 = 5,355 + 5,14 (x - 2,349)$$

$$x - 2,349 = 5 - 5,355$$

$$x - 2,349 = - 0,355$$

$$x = -0,355 + 2,349$$

$$x = 1,994$$

- антилогаритам од x (1,994) је 98,63

LD₅₀ = 98,63 g/t зрна пшенице

Табела 8. Математичко одређивање LT₅₀ Дијатомејске земље (1000 g/t зрна)

Варијанта	Време, h	Log. времена (x)	% уинулих инсеката	Probit (y)	x ²	xy
DZ (1000)	3	0,477	15,0	3,964	0,228	1,891
DZ (100)	6	0,778	25,5	4,431	0,605	3,447
DZ (1000)	24	1,380	70,5	5,539	1,904	7,644
DZ (1000)	48	1,681	87,0	6,126	2,826	10,298
Сума		Σ x=4,316		Σ y=20,06	Σ x²=5,563	Σ xy=23,28
Просек		x=1,079		y=5,015		

$$b = \frac{23,28 - 1,079 \times 20,06}{5,563 - 1,079 \times 4,316} = \frac{1,64}{0,91} = 1,80 \quad \mathbf{b = 1,80}$$

Израчунавање вредности x

$$5 = 5,015 + 1,80 (x - 1,079)$$

$$x - 1,079 = 5 - 5,015$$

$$x - 1,079 = -0,015$$

$$x = -0,015 + 1,079$$

$$x = 1,064$$

- антилогаритам од x (1,064) је 11,59

$$\mathbf{LT_{50} = 11,59 \text{ h}}$$

2.10. Вежба 8. Ефекти ботаничких инсектицида на гусенице губара (*Lymantria dispar* L.)

Одређивање ефеката (*antifeeding* и инсектицидног) ботаничких инсектицида за гусенице губара (*Lymantria dispar* L.) подразумева њихово излагање деловању инсектицида (различите концентрације) нанетих на лист храста („*no choice*“ тест). Антифидинг ефекат ботаничких инсектицида на гусенице губара одређује се преко антифидинг индекса (AFI - *Antifeeding index*), а инсектицидни ефекат се израчунава према Abbott –и.

Ботанички инсектициди

За испитивање антифидинг и инсектицидног деловања на гусенице губара користе се етанолни екстракти лишћа белог дуда (*Morus alba*), коре и листа киселог дрвета (*Ailanthus altissima*), у концентрацији 0,5, 1 и 2%, као и комерцијални препарат Rotena 43 (на бази ротенона) у препорученој концентрацији (0,3%) и концентрацијама нижим и вишим од препоручене (0,15; 0,2; 0,4 и 0,6%).

Тест инсекти

Као тест организам користе се гусенице губара (*Lymantria dispar*) L₂/L₃ развојног узраста. Јајна легла пољске популације губара се сакупе са стабла храста (*Quercus* sp.) и чувају у фрижидеру на температури око 3 °C, до постављања огледа.

Материјал и прибор

1. Листови храста
2. Лабораторијске чаше (250 cm³)
3. Епрувете (пречника 1 cm, висине 16 cm) са металним сталком
4. Меке пинцете за инсекте
5. Микропипета (20-200 μl)
6. Стаклене пипете (1 ml, 2 ml)
7. Стаклени цилиндри (100 cm³)
8. Петри посуде (r = 4,5 cm)
9. Фине четкице
10. Филтер хартија
11. Термохигрометар (собни или лабораторијски)
12. Памучна вата, газа или ретко платно, гумице за повез

13. Термостат за узгој инсеката
14. Графитна оловка, лењир, милиметарска хартија, калкулатор
15. Апарат за мерење површине листа (*Leaf area metra*)

Поступак

Постављањем јајних легала *L. dispar* на затегнут тил изнад лабораторијске чаше и благим кружним покретима тучком, из јајног легла се издвоје јаја губара. Епрувете које се користе у огледу се напуне водом до $\frac{1}{4}$ запремине, а уз помоћ пинцете у епрувету се постави комад вате, која нема контакт са водом.

Јаја ослобођена из легла се стављају у епрувете на вату. Другим комадом вате се епрувете затворе, како би се спречио излазак гусеница након пиљења (Слика 10а).



Слика 10. Епрувете у којима су се испилеле гусенице (а) и гусенице *L. dispar* (L_3 узраст) на листу храста, гајене у лабораторијским условима (б)
(Фото: В. Милетић)

Епрувете са јајима се инкубирају до пиљења гусеница (3-5 дана), на собној температури (22-25 °C) уз уобичајени светлосни режим дан/ноћ (16/8).

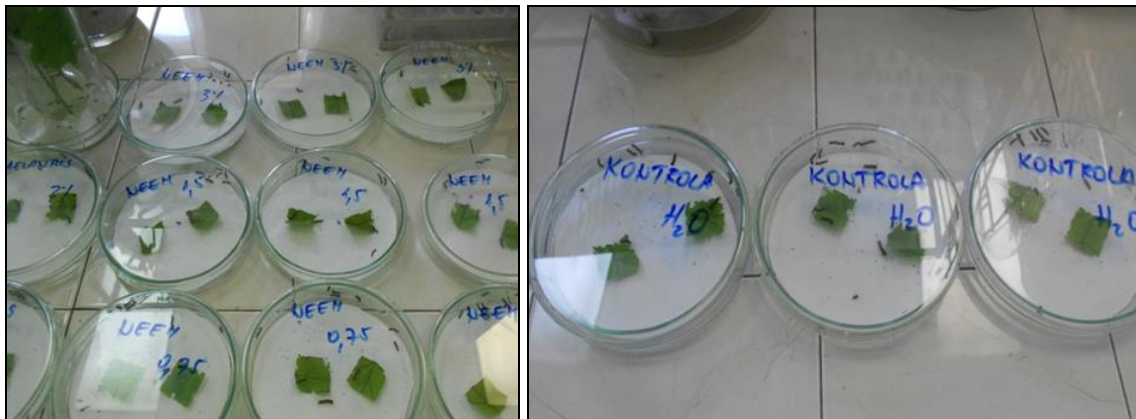
Након пиљења, L_1 гусенице се меком четкицом издвоје из епрувете и поставе у стаклене цилиндрице, у којима се свакодневно хране свежим листовима храста (*Quercus* sp.) до узраста L_2 и L_3 (Слика 10б).

Утицај екстракта на интезитет исхране испитује се у тесту без избора („no choice“ тесту). По два исечка листа храста (3×3 cm, укупно 900 mm²) потопе се у припремљени раствор екстракта или радне течности препарата, у трајању од 5 секунди, а потом се суше на ваздуху око 20 секунди и стављају у Петри кутије, на филтер хартију.

У тако припремљене Петри кутије уноси се по 10 гусеница губара L_2 и L_3 узраста (однос 1:1) по понављању. Оглед се поставља у четири понављања.

Као контролна варијанта користи се лишће храста потопљено у дестиловану воду и постављено на исти, горе описан начин.

„No choice“ тест се одвија на собној температури (22-25 °C) и под уобичајеним светлосним режимом (16/8 h) (Слика 11). Интензитет исхране се мери после 24 и 48 часова, а остварени резултати се пореде са контролом и изражавају се у процентима конзумиране лисне површине (%).



Слика 11. Тест без избора („No choice“ тест) (Фото: В. Милетић)

А) Одређивање *antifeeding* ефекта - *Antifeeding* ефекат (Слика 12) испитиваног екстракта на гусенице губара одређује се преко антифидинг индекса (AFI - *Antifeeding index*), а израчунава на основу формуле по Farrar et al. (1989) која гласи:

$$AFI (\%) = \frac{C - T}{C + T} \times 100$$

AFI – *antifeeding index* (%)

C – поједена површина у контроли

T – поједена површина у третману



Слика 12. *Antifeeding* ефекат, третман и контрола (Фото: В. Милетић)

Површина листа одређује се применом апарата за мерење површине листа на начин описан у Вежби 2.

Категоризација биљног екстракта на основу AFI вредности изводи се према Liu et al. (2009) (Табела 9).

Табела 9. Процена *antifeeding* ефекта на основу AFI вредности

AFI < 20%	нема <i>antifeeding</i> дејство (-)
50% > AFI ≥ 20%	слабо <i>antifeeding</i> дејство (+)
70% > AFI ≥ 50%	средње <i>antifeeding</i> дејство (++)
AFI ≥ 70%	јако <i>antifeeding</i> дејство (+++)

Б) Одређивање инсектицидног ефекта - Оцена инсектицидног ефекта биолошког препарата, на бази ротенона, изводи се након 24 и 48 h по третирању, на основу броја угинулих гусеница. Ефикасност се израчунава према *Abbott* -у (Wentzel, 1963).

$$E (\%) = \frac{K - T}{K} \times 100$$

E – ефикасност (%)

T – број живих јединки у третману

K – број живих јединки у контроли

2.11. Вежба 9. Тест токсичности микробиолошких биоинсектицида за кромпирову златицу (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

Принцип биотеста је заснован на одређивању токсичности микробиолошких биоинсектицида за имага и ларве кромпирове златице (*L. decemlineata*) у тестовима контактеног и дигестивног деловања. Базира се на мерењу одговора презимелог имага кромпирове златице и ларви прве генерације на препоручену количину примењеног биоинсектицида, као и ниже и више од препоручене.

Биоинсектициди

1. Naturalis Biogard (живе споре соја ATCC 74040 ентомопатогене гљиве *Beauveria bassiana* 2.3×10^7 спора/ml у 100 g препарата)
2. Novodor 3% (*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, 10.000 I.U./mg)

Тест инсекти

Као тест организам користе се имага и ларве кромпирове златице (*L. decemlineata*). У тест се укључују само здрави инсекти (без оштећења екстремитета), добре виталности и они који су у потпуности покретни.

Имага и ларве се после сакупљања чувају у лабораторијским условима, у кавезима, без допунске исхране, при температури 23 ± 2 °C, у условима уобичајене смене дана и ноћи. Неопходно је да бројност имага и ларви у кавезима буде оптимална, да не би дошло до појаве морталитета пре укључења у тест.

Материјал и прибор

1. Листови кромпира
2. Лабораторијске чаше (250 cm^3)
3. Епрувете (пречника 1 cm, висине 16 cm) са сталком
4. Меке пинцете за инсекте
5. Стаклене пипете (1 ml, 5 ml)
6. Стаклени цилиндри (100 cm^3)
7. Петри посуде ($r = 4,5 \text{ cm}$)
8. Фине четкице
9. Филтер хартија

10. Пластичне кутије са перфорираним поклопцем
11. Кавези за чување инсеката
12. Термохигрометар (собни или лабораторијски)
13. Памучна вата, газа или ретко платно, гумице за повез
14. Термостат за узгој инсеката
15. Графитна оловка, лењир, милиметарска хартија, калкулатор

Поступак

Припреми се серија концентрација (концентрација за практичну примену, две више и две ниже) радних течности испитиваног биоинсектицида. За препарат Novodor 3%, припреме се радне течности концентрације 0,5; 0,75; 1,0; 1,7 и 2,0%, а за препарат Naturalis Biogard 0,25; 0,33; 0,5; 1,0 и 2%.



Слика 13. Биотест контактнoг и дигестивног деловања биоинсектицида
(Фото: С. Вуковић)

А) Биотест контактнoг деловања биоинсектицида започети постављањем прво контролне варијанте то јест, потопити инсекте у воду (без присуства биоинсектицида), а затим у испитивани биоинсектицид, започети најнижом испитиваном концентрацијом па затим следећом вишом до највише у трајању од 5 секунди. Инсекти се најпре наносе на филтер папир после потапања, који упија сувишну течност са инсеката, а затим се одложе у пластичне кутије, на чијем дну је такође филтер папир. Оглед се поставља у четири понављања са по 30 јединки у сваком (Слика 13). Инсекти се не хране током огледа.

Б) Биотест дигестивног деловања биоинсектицида се састоји у потапању листа кромпира у радне течности биоинсектицида концентрација горе наведених, контролна варијанта се потапа у воду. Након тога лист се ставља у пластичну кутију, на чијем дну је филтер папир, а затим се унесу ларве кромпирове златице. Оглед се поставља у четири понављања са по 30 јединки у сваком.

Оцена ефеката се заснива на одређивању броја угинулих (угинули промене боју, потамне или посветле), паралисаних и живих ларви и имага по понављању.

Вредности се уносе у Табелу 10.

Ефекат се одређује после 24, 48 и 72 h од примене. Огледи се изводе у лабораторијским условима при температури 23 ± 2 °C и светлосном режиму дан/ноћ (16/8 h). При свакој оцени бележити RH и температуру.

Табела 10. Релативна вредност (%) за смртност имага кромпирове златице (*L. decemlineata*) после 24 h од примене биоинсектицида

Биоинсектицид (l/ha)	повнављање				\bar{x} u + p	u + p (%)	E (%)
	I u + p	II u + p	III u + p	IV u + p			
Контрола							

u + p-угинули+паралисани; \bar{x} -просечна вредност; E-ефикасност

Остварени подаци за смртност се коригују за смртност у контроли према Schneider-Orelli (1947), а резултати се приказују преко ефикасности (%).

$$E (\%) = \frac{M_0 - M_k}{100 - M_k} \times 100$$

E – ефикасност (%)

M_0 – морталитет у огледу (%)

M_k – морталитет у контроли (%)

2.12. Вежба 10. Ефекти етарских уља зависно од начина деловања (контактно, контактано-дигестивно и репелентно)

Одређивање токсичности етарских уља на складишне инсекте, подразумева њихово излагање деловању раствора етарског уља (различите концентрације) нанетих на дно Петри посуде ако се ради о испитивању контактано деловања или се раствор наноси на претходно направљене дискове од брашна и воде, за дигестивно или репелентно деловање етарског уља применом Y – тубе олфактометра.

Етарска уља

Босиљак (*Ocimum basilicum* L.), чајно дрво (*Melaleuca alternifolia*), цимет (*Cinnamomum zeylonicum*), бергамот (*Citrus bergamia*).

Тест инсекти

Tribolium sp. (*T. confusum* Du Val, *T. castaneum* Herbst, *T. madens* Charp), гајени на производима од житарица, зрнима пшенице, приближно исте старости.

Oryzaephilus sp. (*O. surinamensis* L.), гајени на зрну пшенице и/или пиринча, кукуруза. Потребно је да су приближне старости (Слика 14).



Слика 14. *Tribolium confusum* Du Val и *Oryzaephilus surinamensis* L.

(Фото: Anonymus 2020c; Anonymus 2020d)

Материјал и прибор

1. Нетретирана зрна пшенице, пиринча, кукуруза
2. Брашно
3. Кашика
4. Пластична посуда
5. Епрувете (пречника 1 cm, висине 16 cm) са сталком
6. Петри посуде ($r = 4,5$ cm)
7. Меке пинцете за инсекте
8. Парафилм
9. Стаклене пипете (1 ml, 2 ml)
10. Цилиндри (100 cm^3)
11. Етанол (96%)
12. Етарско уље
13. Памучна вата
14. Газа
15. Маркер
16. Термостат за узгој инсеката
17. Y – тубе олфактометар

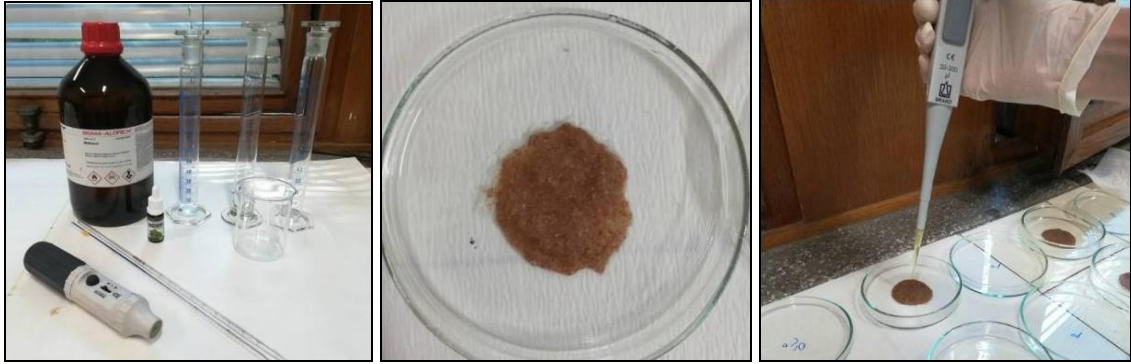
Поступак

Припремити серију раствора етарских уља одређене концентрације (0,5, 1 и 2%) у етанолу, користећи стаклене цилиндрице.

А) Контактна деловања. У Петри кутије се поставе кружни исечци филтер хартије на које се нанесе 0,3 ml раствора етарског уља, а затим се унесе по 10 одраслих инсеката. Тест се поставља у четири понављања. Као контрола користи се етанол и вода. Петри посуде се инкубирају у термостату у условима: $T = 25 \pm 1$ °C, а 45 - 70% RV, неонско дифузно осветљење интензитета 30159 candela 15 h и тамно 9 h.

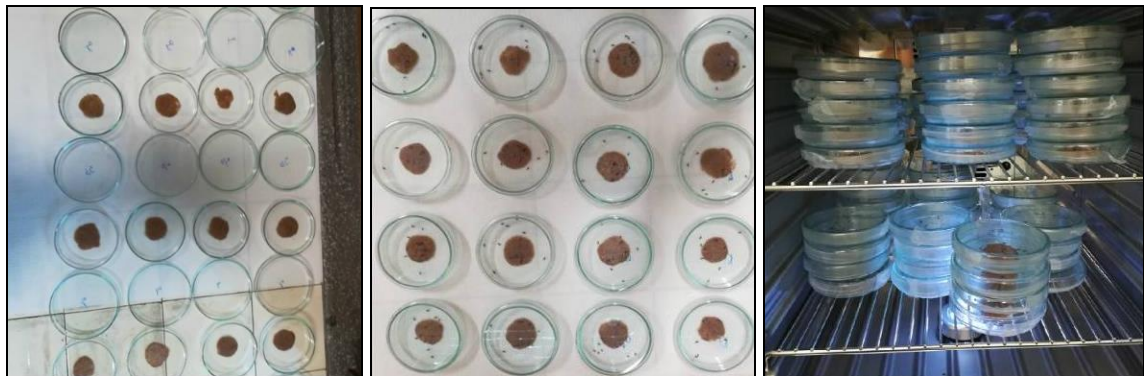
Б) Контактна-дигестивна деловања. Припреми се гушћа смеша од брашна и воде за прављење дискова. Кашиком се формира диск од смеше на дну Петри кутије (Слика 15). Затворене кутије ставити у сушницу на 15 минута или их оставити да се осуше на собној температури.

На дискове нанети по 0,3 ml раствора етарског уља одређене концентрације, а у контролу на диск нанети етанол и воду. Сачекати да се раствор осуши пре уношења инсеката. У сваку Петри посуду, унети 10 инсеката, а затим сваку затворити и пажљиво обложити парафилмом како инсекти не би изашли.



Слика 15. Материјал и поступак рада (Фото: Д. Бошковић)

Тест се постави у четири понављања. Петри посуде се инкубирају у термостату у условима: $T = 25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, а 45 – 70% RV, неонско дифузно осветљење интензитета 30159 candela 15 h и тамно 9 h (Слика 16).



Слика 16. Поступак рада (Фото: Д. Бошковић)

Број угинулих и паралисаних инсеката у тесту контактнoг и контактнo-дигестивнoг деловања, се прати 24, 48 и 72 h од примене, а морталитет се изражава у процентима и коригује у односу на смртност у контроли према Schneider - Orelli (1947). Подаци се обрађују статистичким софтвером Statistica 13, употребом *Duncan*-овог теста вишеструких поређења рангова (F однос), за интервал поверења 95%.

В) Репелентно деловање. Репелентно деловање етарског уља процењује се применом Y – тубе олфактометра (Слика 17). У централну “цев” тубуса, поставља се по 20 одраслих инсеката, након чега се улаз затвара парафилмом.

Тубус је дужине 35 cm и на другом крају се рачва у два крака, у један крак се стави вата намочена у раствор етарског уља одређене концентрације, док се у другом користи етанол (контрола).



Слика 17. Y-tube олфактометар (Фото: Д. Бошковић)

Процент репелентности је израчунат након 24 h, на основу броја инсеката који се налазе у контролном тубусу олфактометра и тубусу са етарским уљем и исказан индексом преферендума (PI) који је израчунат по једначини (Proscopio et al., 2003).

$$PI = \frac{\% \text{ инсеката у третману} - \% \text{ инсеката у контроли}}{\% \text{ инсеката у третману} + \% \text{ инсеката у контроли}}$$

Испитивана етарска уља су класификована, зависно од вредности PI, према следећој скали:

Табела 11. Скала за одређивање репелентног ефекта

Активност	Вредност PI
Репелентна	– 1,00 до – 0,10
Неутрална	– 0,10 до + 0,10
Атрактанска	+ 0,10 до + 1,00



Фото: Д. Мочевик (Органичка бајина Пловдив)

3. ПРИЛОГ

3.1 Прилог 1.

Листа регистрованих средстава за заштиту биља која се могу користити у органској пољопривредној производњи (Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије, март 2020. године)

Бр.	Назив средства за заштиту биља	Активна супстанца		Скраћено пословно име
		Назив	Садржај	Произвођач
1	2	3	4	5

1. ХЕМИЈСКА СРЕДСТВА ЗА ЗАШТИТУ БИЉА

1.1 ФУНГИЦИДИ

1.	Everest	bakar iz bakar-hidroksida	240 g/l	Chemical Agrosava, Београд
2.	Fungohem SC	bakar iz bakar-hidroksida	240 g/kg	Agromarket, Крагујевац
3.	Kocide 2000	bakar iz bakar-hidroksida	35%	Kocide LLC, SAD
4.	Cuprablau Z ultra WP	bakar iz bakar-hidroksida	350 g/l	Cinkarna, Slovenija
5.	Champ Flow	bakar iz bakar-hidroksida (bakar-hidroksid)	360 g/l (553,3 g/l)	Nufarm, Austria
6.	Blauvit	bakar iz bakar-hidroksida	500 g/kg	Župa, Крушевац
7.	Funguran OH	bakar iz bakar-hidroksida	500 g/kg	Spiess Urania, Deutschland
8.	Hidrocob 77	bakar iz bakar-hidroksida	500 g/kg	Ingenieria Industrial, Meksiko
9.	Vitra	bakar iz bakar-hidroksida (bakar-hidroksid)	500 g/kg (777,8 g/kg)	IQV, Spain
10.	Champ DP	bakar iz bakar-hidroksida	655 g/kg	Nufarm, Austria
11.	Nordox 75 WG	bakar iz bakar-oksida	750 g/kg	Nordox, Norway
12.	Cuprozin 35 WP	bakar iz bakar-oksihlorida	350 g/kg	Spiess Urania, Deutschland

13.	Neoram 37,5 WG	bakar iz bakar-oksihlorida	375 g/kg	Isagro, Italy
14.	Bakarni oksihlorid 50	bakar iz bakar-oksihlorida	500 g/kg	Galenika Fitofarmacija, Земун
15.	Cuprocaffaro 50 WP	bakar iz bakar-oksihlorida	500 g/kg	Isagro, Italy
16.	Ossiclor 35 WG	bakar iz bakar-oksihlorida	588 g/kg	Manica SpA, Italy
17.	Bakarno ulje	bakar-hidroksid + mineralno parafinsko ulje	155 + 500 g/l	Chemical Agrosava, Београд
18.	Zimotox	bakar iz bakaroksihlorida + mineralno ulje	100+700 g/l	HI Zaštita bilja, Ниш
19.	Cuproking	bakar iz bakar-sulfata trobaznog (sinonim)	360 g/l	Diachem, Italy
20.	Cuproxtat	bakar iz bakar sulfata trobaznog (sinonim)	190 g/l	Nufarm, Austria
21.	Bordovska čorba S 20 Župa	bakar iz Bordovske čorbe	200 g/kg	Župa, Крушевац
22.	Bordovska čorba 100 SC	bakar iz Bordovske čorbe	100 g/l	Galenika Fitofarmacija, Земун
23.	Blue Bordo	bakar iz Bordovske čorbe	200 g/l	UPL, Europe, Great Britain
24.	Cuperval	bakar iz Bordovske čorbe	200 g/l	IQV, Spain
25.	Cosavet 80 DF	sumpor	800 g/kg	Sulfur Mills, India
26.	Kossan WG	sumpor	800 g/kg	Albaugh, Slovenija
27.	Kumululus DF	sumpor	800 g/kg	BASF SE, Deutschland
28.	Microthiol special dispers	sumpor	800 g/kg	UPL, Europe, Great Britain
29.	Thiovit jet 80 WG	sumpor	800 g/kg	Syngenta Crop Protection, Switzerland
30.	Wetsul	sumpor	800 g/kg	Azufrera y Fertilizantes Pallares, Spain

1.2. ЛИМАЦИДИ

1.	Pužomor pelete Fe	gvožđe fosfat $\text{FePO}_4 \times$ $2\text{H}_2\text{O}$ (sinonim)	10 g/kg	Chemical Agrosava, Београд
----	----------------------	---	---------	-------------------------------

1.3. ИНСЕКТИЦИДИ

1.	Galmin 800	parafinsko ulje	780 g/l	Galenika Fitofarmacija, Земун
2.	Letol EC	parafinsko ulje	790 g/l	Chemical Agrosava, Београд
3.	Herbos belo ulje EW	parafinsko ulje	800 g/kg	Iskra, Hrvatska
4.	Nitropol S	parafinsko ulje	855 g/l	Nitrofarm, Greece
5.	Galmin	parafinsko ulje	940 g/l	Galenika Fitofarmacija, Земун
6.	Ovitex	parafinsko ulje	817 g/l	
7.	Ozoneem trishul 1% EC	Azadirachtin	10 g/l	Ozone Biotech, India
8.	Laser 240 SC	spinosad	240 g/l	Dow AgroSciences, Austria

2. БИОПЕСТИЦИДИ

2.1. БИОФУНГИЦИДИ

2.1.1. МИКРОБИОЛОШКИ

1.	Ekstrasol F	<i>Bacillus subtilis</i> soj Č13	1 x 10 ⁸ CFU/cm ³	BioGenesis, Бачка Топола у сарадњи са Југо Нем, Лесковац
2.	Bacillomix aurum B	<i>Bacillus subtilis</i> soj BS10	6 X 10 ¹⁰ CFU/ml	Амакс, Нови Сад
3.	Polyversum	<i>Pythium</i> <i>oligandrum</i> P	Pythium oligandrum 3% (1 X 10 ⁶ - 10 ⁷ oospora po g)	Biopreparaty, Czech Republic
4.	Vintec	<i>Trichoderma</i> <i>atroviride</i> soj SC1	1x10 CFU	BI-PA NV/SA, Belgija
5.	Erwix	<i>Bacillus subtilis</i> soj Z3	15 X 10 ⁷ CFU/m	Agrounik, Београд

2.1.2. БИОХЕМИЈСКИ

1.	Timorex gold	ulje čajnog drveta (<i>Melaleuca</i> <i>alternifolia</i>) + parafinsko ulje	222,5 + 194,5 g/l	Stockton Israel, Israel
----	--------------	--	-------------------	-------------------------

2.2. БИОИНСЕКТИЦИДИ - МИКРОБИОЛОШКИ

1.	Foray 48 B	<i>Bacillus thuringiensis</i> subspec. <i>kurstaki</i>	10.600 Anagastia kuhniella IU/mg	Valent Biosciences, USA
2.	Lepinox plus	<i>Bacillus thuringiensis</i> subspec. <i>kurstaki</i>	32.000 IU/mg	CBC, Italy
3.	Carpovirusine evo 2	<i>Cydia pomonella</i> granulovirus (CpGVR5) Virus granuloze jabukinog smotavca izolat CpGV-R5	909 g/l (1×10^{13} ОВ/1 оклузионих тела по литри)	Arysta LifeScience S.A.S., Francuska
4.	Madex twin	<i>Cydia pomonella</i> granulovirus (CpGVV22)	520 g/l (1×10^{13} ОВ/1 оклузионих тела по литри)	Andermatt Biocontrol AG, Switzerland

2.3. БИОАКАРИЦИДИ - МИКРОБИОЛОШКИ

1.	Naturalis biogard	<i>Bauveria bassiana</i> soj ATCC 74040	-	CBC, Italy
----	-------------------	--	---	------------

3.2 Прилог 2. Табела за одређивање потребне количине/запремине препарата

Количина/запремина препарата сходно траженој концентрацији и запремини воде (резервоара)

Задага конц. (%)	Запремина воде за припрему радне течности																	
	Литара (l)																	
	1	10	100	1	2	3	5	6	8	10	15	20	50	100	300	400	600	1000
0,01	0,1	0,001	0,01	0,1	0,2	0,3	0,5	0,6	0,8	1,0	1,5	2	5,0	10	30	40	60	100
0,02	0,2	0,002	0,02	0,2	0,4	0,6	1,0	1,2	1,6	2,0	3,0	4	10	20	60	80	120	200
0,03	0,3	0,003	0,03	0,3	0,6	0,9	1,5	1,8	2,4	3,0	4,5	6	15	30	90	120	180	300
0,04	0,0004	0,004	0,04	0,4	0,8	1,2	2,0	2,4	3,2	4,0	6,0	8	20	40	120	160	240	400
0,05	0,0005	0,005	0,05	0,5	1,0	1,5	2,5	3,0	4,0	5,0	7,5	10	25	50	150	200	300	500
0,06	0,0006	0,006	0,06	0,6	1,2	1,8	3,0	3,6	4,8	6,0	9	12	30	60	180	240	360	600
0,10	0,001	0,01	0,1	1,0	2,0	3,0	5,0	6,0	8,0	10,0	15	20	30	100	300	400	600	1
0,12	0,0012	0,012	0,12	1,2	2,4	3,6	6,0	7,2	9,6	12,0	18	24	60	120	360	480	720	1,2
0,15	0,0015	0,015	0,15	1,5	3,0	4,5	7,5	9,0	12,0	15,0	22	30	75	150	450	600	900	1,5
0,2	0,002	0,02	0,2	2,0	4,0	6,0	10,0	12,0	16,0	20,0	30	40	100	200	600	800	1,2	2
0,25	0,0025	0,025	0,25	2,5	5,0	7,5	12,5	15,0	20,0	25,0	37	50	125	250	750	1	1,5	2,5
0,3	0,003	0,03	0,3	3,0	6,0	9,0	15,0	18,0	24,0	30,0	45	60	150	300	900	1,2	1,8	3
0,4	0,004	0,04	0,4	4,0	8,0	12,0	20,0	24,0	32,0	40,0	60	80	200	400	1,2	1,6	2,4	4
0,5	0,005	0,05	0,5	5,0	10,0	15,0	25,0	30,0	40,0	50,0	75	100	250	500	1,5	2	3	5
0,6	0,006	0,06	0,6	6,0	12,0	18,0	30,0	36,0	48,0	60,0	90	120	300	600	1,8	2,4	3,6	6
1	0,01	0,1	1,0	10,0	20,0	30,0	50,0	60,0	80,0	100,0	150	200	500	1	3	4	6	10
2	0,02	0,2	2	20	40	60	100	120	160	200	300	400	1	2	6	8	12	20
3	0,03	0,3	3	30	60	90	150	180	240	300	450	600	1,5	3	9	12	18	30
5	0,05	0,5	5	50	100	150	250	300	400	500	750	1	2,5	5	15	20	30	50
10	0,1	1	10	100	200	300	500	600	800	1000	1,5	2	5	10	30	40	60	100

mg, µl

g, ml, cm³

kg, l

3.3 Прилог 3.

Трансформација процента морталитета у *probit* вредности

	.0	.1	.2	.3	.4	.5	.6	.7	.8	.9
0	0.0000	1.9098	2.1218	2.2522	2.3479	2.4242	2.4879	2.5427	2.5911	2.6344
1	2.6737	2.7096	2.7429	2.7738	2.8027	2.8299	2.8556	2.8799	2.9031	2.9251
2	2.9463	2.9665	2.9859	3.0046	3.0226	3.0400	3.0569	3.0732	3.0890	3.1043
3	3.1192	3.1337	3.1478	3.1616	3.1750	3.1881	3.2009	3.2134	3.2256	3.2376
4	3.2493	3.2608	3.2721	3.2831	3.2940	3.3046	3.3151	3.3253	3.3354	3.3454
5	3.3551	3.3648	3.3742	3.3836	3.3928	3.4018	3.4107	3.4195	3.4282	3.4368
6	3.4452	3.4536	3.4618	3.4699	3.4780	3.4859	3.4937	3.5015	3.5091	3.5167
7	3.5242	3.5316	3.5389	3.5462	3.5534	3.5605	3.5675	3.5745	3.5813	3.5882
8	3.5949	3.6016	3.6083	3.6148	3.6213	3.6278	3.6342	3.6405	3.6468	3.6531
9	3.6592	3.6654	3.6715	3.6775	3.6835	3.6894	3.6953	3.7012	3.7070	3.7127
10	3.7184	3.7241	3.7298	3.7354	3.7409	3.7464	3.7519	3.7574	3.7628	3.7681
11	3.7735	3.7788	3.7840	3.7893	3.7945	3.7996	3.8048	3.8099	3.8150	3.8200
12	3.8250	3.8300	3.8350	3.8399	3.8448	3.8497	3.8545	3.8593	3.8641	3.8689
13	3.8736	3.8783	3.8830	3.8877	3.8923	3.8969	3.9015	3.9061	3.9107	3.9152
14	3.9197	3.9242	3.9286	3.9331	3.9375	3.9419	3.9463	3.9506	3.9550	3.9593
15	3.9636	3.9678	3.9721	3.9763	3.9806	3.9848	3.9890	3.9931	3.9973	4.0014
16	4.0055	4.0096	4.0137	4.0178	4.0218	4.0259	4.0299	4.0339	4.0379	4.0419
17	4.0458	4.0498	4.0537	4.0576	4.0615	4.0654	4.0693	4.0731	4.0770	4.0808
18	4.0846	4.0884	4.0922	4.0960	4.0998	4.1035	4.1073	4.1110	4.1147	4.1184
19	4.1221	4.1258	4.1295	4.1331	4.1367	4.1404	4.1440	4.1476	4.1512	4.1548
20	4.1584	4.1619	4.1655	4.1690	4.1726	4.1761	4.1796	4.1831	4.1866	4.1901
21	4.1936	4.1970	4.2005	4.2039	4.2074	4.2108	4.2142	4.2176	4.2210	4.2244
22	4.2278	4.2312	4.2345	4.2379	4.2412	4.2446	4.2479	4.2512	4.2546	4.2579
23	4.2612	4.2644	4.2677	4.2710	4.2743	4.2775	4.2808	4.2840	4.2872	4.2905
24	4.2937	4.2969	4.3001	4.3033	4.3065	4.3097	4.3129	4.3160	4.3192	4.3224
25	4.3225	4.3287	4.3318	4.3349	4.3380	4.3412	4.3443	4.3474	4.3505	4.3536
26	4.3567	4.3597	4.3628	4.3659	4.3689	4.3720	4.3750	4.3781	4.3811	4.3842
27	4.3872	4.3902	4.3932	4.3962	4.3992	4.4022	4.4052	4.4082	4.4112	4.4142
28	4.4172	4.4201	4.4231	4.4260	4.4290	4.4319	4.4349	4.4378	4.4408	4.4437
29	4.4466	4.4495	4.4524	4.4554	4.4583	4.4612	4.4641	4.4670	4.4698	4.4727
30	4.4756	4.4785	4.4813	4.4842	4.4871	4.4899	4.4928	4.4956	4.4985	4.5013
31	4.5041	4.5070	4.5098	4.5126	4.5155	4.5183	4.5211	4.5239	4.5267	4.5295
32	4.5323	4.5351	4.5379	4.5407	4.5435	4.5462	4.5490	4.5518	4.5546	4.5573
33	4.5601	4.5628	4.5656	4.5684	4.5711	4.5739	4.5766	4.5793	4.5821	4.5848
34	4.5875	4.5903	4.5930	4.5957	4.5984	4.6011	4.6039	4.6066	4.6093	4.6120
35	4.6147	4.6174	4.6201	4.6228	4.6255	4.6281	4.6308	4.6335	4.6362	4.6389
36	4.6415	4.6442	4.6469	4.6495	4.6522	4.6549	4.6575	4.6602	4.6628	4.6655
37	4.6681	4.6708	4.6734	4.6761	4.6787	4.6814	4.6840	4.6866	4.6893	4.6919
38	4.6945	4.6971	4.6998	4.7024	4.7050	4.7076	4.7102	4.7129	4.7155	4.7181
39	4.7207	4.7233	4.7259	4.7285	4.7311	4.7337	4.7363	4.7389	4.7415	4.7441
40	4.7467	4.7492	4.7518	4.7544	4.7570	4.7596	4.7622	4.7647	4.7673	4.7699
41	4.7725	4.7750	4.7776	4.7802	4.7827	4.7853	4.7879	4.7904	4.7930	4.7955
42	4.7981	4.8007	4.8032	4.8058	4.8083	4.8109	4.8134	4.8160	4.8185	4.8211
43	4.8236	4.8262	4.8287	4.8313	4.8338	4.8363	4.8389	4.8414	4.8440	4.8465
44	4.8490	4.8516	4.8541	4.8566	4.8592	4.8617	4.8642	4.8668	4.8693	4.8718
45	4.8743	4.8769	4.8794	4.8819	4.8844	4.8870	4.8895	4.8920	4.8945	4.8970
46	4.8996	4.9021	4.9046	4.9071	4.9096	4.9122	4.9147	4.9172	4.9197	4.9222
47	4.9247	4.9272	4.9298	4.9323	4.9348	4.9373	4.9398	4.9423	4.9448	4.9473
48	4.9498	4.9524	4.9549	4.9574	4.9599	4.9624	4.9649	4.9674	4.9699	4.9724
49	4.9749	4.9774	4.9799	4.9825	4.9850	4.9875	4.9900	4.9925	4.9950	4.9975
50	5.0000	5.0025	5.0050	5.0075	5.0100	5.0125	5.0150	5.0175	5.0201	5.0226
51	5.0251	5.0276	5.0301	5.0326	5.0351	5.0376	5.0401	5.0426	5.0451	5.0476

	.0	.1	.2	.3	.4	.5	.6	.7	.8	.9
52	5.0502	5.0527	5.0552	5.0577	5.0602	5.0627	5.0652	5.0677	5.0702	5.0728
53	5.0753	5.0778	5.0803	5.0828	5.0853	5.0878	5.0904	5.0929	5.0954	5.0979
54	5.1004	5.1030	5.1055	5.1080	5.1105	5.1130	5.1156	5.1181	5.1206	5.1231
55	5.1257	5.1282	5.1307	5.1332	5.1358	5.1383	5.1408	5.1434	5.1459	5.1484
56	5.1510	5.1535	5.1560	5.1586	5.1611	5.1637	5.1662	5.1687	5.1713	5.1738
57	5.1764	5.1789	5.1815	5.1840	5.1866	5.1891	5.1917	5.1942	5.1968	5.1993
58	5.2019	5.2045	5.2070	5.2096	5.2121	5.2147	5.2173	5.2198	5.2224	5.2250
59	5.2275	5.2301	5.2327	5.2353	5.2378	5.2404	5.2430	5.2456	5.2482	5.2508
60	5.2533	5.2559	5.2585	5.2611	5.2637	5.2663	5.2689	5.2715	5.2741	5.2767
61	5.2793	5.2819	5.2845	5.2871	5.2898	5.2924	5.2950	5.2976	5.3002	5.3029
62	5.3055	5.3081	5.3107	5.3134	5.3160	5.3186	5.3213	5.3239	5.3266	5.3292
63	5.3319	5.3345	5.3372	5.3398	5.3425	5.3451	5.3478	5.3505	5.3531	5.3558
64	5.3585	5.3611	5.3638	5.3665	5.3692	5.3719	5.3745	5.3772	5.3799	5.3826
65	5.3853	5.3880	5.3907	5.3934	5.3961	5.3989	5.4016	5.4043	5.4070	5.4097
66	5.4125	5.4152	5.4179	5.4207	5.4234	5.4261	5.4289	5.4319	5.4344	5.4372
67	5.4399	5.4427	5.4454	5.4482	5.4510	5.4538	5.4565	5.4593	5.4621	5.4649
68	5.4677	5.4705	5.4733	5.4761	5.4789	5.4817	5.4845	5.4874	5.4902	5.4930
69	5.4959	5.4987	5.5015	5.5044	5.5072	5.5101	5.5129	5.5158	5.5187	5.5215
70	5.5244	5.5273	5.5302	5.5330	5.5359	5.5388	5.5417	5.5446	5.5476	5.5505
71	5.5534	5.5563	5.5592	5.5622	5.5651	5.5681	5.5710	5.5740	5.5769	5.5799
72	5.5828	5.5858	5.5888	5.5918	5.5948	5.5978	5.6008	5.6038	5.6068	5.6098
73	5.6128	5.6158	5.6189	5.6219	5.6250	5.6280	5.6311	5.6341	5.6372	5.6403
74	5.6433	5.6464	5.6495	5.6526	5.6557	5.6588	5.6620	5.6651	5.6682	5.6713
75	5.6745	5.6776	5.6808	5.6840	5.6871	5.6903	5.6935	5.6967	5.6999	5.7031
76	5.7063	5.7095	5.7128	5.7160	5.7192	5.7225	5.7257	5.7290	5.7323	5.7356
77	5.7388	5.7421	5.7454	5.7488	5.7521	5.7554	5.7588	5.7621	5.7655	5.7688
78	5.7722	5.7756	5.7790	5.7824	5.7858	5.7892	5.7926	5.7961	5.7995	5.8030
79	5.8064	5.8099	5.8134	5.8169	5.8204	5.8239	5.8274	5.8310	5.8345	5.8381
80	5.8416	5.8452	5.8488	5.8524	5.8560	5.8596	5.8633	5.8669	5.8705	5.8742
81	5.8779	5.8816	5.8853	5.8890	5.8927	5.8965	5.9002	5.9040	5.9078	5.9116
82	5.9154	5.9192	5.9230	5.9269	5.9307	5.9346	5.9385	5.9424	5.9463	5.9502
83	5.9542	5.9581	5.9621	5.9661	5.9701	5.9741	5.9782	5.9822	5.9863	5.9904
84	5.9945	5.9986	6.0027	6.0069	6.0110	6.0152	6.0194	6.0237	6.0279	6.0322
85	6.0364	6.0407	6.0450	6.0494	6.0537	6.0581	6.0625	6.0669	6.0714	6.0758
86	6.0803	6.0848	6.0893	6.0939	6.0985	6.1031	6.1077	6.1123	6.1170	6.1217
87	6.1264	6.1311	6.1359	6.1407	6.1455	6.1503	6.1552	6.1601	6.1650	6.1700
88	6.1750	6.1800	6.1850	6.1901	6.1952	6.2004	6.2055	6.2107	6.2160	6.2212
89	6.2265	6.2319	6.2372	6.2426	6.2481	6.2536	6.2591	6.2646	6.2702	6.2759
90	6.2816	6.2873	6.2930	6.2988	6.3047	6.3106	6.3165	6.3225	6.3285	6.3346
91	6.3408	6.3469	6.3532	6.3595	6.3658	6.3722	6.3787	6.3852	6.3917	6.3984
92	6.4051	6.4118	6.4187	6.4255	6.4325	6.4395	6.4466	6.4538	6.4611	6.4684
93	6.4758	6.4833	6.4909	6.4985	6.5063	6.5141	6.5220	6.5301	6.5382	6.5464
94	6.5548	6.5632	6.5718	6.5805	6.5893	6.5982	6.6072	6.6164	6.6258	6.6352
95	6.6449	6.6546	6.6646	6.6747	6.6849	6.6954	6.7060	6.7169	6.7279	6.7392
96	6.7507	6.7624	6.7744	6.7866	6.7991	6.8119	6.8250	6.8384	6.8522	6.8663
97	6.8808	6.8957	6.9110	6.9268	6.9431	6.9600	6.9774	6.9954	7.0141	7.0335
98	7.0537	7.0749	7.0969	7.1201	7.1444	7.1701	7.1973	7.2262	7.2571	7.2904
99	7.3263	7.3656	7.4089	7.4573	7.5121	7.5758	7.6521	7.7478	7.8782	8.0902

4. ЛИТЕРАТУРА

- *Anonymus* (2020). Листа регистрованих средстава за заштиту биља која се могу користити у органској производњи, Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије, Управа за заштиту биља. https://www.uzb.minpolj.gov.rs/attachments/252_Lista%20sredstava%20za%20za%C5%A1titu%20bilja%20za%20organsku%20proizvodnju%20na%20dan%2022.01.pdf 22.01.2020.
- *Anonymus* (2020a). <https://www.savjetodavna.hr/2008/07/22/fitotoksicnost-uzrokovana-nepravilnom-primjenom-herbicida-ili-fungicida/>
- *Anonymus* (2020b). <https://alchetron.com/Alternaria-solani>
- *Anonymus* (2020c). https://www.wikiwand.com/en/Home-stored_product_entomology
- *Anonymus* (2020d). https://baza.biomap.pl/en/taxon/species-oryzaephilus_surinamensis/photos_tx
- Abd-Alla, M.A., Haggag, W.M. (2013). Use of some plant essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of antrachnose disease of mango fruits (*Mangi feraindica* L.) caused by *Colletotrichum gleosporioides* (Penz). <https://www.semanticscholar.org/paper/Use-of-Some-Plant-Essential-Oils-as-Post-harvest-in-Abd-Alla-Haggag/d23063a863685f707ed956ece76b108d31618425>
- Anjum, Th., Stevenson, Ph., Hall, D., Bajwa, R. (2005). Allelopathic potential of *Helianthus annuus* L. (sunflower) as natural herbicide, Regional Institute, Fourth World Congress on Allelopathy.
- Berrera Necha, L.L., Bautista-Baunos, S., FloresMoctazuma, H.E., Estudillo, A.R. (2008). Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gleosporioides* (Penz.) and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Pathology Journal*, 24, 1-5.
- BPIA - Biological Products Industry Alliance (2017). History of biopesticides. <http://www.bpia.org/history-of-biopesticides/>
- Blumer, S., Kundert, J. (1951). Methoden der biologischen Laborprufung von Kupferpreparaten. *Phytopathology*, 17, 161-199.
- Bošković, D., Šunjka, D., Vuković, S., Lazić, S., Žunić, A. (2018). Bioinsekticidi u savremenoj poljoprivrednoj proizvodnji. *Biljni lekar*, 46(5), 534-550.
- Boyetchko, S., Pedersen, E., Punja, Z., & Reddy, M. (1999). Formulations of Biopesticides. *Biopesticides*, 487–508.
- Bruneton, J., (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. In: *Technique et Documentation Lavoisier*, Paris, 418-419.
- Burgas, H. D. (1998). *Formulation of Microbial Biopesticides*, edition 1, Springer Netherlands.
- Cawoy, X., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M. (2011). Bacillus-based biological control of plant diseases. In: *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management* (Ed. Stoytcheva, M.), 273-302.

- Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W.P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 366(1573), 1987–1998.
- Copping, L.G., Menn, J.J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56(8), 651–676.
- Copping, L.G. (2009). *The Manual of Biocontrol Agents*. Fourth edition of the *BioPesticide Manual*, BCPC.
- Dara, S.D., O'neal, M., Bio, M. (2018). Brief history of botanical and microbial pesticides and their current market. *E-journal of entomology and biologicals*. https://www.researchgate.net/publication/328890014_Brief_history_of_botanical_and_microbial_pesticides_and_their_current_market.
- Dilday, R.H., Yan, W.G., Moldenhauer, K.A.K., Gravois, K.A. (1998). Allelopathic activity in rice for controlling major aquatic weeds. In: *Allelopathy in rice* (M. Olofsdotter, ed.), International Rice Research Institute, Manila, Philippines, 7-26.
- EPPO (2004a). *EPPO Standards, Guidelines for the Efficacy Evaluation of Plant Protection Products*, Vol. 3. Insecticide and Acaricides, OEPP/EPPO, Paris.
- EPPO (2004b). *EPPO Standards, Guidelines for the Efficacy Evaluation of Plant Protection Products*, Vol. 1. General and Miscellaneous Guidelines, New and Revised Guidelines, OEPP/EPPO, Paris.
- Finney, D.J., (1962). *Probit analysis*, second edition. Cambridge at the University Press.
- Gar, K.A. (1963). *Metodi ispitivanja toksičnosti i efikasnosti insekticidov*. Seljhoz. Lit, Moskva.
- Grahovac, M. (2014). *Biološko suzbijanje Colletotrichum spp. parazita uskladištenih plodova jabuke*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- Grahovac, M., Inđić, D., Lazio, S., Vuković, S. (2004). Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi. *Pestic. fitomed.*, 24(4), 245-258.
- Ibrahim, M.A., Griko, N., Junker, M., Bulla, L. (2010): *Bacillus thuringiensis: A genomics and proteomics perspective*. *Bioeng Bugs*. 31–50.
- Ibrahim, S. (2019). *Essential oil nanoformulations as a novel method for insect pest control in horticulturae*. <https://www.intechopen.com/books/horticultural-crops/essential-oil-nanoformulations-as-a-novel-method-for-insect-pest-control-in-horticulture>
- International Allelopathy Society (IAS) (2005). *Constitution and Bylaws*. www.ias.usa.es/bylaws.htm
- Инђић, Д., Вуковић, С. (2012). *Практикум из фотофармације (fungициди, зооциди)*. Универзитет у Новом Саду, Пољопривредни факултет, Нови Сад.
- Keswani, C., Bisen, K., Singh, V., Sarma, B. K., Singh, H.B. (2016). *Formulation Technology of Biocontrol Agents: Present Status and Future Prospects*. *Bioformulations: For Sustainable Agriculture*, 35–52.

- Knowles, A. (2005). New developments in crop protection product formulation. (pp. 153-156). Agrow Reports UK: T and F Informa UK Ltd.
- Knowles, A. (2008). Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *Environmentalist*, 28(1), 35-44.
- Kovačević, D., Momirović, N. (2004). Borba protiv korova u organskoj poljoprivredi. *Acta herbologica*, 13(2), 261-267.
- Madduri, K., Waldron, C., Merlo, D.J. (2001). Rhamnose Biosynthesis Pathway Supplies Precursors for Primary and Secondary Metabolism in *Saccharopolyspora spinosa*. *Journal of Bacteriology, American Society for Microbiology*, 19, (183), 5632-5638.
- Macías, F.A., Torres, A., Galindo, J.L., Varela, R.M., Alvarez, J.A., Molinillo, J.M. (2002). Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick, 61(6), 687-92.
- Milenković, S. (2007). Biopesticidi u organskoj proizvodnji, Univerzitet u Beogradu, Fakultet za biofarming, Bačka Topola.
- Miletić, V., Inđić, D., Vuković, S., Lazić, S., Gvozdenc, S., Šunjka, D. (2013). Etarska ulja i biljni ekstrakti od značaja u fitomedicini. *Biljni lekar*, 3, 350-361.
- Procopio, N.A., Zampella, R.A., Bunnell, J.F., Laidig, K.J. (2003). The Rancocas Creek Basin. A Report to the Pinelands Commission on the Status of Selected Aquatic and Wetland Resources. New Jersey Pinelands Commission. New Lisbon, NJ, USA.
- Schneider-Orelli, O. (1947). *Entomologisches Practicum*, 2, Aufulage, Aarau.
- Gašić, S., Tanović, B. (2013). Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. *Pestic. Phytomed.*, 28(2), 97–102.
- Šovljanski, R., Klokočar-Šmit, Z. (1976). *Praktikum iz fitofarmacije*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Tadros, F. (2005). *Applied surfactants, principles and applications*. (187-256). Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA
- Tanović, B., Hrustić, J., Grahovac, M., Mihajlović, M., Delibašić, G., Kostić, M., Inđić, D. (2011). Effectiveness of fungicides and an essential-oil-based product in the control of grey mould disease in raspberry. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 18 (5), 689-695.
- Tanović, B., Milijašević, S., Obradović, A., Todorović, B., Rekanović, E. i Milikić, S. (2004). In vitro efekti etarskih ulja iz začinskih i lekovitih biljaka koji se prenose zemljištem. *Pesticidi i fitomedicina*, 19, 233-240.
- Uremis, I., Arslan, M., Sangun, M. K. (2009). Herbicidal activity of essential oils on the germination of some problem weeds. *Asian Journal of Chemistry*, 21 (4), 3199-3210.
- Vuković, S., Inđić, D., Gvozdenc, S. (2104). Phytotoxic effects of fungicides, insecticides and nonpesticidal components on pepper depending on water quality. *Pesticides & Phytomedicine*, 29 (2), 145-153.
- Vuković, S., Šunjka, D., Inđić, D., Gvozdenc, S., (2013). Botanički fungicidi i herbicidi od značaja za poljoprivredu. *Biljni lekar*, 4, 451-458.

- Wentzel, H. (1963). Pflanzenschutz nachrichten Bayer. The basic Principles of Crop Protection Field Trials, 1963/3.
- Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A. and Wisniewski, M.E. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease, 81, 204-210.
- Zibae, A. (2011). Botanical Insecticides and Their Effects on Insect Biochemistry and Immunity. In book: Pesticides in the Modern World-Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment, Chapter 4.