УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Департман за Фитомедицину и заштиту животне средине

Сара Шиљеговић
дипл. инж. пољопривреде

Утицај типова хране за ларве на могућност масовног гајења азијског тиграстог комарца

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2023

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Департман за Фитомедицину и заштиту животне средине

Кандидат
Сара Шиљеговић

Ментор
Доц. др. Михаела Кавран

Утицај типова хране за ларве на могућност масовног гајења азијског тиграстог комарца

МАСТЕР РАД

Нови Сад, 2023

Садржај

1. УВОД 1
1.1. Еколошки значај врсте *Aedes albopictus* 3
1.2. Биологија *Aedes albopictus* 4
1.2.1. Животни циклус *Aedes albopictus* 4
1.2.1.1. Јаје 5
1.2.1.2. Ларва 6
1.2.1.3. Лутка 7
1.2.1.4. Имаго 7
1.3. Техника стерилизације инсеката (СИТ) 10
1.3.1. Масовни узгој и отпуштање стерилисаних мужјака у природу 12
2. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА 14
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА 15
3.1. Тест инсекти 15
3.2. Компоненте тестираних храна за ларве 15
3.3. Пиљење ларви 16
3.4. Гајење ларви 17
3.5. Сепарација полова 18
3.6. Утицај хране на капацитет лета мужјака *Ae. albopictus* 22
3.7. Утицај хране на дужину живота мужјака *Ae. albopictus* 23
3.8. Процена исплативости коришћења две алтернативне хране 23
3.9. Статистичка анализа података 24
4. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА 25
4.1. Време од почетка улуткавања 25
4.2. Динамика улуткавања 26
4.3. Ефикасност просејавања лутки 27
4.4. Удео мужјака у укупном броју произведених лутки 28
4.5. Капацитет лета мужјака 31
4.6. Дужина живота мужјака 31
4.7. Однос цене и квалитета упоређиваних типова хране 33
5. ДИСКУСИЈА 35
6. ЗАКЉУЧЦИ 40
7. ЛИТЕРАТУРА 41

КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНУ И ОЦЕНУ МАСТЕР РАДА:

др Михаела Кавран, доцент
Ужа научна област: Ентомологија
Пољопривредни факултет, Нови Сад
-Ментор-

др Александра Игњатовић Ћупина, редовни професор
Ужа научна област: Ентомологија
Пољопривредни факултет, Нови Сад
-Председник-

др Александар Јуришић, редовни професор
Ужа научна област: Зоологија
Пољопривредни факултет, Нови Сад
-Члан-

Захвалница

На првом месту хтела бих се захвалити свом ментору доц. др Михаели Кавран на њеној посвећеној подршци, саветима и сугестијама. Увек је пружала охрабрења и била вољна и ентузиастична да помогне на било који начин током овог истраживачког пројекта.

Такође желим да се захвалим и председнику Комисије за оцену Мастер рада проф. др Александри Игњатовић Ђупина, као и члану Комисије проф. др Александру Јуришићу.

На крају, волела бих посебно да се захвалим својим родитељима, мајци Даници, оцу Браниславу и брату Николи на њиховој континуираној подршци и разумевању током овог истраживања и писања мастер рада.

Сара Ш.

Утицај типова хране за ларве на могућност масовног гајења азијског тиграстог комарца

РЕЗИМЕ

Азијски тиграсти комарац (*Aedes albopictus*) је инвазивна врста од медицинског и ветеринарског значаја, која се може успешно сузбијати употребом технике стерилизације инсеката (СИТ). Ова техника се заснива на масовном узгоју, стерилизацији и отпуштању стерилних мужјака комараца у природу где би се нашли у директној компетицији са дивљим мужјацима, парили се са фертилним женкама из дивље популације што би резултирало изостанком потомства. За ову технику неопходно је оптимизовати исхрану ларви како би се добили мужјаци високог квалитета који би имали високу стопу преживљавања и добар капацитет лета. Ово истраживање имало је за циљ оцену ефикасности три типа хране за ларве (IAEA-BY, BCWPRL, MIX-14). Примена хранљивог супстрата BCWPRL, резултирала је просејавањем већег броја лутки мужјака у односу на женке, али добијени број лутки и имага мужјака је био нижи а развој спорији у поређењу са преосталим хранама. Просечна вредност животног века је била највиша код мужјака храњених са MIX-14 а најнижа код мужјака храњених IAEA-BY храном. Мужјаци храњени са IAEA-BY су такође имали вишу стопу смрти у стадијуму имага. Супстрати BCWPRL и MIX-14 су јефтинији у односу на IAEA-BY (2.28 и 5.30 пута). Супстрат MIX-14 представља добру супституцију ефикасне, али још увек скупе IAEA-BY хране.

Кључне речи: *Aedes albopictus*; техника стерилизације инсеката; хранљиве смеше за ларве; масован узгој, капацитет лета, дужина живота имага.

Impact of larval feed types to the mass-rearing possibility of the Asian tiger mosquito

SUMMARY

The Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) is an important invasive species of medical and veterinary concern, which could be successfully suppressed by application of the sterile insect technique (СИТ). This technique is based on the mass rearing of males, and their sterilization and release into the habitats to compete with wild males in the mating process, which results in an absence of offspring. Our research compared the effectiveness of three larval diet recipes (IAEA-BY, BCWPRL, and MIX-14) in the rearing of *Ae. albopictus* males in order to evaluate the available economical feeding alternatives. The application of BCWPRL resulted in a higher portion of sieved male pupae than females, but the obtained number of both pupae and adult males was lower and the development was slower than the other two diets. The adult mean survival time was the highest in males fed with MIX-14 and the lowest in males fed with IAEA-BY. Males fed by IAEA-BY also demonstrated higher initial mortality in the adult stage. The diets BCWPRL and MIX- 14 are cheaper than IAEA-BY (2.28 and 5.30 times, respectively). The diet MIX-14 represents a candidate for replacing the effective but still expensive IAEA-BY diet.

Key words: *Aedes albopictus*; sieving method; SIT; larval diets; mass rearing; flight capacity and life longevity

1. УВОД

У свету је познато око 3570 врста комараца које се сврставају у 41 род који припада једној фамилији, Culicidae и реду Diptera (Wilkerson и сар., 2021). Род *Aedes* чини 74 подрода. Из рода *Aedes* данас је веома распрострањено и неколико инвазивних врста комараца, као што су *Aedes* (*Stegomiya*) *aegypti* (Linnaeus 1762), *Ae.* (*Stg.*) *albopictus* (Skuse 1894), *Ae.* (*Hulecoetemyia*) *japonicus* (Theobald 1901) и *Ae.* (*Hul.*) *koreicus* (Edwards 1917).

Од давнина је познато да су уболи комараца у блиској асоцијацији са људским обољењима, а током 1878. године, комарци су били први зглавкари који су забележени као посредни домаћини паразита и патогена (Foster и Walker, 2009). Највећи утицај на људе и животиње комарци имају у улози вектора проузроковача великог броја обољења попут маларије, филаријазе, енцефалитиса, жуте грознице, денга хеморагичне грознице, зике, грознице вируса Западног Нила и др. Ова обољења су највише заступљена у тропским земљама у развоју, где проузрокују рану смрт и хронично слабљење организма, што даље оптерећује ресурсе здравствених установа и смањује људску продуктивност и у коначном негативно утиче и на саму економију државе. Иако се патогени које преносе комарци често бележе и у континенталним пределима са умереном климом, у овим подручјима главни фокус представља молестантска улога комараца која је резултат њиховог режима исхране на људима и животињама. Већа популација комараца може проузроковати интензивну иритацију и губитак крви код стоке и дивљих животиња, што резултира смањењем продуктивности па чак и смрћу.

Комарци су присутни на свим континентима осим на Антарктику, настањујући различите типове станишта попут: арктичких тундри, тајги, високих планина, пустиња, тропских шума, слатина итд.

За њихов развој неопходна су водена станишта која варирају од већих природних, углавном сталних водених станишта попут мочвара и пиринчаних поља до привремених реципијената воде попут базена, бара, јаркова, одвода, сливника, водом испуњених трагова аутомобила, отисака животиња и сл. Такође, велики значај имају и природна станишта мањих површина која задржавају воду попут пукотина у стенама, шупљине у стаблима дрвећа, пањеви, бамбуси, лисни отвори биљака, љуске кокоса, па чак и љуштуре пужева. Ларве комараца се могу наћи и у вештачким стаништима као што су саксије, конзерве, канте, гуме на депонијама итд. Ларве неких врста комараца не могу преживети у водама загађеним органском материјом у распадању, што може бити индикатор загађености водених површина (Service, 2015), док друге преферирају таква станишта као на пример кућни комарац (Becker и сар., 2010).

Крвљу се хране искључиво женке, а крвни оброк неопходан им је за продукцију јаја. Исхраном крвљу женке врше трансмисију патогена на људе и животиње. Такође се хране и биљним нектаром који даје неопходну енергију за остале животне активности. С

друге стране, мужјаци се хране само биљним нектаром, не хране се крвљу те тако не учествују у преносу патогена.

На територији Србије две најзначајније врсте комараца су *Culex pipiens* (Linnaeus 1758) – кућни комарац, који представља вектора вируса Западног Нила; и *Aedes albopictus* – азијски тиграсти комарац, доказани вектор денга и чикунгуња вируса.

Aedes albopictus је у Србији први пут заблежен 2009. године на Батровцима, граници са Хрватском (Petrić, 2009), а од 2013. године се редовно налазио и на граничном прелазу са Црном Гором (Кавран и сар., 2020). Иако мање распрострањен од кућног комарца, протеклих неколико година се рапидно шири из пограничних области ка унутрашњости наше земље. Азијски тиграсти комарац је забележен у више градова Србије, а значајна бројност популације је забележена у Новом Саду 2018. године (Кавран и сар., 2020). С обзиром на особине ове врсте као што су висок репродуктивни потенцијал и брза адаптабилност на нове територије, нужно је вршити стални мониторинг ове врсте како би се ширење и бројност могла ефикасно контролисати.

Што се тиче сузбијања комараца, постоји више метода и то: биолошке (употреба предаторских риба или бактерија попут *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*), хемијске (примена инсектицида, односно адултицида, ларвицида итд.), механичке (елиминисање потенцијалних станишта за ларве попут буради, канти итд.) и физичке (примена мономолекуларних филмова на воденој површини у којој се развијају ларве и лутке). Неке од ових метода су мање успешне од осталих, или је дошло до развијања резистентности комараца, док друге представљају само привремена решења, или нису примењива на већим површинама, те из тих разлога научници већ годинама раде на увођењу и оптимизовању генетичке контроле комараца под називом техника стерилизације инсеката (Sterile Insect Technique – СИТ). Не само што је доказано да је ова метода ефикасна у сузбијању комараца (Bourtzis и Vreysen, 2021), већ је и еколошки прихватљива (не угрожава животну средину). Такође, представља добру алтернативну методу у борби против комараца који су развили резистентност на одређене инсектициде. Ова техника се заснива на масовном лабораторијском узгоју, стерилизацији и отпуштању стерилних мужјака комараца у природу где би се нашли у директној компетицији са дивљим мужјацима у борби за женке и тиме онемогућили потомство, а самим тим би редуковали бројност популације комараца у природи. За ову технику неопходно је оптимизовати исхрану ларви како би се добили мужјаци високог квалитета који би имали високу стопу преживљавања и добар капацитет лета.

У циљу оптимизације процеса масовног узгоја, неопходно је испитати различите типове хране чије су компоненте не само квалитетне, већ и јефтине и лако доступне у односу на скупе компоненте које су у употреби као стандардна храна, те би на овај начин техника стерилизације инсеката постала економски исплатива и тиме конкурентна другим методама сузбијања.

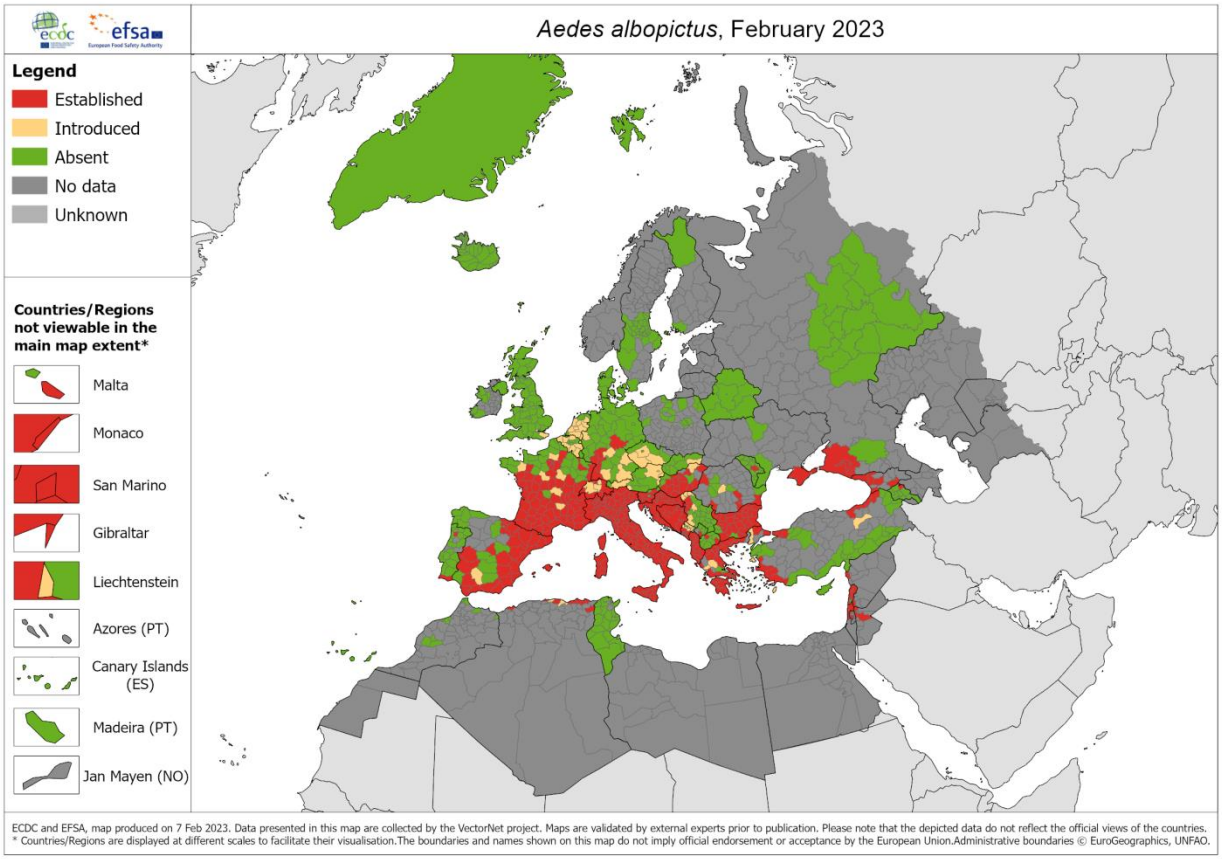
1.1. Еколошки значај врсте *Aedes albopictus*

Aedes albopictus, врста позната као азијски тиграсти комарац, води порекло из југоисточне Азије, острва Западног Пацифика и Индијског океана одакле је почела рапидно да се шири по Африци, Северној и Јужној Америци и до данас присутна у скоро свим државама Европе (Reiter и Sprenger, 1987; Benedict и сар., 2007) (слика 1). У Србији је забележена како у урбаним (Нови Сад, Београд, Ниш, Ваљево) тако и у руралним срединама (Кузмин, Моровић) (Кавран и сар., 2020, 2021). Због високих адаптабилних способности, репродуктивног потенцијала и векторске компетентности за трансмисију више од 20 врста арбовируса, ова врста комарца је постала примарни молестант од великог значаја за јавно здравље у подручјима где се настанила. Главни је вектор чикунгуња и денга вируса, а од мањег је значаја као вектор зика вируса. Азијски тиграсти комарац такође је демонстрирао потенцијал за трансмисију усуту вируса (Kasai и сар., 2011).

Ширење *Ae. albopictus* на нова подручја омогућено је путем пасивног транспорта јаја и то углавном током међународне трговине робом (у половним гумама, у посудама са резницама бамбуса и цвећа), док се одрасли комарци често преносе у путничким аутомобилима, аутобусима, камионима, авионима и другим средствима превоза људи и роба.

Азијски тиграсти комарац се може наћи у различитим типовима водених станишта природног и вештачког порекла. Од значајнијих природних реципијената воде разликујемо: водом испуњене шупљине у дрвећу, пукотине у стенама, у љускама кокоса, пањевима бамбуса и др. У Србији значај имају само вештачка развојна станишта као што су гуме на депонијама, половне гуме, флаше, конзерве, канте, шахтови, саксије и сл.

Покушаји сузбијања и контроле ове врсте комараца су се до сада углавном ослањали на примену конвенционалних метода. Међутим, због њене сложене биологије и екологије, третмани против азијског тиграстог комарца нису обезбедили задовољавајуће резултате у редукцији популације, показујући ниску ефикасност у сузбијању ове врсте. Као резултат учестале употребе инсектицида, ова врста је развила резистентност ка већем броју пиретроида (Rahman и сар., 2021). Пошто су конвенционалне мере сузбијања комараца често биле неуспешне у сузбијању *Ae. albopictus*, намеће се потреба за увођењем алтернативних метода сузбијања. Техника стерилизације инсеката представља добар потенцијал за сузбијање врсте *Ae. albopictus*, што је већ демонстрирано у неколико ранијих истраживања (WHO/IAEA, 2020).

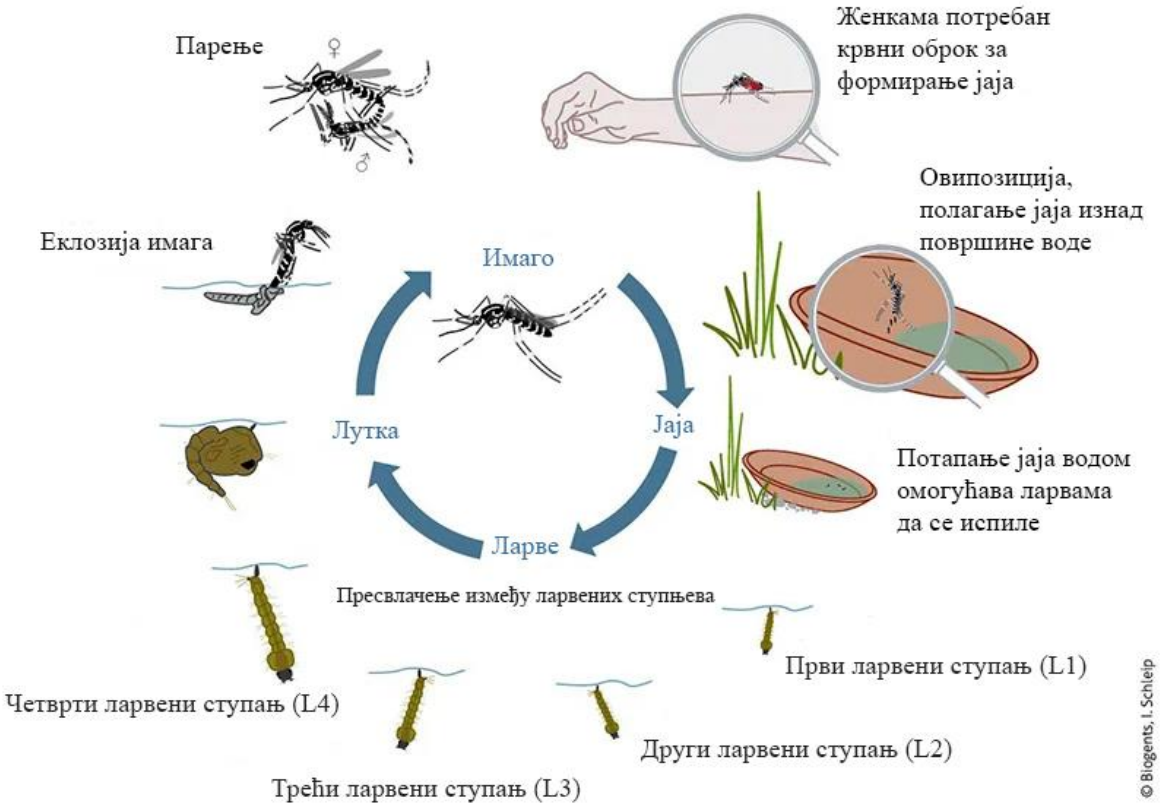


Слика 1. Распрострањеност *Ae. albopictus* у Европи до фебруара 2023. године
(извор: http://ecdc.europa.eu)

1.2. Биологија *Aedes albopictus*

1.2.1. Животни циклус *Aedes albopictus*

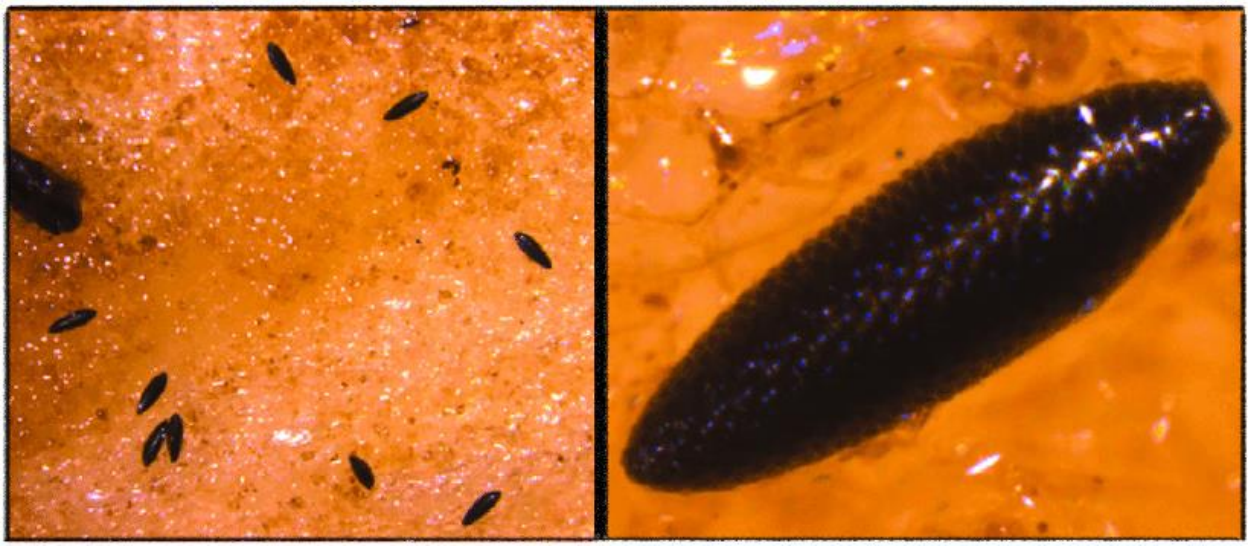
Животни циклус Азијског тиграстог комарца одвија се кроз четири развојна стадијума: јаје, ларва, лутка и имаго, где су јувенилни стадијуми (ларве и лутке) везани за водена станишта (слика 2), док је имаго терестричан. Презимљавају у стадијуму јајета у подручјима умерене климе, док су у тропским и суптропским стаништима активни током целе године (Hawley, 1988). Годишње могу имати више генерација, што зависи од климатских услова, као и од доступности хранљивих материја током развоја ларви, а и доступности домаћина који је извор крвног оброка.



Слика 2. Животни циклус *Ae. albopictus*
(извор: sea.biogents.com)

1.2.1.1. Јаје

Јаја *Ae. albopictus* (слика 3) су издужено овална, црне боје, дужине 0.5 mm, а женке их искључиво полажу појединачно, тачно изнад површине воде и то на влажном делу. Јаја су отпорна на десикацију, што им омогућава да задрже виталност дужи период док се не створе повољни услови за пиљење. Током овипозиције, јаја још увек нису у потпуности развијена и неопходан је одређен период да се заврши ембриогенеза. Након завршетка ембриогенезе, потребне су падавине (киша) које би повећале ниво воде у посудама и потопиле јаја, омогућавајући ларвама да се испиле. Треба напоменути да је један од битнијих фактора који индукују пиљење ларви (поред температуре и потапања јаја водом), пад концентрације кисеоника у води (Hawley, 1988). Просечан број положених јаја по женки варира од 300 до 350 (Hawley, 1988), а број положених јаја по једном гонотрофичком циклусу се креће у опсегу од 30 до 80 (Delatte и сар., 2009).



Слика 3. Јаја *Ae. albopictus*
(Фото: Alexander GC Vaux, 2019)

1.2.1.2. Ларва

Ларве азијског тиграстог комарца (слика 4) пролазе кроз четири ларвена ступња где им је потребно 5 до 10 дана за развој, што зависи од квалитета и приступачности хране, као и од температуре (Hawley, 1988). Ларве су веома активне, аподне и еуцефалне. Пошто им је усни апарат модификован у виду четкица, хране се филтрирањем органске материје у распадању која се налази у води у којој се развијају. Ларве дишу уз помоћ респираторне цевчице – сифона, који се налази на крају абдомена. Не користе растворен кисоник у води те је неопходно да су стално у контакту са атмосферским кисеоником. Кретање кроз воду врше грчењем тела.

Слика 4. Ларва *Ae. albopictus*
(Фото: Elisa Antognini)

1.2.1.3. Лутка

За разлику од лутки других инсеката, лутке комараца су активне. Овај стадијум кратко траје, што пре свега зависи од температуре, где при температури од 25-30ºC у просеку траје 2 дана (Waldock и сар., 2013), док у мање повољним условима може трајати и до 8 дана. Не хране се, а као и у стадијуму ларве, испливавају на површину воде ради дисања уз помоћ две респиратоне цевчице смештене на цефалотораксу. Лутке су по формирању беле, али временом како кутикула склерификује, постаје тамнија. Запетастог су облика (слика 5).

Слика 5. Лутка *Ae. albopictus*
(Фото: Hunter Deerman)

1.2.1.4. Имаго

Имаго *Ae. albopictus*, као и многи други припадници рода *Aedes*, има специфичне шаре на тораксу (које формирају беле љуспице) које су важан таксономски карактер (Service, 2015). На дорзалној страни торакса, односно на скутуму се налази карактеристична уздужна бела линија, док су ноге прекривене белим прстеновима специфичног распореда. Последња, пета тарзомера на метаторакалним ногама је потпуно бела (слика 6).

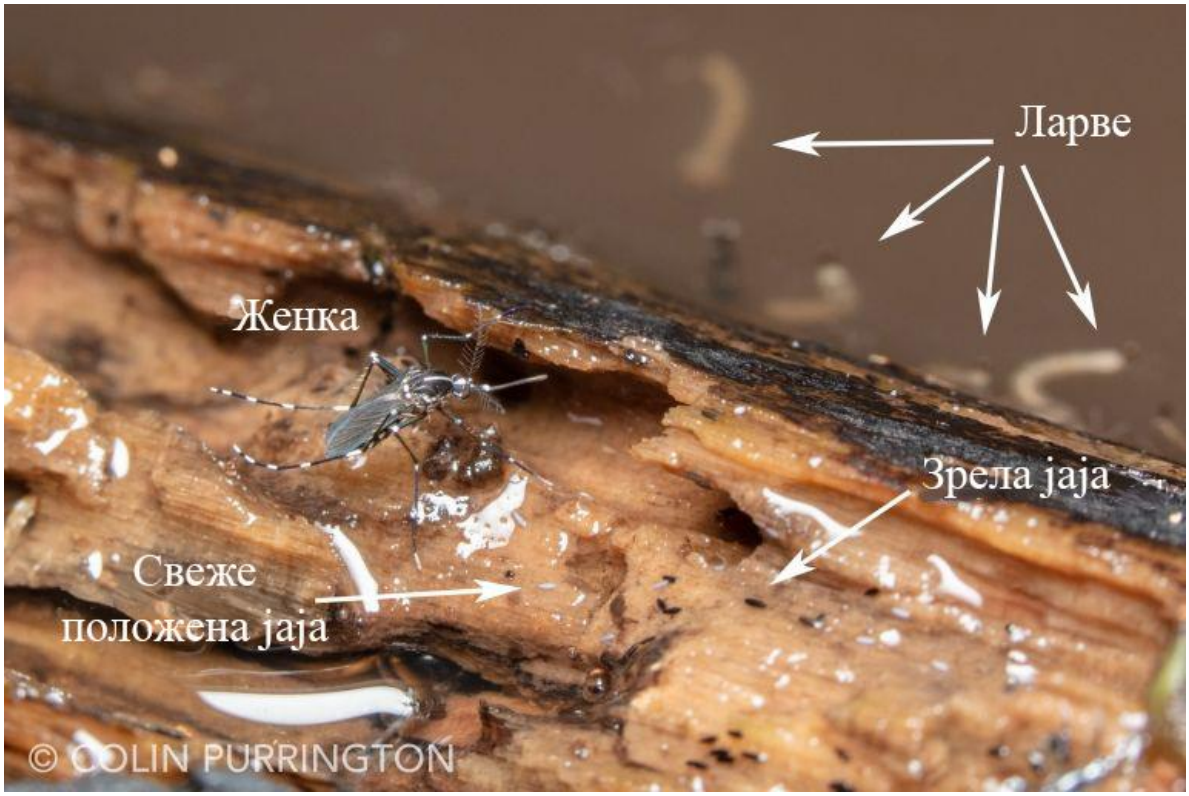
Слика 6. Имаго *Ae. albopictus* - мужјак
(Фото: оригинал С. Шиљеговић)

Што се тиче исхране, женке су те које се хране крвљу (слика 7), а крв им је неопходна за сазревање јаја, али исто тако им је потребан и биљни нектар и други извори шећера у течном стању, ради добијања енергије неопходне за остале животне активности. Са друге стране, мужјаци се искључиво хране биљним нектаром и другим шећерним растворима, те немају улогу узнемиривача људи и животиња, нити врше трансмисију патогена. Женке су анаутогене, што значи да је узимање крвног оброка за сазревање јаја облигатно. Широк је спектар домаћина од којих ова врста узима крвни оброк, а који укључује људе, домаће и дивље животиње. Углавном боде напољу (егзофагна исхрана), међутим последњих година се адаптирала и на затворене просторе, као што су станови и други стамбени простори (ендофагна исхрана) (Hawley, 1988). За разлику од наших аутохтоних врста комараца, азијски тиграсти комарац је веома агресиван молестант. Забележен је преферендум исхране на дневној светлости у току дана али по запажањима аутора Murray и Marks (1984) могу да боду и ноћу.

Слика 7. Исхрана женке *Ae. albopictus* крвљу
(Фото: оригинал С. Шиљеговић)

Копулација имага се не дешава одмах након еклодирања имага. С обзиром да се мужјаци развијају брже од женки, они су ти који еклодирају први, а потребно им је 24 часа да ротирају полни апарат (Klowden, 1990). Међутим, њихова спремност за парење је синхронизована услед каснијег излетања женки, и тада су мужјаци већ присутни (излетели) и спремни за парење. Парење се одвија у лету и траје од неколико секунди до неколико десетина секунди. Мужјаци су способни да копулирају са већим бројем женки. Раније се сматрало да се женке *Ae. albopictus* паре само са једним мужјаком, али у новијим истраживањима забележено је да могу бити оплођене од стране више мужјака (Boyer и сар., 2012).

Приликом овипозиције (слика 8), женке преферирају водене реципијенте у којима су се ларве претходно развијале (Пудар, 2018). Такође имају тенденцију да бирају овипозициона места према боји, где тамније боје индукују већи број положених јаја (Lee, 1994). Након исхране крвљу, женке полажу већину јаја током првог дана овипозиције, а сваког наредног дана број положених јаја се смањује.



Слика 8. Овипозиционо место женке *Ae. albopictus*
(Фото: Colin Purrington)

1.3. Техника стерилизације инсеката (СИТ)

Техника стерилизације инсеката је еколошки прихватљива метода, заснована на масовном узгоју, стерилизацији и отпуштању стерилних мужјака *Ae. albopictus* како би се редуковало потомство, а самим тим и популација ове штетне инсекатске врсте (FAO, 2005). За успешну компетицију са дивљим мужјацима, неопходно је произвести и отпустити велики број стерилних мужјака. Уколико су отпуштени стерилисани мужјаци високо квалитетни и далеко бројнији у односу на фертилне мужјаке дивље популације, повећана је и вероватноћа високе ефикасности ове технике. Један од захтева масовног узгоја јесте да се квалитет стерилних мужјака одржава у конзистентно високим границама. Из тог разлога, током масовног узгоја неопходно је да се ларве одгајају у оптималним контролисаним условима (температура и релативна влажност ваздуха), где ће бити храњене адекватном храном за ларве. Ларвама су потребни протеини/амино киселине, масне киселине, нуклеинске киселине, и витамини како би се популација успешно и синхронизовано развијала (Kleinjan и Dadd, 1977). Претходна истраживања су потврдила да је квалитет хране за ларве у директној корелацији са квалитетом одгојених индивидуа имага (Briegel и Timmermann, 2001; Mori, 1979). Потребно је ларвама обезбедити квалитетну, али са друге стране јефтину и лако доступну храну да бисмо на тај начин гарантовали континуирану производњу, прихватљиву цену, али пре свега високо квалитетне јединке које ће бити отпуштене у природу.

Протеклих неколико година, спроведено је неколико студија за процену, имплементацију, унапређивање и оптимизацију СИТ-а у борби против *Aedes* инвазивних врста комараца (Balestrino и сар., 2017; Culbert и сар., 2018; Haramboure и сар., 2020). Није само цена хране за ларве важна за масован узгој, такође је од великог значаја и њена доступност на тржишту, а све у циљу стандардизације масовног узгоја. Из тих разлога, неопходно је обезбедити приступачну и јефтину мешавину хране за ларве која има висок садржај хранљивих материја које би обезбедиле продукцију квалитетних компетитивних мужјака. Стандардна храна за ларве комараца се назива IAEA-BY, чији састав је креиран од стране Међународне агенције за атомску енергију из Беча (International Atomic Energy Agency, IAEA) (Damiens и сар., 2012). Најскупља компонента ове хране јесте дехидрирана говеђа јетра у праху. Неколико научних радова је спроведено на тему редукције или замене најскупљих компоненти хране (Puggioli и сар., 2013; Bimbile Somda и сар., 2019). Иако је наведена стандардна храна врло ефикасна, цена хране која у свом саставу има висок проценат говеђе јетре у праху је веома висока и значајно поскупљује масовну продукцију комараца, а додатно н представља лако доступну компоненту хране. Аутори Bimbile Somda и сар. (2019) и Mamai и сар. (2019) су тестирали хране сачињене од инсеката у праху попут *Hermetia illucens* (Linnaeus 1785), *Tenebrio molitor* Linnaeus 1758, и *Musca domestica* Linnaeus 1758, заједно са другим компонентама хране које чине IAEA-BY

храну за ларве, и упоредили утицај различитих комбинација састојака за масовни узгој две врсте комараца, *Ae. albopictus* и *Ae. aegypti*. Њихово истраживање је показало да инсекти као компонента хране у комбинацији са другим компонентама хране обезбеђују задовољавајући ниво продукције ларви комараца, а исто тако доприносе безбедности хране и заштити животне средине. Са друге стране, храна заснована на инсектима и даље није доступна на нашем тржишту, као и на тржишту многих европских земаља, те се оваква врста хране још увек не може сматрати храном за комарце која ће бити коришћена у масовној продукцији стерилних мужјака врсте *Ae. albopictus* у Србији.

Техника стерилизације инсеката се састоји из следећих фаза:

- колонизација врсте
- масовни узгој
- раздвајање полова,
- стерилизација мужјака,
- маркирање (обележавање) мужјака и
- отпуштање стерилисаних мужјака у природу где ће се парити са плодним женкама из природе (Слика 9).

Креиран је пакет метода за масовни узгој, стерилизацију, отпуштање и контролу квалитета стерилних комараца. Стандардне оперативне процедуре, односно водичи доступни су за колонизацију, масовни узгој и зрачење, све у циљу стерилизације инвазивних врста комараца из рода *Aedes,* док су водичи за транспорт и отпуштање стерилних мужјака, као и за контролу квалитета у процесу развоја.

Слика 9. Фазе СИТ технике (извор: http://www-naweb.iaea.org)

Поред наведених фаза СИТ-а, треба напоменути и неизоставну порцедуру контроле квалитета. Неопходно је контролисати квалитет произведених мужјака, односно утицај стерилизације, хлађења и транспорта на њихов квалитет, као и контролу резултата које су такви мужјаци постигли у природи. Масовном производњом могу се обезбедити високо квалитетни мужјаци који ће бити добра конкуренција дивљим мужјацима у борби за освајање женки из природе.

1.3.1. Масовни узгој и отпуштање стерилисаних мужјака у природу

Успех СИТ технике зависи од масовног узгоја који се спроводи у наменским објектима где се производи велики број високо квалитетних мужјака циљане врсте. Високо квалитетан мужјак представља оног мужјака који је способан за летење, преживљавање и ширење у животној средини, затим за мешање са дивљом популацијом, да је компететиван са дивљим сродницима у освајању женки, да је способан за парење са освојеном женком, као и у преношењу довољне количине репродуктивног материјала, смањујући вероватноћу тих женки да се паре са плодним мужјацима из природе.

Фаза производње, укључујући и раздвајање полова које обезбеђује отпуштање искључиво мушких стерилних јединки, одређује квалитет стерилисаних мужјака. Масовни узгој, стерилизација и отпуштање стерилисаних мужјака, састоје се од сложеног низа високо стандардизованих корака (Слика 10), организованих тако да дају оптималну и ефикасну производњу као и успешно отпуштање циљне врсте у природу.

Слика 10. Фазе масовног узгоја *Aedes* инвазивних врста комараца (WHO/IAEA, 2020)

Добра организација масовне производње, стерилизације и отпуштања су кључни за одрживу, економски исплативу примену СИТ-а. Методе и алати који су развијени у циљу одржавања и процене квалитета произведених мужјака одређују стандардни параметри који обезбеђују висок квалитет производа за сузбијање вектора (нпр. преживљавање, капацитет за парење, компетитивност у парењу, капацитет лета у контролисаним условима и др.).

2. ЗАДАТАК И ЦИЉ РАДА

Задатак овог истраживања је тестирање лако доступних и јефтиних врста хране за ларве (BCWPRL и MIX-14) које би биле конкурентне стандардној IAEA-BY храни која се тренутно примењује у пракси за масовни узгој азијског тиграстог комарца.

Циљ је био испитати утицај храна за ларве на важне параметре масовне производње ове врсте као што су: 1) брзина развоја ларви, односно почетак улуткавања, 2) успешност сепарације полова методом просејавања, 3) процентуална заступљеност мужјака у односу на укупан број произведених лутки, 4) капацитет лета мужјака и 5) животни век мужјака.

Такође, ово истраживање је имало за циљ упоређивање цена три врсте хране и процену оправданости трошкова у односу на постигнуту ефикасност хране. На основу резултата овог испитивања, биће утврђено која од ове три врсте хране за ларве представља најбољег кандидата за примену у масовном узгоју врсте *Ae. albopictus*, а да притом не дође до смањења квалитета и квантитета мужјака, који би се касније користили у примени СИТ технике сузбијања популације комараца.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

3.1. Тест инсекти

Колонија комараца *Ae. albopictus* која је била коришћена у овом експерименту, добијена је из соја пореклом из Црне Горе. Врста је била умножена у лабораторији за масовни узгој Centro Agricoltura Ambiente "Giorgio Nicoli" (CAA) у Кревалкореу, Италија. Комарци су одгајани у комори са контролисаним условма (температура ваздуха 28 ± 2 ºC, са релативном влажношћу ваздуха 80 ± 5% и фотопериодом 14:10 часова L:D), на основу протокола који су описали Balestrino и сар. (2014). Јединке коришћене у овом експерименту добијене су из шесте генерације овог соја. Из CAA лабораторије, јаја су достављена у лабораторију за Медицинску и ветеринарску ентомологију на Пољопривредном факултету у Новом Саду, где је рађен наведени експеримент.

3.2. Компоненте тестираних храна за ларве

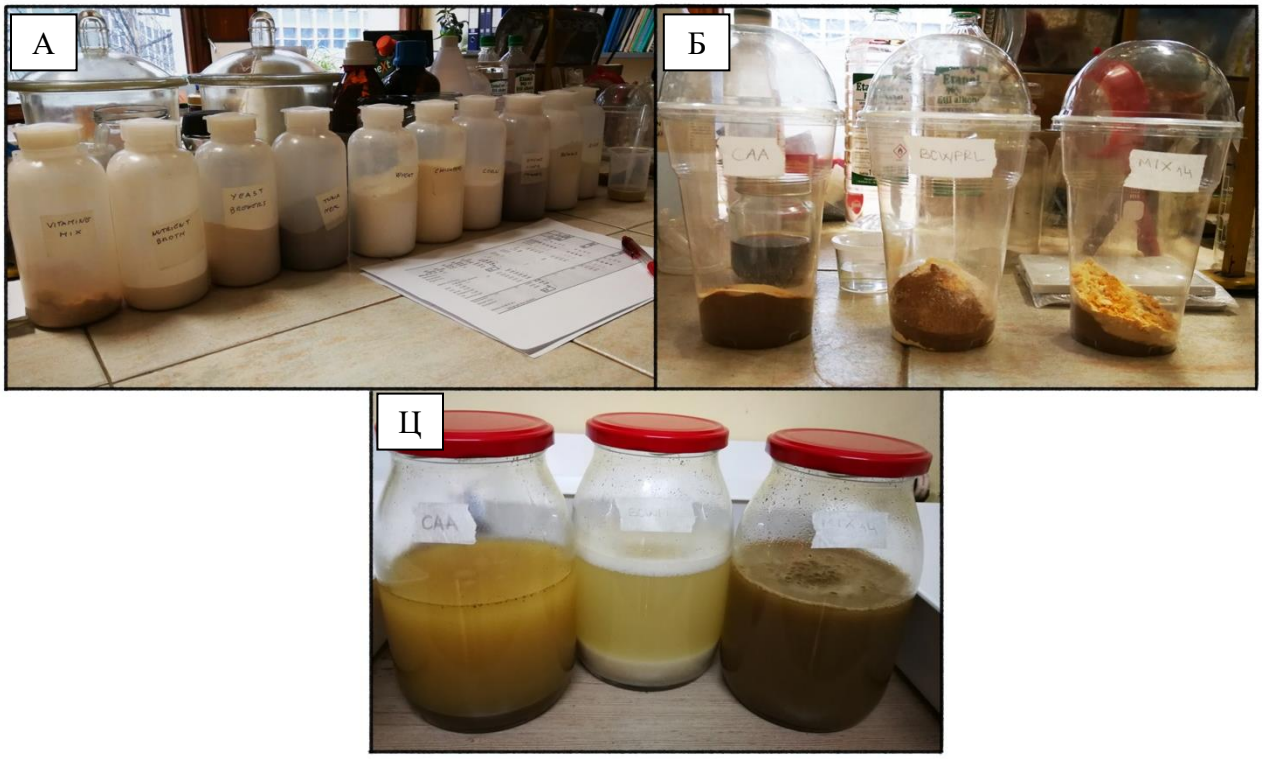
У експерименту је тестирано три типа хране за ларве од којих IAEA-BY представља стандардну храну, а BCWPRL и MIX-14 тест хране (слика 11-А). Компоненте сваке од три хране су дате у следећем тексту:

1. IAEA-BY: стандардна храна развијена у лабораторији за контролу штеточина међународне агенције за атомску енергију (IAEA) у Сајберсдорфу, Аустрија и лабораторији CAA (Balestrino и сар., 2014; Puggioli и сар., 2013): брашно од туне 50%, говеђа јетра у праху 36%, пивски квасац 14% и витамински микс 0.2% w:v 2g по литри раствора;

2. BCWPRL (Khan и сар., 2013): пасуљ 16.7%, кукуруз 16.7%, пшеница 16.7%, леблебија 16.7%, рижа 16.7% и говеђа јетра у праху 16.7%. С обзиром да овај тип хране садржи претежно биљне компоненте изузев говеђе јетре у праху, цена је самим тим нижа;

3. MIX-14 (Bimbile-Somda и сар., 2017): брашно од туне 70%, пивски квасац 15%, леблебија 15% и витамински микс w:v 4.6g по литри раствора. Ова врста хране представља комбинацију претходне две, што је чини добрим кандидатом за исхрану ларви.

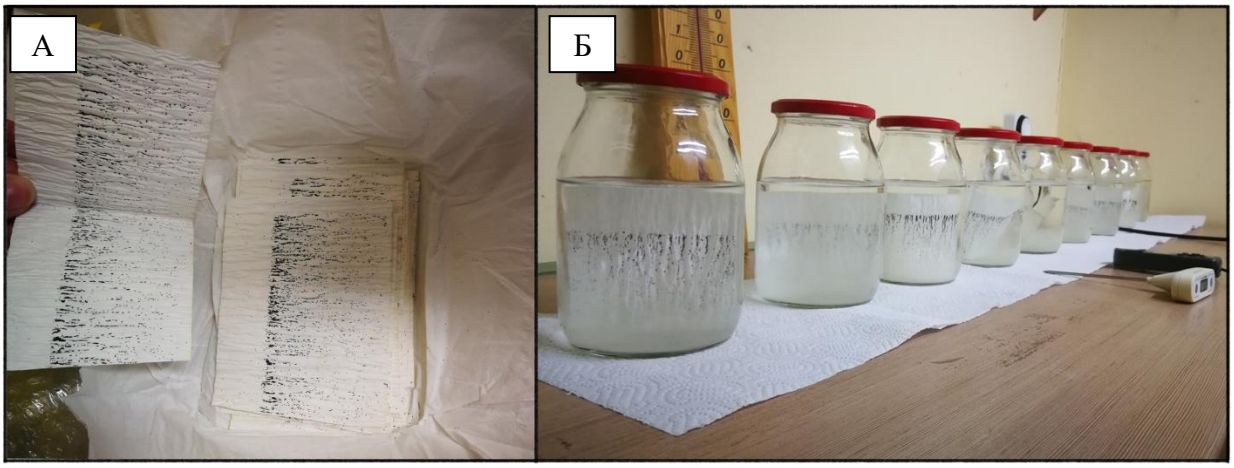
За сваку од хранидбених смеша, суве компоненте у праху (слика 11-А) су биле помешане (слика 11-Б), а затим растворене у води у односу од 50g хране у праху по литри дестиловане воде (слика 11-Ц). Раствори хране су складиштени у фрижидеру на температури од 4°C.



Слика 11. А – Појединачне компоненте свих типова храна, Б – Помешане суве компоненте сваке од три типа хране, Ц – Хранљиви раствори три типа хране
(Фото: оригинал С. Шиљеговић)

3.3. Пиљење ларви

Експеримент је рађен у три понављања. За сваку храну и за сваку репликацију је коришћено 4000 јаја (укупно 36 000 јаја за цео експеримент, слика 12-А). Тачан број јаја положених на филтер папиру је одређен употребом програма за обраду и анализу слика „ImageJ“ (Национални институт за здравље Сједињених држава) (Bellini и сар., 2007). Пиљење јаја, која су била положена на филтер папирима, вршено је у теглама запремине 1L (4000 јаја/тегли), где је у сваку теглу (укупно 9) сипано по 700ml дејонизоване воде (слика 12-Б). Да би пиљење ларви било стимулисано и поспешено, у сваку теглу додато је 0.25g хранљивог раствора са додатком бактеријских култура и 0.05g пивског квасца (који редукују кисеоник у тегли, те на тај начин подстичу пиљење ларви). Ове компоненте су прво растворене у 2ml воде, а потом је овај раствор додат у сваку теглу (Bellini и сар., 2007; Balestrino и сар., 2010). Све тегле су потом биле затворене и смештене на инкубацију на температури од 31 ºC у трајању од 15 часова.

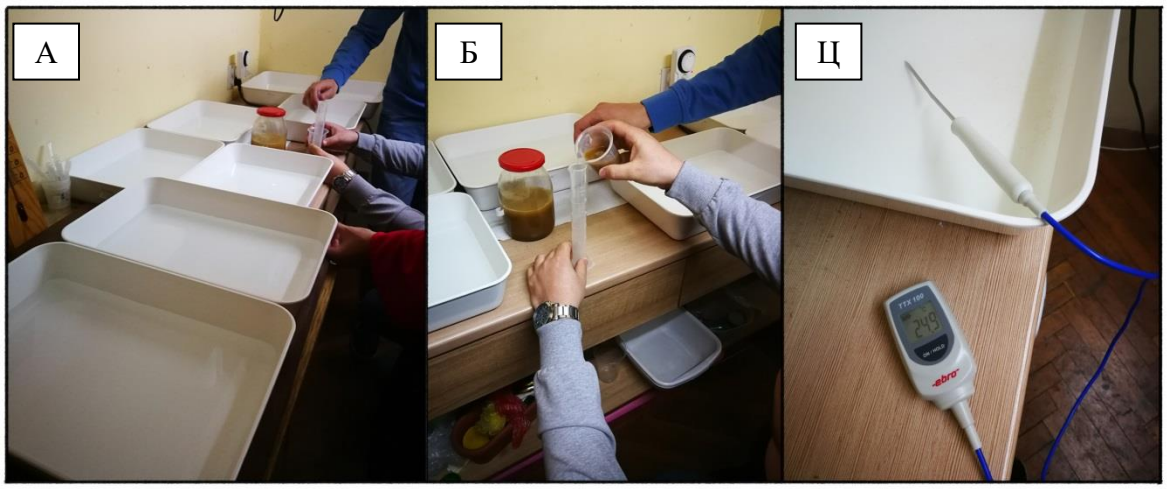


Слика 12. А – Јаја на филтер папирима, Б – Тегле за пиљење у које су смештени папири са јајима (Фото: оригинал С. Шиљеговић)

3.4. Гајење ларви

Након наведене процедуре пиљења припремљено је девет посуда које су напуњене са 1.3L дејонизоване воде (слика 13-А). Садржај тегли (вода са новоиспиљеним ларвама L_1 ступња) је пребачен у посуде (једна тегла по посуди) да би се постигла укупна запремина течности од 2L/посуди и густина ларви од приближно 2 ларве/ml воде. Количина хране потребна за сваку посуду по данима је била израчуната на основу броја ларви, према калкулацији коју су описали Bellini и сар. (2007), и Balestrino и сар. (2010). Првог дана је помоћу мензуре додатао 16 mL хранљивог раствора по посуди, следећег дана 32 mL, трећег дана 48 mL, и четвртог 64 mL (последњи дан исхране) (слика 13-Б). Количина хране се повећавала директно пропорционално узрасту ларви у посудама. Температура воде је у свакој посуди бележена три пута на дан (у 9h, 12h и 15h), све до шестог дана од пиљења, односно наредног дана од почетка улуткавања (слика 13-Ц). Током периода гајења ларви, температура воде се није значајно разликовала између посуда.

Петог дана је бележена појава првих лутки у свакој од посуда, а опсервација је трајала од 9h до 20h. Уколико је појава првих лутки забележена након овог периода (односно након 20h), сматра се да се улуткавање десило наредног дана. Време које је протекло од пиљења ларви до појаве прве лутке у посуди је коришћено за израчунавање времена потребног за улуткавање.



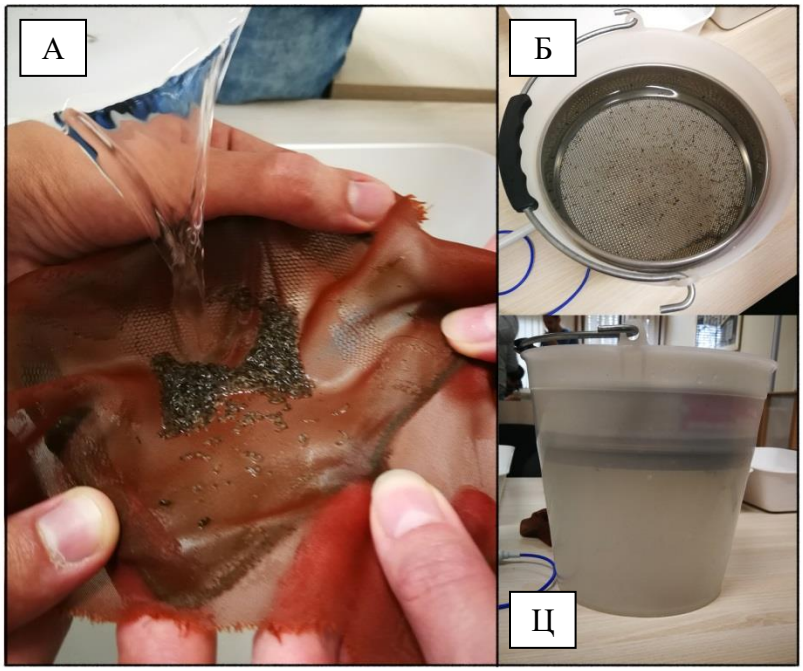
Слика 13. А –Посуде за гајење, Б – Дозирање хране помоћу мензуре, Ц – Мерење температуре воде (Фото: оригинал С. Шиљеговић)

3.5. Сепарација полова

Раздвајање полова је рађено у стадијуму лутке методом просејавања коју су описали Bellini и сар. (2007). Метода просејавања се заснива на два природна феномена а то су: протандрија (лутке мужјака се развијају брже од лутки женки) и полни диморфизам (лутке мужјака су углавном мање од лутки женки). Сепарација је рађена 24 часа од појаве прве лутке у било ком од 9 понављања, коришћењем сита чији је промер отвора дизајниран у складу са просечном величином лутки мужјака (пречник отвора 1400µM). Постављањем сита у воду поставља се баријера за узимање атмосферског кисеоника. Баријеру могу превазићи проласком кроз рупице сита и то је изводљиво само за само ситније лутке и ларве. Током прва 24 часа након почетка улуткавања, било је очекивано да ће већина формираних лутки бити мужјаци (Bellini и сар., 2007). Уколико је храна била адекватна, лутке женки ће бити крупне и неће проћи кроз сито, што је значајно са аспекта отпуштања комараца у природу. Сматра се веома непожељним да се женке отпуштају заједно са стерилисаним мужјацима.

Све јединке су прво процеђене мрежицом за акваријумске рибице и тилом, из посуда за узгој у чисту воду у канти предвиђеној за просејавање. Процеђивањем ларви и лутки из сваког од понављања (укупно 9 посуда) раздвојени су били јувенилни стадијуми (ларве и лутке) од воде у којој су били гајени (слика 14-А). Вода која је била у посудама за узгој је била сачувана и враћена у претходно коришћену посуду за узгој. Ларве и лутке су потом са тила смештене у канту за просејавање, која је претходно била испуњена млаком водом (34 °C). Након благог мешања воде ради одвајања јувенилних стадијума од зидова канте, сито је постављено у канту, чије је дно (део са рупицама) било окренуто надоле, потопљено 2cm испод површине воде (слика 14-Б). Сито је тако задржано наредна три минута у канти (слика 14-Ц) како би било омогућено луткама мањих димензија, за које се

претпоставља да су мужјаци, да прођу кроз рупице у покушају доспевања до површине воде ради узимања атмосферског кисеоника (дисања). Након истека три минута, сито је извађено из канте.



Слика 14. А – Тил за процеђивање јувенилних стадијума, Б – Сито за раздвајање полова, Ц – Сито у канти у току раздвајања полова
(Фото: оригинал С. Шиљеговић)

Лутке које су прошле кроз сито су избројане и смештене у нову посуду са чистом водом (слика 15-А), одакле су пипетиране у стаклене лабораторијске чаше са 150 ml воде (слика 15- Б) и стављене у кавезе за узгој одраслих јединки (BugDorm кавези димензија 30 x 30 x 30 cm). Лутке су класификоване према параметрима који ће бити испитиване (објашњење у 6.6 поглављу).

Лутке које су остале у канти су биле пренешене у чисту воду у посуду уз помоћ претходно поменуте мрежице. Потом су све ове лутке (означене као оне које „нису прошле“) пипетиране у стаклене лабораторијске чаше са 150 ml воде, и постављене у засебне кавезе ради излетања одраслих јединки.

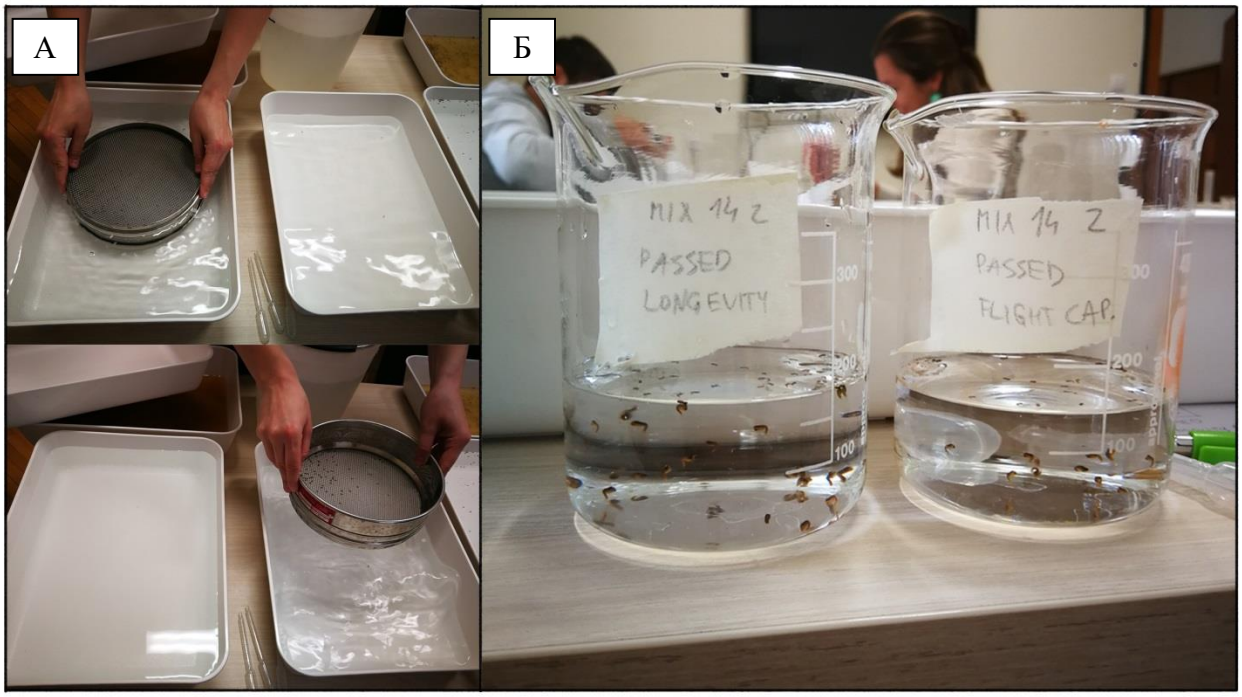
Ларве које су остале у канти и које су прошле кроз сито су враћене у одговарајуће посуде у којима су се првобитно гајиле заједно са растворeном храном у води. Ове ларве нису биле додатно храњене.

Цео поступак просејавања је поновљен за сваку од експерименталних посуда за узгој, а тачан број лутки које су прошле и које нису прошле је бележен за сваки тип хране и понављање.

Лутке су сакупљане из сваке посуде током наредна два дана, тј. 48h и 72h након почетка улуткавања. Том приликом није рађено пропуштање кроз сито него су лутке

сакупљене пипетом.

Након тога све ларве које се нису преобразиле у лутку, су биле искључене из даљег посматрања и одбачене.



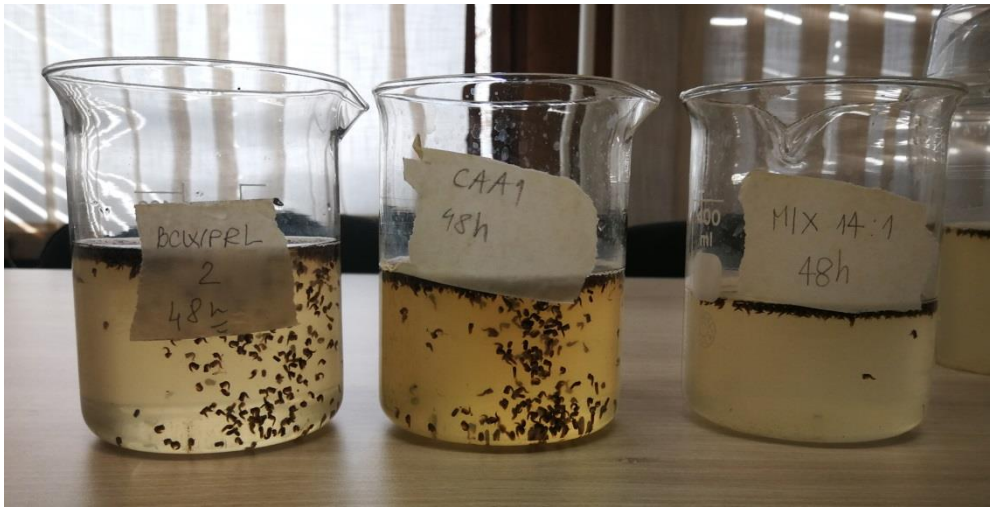
Слика 15. А – Премештање лутки које су прошле кроз сито, у нову посуду, Б – Пипетиране лутке у лабораторијским чашама (Фото: оригинал С. Шиљеговић)

У циљу даљег тестирања одраслих мужјака, лутке које су успешно прошле кроз сито подељене су у подгрупе и одвојено смештене у три кавеза за свако понављање. У један кавез смештено је 70 лутки, и те лутке (потенцијални мужјаци) коришћене су за тестирање капацитета лета, док је у други кавез смештено 120 лутки које су биле намењене за одређивање утицаја хране за ларве на дужину живота мужјака. Остатак лутки које су прошле кроз сито остављене су у трећи кавез до појаве имага (ради утврђивања укупног броја мужјака који су прошли кроз сито). Сва имага која су се налазила у сва три кавеза су се користила за евидентирање удела мужјака и женки у броју лутки које су прошле кроз сито. Све је рађено у три понављања (једна посуда за узгој = једно понављање у кавезима).

Укупно је припремљено 27 кавеза намењених за узгој одраслих комараца добијених од лутки које су прошле кроз сито (3 типа хране, 3 понаваљања и 3 теста) и 9 кавеза за узгој имага добијених од лутки које нису прошле кроз сито (3 типа хране за ларве, 3 понављања, 2 дана сакупљања- 48h и 72h).

Лутке пипетиране 48h након појаве прве лутке су биле смешене у стаклене

лабораторијске чаше (слика 16), затим су биле избројане и постављене у засебне кавезе за еклодирање (9 кавеза укупно).



Слика 16. Лутке формиране 48ч након првог улуткавања у стакленим лабораторијским чашама (Фото: оригинал С. Шиљеговић)

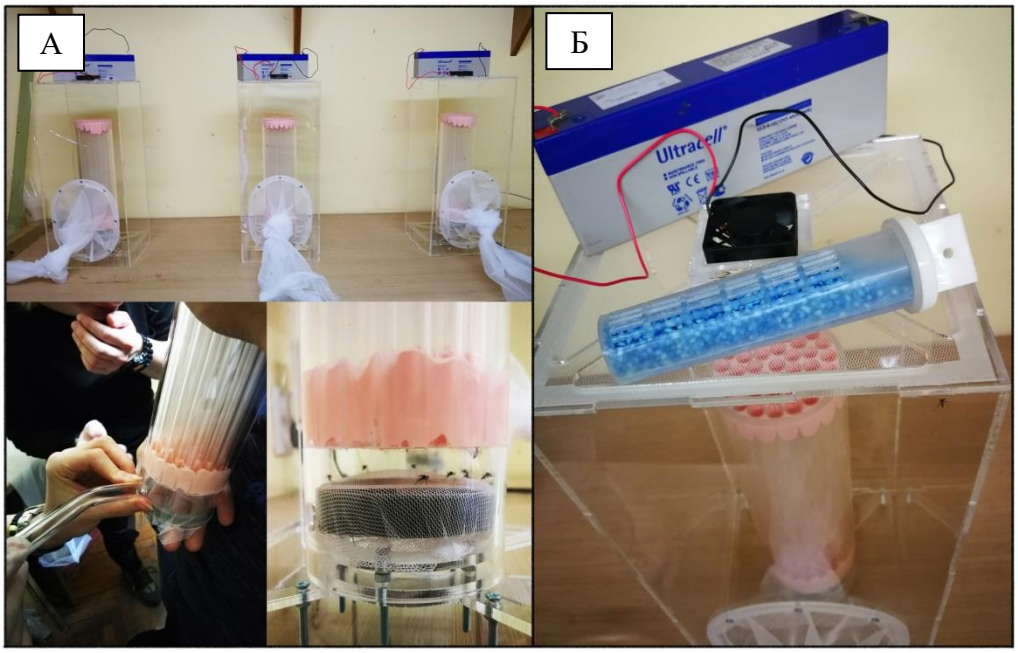
Исти поступак је примењен и наредног дана ради прикупљања лутки формираних 72h након првог улуткавања. Еклодирана имага добијена из лутки које су биле прикупљене 48h и 72h након првог улуткавања су се искључиво користила за утврђивање односа полова.

Такође, имага добијена од лутки које су прошле и које нису прошле сито (сакупљене 24ч након првог улуткавања), коришћена су за утврђивање односа полова имага. Број мужјака и женки је бележен како би се евидентирао удео мужјака у обе категорије (лутке које су прошле и нису прошле кроз сито), и да би се израчунао укупан број и удео мужјака развијених из лутки сакупљених 24h након првог улуткавања. Слично томе, удео лутки мужјака скупљених 48h и 72h након првог улуткавања, израчунат је у односу на укупни број еклодираних имага.

Одрасли мужјаци који су се успешно развили од лутки које су прошле кроз сито, су се користили за даље тестирање два битна параметра: дужина животног века и капацитет лета мужјака. Током експеримента са одраслим јединкама, средња дневна температура је износила 23.79 ± 1.80°C, релативна влажност ваздуха 77.46 ± 10.79% и фотопериод 14:10h L:D. Мужјацима је био обезбеђен 10% раствор сахарозе од момента њихове еклозије до краја експеримента. Адаптирана верзија хранилице је била постављена у сваком кавезу пре него што је дошло до преображаја у имага, што је одраслим јединкама обезбедило *ad libitum* приступ шећерном раствору. Дно кавеза је било чишћено на дневном нивоу због капљица шећерног раствора, употребом чисте марамице.

3.6. Утицај хране на капацитет лета мужјака *Ae. albopictus*

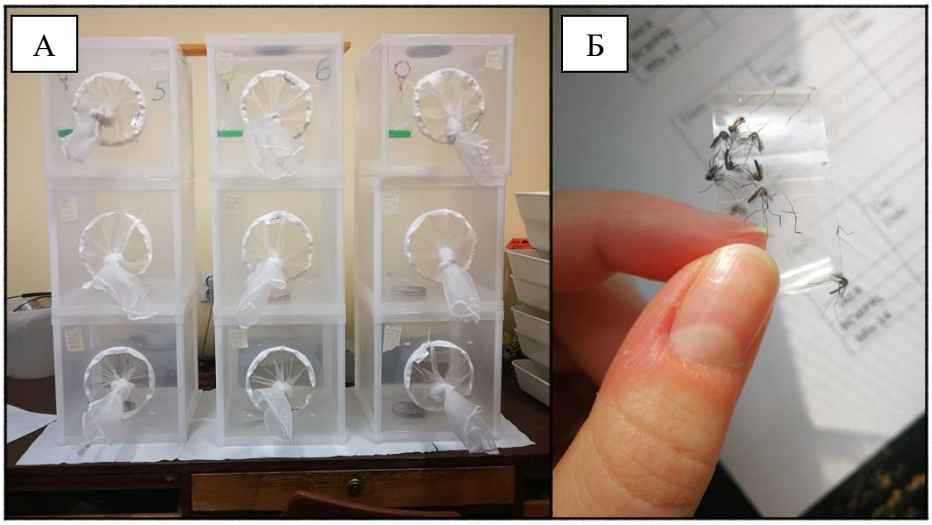
За оцену капацитета лета мужјака коришћен је уређај специјално дизајниран у Међународној агенцији за атомску енергију (IAEA) у Бечу, Аустрија (слика 17-А). Тестирање је почело након што су сви мужјаци у свим кавезима (9 кавеза, 3 врсте хране у три понављања) еклодирали и достигли 2-4 дана старости. Из сваког кавеза (тј. понављања) тестирано је по 50 мужјака. Мужјаци су у кавезима аспирирани усним аспиратором, а потом смештени у базу цилиндра унутар главног уређаја (слика 17-А). На врху уређаја (на поклопцу), прекривеном мрежом, постављен је БГ атрактант (Биогент, САД) који је имао за циљ да подстакне мужјаке да лете на горе кроз цевчице унутар цилиндра (слика 17-Б). На поклопцу се такође налазио мали вентилатор који је производио струјање ваздуха на доле (слика 17-Б). Сматрало се да су тест прошли они мужјаци који су успешно напустили цевчице цилиндара упркос притиску ваздуха који ствара вентилатор. Тест је трајао 2 сата, након чега је вентилатор искључен и избројани мужјаци који су прошли тест. Од укупног броја мужјака који су били смештени у цилиндру, израчунат је проценат оних који су успешно прошли кроз цилиндар. Они мужјаци који нису успели да прођу тест, су остали унутар цилиндра. С обзиром да смо располагали са три уређаја, било је омогућено истовремено тестирање мужјака одгајаних на свакој од три врсте хране.



Слика 17. А –Уређаји за тестирање капацитета лета (горе); Смештање мужјака усним аспиратором (доле лево) у базу цилиндра (доле десно), Б – БГ атрактант и вентилатор
(Фото: оригинал С. Шиљеговић)

3.7. Утицај хране на дужину живота мужјака *Ae. albopictus*

Оцена утицаја хране на дужину животног века подразумевала је следеће: припремљено је 9 кавеза (3 врсте хране у три понављања). У кавезе су, у лабораторијским чашама, смештене лутке мужјака (120 лутки по кавезу) (слика 18-А). Убрзо након еклозије имага, сваки кавез је детаљно прегледан ради утврђивања присуства женки, које су уз помоћ усног аспиратора биле уклоњене. Мужјацима је обезбеђен 10% шећерни раствор све до краја теста. Свакодневно је бележен број угинулих мужјака у кавезима, а угинуле јединке су свакодневно уклањане из кавеза (слика 18-Б). Тест је завршен када је последњи мужјак угинуо.



Слика 18. А – Кавези за праћење дужине живота, Б – Уклањање угинулих јединки из кавеза (Фото: оригинал С. Шиљеговић)

3.8. Процена исплативости коришћења две алтернативне хране

Веома важан фактор је цена која би потенцијално била коришћена за исхрану ларви у масовном узгоју азијског тиграстог комарца. Цене сваке од три хране (Bimbile Somda и сар., 2019, Khan и сар., 2013) биће међусобно упоређене ради процене најисплативије хране за масовни узгој азијског тиграстог комарца. Ефикасност сваке од мешавина поређена је у односу на цену коштања сваке од храна и на основу тога вршена процена могућности увођења алтернативних храна као замене скупљој, стандардној храни.

3.9. Статистичка анализа података

Анализирање података је рађено у статистичком пакету Statistica v.14.0.0.15. (TIBCO Software Inc.). Поређење дужине развоја ларви, односно почетка улуткавања (тј. време до најранијег улуткавања) је рађено коришћењем општег линеарног модела (GLM), упоређујући средње вредности користећи Tukey HSD тест у интервалу поверења $\alpha = 0.05$. Мерено је време улуткавања за сваку појединачну посуду, рачунајући број сати од момента преношења новоиспиљених ларви (L_1) из тегли у узгојне посуде (моменат кад су ларве ступиле у први контакт са тест хранама) све до формирања прве лутке.

Ефикасност тестираних храна се огледа у % лутки које су прошле и које нису прошле кроз сито 24h након првог улуткавања, као и у % формираних лутки 48h и 72h након првог улуткавања, у броју формираних лутки мужјака на дневном нивоу (24h, 48h и 72h након првог улуткавања). Веома значајан параметар је и процентуална заступљеност мужјака који су прошли кроз сито. Поређени су % мужјака који су успешно прошли кроз цилиндар током теста капацитета лета. Добијени резултати су били анализирани GLM моделом, а добијени проценти су пре анализе трансформисани у arcsin√ %.

Животни век мужјака одгајаних на три различите врсте хране је анализиран коришћењем Kaplan-Meier-ове методе преживљавања, а просечна дужина живота имага за све три групе хране је међусобно упоређена коришћењем Log-rank теста како бисмо оценили утицај ова три типа хране за ларве на животни век одраслих мужјака.

4. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

4.1. Време од почетка улуткавања

У табели 1 приказано је време за свако од 3 понављања након исхране наведеним типовима хране. Петог дана од пиљења, када је праћена појава првих лутки у свакој од посуда за узгој, прва лутка се појавила већ у 11h у посуди где је коришћена IAEA-BY. Посуда у којој се прва лутка најкасније појавила била је из групе где је коришћена BCWPRL храна. Прва лутка се у тој посуди појавила тек у 18h.

Време које је било потребно за достизање стадијума лутке рачунајући од момента трансфера првог ларвеног ступња из тегле за пиљење до појаве прве лутке, је варирало од најкраћих 95.5h за IAEA-BY до најдужих 102.5h за BCWPRL. Иако је IAEA-BY храна показала најкраће средње време за улуткавање (97.17 ± 2.08h) у поређењу са MIX-14 (99.17 ± 2.31h) и BCWPRL (100.17 ± 2.52h), није било статистички значајних разлика између брзине улуткавања након исхране наведеним типовима хране (MSE = 5.3, df = 6; IAEA-BY vs. BCWPRL p = 0.32; IAEA-BY vs. MIX-14 p = 0.57; and BCWPRL vs. MIX-14 p = 0.86).

Табела 1. Време потребно за улуткавање јединки након исхране ларви са три типа хране: IAEA-BY, BCWPRL и MIX-14, изражено у броју часова од L_1 до појаве прве лутке.

Типови хране	Понављања	Време од 9 до 20h петог дана од почетка гајења												Време од L_1 до првог улуткавања (h)
		≤ 9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
IAEA-BY	1							■						99.5
	2				■									96.5
	3			■										95.5
Просек ± Sd														97.17 ± 2.08h
BCWPRL	1								■					100.5
	2										■			102.5
	3					■								97.5
Просек ± Sd														100.17 ± 2.52h
MIX-14	1								■					100.5
	2								■					100.5
	3				■									96.5
Просек ± Sd														99.17 ± 2.31h

4.2. Динамика улуткавања

Упоређен је укупан број лутки прикупљених у периоду од 24h, 48h и 72h након момента првог улуткавања (табела 2), и утврђена је значајна разлика у просечном броју формираних лутки у току читавог периода евалуације до 72h (MSE=20.33, df=6.0) између IAEA-BY и BCWPRL, као и између BCWPRL и MIX-14 храна. Укупан број лутки у посудама у којима су ларве храњене IAEA-BY храном, кретао се од 3300 до 3659, док је у посудама са BCWPRL храном број лутки био од 2015 до 2155. Укупан број лутки у посудама са MIX-14 храном у три понављања био је сличан као и у случају стандардне IAEA-BY хране, износећи 3051 до 3703 лутке.

Храна IAEA-BY је дала највећи просечан број произведених лутки (3475.00 ± 179.67), али у поређењу са MIX-14 храном (3399.67 ± 328.36) разлика није била значајна (p = 0.94). Значајно мањи број произведених лутки је забележен код BCWPRL хране (2105.00 ± 78.10) у поређењу са MIX-14 (p = 0.003) и IAEA-BY (p = 0.002). Слична ефикасност IAEA-BY и MIX-14 храна се огледа у сличном броју формираних лутки. Од укупног броја јаја по понављању (4000 јаја), већина јединки које су биле храњене IAEA-BY и MIX-14 храном су се улуткале (86.9% и 85%). У истом периоду, проценат улутканих јединки храњених BCWPRL храном је био много нижи (52.6%).

Број лутки формираних 24h након првог улуткавања кретао се од 1524 до 2023 када су ларве добијале стандардну IAEA-BY храну. Ларве које су се храниле BCWPRL храном, нису се тако брзо и успешно развијале, резултирајући са 390 до 745 лутки по понављању. Много више лутки у односу на оне формиране након што су ларве узимале BCWPRL храну, формирано је у посудама са MIX-14 храном (од 1264 до 1538). Када се упореди просечан број лутки формираних од 4000 јаја, прикупљених 24h након првог улуткавања (MSE=40,263.0, df=6.0), значајно мањи број лутки је произведен у посудама где су ларве добијале BCWPRL храну (603.00 ± 187.85) у поређењу са преостале две хране, IAEA-BY (1748.33 ± 253.28) и MIX-14 (137.67 ± 146.12), (BCWPRL vs IAEA-BY p=0.001, и BCWPRL vs MIX-14 p=0.008). IAEA-BY и MIX-14 хране се нису међусобно значајно разликовале у броју формираних лутки 24h након првог улуткавања (p=0.13).

Други дан од почетка улуткавања (48h) у посудама са IAEA-BY храном формирано је 1089 до 1452 лутке. Лошији резултат постигнут је применом BCWPRL хране, резултирајући од 983 до 1082 лутке. Најбољи резултат је постигнут MIX-14 храном, где је 48h од почетка улуткавања формирано од 1305 до 1757 лутки. Просечне вредности броја лутки формираних 48h након првог улуткавања (MSE=29,934.0, df = 6.0) су приказале значајну разлику између BCWPRL и MIX-14 (p = 0.03), док IAEA-BY храна није резултирала значајним разликама у броју формираних лутки у поређењу са преостале две хране (BCWPRL vs IAEA-BY p = 0.302, и IAEA-BY vs MIX-14 p = 0.247).

Трећег дана (72h) од почетка улуткавања број формираних лутки се смањио у свакој од три експерименталне групе. У посудама где је коришћена IAEA-BY храна

формирано је 422 до 513 лутки, док је у посудама са BCWPRL храном формирано 414 до 543 лутке. Највише лутки трећег дана након почетка улуткавања забележено је у посудама у којима су ларве добијале MIX-14 храну и то од 450 до чак 633 лутки. Број лутки прикупљених 72h након првог улуткавања није показао значајне разлике између анализираних храна (MSE = 5327.2, df = 6.00, IAEA-BY vs. BCWPRL p = 0.993, и IAEA vs. MIX-14 p = 0.726, и BCWPR vs. MIX-14 p = 0.788).

Табела 2. Број лутки прикупљених 24h, 48h и 72h након првог улуткавања, и укупан број лутки на крају експеримента за сва три типа хране.

	24h			**48h**			**72h**			**Укупно**		
Понављања	IAEA-BY	BCWPRL	MIX-14	IAEA-BY	BCWPRL	MIX-14	IAEA-BY	BCWPRL	MIX-14	IAEA-BY	BCWPRL	MIX-14
1	1524	674	1313	1452	983	1757	490	488	633	3466	2145	3703
2	2023	745	1538	1214	996	1457	422	414	450	3659	2155	3445
3	1698	390	1264	1089	1082	1305	513	543	482	3300	2015	3051
Средња вредност	1748.33 a	603.00 b	1371.67 a	1251.67 ab	1020 a	1506.33 b	475.00 a	481.67 a	521.67 a	3475.00 a	2105.00 b	3399.67 a
Sd	253.28	187.85	146.12	184.41	53.80	230.00	47.32	64.73	97.74	179.67	78.10	328.36

Није било статистички значајних разлика између вредности са истим словом у истом реду (Tukey HSD тест, α = 0.05). Статистичке анализе су биле рађене појединачно за сваки од временских интервала. Исто важи и за укупан број добијених лутки.

4.3. Ефикасност просејавања лутки

Проценат лутки које су прошле кроз сито у односу на укупан број лутки прикупљених 24h након првог улуткавања, које су прошле процес просејавања, се није значајно разликовао између три анализиране хране: IAEA-BY, BCWPRL и MIX-14 (MSE = 56,124, df = 6.0; табела 3). Упоређујући три типа хране (MIX-14 и IAEA-BY; IAEA-BY и BCWPRL; и MIX-14 и BCWPRL) забележено је да није било статистички значајних разлика у проценту просејаних лутки (p = 0.863; p = 0.661; и p = 0.389). У посудама у којима је коришћена IAEA-BY храна у просеку је 55.74 ± 14% прошло кроз сито током просејавања. Лутке које су добијене након исхране ларви BCWPRL храном су у већем проценту прошле кроз сито у односу на стандардну храну IAEA-BY храну и то у 65.02 ± 9.0% случајева. Овакав податак сведочи о недовољној искоришћености примењене хране, услед чега су лутке остајале ситније, па су много лакше пролазиле кроз сито. Након што су ларве храњене MIX-14 храном, у просеку је 50.24 ± 15.0% прошло кроз сито.

Када се број лутки које су прошле кроз сито упореди са почетном популацијом (4000 јаја; табела 3, колона Прошле **), проценат лутки које су прошле кроз сито код BCWPRL хране (9.81± 3.35) је био значајно мањи у поређењу са IAEA-BY (23.77 ± 3.07, p = 0.006), али није било значајних разлика у поређењу са MIX-14 храном (16.92 ± 3.43, p = 0.075). Такође, није било статистички значајних разлика између IAEA-BY и MIX-14 у процентима успешно просејаних лутки (p = 0.149).

Када се узме у обзир укупан број произведених лутки (оне које су прошле и нису прошле кроз сито) од укупног броја јаја употребљених за експеримент, статистичке анализе су показале да су хране IAEA-BY (43.71 ± 6.33) и MIX-14 (34.29 ± 3.65) резултирале значајно већим процентуалним вредностима лутки него BCWPRL (15.08 ± 4.70), где је вредност p мања од 0.01 (p = 0.001 и p = 0.007). IAEA-BY и MIX-14 се нису значајно разликовале по овом параметру.

Табела 3. Проценат (%) просејаних лутки прикупљених 24h након првог улуткавања у поређењу са укупним бројем лутки прикупљених истог дана (које су прошле или нису прошле кроз сито)*, и проценат просејаних лутки у поређењу са првобитним бројем јаја стављених на пиљење**, након исхране са три типа анализираних храна.

Хране	**Прошле***	**Нису прошле***	**Прошле****	**Нису прошле****	**Укупно****
IAEA-BY	55.74 ± 14 a	44.26 ± 14 a	23.77 ± 3.07 a	19.94 ± 9.31 a	43.71 ± 6.33 a
BCWPRL	65.02 ± 9.0 a	34.98 ± 9.0 a	9.81 ± 3.35 b	5.25 ± 2.29 b	15.08 ± 4.70 b
MIX-14	50.24 ± 15 a	49.76 ± 15 a	16.92 ± 3.43 ab	17.36 ± 6.72 ab	34.29 ± 3.65 a

*Од укупног броја лутки прикупљених 24h након првог улуткавања. ** Од укупног броја потенцијалних јединки (4000 јаја). Нема статистички значајних разлика између вредности са истим словом у истој колони (Tukey HSD, α = 0.05).

4.4. Удео мужјака у укупном броју произведених лутки

Од укупног броја лутки које су прошле кроз сито (просејавање које је рађено 24h након првог улуткавања), већина јединки су били мужјаци. Анализиране врсте храна су обезбедиле следеће проценте мужјака (средња вредност ± стандардна девијација (Sd)): IAEA-BY 93.85 ± 6.63%, BCWPRL 97.23 ± 3.61 и MIX-14 96.36 ± 4.00%.

За масовни узгој веома важан параметар је и % заступљеност женки међу луткама које су прошле кроз сито. Женке које прођу кроз сито у процесу примене СИТ технике биће отпуштене у природу заједно са мужјацима. Ефикасност СИТ-а је обрнуто пропорционална процентуалној заступљености женки у узорку који се отпушта у природу. Процентуална заступљеност женки (у страној литератури названа „контаминација женкама“) указује да је проценат женки у узорку у ком су ларве храњене стандардном храном био 6.15%. Када су ларве добијале BCWPRL храну, контаминација женкама је била нижа, резултирајући са 2.77% женки. Резултат након исхране ларви MIX-14 храном био је бољи у односу на стандардну храну, али лошији у односу на BCWPRL, износећи у просеку 3.64%

Међу луткама које нису успеле да прођу сито, мужјаци су такође били доминантнији (IAEA-BY 83.24 ± 4.45%, BCWPRL 85.68 ± 7.23% и MIX-14 80.41 ± 17.73%). Следећег дана (48h), удео мужјака је опао, али су и даље били доминантнији у BCWPRL (78.90 ± 9.70%) и MIX-14 храни (59.84 ± 8.44%), док им је удео у IAEA-BY храни опао испод 50% (37.32 ± 23.50). Последњег дана сакупљања лутки (72h након првог улуткавања), лутке женки су доминирале у сва три типа хране, где је удео мужјака био

следећи: 11.60 ± 3.56% у IAEA-BY, 40.52 ± 15.28% u BCWPRL, и 20.60 ± 9.77% у MIX-14.

Код лутки формираних 24h након првог улуткавања, број мужјака у односу на укупан број лутки је био израчунат за обе категорије лутки – оне које су прошле и које нису прошле кроз сито – док је за лутке формиране 48h и 72h након првог улуткавања, презентован само укупан број сакупљених лутки (јер није било просејавања) (табела 4).

Статистички значајна разлика је забележена између тестираних храна у броју мужјака који су прошли кроз сито, улутканих у току 24h након првог улуткавања (MSE = 17,719.00, df = 6.00). BCWPRL храна је дала значајно мањи (p = 0.01) број мужјака (356.33 ± 113.51) у односу на IAEA-BY (890.00 ± 110.01), али у поређењу са бројем мужјака који су прошли кроз сито код MIX-14 хране (629.67 ± 167.84), разлика није била значајна (p = 0.10). Поред тога, број мужјака у IAEA-BY храни није био значајно већи у односу на MIX-14 (p = 0.12).

Број мужјака који није прошао кроз сито се није значајно разликовао између анализираних храна (MSE = 62,456.00, df = 6.00, IAEA-BY vs. BCWPRL p = 0.12, IAEA-BY vs MIX-14 p = 0.87 и BCWPRL vs MIX-14 p = 0.22).

Када се упореди укупан број лутки мужјака сакупљених током 24h (они који су прошли и који нису прошли кроз сито), BCWPRL храна је показала значајно мањи број мужјака (533.00 ± 133.37) у поређењу са преостале две хране (MSE = 39,334.0, df = 6.00; IAEA-BY vs. BCWPRL p = 0.002; BCWPRL vs. MIX-14 p = 0.016). IAEA-BY и MIX-14 се међусобно нису значајно разликовале (p = 0.142).

Што се тиче прикупљених мужјака 48h и 72h након првог улуткавања, број добијених мужјака се није значајно разликовао између анализираних храна.

Другог дана сакупљања лутки, 48h након првог улуткавања (MSE = 69,628.0, df = 6.00), највећа средња бројност лутки је била прикупљена из MIX-14 посуда (914.00 ± 266.04), затим у BCWPRL (806.33 ± 135.43), а најмања бројност је била у IAEA-BY посудама (480.00 ± 346.07), али разлике нису биле значајне (IAEA-BY vs. BCWPRL p = 0.35, IAEA-BY vs. MIX-14 p = 0.19 и CWPRL vs. MIX-14 p = 0.87)

Слични резултати су добијени и за следећи дан прикупљања лутки, 72h након првог улуткавања. Разлике у броју лутки мужјака између анализираних храна нису биле значајне (MSE = 5078.9, df = 6.00, IAEA-BY vs. BCWPRL p = 0.10, IAEA-BY vs. MIX-14 p = 0.61, и BCWPRL vs. MIX-14 p = 0.35).

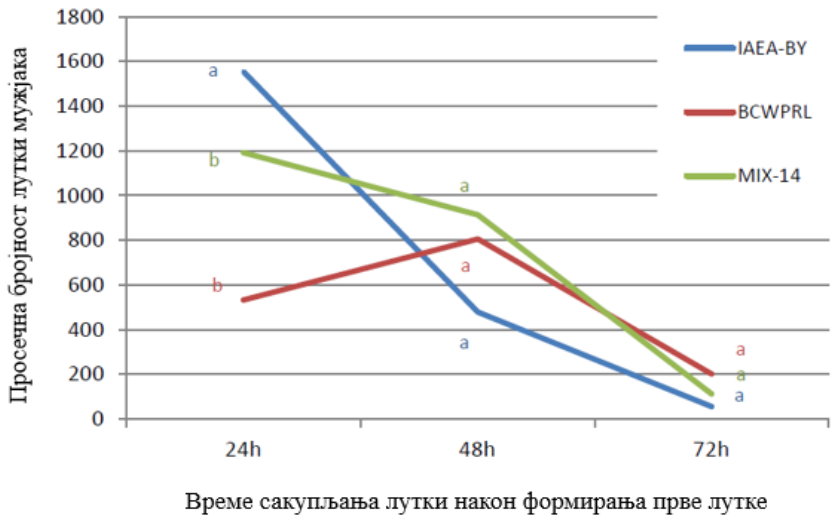
Коначно, упоређен је укупан, кумулативни број лутки мужјака произведених у свакој од анализиранух храна у току ова три периода прикупљања лутки (24h, 48h и 72h након првог улутавања) (MSE = 26,720.0, df = 6.00). Показало се да је MIX-14 храна резултирала највећом средњом бројношћу мужјака (2219.33 ± 221.39), али није била значајно већа (p = 0.62) од средњег броја лутки мужјака произведених IAEA-BY исхраном (2090.67 ± 120.34). BCWPRL храна је произвела значајно мањи број лутки мужјака (1541 ± 129.09) у поређењу са IAEA-BY (p = 0.01) и MIX-14 (p < 0.01) храном.

Табела 4. Број лутки мужјака прикупљених 24h, 48h и 72h након првог улуткавања и проценти везани за укупан број лутки мужјака прикупљених након исхране различитим типовима храна за ларве.

Храна		Резултати просејавања (24h)				Укупан број лутки по времену скупљања						
		Број		%		24h		48h		72h		
		прошле	нису прошле	прошле	нису прошле	Бр.	%	Бр.	%	Бр.	%	Укупно
IAEA-BY	Средња вредност	890.00 a	664.67 a	57.25	42.75	1554.67 a	74.36	480.00 a	22.96	56.00 a	2.68	2090.67 a
	Sd	110.01	320.80			247.53		346.07		20.66		120.34
BCWPRL	Средња вредност	356.33 b	176.67 a	66.85	33.15	533.00 b	34.59	806.33 a	52.33	201.67 a	13.09	1541.00 b
	Sd	113.51	64.42			133.37		135.43		96.46		129.09
MIX-14	Средња вредност	629.67 ab	562.00 a	52.84	47.16	1191.67 a	53.69	914.00 a	41.18	113.67 a	5.12	2219.33 a
	Sd	167.84	283.38			197.37		266.04		74.19		221.39

Нема статистички значајних разлика између вредности са истим словом у истој колони (Tukey HSD тест, α = 0.05).

Промене у динамици протандријских односа (просечан број лутки мужјака прикупљених у одређеном периоду/просечан број лутки мужјака прикупљених за сва три периода) показују да су IAEA-BY и MIX-14 храна произвеле највећу бројност мужјака у току 24h након првог улуткавања, док је ово било одложено за други дан кад су ларве биле храњене BCWPRL храном (као што је приказано на графикону 1).



Графикон 1. Просечна бројност лутки мужјака скупљених 24h, 48h и 72h након првог улуткавања (формираних из 4000 јаја користећи три анализиране хране за ларве). Вредности пређене истим словима нису се значајно разликовале (Tukey HSD тест, α = 0.05)

4.5. Капацитет лета мужјака

Није било значајних разлика у капацитету лета између мужјака одгајаних у стадијуму ларве на IAEA-BY (57.33 ± 16.04%), BCWPRL (61.33 ± 3.06%), и MIX-14 храни (56.67 ± 16.17%) (MSE = 61.86, df = 6.00). Поређењем се показало да имају сличне вредности капацитета лета, са високим p вредностима (IAEA-BY vs. BCWPRL p = 0.940, IAEA-BY vs. MIX-14 p = 0.998, и BCWPRL vs. MIX-14 p = 0.918).

У табели 5 приказани су резултати теста оцене капацитета лета за сваку храну и за свако понављање.

Табела 5. Капацитет лета мужјака након исхране ларви са три типа хране.

Хране	Понављања	Број мужјака у цилиндру	Број мужјака излетелих из цилиндра	% излетелих мужјака из цилиндра
IAEA-BY	1	50	28	56.00
	2	50	21	42.00
	3	50	37	74.00
Просек± Сд				**57.33 ± 16.04**
BCWPRL	1	50	29	58.00
	2	50	31	62.00
	3	50	32	64.00
Просек± Сд				**61.33 ± 3.06**
MIX-14	1	50	21	42.00
	2	50	27	54.00
	3	50	37	74.00
Просек± Сд				**56.67 ± 16.17**

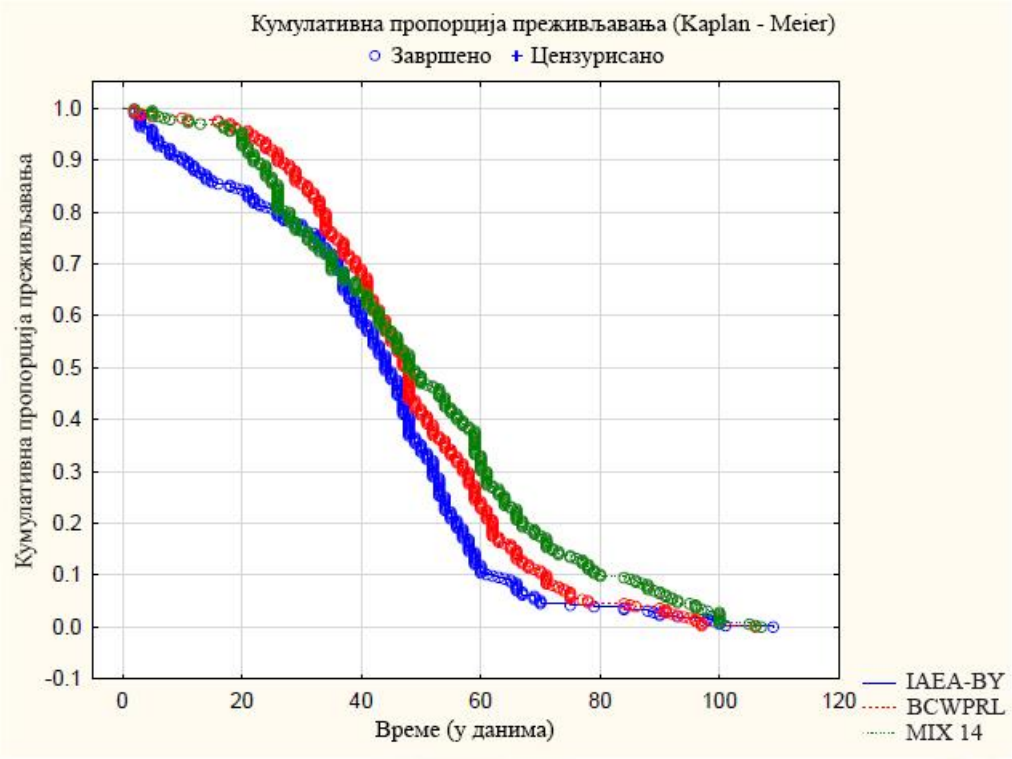
4.6. Дужина живота мужјака

Без обзира на употребљену храну, први мужјаци су угинули два дана након еклозије. Током овог експеримента најдужи животни век имао је мужјак храњен IAEA-BY храном и то 109 дана, док је најдужи животни век мужјака за MIX-14 био 107 дана, а за BCWPRL храну 106 дана. Мужјаци храњени IAEA-BY храном имали су највишу иницијалну стопу смртности у поређењу са преостале две хране.

Такође, најбржи пад преживљавања након 40 дана је забележен код групе мужјака који су у стадијуму ларве храњени IAEA-BY храном (графикон 2). Kaplan-Meier-ова метода преживљавања је приказала значајну разлику у стопи преживљавања између свих тест група (графикону 2, Chi-square = 21.28, df = 2.00, и p < 0.01) (табела 6). Мужјаци који су у стадијуму ларве храњени IAEA-BY храном, имали су најкраће просечно време преживљавања. Мужјаци храњени MIX-14 храном живели су 8 дана дуже у односу на оне

храњене IAEA-BY храном, и 2 дана дуже од мужјака храњена BCWPRL храном за ларве.

Упоређивање извршено Log rank тестом је показало значајну разлику у просечној стопи преживљавања између IAEA-BY и BCWPRL (p = 0.02), и између BCWPRL и MIX-14 (p = 0.01) хране. Разлика у дужини живота имага је била високо значајна између IAEA-BY и MIX-14 ($p < 0.01$).



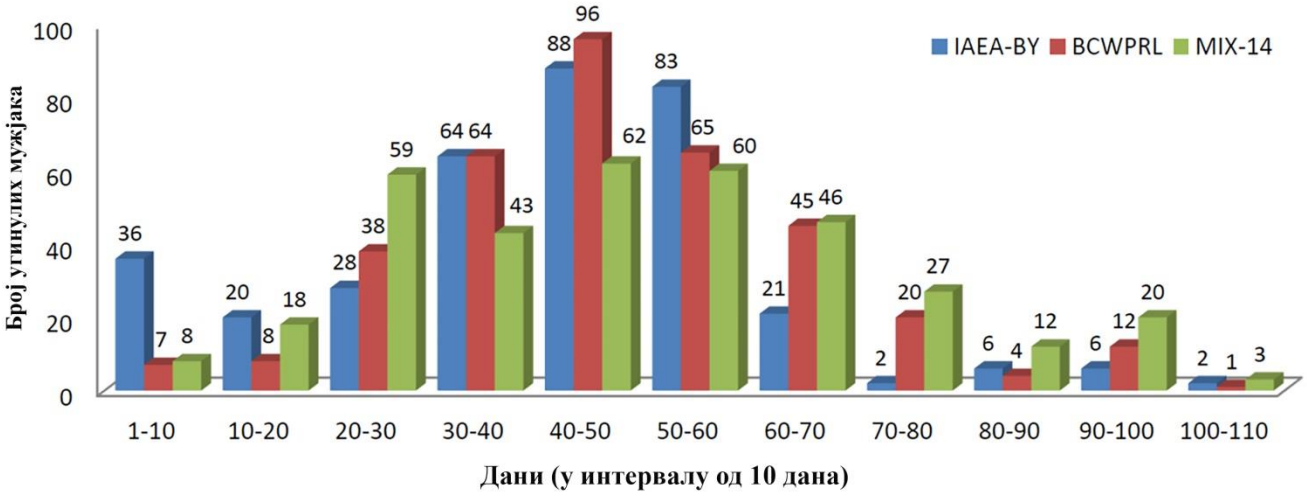
Графикон 2. Степен преживљавања мужјака чије су ларве храњене IAEA-BY, BCWPRL и MIX-14 хранама (сви приказани подаци су потпуни, нема цензурисаних података)

Табела 6. Средња вредност животног века мужјака *Aedes albopictus* храњених различитим хранама за ларве.

Храна	**Средња вредност ± Sd**	**Укупно анализирано**
IAEA-BY	42.13 ± 20.29 a	356
BCWPRL	48.19 ± 18.10 b	360
MIX-14	50.01 ± 22.64 c	358

Нема статистички значајних разлика између вредности са истим словом (Kaplan-Meier тест, Chi square = 21.28, df = 2.00, и $p < 0.01$). Статистичка анализа приказује потпуне податке, нема цензурисаних података.

На графикону 3 приказан је морталитет мужјака у интервалу од 10 дана за сва три типа хране за ларве. Графикон приказује растући и опадајући број угинулих јединки у зависности од тога којом храном су ларве *Ae. albopictus* биле храњене. У почетку (првих 20 дана експеримента), IAEA-BY храна је показала већу почетну стопу морталитета у поређењу са преостале две хране. Касније, сличан тренд је забележен и код BCWPRL и MIX-14 хране. Такође, забележено је да су мужјаци чије су ларве храњене MIX-14 храном већ након 50 дана имали највишу стопу преживљавања. Најбржи пад преживљавања је забележен код групе мужјака чије су ларве храњене IAEA-BY храном.



Графикон 3. Просечан морталитет мужјака у кавезима у којима је испитиван утицај три типа хране за ларве (BCWPRL, MIX-14 и IAEA-BY) на дужину живота, представљен у интервалима од 10 дана.

4.7. Однос цене и квалитета упоређиваних типова хране

Прорачун трошкова за 100 kg сваке од три хране је спроведен на основу цена сваке од компоненти, коју су обајвили Bimbile Somda и сар (2019) и Bimbile-Somda и сар., (2017), Khan и (2013), као и на основу количине компоненти које су потребне на основу рецепта (табела 7). IAEA-BY (стандардна храна) је 2.28 пута скупља од BCWPRL хране и 5.30 пута скупља од MIX-14 хране. Цена BCWPRL је 2.32 пута скупља од MIX-14. Говеђа јетра у праху је најскупља компонента у IAEA-BY и BCWPRL храни, док је код MIX-14 најскупља компонента витамински микс.

Табела 7. Анализа трошкова састојака и њихових мешавина за исхрану ларви *Ae. albopictus*

Храна	**Састојци**	**Количина састојака (kg) у мешавини од 100 kg**	**Цена састојака/kg (РСД)***	**Цена састојака у мешавини од 100 kg (РСД)**
IAEA-BY	Брашно од туне	50	85.16	4,258
	Говеђа јетра у праху	36	6,706.36	241,428.83
	Пивски квасац	14	1,064.50	10,645.01
	Витаминski микс	2g/L раствора (4kg)	2,980.60	119,22.41
Укупно				**268, 253.42**
BCWPRL	Пасуљ	16.7	63.87	1,066.63
	Кукуруз	16.7	74.52	1,244.40
	Пшеница	16.7	21.29	355.54
	Леблебија	16.7	85.16	1,422.17
	Рижа	16.7	85.16	1,422.17
	Говеђа јетра у праху	16.7	6,706.36	111,996.15
Укупно				**117,507.06**
MIX-14	Брашно од туне	70	85.16	5,961.21
	Пивски квасац	15	1,064.50	15,967.52
	Леблебија	15	85.16	1,277.40
	Витаминski микс	4.6 g/L раствора (9.2)	2,980.60	27,421.55
Укупно				**50,627.68**

* Приказане цене су оригинално објавили Bimbile Somda и сар. (2019) и Khan и сар. (2013), а примењене су за обрачун трошкова 100 kg сваке тестиране хране. Цене су конвертоване из америчког долара (USD) у РСД.

5. ДИСКУСИЈА

Оптимизовање масовног узгоја ларви *Ae. albopictus* подразумева методе које би обезбедиле велики број ларви, брз и синхронизован развој ларви, хомогеност величине унутар популације, и синхронизован почетак улуктавања, што би све заједно резултирало продукцијом високо квалитетних одраслих јединки. Процена квалитета имага ја заснована на неколико кључних параметара као што су: дужина живота, капацитет лета, способност парења, фекундитет и фертилитет (Bellini и сар., 2007; Bellini и сар., 2018; Mastronikolos и сар., 2022; Tur и сар., 2021). Када храна за ларве обезбеди кључне параметре високог квалитета, следеће битно питање јесте да ли су компоненте хране лако доступне и да ли је цена приступачна у смислу обезбеђивања ефикасне и исплативе мере редукције популације комараца.

Како бисмо тестирали кључне параметре за оцену три типа хране анализирано је а) време до почетка улуткавања, односно брзина развоја ларви, б) динамика улуткавања, в) ефикасност сепарације полова методом просејавања, г) процентуална заступљеност мужјака у односу на укупан број лутки формираних током 24h, 48h и 72h након почетка улуткавања, д) капацитет лета мужјака који су прошли кроз цилиндар, е) дужина живота просејаних мужјака, и ж) цена хране за ларве.

Дужина развоја ларви може значајно утицати на трошкове производње. Ако узгој комараца захтева дуже време, мањи број производних циклуса ће бити могућ у одређеном временском периоду, а трошкови радне снаге, енергије, и исхрана ларви ће се повећати по производном циклусу. Коришћењем одређене хране за ларве која убрзава развојни циклус ларве и фаворизује раније улуткавање, може итекако бити велика предност, све док се квалитет комараца одгајаних на оваквој храни одржава у конзистентно високим границама. Иако је IAEA-BY храна обезбедила најбржи развој ларве (97.17 ± 2.08h), а BCWPRL најспорији (100.17 ± 2.52 h) (израчунато на основу најранијег улуткавања), разлика од 3 сата није од великог значаја. Сва три типа хране анализирана у овом експерименту су обезбедила бржи развој ларви у поређењу са истраживањима где су ларве биле храњене хранљивим смешама на бази инсеката (Bimbile Somda и сар., 2019; Mamai и сар., 2019). Добијени резултати овог истраживања су били слични оним истраживањима где су ларве биле храњене истим компонентама али у различитим пропорцијама (Puggiol и сар., 2013). С друге стране, истраживање аутора Sasmita и сар. (2019) показало је да су ларве *Ae. aegypti* храњене BCWPRL храном имале краћи развојни циклус у стадијуму ларве у поређењу са ларвама које су храњене IAEA 2 храном (сличној IAEA-BY).

Укупан број формираних лутки у току 72h након првог улуткавања се није разликовао између IAEA-BY и MIX-14, али BCWPRL храна је обезбедила значајно мању бројност лутки у поређењу са претходне две хране. Укупан број лутки (мужјака и женки)

формираних из 4000 јаја, скупљених првог дана (24h након првих улуткавања), је био значајно мањи код BCWPRL хране у поређењу са преостале две, док се IAEA-BY и MIX-14 нису међусобно разликовале. Другог дана прикупљања лутки (48h након првог улуткавања) просечна бројност лутки код BCWPRL хране је и даље била значајно мања у поређењу са MIX-14, док IAEA-BY храна није произвела значајно другачији број лутки у поређењу са преостале две. Трећег дана (72h након првог улуткавања), све хране су дале сличан број лутки. У истраживању аутора Sasmita и сар. (2019), BCWPRL храна је такође резултирала нижом стопом улуткавања у поређењу са IAEA 2 храном.

Приликом сакупљања мужјака током једног узгојног циклуса и током контроле протандрије и полног диморфизма, један од најбитнијих параметара за масован узгој јесте број лутки, формираних у току прва 24 часа, које прођу кроз сито (процес просејавања или раздвајања полова). Број лутки мужјака формираних у току прва 24 часа представља прави принос, тј. представља продуктивност масовног узгоја СИТ техником. Само су ове лутке те које ће бити стерилисане, а еклодирани стелини мужјаци пуштени у природу.

Број лутки које успешно прођу кроз сито је кључни параметар у раздвајању полова јер проценат добијених лутки мужјака би идеално требао да буде >99%. (Alphey и сар., 2010).

Када је упоређен број просејаних лутки са почетном популацијом (4000 јаја), удео просејаних лутки код BCWPRL хране је био значајно мањи у поређењу са оним из IAEA-BY хране, али није било значајних разлика у односу на MIX-14 храну. IAEA-BY и MIX-14 се нису значајно разликовале према овом параметру.

Када је упоређен укупан принос лутки формираних након 24 часа између ове три хране, IAEA-BY и MIX-14 су демонстрирали значајно већи проценат мужјака у односу на BCWPRL.

Пошто је BCWPRL храна обезбедила највећи проценат просејаних лутки (65.02 ± 9.00%) након 24 часа у односу на укупан број лутки прикупљених истог дана, ова чињеница се може сматрати као предност, међутим у реалности то није случај. Однос укупног броја произведених лутки током 24h и почетне популације (4000 јаја) је био значајно нижи код BCWPRL хране у поређењу са IAEA-BY и MIX-14 храном. Sasmita и сар. (2019) су у току свог истраживања дошли до сличних резултата где су приметили већи број произведених лутки мужјака *Ae. aegypti* храњених BCWPRL храном у поређењу са оним јединкама храњеним IAEA 2 храном.

У току процеса просејавања лутки формираних 24h након првог улуткавања, већина лутки које су прошле кроз сито су били мужјаци, као што је било демонстрирано за све три хране (IAEA-BY 93.85 ± 6.63%, BCWPRL 97.23 ± 3.61 и MIX-14 96.36 ± 4.00%). Ови резултати су у складу са истраживањем које су спровели Puggioli и сар. (2013).

Узимајући у обзир просечан број лутки мужјака који је прошао кроз сито, BCWPRL храна је имала значајно нижу вредност (356.33 ± 113.51) у односу на IAEA-BY храну (890.00 ± 110.01). Разлика у средњем броју мужјака између MIX-14 и IAEA-BY хране није била значајна, као ни између MIX-14 и BCWPRL.

Што се тиче удела мужјака забележених у временском периоду 48h и 72h, BCWPRL храна је резултирала вишим процентом мужјака у поређењу са IAEA-BY храном, што указује да је BCWPRL продужила развој мужјака. Максимум производње мужјака за BCWPRL храну је достигнут другог дана улуткавања (806.33 ± 135.43, 52.33%), што представља недостатак у масованом узгоју намењеном примени СИТ технике. Међу луткама сакупљеним 48h након првог улуткавања, мужјаци су доминирали у популацијама храњеним BCWPRL и MIX-14 храном (78.90 ± 9.70% и 59.84 ± 8.44% мужјака), али не и код ларви храњених IAEA-BY храном (37.32 ± 23.50%). У узорцима прикупљених 72 часа након првог улуткавања, број мужјака је опао у свим типовима хране, где је удео мужјака био 11.60 ± 3.56% за IAEA-BY, 40.52 ± 15.28% за BCWPRL, и 20.60 ± 9.77% за MIX-14 храну.

Aedes albopictus се сматра слабим летачем. Веће средње пређене удаљености (СПУ) за мужјаке су забележене само у експериментима рађеним у Тексасу, САД (1100 m) (Medeiros и сар., 2017) и Швајцарској (685 m) (Vavassori и сар., 2019). Међутим, друга истраживања спроведена у Италији и на острву Ла Реунион су демонстрирала ниже СПУ мужјака *Ae. albopictus*, чије вредности нису прелазиле 154 m (Marini и сар., 2010) и 67 m (Le Goff и сар., 2019). Веома је битно утврдити капацитет лета мужјака произведених поступком масовног узгоја јер њихова дисперзија у простору отпуштања и компетитивност са дивљим мужјацима из природе у проналажењу и парењу са женкама зависе од њиховог квалитета.

Међународна агенција за атомску енергију (IAEA) је развила уређај за тестирање лета мужјака како би се утврдио квалитет стерилних мужјака, путем тестирања њихове способности да прођу кроз цилиндар испуњен цевчицама, у року од 2 часа. Помоћу овог уређаја може се предвидети стопа преживљавања и оплодње, са преко 80% сигурности предвиђања (Balestrino и сар., 2017). Овај уређај коришћен је у овом истраживању као метод контроле квалитета како бисмо утврдили кумулативни квалитет мужјака храњених различитим типовима храна за ларве.

Наше истраживање је показало да се анализиране хране нису другачије одражавале на капацитет лета мужјака. У сваком случају, најбољи капацитет лета је забележен код мужјака одгајаних на BCWPRL храни (61.33 ± 3.06% мужјака је прошло тест), затим на IAEA-BY (57.33 ± 16.04%) и на крају на MIX-14 (56.67 ± 16.17%), али није било статистички значајних разлика. Све три врсте хране анализиране у овом истраживању су демонстрирале нижи капацитет лета у односу на резултате истраживања где су мужјаци били одгајани храном на бази инсеката (78.71 ± 3.51%) (Mamai и сар., 2019).

Мужјаци одгајани методом масовног узгоја намењени за СИТ морају преживети што дуже након њиховог отпуштања у природу. Дужи животни век мужјака повећава шансе за проналазак женки за парење. Све три врсте хране су дале релативно дуго средње време преживљавања мужјака у лабораторијским условима (где је преживљавање варирало од 42.13 ± 20. 29 за IAEA-BY, до 50.01 ± 22.64 за MIX-14). Средње време преживљавања је било значајно веће код мужјака одгајаних на MIX-14 храни у поређењу

са преостале две хране, док су мужјаци одгајани IAEA-BY храном имали значајно краће средње време преживљавања у поређењу са преостале две. Мужјаци храњени MIX-14 храном живели су 8 дана дуже него они који су као ларве храњени са IAEA-BY храном.

Sasmita и сар. (2019) су закључили да се високе резерве енергије, коју обезбеђује BCWPRL храна, одражавају на дуг животни век мужјака у поређењу са IAEA 2 храном. Упоређујући резултате других аутора (Puggioli и сар., 2013) који су тестирали хране са сличним компонентама, све три хране анализиране у овом истраживању (IAEA-BY, BCWPRL, и MIX-14) обезбедиле су задовољавајућу стопу преживљавања мужјака. Међутим, MIX-14 је обезбедио значајно дужи животни век имага мужјака, што му даје предност у односу на преостале две хране.

Поред најкраћег средњег времена преживљавања, мужјаци храњени IAEA-BY храном су имали вишу почетну стопу смртности него мужјаци храњени преосталим хранама. У оквиру СИТ технике, висока почетна стопа морталитета може бити индикатор за лоше способности преживљавања и слабу успешност током парења стерилних мужјака након отпуштања у природу. Такође, одрасли мужјаци који су у стадијуму ларве храњени IAEA-BY храном, показали су најбржи иницијални морталитет популације након 40 дана.

Иако се IAEA-BY храна сматра стандардном храном и успешно се користи већ годинама у масовном узгоју врсте *Ae. albopictus*, храна садржи велику количину говеђе јетре у праху (36%). Ова компонента је врло скупа (10 пута скупља у односу на остале састојке потребне за припремање IAEA-BY хране) и тешко се набавља у многим државама. Цене две алтернативне хране анализиране у овом истраживању, које не садрже говеђу јетру у праху или садрже у много мањем проценту у односу на стандардну су ниже. Цене алтернативних храна су знатно повољније у односу на IAEA-BY с обзиром да једна од њих има знатно мању количину говеђе јетре у праху (BCWPRL, 16.7%), док у другој (MIX-14) није саставни део хране (BCWPRL је 2.28, а MIX-14 5.30 пута јефтинија од IAEA-BY).

Говеђа јетра у праху, као и знатно јефтиније брашно од туне, су богате протеинима, витаминима и масним киселинама (Damiens и сар., 2012). Пивски квасац, који садржи угљене хидрате, се такође користи као компонента у масовном узгоју *Ceratitis capitata* (Wiedemann 1824) (Nestel и Nemny-Lavy, 2008) и неопходан је за нормалан развој *Ae. aegypti* (Sneller и Dadd, 1977). Код MIX-14 хране, говеђа јетра у праху је замењена леблебијом. Претходна истраживања су показала да леблебија има високу нутритивну вредност, богата је полинезасићеним масним киселинама, протеинима, угљеним хидратима, Б групом витамина и одређеним минералима (Khan и сар., 1995). У истраживању аутора Khan и сар. (2013), забележено је да је леблебија сама по себи довољна за успешан развој *An. stephensi* (Liston 1901).

У овом истраживању најјефтинија храна, MIX-14, се показала као добар кандидат за замену добре, али скупе IAEA-BY хране, што би омогућило јефтинију продукцију стерилних мужјака и одрживост употребе СИТ-а у сузбијању комараца.

MIX-14 храна се састоји од брашна од туне, пивског квасца. витаминског микса и

леблебије. Прве три компоненте су индустријски произведене, тако да се њихов квалитет и састав могу одржавати у конзистентно истом нивоу. Али је зато много теже обезбедити квалитетан стандард за леблебију, пољопривредни производ са релативно високом варијабилношћу кад је у питању хранљиви састав. Из тих разлога би у блиској будућности требало проценити поновљивост добијених резултата.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Интеграција технике стерилизације инсеката може представљати ефикасну алтернативну методу за контролу инвазивних врста комараца, као и контролу њиховог векторског потенцијала. Велики трошкови масовног узгоја комараца ограничавају широку примењивост СИТ технике широм света, посебно у земљама у развоју, које су изложене највећем ризику од болести које преносе комарци. Оптимизовање узгоја ларви за циљ има да смањи трошкове масовне производње. Различите компоненте анализираних храна (IAEA-BY, BCWPRL и MIX-14) нису значајно утицале на дужину развоја стадијума ларве, на бројност мужјака који су се улуткали у току прва 24 часа, и на капацитет лета мужјака.

BCWPRL храна је обезбедила најспорији развој мужјака, већи проценат мужјака у односу на женке који је прошао кроз сито (али мањи број лутки у односу на преостале две хране), мањи број мужјака који је прошао кроз сито 24h након првог улуткавања, и мањи укупан број мужјака.

Највећа средња вредност преживљавања је забележена код MIX-14 хране. Мужјаци који су као ларве храњени IAEA-BY храном, су имали најкраће просечно време преживљавања и виши почетни морталитет у односу на мужјаке узгојене на преостале две хране. Две алтернативне хране анализиране у овом експерименту коштају мање него IAEA-BY храна (BCWPRL је 2.28, а MIX-14 5.30 пута јефтинија).

С обзиром да је најјефтинија храна, MIX-14, произвела високо квалитетне мужјаке, овај тип хране представља доброг кандидата за јефтинију производњу стерилних мужјака што би чинило СИТ технику конкурентном и одрживом методом сузбијања комараца.

Предуслов за употребу ове хране у масовном узгоју комараца јесте потреба за тестирањем поновљивости добијених резултата. Храна MIX-14 се састоји од брашна од туне, пивског квасца, витаминске мешавине и леблебије. Прве три компоненте су индустријски произведене, тако да се њихов квалитет и састав могу конзистентно одржавати. Много је теже обезбедити квалитетан стандард за леблебију, пољопривредни производ са релативно високом варијабилношћу кад је у питању хранљиви састав.

7. ЛИТЕРАТУРА

Alphey, L., Benedict, M., Bellini, R., Clark, G. C., Dame, D. A., Service, M., и Dobson, S. L. (2010). Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diiseases: An analysis. *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, (10) 295-311.

Balestrino, F., Medici, A., Candini, G., Carrieri, M., Macagnani, B., Calvitti, M., Bellini, R. (2010). Gama ray dosimetry and mating capacity studies in the laboratory on *Aedes albopictus* males. *J. Med. Entomol.*, (47) 581-591.

Balestrino, F., Puggioli, A., Carrieri, M., Bouyer, J., и Bellini, R. (2017). Quality control methods for *Aedes albopictus* sterile male production. *PLos Negl. Trop. Dis.*, (11) e0005881.

Balestrino, F., Puggioli, A., Gilles, J. R., и Bellini, R. (2014). Validation of a new larval rearing unit for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mass rearing. *PLoS ONE*, (9) e91914.

Becker, N., Petrić, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C. и Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and Their Control* (стр. 278). Springer.

Bellini, R., Calvitti, M., Medici, A., Carrieri, M., Celli, G., и Maini, S. (2007). Use of the steriler insect technique against *Aedes albopictus* in Italy: First results of a pilot trial. У *Area-Wide Control of Insect Pests* (505-515). Berlin/Heidelberg, Germany: Springer.

Bellini, R., Puggioli, A., Balestrino, F., Carrieri, M., и Urbanelli, S. (2018). Exploring protandry and pupal size selection for *Aedes albopictus* sex separation. *Parasit. Vectors*, (11) 650.

Benedict, M. Q., Levine, R. S., Hawley, W. A., и Lounibos, L. P. (2007). Spread of the tiger: Global risk of invasion by the mosquitoes Aedes albopictus. *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, (7) 76-85.

Bimbile Somda, N. S., Maiga, H., Mamai, W., Yamada, H., Ali, A., Konczal, A., Dabire, K. R. (2019). Insects to feed insect-feeding *Aedes* mosquitoes with flies for laboratory rearing. *Sci. Rep.*, (9) 11403.

Bimbile Somda, N. S., Dabire, K. R., Maiga, H., Yamada, H., Mamai, W., Gnankine, O., Gilles, J. L. (2017). Cost-effective larval diet mixture for mass rearing of *Anopheles arabbiensis* Patton (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors*, (10) 619.

Bourtzis, K., и Vreysen, M. J. (2021). Insect Technique (SIT) and Its Applications. *National Library of Medicine*, 4.

Boyer, S., Toty, C., Jacquet, M., Lemeriere, G., и Fontenille, D. (2012). Evidene of multiple insemination in the field in *Aedes albopictus*. *PloS ONE*, 7(8) e42040.

Briegel, H., и Timmermann, S. E. (2001). *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Physiological aspects of development and reproduction. *J. Med. Entomol.*, (38) 566-571.

Vaux, A. G. (2019). Преузето са ResearchGate: https://www.researchgate.net/figure/Comparison-of-the-eggs-of-Aedes-albopictus-and-Aedes-geniculatus-A-Eggs-on-ovitrap_fig2_334769271

Vavassori, L., Saddler, A., и Muller, P. (2019). Active dispersal of *Aedes albopictus*: A mark-release-recapture study using self-marking units. *Parasites Vectors*, (12) 583.

Damiens, D., Benedict, M. Q., Wille, M., и Gilles, J. R. (2012). An inexpensive and effective larval diet for *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae): Eat like a horse, a bird, or a fish? *J. Med. Entomol.*, (49) 1001-1011.

Delatte, H., Gimonneau, G., Triboire, A., и Fontenille, D. (2009). Influence of temperature on immature development survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chinkungunya and dengue in the Indian Ocean. *J. Med. Entomol.*, 46(1) 33-41.

Kasai, S., Ng, L. C., Lam-Phua, S. G., Tang, C. S., Itokawa, K., Komagata, O., Tomita, T. (2011). First detection of a putative knockdown resstance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*. *Jpn. J. Infect. Dis.*, (64) 217-221.

Кавран, М., Игњатовић Ћупина, А., Згомба, М., Жунић, А., Богдановић, С., Срдић, В., Петрић, Д. (2020). Successful invasion of Vojvodina Province by *Aedes albopictus*. *2nd AIM-COST ANNUAL CONFERENCE*. Lisbon, Portugal, 12th-13th February.

Кавран, М., Игњатовић Ћупина, А., Петрић, Д., (2021) Инвазивне врсте комараца (Diptera: Culicidae) у Србији. Биљни лекар, 49(5): 687.

Khan, I., Farid, A., и Zeb, A. (2013). Development of inexpensive and globally available larval diet for rearing *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Parasit. Vectors*, (6) 90.

Khan, M. A., Akhtar, N., Ullah, I., и Jaffery, S. (1995). Nutritional evaluation of desi and kabuli chickpeas and their products commonly consumed in Pakistan. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, (46) 215-223.

Kleinjan, J. E., и Dadd, R. H. (1977). Vitamin requirements of the larval mosquito, *Culex pipiens*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, (70) 541-543.

Klowden, M. J. (1990). The endogenous regulation of mosquito reproductive behavior. *Experientia*, (46) 660-670.

Le Goff, G., Damiens, D., Rutte, A. H., Payet, L., Lebon, C., Dehecq, J. S., и Gouagna, L. C. (2019). Field evaluation of seasonal trends in relative population sizes and dispersal pattern od *Aedes albopictus* males in support of the design of sterile male release strategy. *Parasties Vectors*, (12) 82.

Lee, S. J. (1994). Bloodsucking, Oviposition and Longevity of *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae). *Chinese Jornual Entomology*, (14) 217-231.

Mamai, W., Somda, N. S., Maiga, H., Konczal, A., Wallner, T., Bakhoum, M. T., Bouyer, J. (2019). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae powder as a larval diet ingredient for mass-rearing Aedes mosquitoes. *Parasite*, (26) 57.

Marini, F., Caputo, B., Pombi, M., Tarsitani, G., и Della Torre, A. (2010). A Study of *Aedes albopictus* dispersal in Rome, Intalu, using sticky traps in mark-release-recapture experiment. *Med. Vet. Entomol.*, (24) 361-368.

Mastronikolos, G. D., Kapranas, A., Balatsos, G. K., Ioannou, C., Papachristos, D. P., Milonas, P. G., Bellini, R. (2022). Quality control Methods for *Aedes albopictus* Sterile Male Transportation. *Insects*, (13) 179.

Medeiros, M. C., Boothe, E. C., Roark, E. B., и Hamer, G. L. (2017). Dispersal of male and female *Culex quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes using stable isotope enrichment. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, (11) e0005347.

Mori, A. (1979). Effects of larval density and nutriotion on some attributes of immature and adult *Aedes albopictus*. *Trop. Med.*, (21) 85-103.

Murray, M. D., и Marks, E. N. (1984). Blood sucking Diptera of Cocos (Keeling) Islands. *Jornual of the Australian Entomological Society*, (23) 265-268.

Nestel, D., и Nemny-Lavy, E. (2008). Nutrient balance in medfly, *Ceratitis capitata*, larval diets affects the ability of the developing insect to incorporate lipid and protein reserves. *Entomol. Exp. Appl.*, (126) 53-60.

Петрић, Д. (2009). Monitoring of invasive vector mosquitoes and vectorborne diseases (in Serbia). *Report to Administration for Environmental Protection, Novi Sad*, 1-9.

Puggioli, A., Balestrino, F., Damiens, D., Lees, R. s., Soliban, S. M., Madakacherry, O., Gilles, J. R. (2013). Efficiency of three diets for larval development in mass rearing *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, (50) 819-825.

Пудар, Д. (2018). Утицај услова масовног узгоја на селекцију дужине крила комараца врсте *Stegomyia albopictus* (Diptera: Culicidae) и ефекти методе отпуштања стерилних мужјака. 17.

Rahman, R. U., Souza, B., Uddin, I., Carrara, L., Brito, L. P., Costa, M. M., Martins, A. J. (2021). Insecticide resistance and underlying target-site and metabolic mechanisms in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Lahore, Pakistan. *Sci. Rep.*, (11) 4555.

Reiter, P., и Sprenger, D. (1987). A mechanism for the worldwide dispersal of container reeding mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control. Assoc*, (3) 494-501.

Sasmita, H. I., Tu, W. C., Bong, L. J., и Neoh, K. B. (2019). Effects of larval diets and temperature regimes on life history traits, energy reserves and temperature tolerance of male *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Optimizing rearing techniques for sterile insect programmes. *Parasit. Vectors*, (12) 578.

Service, M. (2015). Larval habitats (9-10). *Medical Entomology* Liverpool, UK: Cambridge University Press.

Sneller, V. P., и Dadd, R. H. (1977). Requirement for sugar in chemically defined diet for larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, (14) 387-392.

Tur, C., Benlloch-Navarro, S., Argiles-Herrero, R., Zacares, M., Dalmau, V., и Pla, I. (2021). Sterile Insect Technique is an Integrated Vector Management Program against Tiger Mosquito *Aedes albopictus* in the Valenica Region (Spain) Operating Procedures and Quality Control Parameters. *Insects*, (12) 272.

FAO. (2005). Secretariant of the Internatonal Plant Protection Convention (IPPC): Rome, Italy. *Provisional Additions, Glossary of Phytosanitary Terms*.

Foster, W. A., Walker, E. D. (2009). Mosquitoes (Culicidae): *Medical and Veterinary Entomology* (207). San Diego, California: Academic Press.

Haramboure, M., Labbe, P., Baldet, T., Damiens, D., Gouagna, L. C., Bouyer, J., и Tran, A. (2020). Moddeling the control of *Aedes albopictus* mosquitoes based on sterile males release techniques in a tropical environment. *Ecol. Model.*, 424, 109002.

Hawley, W. A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *Jornual of the American Mosquito Control association (suppl)*, 1-40.

Culbert, N. J., Balestrino, F., Dor, A., Herranz, G. S., Yamada, H., Wallner, T., и Bouyer, J. (2018). A rapid quality control test to foster the development of genetic control in mosquitoes. *Sci. Rep.*, 8, 16179.

Waldock, J., Chandra, J., Lelieveld, Y., Proestos, E., Michael, E., Christophides, G., и Parham, P. E. (2013). The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathog. Glob. Health*, 107(5) 224-241.

WHO/IAEA. (2020). Guidence framework for testing the sterile insect technique as a vector control tool against *Aedes*-borne diseases. *World Health Organization and the International Atomic Energy Agency, Geneva, Switzerland*.

Wilkerson, R. C., Linton, Y. M. и Strickman, D. (2021) *Mosquitoes of the World* (613-623). Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press.