

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Irena S. Međo, dipl. inž.

AKARICIDNI I SUBLETALNI EFEKTI BIOPESTICIDA
NA *Tetranychus urticae* Koch(Acari: Tetranychidae)

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Irena S. Međo, BSc

ACARICIDAL AND SUBLETHAL EFFECTS OF
BIOPESTICIDES ON *Tetranychus urticae* Koch
(Acari: Tetranychidae)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

POLJOPRIVREDNI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

Članovi komisije:

Mentor

dr Radmila Petanović, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet
dopisni član SANU

Drugi mentor

dr Dejan Marčić, naučni savetnik
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

dr Bojan Stojnić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet

dr Petar Kljajić, naučni savetnik
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

dr Slavica Vuković, docent
Univerzitet u Novom Sadu - Poljoprivredni fakultet

Akaricidni i subletalni efekti biopesticida na *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

Rezime

Akaricidni i subletalni efekti komercijalnih preparata biopesticida na bazi oksimatrina, azadirahtina, spinosada i entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* na običnu grinju-paučinara *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) ispitivani su u laboratorijskim biotestovima, u cilju kompletiranja profila njihove biološke aktivnosti kao osnove za definisanje održive strategije primene. Biotestovi su izvedeni na temperaturi $27 \pm 2^\circ\text{C}$ i relativnoj vlažnosti 50-70% uz fotoperiod svetlo/tama 16h/8h. Biopesticidi su aplicirani prskanjem lisnih isečaka (prečnika 30 mm) ili celih primarnih listova pasulja, postavljenih adaksijalno u Petri sudove, pomoću aparata Potter Tower (2 ml tečnosti, pritisak 100 kPa, vodeni depozit $2,7 \text{ mg/cm}^2$). Toksičnost biopesticida za životne stadijume *T. urticae* ocenjena je izvođenjem biotestova u kojima su jaja, juvenilni stadijumi (larve, protonimfe, ženke deutonimfe) ili odrasle preovipozicione ženke tretirane serijom simetrično raspoređenih koncentracija, a dobijeni podaci obrađeni postupkom probit-analize. Nijedan od ispitivanih biopesticida nije uzrokovao značajnu ovicidnost, već je akaricidni efekat nastao usled rezidualnog delovanja biopesticida na larve ispiljene iz tretiranih jaja. U svim biotestovima direktno tretirane larve bile su najosetljiviji životni stadijum. Direktno tretiranje preovipozicionih ženki preparatima na bazi azadirahtina i *B. bassiana* uzrokovalo je RO-efekat („run-off“-efekat: napuštanje tretirane površine) kao dominantan u odnosu na smrtnost. Vrednosti LC_{90} za preparat na bazi oksimatrina bile su znatno niže od koncentracije preporučene za primenu (2 ml/l), dok su kod spinosada bile više od preporučenih koncentracija (60-300 mg/l). Vrednosti LC_{90} za azadirahtin bile su niže a vrednosti EC_{90} za RO-efekat ovog biopesticida viša od preporučene koncentracije (50 mg/l a.m.). U biotestovima sa preparatom na bazi *B. bassiana* sve LC/EC_{90} vrednosti (osim za LC_{90} za larve) bile su više od preporučene koncentracije (3 ml/l). Repelentnost i ovipoziciona deterentnost biopesticida ocenjena je izvođenjem biotesta sa mogućnošću izbora u kojem su preovipozicione ženke postavljane na centralni nerv lista čija je samo jedna polovina tretirana; broj ženki i broj položenih jaja utvrđivani su posebno na tretiranoj i netretiranoj polovini lista posle 24, 48 i 72 h. Značajne repelentne i deterentne efekte (posle 24 h i kumulativno za ceo period) uzrokovale su serije koncentracija preparata na bazi oksimatrina (0,5-2 ml/l), azadirahtina (1,56-50 mg/l a.m.) i *B. bassiana* (0,82-7 ml/l). Efekti biopesticida na životne parametre i populacioni rast *T. urticae* ocenjeni su izvođenjem dve varijante biotesta u kojima su ženke koje su preživjele tretiranje u stadijumu jajeta starosti do 24 h i izloženost reziduama tokom juvenilnog razvića (prva varijanta) ili preovipozicionom periodu (druga varijanta) prebačene na netretiranu površinu na kojoj su tokom perioda od sedam dana dnevno utvrđivani broj položenih jaja i broj živih ženki. Preparat na bazi oksimatrina (0,025-0,1 ml/l) značajno je redukovao fekunditet, dužinu života ženki i trenutnu stopu rasta (r_t), posebno u drugoj varijanti gde je zabeležena negativna r_t vrednost. Značajna redukcija ovih parametara zabeležena je i u biotestovima sa preparatima azadirahtina (prva varijanta: 3,75-15 mg/l a.m; druga varijanta: 17,5-70 mg/l a.m.), spinosada (60-240 mg/l a.m.) i *B. bassiana* (1,5-6 ml/l).

Efekti biopesticida na prirodnu stopu rasta (r_m) i druge demografske parametre *T. urticae* ocenjeni su formiranjem tabela života sa podacima o uzrasno-specifičnim stopama preživljavanja i fertiliteta (produkciji ženskog potomstva) ženki preživelih tretiranje u stadijumu jajeta starosti do 24 h (prva varijanta) ili preovipozicionom periodu (druga varijanta). Demografski biotestovi sa preparatima oksimatrina (0,05 ml/l), azadirahtina (prva varijanta: 7,5 mg/l a.m; druga varijanta: 35 mg/l a.m.) pokazali su da ovi biopesticidi redukuju populacioni rast redukujući fertilitet i stope preživljavanja, ali i usporavajući juvenilno razviće jedinki ispiljenih iz tretiranih jaja. Značajna redukcija demografskih parametara zabeležena je i u obe varijante biotesta sa preparatom na bazi *B. bassiana* (3 ml/l). Preparat spinosada (120 mg/l a.m.) takođe je značajno redukovao demografske parametre nakon tretiranja u preovipozicionom periodu, dok je tretiranje u stadijumu jajeta povećalo r_m vrednost preživelih jedinki, zahvaljujući većem fertilitetu na početku perioda reprodukcije tretiranih ženki. Dobijeni rezultati razmatrani su u kontekstu populacione strukture i dinamike *T. urticae* kao kolonizirajuće vrste i heterogene distribucije aktivne materije u uslovima praktične primene.

Ključne reči: *T. urticae*, biopesticidi, oksimatrini, azadirahtin, spinosad, *B. bassiana*, toksičnost, subletalni efekti, populacioni rast

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitomedicina

UDK: 632.951: 632.752(043.3)

Acaricidal and sublethal effects of biopesticides on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

Abstract

Acaricide and sublethal effects of several commercial biopesticide products based on oxymatrine, azadirachtin, spinosad and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) were examined in laboratory bioassays in order to round off a profile of their biological activity as a basis for defining a sustainable application strategy. Bioassays were performed at $27\pm 2^\circ\text{C}$ temperature, 50-70% relative humidity and 16h/8h light/dark photoperiod. The biopesticides were sprayed on bean leaf discs (30 mm in diameter) or intact leaves positioned adaxially in Petri dishes using a Potter Tower device (2 ml liquid, 100 kPa pressure, 2.7 mg/cm^2 water deposit). Toxicity of the biopesticides to different stages of *T. urticae* mites was assessed in bioassays in which eggs, juvenile stages (larvae, protonymphs, female deutonymphs) or adult preovipositing females were treated with a series of symmetrical concentrations, and the data were processed by probit analysis. None of the investigated biopesticides caused a significant ovicide effect, while acaricide effects resulted from their residual effects on larvae hatched from the treated eggs. In all bioassays, directly treated larvae were found the most sensitive life stage. Direct treatment of preovipositing females with azadirachtin and *B. bassiana* products caused a run-off effect which was dominant compared to mortality. The LC_{90} values of the oxymatrine product were significantly lower than its recommended concentration (2 ml/l), while those of spinosad were higher than the recommended concentration (60-300 mg/l). Azadirachtin LC_{90} values were lower and those of its RO-effect higher than the recommended concentration (50 mg/l a.i.). In *B. bassiana* bioassays, all LC/EC_{90} values (except LC_{90} for larvae) were higher than the recommended concentration (3 ml/l). Repellence and ovipositional deterrence of the biopesticides were assessed in bioassays in which preovipositing females were offered a choice by releasing them onto the central nerve dividing each leaf into a treated and untreated half; and the number of females and eggs were counted on each half after 24, 48 and 72 h. Significant repellent and deterrent effects (after 24 h and cumulative over the entire period) were caused by oxymatrine (0.5-2 ml/l), azadirachtin (1.56-50 mg/l a.i.) and *B. bassiana* (0.82-7 ml/l) concentration series. Biopesticide effects on the life-table parameters and population growth of *T. urticae* were evaluated by conducting two variants of bioassay in which females that survived treatment at the 24h-old egg stage and were exposed to residues over their entire juvenile development (first variant) or during preovipositing period (second variant) were transferred to untreated surface on which the number of eggs they laid and live females were counted daily for seven days. The oxymatrine product (0.025-0.1ml/l) significantly reduced fecundity, life span and instantaneous rate of increase (r_i), particularly in the second variant, in which a negative r_i was found. Significant reduction in these parameters was also detected in bioassays testing azadirachtin (first variant: 3.75-15 mg/l a.i.; second variant: 17.5-70 mg/l a.i.), spinosad (60-240 mg/l a.i.) and *B. bassiana* (1.5-6 ml/l).

The effects of the biopesticides on intrinsic rate of increase (r_m) and other demographic parameters of *T. urticae* were assessed by constructing life-tables that included age-specific survival and fertility rates (female offspring production) of females that survived treatment at the egg stage of up to 24 h (first variant) or during preoviposition (second variant). Demographic bioassays with oxymatrine (0.05 ml/l) and azadirachtin (first variant: 7.5 mg/l a.i.; second variant: 35 mg/l a.i.) showed that these two biopesticides reduced population growth by suppressing fertility and survival rates, but also by slowing down the juvenile development of mites hatched from treated eggs. Both bioassay variants testing *B. bassiana* (3 ml/l) also showed significant reductions in demographic parameters. Spinosad (120 mg/l a.i.) also significantly reduced those parameters after treatment at the preovipositing period, while treatment at the egg stage increased the r_m values of the surviving mites, owing to the higher fertility of treated females at the beginning of reproduction. The results were discussed in terms of population structure and dynamic of *T. urticae* as a colonizing species and the heterogenous distribution of active ingredients under practical conditions.

Keywords: *T. urticae*, biopesticides, oxymatrine, azadirachtin, spinosad, *B. bassiana*, toxicity, sublethal effects, population growth

Field of science: Biotechnical science

Branch of science: Phytomedicine

UDC: 632.951: 632.752(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. BOTANIČKI INSEKTICIDI I AKARICIDI	3
2.2. INSEKTICIDI I AKARICIDI MIKROBIOLOŠKOG POREKLA	5
2.3. SUBLETALNI EFEKTI I POPULACIONA TOKSIKOLOGIJA AKARICIDA	7
3. MATERIJAL I METODE	12
3.1. TEST ORGANIZAM	12
3.2. BIOPESTICIDI	12
3.3. BIOTESTOVI	13
3.3.1. Biotest toksičnosti za životne stadijume	13
3.3.2. Biotest repelentnosti i deterentnosti	14
3.3.3. Biotest efekata na životne parametre i populacioni rast	15
3.3.4. Demografsko-toksikološki biotest	17
4. REZULTATI	20
4.1. AKARICIDNI I SUBLETALNI EFEKTI BIOPESTICIDA KINGBO	20
4.1.1. Toksičnost za životne stadijume	20
4.1.2. Repelentni i deterentni efekti	21
4.1.3. Efekti na životne parametre i populacioni rast	22
4.1.4. Efekti na demografske parameter	27
4.2. AKARICIDNI I SUBLETALNI EFEKTI AZADIRAHTINA	29
4.2.1. Toksičnost za životne stadijume	29
4.2.2. Repelentni i deterentni efekti	31

4.2.3. Efekti na životne parametre i populacioni rast	32
4.2.4. Efekti na demografske parameter	36
4.3. AKARICIDNI I SUBLETALNI EFEKTI SPINOSADA	38
4.3.1. Toksičnost za životne stadijume	38
4.3.2. Efekti na životne parametre i populacioni rast	39
4.3.3. Efekti na demografske parameter	43
4.4. AKARICIDNI I SUBLETALNI EFEKTI BIOPESTICIDA NATURALIS-L	46
4.4.1. Toksičnost za životne stadijume	46
4.4.2. Repelentni i deterentni efekti	47
4.4.3. Efekti na životne parametre i populacioni rast	49
4.4.4. Efekti na demografske parameter	53
5. DISKUSIJA	56
5.1. AKARICIDNI I SUBLETALNI EFEKTI BIOPESTICIDA KINGBO	56
5.2. AKARICIDNI I SUBLETALNI EFEKTI AZADIRAHTINA	58
5.3. AKARICIDNI I SUBLETALNI EFEKTI SPINOSADA	62
5.4. AKARICIDNI I SUBLETALNI EFEKTI BIOPESTICIDA NATURALIS-L	64
5.5. PRIMENA ISPITIVANIH BIOPESTICIDA ZA SUZBIJANJE T. URTICAE	67
6. ZAKLJUČAK	69
7. LITERATURA	71
8. PRILOZI	85

1. UVOD

Obična grinja paučinar, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Prostigmata, Tetranychidae) najpoznatija je i ekonomski najznačajnija fitofagna grinja. Ovo je izrazito polifagna i kosmopolitska vrsta, koja je sa preko 1100 registrovanih biljaka domaćina, uključujući i mnoge poljoprivredne kulture (Migeon i Dorkeld, 2015) rekorder među tetranhidama. Obična grinja paučinar naročito je značajna u staklenicima i plastenicima, gde se redovno sreće kao jedna od ključnih štetnih vrsta (Zhang, 2003; Petanović i Vidović, 2009; Petanović et al., 2010; Hoy, 2011).

Primena specifičnih akaricida i insekticida sa akaricidnim delovanjem dominantan je način suzbijanja grinja-paučinara decenijama unazad. Usled izuzetnog prirodnog potencijala za brz razvoj rezistentnosti i ne uvek dovoljno promišljene strategije hemijskog suzbijanja, rezistentnost *T. urticae* i drugih tetranhida na akaricide postala je globalni fenomen (Cranham i Helle, 1985; Croft i Van de Baan, 1988; Knowles, 1997; Van Leeuwen et al., 2009). Početkom 2016. godine, baza podataka APRD („Arthropod Pesticide Resistance Database“) - veoma značajan izvor za sagledavanje fenomena rezistentnosti artropoda na pesticide na globalnom nivou - sadržala je 871 izveštaj o rezistentnosti 24 vrste tetranhida, od čega 508 izveštaja o rezistentnosti *T. urticae*. Autori ove baze podataka kreirali su i listu "top 20" rezistentnih artropoda, rangiranih na osnovu broja akaricidnih jedinjenja sa dokumentovanom rezistentnošću (Whalon et al., 2008, 2016), na kojoj ova vrsta zauzima prvo mesto sa 94 jedinjenja.

Od prve raširenije pojave rezistentnih populacija tetranhida 50-tih godina prošlog veka, hemijska industrija nastoji da prevaziđe problem rezistentnosti razvojem i uvođenjem u primenu akaricida sa novim mehanizmima delovanja (Cranham i Helle, 1985; Knowles, 1997; Dekeyser, 2005; Marčić, 2012). Nove aktivne materije akaricida danas se razvijaju i uvode u primenu u uslovima sve većeg pritiska javnog mnjenja za smanjenjem ekoloških i zdravstvenih, odnosno sve oštrijih toksikoloških i ekotoksikoloških kriterijuma koje postavlja zakonska regulativa. U Evropskoj Uniji, kao rezultat primene Direktive 91/414 i Regulative 1107/2009, od preko 100 sintetskih aktivnih materija akaricida svega dvadesetak dobilo je odobrenje za stavljanje u promet (EU, 2016). Problem rezistentnosti, relativno ograničene mogućnosti izbora novih aktivnih materija i javni zahtevi za smanjenjem zdravstvenih i ekoloških rizika, reaktuelizovali su značaj biopesticida kao alternative sintetskim jedinjenjima (Copping i Menn, 2000; Bailey et al., 2010; Chandler et al., 2011). Regulativa 1107/2009

podstiče korišćenje aktivnih materija niskog rizika i daje poseban status alternativama za sintetske pesticide, što ide u prilog uvođenju u primenu biopesticida (Villaverde et al., 2014).

Prikupljanje osnovnih podataka o efektima akaricida (biopesticida) na *T. urticae* u laboratorijskim biotestovima prvi je korak u ispitivanju mogućnosti njihove primene za suzbijanje populacija ove štetne vrste. Pored osnovnog biološkog profila toksičnosti za različite stadijume, za procenu ukupnog učinka akaricida potrebno je izvršiti i evaluaciju subletalnih efekata na ponašanje, vitalnost i reprodukciju preživelih jedinki, uključujući i odgovor na nivou populacije (Robertson i Worner, 1990; Stark et al., 1997; Stark i Banks, 2003). Heterogena distribucija aktivne materije, što je čest slučaj prilikom praktične primene pesticida, omogućava oporavak populacije na netretiranoj ili slabije tretiranoj površini lista, koji zavisi od reproduktivne sposobnosti ženki koje izbegnu ili prežive tretiranje (Sáenz-de-Cabezón Irigaray i Zalom, 2009; Martini et al., 2012). S druge strane, adaptivna strategija *T. urticae* kao kolonizujuće vrste zasnovana je na visokoj reprodukciji mladih oplodjenih ženki koje su glavni stadijum disperzije na nove površine. Populacije ove vrste su u prirodi često blizu stabilne uzrasne strukture koju čini približno 65% jaja, 25% juvenilnih stadijuma i 10% adulta (Carey, 1982; Sabelis, 1985; Li i Margolies, 1993; Saito, 2010). Radi što pouzdanije procene učinka akaricida rezultate biotestova letalnih i subletalnih efekata treba posmatrati i tumačiti u ovom kontekstu.

Cilj ove doktorske disertacije je evaluacija akaricidnih i subletalnih efekata preparata na bazi oksimatrina, azadirahatina, spinosada i entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* na *T. urticae* (sa posebnim osvrtom na ocenu efekata u kontekstu populacione biologije ove vrste), kao polazne osnove za definisanje održive strategije praktične primene ispitivanih biopesticida.

2. PREGLED LITERATURE

Ne postoji opšte prihvaćena definicija pojma biopesticid. Prema nekim autorima (Eilenberg et al., 2001; Glare et al., 2012) ovaj pojam obuhvata samo žive (mikro)organizme. Šira definicija biopesticida (Bailey et al., 2010; Chandler et al., 2011) podrazumeva komercijalna sredstva za zaštitu bilja napravljena od živih organizama ili njihovih proizvoda koja se prema vrsti agensa/aktivne materije dele na **mikroorganizme** (bakterije, gljive, oomicete, virusi, protozoe), **biohemikalije** (sekundarni metaboliti mikroorganizama i biljaka i drugi prirodni proizvodi) i **semiohemikalije** (feromoni i alelohemikalije). U literaturi se često sreću i nazivi *mikrobiološki pesticidi*, za biopesticide na bazi mikroorganizama, *mikopesticidi* (*mikoinsekticidi*), za mikrobiološke pesticide na bazi entomopatogenih gljiva, i *botanički pesticidi* (*botanički insekticidi*), za biopesticide čije su aktivne materije sekundarni metaboliti biljaka (Isman, 2006; Faria i Wraight, 2007; Chandler et al., 2011; Miresmailli i Isman, 2014).

Kao komparativne prednosti biopesticida u odnosu na sintetske pesticide najčešće se navode njihova niža toksičnost za sisare, minimalne ili nulte karence, veća bezbednost za neciljane organizme i životnu sredinu, mali rizik za razvoj rezistentnosti, kompatibilnost sa organskom proizvodnjom. S druge strane, u nedostatke biopesticida ubrajaju se mala perzistentnost, sporije delovanje, veća osetljivost na nepovoljne ekološke uslove, problemi u vezi sa standardizacijom i formulisanjem (Copping i Menn, 2000; Chandler et al., 2011; Regnault-Roger et al., 2012; Miresmailli i Isman, 2014; Villaverde et al., 2014). Biopesticidi čine svega 4-5 % globalnog tržišta pesticida ali se procenjuje da bi ovaj udeo u narednih desetak godina mogao da se poveća na oko 20 % (Isman, 2015). U daljem tekstu biće više reči samo o botaničkim i pesticidima mikrobiološkog porekla (mikroorganizmima i njihovim proizvodima) koji poseduju insekticidna i akaricidna svojstva.

2.1. Botanički insekticidi i akaricidi

Različiti proizvodi biljnog porekla, kao što su **rotenon** (izoflavonoid iz korena i rizoma tropskih leguminoza iz rodova *Derris*, *Lonchocarpus* i *Tephrosia*) i **piretrum** (oleoresin iz cvetova dalmatinskog buhača, *Chrysanthemum cinerariaefolium*, mešavina estara hrizantemske i piretrinske kiseline) već decenijama se nalaze se u upotrebi, uključujući i suzbijanje tetrahidida i drugih fitofagnih grinja (Copping i Menn, 2000; Isman, 2006). **Etarska ulja**, sekundarni metaboliti aromatičnih biljaka iz familija Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae i drugih, kompleksne mešavine čije su glavne komponente

terpenoidi, takođe su važan izvor prirodnih proizvoda sa pesticidnim delovanjem (Isman, 2006; Regnault-Roger et al., 2012). Iako rezultati laboratorijskih ispitivanja akaricidnog delovanja pokazuju veliki potencijal etarskih ulja i njihovih komponenti kao biopesticida, na tržištu nema mnogo komercijalnih preparata namenjenih suzbijanju tetranihida. Primeri uspešne komercijalizacije su preparati na bazi etarskih ulja ruzmarina, karanfilića, cimeta, timijana, semena pamuka, korovske biljke centralnoameričkog porekla *Chenopodium ambrosioides* (Chiasson et al., 2004; Copping i Duke 2007; Cloyd et al., 2009; Attia et al., 2013). Postoje i komercijalne formulacije sa akaricidnim delovanjem na bazi drugih biljnih ekstrakata kao što su masne kiseline, ulja soje, uljane repice, kanole (Copping i Menn, 2000; Lancaster et al., 2002; Copping i Duke 2007; Cloyd et al., 2009; Marčić et al., 2009).

Jedan od najpoznatijih botaničkih pesticida je limonoid **azadirahtin**, primarna aktivna materija u ekstraktima, uljima i drugim derivatima dobijenim iz semena tropske biljke *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) („the Indian neem tree“). Azadirahtin je snažan prirodni antifidant (deterent ishrane) i regulator rasta i razvića insekata, efikasan protiv štetnih vrsta Lepidoptera, Hemiptera, Coleoptera, Thysanoptera i drugih. Smatra se da azadirahtin uzrokuje dve vrste antifidantnih efekata: primarne, koji nastaju delovanjem na gustatorne hemoreceptore (pre svega kod gusenica Lepidoptera) i sekundarne, koji su posledica fizioloških poremećaja nakon apsorpcije azadirahatina preko integumenta ili ingestijom. Pored antifidantnih efekata koji uzrokuju smrtnost indirektno, azadirahtin deluje na neuro-endokrini sistem narušavajući procese rasta, razvića i presvlačenja što ima za ishod malformacije i uginuće organizma. Takođe, azadirahtin uzrokuje i sterilnost ili redukciju fekunditeta tretiranih ženki (Schmutterer, 1990; Mordue [Luntz] i Blackwell, 1993; Mordue [Luntz] et al., 2010). Ispitivanja osetljivosti tetranihida u laboratorijskim biotestovima pokazala su da proizvodi na bazi azadirahatina poseduju značajna akaricidna svojstva (Mansour et al., 1993, 1997; Kashenge i Makundi, 2001; Tsolakis et al., 2002; Brito et al., 2006; Knapp i Kashenge, 2003; Duso et al., 2008).

Od početka komercijalizacije sredinom 80-tih godina prošlog veka na tržištu se pojavio veliki broj preparata na bazi azadirahatina različitih po geografskom poreklu, sadržaju aktivne materije, tipu formulacije, što utiče na njihova pesticidna svojstva (Copping i Duke 2007; Gahukar, 2014). Preparat NeemAzal-T/S, proizvod druge generacije, formulisan je od NeemAzal-a, koncentrovanog i standardizovanog ekstrakta dobijenog procesom ekstrakcije kojim se iz semena izdvaja aktivna materija ali ne i ulje (Kleeberg, 2004). Ovaj preparat je u Evropskoj Uniji odobren prema Regulativi 1107/2009 (EU, 2016). O akaricidnim efektima preparata NeemAzal-T/S ima malo podataka iz laboratorijskih biotestova: uglavnom je reč o

smrtnosti zabeleženoj nakon tretiranja jaja ili odraslih ženki *T. urticae* aplikacijom 3-4 koncentracije (Mironova i Khorkhordin, 1997; Kim et al., 2000; Basha i Kelany, 2001); jedino su Dimetry et al. (2008) izračunali LC vrednosti postupkom probit analize.

Relativno malom broju novih komercijalnih botaničkih pesticida poslednjih godina pridružio se i preparat Kingbo, čija je aktivna materija **oksimatrin**, alkaloid hinolizidin dobijen iz biljke *Sophora flavescens* Ait. (Fabaceae). Osušeni koren ove biljke poznat je u kineskoj tradicionalnoj medicini pod nazivom Ku Shen. Preparat sadrži i **psoralen**, furanokumarin najviše prisutan u biljkama iz familija Apiaceae, Rutaceae, Moraceae i Fabaceae. Hinolizidini i furanokumarini imaju ulogu u odbrani biljaka kao deterenti ishrane fitofagnih artropoda (Wink, 1992; Berdegué et al., 1997; Wittstock i Gershenzon, 2002; Shields et al., 2008). Ekstrakti *S. flavescens* proizvodi na bazi oksimatrina pokazali su se i kao toksični za različite vrste insekata (Lou et al., 1997; Yuan et al., 2004; Kim et al., 2005; Liu et al., 2007; Mao i Henderson, 2007; Abd El-Mageed i Shalaby, 2011) i imaju praktičnu primenu kao pesticidi (Zheng et al., 2000; Fu et al., 2005; Marrone et al., 2008). Podataka o toksičnosti za tetranihide ima malo. Kim et al. (2005) utvrdili su da ekstrakt *S. flavescens* primenjen u koncentraciji 0,1 ml/l uzrokuje smrtnost ženki *T. urticae* od 80 %, dok su Wang et al. (2009) izračunali da vrednost LC₅₀ kombinacije oksimatrin+psoralen za *T. cinnabarinus* iznosi 146 mg/l. Psoralen takođe ispoljava insekticidno delovanje (Diawara et al., 1993); o eventualnim akaricidnim efektima ovog jedinjenja, nezavisno od kombinovanja sa oksimatinom, nema dostupnih podataka.

Preparati na bazi kombinacije oksimatrina i psoralena pokazuju visok potencijal kao alternativa sintetskim akaricidima (Wang et al., 2010; Marčić et al., 2012b). Međutim, da bi bili registrovani na tržištima razvijenih zemalja (SAD, Evropska Unija, zemlje OECD-a) ovi preparati treba da zadovolje visoke toksikološke i ekotoksikološke standarde. Regulatorni kriterijumi ovih zemalja mogu da budu prepreka za registraciju pre svega zbog psoralena, fotoreaktivnog jedinjenja čiji se metoksi derivati koriste u fotohemoterapiji psorijaze UV zračenjem i povezuju sa pojavom raka kože (Stern, 2012).

2.2. Insekticidi i akaricidi mikrobiološkog porekla

Sekundarni metaboliti zemljišnih aktinomiceta predstavljaju važan izvor za dobijanje novih biopesticida. Makrociklični laktoni abamektin (fermentacioni proizvod *Streptomyces avermitilis*) i milbemektin (fermentacioni proizvod *S. hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus*) globalno su poznati primeri uspešne komercijalizacije insekticida i akaricida prirodnog porekla (Lasota i Dybas, 1991). Noviji sličan primer biopesticida mikrobiološkog porekla je

spinosad, mešavina spinosina A i D, sekundarnih metabolita *Saccharopolyspora spinosa*, uveden u primenu kao insekticid za suzbijanje štetnih vrsta iz redova Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Thysanoptera i drugih (Thompson et al., 2000; Copping i Duke, 2007). Spinosad je neurotoksični insekticid, alosterični modulator nikotinskih receptora acetilholina koji uzrokuje hiperekscitaciju nervnog sistema i paralizu insekata (Sparks et al., 2012). Spinosad je odobren u Evropskoj Uniji prema Regulativi 1107/2009 (EU, 2016).

Populacije tetranihida izložene su delovanju spinosada prvenstveno u staklenicima, gde se ovaj insekticid dosta koristi za suzbijanje *Frankliniella occidentalis* i drugih vrsta tripsa na povrću i ukrasnom bilju (Jones et al., 2005; Rahman et al., 2011). Neki preparati na bazi spinosada registrovani su i za suzbijanje tetranihida, ali u koncentracijama većim od onih koje su preporučene za suzbijanje insekata (Holt et al., 2006). Podaci o akaricidnim svojstvima spinosada su protivrečni. Cowles (1998), Tjosvold i Chaney (2001) i Cote et al. (2002) izvestili su o niskoj ili zanemarljivoj toksičnosti/efikasnosti različitih formulacija ovog biopesticida u laboratorijskim biotestovima odnosno ispitivanjima efekata suzbijanja. S druge strane, postoje i izveštaji o značajnim akaricidnim efektima spinosada. Van Leeuwen et al. (2005) utvrdili su da je nivo akutne toksičnosti spinosada za direktno tretirane ženke *T. urticae* uporediv sa toksičnošću dikofola, fenbutatin-oksida i još nekih sintetskih akaricida starije generacije, dok je u poređenju sa novijim akaricidima znatno niži. Ismail et al. (2007) zabeležili su sličan nivo osetljivosti direktno tretiranih ženki, dok su Villanueva i Walgenbach (2006) utvrdili da su larve i ženke ove vrste osetljive na rezidualno delovanje spinosada primenjenog u relativno visokim koncentracijama. Van Leeuwen et al. (2005) su takođe pokazali da spinosad postiže visoku efikasnost u suzbijanju *T. urticae* primenjen sistemično za zalivanje biljaka paradajza, ali i da nivo efikasnosti zavisi od vrste supstrata.

Mikoinsekticidi i mikoakaricidi formulisani na bazi konidija, blastospora i drugih živih propagula entomo- i akaropatogenih gljiva kao aktivnih materija, takođe su potencijalno efikasna alternativa sintetskim hemijskim akaricidima (Faria i Wraight 2007; Maniania et al. 2008). Gljive koje se najčešće javljaju kao specifični prirodni patogeni tetranihida, inficirajući grinje i uzrokujući epizootije u povoljnim ekološkim uslovima, pripadaju rodovima *Neozygites* i *Hirsutella*, sa najznačajnijim vrstama *Neozygites floridana* i *Hirsutella thompsonii* (Chandler et al., 2000). Komercijalizacija ovih vrsta kao kontrolnih agenasa, međutim, ograničena je poteškoćama povezanim sa njihovom produkcijom *in vitro*. Znatno veći uspeh postigli su mikopesticidi na bazi gljiva iz rodova *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria*(=*Paecilomyces*) i *Lecanicillium* (= *Verticillium*) (Ascomycota:Hypocreales) koje imaju širok spektar ekoloških domaćina uključujući i tetranihide, mnogo lakše se masovno

proizvode, formulišu i apliciraju (Faria i Wraight 2007; Maniania et al., 2008; Wekesa et al., 2015). Posmatrano pojedinačno, relativno najveći broj savremenih mikoakaricida formulisan je na bazi konidija vrste *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Sojevi ATCC 74040 i GHA ove vrste odobreni su u Evropskoj Uniji prema Regulativi 1107/2009 (EU, 2016).

Entomopatogene gljive iz reda Hypocreales su hemibiotrofni organizmi koji prolaze kroz parazitnu fazu u živom domaćinu i saprofitnu fazu na lešu domaćina. Njihove hidrofobne konidije pričvršćuju se za kutikulu insekata/grinja, kličaju i prodiru u telo domaćina, u kojem se umnožavaju formirajući blastospore, uništavajući unutrašnje strukture organizma domaćina i uzrokujući smrt. Nakon smrti domaćina, blastospore se transformišu u miceliju koja se pojavljuje kroz kutikulu i formira spore; sporulacija se dešava samo u uslovima visoke relativne vlažnosti (Charnley i Collins, 2007; Ullah i Lim, 2015).

Laboratorijske studije patogenosti/toksičnosti gljive *B. bassiana* za *T. urticae* i druge tetranhide (Chandler et al., 2005; Maniania et al., 2008; Shi et al., 2008; Seiedy et al., 2010; Bugeme et al., 2014; Seyed-Talebi et al., 2014; Ullah i Lim, 2015) pokazale su da poreklo izolata i sojeva, način formulisanja (eksperimentalne suspenzije konidija ili komercijalne formulacije), kao i relativna vlažnost vazduha i drugi abiotički faktori značajno utiču na stepen i efekte infekcije. Testiranje akaricidnih efekata na *T. urticae* preparata Naturalis-L, koji sadrži konidije soja ATCC 74040, bilo je predmet nekoliko radova. Sáenz-de-Cabezón Irigaray et al. (2003) ispitivali su osetljivost različitih razvojnih stadijuma i izračunali LC₅₀ i LC₉₀ vrednosti postupkom probit-analize, dok su Chandler et al. (2005), Castagnoli et al. (2005) i Duso et al. (2008) ispitivali akaricidnost nakon tretiranja ženki samo jednom koncentracijom preparata; Castagnoli et al. (2005) i Duso et al. (2008) takođe su testirali i ovicidnost preparata Naturalis-L.

2.3. Subletalni efekti i populaciona toksikologija akaricida

Na osnovu poznavanja parametara akutne toksičnosti dobijenih analizom podataka koncentracija-smrtnost teško je proceniti ukupan učinak pesticida (akaricida) između ostalog i zbog toga što, pored smrtnosti, pesticidi uzrokuju i različite *subletalne efekte* (Moriarty, 1969; Haynes, 1988; Robertson i Worner, 1990; Stark i Banks, 2003). Pod subletalnim efektima ovde podrazumevamo promene ponašanja i/ili parametara životne istorije jedinki preživelih izlaganje dozama/koncentracijama pesticida koje mogu da budu letalne (u opsegu koji uzrokuje stopu smrtnosti veću do prirodne) ili subletalne (ispod ovog opsega). U uslovima praktične primene distribucija pesticida na tretiranim biljkama može da bude veoma

heterogena, što stvara mogućnost da deo populacije bude izložen različitim dozama akaricida, uključujući i subletalne. Posledice promena na pojedinačnim organizmima mogu da se ispolje na višim hijerarhijskim nivoima kao što su populacije i zajednice (Desneux et al., 2007; Martini et al., 2012; Guedes et al., 2016).

O promenama ponašanja tetranihida koje uzrokuju akaricidi u literaturi ima dosta podataka. Pojačana lokomotorna aktivnost i repelentni efekti (izbegavanje kontakta sa reziduama, disperzija sa tretiranih površina, preferencija netretiranih površina) zabeleženi su kao odgovor tetranihida na različite sintetske akaricide i insekticide, najviše na neurotoksična jedinjenja kao što su piretroidi (Penman i Chapman, 1988; Holland i Chapman, 1994, 1995; Bowie et al., 2001). Akaricidi takođe deluju i kao deterentni ishrane i ovipozicije tetranihida, inhibirajući ili redukujući ishranu i polaganje jaja na površinama na kojima se ove aktivnosti inače normalno odvijaju (Iftner et al. 1986; Kolmes et al., 1990, 1991; Holland et al., 1994; Bowie et al., 2001). Repelentni i/ili deterentni efekti karakteristični su za mnoge sekundarne biljne metabolite sa akaricidnim delovanjem, kao što su etarska ulja i/ili njihove komponente: u biotestu sa mogućnošću izbora između tretirane i netretirane polovine lista („two choice“ biotest) po pravilu se beleži značajno veći broj ženki i položenih jaja na netretiranoj u poređenju satretiranom polovinom (Antonious i Snyder, 2006; Miresmailli i Isman, 2006; Kumral et al., 2010; Roh et al., 2011, 2013; Araújo et al., 2012).

Azadirahatin, jedan od najmoćnijih deterenata ishrane insekata (Mordue [Luntz] et al., 2010), takođe redukuje i ishranu tetranihida (Sundaram i Sloane, 1995; Dabrowski i Seredyńska, 2007). Repelentni efekti azadirahatinana *T. urticae*, koji se često beleže nakon direktnog tretiranja i/ili izlaganja reziduama (Mansour et al., 1993, 1997; Kashenge i Makundi; Dabrowski i Seredyńska, 2007) kao i u biotestovima sa mogućnošću izbora između tretirane i netretirane površine (Dimetry et al., 1993; Sundaram i Sloane, 1995; Tsolakis et al., 2002; Knapp i Kashenge, 2003; Brito et al., 2006) verovatno su sekundarna posledica deterentnog delovanja ovog biopesticida.

Akaricidi menjaju i vrednosti parametara životne istorije tetranihida, među kojima su najznačajniji fekunditet, fertilitet, dužina života ženki, brzina razvića. Fekunditet, definisan kao broj položenih jaja (za razliku od fertiliteta - broja ispiljenih jaja) parametar je koji se uvek prati prilikom testiranja subletalnih efekata. Ovaj parametar može da bude iskazan i kao neto vrednost, integracijom podataka o reprodukciji i preživljavanju ženki (Carey, 1993). Redukcija fekunditeta česta je posledica kontakta sa akaricidima i insekticidima odraslih ženki tetranihida (Zhang i Sanderson, 1990; Holland et al., 1994; Bowie et al., 2001; Kim i Yoo, 2002; Marčić, 2007; Marčić et al., 2010; Pozzebon et al., 2011), ali se beleži i nakon

tretiranja u nekom od preadultnih stadijuma (He et al., 2011; Marčić et al., 2010; Wang et al., 2014). Efekat koji u „two-choice“ biotestu uzrokuju etarska ulja i drugi sekundarni biljni metaboliti, posmatran kao promena ponašanja (deterencija ovipozicije), takođe može da se kvantifikuje i kao promena vrednosti fekunditeta ženki koje se zadrže na tretiranoj površini.

Osim u „two-choice“ biotestu (Sundaram i Sloane, 1995; Kashenge i Makundi, 2001; Tsolakis et al., 2002; Knapp i Kashenge, 2003), biopesticidi na bazi azadirachtina mogu značajno da redukuju fekunditet *T. urticae* i nakon direktnog tretiranja ženki i njihovog zadržavanja na tretiranoj površini (Basha i Kelany, 2001; Kim et al., 2000; Tsolakis et al., 2002; Martinez-Villar et al., 2005), prebacivanja na netretiranu površinu (Dimetry et al., 2008) ili izlaganja rezidualnom delovanju biopesticida (Sundaram i Sloane, 1995; Mansour et al., 1997; Mironova i Khorkhordin, 1997; Basha i Kelany, 2001; Tsolakis et al., 2002). Redukciju fekunditeta *T. urticae* uzrokovanu delovanjem spinosada Villanueva i Walgenbach (2006) zabeležili su nakon izlaganja ženki reziduama, a Ismail et al. (2007) nakon direktnog tretiranja ženki. Fekunditet redukuje i tretiranje ženki komercijalnim preparatima (Duso et al., 2008) i eksperimentalnim formulacijama (Shi i Feng, 2009) konidija *B. bassiana*.

Nasuprot redukciji, kao mogući ishod subletalnog delovanja akaricida javlja se stimulacija. Povećanje fekunditeta/fertiliteta uzrokovano izlaganjem tetrahidra insekticidima i akaricidima je poznat fenomen, zabeležen kod organofosfata (Maggi i Leigh, 1983; Jones i Parella, 1984), piretroida (Iftner i Hall, 1984; Jones i Parella, 1984; Cordeiro et al. 2013), neonicotinoida (James i Price, 2002; Szczepaniec et al., 2011; Barati i Hejazi, 2015), klofentezina (Marčić, 2003), abamektina (He et al., 2011). U toksikologiji artropoda se za ovaj biološki fenomen tradicionalno koristi pojam *hormoligoza*, koji je Luckey (1968) u svom uticajnom radu definisao kao stimulativni efekat malih količina stresnog agensa na organizam koji se nalazi u suboptimalnim uslovima. Širokom korišćenju ovog pojma doprinelo je zanemarivanje činjenice da njegova definicija podrazumeva suboptimalne uslove tj. da se organizam već nalazi pod stresom izazvanim delovanjem nekog drugog faktora ili agensa, kao što su nepovoljna temperatura ili nedovoljna ishrana (Cutler, 2013; Guedes i Cutler, 2014). Pored ovog, u literaturi iz oblasti primenjene entomologije i akarologije sreće se i pojam *hormeza*, kojioznačava bifazni odnos doza-odgovor gde niske doze stresnih agenasa (pesticida) deluju stimulativno, dok visoke doze deluju inhibitorno na organizme. Za životne parametre kao što je fekunditet, grafički prikazan hormetički odgovor ima oblik β -krive (obrnut U-oblik). Pored ovog osnovnog kvalitativnog svojstva, hormetički odnos doza-odgovor karakterišu i kvantitativna svojstva, koja se odnose na magnitudu stimulacije i raspon stimulativnih doza. Iako je kao pojam hronološki starija od hormoligoze (prvi put se pominje

u radu objavljenom 1943. godine), hormeza je tek u novije vreme šire prihvaćena u toksikologiji (Calabrese i Baldwin, 2003; Calabrese 2005). Hormetički model doza-odgovor primenjuje se i na primere stimulativnih efekata pesticida na insekte i grinje, s tim da se u nekim radovima hormeza i hormoligoza pogrešno posmatraju kao sinonimi, iako iz njihovih definicija proizilazi da je hormoligoza je poseban slučaj hormeze kod organizma koji se već nalazi pod stresom (Cutler, 2013; Guedes i Cutler, 2014).

Analizirajući ograničenja konvencionalnog biotesta toksičnosti, Robertson i Worner (1990) ukazale su na potrebu da se efekti pesticida ocenjuju na nivou populacije, a ne na nivou jedinke. Populaciona stopa rasta je u ekološkom smislu značajnija mera uticaja toksikanta u odnosu na pojedinačne životne parametre, jer integriše potencijalno kompleksne odnose među njima (Forbes i Calow, 1999, 2002). Jedan od najšire prihvaćenih načina za procenu populacionog odgovora na pesticide je konstruisanje *tabela života* s podacima o preživljavanju i produkciji ženskog potomstva (fertilitetu) ženki preživelih izlaganje, na osnovu kojih se izračunava **prirodna stopa rasta populacije** (r_m), parametar preuzet iz demografije i adaptiran za primenu na populacije insekata i drugih artropoda (Birch, 1948; Carey, 1993; Stark i Banks, 2003). Prirodnu stopa rasta, koja je indikator potencijala populacije da iskoristi postojeće uslove sredine, određuju pojedinačni parametri životne istorije, među kojima su najznačajniji dužina juvenilnog razvića i fertilitet. Što je starost ženki u vreme početka reprodukcije manja tj. što je juvenilno razviće kraće, to je vrednost r_m veća; s druge strane, visina fertiliteta u početnoj fazi reprodukcije u velikoj meri određuje visinu prirodne stope rasta populacije (Birch, 1948; Carey, 1993). Demografsko-toksikološki pristup sve više se primenjuje i za evaluaciju subletalnih efekata akaricida i insekticida na *T. urticae* i druge tetranihide (Marčić, 2003, 2005, 2007; Li et al., 2006; He et al., 2011; Cordeiro et al., 2013; Barati i Hejazi, 2015).

Jedan broj radova posvećenih uticaju akaricida na populacioni rast tetranihida (Kim et al., 2006; Stavriniades i Mills, 2009; Marčić et al. 2010, 2012) zasniva se proceni vrednosti **trenutne stope rasta** (r_t). Ovaj alternativni pristup evaluaciji efekata na nivou populacije ne zahteva konstruisanje tablica života niti toliki utrošak rada i vremena kao demografsko-toksikološki biotest, već se zasniva na cenzus podacima o broju živih jedinki na početku i na kraju izabranog vremenskog intervala (Stark i Banks, 2003).

O efektima biopesticida na populacioni rast *T. urticae* ima malo podataka. Flores et al. (2000) ispitivali su uticaj tretiranja ženki subletalnim koncentracijama abamektina na demografske parametre F_1 generacije. Promene demografskih parametara proučavane su i u uslovima kontinuiranog izlaganja ženki delovanju azadirahtina (Martinez-Villar et al., 2005),

odnosno nakon tretiranja larvi eksperimentalnom formulacijom konidija *B. bassiana* (Seyed-Talebi et al., 2012). Alternativni pristup populacionoj toksikologiji koristili su Stark et al. (1997) koji su ispitivali efekte izlaganja ženki delovanju azadirachtina u periodu maksimalne reprodukcije na trenutnu stopu rasta populacije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Test organizam

Laboratorijska populacija obične grinje paučinara (*Tetranychus urticae* Koch) potiče od jedinki prikupljenih sa ruderalne korovske flore na periferiji Beograda. Od marta 2004. godine populacija se gaji na biljkama pasulja (*Phaseolus vulgaris* L, sorta „Biser“) u uslovima dugog dana (fotoperiod 16h/8h svetlost/mrak; temperatura 25-30°C). Za potrebe izvođenja biotestova gajene su razvojno i starosno sinhronizovane kulture grinja iz jaja koja su položile mlađe odrasle ženke uzimane iz populacije i nanošene na cele primarne listove pasulja postavljene adaksijalnom stranom na navlaženu pamučnu vatu u Petri sudove, gde su ostavljane 24 h da polažu jaja.

3.2. Biopesticidi

U oglecima su korišćeni sledeći komercijalni preparati biopesticida:

1) **Kingbo** (proizvođač Beijing KingBo Biotech, Kina; batch no. 20100512); koncentrovani rastvor; aktivna materija: **oksimatrin**; sadržaj: 0,2%. Oksimatrin je alkaloid iz grupe hinolizidina, sekundarni metabolit biljke *Sophora flavescens* Ait. (Fabaceae). Preparat sadrži i **psoralen** (0,4%), furanokumarin, sekundarni metabolit biljaka iz familija Rutaceae, Apiaceae, Moraceae, Phabaceae, koji ima ulogu prirodnog regulatora;

2) **NeemAzal T/S** (proizvođač Trifolio-M GmbH, Nemačka), koncentrat za emulziju; aktivna materija: **azadirachtin-A**; sadržaj: 1% (10 g/l). Azadirachtin je triterpenoid koji se dobija iz semena biljke *Azadirachta indica* A. Jus. (Meliaceae). Preparat je formulacija NeemAzal-a, koncentrovanog ekstrakta koji sadrži 34% azadirachtina-A i oko 20% ostalih izomera i iz kojeg je odstranjeno ulje iz semena;

3) **Laser 240-SC** (proizvođač Dow AgroSciences, Austrija); koncentrovana suspenzija; aktivna materija: **spinosad**; sadržaj 240 g/l. Spinosad je mešavina spinosina A i D, proizvoda fermentacije zemljišne aktinomicete *Saccharopolyspora spinosa*;

4) **Naturalis-L** (proizvođač CBC-Biogard, Italija; batch no. 15001), koncentrovana suspenzija; aktivna materija: spore entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, soj ATCC 74040; sadržaj: $2,3 \times 10^7$ konidiospora/ml (7,16 % w/w). Preparat je suspenzija konidiospora u ulju soje.

3.3. Biotestovi

Svi biotestovi su izvedeni na temperaturi $27 \pm 2^\circ\text{C}$ i relativnoj vlažnosti vazduha 50-70% uz fotoperiod 16h/8h. Biopesticidi su aplicirani razblaženi u destilovanoj vodi, prskanjem celih primarnih listova ili kružnih isečaka primarnih listova pasulja (prečnika 30 mm) postavljenih adaksijalno na navlaženu pamučnu vatu u Petri sudove. Aplikacija preparata obavljena je pomoću aparata Potter Precision Spray Tower (Burkard Scientific, Velika Britanija), prskanjem 2 ml tečnosti pod pritiskom od 100 kPa, čime se formira vodeni depozit od $2,7 \pm 0,2 \text{ mg/cm}^2$.

3.3.1. Biotest toksičnosti za životne stadijume

Toksičnost biopesticida za različite životne stadijume ocenjena je izvođenjem pet sukcesivnih biotestova, u kojima su jaja, juvenilni stadijumi (larve, protonimfe, ženke deutonimfe) ili odrasle preovipozicione ženke tretirane serijom simetrično raspoređenih koncentracija (najmanje 6 koncentracija) u rasponu koji pokriva 10-90% smrtnosti, određenom na osnovu rezultata preliminarnih testiranja. Kontrolne jedinke tretirane su destilovanom vodom. Biotestovi sa jajima izvedeni su u 4-8 ponavljanja na celim primarnim listovima. Po tri ovipozicione ženke po listu postavljene su da polažu jaja ne duže od 24 h, nakon čega su uklonjene a položena jaja (15-30 po listu) tretirana biopesticidom. Biotestovi sa ostalim stadijumima izvedeni su u 4-5 ponavljanja na kružnim lisnim isečcima, na koje je postavljeno po 15-20 jedinki i odmah tretirano biopesticidom. Smrtnost je utvrđivana kao razlika između broja tretiranih jedinki i broja jedinki dospelih u stadijum adulta (biotestovi sa jajima i juvenilnim stadijumima) ili broja živih ženki na kraju izabranog vremenskog intervala od tretiranja (biotest sa preovipozicionim ženkama). Imajući u vidu rezultate preliminarnih testiranja efekata biopestida na bazi azadirachtina i *B. bassiana* na preovipozicione ženke, u ogledima sa ovim biopesticidima utvrđivan je i broj „run-off“ (u daljem tekstu: RO) jedinki tj. ženki pronađenih u navlaženoj vati koja okružuje tretiranu lisnu površinu. „Run-off“ efekat (u daljem tekstu: RO-efekat) izračunat je kao procenat RO-ženki od ukupnog broja tretiranih preovipozicionih ženki.

Podaci *koncentracija-smrtnost* obrađeni su postupkom probit-analize (Finney, 1971) pomoću softvera Polo Plus (LeOra Software, Berkeley, USA) kojim se izračunavaju letalne koncentracije (LC_{50} , LC_{90}) i nagib regresione krive (Robertson et al., 2007). U biotestovima sa pre-ovipozicionim ženkama u kojima je zabeležen RO-efekat, probit-analizom obrađeni su podaci *koncentracija-biološki odgovor*, gde je biološki odgovor zbir uginulih i RO-ženki

(Fisher i Wrench, 1986; Knight et al., 1990; Blümel i Hausdorf, 2002) i *koncentracija-RO-efekat* (Penman et al., 1986; Bowie et al., 2001) i izračunate vrednosti efektivnih koncentracija (EC₅₀, EC₉₀).

Za međusobna poređenja izračunatih LC/EC vrednosti korišćen je *test odnosa letalnih doza*: ukoliko 95% interval poverenja odnosa između dve LC vrednosti uključuje 1, smatra se da se ove vrednosti ne razlikuju statistički značajno (Robertson et al., 2007).

3.3.2. Biotest repelentnosti i deterentnosti

Repelentnost i ovipoziciona deterentnost biopesticida ocenjena je izvođenjem biotesta sa mogućnošću izbora („two choice bioassay“). Celi primarni listovi pasulja, čija je jedna polovina zaštićena postavljanjem plastične pločice duž centralnog nerva tretirani su serijom koncentracija biopesticida (Tabela 1) počevši od najviše koncentracije preporučene za primenu (Kingbo, azadirahatin), odnosno serijom koncentracija koje uzrokuju biološki odgovor u rasponu 0-100% (Naturalis-L). Pošto je preliminarni biotest pokazao da spinosad ne izaziva značajnu repelentnost, ovaj biopesticid je izostavljen. Nakon uklanjanja pločice i sušenja depozita, na centralni lisni nerv postavljeno je 15-20 ženki pri kraju preovipozicionog perioda. Žive ženke, uginule ženke i položena jaja brojani su odvojeno na nezaštićenoj (tretiranoj) i na zaštićenoj (netretiranoj) polovini lista 24, 48 i 72 h od postavljanja ženki na list. Značajnost razlika srednjih vrednosti dnevnih i kumulativnih podataka o repelentnosti i deterentnosti utvrđivana je pomoću *t*-testa ($P \leq 0,05$).

Tabela 1. Koncentracije biopesticida korišćene u biotestovima repelentnosti i ovipozicione deterentnosti

Biopesticidi	Koncentracije
Kingbo (µl/l)*	2000; 1000; 500; 200; 100; 50
azadirahatin (mg/l)	50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56
Naturalis-L (ml/l)*	7; 4,9; 3,43; 2,40; 1,68; 1,18; 0,82

* koncentracija preparata

Indeks repelentnosti/deterentnosti (%) izračunat je pomoću formule

$$\frac{C - T}{C + T} \times 100$$

gde je *C* kumulativan broj ženki ili položenih jaja na netretiranoj polovini, a *T* kumulativan broj ženki ili položenih jaja na tretiranoj polovini lista (Sundaram i Sloane, 1995; Takakura, 2009; Yang et al., 2010).

U oglecima sa biopestidima na bazi azadirahatina i *B. bassiana* utvrđivan je i broj RO ženki i izračunat RO efekat (%) u odnosu na početni broj ženki.

3.3.3. Biotest efekata na životne parametre i populacioni rast

Efekti biopesticida na parametre životne istorije i populacioni rast ocenjeni su izvođenjem dve varijante biotesta u kojima su posmatrani vitalnost i reprodukcija ženki koje su preživjele tretiranje u stadijumu jaja starosti do 24 h (prva varijanta biotesta) ili kao preovipozicione ženke (druga varijanta biotesta). Biotestovi su izvedeni u četiri ponavljanja. Koncentracije biopesticida (Tabela 2) izabrane su na osnovu rezultata dobijenih u prethodno izvedenim biotestovima toksičnosti za životne stadijume. Za tretiranje jaja srednja od tri koncentracije izabrana je tako da se nalazi unutar 95% intervala poverenja za LC_{50} vrednosti izračunate nakon tretiranja ovog stadijuma, dok je jedna od ostale dve koncentracije dvostruko manja a druga dvostruko veća (u biotestu sa preparatom Kingbo viša koncentracija je isključena zbog nedovoljnog broja jedinki koje su dostigle stadijum odraslih ženki). Za tretiranje preovipozicionih ženki izabrane su iste koncentracije kao i za tretiranje jaja; ove koncentracije su u biotestu toksičnosti posle 24 h (što približno odgovara trajanju perioda preovipozicije) uzrokovale akaricidni efekat $\leq 30\%$. Izuzetak je preparat azadirahatin, gde su u izabrane nekoliko puta veće koncentracije, koje su u biotestu toksičnosti uzrokovale sličan akaricidni efekat.

Tabela 2. Koncentracije biopesticida korišćene u biotestu efekata na životne parametre i populacioni rast (E = jaja starosti 24 h; Afp = preovipozicione ženke)

Biopesticidi	Tretirani stadijumi	
	E	Afp
Kingbo ($\mu\text{l/l}$)*	100	100
	50	50
	25	25
azadirahatin (mg/l)	15	70
	7,5	35
	3,75	17,5
spinosad (mg/l)	240	240
	120	120
	60	60
Naturalis-L (ml/l)*	6	6
	3	3
	1,5	1,5

* koncentracije preparata

U prvoj varijanti mlade ovipozicione ženke postavljene su na primarne listove pasulja gde su polagale jaja 24 h, nakon čega su uklonjene a položena jaja prebrojana i tretirana. Po ponavljanju je tretirano 50-250 jaja, zavisno od koncentracije. Juvenilno razviće ispiljenih jedinki oba pola odvijalo se na tretiranoj lisnoj površini. Preživele odrasle ženke pri kraju preovipozicionog perioda prebačene su na netretirane lisne isečke. U drugoj varijanti, mlade preovipozicione ženke tretirane su na lisnim isečcima (10-15 po isečku, 30-300 po ponavljanju, zavisno od koncentracije), a preživele jedinke su nakon 24 h prebačene na netretirane lisne isečke. U obe varijante, kontrolne jedinke (30-50 po ponavljanju) tretirane su destilovanom vodom. Za prebacivanje na netretirane isečke među preživelim jedinkama u tretmanima i kontroli odabrano je 20 po ponavljanju (5 ženki po isečku, 4 isečka po Petri sudu).

Tokom narednih sedam dana ženke su prebacivane dnevno na nove isečke, pri čemu je utvrđivan broj položenih jaja i broj živih ženki. Na osnovu ovih podataka izračunati su **bruto fekunditet** (broj položenih jaja dnevno po živoj ženki na sredini intervala od 24h) i **neto fekunditet** (bruto fekunditet \times stopa preživljavanja ženki) uz pretpostavku da se sva uginuća ženki dešavaju na sredini intervala od 24 h (Carey, 1993). **Stopa preživljavanja ženki** izračunata je pomoću formule: $(S_a/N + S_b/N) \times 0,5$, gde je N broj tretiranih ženki, S_a broj živih ženki na početku, a S_b broj živih ženki na kraju svakog dana. Izračunata je i prosečna **dužina života ženki** nakon prebacivanja na netretirane lisne isečke. Na osnovu podataka o broju živih jedinki na početku i na kraju sedmodnevne reprodukcije na netretiranim isečcima izračunata je **trenutna stopa populacionog rasta** (r_i) primenom formule:

$$r_i = \frac{\ln \frac{N_f}{N_0}}{\Delta t} \times 100$$

gde je N_0 početni broj jedinki (20 ženki po ponavljanju), N_f krajnji broj jedinki (broj preživelih ženki, broj položenih jaja i broj ispiljenih jedinki na kraju sedmog dana), Δt broj dana od početka do kraja testa (sedam dana). Pozitivna r_i vrednost ukazuje na rast populacije, negativna r_i vrednost ukazuje na populaciju u opadanju, a ako je $r_i = 0$ populacija je stabilna (Stark et al., 1997; Stark i Banks, 2003).

Značajnost razlika srednjih vrednosti podataka o fekunditetu, dužini života ženki i trenutnoj stopi rasta utvrđivana je jednofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA; Fisher LSD test, $\alpha=0,05$) pomoću softvera Statsoft Statistica 7.0. Pre analize izvršena je \sqrt{x} transformacija podataka.

3.3.4. Demografsko-toksikološki biotest

Efekti biopesticida na demografske parametre ocenjeni su izvođenjem osam sukcesivnih biotestova u kojima su konstruisane *tabele života* ženki preživelih tretiranje u stadijumu jaja starosti do 24 h (prva varijanta biotesta) ili kao preovipozicione ženke (druga varijanta biotesta). Za tretiranje su uzete srednje koncentracije iz prethodnog biotesta (Tabela 3). U prvoj varijanti, jaja starosti do 24 h položena na cele listove (10 listova \times 25-30 jaja po listu) tretirana su izabranom koncentracijom biopesticida. Kontrola (4 lista \times 25 jaja po listu) je tretirana destilovanom vodom. Juvenilno razviće ispiljenih jedinki oba pola odvijalo se na tretiranoj lisnoj površini. U vreme kada su preživele odrasle ženke bile pri kraju preovipozicionog perioda, kohorte sa 40 jedinki u kontroli i tretmanu prebačene su na netretirane lisne isečke (1 ženka po isečku). U drugoj varijanti jaja starosti do 24 h ostavljena su na listovima gde se odvijalo juvenilno razviće ispiljenih jedinki. Za tretiranje su uzimane mlade preovipozicione ženke koje su tretirane na lisnim isečcima (10 isečaka \times 15-20 ženki po isečku). Kontrolne jedinke (3 isečka \times 20 ženki po isečku) tretirane su destilovanom vodom. Nakon 24 h, kohorte sa 40 preživelih jedinki u tretmanu i kontroli prebačene su na netretirane lisne isečke (1 ženka po isečku). U obe varijante, ženke su prebacivane dnevno na nove isečke do kraja života poslednje ženke u kohorti, pri čemu je utvrđivan broj položenih jaja i živih ženki; desetog dana nakon završene ovipozicije, utvrđivan je i broj odraslih ženki nastalih iz položenih jaja.

Tabela 3. Koncentracije biopesticida u demografsko-toksikološkim biotestovima (E = jaja starosti 24 h; Afp = preovipozicione ženke)

Biopesticidi	Tretirani stadijumi	
	E	Afp
Kingbo ($\mu\text{l/l}$)*	50	50
azadirachtin (mg/l)	7,5	35
spinosad (mg/l)	120	120
Naturalis-L (ml/l)*	3	3

* koncentracije preparata

Na osnovu podataka o trajanju juvenilnog razvića, preživljavanju i reprodukciji ženki izračunati su *starosno-specifično preživljavanje* (l_x = proporcija preživelih ženki u kohorti starosti x dana) i *starosno-specifični fertilitet* (m_x = broj ženskog potomstva po ženki u

kohorti starosti x dana), uz pretpostavku da u svim kohortama l_x u vreme prve reprodukcije iznosi 1,00 (tj. smrtnost koju je uzrokovao pesticid nije uključena u izračunavanje).

Od starosno-specifičnih podataka formirane su tabele života ženki u kohortama i izračunate *subbruto stopa reprodukcije* (GRR) i *neto stopa reprodukcije* (R_0) primenom formula:

$$GRR = \sum_{x=\alpha}^{\beta} m_x$$

$$R_0 = \sum_{x=\alpha}^{\beta} l_x m_x$$

gde α označava starost ženki u vreme prve reprodukcije, a β starost ženki u vreme poslednje reprodukcije. Neto stopa reprodukcije predstavlja očekivanu životnu produkciju ženskog potomstva po ženki u kohorti, odnosno faktor umnožavanja populacije za vreme jedne generacije (Birch, 1948; Carey, 1982, 1993). Najznačajniji demografski parametar, *prirodna stopa rasta populacije* (r_m) izračunata je iterativnim postupkom pomoću Ojler-Lotkine jednačine:

$$\sum_{x=0}^{\omega} e^{-r_m(x+1)} l_x m_x = 1$$

gde 0 označava početak, a ω kraj životnog ciklusa. Prirodna stopa rasta definisana je kao *per capita* stopa rasta u jedinici vremena zatvorene populacije sa nepromenljivim uzrasno-specifičnim stopama fertiliteta i smrtnosti koja je dostigla stabilnu uzrasnu strukturu i čiji resursi nisu ograničeni; izražava se brojem ženskog potomstva po ženki dnevno (Birch, 1948; Carey, 1993; Neal, 2004). *Konačna stopa rasta* (λ), koja predstavlja faktor umnožavanja populacije u jedinici vremena, izračunata je primenom formule:

$$\lambda = e^{r_m}$$

Srednje vreme generacije (T), koje predstavlja broj dana potreban da se populacija poveća R_0 -puta, izračunato je po formuli:

$$T = \frac{\ln R_0}{r_m}$$

Standardne greške srednjih vrednosti demografskih parametara procenjene su primenom *bootstrap* postupka (Meyer et al., 1986; Efron i Tibshirani, 1993; Huang i Chi, 2012) sa 100000 *bootstrap* ponavljanja, a razlike između tretmana i kontrole upoređene su primenom

parnog *bootstrap* testa zasnovanog na intervalu poverenja razlike, pomoću softvera TWSEX MSChart (Chi, 2015) uz pretpostavku da su sve ženke u jednoj kohorti u isto vreme dostigle stadijum adulta.

4. REZULTATI

4.1. Akaricidni i subletalni efekti biopesticida Kingbo

4.1.1. Toksičnost za životne stadijume

Biopesticid Kingbo pokazao je različite nivoe akutne toksičnosti za životne stadijume *T. urticae* (Tabela 4). Najveću osetljivost ispoljile su larve, dok je nešto manja osetljivost zabeležena kod protonimfi i ženki deutonimfi, čije su LC₅₀ i LC₉₀ vrednosti bile značajno više u poređenju sa larvama. S druge strane, višestruko manja toksičnost zabeležena je nakon tretiranja jaja, gde je akaricidni efekat nastao usled rezidualnog delovanja biopesticida na larve koje su se ispilile iz tretiranih jaja, a ne kao rezultat direktnog ovicidnog delovanja (procenat neispiljenih jaja u tretmanu iznosio je 0,5-2,9%, a u kontroli 2,1%). Ovaj rezidualni efekat bio je najslabiji zabeležen akaricidni efekat, zajedno sa efektom ostvarenim nakon tretiranja preovipozicionih ženki biopesticidom. Najviše dobijene LC₉₀ vrednosti bile su daleko ispod preporučene koncentracije za primenu biopesticida Kingbo (2 ml/l).

Tabela 4. Parametri toksičnosti biopesticida Kingbo (µl/l) za *T. urticae* nakon tretiranja različitih životnih stadijuma (E = jaja; L = larve; PN = protonimfe, DNf = deutonimfe ženke; Afp = preovipozicione ženke)

Životni stadijumi	n	LC ₅₀ (µl/l) (95% CL)	LC ₉₀ (µl/l) (95% CL)	b(± SE)	χ ²	df
E	1287	55,49 d (52,14 - 59,41)	138,73 c (118,72 - 171,65)	3,22 (± 0,27)	1,21	4
L	675	6,88 a (6,43 - 7,32)	12,12 a (11,14 - 13,45)	5,21 (± 0,39)	4,74	6
PN	675	13,03 c (11,87 - 14,20)	26,08 b (22,52 - 32,75)	4,25 (± 0,53)	3,27	6
DNf	640	8,80 b (7,53 - 9,97)	20,44 b (17,12 - 27,06)	3,50 (± 0,36)	5,21	5
Afp	640	52,68 d (43,62 - 63,68)	117,41 c (85,25 - 293,79)	3,68 (± 0,66)	6,21	5

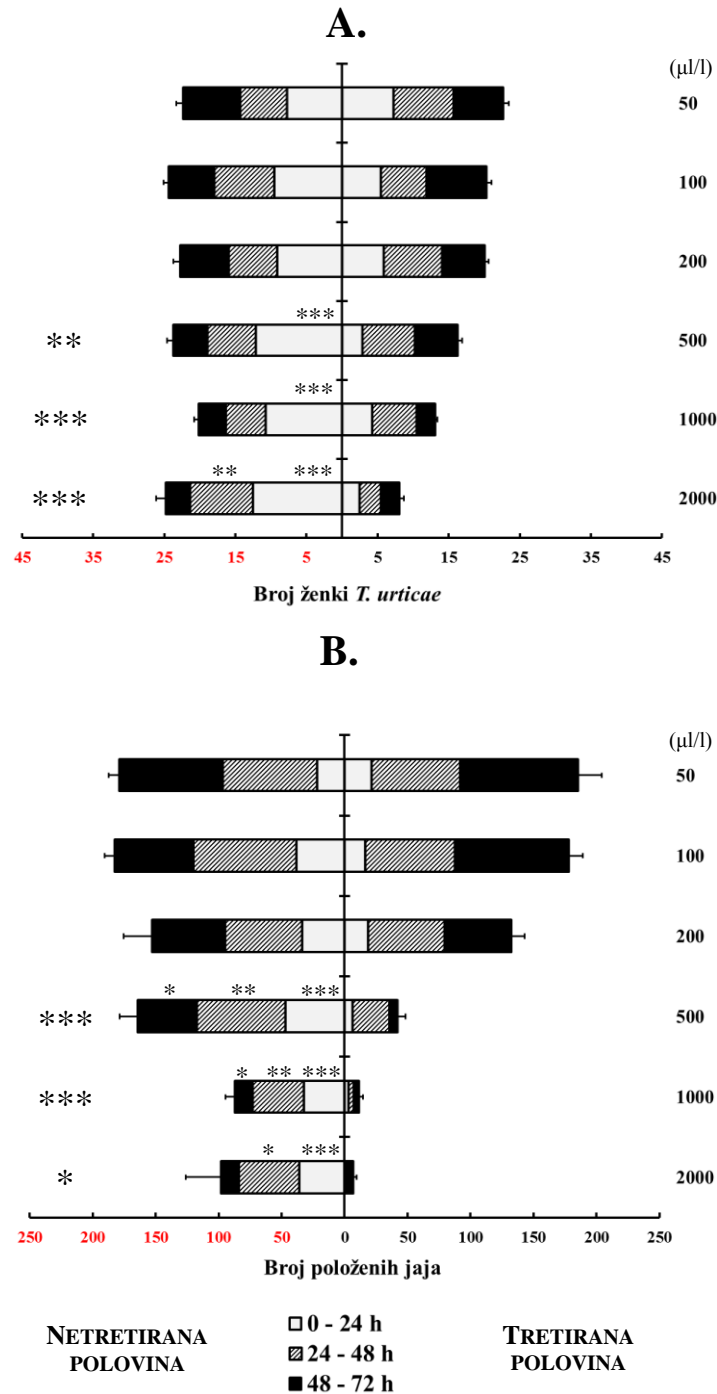
LC vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (test odnosa letalnih doza, P=0,05)

(E, L, PN, DNf = smrtnost utvrđivana na osnovu broja tretiranih jedinki dospelih u stadijum adulta; Afp = smrtnost utvrđivana na osnovu broja živih ženki 48 h posle tretiranja)

n = broj tretiranih jedinki
CL = interval poverenja
b = nagib regresione krive
df = stepeni slobode

4.1.2. Repelentni i deterrentni efekti

Biopesticid Kingbo uticao je značajno na ponašanje ženki *T. urticae* u biotestu sa mogućnošću izbora između tretirane i netretirane polovine lista. Repelentni efekat biopesticida prikazan je na slici 1A. Efekat je bio najjači nakon 24 h, kada je statistički značajnomanji broj ženki zabeležen na polovinama listova tretiranim koncentracijama 2000,



Sl. 1. Repelentni (A) i deterrentni (B) efekti biopesticida Kingbo ($\mu\text{l/l}$) na ženke *T. urticae* (dnevni i kumulativni broj ženki/položenih jaja na netretiranoj ili tretiranoj polovini lista 0-72 h od početka izlaganja, $M_s \pm SE$; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, t-test)

1000 i 500 $\mu\text{l/l}$. Nakon 48 h statistički značajan repelentni efekat uzrokovala je samo najviša koncentracija biopesticida, dok posle 72 h ni u jednoj varijanti tretmana nisu zabeležene značajne razlike između broja ženki na tretiranoj i netretiranoj polovini lista. Zahvaljujući efektu uzrokovanom prvog dana, kumulativna repelentnost takođe je bila statistički značajna u varijantama tretmana sa tri najviše koncentracije (Sl. 1A). Kumulativni indeksi repelentnosti (%) iznosili su: $53,1 \pm 11,6$ (2000 $\mu\text{l/l}$); $21,8 \pm 4,5$ (1000 $\mu\text{l/l}$); $18,8 \pm 4,5$ (500 $\mu\text{l/l}$); $5,6 \pm 9,3$ (200 $\mu\text{l/l}$); $9,7 \pm 10,8$ (100 $\mu\text{l/l}$); $-0,4 \pm 13,0$ (50 $\mu\text{l/l}$).

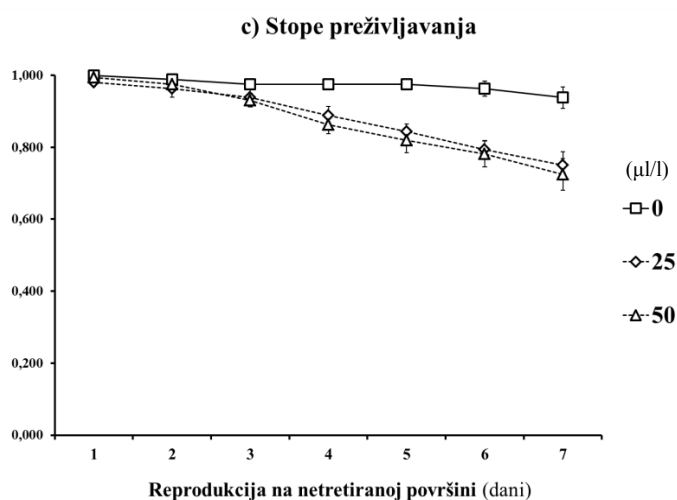
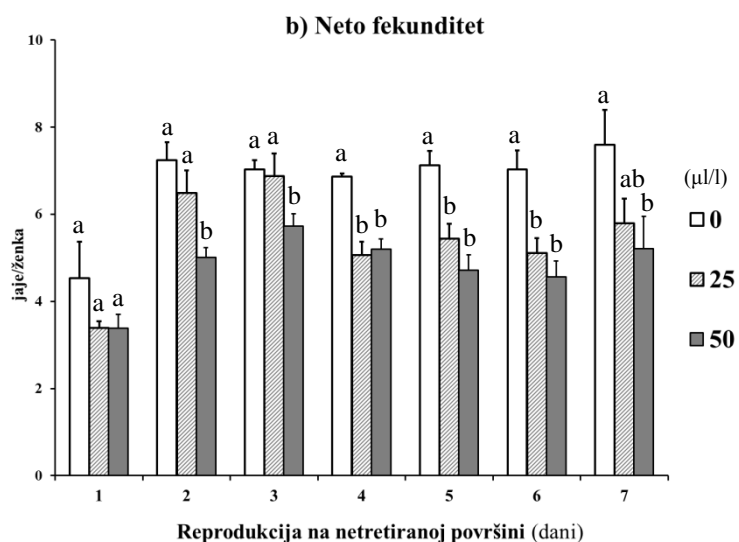
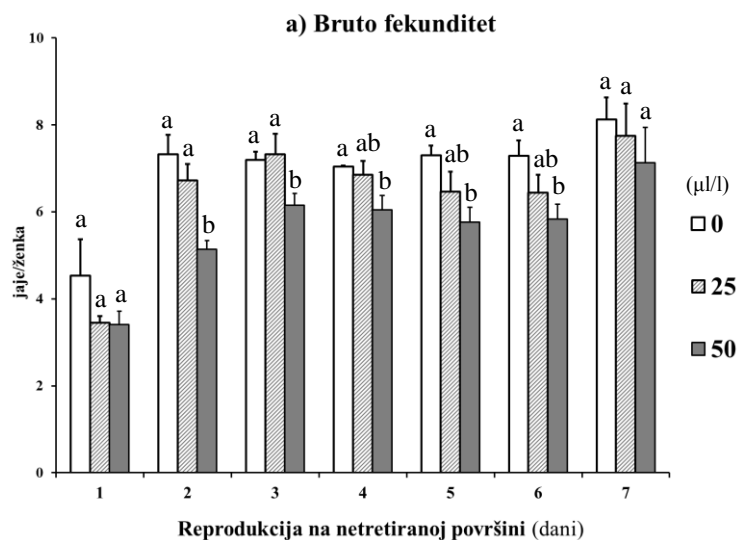
Deterentni efekat na ovipoziciju ženki *T. urticae* bio je izraženiji od repelentnog efekta (Sl. 1B). Ženke su položile statistički značajno manji broj jaja na polovinama listova tretiranim koncentracijama 2000, 1000 i 500 $\mu\text{l/l}$ ne samo prvog, već i drugog i trećeg dana ovipozicije (izuzetak je treći dan ovipozicije u tretmanu najvišom koncentracijom: ovde je na netretiranoj površini prosečno položeno 14 jaja a na tretiranoj 3,4, ali se ove dve vrednosti nisu značajno razlikovale usled velike varijanse podataka). Slično kao kod repelentnosti, kumulativna deterentnost bila je statistički značajna u varijantama tretmana sa tri najviše koncentracije. Kumulativni indeksi ovipozicione deterentnosti bili su veći od odgovarajućih indeksa repelentnosti i iznosili su (%): $89,2 \pm 3,7$ (2000 $\mu\text{l/l}$); $75,7 \pm 7,3$ (1000 $\mu\text{l/l}$); $59,2 \pm 3,9$ (500 $\mu\text{l/l}$); $5,8 \pm 5,9$ (200 $\mu\text{l/l}$); $1,5 \pm 4,0$ (100 $\mu\text{l/l}$) i $-0,9 \pm 6,0$ (50 $\mu\text{l/l}$).

Tri najviše koncentracije koje su izazvale značajne repelentne i deterentne efekte takođe su uzrokovale i visok procenat smrtnosti ženki, koja je nakon 72 h iznosila: $84,0 \pm 8,3$ (2000 $\mu\text{l/l}$); $78,7 \pm 2,5$ (1000 $\mu\text{l/l}$) i $60,0 \pm 4,7$ (500 $\mu\text{l/l}$). Ostale tri koncentracije uzrokovale su znatno niži procenat smrtnosti: $24,0 \pm 9,1$ (200 $\mu\text{l/l}$); $8,0 \pm 1,3$ (100 $\mu\text{l/l}$) i $4,0 \pm 1,6$ (50 $\mu\text{l/l}$).

4.1.3. Efekti na životne parametre i populacioni rast

Dnevne vrednosti fekunditeta ženki *T. urticae* preživelih tretiranje biopesticidom Kingbo u stadijumu jajeta i izloženost reziduama tokom juvenilnog razvića prikazane su na slici 2. Bruto fekunditet tretiranih ženki bio je niži u poređenju sa kontrolom (osim trećeg dana u tretmanu koncentracijom 25 $\mu\text{l/l}$), ali su statistički značajne razlike utvrđene samo između tretmana koncentracijom 50 $\mu\text{l/l}$ i kontrole u periodu od drugog do šestog dana reprodukcije. Maksimalna redukcija (29,9 %) zabeležena je drugog dana reprodukcije.

Razlike između dnevnih vrednosti neto fekunditeta u tretmanima i kontroli bile su izraženije: statistički značajno niži neto fekunditet ženki tretiranih višom koncentracijom zabeležen je od drugog do sedmog dana, a ženki tretiranih nižom koncentracijom četvrtog,



Sl. 2. Dnevne vrednosti bruto fekunditeta (a) i neto fekunditeta (b) ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje biopesticidom Kingbo ($\mu\text{l/l}$) u stadijumu jajeta ($M \pm SE$; vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, ANOVA, Fisher LSD test); (c) Stope preživljavanja ženki ($M \pm SE$)

petog i šestog dana reprodukcije. Maksimalna redukcija (35,1%) utvrđena je šestog dana reprodukcije. Stope preživljavanja ženki u tretmanima bile su niže u poređenju sa ženkama u kontroli, osim u prva dva dana reprodukcije (Sl. 2).

Slično dnevnim vrednostima, sedmodnevni fekunditet ženki preživelih tretiranje koncentracijom 50 µl/l bio je statistički značajno redukovan (bruto fekunditet 19,2%; neto fekunditet 28,7%) u poređenju sa kontrolom. Kod ženki u tretmanu koncentracijom 25 µl/l, odgovarajuće vrednosti bile su redukovane 7,8% i 17,3%, a statistički značajna redukcija utvrđena je samo za neto fekunditet (Tabela 5). U obe varijante zabeležena je izraženija redukcija dnevnog i ukupnog neto fekunditeta u odnosu na bruto fekunditet što je posledica umanjene vitalnosti ženki u tretmanu tj. nižih stopa preživljavanja. Dužina života ženki u tretmanu u poređenju sa kontrolom bila je redukovana za manje od 24 h, ali je ova redukcija ipak bila statistički značajna. Trenutna stopa rasta u tretmanu takođe je bila statistički značajno redukovana, iako za svega 5% (25 µl/l) i 9% (50 µl/l) (Tabela 5).

Tabela 5. Životni parametri i populacioni rast ($M \pm SE$) ženki *T. urticae* preživelih tretiranje biopesticidom Kingbo (µl/l) u stadijumu jajeta

µl/l	<i>GF</i>	<i>NF</i>	<i>L</i>	<i>r_i</i>
50	39,46 b (± 1,91)	33,80c (± 1,79)	6,07 b (± 0,14)	0,496 c (± 0,008)
25	45,01 a (± 1,76)	39,19 b (± 1,79)	6,17 b (± 0,14)	0,518 b (± 0,006)
0	48,82 a (± 1,66)	47,40 a (± 1,55)	6,81 a (± 0,10)	0,546 a (± 0,004)
<i>F_{2,9}</i>	7,47	15,55	9,54	16,93
<i>p</i>	< 0,05	< 0,001	< 0,05	< 0,001

Srednje vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (ANOVA, Fisher LSD, $\alpha=0.05$)

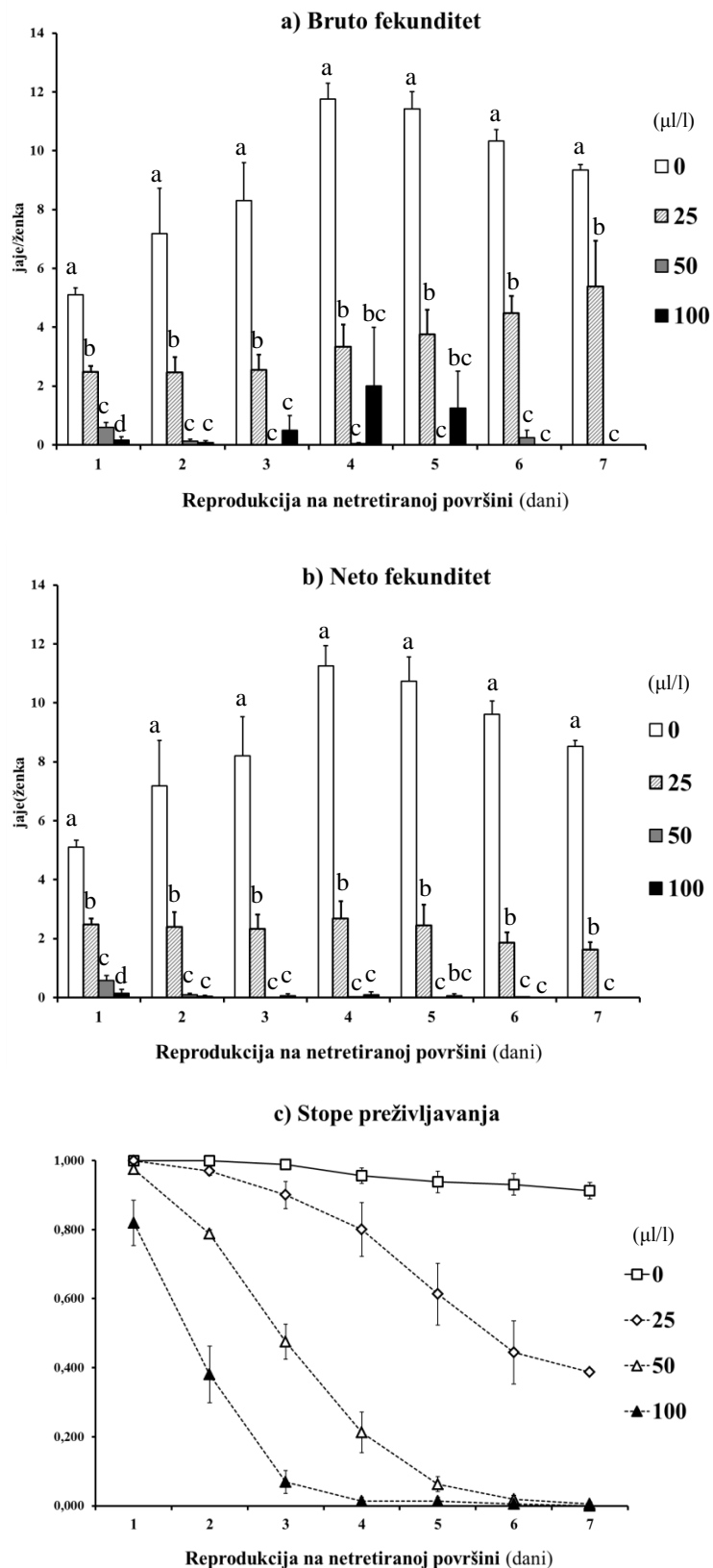
GF= bruto fekunditet (suma sedmodnevne reprodukcije)

NF= neto fekunditet (suma sedmodnevne reprodukcije)

L= dužina života ženki (dani)

r_i= trenutna stopa rasta populacije nakon sedmodnevne reprodukcije

Dnevne vrednosti fekunditeta ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje u periodu preovipozicije prikazane su na slici 3. Za razliku od ženki preživelih tretiranje u stadijumu jajeta, ovde su statistički značajne razlike između tretmana biopesticidom Kingbo i kontrole utvrđene od prvog dana reprodukcije do kraja posmatranog perioda, a i subletalni efekti su bili



Sl. 3. Dnevne vrednosti bruto fekunditeta (a) i neto fekunditeta (b) ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje biopesticidom Kingbo ($\mu\text{l/l}$) u periodu previpozicije ($M \pm SE$; vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, ANOVA, Fisher LSD test); (c) Stope preživljavanja ženki ($M \pm SE$)

znatno izraženiji. Takođe, stope preživljavanja ženki u tretmanima bile su znatno niže u poređenju sa ženkama u kontroli. Ženke preživele tretiranje koncentracijom 25 µl/l imale su 1,7-3,5 puta manji bruto fekunditet od ženki u kontroli, dok se bruto fekunditet ženki u tretmanima koncentracijama 50 µl/l i 100 µl/l kretao se u rasponu 0-17% u poređenju sa ženkama u kontroli.

Dnevne vrednosti neto fekunditeta ženki preživelih tretiranje bile su još niže u poređenju sa ženkama u kontroli: u tretmanu koncentracijom 25 µl/l neto fekunditet je bio 2-5,2 puta manji od kontrolnog, dok su maksimalne vrednosti neto fekunditeta u tretmanima koncentracijama 50 µl/l i 100 µl/l, zabeležene prvog dana reprodukcije, iznosile 11,2% i 3% u odnosu na odgovarajuće vrednosti u kontroli (Sl. 3).

Kao i kod dnevnog fekunditeta, vrednosti sedmodnevnog fekunditeta ženki preživelih tretiranje u periodu preovipozicije bile su statistički značajno niže u poređenju sa ženkama u kontroli. Zabeležen subletalni efekat bio je znatno snažniji nego u slučaju tretiranja u stadijumu jajeta: bruto fekunditet bio je redukovan u rasponu 61,4-98,4%, a neto fekunditet u rasponu 73,8-99,3% (Tabela 6).

Tabela 6. Životni parametri i populacioni rast ($M \pm SE$) ženki *T. urticae* preživelih tretiranje biopesticidom Kingbo (µl/l) u periodu preovipozicije

µl/l	<i>GF</i>	<i>NF</i>	<i>L</i>	<i>r_i</i>
100	3,97 c (± 3,94)	0,41c (± 0,38)	1,27 d (± 0,20)	-0,292 c (± 0,111)
50	1,01 c (± 0,26)	0,70 c (± 0,37)	2,49 c (± 0,13)	-0,110 c (± 0,054)
25	24,50 b (± 1,08)	15,86 b (± 2,44)	5,10 b (± 0,38)	0,381 b (± 0,026)
0	63,41 a (± 4,10)	60,62 a (± 4,73)	6,72 a (± 0,12)	0,579 a (± 0,011)
<i>F_{3,12}</i>	47,85	166,26	105,21	41,56
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Srednje vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (ANOVA, Fisher LSD, $\alpha=0.05$)

GF= bruto fekunditet (suma sedmodnevne reprodukcije)

NF= neto fekunditet (suma sedmodnevne reprodukcije)

L= dužina života ženki (dani)

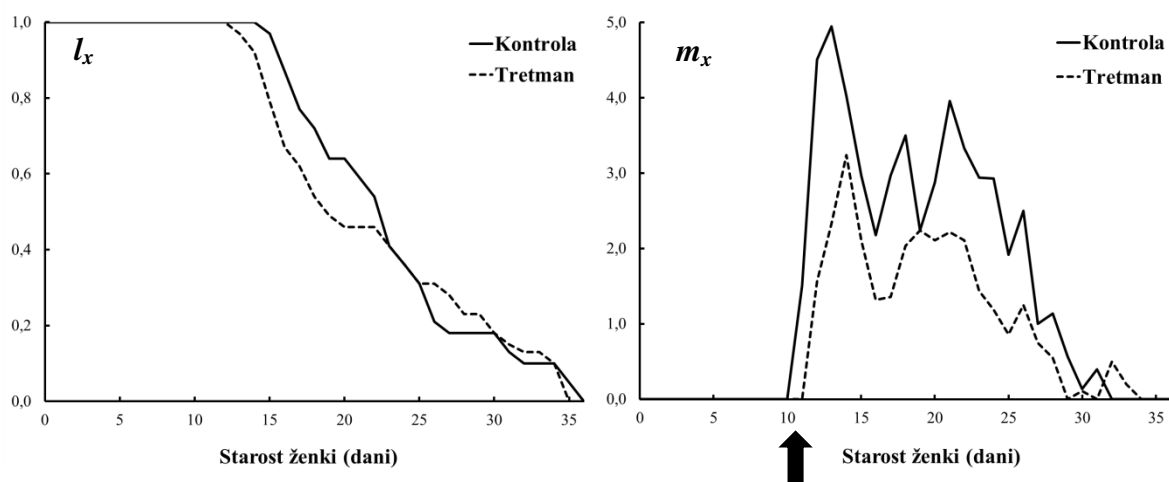
r_i= trenutna stopa rasta populacije nakon sedmodnevne reprodukcije

Dužina života ženki preživelih tretiranje takođe je znatno redukovana u poređenju sa kontrolom, posebno nakon tretiranja koncentracijama 50 µl/l (2,7 puta) i 100 µl/l (5,3 puta). Kao posledica redukcije fekunditeta i vitalnosti ženki, zabeležena je i redukcija *r_i* vrednosti

koja se kretala u rasponu od 34,2% (25 $\mu\text{l/l}$) do negativnog rasta, odnosno opadanja populacije u tretmanima koncentracijama 50 $\mu\text{l/l}$ i 100 $\mu\text{l/l}$. (Tabela 6).

4.1.4. Efekti na demografske parametre

Juvenilno razviće ženki *T. urticae* koje su preživjele tretiranje biopesticidom Kingbo u stadijumu jajeta trajalo je jedan dan duže, tako da su u stadijumu adulta dospjele jedanaestog a prvu reprodukciju ostvarile dvanaestog dana života, dan kasnije u odnosu na ženke u kontroli (Sl. 4).



Sl. 4. Starosno-specifično preživljavanje (l_x) i starosno-specifični fertilitet (m_x) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživjele tretiranje u stadijumu jajeta biopesticidom Kingbo (50 $\mu\text{l/l}$)

Tretiranje je redukovalo starosno-specifično preživljavanje tokom prve polovine života odraslih ženki, dok su se u drugoj polovini života ženke oporavile. Fertilitet ženki u tretmanu bio je redukovan u poređenju sa kontrolom tokom čitavog perioda reprodukcije, s tim da je u tretmanu poslednja ženka živela dva dana duže (Sl. 4).

Tabela 7. Demografski parametri ($M \pm SE$) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživjele tretiranje u stadijumu jajeta biopesticidom Kingbo (50 $\mu\text{l/l}$)

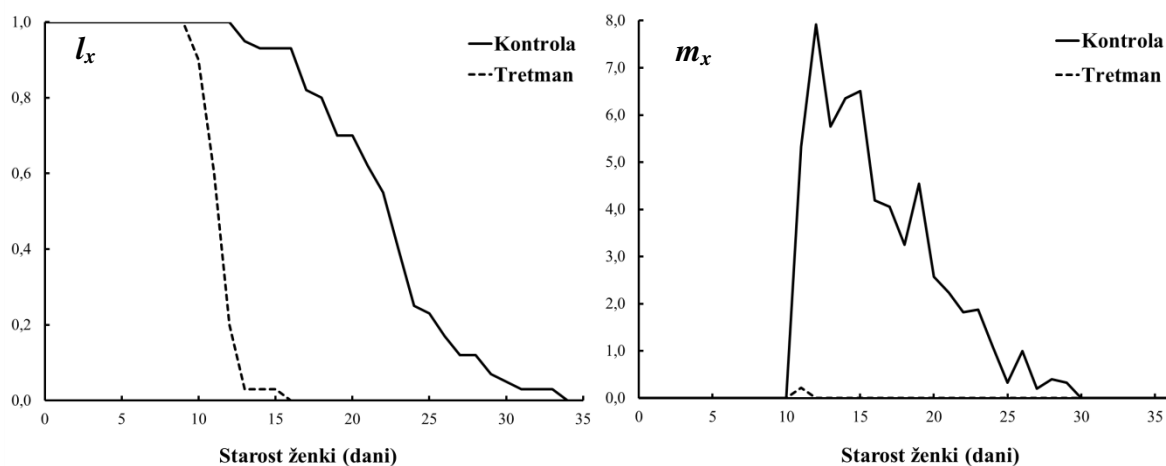
	<i>GRR</i>	<i>R₀</i>	<i>r_m</i>	λ	<i>T</i>
Kontrola	52,57_a ($\pm 4,02$)	35,92_a ($\pm 3,29$)	0,238_a ($\pm 0,004$)	1,269_a ($\pm 0,006$)	15,03_b ($\pm 0,23$)
Tretman	29,52_b ($\pm 3,82$)	18,82_b ($\pm 2,70$)	0,185_b ($\pm 0,008$)	1,203_b ($\pm 0,010$)	15,86_a ($\pm 0,32$)
<i>P</i>	0,00003	0,00007	0	0	0,03677

Srednje vrednosti demografski parametara označene različitim slovima razlikuju se značajno (parni *bootstrap* test, $B = 100000$)

GRR = bruto stopa reprodukcije; *R₀* = neto stopa reprodukcije; *r_m* = prirodna stopa rasta populacije; λ = konačna stopa rasta populacije; *T* = srednje vreme generacije

Kao posledica redukcije preživljavanja i fertiliteta, kao i usporavanja juvenilnog razvića, vrednosti demografskih parametara ženki u tretmanu razlikovale su se statistički značajno od odgovarajućih vrednosti u kontroli (Tabela 7). Bruto stopa reprodukcije redukovana je za 43,8% a neto stopa reprodukcije za 47,6%, dok su prirodna stopa rasta i konačna stopa rasta redukovane za 22,3% i 5,2%; s druge strane, srednje vreme generacije je produženo.

U poređenju sa subletalnim efektima zabeleženim nakon tretiranja u stadijumu jajeta, biopesticid Kingbo uticao je znatno snažnije na starosno-specifično preživljavanje i fertilitet ženki *T. urticae* tretiranih u preovipozicionom periodu i potom prebačenih na netretiranu površinu (Sl. 5). Posle dva dana bilo je 60% živih ženki, dan kasnije 20%, dok je četiri dana nakon prebacivanja na netretiranu površinu preostala samo jedna živa ženka; istovremeno, u kontroli je bilo živo 93% ženki. Reprodukција tretiranih ženki trajala je samo jedan dan, tokom kojeg je od 11 ženki koje su položile jaja osam ženki dalo žensko potomstvo (0,22 po ženki; u kontroli 5,33 po ženki). Nakon toga, preostale ženke više nisu pologale jaja.



Sl. 5. Starosno-specifično preživljavanje (l_x) i starosno-specifični fertilitet (m_x) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u periodu preovipozicije biopesticidom Kingbo (50 μ l/l)

Vrednosti demografskih parametara ženki u tretmanu biopesticidom Kingbo pokazuju efekat snažne redukcije preživljavanja i fertiliteta (Tabela 8). Bruto stopa reprodukcije i neto stopa reprodukcije redukovane su za preko 99%, dok vrednost prirodne stope rasta manja od nule i vrednost konačne stope rasta manja od jedinice ukazuju na opadanje populacije.

Tabela 8. Demografski parametri ($M \pm SE$) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživjele tretiranje u periodu previpozicije biopesticidom Kingbo (50 μ l/l)

	<i>GRR</i>	<i>R₀</i>	<i>r_m</i>	λ	<i>T</i>
Kontrola	59,78 a ($\pm 3,31$)	49,20 a ($\pm 3,38$)	0,279 a ($\pm 0,004$)	1,322a ($\pm 0,005$)	13,95a ($\pm 0,11$)
Tretman	0,22 b ($\pm 0,09$)	0,20 b ($\pm 0,08$)	-0,146 b ($\pm 0,042$)	0,864 b ($\pm 0,035$)	11,00b ($\pm 0,00$)
<i>P</i>	0	0	0	0	0

Srednje vrednosti demografskih parametara označene različitim slovima razlikuju se značajno (parni *bootstrap* test, $B = 100000$)

GRR = bruto stopa reprodukcije; *R₀* = neto stopa reprodukcije; *r_m* = prirodna stopa rasta populacije; λ = konačna stopa rasta populacije; *T* = srednje vreme generacije

4.2. Akaricidni i subletalni efekti azadirahtina

4.2.1. Toksičnost za životne stadijume

Parametri toksičnosti azadirahtina za *T. urticae* nakon tretiranja jaja i juvenilnih stadijuma prikazani su u tabeli 9. Azadirahtin je bio najtoksičniji za larve i protonimfe, dok su u odnosu na njih deutonimfe ženke pokazale približno 2-3 puta manju osetljivost. Akaricidniefekat ovog biopesticida zabeležen nakon tretiranja jaja nastao je kao posledica rezidualnog delovanja na larve koje su se ispilile iz tretiranih jaja. Ovaj rezidualni efekat bio je značajno niži od akaricidnog efekta ostvarenog direktnim tretiranjem larvi i protonimfi, ali ne i deutonimfi, koje su se pokazale kao najmanje osetljiv juvenilni stadijum. Sve LC_{50} i LC_{90} vrednosti bile su niže od koncentracije azadirahtina preporučene za primenu (50 mg/l).

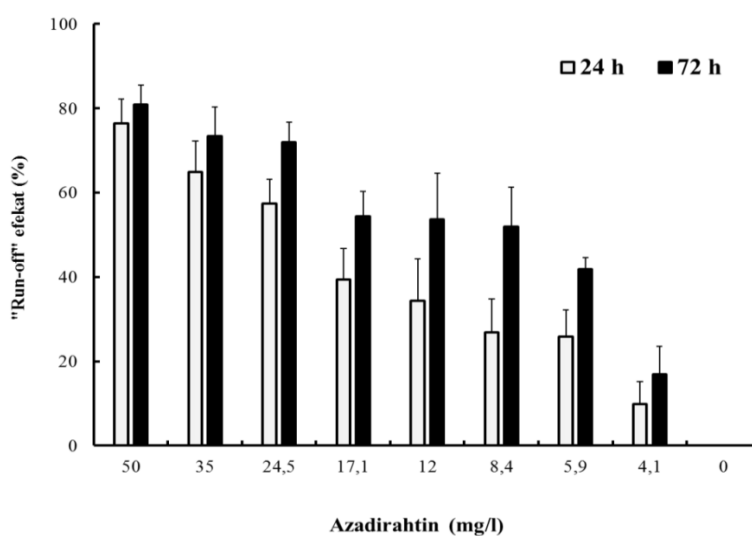
Tabela 9. Parametri toksičnosti azadirahtina(mg/l) za *T. urticae* nakon tretiranja različitih životnih stadijuma (E = jaja; L = larve; PN = protonimfe, DNf = deutonimfe ženke)

Životni stadijumi	n	LC_{50} (mg/l) (95% CL)	LC_{90} (mg/l) (95% CL)	b ($\pm SE$)	χ^2	df
E	2067	7,62b (7,18 - 8,05)	17,45b (16,23 - 18,97)	3,56 ($\pm 0,17$)	3,94	4
L	640	5,15a (3,35 - 6,14)	9,51 a (7,80 - 17,10)	4,81 ($\pm 0,75$)	10,85	5
PN	560	5,86a (5,06 - 6,64)	11,56a (9,64 - 15,96)	4,35 ($\pm 0,51$)	4,14	4
DNf	390	11,55c (9,86 - 13,32)	33,59c (26,84 - 47,35)	2,76 ($\pm 0,34$)	1,48	4

LC vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (test odnosa letalnih doza, $P=0,05$)

n = broj tretiranih jedinki
CL = interval poverenja
b = nagib regresione krive
df = stepeni slobode

Direktno tretiranje pre-ovipozicionih ženki serijom koncentracija azadirahatina počevši od preporučene za primenu izazvalo je RO-efekat (Sl. 6). Procenat ženki koje su napustile lisne isečke zavisio je od koncentracije biopesticida i iznosio je 10-76% (posle 24 h) i 17-81% (posle 72 h). Od ukupnog broja RO-ženki, većina je napustila tretirane lisne isečke u prva 24 h, naročito u tretmanima višim koncentracijama biopesticida. RO-efekat posle 72 h bio je veći od 50% u svim, osim u tretmanima sa dve najniže koncentracije, što pokazuje da je promena ponašanja bila glavni efekat delovanja azadirahatina u odnosu na smrtnost koja nije prelazila 20% ukupnog broja tretiranih ženki.



Sl. 6. RO-efekat (%) 24 h i 72 h nakon tretiranja pre-ovipozicionih ženki *T. urticae* azadirahatinom (mg/l)

Imajući u vidu ovakav odgovor ženki *T. urticae* nakon tretiranja azadirahatinom, izračunata je biološka efektivnost biopesticida na osnovu zbira uginulih i RO-ženki (tabela 10). Efektivne koncentracije biološke efektivnosti azadirahatina 24 h posle tretiranja preovipozicionih ženki bile su iznad letalnih koncentracija za pre-adultne životne stadijume, dok su se 72 h posle tretiranja nalazile u opsegu letalnih koncentracija. Efektivne koncentracije RO-efekta (Tabela 10) bile su značajno više od odgovarajućih koncentracija biološke efektivnosti, a na nivou 90% i od koncentracije preporučene za primenu.

Tabela 10. Parametri efekata azadirahtina (mg/l) 24 h i 72 h nakon tretiranja pre-ovipozicionih ženki *T. urticae* (n = 1360)

Vreme posle tretiranja	Parametri	Biološka efektivnost	RO-efekat
24 h	EC ₅₀ (mg/l) (95% CL)	14,67^a (11,70 - 17,79)	20,16^b (17,50 - 23,37)
	EC ₉₀ (mg/l) (95% CL)	74,38^a (53,30 - 126,42)	117,40^b (84,40 - 189,26)
	b(± SE)	1,82(± 0,12)	1,68(± 0,12)
	χ ² (df = 6)	14,09	7,61
72 h	EC ₅₀ (mg/l) (95% CL)	6,42^a (4,09 - 8,55)	11,22^b (7,98 - 14,34)
	EC ₉₀ (mg/l) (95% CL)	29,12^a (22,27 - 43,83)	96,92^b (60,55 - 230,71)
	b(± SE)	1,95(± 0,14)	1,17(± 0,12)
	χ ² (df = 6)	18,31	14,64

LC vrednosti u redovima označene različitim slovima razlikuju se značajno (test odnosa letalnih doza, P=0,05)

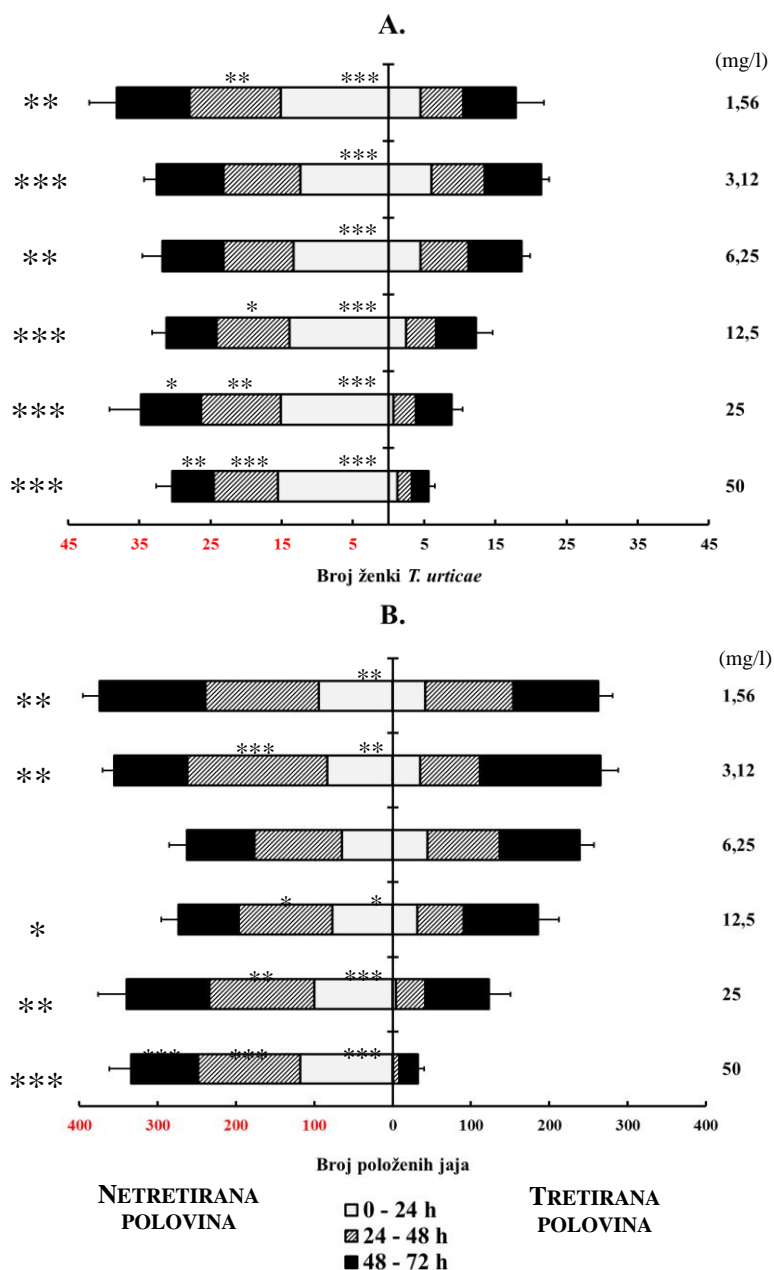
n = broj tretiranih jedinki; CL = interval poverenja; b = nagib regresione krive; df = stepeni slobode

4.2.2. Repelentni i deterentni efekti

Azadirahtin je uticao značajno na ponašanje ženki *T. urticae* (Sl. 7). Dvadeset četiri časa od početka biotesta statistički značajan repelentni efekat zabeležen je u svim tretmanima. Nakon naredna 24 h značajan repelentni efekat uzrokovale su koncentracije 50, 25, 12,5 i 1,56 mg/l, dok je nakon poslednja 24 h značajan efekat zabeležen samo kod koncentracija 50 i 25 mg/l. Posmatran kumulativno, broj ženki utvrđen na tretiranim polovinama listova bio je značajno manji od broja ženki na netretiranim polovinama u svim tretmanima (Sl. 7A). Kumulativni indeksi repelentnosti (%) iznosili su: 81,2±3,3 (50 mg/l); 73,0±6,8 (25 mg/l); 61,5±6,5 (12,5 mg/l); 38,5±9,4 (6,25 mg/l); 33,1±7,0 (3,12 mg/l) i 45,1±21,1 (1,56 mg/l).

Sličan obrazac zabeležen je i kod ovipozicione deterentnosti (Sl. 7B). U prva 24 h, ženke *T. urticae* položile su statistički značajno manji broj jaja na tretiranim polovinama listova u svim, osim u tretmanu koncentracijom 6,25 mg/l. U naredna 24 h ovipoziciona deterentnost bila je značajna u tretmanima koncentracijama 50, 25, 12,5 i 3,12 mg/l, dok je u poslednja 24 h biotesta jedino u tretmanu najvišom koncentracijom zabeležen značajan efekat. Posmatrano kumulativno, svi tretmani (osim koncentracije 6,25 mg/l) uzrokovali su značajnu ovipozicionu deterentnost. Kumulativni indeksi deterentnosti (%) iznosili su: 82,9±4,1 (50 mg/l); 49,4±6,1 (25 mg/l); 20,9±5,2 (12,5 mg/l); 4,4±5,2 (6,25 mg/l); 14,9±4,4 (3,12 mg/l) i 17,4±5,6 (1,56 mg/l). Kontakt sa azadirahtinom uzrokovao je nisku smrtnost: najviša vrednost (6,2±2,8%) zabeležena je nakon 72 h na polovini lista tretiranoj najvišom koncentracijom.

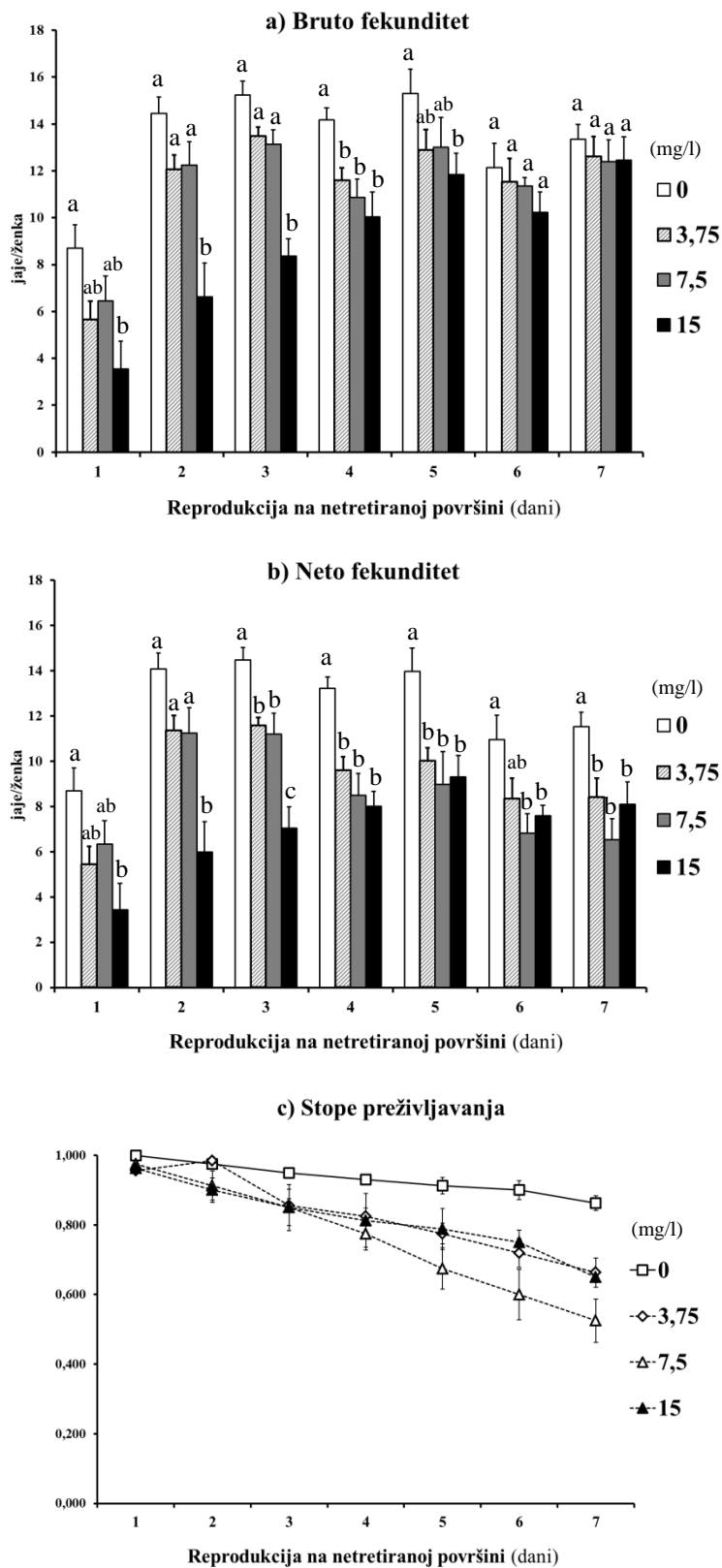
Biopesticid je uzrokovao i RO-efekat koji je posle 72 h iznosio (%): 56±4,3 (50 mg/l), 32±9,6 (25 mg/l), 36±7 (12,5 mg/l), 20±5 (6,25 mg/l), 12±3,4 (3,12 mg/l) i 11±2,9 (1,56 mg/l), s tim da je približno 80% RO-ženki pronađeno uz tretirane polovine listova.



Sl. 7. Repelentni (A) i deterentni (B) efekti azadirachtina (mg/l) na ženke *T. urticae* (dnevni i kumulativni broj ženki/položenih jaja na netretiranoj ili tretiranoj polovini lista 0-72 h od početka izlaganja, $M \pm SE$; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, t-test)

4.2.3. Efekti na životne parametre i populacioni rast

Dnevne vrednosti fekunditeta ženki *T. urticae* preživelih tretiranje azadirachtinom u stadijumu jajeta i izloženost reziduama biopesticida tokom juvenilnog razvića prikazane su na slici 8. Bruto fekunditet bio je statistički značajno redukovano samo u tretmanu koncentracijom



Sl. 8. Dnevne vrednosti bruto fekunditeta (a) i neto fekunditeta (b) ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje azadirachtinom (mg/l) u stadijumu jajeta ($M \pm SE$; vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, ANOVA, Fisher LSD test); (c) Stope preživljavanja ženki ($M \pm SE$)

15 mg/l i to od prvog pa do petog dana reprodukcije, dok je neto fekunditet u tretmanu ovom koncentracijom značajno redukovano od početka do kraja ogleda. Druge dve koncentracije uzrokovale su značajnu redukciju neto fekunditeta od trećeg do sedmog dana reprodukcije. Maksimalna redukcija zabeležena je kod ženki tretiranih najvišom koncentracijom u prva dva dana reprodukcije, kada je bruto fekunditet bio redukovano 54,1-59,3% a neto fekunditet 57,5-60,6%. Od trećeg dana reprodukcije, stope preživljavanja ženki u tretmanima bile su niže u poređenju sa kontrolom (Sl. 8), što je uzrokovalo izraženiju redukciju neto fekunditeta u odnosu na bruto fekunditet.

Slično kao kod dnevnih vrednosti, samo je najviša koncentracija statistički značajno redukovala sedmodnevni bruto fekunditet (32%), dok je značajna redukcija sedmodnevnog neto fekunditeta (26-43%) zabeležena u svim tretmanima (Tabela 11). Sve tri koncentracije značajno su redukovale prosečnu dužinu života ženki (za 0,8 - 1,2 dana). Trenutna stopa populacionog rasta značajno je redukovana u tretmanima koncentracijama 15 mg/l i 7,5 mg/l, za 12 % i 9 % u poređenju sa kontrolom (Tabela 11).

Tabela 11. Životni parametri i populacioni rast ($M \pm SE$) ženki *T. urticae* preživelih tretiranje azadirahtinom (mg/l) u stadijumu jajeta

mg/l	<i>GF</i>	<i>NF</i>	<i>L</i>	<i>r_i</i>
15	63,07^b (± 7,50)	49,45^b (± 6,16)	5,46^b (± 0,12)	0,559^b (± 0,024)
7,5	79,47^{ab} (± 5,53)	59,48^b (± 6,86)	5,27^b (± 0,32)	0,581^b (± 0,018)
3,75	80,46^a (± 3,57)	64,61^b (± 3,94)	5,69^b (± 0,15)	0,595^{ab} (± 0,009)
0	93,34^a (± 4,70)	86,91^a (± 4,72)	6,48^a (± 0,08)	0,638^a (± 0,008)
<i>F_{3,12}</i>	4,65	6,72	7,12	4,26
<i>p</i>	< 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,05

Srednje vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (ANOVA, Fisher LSD, $\alpha=0.05$)

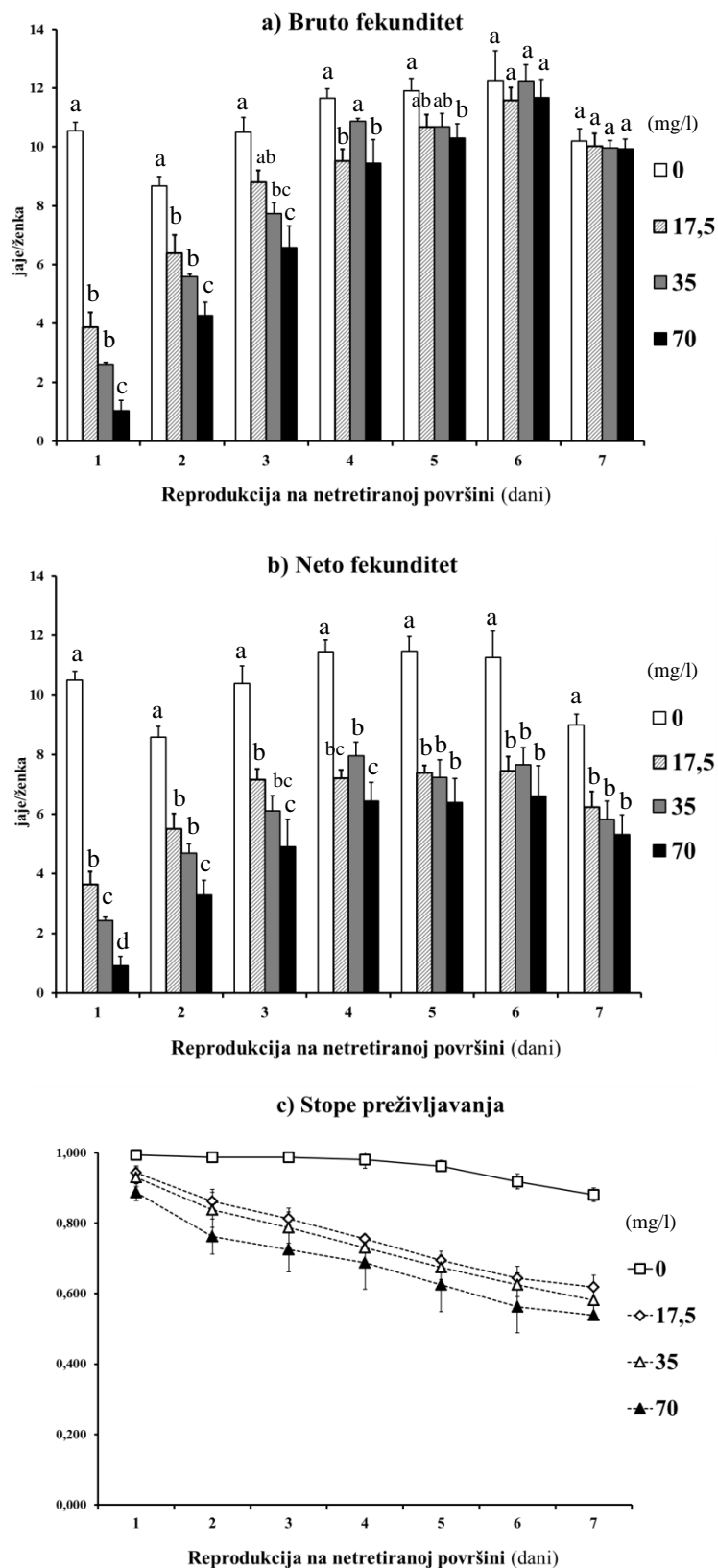
GF= bruto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

NF= neto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

L= dužina života ženki (dani)

r_i= trenutna stopa rasta populacije nakon sedmodnevne reprodukcije

Dnevne vrednosti fekunditeta ženki *T. urticae* preživelih tretiranje azadirahtinom u preovipozicionom periodu a zatim prebačenih na netretiranu površinu prikazane su na slici 9. Sve tri koncentracije statistički značajno su redukovale bruto fekunditet prvog i drugog dana reprodukcije, dok je u naredna tri dana samo najviša koncentracija postigla značajnu redukciju.



Sl. 9. Dnevne vrednosti bruto fekunditeta (a) i neto fekunditeta (b) ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje azadirachtinom (mg/l) u periodu preovipozicije ($M \pm SE$; vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, ANOVA, Fisher LSD test); (c) Stope preživljavanja ženki ($M \pm SE$)

Šestog i sedmog dana reprodukcije ženke u tretmanu su se oporavile i njihov bruto fekunditet se nije razlikovao od kontrolnog. Neto fekunditet bio je značajno redukovano u sva tri tretmana tokom celog posmatranog perioda reprodukcije. Maksimalne redukcije fekunditeta (>90%) zabeležene su prvog dana reprodukcije; izraženija redukcija neto fekunditeta do kraja biotesta nastala je usled nižih stopa preživljavanja ženki u tretmanu u odnosu na kontrolu.

Sve tri koncentracije azadirahtina statistički značajno su redukovale sedmodnevne vrednosti bruto fekunditeta i neto fekunditeta, za 20-30% i 39-53%, u poređenju sa kontrolom (Tabela 12). Prosečna dužina života ženki takođe je značajno redukovana u svim tretmanima (za 1,4 - 2 dana), kao i trenutna stopa rasta (11-18%).

Tabela 12. Životni parametri i populacioni rast ($M \pm SE$) ženki *T. urticae* preživelih tretiranje azadirahtinom (mg/l) u periodu preovipozicije

mg/l	<i>GF</i>	<i>NF</i>	<i>L</i>	<i>r_i</i>
70	53,20_c (±1,60)	33,85_c (± 4,41)	4,66_b (± 0,54)	0,501_c (± 0,020)
35	59,67_b (± 1,10)	41,89_{bc} (± 2,88)	5,17_b (± 0,26)	0,534_{bc} (± 0,021)
17,5	60,90_b (± 1,62)	44,58_b (± 2,05)	5,33_b (± 0,10)	0,543_b (± 0,014)
0	75,76_a (± 2,50)	72,59_a (± 2,62)	6,71_a (± 0,07)	0,613_a (± 0,010)
<i>F_{3,12}</i>	29,30	21,63	6,41	15,40
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,001

Srednje vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (ANOVA, Fisher LSD, $\alpha=0.05$)

GF= bruto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

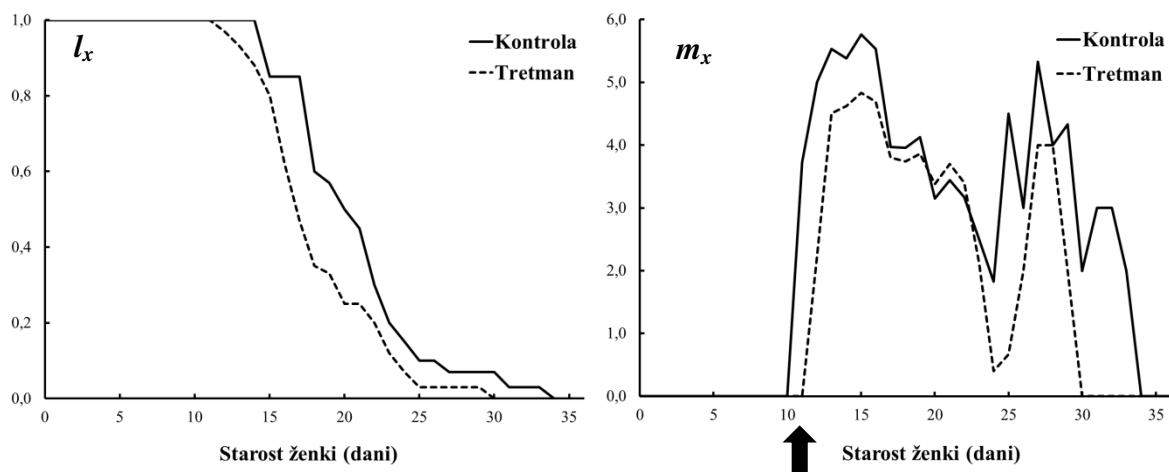
NF= neto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

L= dužina života ženki (dani)

r_i= trenutna stopa rasta populacije nakon sedmodnevne reprodukcije

4.2.4. Efekti na demografske parametre

Tretiranje jaja *T. urticae* azadirahtinom uzrokovalo je produženje juvenilnog razvika preživelih jedinki koje su u stadijum adulta dospеле jedanaestog a prvu reprodukciju ostvarile dvanaestog dana života, dan kasnije u odnosu na ženke u kontroli. Starosno-specifično preživljavanje u tretmanu bilo je redukovano u odnosu na kontrolu do kraja života odraslih ženki, dok je starosno-specifični fertilitet u tretmanu bio redukovano tokom većeg dela života adulta, a najviše u vreme reproduktivnog maksimuma (Sl. 10).



Sl. 10. Starosno-specifično preživljavanje (l_x) i starosno-specifični fertilitet (m_x) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u stadijumu jajeta azadirahtinom (7,5 mg/l)

Redukcija preživljavanja i fertiliteta i usporavanje juvenilnog razvića u tretmanu u poređenju sa kontrolom uzrokovali su značajnu redukciju stopa reprodukcije i rasta (Tabela 13). Bruto stopa reprodukcije redukovana je za 34,3% a neto stopa reprodukcije za 36,6%, dok su prirodna stopa rasta i konačna stopa rasta redukovane za 16% i 4%. Srednje vreme generacije je značajno produženo, ali za manje od 24 h.

Tabela 13. Demografski parametri ($M \pm SE$) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u stadijumu jajeta azadirahtinom (7,5 mg/l)

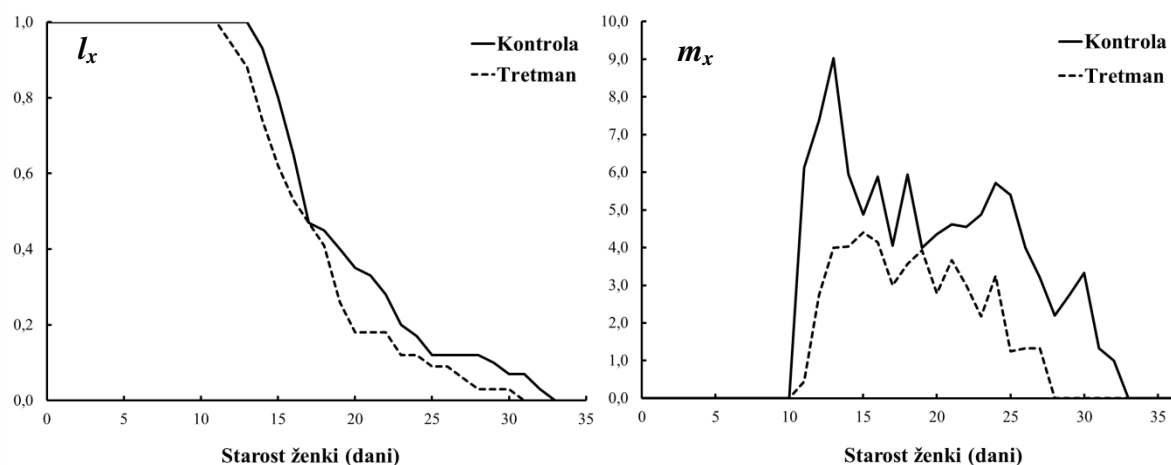
	GRR	R_0	r_m	λ	T
Kontrola	88,24a ($\pm 11,34$)	44,32a ($\pm 3,56$)	0,263a ($\pm 0,004$)	1,300a ($\pm 0,005$)	14,43b ($\pm 0,23$)
Tretman	57,95b ($\pm 7,25$)	28,08b ($\pm 2,82$)	0,221b ($\pm 0,005$)	1,248b ($\pm 0,006$)	15,07a ($\pm 0,21$)
P	0,02911	0,00043	0,00043	0,00043	0,04003

Srednje vrednosti demografskih parametara označene različitim slovima razlikuju se značajno (parni *bootstrap* test, $B = 100000$)

GRR = bruto stopa reprodukcije; **R_0** = neto stopa reprodukcije; **r_m** = prirodna stopa rasta populacije; **λ** = konačna stopa rasta populacije; **T** = srednje vreme generacije

Tretiranje preovipozicionih ženki *T. urticae* azadirahtinom redukovalo je obe starosno-specifične funkcije tokom celog perioda života adulta (Sl. 11). Usled izraženije redukcije fertiliteta, u poređenju sa efektima tretiranja u stadijumu jajeta, zabeležena je i veća redukcija vrednosti stopa rasta i reprodukcije u tretmanu (Tabela 14). Bruto stopa reprodukcije redukovana je za 51,2% a neto stopa reprodukcije za 52,2%, dok su prirodna stopa rasta i

konačna stopa rasta redukovane za 24% i 6,6%; s druge strane, srednje vreme generacije produženo je približno za 24 h.



Sl. 11. Uzrasno-specifično preživljavanje (l_x) i uzrasno-specifični fertilitet (m_x) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u periodu preovipozicije azadirahtinom(35 mg/l)

Tabela 14. Demografski parametri ($M \pm SE$) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u periodu preovipozicije azadirahtinom (35 mg/l)

	<i>GRR</i>	<i>R₀</i>	<i>r_m</i>	λ	<i>T</i>
Kontrola	100,55_a (± 9,58)	50,70_a (± 5,19)	0,283_a (± 0,004)	1,328_a (± 0,005)	13,86_b (± 0,24)
Tretman	49,02_b (± 4,22)	24,24_b (± 3,49)	0,215_b (± 0,008)	1,240_b (± 0,010)	14,84_a (± 0,24)
<i>P</i>	0,00001	0,00004	0,00004	0,00004	0,00324

Srednje vrednosti demografski parametara označene različitim slovima razlikuju se značajno (parni *bootstrap* test, $B = 100000$)

GRR = bruto stopa reprodukcije; ***R₀*** = neto stopa reprodukcije; ***r_m*** = prirodna stopa rasta populacije; **λ** = konačna stopa rasta populacije; ***T*** = srednje vreme generacije

4.3. Akaricidni i subletalni efekti spinosada

4.3.1. Toksičnost za životne stadijume

Parametri toksičnosti spinosada nakon tretiranja jaja i juvenilnih stadijuma *T. urticae* prikazani su u tabeli 15. Najveću osetljivost na ovaj biopesticid pokazale su larve i protonimfe, dok je osetljivost ženki deutonimfi bila značajno manja. Toksičnost spinosada za odrasle ženke nije se značajno razlikovala od toksičnosti za deutonimfe. Akaricidni efekat spinosada zabeležen nakon direktnog tretiranja jaja nastao je usled rezidualnog delovanja biopesticida na larve ispiljene iz tretiranih jaja i bio je nekoliko puta manji od efekta ostvarenog direktnim tretiranjem larvi. Ovaj rezidualni efekat bio je najslabiji akaricidni

efekat na nivou LC₅₀, dok se na nivou LC₉₀ nije značajno razlikovao od efekata ostvarenih tretiranjem deutonimfi i preovipozicionih ženki. Osim LC₅₀ za larve i protonimfe, sve ostale dobijene LC vrednosti bile su na nivou ili veće od koncentracija spinosada preporučenih za primenu (60-300 mg/l).

Tabela 15. Parametri toksičnosti spinosada(mg/l)za *T. urticae* nakon tretiranja različitih životnih stadijuma (E = jaja; L = larve; PN = protonimfe, DNf = deutonimfe ženke; Afp = pre-ovipozicione ženke)

Životni stadijumi	n	LC ₅₀ (mg/l) (95% CL)	LC ₉₀ (mg/l) (95% CL)	b (± SE)	χ ²	df
E	2346	105,78 d (73,65 - 149,36)	596,95 b (340,01 - 2076,08)	1,70 (± 0,13)	14,65	4
L	640	27,52 a (21,20 - 34,84)	116,72 a (83,76 - 193,04)	2,04 (± 0,20)	5,26	5
PN	640	36,55 b (29,92 - 43,45)	136,20 a (109,32 - 182,36)	2,24 (± 0,22)	4,49	5
DNf	640	82,76 cd (66,11 - 106,70)	721,28 b (460,70 - 1347,41)	1,36 (± 0,13)	2,80	5
Afp	526	61,47c (41,68 - 97,68)	457,21b (230,79 - 1760,00)	1,47 (± 0,14)	7,22	4

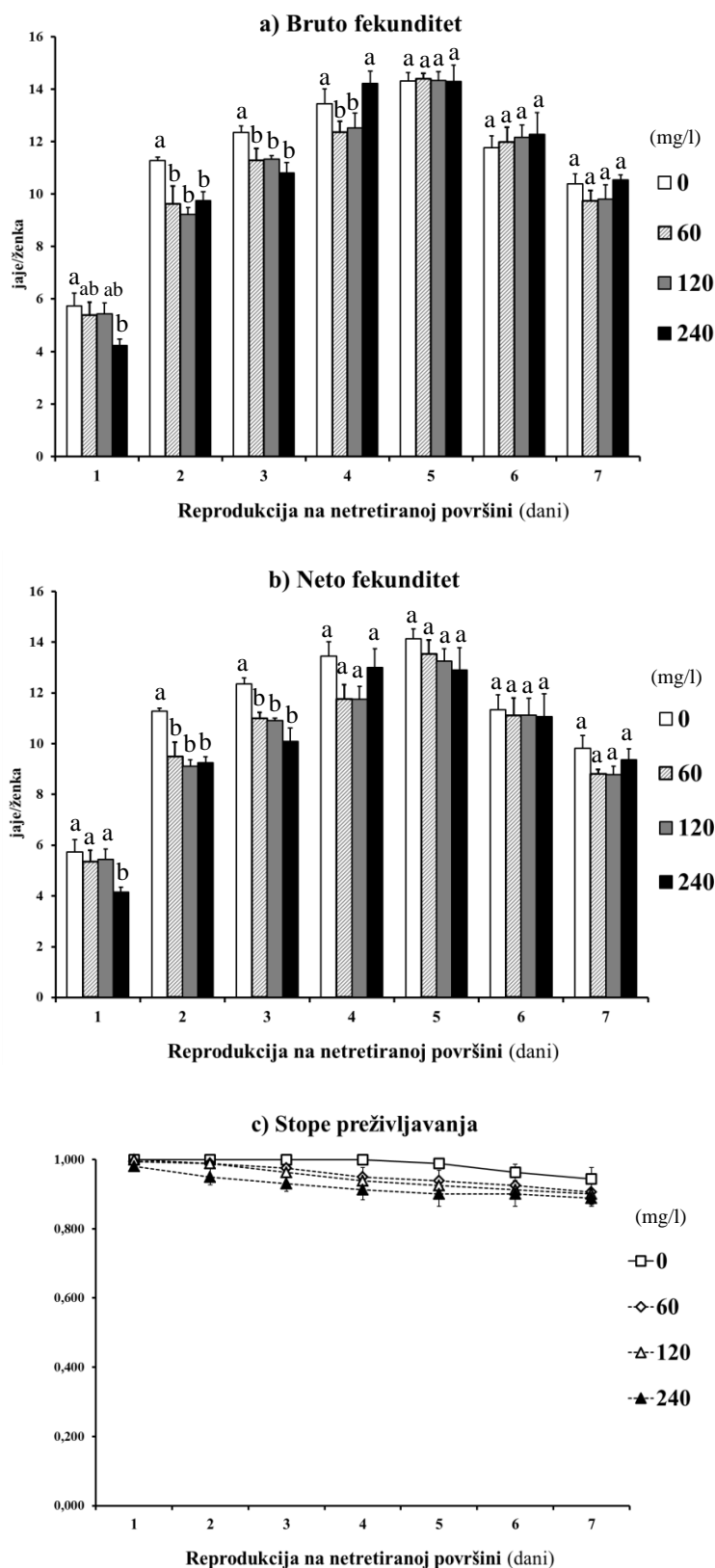
LC vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (test odnosa letalnih doza, P=0,05)

(E, L, PN, DNf = smrtnost utvrđivana na osnovu broja tretiranih jedinki dospelih u stadijum adulta;
Afp = smrtnost utvrđivana na osnovu broja živih ženki 48 h posle tretiranja)

n = broj tretiranih jedinki
CL = interval poverenja
b = nagib regresione krive
df = stepeni slobode

4.3.2. Efekti na životne parametre i populacioni rast

Dnevne vrednosti fekunditeta ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje spinosadom u stadijumu jajeta i rezidualno delovanje biopesticida tokom juvenilnog razvića prikazane su na slici 12. Bruto fekunditet bio je statistički značajno redukovano u sva tri tretmana samo drugog dana reprodukcije; maksimalna redukcija od 26,4% u odnosu na kontroluostvarena je prvog dana reprodukcije u tretmanu najvišom koncentracijom. Neto fekunditet bio je značajno redukovano u sva tri tretmana drugog i trećeg dana reprodukcije, dok je prvog dana samo najviša koncentracija ostvarila značajnu (ujedno i maksimalnu) redukciju od 27,7%. Stope preživljavanja ženki u tretmanu nisu se znatno razlikovale u poređenju sa kontrolom.



Sl. 12. Dnevne vrednosti bruto fekunditeta (a) i neto fekunditeta (b) ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje spinosadom (mg/l) u stadijumu jajeta ($M \pm SE$; vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, ANOVA, Fisher LSD test); (c) Stope preživljavanja ženki ($M \pm SE$)

Tretiranje spinosadom redukovalo je sedmodnevni bruto fekunditet za 4,1-5,8% a sedmodnevni neto fekunditet za 9,1-10,6% (Tabela 16). U svim tretmanima zabeležene su statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu osim kod vrednosti bruto fekunditeta u tretmanu koncentracijom 240 mg/l. Najviša koncentracija značajno je redukovala prosečnu dužinu života ženki (približno za pola dana), dok je trenutna stopa populacionog rasta značajno redukovana u svim tretmanima, iako za svega 2-3% u poređenju sa kontrolom.

Tabela 16. Životni parametri i populacioni rast ($M \pm SE$) ženki *T. urticae* preživelih tretiranje spinosadom (mg/l) u stadijumu jajeta

mg/l	<i>GF</i>	<i>NF</i>	<i>L</i>	<i>r_i</i>
240	76,12_{ab} (± 1,39)	69,78_b (± 2,92)	6,45_b (± 0,19)	0,606_b (± 0,012)
120	74,81_b (± 0,64)	70,35_b (± 1,30)	6,63_{ab} (± 0,08)	0,608_b (± 0,005)
60	74,78_b (± 1,83)	70,95_b (± 1,10)	6,66_{ab} (± 0,17)	0,610_b (± 0,005)
0	79,38_a (± 1,51)	78,09_a (± 1,72)	6,90_a (± 0,06)	0,624_a (± 0,006)
<i>F_{3,12}</i>	2,35	4,13	1,73	4,10
<i>p</i>	0,124	< 0,05	0,214	< 0,05

Srednje vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (ANOVA, Fisher LSD, $\alpha=0.05$)

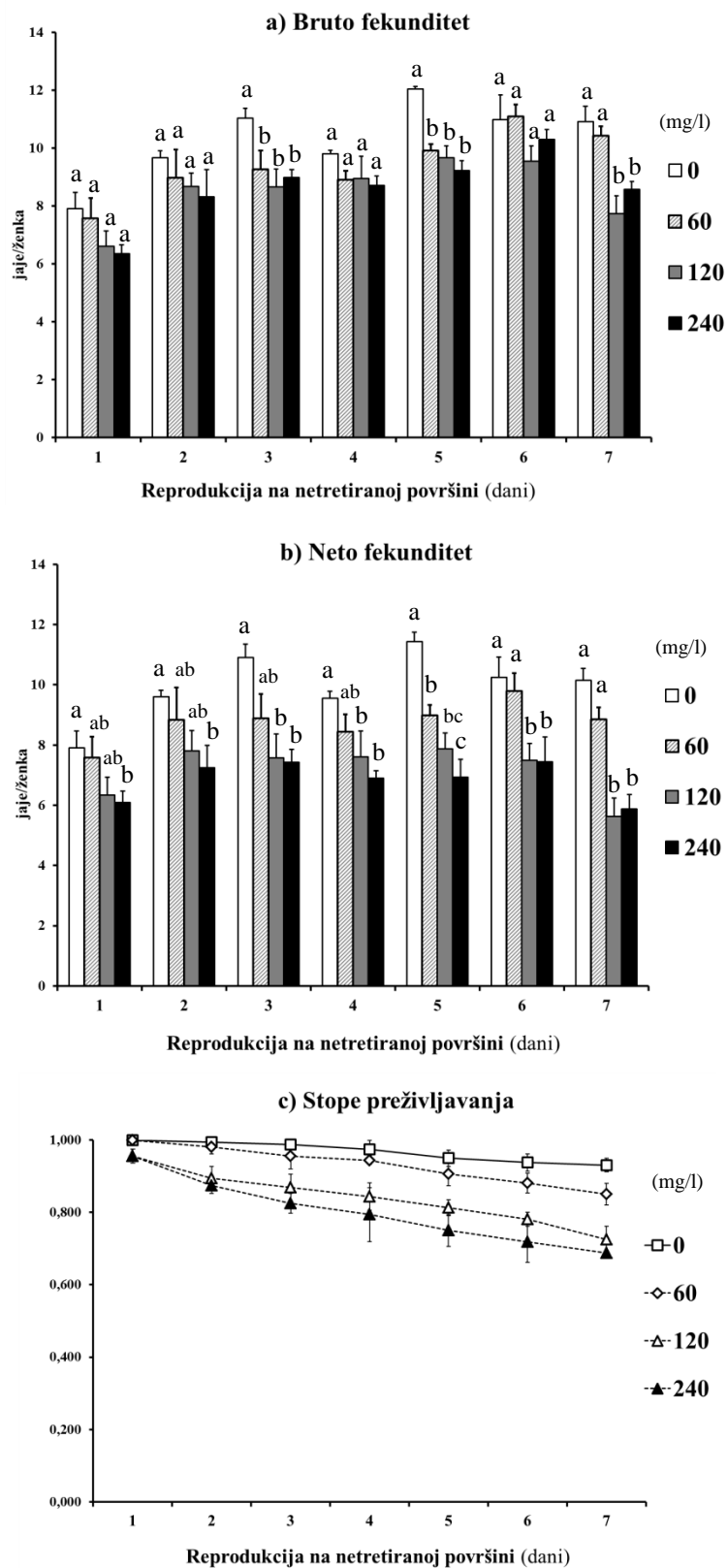
GF= bruto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

NF= neto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

L= dužina života ženki (dani)

r_i= trenutna stopa rasta populacije nakon sedmodnevne reprodukcije

Dnevne vrednosti fekunditeta ženki *T. urticae* preživelih tretiranje spinosadom u preovipozicionom periodu prikazane su na slici 13. Sve tri koncentracije statistički značajno su redukovale bruto fekunditet trećeg i petog dana reprodukcije, dok je u ostalim danima nije bilo značajne redukcije, osim u tretmanima koncentracijama 120 i 240 mg/l sedmog dana reprodukcije. Neto fekunditet bio je značajno redukovano u tretmanu najvišom koncentracijom tokom celog posmatranog perioda reprodukcije, dok je koncentracija 120 mg/l ostvarila značajnu redukciju od trećeg do sedmog dana, a koncentracija 60 mg/l samo petog dana reprodukcije. Maksimalna redukcija zabeležena je sedmog dana: bruto fekunditeta za 29,1% a neto fekunditeta za 44,5%, u odnosu na kontrolu.



Sl. 13. Dnevne vrednosti bruto fekunditeta (a) i neto fekunditeta (b) ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje spinosadom (mg/l) u periodu preovipozicije ($M \pm SE$; vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, ANOVA, Fisher LSD test); (c) Stope preživljanja ženki ($M \pm SE$)

Sedmodnevne vrednosti bruto fekunditeta i neto fekunditeta (Tabela 17) bile su statistički značajno redukovane u odnosu na kontrolu u tretmanima koncentracijama 120 mg/l (za 17,3% i 27,9%) i 240 mg/l (za 16,4% i 31,3%). Niže stope preživljavanja ženki u tretmanu u odnosu na kontrolu uzrokovale su izraženiju redukciju neto fekunditeta u poređenju sa bruto fekunditetom. Prosečna dužina života ženki takođe je značajno redukovana u tretmanima ovim dvema koncentracijama (približno za jedan dan), kao i trenutna stopa rasta (za 8,2% i 9,2%).

Tabela 17. Životni parametri i populacioni rast ($M \pm SE$) ženki *T. urticae* preživelih tretiranje spinosadom (mg/l) u periodu preovipozicije

mg/l	<i>GF</i>	<i>NF</i>	<i>L</i>	<i>r_i</i>
240	60,46 b (±1,12)	47,93 b (± 2,73)	5,62 b (± 0,22)	0,553 b (± 0,017)
120	59,83 b (± 2,80)	50,30 b (± 3,41)	5,88 b (± 0,13)	0,559 b (± 0,020)
60	66,18 ab (± 2,97)	61,38 a (± 3,80)	6,51 a (± 0,17)	0,588 a (± 0,018)
0	72,35 a (± 1,17)	69,81 a (± 0,78)	6,71 a (± 0,07)	0,609 a (± 0,004)
<i>F_{3,12}</i>	6,70	11,14	10,42	10,15
<i>p</i>	< 0,01	< 0,001	< 0,01	< 0,01

Srednje vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (ANOVA, Fisher LSD, $\alpha=0.05$)

GF= bruto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

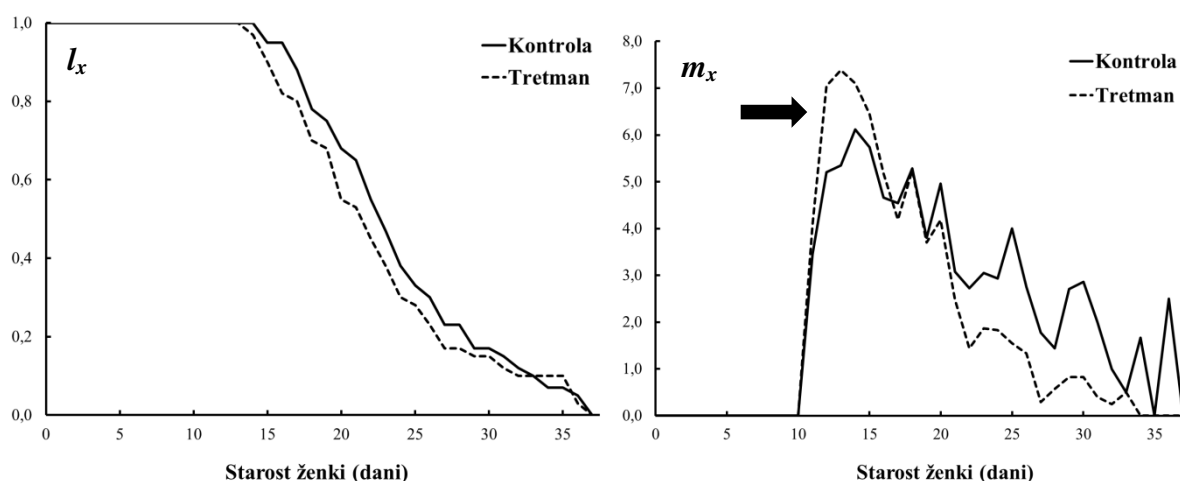
NF= neto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

L= dužina života ženki (dani)

r_i= trenutna stopa rasta populacije nakon sedmodnevne reprodukcije

4.3.3. Efekti na demografske parametre

Tretiranje jaja *T. urticae* spinosadom uzrokovalo je redukciju starosno-specifičnog preživljavanja od početka i tokom najvećeg dela života odraslih ženki (Sl. 14). S druge strane, ženke u tretmanu imale su 21,2% veći starosno-specifični fertilitet u poređenju sa ženkama u kontroli u prvih šest dana reprodukcije. Sa povećanjem starosti ženki ova razlika je nestala, tako da je u drugoj polovini perioda reprodukcije u kontroli zabeležen veći fertilitet u odnosu na tretman. Iskazan kao neto vrednost ($l_x \times m_x$) fertilitet ženki u tretmanu bio je 18,4% veći u odnosu na ženke u kontroli (razlika neto vrednosti u korist tretiranih ženki bila je manja nego kod bruto vrednosti jer su l_x vrednosti u tretmanu bile niže od kontrolnih).



Sl. 14. Starosno-specifično preživljavanje (l_x) i starosno-specifični fertilitet (m_x) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u stadijumu jajeta spinosadom (120mg/l)

Veći neto fertilitet tretiranih ženki na početku perioda reprodukcije, kad je produkcija potomstva kod *T. urticae* najveća, bio je dovoljan da uzrokuje značajno povećanje stopa populacionog rasta u tretmanu u poređenju sa kontrolom, iako neto stopa reprodukcije (tj. ukupan neto fertilitet) u tretmanu nije bio značajno veći od kontrolnog. Bruto stopa reprodukcije u kontroli bila je značajno veća u odnosu na tretman, zahvaljujući većoj produkciji potomstva starijih ženki, ali ova razlika nije bila dovoljna da poništi efekat povećanja fertiliteta u tretmanu u prvim danima reprodukcije (Tabela 18).

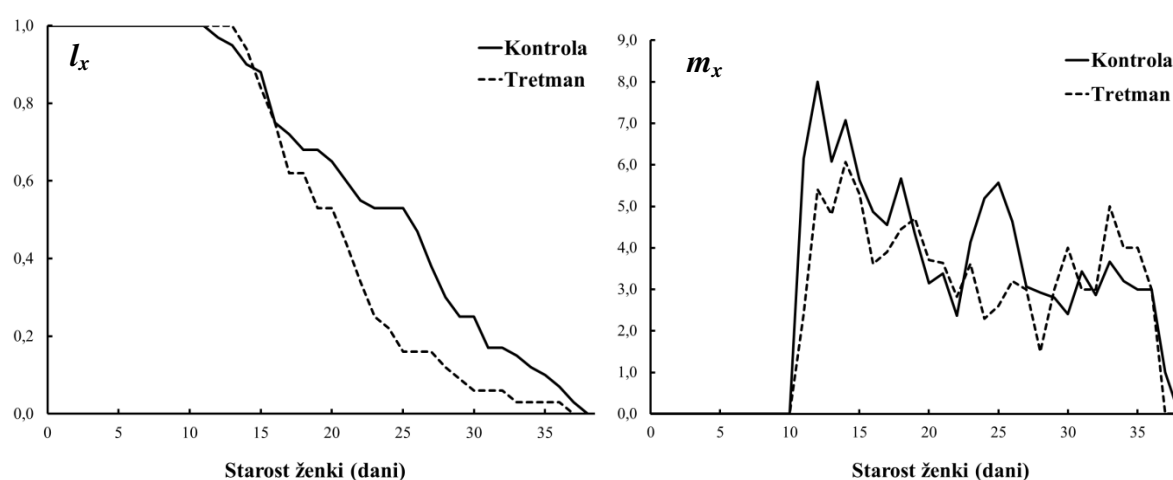
Tabela 18. Demografski parametri ($M \pm SE$) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u stadijumu jajeta spinosadom (120 mg/l)

	<i>GRR</i>	<i>R₀</i>	<i>r_m</i>	λ	<i>T</i>
Kontrola	84,12_a (± 4,44)	54,88_a (± 3,73)	0,267_b (± 0,003)	1,306_b (± 0,004)	15,01_a (± 0,20)
Tretman	68,73_b (± 3,93)	51,78_a (± 3,53)	0,278_a (± 0,003)	1,321_a (± 0,004)	14,18_b (± 0,13)
<i>P</i>	0,01267	0,54671	0,01222	0,01222	0,00048

Srednje vrednosti demografskih parametara označene različitim slovima razlikuju se značajno (parni *bootstrap* test, $B = 100000$)

GRR = bruto stopa reprodukcije; ***R₀*** = neto stopa reprodukcije; ***r_m*** = prirodna stopa rasta populacije; **λ** = konačna stopa rasta populacije; ***T*** = srednje vreme generacije

Za razliku od efekata zabeleženih u prethodnom biotestu, tretiranje preovipozicionih ženki *T. urticae* spinosadom nije uzrokovalo redukciju starosno-specifičnog preživljavanjatokom prvih šest dana, ali je reprodukcija u ovom periodu bila redukovana u poređenju sa ženkama u kontroli. Do kraja života adulta starosno-specifično preživljavanju tretmanu bilo je redukovano u odnosu na kontrolu, dok su m_x vrednosti bile i manje i veće od kontrolnih (Sl. 15). Usled relativnog oporavka fertiliteta starijih tretiranih ženki, bruto stope reprodukcije u tretmanu i kontroli nisu se značajno razlikovale. Neto stopa reprodukcije tretiranih ženki bila je, međutim, značajno redukovana u poređenju sa kontrolom (za 36,2%) jer su tokom većeg dela života adulta u tretmanu zabeležene niže l_x vrednosti. Ovakvi efekti uzrokovali su značajnu redukciju vrednosti stopa populacionog rasta: 10,2% (r_m) i 2,9% (λ) (Tabela 19).



Sl. 15. Starosno-specifično preživljavanje (l_x) i starosno-specifični fertilitet (m_x) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u periodu preovipozicije spinosadom (120mg/l)

Tabela 19. Demografski parametri ($M \pm SE$) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u periodu preovipozicije spinosadom (120mg/l)

	GRR	R_0	r_m	λ	T
Kontrola	112,12_a (± 5,92)	66,05_a (± 5,59)	0,283_a (± 0,004)	1,327_a (± 0,005)	14,80_a (± 0,21)
Tretman	96,05_a (± 17,68)	42,12_b (± 4,65)	0,254_b (± 0,004)	1,289_b (± 0,005)	14,73_a (± 0,30)
<i>P</i>	0,2406	0,00101	0	0	0,82202

Srednje vrednosti demografskih parametara označene različitim slovima razlikuju se značajno (parni *bootstrap* test, $B = 100000$)

GRR = bruto stopa reprodukcije; **R_0** = neto stopa reprodukcije; **r_m** = prirodna stopa rasta populacije; **λ** = konačna stopa rasta populacije; **T** = srednje vreme generacije

4.4. Akaricidni i subletalni efekti biopesticida Naturalis-L

4.4.1. Toksičnost za životne stadijume

Parametri toksičnosti biopesticida Naturalis-L nakon tretiranja jaja i juvenilnih stadijuma prikazani su u tabeli 20. Biopesticid je bio najtoksičniji za larve, značajno manje toksičan za protonimfe, dok su deutonimfe bile najmanje osetljiv juvenilni stadijum. Akaricidni efekat zabeležen nakon direktnog tretiranja jaja ovim biopesticidom bio je rezultat rezidualnog toksičnog delovanja na larve koje su se ispilile iz tretiranih jaja. Ovaj rezidualni efekat bio je značajno niži od akaricidnog efekta ostvarenog direktnim tretiranjem larvi i protonimfi. Od svih tretiranih stadijuma, samo su letalne koncentracije za larve bile ispod maksimalne preporučene koncentracije za primenu biopesticida Naturalis-L (3 ml/l).

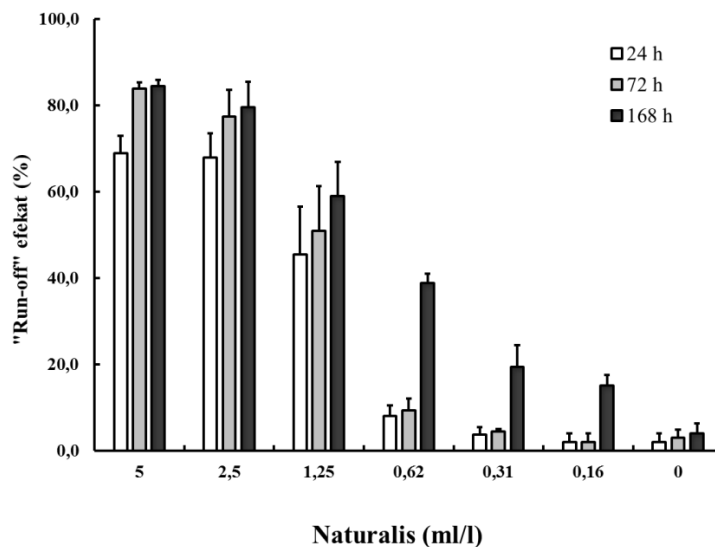
Tabela 20. Parametri toksičnosti biopesticida Naturalis-L (ml/l) za *T. urticae* nakon tretiranja različitih životnih stadijuma (E = jaja; L = larve; PN = protonimfe, DNf = deutonimfe ženke)

Životni stadijumi	n	LC ₅₀ (ml/l) (95% CL)	LC ₉₀ (ml/l) (95% CL)	b (± SE)	χ ²	df
E	1059	3,16_c (2,59 - 3,90)	9,52_c (6,94 - 16,46)	2,68 (± 0,19)	14,09	5
L	640	0,97_a (0,80 - 1,13)	1,99_a (1,66 - 2,65)	4,15 (± 0,42)	7,46	5
PN	730	1,57_b (1,38 - 1,79)	3,69_b (3,06 - 4,84)	3,45 (± 0,23)	7,76	5
DNf	650	3,85_d (3,52 - 4,18)	7,62_c (6,74 - 8,99)	4,32 (± 0,34)	0,67	4

LC vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (test odnosa letalnih doza, P=0,05)

n = broj tretiranih jedinki
 CL = interval poverenja
 b = nagib regresione krive
 df = stepeni slobode

Direktno tretiranje pre-ovipozicionih ženki biopesticidom Naturalis-L izazvalo je RO-efekat (Sl. 16). Procenat ženki koje su napustile lisne isečke iznosio je 2-69% (posle 24 h), 2-84% (posle 72 h) i 15-85% (posle 168 h). Biopesticid je primenjen u koncentracijama u rasponu 0,16 - 10 ml/l, ali je najviša koncentracija izostavljena iz prikazivanja rezultata, jer u ovom tretmanu posle 72 h više nije bilo živih ženki. Promena ponašanja bila je glavni efekat delovanja biopesticida u odnosu na smrtnost koja nije prelazila 8% (posle 24 h), 14% (posle 72 h) i 33% (posle 168 h) ukupnog broja tretiranih ženki.



Sl. 16. RO-efekat (%) 24 h, 72 h i 168 h nakon tretiranja pre-ovipozicionih ženki *T. urticae* biopesticidom Naturalis-L (mg/l)

Kao i u biotestu sa azadirahinom, i ovdje je izračunata je biološka efektivnost biopesticida Naturalis-L na osnovu zbira uginulih i RO-ženki (Tabela 21). Efektivne koncentracije na nivou 50% i 90% 168 h posle tretiranja preovipozicionih ženki bile su ispod preporučene koncentracije biopesticida, osim EC₉₀ za RO-efekat.

Tabela 21. Parametri efekata biopesticida Naturalis-L (ml/l) 168 h nakon tretiranja pre-ovipozicionih ženki *T. urticae* (n = 1120)

	EC ₅₀ (ml/l) (95% CL)	EC ₉₀ (ml/l) (95% CL)	b (± SE)	χ ² (df=4)
Biološka efektivnost	0,80_a (0,51 - 1,04)	2,34_a (1,85 - 3,30)	2,75 (± 0,26)	6,70
RO-efekat	1,01_b (0,75 - 1,30)	6,10_b (4,28 - 10,27)	1,64 (± 0,12)	5,83

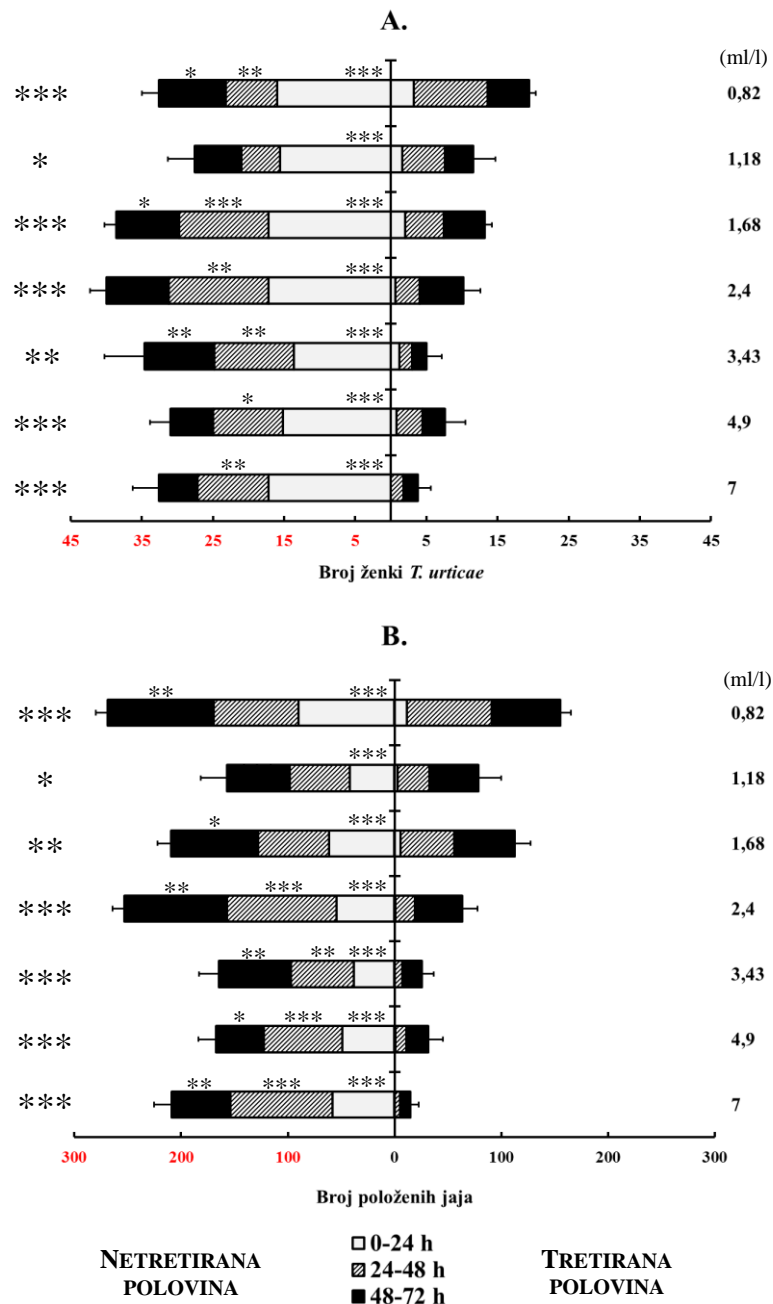
LC vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (test odnosa letalnih doza, P=0,05)

n = broj tretiranih jedinki; CL = interval poverenja; b = nagib regresione krive; df = stepeni slobode

4.4.2. Repelentni i deterentni efekti

Biopesticid Naturalis-L uticao je značajno na ponašanje ženki *T. urticae* (Sl. 17). Repelentni i deterentni efekti bili su najizraženiji 24 h od početka biotesta, kada su sve koncentracije biopesticida uzrokovale statistički značajan odgovor. Nakon naredna 24h značajna repelentnost takođe je zabeležena u svim tretmanima (osim koncentracije 1,18 ml/l), dok su značajnu deterentnost uzrokovale četiri najviše koncentracije. Deterentni efekat bio je

značajan u svim tretmanima, osim jednog, nakon poslednja 24 h; istovremeno, značajan repelentni efekat izostao je u većini tretmana. Posmatrani kumulativno, repelentni i deterentni efekti bili su statistički značajni u svim tretmanima.



Sl. 17. Repelentni (A) i deterentni (B) efekti biopesticida Naturalis-L (ml/l) na ženke *T. urticae* (dnevni i kumulativni broj ženki/položenih jaja na netretiranoj ili tretiranoj polovini lista 0-72 h od početka izlaganja, $M \pm SE$; *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, t-test)

Kumulativni indeksi repelentnosti (%) iznosili su: $78,3 \pm 9,9$ (7 ml/l); $61,9 \pm 12,2$ (4,9 ml/l); $75,1 \pm 12,1$ (3,43 ml/l); $60 \pm 7,7$ (2,4 ml/l); $49,2 \pm 2,5$ (1,68 ml/l), $41,9 \pm 11,6$ (1,18 ml/l) i $24,8 \pm 5,0$ (0,82 ml/l). Kumulativni indeksi deterentnosti (%) iznosili su: $86,2 \pm 6,5$ (7 ml/l);

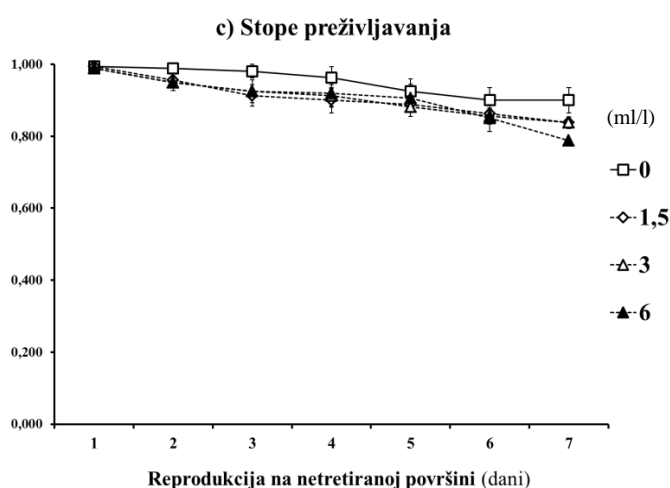
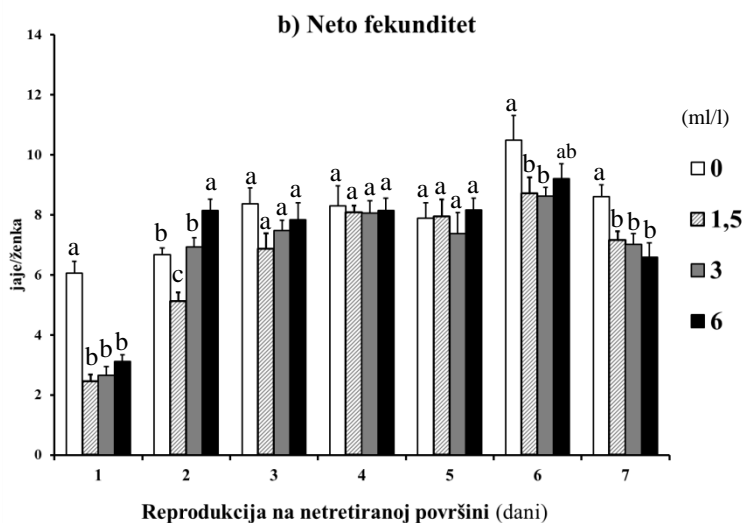
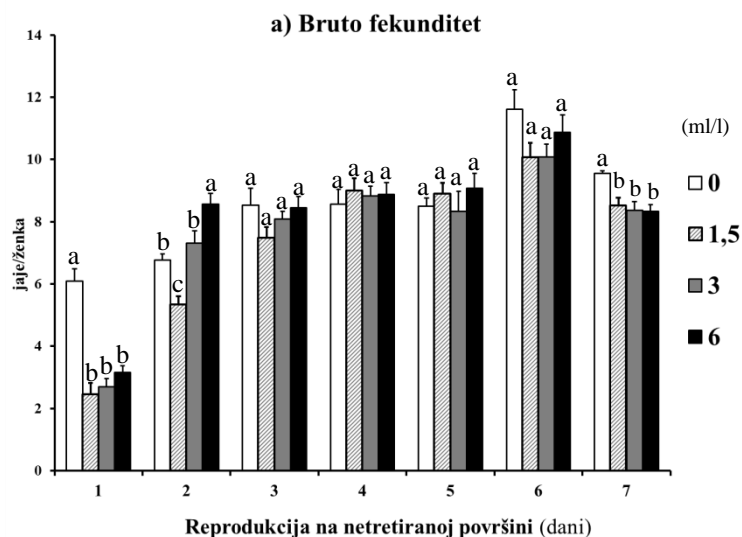
70,3±11,2 (4,9 ml/l); 73,8±11,3 (3,43 ml/l); 61,2±6,4 (2,4 ml/l); 30,4±6,9 (1,68 ml/l), 33,2±11,9 (1,18 ml/l) i 26,8±3,3 (0,82 ml/l).

Kontakt sa biopesticidom Naturalis-L uzrokovao je nisku smrtnost ženki: nakon 72 h ukupna smrtnost na obe polovine lista kretala se od 0,7±0,4% do 3,5±2,4%. Biopesticid je uzrokovao i RO-efekat koji je posle 72 h iznosio (%): 61±6,4 (7 ml/l); 51±6,2 (4,9 ml/l); 37±10,3 (3,43 ml/l); 21±7,5 (2,4 ml/l); 22±5,8 (1,68 ml/l), 47±9,7 (1,18 ml/l) i 23±6 (0,82 ml/l); približno 86% RO-ženki pronađeno je uz tretirane polovine listova.

4.4.3. Efekti na životne parametre i populacioni rast

Dnevne vrednosti bruto i neto fekunditeta ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje biopesticidom Naturalis-L u stadijumu jajeta i zatim bile izložene rezidualnom delovanju biopesticida tokom juvenilnog razvića prikazane su na slici 18. Sve tri koncentracije statistički značajno su redukovale bruto fekunditet prvog i sedmog dana reprodukcije odraslih ženki na netretiranoj površini. Značajne razlike između kontrole i tretmana utvrđene su još samo drugog dana reprodukcije: ženke u tretmanu koncentracijom 1,5 ml/l položile su manji, a ženke u tretmanu koncentracijom 6 ml/l veći prosečan broj jaja u poređenju sa ženkama u kontroli. Neto fekunditet takođe je bio statistički značajno redukovan u svim tretmanima prvog i sedmog dana reprodukcije, a i drugog dana reprodukcije zabeležen je isti efekat kao kod bruto fekunditeta. Jedina razlika između bruto i neto fekunditeta utvrđena je šestog dana reprodukcije, kada su tretmani koncentracijama 1,5 ml/l i 3 ml/l značajno redukovali neto ali ne i bruto vrednosti. Maksimalna redukcija fekunditeta (60%) zabeležena je prvog dana reprodukcije. Stope preživljavanja ženki u tretmanima i kontroli nisu se znatno razlikovale.

Biopesticid Naturalis-L značajno je redukovao sedmodnevni bruto fekunditet ženki *T. urticae* u tretmanima koncentracijama 1,5 ml/l (za 13,2%) i 3 ml/l (za 9,9%); bruto fekunditet ženki u tretmanu koncentracijom 6 ml/l nije se značajno razlikovao od kontrole, kao ni od odgovarajuće vrednosti u tretmanu koncentracijom 3 ml/l (Tabela 22). Sedmodnevni neto fekunditet takođe je bio značajno redukovan u tretmanima koncentracijama 1,5 ml/l (za 17,9%) i 3 ml/l (za 14,6%), dok se bruto fekunditet u tretmanu koncentracijom 6 ml/l nije značajno razlikovao od odgovarajućih vrednosti u drugim tretmanima i kontroli. Tretiranje nije značajno redukovalo prosečnu dužinu života ženki. Kao i kod neto fekunditeta, redukcija trenutne stope populacionog rasta zabeležena je u tretmanima koncentracijama 1,5 ml/l (za 4,8%) i 3 ml/l (za 4%), dok se r_i vrednost u tretmanu najvišom koncentracijom nije značajno razlikovala od ostalih r_i vrednosti.



Sl. 18. Dnevne vrednosti bruto fekunditeta (a) i neto fekunditeta (b) ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje biopesticidom Naturalis-L (ml/l) u stadijumu jajeta ($M \pm SE$; vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, ANOVA, Fisher LSD test); Stope preživljavanja ženki ($M \pm SE$)

Tabela 22. Životni parametri i populacioni rast ($M \pm SE$) ženki *T. urticae* preživelih tretiranje biopesticidom Naturalis-L (ml/l) u stadijumu jajeta

ml/l	<i>GF</i>	<i>NF</i>	<i>L</i>	<i>r_i</i>
6	57,31_{ab} (± 0,97)	51,18_{ab} (± 1,42)	6,33_a (± 0,20)	0,564_{ab} (± 0,004)
3	53,71_{bc} (± 1,75)	48,14_b (± 2,01)	6,35_a (± 0,14)	0,555_b (± 0,006)
1,5	51,77_c (± 1,09)	46,24_b (± 1,93)	6,35_a (± 0,15)	0,550_b (± 0,006)
0	59,62_a (± 1,53)	56,35_a (± 2,77)	6,65_a (± 0,17)	0,578_a (± 0,007)
<i>F_{3,12}</i>	6,60	4,37	0,83	4,19
<i>p</i>	<0,01	< 0,05	0,502	< 0,05

Srednje vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (ANOVA, Fisher LSD, $\alpha=0.05$)

GF= bruto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

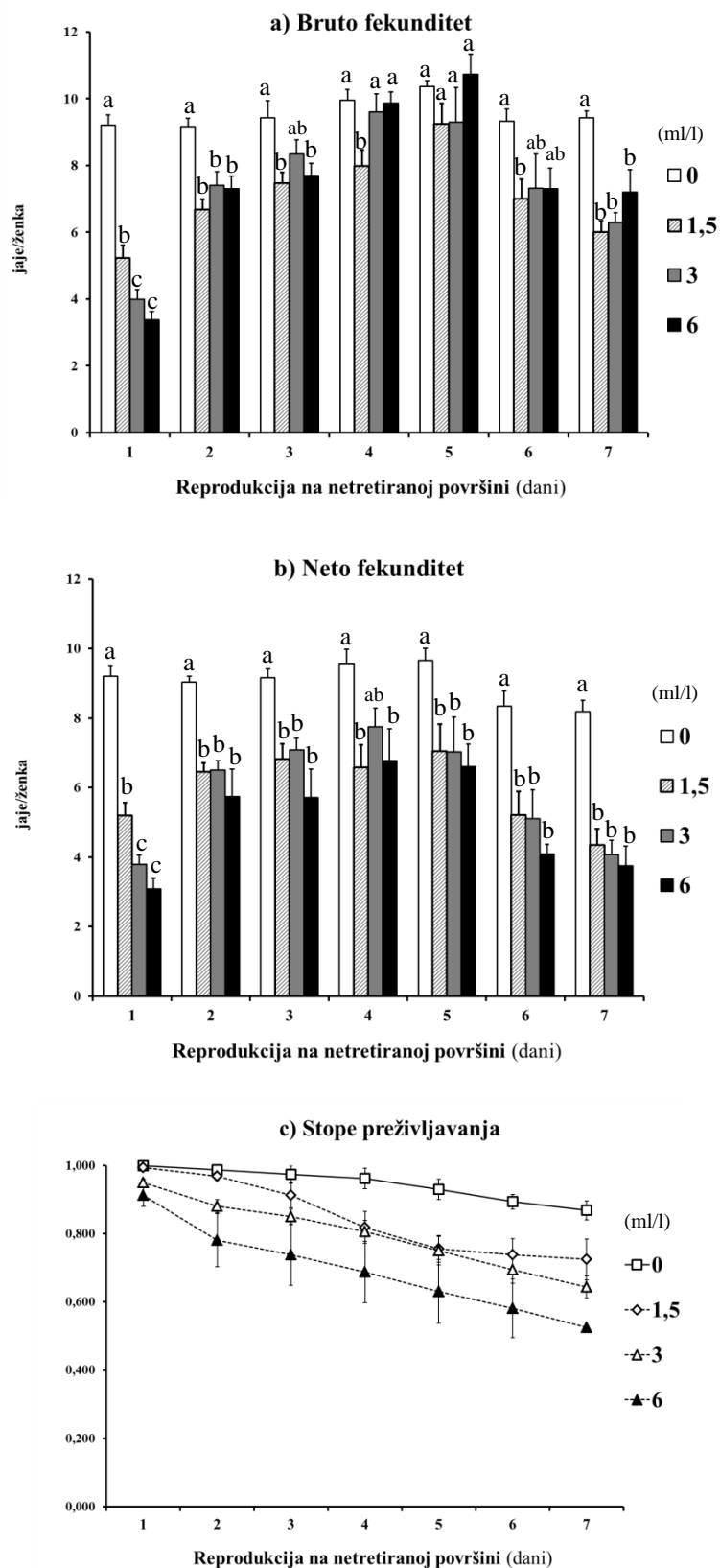
NF= neto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

L= dužina života ženki (dani)

r_i= trenutna stopa rasta populacije nakon sedmodnevne reprodukcije

Dnevne vrednosti fekunditeta ženki *T. urticae* preživelih tretiranje biopesticidom Naturalis-L u preovipozicionom periodu prikazane su na slici 19. Sve tri koncentracije statistički značajno su redukovale bruto fekunditet prvog, drugog i sedmog dana reprodukcije; maksimalna redukcija (63,4%) ostvarena je prvog dana. Značajno manji broj jaja u pojedinim tretmanima zabeležen je i trećeg, četvrtog i šestog dana reprodukcije. Neto fekunditet bio je statistički značajno redukovan u svim tretmanima od početka do kraja biotesta, osim u tretmanu koncentracijom 3 ml/l četvrtog dana reprodukcije. Maksimalna redukcija (66,4%) neto fekunditeta takođe je ostvarena prvog dana. Stope preživljavanja ženki u tretmanu najvišom koncentracijom bile su znatno niže od kontrole od početka do kraja biotesta, dok su u ostalim tretmanima znatne razlike zabeležene od trećeg ili četvrtog dana reprodukcije.

Biopesticid Naturalis-L značajno je redukovao sedmodnevni fekunditet ženki *T. urticae* u svim tretmanima (Tabela 23): bruto fekunditet za 20 - 25,8% a neto fekunditet za 34 - 43,4% u odnosu na kontrolu. Prosečna dužina života ženki bila je značajno redukovana samo u tretmanu najvišom koncentracijom, za 1,8 dana. Kao fekunditet, i trenutna stopa populacionog rasta statistički značajno je redukovana u svim tretmanima, za 10,3 - 14,7% u odnosu na kontrolu.



Sl. 19. Dnevne vrednosti bruto fekunditeta (a) i neto fekunditeta (b) ženki *T. urticae* koje su preživele tretiranje biopesticidom Naturalis-L (ml/l) u periodu preovipozicije ($M \pm SE$; vrednosti označene različitim slovima razlikuju se značajno, ANOVA, Fisher LSD test); (c) Stope preživljavanja ženki ($M \pm SE$)

Tabela 23. Životni parametri i populacioni rast ($M \pm SE$) ženki *T. urticae* preživelih tretiranje biopesticidom Naturalis-L (ml/l) u periodu preovipozicije

ml/l	<i>GF</i>	<i>NF</i>	<i>L</i>	<i>r_i</i>
6	53,47_b (±1,60)	35,77_b (± 4,18)	4,85_b (± 0,55)	0,507_b (± 0,018)
3	52,25_b (± 1,79)	41,35_b (± 2,381)	5,58_{ab} (± 0,17)	0,532_b (± 0,008)
1,5	49,63_b (± 1,78)	41,68_b (± 3,06)	5,92_a (± 0,23)	0,533_b (± 0,011)
0	66,88_a (± 1,44)	63,18_a (± 1,56)	6,62_a (± 0,12)	0,594_a (± 0,003)
<i>F_{3,12}</i>	19,91	12,93	5,05	9,94
<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,01

Srednje vrednosti u kolonama označene različitim slovima razlikuju se značajno (ANOVA, Fisher LSD, $\alpha=0.05$)

GF= bruto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

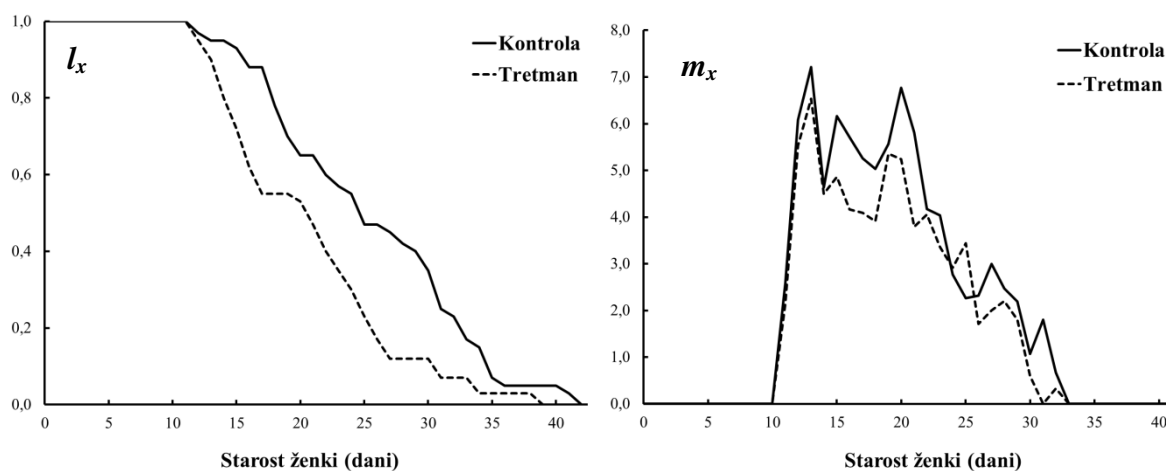
NF= neto fekunditet (suma nakon sedmodnevne reprodukcije)

L= dužina života ženki (dani)

r_i= trenutna stopa rasta populacije nakon sedmodnevne reprodukcije

4.4.4. Efekti na demografske parametre

Tretiranje jaja *T. urticae* biopesticidom Naturalis-L uzrokovalo je redukciju starosno-specifičnog preživljavanja od početka do kraja života odraslih ženki. Starosno-specifični fertilitet ženki u tretmanu takođe je bio niži od kontrolnog (sa jednim izuzetkom kod ženki starih 25 dana) s tim da su najveće razlike zabeležene kod ženki starosti 15-23 dana (Sl. 20).



Sl. 20. Starosno-specifično preživljavanje (l_x) i starosno-specifični fertilitet (m_x) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživjele tretiranje u stadijumu jajeta biopesticidom Naturalis-L (3ml/l)

Redukcija starosno-specifičnih funkcija uzrokovala je statistički značajnu redukciju demografskih parametara (Tab. 24). Bruto stopa reprodukcije redukovana je za 17,2% a neto stopa reprodukcije za 36,5% u odnosu na kontrolu; veća redukcija neto stope u poređenju sa bruto stopom posledica je kontinuirane redukcije l_x vrednosti tokom celog života odraslih ženki u tretmanu. Stope populacionog rasta u tretmanu bile su redukovane za svega 7,4% (r_m) i 2% (λ) u odnosu na kontrolu; iako male, ove razlike su ipak bile statistički značajne.

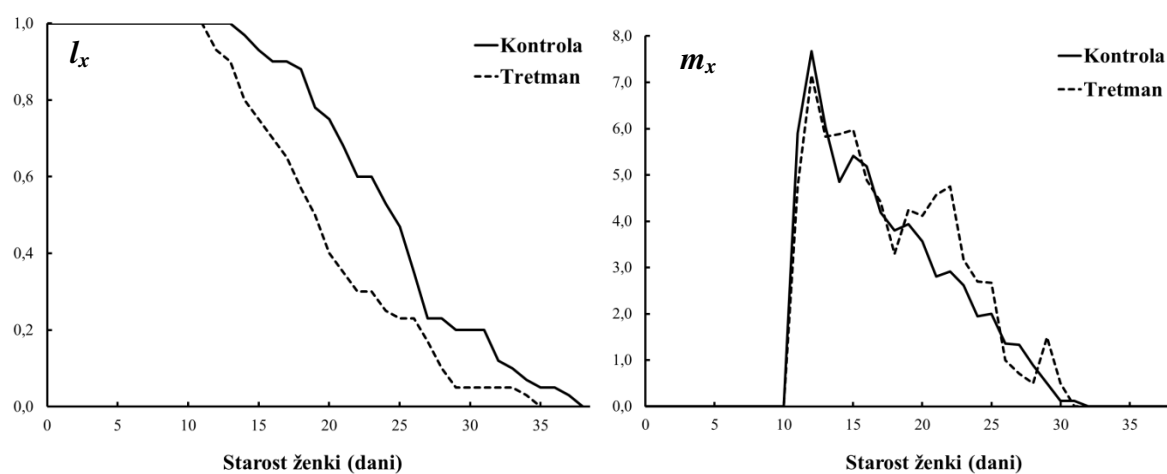
Tabela 24. Demografski parametri ($M \pm SE$) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u stadijumu jajeta biopesticidom Naturalis-L (3 ml/l)

	<i>GRR</i>	<i>R</i> ₀	<i>r</i> _m	λ	<i>T</i>
Kontrola	87,57_a (± 2,98)	63,80_a (± 4,85)	0,269_a (± 0,004)	1,309_a (± 0,005)	15,45_a (± 0,19)
Tretman	72,55_b (± 3,80)	40,50_b (± 4,41)	0,249_b (± 0,005)	1,283_b (± 0,007)	14,85_b (± 0,21)
<i>P</i>	0,00246	0,00041	0,00253	0,00235	0,03069

Srednje vrednosti demografskih parametara označene različitim slovima razlikuju se značajno (parni *bootstrap* test, $B = 100000$)

GRR = bruto stopa reprodukcije; *R*₀ = neto stopa reprodukcije; *r*_m = prirodna stopa rasta populacije; λ = konačna stopa rasta populacije; *T* = srednje vreme generacije

Tretiranje preovipozicionih ženki biopesticidom Naturalis-L takođe je uzrokovalo kontinuiranu redukciju l_x vrednosti (Sl. 21). Starosno-specifični fertilitet tretiranih ženki bio je neznatno niži u poređenju sa kontrolom u osam od ukupno 21 dana reprodukcije, dok su znatno više m_x vrednosti u tretmanu zabeležene kod ženki starosti 19-25 dana. Usled povećane



Sl. 21. Starosno-specifično preživljavanje (l_x) i starosno-specifični fertilitet (m_x) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u periodu preovipozicije biopesticidom Naturalis-L (3ml/l)

produkcije potomstva starijih ženki, bruto stopa reprodukcije u tretmanu bila je veća u poređenju sa kontrolom, ali ova razlika nije bila statistički značajna (Tabela 25). S druge strane, kontinuirana redukcija l_x vrednosti u tretmanu uzrokovala je statistički značajnu redukciju neto stope reprodukcije, za 21,1% u odnosu na kontrolu. Stope populacionog rasta u tretmanu takođe su bile su značajno redukovane, iako za svega 4,6% (r_m) i 1,3% (λ).

Tabela 25. Demografski parametri ($M \pm SE$) ženki *T. urticae*: **kontrola** = netretirane ženke; **tretman** = ženke preživele tretiranje u periodu previpozicije biopesticidom Naturalis-L (3ml/l)

	GRR	R_0	r_m	λ	T
Kontrola	67,21a (± 2,81)	55,18a (± 3,38)	0,281a (± 0,003)	1,324 a (± 0,004)	14,28a (± 0,14)
Tretman	72,65a (± 4,00)	43,52b (± 4,23)	0,268b (± 0,006)	1,307b (± 0,007)	14,11a (± 0,18)
<i>P</i>	0,29748	0,03106	0,03662	0,03597	0,43564

Srednje vrednosti demografski parametara označene različitim slovima razlikuju se značajno (parni *bootstrap* test, $B = 100000$)

GRR = bruto stopa reprodukcije; **R_0** = neto stopa reprodukcije; **r_m** = prirodna stopa rasta populacije; **λ** = konačna stopa rasta populacije; **T** = srednje vreme generacije

5. DISKUSIJA

Za ocenu efekata sintetskih i bioakaricida na *T. urticae* i druge tetranihide koriste se laboratorijske metode biotesta koje je moguće svrstati u nekoliko osnovnih tipova u zavisnosti od toga da li se kao odgovori uzimaju smrtnost, ponašanje, reprodukcija ili populacioni rast (Busvine, 1971; Stark i Banks, 2003; Robertson et al., 2007). Biotestovi se najčešće izvode na celim listovima ili lisnim isečcima biljaka domaćina (pasulj, krastavac i dr.) koji se prskaju ili, znatno ređe, potapaju u rastvor akaricida; grinje se postavljaju na lisnu površinu pre ili posle aplikacije. Tehnika potapanja predmetnog stakla sa zalepljenim grinjama u rastvor ("slidedip"), dosta primenjivana pre nekoliko decenija, danas se koristi sporadično (Dennehy et al., 1983; Helle i Overmeer, 1985; Kabir et al., 1993; Bostanian et al., 2009). Prilikom komparacije rezultata biotestova istog tipa treba imati u vidu sve elemente eksperimentalnog postupka tj. uzeti u obzir eventualne razlike u tehnikama aplikacije, načinu i trajanju ekspozicije, depozitu aktivne materije, ali i poreklo testiranih populacija/rasa (Robertson i Worner, 1990; Kabir et al., 1993; Kavousi et al., 2009).

5.1. Akaricidni i subletalni efekti biopesticida Kingbo

Preparat Kingbo je biopesticid formulisan na bazi oksimatrina (alkaloida hinolizidina) i psoralena (furanokumarina), supstanci koje spadaju u sekundarne metabolite biljaka čija je glavna uloga hemijska odbrana od fitofagnih artropoda i drugih organizama). Imajući u vidu eksperimentalno potvrđena insekticidna i antifidantna svojstva hinolizidina i furanokumarina, kao i sinergizam/antagonizam kao moguć ishod kombinovanja sekundarnih metabolita (Wink, 1992; Diawara et al., 1993; Berdegué et al., 1997; Wittstock i Gershenson, 2002; Mao i Henderson, 2007; Shields et al., 2008; Zanardi et al., 2015) biološki efekti zabeleženi u našem istraživanju povezani su sa preparatom Kingbo kao kombinacijom dve aktivne materije, a ne samo sa oksimatrinom ili psoralenom.

Rezultati biotestova toksičnosti biopesticida Kingbo za životne stadijume *T. urticae* pokazali su visoku osetljivost juvenilnih stadijuma (larvi, protonimfi i deutonimfi), višestruko manju osetljivost odraslih ženki, kao i izostanak ovicidnog efekta koncentracija koje su se pokazale kao visoko rezidualno toksične za larve ispijene iz tretiranih jaja. Najviše LC₉₀ vrednosti bile su daleko ispod 2 ml/l što je koncentracija preporučena za primenu ovog biopesticida. U literaturi ima malo dostupnih podataka o toksičnosti proizvoda koji sadrže

oksimatrin za grinje-paučinare. Kim et al. (2005) su utvrdili da metanolski ekstrakt *S. flavescens* uzrokuje smrtnost ženki *T. urticae* od 80% 48 h nakon tretiranja na lisnim isečcima koncentracijom 0,1 ml/l. Ispitujući toksičnost kombinacije oksimatrin + psoralen za ženke *T. cinnabarinus* u "slide dip" biotestu, Wang et al. (2009) su izračunali da LC_{50} iznosi 146 $\mu\text{g/l}$. U našem biotestu, u kojem je primenjen drugačiji metod aplikacije, 48 h nakon tretiranja preovipozicionih ženki *T. urticae* LC_{50} je iznosila 52,68 $\mu\text{l/l}$ preparata, što odgovara sadržaju aktivne materije od 316,08 $\mu\text{g/l}$ (preparat sadrži 2 g/l oksimatrina i 4 g/l psoralena).

Primenjen u koncentracijama 2000, 1000 i 500 $\mu\text{l/l}$ biopesticid Kingbo uticao je značajno na ponašanje ženki *T. urticae* u biotestu repelentnosti i deterentnosti. Značajno veći broj ženki zabeležen je na netretiranoj polovini lista u poređenju sa tretiranom 24 h časa nakon početka biotesta, dok je značajno veći broj jaja položen na netretiranu polovinu u prva dva dana; sva tri tretmana uzrokovala su značajan kumulativni efekat tokom tri dana. Ovo su prvi podaci o repelentnim efektima biopesticida Kingbo na grinje-paučinare. Testirajući repelentnost metanolskog ekstrakta *S. flavescens* u koncentraciji 0,1 ml/l, Kim et al. (2005) su izračunali da indeks repelentnosti za *T. urticae* nakon 72 h iznosi 57,8%. Ovo je znatno veći efekat u poređenju sa indeksom repelentnosti od 9,7% u tretmanu istom koncentracijom preparata Kingbo, ali je i ekstrakt koji su koristili pomenuti autori mešavina oksimatrina i drugih alkaloida u koncentracijama verovatno višestruko većim od koncentracije aktivne materije u preparatu. Pored promene ponašanja, u našem biotestu repelentnosti i deterentnosti zabeležena je i smrtnost ženki, koja je u tretmanima koncentracijama 1000 i 2000 $\mu\text{l/l}$ (odnosno 16,2 i 32,4 ng/cm^2 aktivne materije, ako je depozit 2,7 $\mu\text{l/cm}^2$) posle 24 h iznosila 21-23%, s tim da je 36% od ukupnog broja uginulih jedinki pronađeno na netretiranoj polovini lista. Ovi podaci pokazuju da je relativno kratkotrajan kontakt ženki *T. urticae* sa reziduama biopesticida primenjenog u preporučenoj ili dva puta manjoj koncentraciji dovoljan da uzrokuje značajnu smrtnost grinja.

Biopesticid Kingbo redukovao je vitalnost i fekunditet ženki *T. urticae* koje su na netretiranu površinu dospele nakon što su preživele tretiranje u stadijumu jajeta (i izloženost reziduama tokom juvenilnog razvića jedinki ispiljenih iz tretiranih jaja), odnosno tretiranje u periodu preovipozicije. Ženke tretirane koncentracijama 20-80 puta manjim od koncentracije preporučene za primenu živele su kraće i polagale manji jaja *per capita*, usled čega su i r_t vrednosti pokazivale redukciju populacionog rasta u poređenju sa kontrolom. Kod ženki tretiranih u stadijumu jajeta redukcija sedmodnevnog fekunditeta nije prelazila 29%, a redukcija trenutne stope rasta 9%. Redukcija je bila znatno izraženija kod ženki tretiranih u preovipozicionom periodu, posebno koncentracijama 50 i 100 $\mu\text{l/l}$ koje su uzrokovale

negativan populacioni rast tj. opadanje populacije. Demografsko-toksikološki biotest sa koncentracijom 50 $\mu\text{l/l}$ otkrio je još jedan efekat - usporavanje juvenilnog razvića ženki preživelih tretiranje u stadijumu jajeta, što povećava starost ženki u vreme prve reprodukcije i tako direktno snižava r_m vrednost (Birch, 1948; Snell, 1978; Carey, 1993) - i potvrdio nalaz o negativnom populacionom rastu nakon tretiranja previpozicionih ženki. Ovo su prvi podaci o subletalnim efektima biopesticida Kingbo na vitalnost i reprodukciju *T. urticae*.

Na osnovu letalnih i subletalnih efekata biopesticida Kingbo zabeleženih u našem istraživanju i posmatranih u kontekstu biologije *T. urticae* kao kolonizirajuće vrste, može se predvideti da će direktno tretiranje koncentracijom 100 $\mu\text{l/l}$ preparata (ili 1,62 ng/cm^2 a.m.) eliminisati veliki deo populacije i uzrokovati njeno opadanje, dok bi nakon tretiranja koncentracijama 25-50 $\mu\text{l/l}$ populacija zadržala sposobnost oporavka na netretiranoj površini, uglavnom reprodukcijom ženki koje prežive tretiranje u stadijumu jajeta. Koncentracije višestruko veće od 100 $\mu\text{l/l}$ u potpunosti bi eliminisale populaciju, ali bi repelentni i deterentni efekti relativno visokih koncentracija, uključujući i preporučenu za primenu, omogućili obnavljanje populacije ovipozicijom na netretiranoj površini.

5.2. Akaricidni i subletalni efekti azadirahtina

Biološki profil akutne toksičnosti azadirahtina za jaja i juvenilne stadijume *T. urticae* pokazao se kao sličan profilu biopesticida Kingbo: izostanak ovicidnog efekta praćen je visokom rezidualnom toksičnošću za ispiljene larve, utvrđena je visoka osetljivost direktno tretiranih larvi i protonimfi, a najviša LC_{90} bila je niža od koncentracije preporučene za primenu (50 mg/l). Do sličnih rezultata testiranja ovicidnosti azadirahtina za jaja *T. urticae* došli su i drugi autori. Mironova i Khorkhordin (1997) ustanovili su da preparat NeemAzal-T/S nije delovao ovicidno u koncentracijama aktivne materije od 10 mg/l i 30 mg/l . Testirajući drugi preparat na bazi azadirahtina, takođe koncentrat za emulziju, Castagnoli et al. (2005) i Duso et al. (2008) ustanovili su da koncentracija aktivne materije od 45 mg/l ne deluje ovicidno. Primenjen u koncentraciji aktivne materije od 50 mg/l , preparat NeemAzal-T/S uzrokovao je ovicidni efekat od 13% (Basha i Kelany, 2001), 27% (Mironova i Khorkhordin, 1997) i 47% (Kim et al., 2000). Značajan ovicidni efekat preparata NeemAzal-T/S na *T. urticae* zabeležili su Dimetry et al. (2008) koji su dobili LC_{50} i LC_{90} vrednosti od 47 i 1230 mg/l azadirahtina. Hernandez et al. (2012) su ispitivali ovicidnost drugog preparata, takođe formulisanog kao koncentrat za emulziju, i izračunali LC_{50} i LC_{90} vrednosti od 333 i 1740 mg/l ; vodeni depozit preparata apliciranog pomoću Potter sprayer-a iznosio je 5

mg/cm², skoro dvostruko više nego u našem biotestu. Iako se metode aplikacije u ovim radovima razlikuju (samim tim i količine aktivne materije po jedinici površine), navedeni rezultati pokazuju da je za postizanje značajnijeg ovicidnog efekta potrebna relativno visoka koncentracija, jednaka ili veća od preporučene. Primenjen u nekoliko puta nižim koncentracijama azadirahthin ne deluje ovicidno, ali su larve ispijane iz tretiranih jaja visoko osetljive na rezidue ovog biopesticida. Ovde treba napomenuti da proizvodi na bazi azadirahthina koji sadrže ulje iz semena *A. indica* mogu da ostvare značajan ovicidni efekat, zahvaljujući fizičkom delovanju ulja na tretirana jaja (Tsolakis et al., 2002; Brito et al., 2006).

O toksičnosti azadirahthina za juvenilne stadijume *T. urticae* ima malo podataka. Veću osetljivost juvenilnih stadijuma u odnosu na jaja zabeležili su Mironova i Khorkhordin (1997), koji su utvrdili da preparat NeemAzal-T/S uzrokuje smrtnost larvi i nimfi 100%, primenjen u koncentraciji aktivne materije od 50 mg/l. Takođe, Hernandez et al. (2012) suza larve, protonimfe i deutonimfe dobili LC₅₀ i LC₉₀ vrednosti u rasponu 82-101 mg/l odnosno 223-448 mg./l, značajno niže od odgovarajućih vrednosti ovicidnog delovanja.

Tretiranje preovipozicionih ženki *T. urticae* azadirahthinom izazvalo je RO-efekat, kao dominantni efekat u odnosu na smrtnost. Napuštanje tretirane površine nakon direktnog tretiranja i/ili izlaganja reziduama (repelentni ili RO-efekat) često se beleži u biotestovima sa ženkama tetranihida i proizvodima na bazi azadirahthina, a njegov intenzitet u poređenju sa smrtnošću varira u zavisnosti od koncentracije i vrste proizvoda (Mansour et al., 1993, 1997; Sundaram i Sloane, 1995; Kashenge i Makundi, 2001; Brito et al., 2006; Dabrowski i Seredyńska, 2007). Ima i radovakoji izveštavaju o smrtnosti ženki *T. urticae* tretiranih preparatom NeemAzal-T/S (Mironova i Khorkhordin, 1997; Kim et al., 2000; Basha i Kelany, 2001; Dimetry et al., 2008) ili drugim sličnim preparatima (Knapp i Kashenge, 2003; Castagnoli et al., 2005; Duso et al., 2008; Hernandez et al., 2012) ali u kojima nema podataka o repelentnosti, iako su korišćene metode koje omogućavaju grinjama napuštanje tretirane površine. Smrtnost zabeležena u ovim radovima bila je različita u zavisnosti od primenjenih koncentracija, načina aplikacije, trajanja ekspozicije, ali i porekla testiranih populacija. Ukoliko RO-efekat nije zanemaren (Knapp i Kashenge, 2003), njegov izostanak takođe može da bude posledica različite metodologije i/ili različitog porekla testiranih populacija/rasa *T. urticae*.

Kao parametar odgovora ženki tretiranih azadirahthinom u našem biotestu korišćena je biološka efektivnost, koja je izračunata na osnovu zbira uginulih i RO-ženki. Ovakav pristup primenjivan je u jednom broju radova u kojima je proučavana promena ponašanja grinja izloženih delovanju piretroida i još nekih akaricida (Fisher i Wrensch, 1986; Knight et al.,

1990; Riedl i Shearer, 1991; Blümel i Hausdorf, 2002). Polazeći od pretpostavke da će grinje koje napuste tretiranu površinu lista uginuti ili usled dospevanja na drugu tretiranu površinu ili usled nemogućnosti ishrane, ako potpuno napuste biljku-domaćina, RO-efekat akaricida treba posmatrati kao indirektnu smrtnost i uključiti u ukupnu smrtnost (biološku efektivnost) zajedno sa direktnom smrtnošću grinja koje ostanu na tretiranoj površini (Fisher i Wrensch, 1986). Posmatrajući LC vrednosti dobijene u našim biotestovima za jaja i juvenilne stadijume *T. urticae*, koncentracija azadirahtina preporučena za primenu (50 mg/l = 135 ng/cm²) eliminisala bi znatan deo populacije. Većina mladih odraslih ženki napustila bi tretiranu površinu, imajući u vidu EC₅₀ i EC₉₀ vrednosti RO-efekta. U uslovima heterogene distribucije aktivne materije i mogućnosti da jedan deo RO-ženki dospe na slabije tretirane ili netretirane površine (Saenz-de-Cabezón Irigaray i Zalom, 2009; Martini et al., 2012) koncept biološke efektivnosti tj. uključivanja RO-efekta u smrtnost, treba zameniti konceptom oporavka populacije zasnovanom na reproduktivnom potencijalu RO-ženki.

Biotest sa mogućnošću izbora između tretirane i netretirane površine pokazao je da preparat NeemAzal-T/S, primenjen u rasponu koncentracija od 1,56-50 mg/l aktivne materije, uzrokuje značajne repelentne i deterentne efekte u prva 24 h; efekti u tretmanu preporučenom koncentracijom bili su značajni i u narednih 48 h. Repelentni i deterentni efekti različitih proizvoda na bazi azadirahtina, primenjenih u preporučenoj ili manjim koncentracijama, zabeleženi su i u drugim radovima sa *T. urticae* u kojima je korišćen ovaj tip biotesta (Dimetry et al., 1993, Sundaram i Sloane, 1995; Kim et al., 2000; Kashenge i Makundi, 2001; Tsolakis et al., 2002; Knapp i Kashenge, 2003; Brito et al., 2006; Estevez Filho, 2012). Pored repelentnosti i deterentnosti, u našem biotestu zabeležen je i RO-efekat, jer je jedan deo ženki (u tretmanu koncentracijom 50 mg/l više od polovine) potpuno napustio lisnu površinu, s tim da je oko 80% ženki to učinilo sa tretirane polovine. I drugi autori zabeležili su RO-efekat u ovom tipu biotesta: Sundaram i Sloane (1995) uključili su RO-ženke u izračunavanje repelentnog efekta, dok su Knapp i Kashenge (2003) postupili suprotno. Kako god da se tretira, postojanje RO-efekta kada je moguć izbor između tretirane i netretirane polovine pokazuje snažan uticaj azadirahtina na lokomotornu aktivnost *T. urticae* i umanjuje potencijal oporavka populacije. Suprotno preparatu Kingbo, azadirahtin je uzrokovao nisku smrtnost ženki koje su u biotestu repelentnosti i deterentnosti mogle da prelope sa jedne na drugu polovinu lista, što ukazuje na relativnu sporost delovanja ovog biopesticida. Nisku smrtnost ženki u ovom tipu biotesta zabeležili su i Dimetry et al. (1993), Sundaram i Sloane (1995) i Tsolakis et al. (2002).

Redukcija fekunditeta gotovo redovno se beleži kao značajan subletalni efekat u biotestovima sa ženka *T. urticae* (Sundaram i Sloane, 1995; Mansour et al., 1997; Mironova i Khorkhordin, 1997; Kim et al., 2000; Basha i Kelany, 2001; Tsolakis et al., 2002; Martinez-Villar et al., 2005; Dimetry et al., 2008). U našem biotestu, u kojem su preovipozicione ženke *T. urticae* tretirane koncentracijama azadirachtina 17,5-70 mg/l i nakon 24 h prebačene na netretiranu površinu, utvrđena je redukcija fekunditeta 20-30%. Koristeći isti preparat, Dimetry et al. (2008) su zabeležili redukciju fekunditeta od 59% kod ženki tretiranih u preovipozicionom periodu kombinacijom 8,6 mg/l azadirachtina (LC₅₀, 48 h) i nejonskog surfaktanta i prebačenih na netretiranu površinu nakon sušenja depozita. Osim mogućeg uticaja različitog porekla testiranih populacija *T. urticae*, znatno veća redukcija fekunditeta ostvarena manjim koncentracijama može se povezati i sa delovanjem surfaktanta. Primenjen u preporučenoj koncentraciji u biotestovima sa različitim populacijama *T. urticae*, preparat NeemAzal-T/S redukovao je fekunditet ženki direktno tretiranih i zadržanih na tretiranoj površini za 27% (Basha i Kelany, 2001) odnosno 95% (Kim et al., 2000), dok je višednevno izlaganje reziduama ovog biopesticida praktično zaustavilo polaganje jaja (Mironova i Khorkhordin, 1997). I drugi preparati na bazi azadirachtina redukovali su fekunditet tretiranih ženki (Dimetry et al., 1993; Sundaram i Sloane, 1995; Mansour et al., 1997; Tsolakis et al., 2002; Martinez-Villar et al., 2005), ali ima i primera da tretiranje nije uzrokovalo značajnu redukciju broja položenih jaja (Castagnoli et al., 2005; Duso et al., 2008). O reprodukciji ženki *T. urticae* preživelih tretiranje u stadijumu jajeta proizvodima na bazi azadirachtina nema dostupnih podataka, tako da su naši rezultati verovatno prvi ovakve vrste. Pored toga, iako se u literaturi nailazi i na podatke o redukciji prosečne dužine života ženki preživelih tretiranje azadirachtinom (Martinez-Villar et al., 2005; Dimetry et al., 2008), većina autora prilikom evaluacije efekata na fekunditet ne uzima u obzir vitalnost ženki tj. broj položenih jaja iskazuje se samo kao bruto parametar. U našem istraživanju praćene su i stope preživljavanja ženki tako da su efekti azadirachtina na vitalnost i reprodukciju integrisani i iskazani kao neto parametar. Takođe, posebno je utvrđena i redukcija prosečne dužine života tretiranih ženki.

O efektima biopesticida na bazi azadirachtina na *T. urticae* iskazanim promenama vrednosti populacionih parametara ima malo podataka. Stark et al. (1997) zabeležili su nakon direktnog tretiranja i sedmodnevnog izlaganja ženki reziduama azadirachtina primenjenog u koncentracijama 125-1000 mg/l (znatno većim od preporučene za primenu), progresivno opadanje vrednosti trenutne stope rasta sve do izumiranja populacije; autori su koristili isti način aplikacije kao u našem biotestu, proizvevši nešto manji vodeni depozit (2,2 mg/cm²).

Najviša primenjena koncentracija unašem istraživanju (70 mg/l), u kojem su ženke nakon direktnog tretiranja izlagane reziduama biopesticidu svega 24 h, ostvarila je redukciju r_i vrednosti na nivou sličnom onom koji su Stark et al. (1997) postigli primenom 125 mg/l azadirahatina. Martinez-Villar et al. (2005) zabeležili su negativnu vrednost prirodne stope populacionog rasta ($r_m = -0,033$) nakon direktnog tretiranja ženki *T. urticae* koncentracijom azadirahatina od 80 mg/li njihovog zadržavanja na tretiranoj površini do kraja života. Ovakav efekat nastao je kao posledica redukcije starosno-specifičnog preživljavanja i starosno-specifičnog fekunditeta tretiranih ženki. U našem demografsko-toksikološkom biotestu, direktnim tretiranjem i jednodnevnim izlaganjem ženki reziduama azadirahatina primenjenog u koncentraciji 35 mg/l ostvarena je značajna redukcija r_m vrednosti, ali ne i opadanje populacije, takođe usled redukcije preživljavanje i reprodukcije ženki u tretmanu. Drugi demografsko-toksikološki biotest pokazao je da azadirahatin usporava juvenilno razviće jedinki ispiljenih iz tretiranih jaja, što direktno redukuje stopupopulacionog rasta (Birch, 1948; Snell, 1978; Carey, 1993). Iako podaci o dužem trajanju preadultnih stadijuma *T. urticae* uzrokovanom tretiranjem azadirahatinom postoje u literaturi (Sundaram i Sloane, 1995; Dimetry et al., 2008), ovo je prvi nalaz u kontekstu uticaja na stope populacionog rasta.

Evaluacija letalnih i subletalnih efekata azadirahatina na *T. urticae* našem istraživanju pokazala je da bi tretiranje preporučenom koncentracijom (50 mg/l) eliminisalo veliki deo populacije, ali i da je moguć njen oporavak na netretiranoj ili slabije tretiranoj površini zahvaljujući snažnim repelentnim i deterentnim efektima ovog biopesticida, kao i značajnom reproduktivnom potencijalu ženki koje prežive direktno tretiranje.

5.3. Akaricidni i subletalni efekti spinosada

Biološki profil akutne toksičnosti spinosada za razvojne stadijume *T. urticae* pokazao je izvesnu sličnost sa profilima ostalih biopesticida jer je zabeležen zanemarljiv ovicidni efekat, praćen visokom rezidualnom toksičnošću za ispiljene larve, i utvrđeno da su direktno tretirane larve i protonimfe najosetljiviji stadijumi. Međutim, sve LC vrednosti (osim LC₅₀ za larve i protonimfe) bile su na nivou ili veće od koncentracija preporučenih za primenu u suzbijanju insekata, koje se kreću u rasponu 60 - 300 mg/l (Jones et al., 2005; Van Leeuwen et al., 2005; Villanueva i Walgenbach, 2006). Iako postoje izvesne metodološke razlike, rezultati naših biotestova uporedivi su sa rezultatima drugih autora koji su ispitivali akutnu toksičnost spinosada za *T. urticae*. Na osnovu podataka o smrtnosti ženki izloženih 48 h reziduama spinosada Van Leeuwen et al. (2005) su izračunali LC₅₀ koja je iznosila 22 mg/l,

dok su Villanueva i Walgenbach (2006) utvrdili da rezidualno delovanje ovog biopesticida, primenjenog u rasponu koncentracija 25-266 mg/l, posle 48 h uzrokuje smrtnost ženki 18-26%, a posle 96 h smrtnost 63-81%. Ismail et al. (2007) direktno su tretirali ženke spinosadom i izračunali LC_{50} od 24 mg/l. Ovi autori su takođe ustanovili da se larve ispile iz 88% jaja tretiranih spinosadom u koncentraciji 40 mg/l, ali i da ispiljene larve uginu usled rezidualnog delovanja. Visoka toksičnost za larve zabeležena je i nakon njihovog izlaganja reziduama spinosada apliciranog u koncentracijama 25-266 mg/l (Villanueva i Walgenbach, 2006).

Podataka o subletalnim efektima spinosada na tetranihide ima malo. Villanueva i Walgenbach (2006) utvrdili su da 96-časovno izlaganje ženki *T. urticae* reziduama spinosada (25-266 mg/l) redukuje fekunditet za 67-84%. Ismail et al. (2007) zabeležili su redukciju fekunditeta od 93 % kod ženki direktno tretiranih spinosadom (10 mg/l) i zadržanih 72 h na tretiranoj površini. Rezultati našeg biotesta, u kojem su preovipozicione ženke direktno tretirane i naredna 24 h izložene rezidualnom delovanju spinosada (60-240 mg/l), pokazali su značajnu, ali znatno manju redukciju fekunditeta (16-17%). Još manja redukcija fekunditeta (4-6%) zabeležena je u biotestu u kojem je praćen fekunditet ženki preživelih tretiranje istim koncentracijama u stadijumu jajeta i rezidualno delovanje tokom juvenilnog razvića. U našem istraživanju efekti spinosada na vitalnost i reprodukciju integrisani su kao neto fekunditet, jer je osim broja položenih jaja praćeno i preživljavanje ženki.

Naši rezultati evaluacije subletalnih efekata spinosada na nivou populacije prvi su ovakvi rezultati za tetranihide. Usled redukcije fekunditeta i stopa preživljavanja ženki, tretiranih u stadijumu jajeta ili preovipozicionom periodu, zabeležena je mala (2-9%) ali statistički značajna redukcija r_i vrednosti nakon sedmodnevne reprodukcije na netretiranoj površini. Demografsko-toksikološki biotest u kojem su tretirane preovipozicione ženke potvrdio je ovaj nalaz. Drugi ovakav biotest, u kojem je tretiranje izvršeno u stadijumu jajeta, pokazao je drugačije rezultate: prirodna stopa rasta u tretmanu bila je statistički značajno veća u odnosu na kontrolu, iako za svega 4,1%. Ovakav rezultat nastao je kao posledica većeg starosno-specifičnog fertiliteta tretiranih ženki u prvih šest dana reprodukcije, jer visina fertiliteta u početnoj fazi reprodukcije u velikoj meri određuje visinu r_m vrednosti (Birch, 1948; Carey, 1993). Različite nalaze moguće je bar delimično povezati sa metodološkim razlikama između dva tipa biotesta: u sedmodnevnom biotestu utvrđivan je broj položenih jaja, a u demografskom biotestu broj ženskog potomstva, s tim da je u prvom slučaju praćena reprodukcija pet ženki, a u drugom slučaju jedne ženke po lisnom isečku. Komparacija fekunditeta i fertiliteta između kontrole i tretmana u demografskom biotestu pokazuje da je u

prvih šest dana reprodukcije u tretmanu broj položenih jaja bio za 6,6%, a broj ženskog potomstva za 21,2% veći u odnosu na kontrolu. Drugim rečima, razlika između kontrole i tretmana dodatno je uvećana pomeranjem odnosa polova u potomstvu u korist ženki.

Stimulacija fekunditeta i populacionog rasta tetranihida zabeležena je kao posledica izlaganja akaricidima različitih mehanizama delovanja, primenjenih u širokom rasponu koncentracija (Jones i Parella, 1984; Marčić, 2003; He et al., 2011; Cordeiro et al. 2013). U našem demografskom biotestu, stimulativni odgovor zabeležen je kod ženki preživelih tretiranje u stadijumu jajeta koncentracijom spinosada na nivou LC_{50} za ovaj stadijum. Ovo nije dovoljno da se govori o hormezi, jer potvrđivanje nekog odnosa doza-odgovor kao odnosa koji poseduje svojstva hormetičkog bifaznog modela zahteva primenu biotesta sa većim brojem doza raspoređenih tako da pokriju i stimulaciju i inhibiciju (Calabrese, 2005; Cordeiro et al., 2013; Cutler, 2013). Činjenica da je stimulacija populacionog rasta *T. urticae* nedavno zabeležena i kao posledica tretiranja spinetoramom (Wang et al., 2016) ukazuje na značaj daljih istraživanja subletalnih efekata jedinjenja iz klase spinosina.

Posmatrani u kontekstu populacione strukture i dinamike *T. urticae*, naši rezultati pokazuju da je nakon tretiranja preporučenim koncentracijama spinosada ($60-240 \text{ mg/l} = 162-648 \text{ ng/cm}^2$) moguć relativno brz oporavak na netretiranoj lisnoj površini, jer ove koncentracije ne eliminišu znatan deo populacije niti bitno umanjuju reproduktivni potencijal preživelih jedinki.

5.4. Akaricidni i subletalni efekti biopesticida Naturalis-L

Biopesticid Naturalis-L je preparat formulisan u obliku koncentrovane suspenzije konidija *B. bassiana* u ulju soje kao nosaču. Uljne formulacije pojačavaju efekat mikro-pesticida verovatno usled poboljšanog pričvršćivanja konidija za integument artropoda i unapređene zaštite konidija od negativnog uticaja abiotičkih faktora (Wraight et al., 2001; Shi et al. 2008). Imajući u vidu letalne i subletalne efekte različitih biljnih ulja zabeležene na tetranihidama (Pless et al., 1995; Lancaster et al., 2002; Tsolakis i Ragusa, 2008; Marčić et al., 2009; Pavela et al., 2009) rezultati naših biotestova povezani su sa formulisanim preparatom kao kombinacijom konidija i biljnog ulja, a ne samo sa konidijama *B. bassiana*. Koncentracije preparata Naturalis-L iskazane su kao koncentracije konidija u 1 ml tečnosti ili kao broj konidija po cm^2 jedino radi poređenja sa rezultatima drugih autora.

Biološki profil akutne toksičnosti/patogenosti preparata Naturalis-L dobijen u našim biotestovima pokazao je, slično kao kod prethodnih biopesticida, da su larve *T. urticae*

najosetljiviji juvenilni stadijum i da se osetljivost na ovaj biopesticid smanjuje sa odmicanjem razvića, kao i da je ovicidni efekat zanemarljiv, ali ne i rezidualni larvicidni efekat. Slično kao u biotestu sa azadirachtinom, direktno tretiranje ženki pokazalo je da je napuštanje tretirane površine dominantni efekat u odnosu na smrtnost. Testiranje akaricidnih efekata preparata Naturalis-L u laboratorijskim biotestovima bilo je predmet interesovanja drugih autora. Tako su Sáenz-de-Cabezón Irigaray et al. (2003) utvrdili da je tretiranje jaja *T. urticae* koncentracijom $2,3 \times 10^4$ konidija/ml uzrokovalo ovicidni efekat manji od 50%, dok su LC_{50} i LC_{90} (konidija/ml) za juvenilne stadijume iznosile $3,2 \times 10^3$ i $2,7 \times 10^4$, a za adulte $1,9 \times 10^3$ i $1,3 \times 10^5$, uz nagibe regresionih linija 1,38 i 0,70. Iskazane kao broj konidija/cm² (depozit $9,6 \mu\text{l/cm}^2$) ove vrednosti su iznosile: 221 (ovicidni efekat), 31 i 259 (juvenilni stadijumi) i 19 i 1248 (adulti). Rezultati ovih autora uporedivi su sa rezultatima naših biotestova u kojima su za juvenilne stadijume *T. urticae* dobijene LC_{50} vrednosti u rasponu $2,2-8,9 \times 10^4$ konidija/ml ($60-239$ konidija/cm²) i LC_{90} vrednosti u rasponu $4,6 \times 10^4-1,8 \times 10^5$ konidija/ml ($124-473$ konidija/cm²), dok su za akaricidni efekat nakon tretiranja jaja LC_{50} i LC_{90} vrednosti iznosile $7,3 \times 10^4$ konidija/ml (196 konidija/cm²) i $2,2 \times 10^5$ konidija/ml (591 konidija/cm²). Pored znatno većih vrednosti nagiba regresione linije u našim biotestovima sa preadultnim stadijumima ($3,45-4,32$), razlika je i u tome što su Sáenz-de-Cabezón Irigaray et al. (2003) pratili piljenje tretiranih jaja, ali ne i preživljavanje ispiljenih larvi na tretiranoj površini. Takođe, tretiranje adulta u našem biotestu pokazalo je da je RO-efekat dominantan, sa EC_{50} i EC_{90} vrednostima koje su iznosile $2,3 \times 10^4$ konidija/ml (63 konidija/cm²) i $1,4 \times 10^5$ konidija/ml (379 konidija/cm²), uz nagib regresione linije 1,64.

Drugi autori koji su testirali akaricidna svojstva preparata Naturalis-L dobili su različite rezultate. Chandler et al. (2005) zabeležili su sedam dana nakon direktnog tretiranja ženki *T. urticae* koncentracijom 1×10^5 konidija/ml smrtnost od 52%, bez podataka o RO-efektu. Tretirajući ženke koncentracijom preporučenom za primenu i ocenjujući efekat posle tri dana, Castagnoli et al. (2005) dobili su smrtnost od 8%, pri čemu su RO-jedinke isključili iz analize akaricidnog efekta, dok su Duso et al. (2008) zabeležili smrtnost od 33%, koristeći tehniku koja sprečava napuštanje tretirane površine. Ovi autori su testirali i ovicidno delovanje, zabeleživši ovicidni efekat od 28% (Castagnoli et al., 2005) odnosno 96% (Duso et al., 2008). Testiranje patogenosti drugih izolata/sojeva *B. bassiana* (Chandler et al., 2005; Maniania et al., 2008; Shi et al., 2008; Seiedy et al., 2010; Bugeme et al., 2014; Seyed-Talebi et al., 2014; Ullah i Lim, 2015) takođe je pokazalo znatne varijacije osetljivosti adulta i drugih stadijuma *T. urticae*.

Pored RO-efekta zabeleženog nakon direktnog tretiranja ženki *T. urticae*, biopesticid Naturalis-L uzrokovao je značajne repelentne i deterentne efekte u našem biotestu sa mogućnošću izbora između tretirane i netretirane površine. Ovi efekti verovatno su posledica delovanja ulja soje, koje kao nosač čini oko 93% sadržine preparata. Poznato je da biljna ulja, formulisana kao preparati za folijarno tretiranje, utiču na ponašanje insekata i grinja prilikom ishrane i ovipozicije (Lopez et al., 2003; Tsolakis i Ragusa, 2008; Yang et al., 2010; Hidayat et al., 2013), što se povezuje sa stvaranjem fizičke barijere na tretiranoj površini, maskiranjem atraktanata biljke domaćina i/ili delovanjem pojedinih komponenti ulja na olfaktorne receptore artropoda. Testirajući repelentne i deterentne efekte preparata na bazi ulja na trešnjinu muvu, *Rhagoletis cerasi* (L.) (Diptera: Tephritidae), Daniel (2014) je u oglede uključila i preparat Naturalis-L zbog visokog sadržaja ulja u formulaciji. Primenjen u koncentraciji 2,5 ml/l za tretiranje plodova trešnje, preparat je višestruko redukovao broj položenih jaja, slično kao i ostali testirani preparati; redukcija ovipozicije zabeležena je i kada su plodovi tretirani formulacijom preparata Naturalis-L koja ne sadrži konidije *B. bassiana*. Na osnovu ovih rezultata i zapažanja o ponašanju ženki *R. cerasi*, autorka je zaključila da je reč o efektu koji je prevashodno nastao kao posledica prekrivanja tretirane površine uljem.

Efekti izolata i formulacija *B. bassiana* na parametre životne istorije i populacionog rasta *T. urticae* predmet su malog broja radova. Ocenjujući efekat preporučene koncentracije preparata Naturalis-L na fekunditet ženkinakon direktnog tretiranja i 72-časovne izloženosti reziduama Castagnoli et al. (2005) su utvrdili da broj položenih jaja nije redukovano, dok su Duso et al. (2008) zabeležili značajnu redukciju fekunditeta; suprotni nalazi ovih autora, koji su koristili istu eksperimentalnu tehniku, verovatno su posledica različitog porekla testiranih populacija. Shi i Feng (2009) tretirali su ženke starosti do dva dana koncentracijom 1×10^8 konidija/ml izolata Bb2860 i zatim ih prebacivali na netretiranu površinu, zabeleživši značajnu redukciju broja položenih jajai dužine života inficiranih ženki. Iako je reč o različitim izolatima i formulacijama, rezultati do kojih su došli Shi i Feng (2009) slažu se sa našim nalazom da relativno kratkotrajna ekspozicija mladih odraslih ženki *T. urticae* može značajno da redukuje fekunditet i vitalnost. O efektima na životne parametre nakon tretiranja jaja konidijama *B. bassiana* nema dostupnih podataka, tako da su naši rezultati prvi ovakve vrste. U demografsko-toksikološkom biotestu Seyed-Talebi et al. (2012) zabeležili su značajnu redukciju R_0 , r_m i λ vrednosti kod jedinki koje su u stadijumu larve tretirane koncentracijom 1×10^8 konidija/ml izolata EUT105 i posle tri dana prebačene na nove lisne isečke. Drugih dostupnih podataka o efektima na nivou populacije nema, tako da su rezultati

naših demografsko-toksikoloških biotestova u kojima su tretirana jaja i preovipozicione ženke *T. urticae* takođe prvi ovakvi nalazi.

Evaluacija akaricidnih i subletalnih efekata biopesticida Naturalis-L na *T. urticae* u našem istraživanju pokazala je da preporučena koncentracija preparata (3 ml/l) ne eliminiše znatan deo populacije, dok snažni repelentni i deterentni efekti ovog biopesticida i značajan reproduktivnom potencijalu ženki koje prežive direktno tretiranje stvaraju osnovu za oporavak populacije na netretiranoj površini.

5.5. Primena ispitivanih biopesticida za suzbijanje *T. urticae*

Biopesticidi su potencijalno korisno sredstvo u aktuelnoj situaciji u kojoj strategija održivog upravljanja populacijama *T. urticae* i drugih tetranihida zahteva dostupnost što šireg spektra efikasnih akaricidnih jedinjenja različitih mehanizama delovanja i niskog rizika za čoveka i životnu sredinu (Dekeyser 2005; Marčić 2012; Villaverde et al. 2014). Imajući u vidu teškoće u komercijalizaciji i prihvatanju biopesticida kao pojedinačnih proizvoda (Chandler et al., 2011; Miresmailli i Isman, 2014), rešenje za njihovu širu primenu je uključivanje u integrisane programe hemijskih, bioloških, agrotehničkih i drugih metoda suzbijanja tetranihida (Hoy, 2011).

Podatke o akaricidnim i subletalnim efektima biopesticida na *T. urticae* dobijene u našim biotestovima treba posmatrati kao polaznu tačku za dalja istraživanja u cilju unapređenja programa održivog upravljanja populacijama ove štetne vrste grinja. Biopesticid Kingbo pokazao se kao visokoefikasan akaricid u koncentracijama 20 puta manjim od preporučene za primenu što otvara mogućnost primene redukovanih doza integrisane sa korišćenjem fitozeida i drugih predatora, što se pokazalo kao održivo rešenje (Rhodes et al., 2006; Roubos et al., 2014). Primena preparata na bazi azadirachtina i konidija *B. bassiana* u preporučenim koncentracijama pokazala je da bi jedan deo populacije mogao da preživi tretiranje i obezbedi oporavak na netretiranoj ili slabije tretiranoj površini. Pored nastojanja da se u praktičnim uslovima postigne dovoljno visoka i što ravnomernija pokrivenost lisne površine aktivnom materijom (Martini et al., 2012), održiva primena ova dva biopesticida zahteva i ispitivanje efekata njihovog međusobnog kombinovanja, kao i njihove primene sa sintetskim akaricidima i predatorima (Shi et al., 2005; Hernandez et al., 2012; Bernardi et al., 2013; Seyed-Talebi et al., 2014).

Naši rezultati evaluacije akaricidnih i subletalnih efekata spinosada ne idu u prilog uključivanju ovog biopesticida u programesuzbijanja *T. urticae*. Populacije ove vrste u

staklenicima i plastencima, međutim, svakako bivaju izložene delovanju spinosada jer je reč o biopesticidu koji se preporučuje kao dobro rešenje za suzbijanje tripsa, lepidoptera i drugih fitofagnih insekata (Thompson et al., 2000). Sve ovo zahteva dalja istraživanja u kontekstu primene spinosada u okviru integrisanog upravljanja populacijama fitofagnih artropoda u zaštićenom prostoru.

6. ZAKLJUČCI

➤ Ispitivanje osjetljivosti životnih stadijuma *T. urticae* na preparate na bazi oksimatrina, azadirahatina, spinosada i konidija entomopatogene gljive *B. bassiana* pokazalo je da nijedan od ovih biopesticida nije značajan ovid i da je akaricidni efekat nakon tretiranja jaja posledica rezidualnog delovanja na ispiljene larve. Direktno tretirane larve bile su najosetljiviji životni stadijum u svim biotestovima. Direktno tretiranje preovipozicionih ženki preparatima na bazi azadirahatina i konidija *B. bassiana* uzrokovalo je RO-efekat kao dominantan u odnosu na smrtnost.

➤ Značajne repelentne i deterentne efekte na ženke *T. urticae* u biotestu sa mogućnošću izbora između tretirane i netretirane polovine lista uzrokovale su serije koncentracija preparata na bazi oksimatrina (0,5-2 ml/l), azadirahatina (1,56-50 mg/l a.m.) i konidija *B. bassiana* (0,82-7 ml/l). Ovi efekti bili su najizraženiji u prva 24 h, što je znatno doprinelo da i kumulativni efekti (za ceo period od 72 h) budu značajni.

➤ Preparat na bazi oksimatrina, primenjen u koncentracijama 25, 50 i 100 µl/l za tretiranje jaja i preovipozicionih ženki, značajno je redukovao fekunditet, dužinu života ženki i trenutnu stopu rasta, posebno u drugoj varijanti gde je zabeležen negativan populacioni rast. Demografski biotest pokazao je da ovaj preparat, primenjen u koncentraciji 50 µl/l, redukuje prirodnu stopu rasta populacije redukujući starosno-specifične stope preživljavanja i fertiliteta, ali i usporavajući juvenilno razviće jedinki ispiljenih iz tretiranih jaja. Tretiranje koncentracijom 100 µl/l preparata (20 puta manjom od preporučene) eliminisalo bi veliki deo populacije *T. urticae* i uzrokovalo njeno opadanje, dok bi koncentracije višestruko veće od 100 µl/l u potpunosti eliminisale populaciju, ali bi repelentni i deterentni efekti omogućili obnavljanje populacije na netretiranoj površini.

➤ Preparat na bazi azadirahatina, primenjen u koncentracijama 3,75-15 mg/l a.m. (za tretiranje jaja) i 17,5-70 mg/l (za tretiranje preovipozicionih ženki) značajno je redukovao fekunditet, dužinu života ženki i trenutnu stopu rasta. Primenjen u koncentracijama 7 mg/l a.m. i 35 mg/l a.m. u demografskom biotestu, preparat je redukovao prirodnu stopu rasta populacije redukujući starosno-specifične stope preživljavanja i fertiliteta, kao i usporavajući juvenilno razviće jedinki ispiljenih iz tretiranih jaja. Tretiranje koncentracijom (50 mg/l) eliminisalo bi veliki deo populacije *T. urticae*, ali je njen oporavak moguć na netretiranoj

površini zahvaljujući snažnim repelentnim i deterentnim efektima ovog biopesticida, kao i reproduktivnom potencijalu ženki koje prežive direktno tretiranje.

➤ Preparat na bazi konidija *B. bassiana*, primenjen u koncentracijama 1,5-6 ml/l za tretiranje jaja i preovipozicionih ženki, značajno je redukovao fekunditet, dužinu života ženki i trenutnu stopu rasta. Primenjen u koncentraciji 3 ml/l u demografskom biotestu za tretiranje jaja, preparat je značajno redukovao prirodnu stopu rasta redukujući starosno-specifične stope preživljavanja i fertiliteta, dok je redukcija prirodne stope rasta nakon tretiranja preovipozicionih ženki istom koncentracijom bila posledica redukcije starosno-specifične stope preživljavanja, ali ne i fertiliteta. Preporučena koncentracija ovog preparata (3 ml/l) ne eliminiše znatan deo populacije *T. urticae*, dok snažni repelentni i deterentni efekti (koji su posledica visokog sadržaja biljnog ulja u preparatu) i značajan reproduktivni potencijal ženki koje prežive direktno tretiranje stvaraju osnovu za oporavak populacije na netretiranoj površini.

➤ Preparat na bazi spinosada, primenjen u koncentracijama 60-240 mg/l a.m. za tretiranje jaja i preovipozicionih ženki, značajno je redukovao fekunditet, dužinu života ženki i trenutnu stopu rasta. Demografski biotest pokazao je da ovaj preparat, primenjen u koncentraciji 120 mg/l a.m. za tretiranje preovipozicionih ženki redukuje prirodnu stopu rasta redukujući starosno-specifične stope preživljavanja i fertiliteta, dok je nakon tretiranja jaja istom koncentracijom zabeleženo značajno povećanje prirodne stope rasta, kao posledica većeg starosno-specifičnog fertiliteta u prvim danima reprodukcije ženki u tretmanu. Nakon tretiranja preporučenim koncentracijama spinosada (60-240 mg/l) moguć je relativno brz oporavak na netretiranoj površini, jer ove koncentracije ne eliminišu znatan deo populacije niti bitno umanjuju reproduktivni potencijal preživelih ženki *T. urticae*.

➤ Podaci o biološkim profilima toksičnosti i subletalnim efektima dobijeni u ovom radu predstavljaju polaznu osnovu za dalja istraživanja u cilju unapređenja integrisanih programa održivog upravljanja populacijama *T. urticae*.

7. LITERATURA

- Abd, El-Mageed, A.E.M., Shalaby, S.E.M. (2011): Toxicity and biochemical impacts of some new insecticidemixtures on cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Plant Prot. Sci. 47:166–175.
- Antonious, G.F., Snyder, J.C. (2006): Natural products: repellency and toxicity of wild tomato leaf extracts to the two-spotted spider ite, *Tetranychus urticae* Koch. J. Environ. Sci. Health Part B, 43-55.
- Araújo, M.J.C., Câmara C.A.G., Born, F.S., Moraes, M.M., Badji, C.A. (2012): Acaricidal activity and repellency of essential oil from *Piper aduncum* and its components against *Tetranychus urticae*. Exp. Appl. Acarol. 57:139-155.
- Attia, S., Griss,a K.L., Lognay, G., Bitume, E., Hance, T., Mailleux, A.C. (2013): A review of the major biological approaches to control the worldwide pest *Tetranychusurticae*(Acari: Tetranychidae), with special reference to natural pesticides. J. Pest. Sci. 86:361-386.
- Bailey, A., Chandler, D., Grant, W.P., Greaves, J., Prince, G., Tatchell, M. (2010): Biopesticides: Pest management and regulation. CAB International, Wallingford, UK.
- Barati, R., Hejazi, M.J. (2015): Reproductive parameters of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) affected by neonicotinoid insecticides. Exp. Appl. Acarol. 66:481-489.
- Basha, A.A.E., Kelany, I.M. (2001): Laboratory studies on the effects of NeemAzal-T/S and NeemAzal-T on some biological aspects of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. In: Kleeberg H., Kelany I.M. (Eds.),Practice oriented results on use of plant extracts and pheromones in integrated and biological pest control - Proceedings of the 10th workshopTrifolio-M GmbH, Lahnau, Germany, pp. 291-299.
- Berdegué, M., White, K.K., Trumble, J.T. (1997): Feeding deterrence of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae by low concentrations of linear furanocoumarins. Environ. Entomol. 26:912-919.
- Bernardi, D., Botton, M., da Cunha, U.S., Bernardi, O., Malausa, T., Garcia, M.S. Nava, D.E. (2013): Effects ofazadirachtin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and its compatibility with predatory mites(Acari: Phytoseiidae) on strawberry. Pest Manag. Sci. 69:75–80.
- Birch, L.C. (1948). The intrinsic rate of natural increase of an insect population. J. Animal. Ecol. 17:15-26.
- Blümel, S.,Hausdorf, H. (2002): Results of the 8th and 9th IOBC Joint Pesticide Testing Programme: persistence test with *Phytoseiuluspersimilis*AthiasHenriot (Acari: Phytoseiidae). IOBC/wprs Bull. 25:45-51.
- Bostanian, N.J., Beudjekian, S., McGregor, E., Racette G. (2009): A modified excised leaf disc method to estimate the toxicity of slow- and fast-acting reduced-risk acaricides to mites. J. Econ. Entomol. 102:2084-2089.

- Bowie, M.H., Worner, S.P., Krips, O.E., Penman, D.R. (2001): Sublethal effects of esfenvalerat on pyrethroid resistant *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae) and its prey *Panonychus ulmi* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 25:311-319.
- Brito, H.M., Gondim, Jr. M.G.C., de Oliveira, J.M., da Camara, C.A.G. (2006): Toxicity of neem (*Azadirachtaindica* A. Juss) formulations for twospotted spidermite and *Euseius alatus* De Leon and *Phytoseiulus macropilis* (Banks) (Acari: Phytoseiidae). *Neotrop. Entomol.* 35:500–505.
- Brødsgaard, H.F., Albajes, R. (2000): Insect and mite pests. In: Albajes R., Gullino M.L., van Lenteren J.C., Elad Y. (Eds.), *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 48-60.
- Bugeme, D.M., Knapp, M., Boga H.I., Ekesi, S., Maniania, N.K. (2014): Susceptibility of developmental stages of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) to infection by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Int. J. Trop. Ins. Sc.* 34:190-196.
- Busvine, J.R. (1971): *A critical review of the techniques for testing insecticides*, 2nd edition. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough, England
- Calabrese, E.J. (2005): Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environ. Pollut.* 138:378-411.
- Calabrese, E.J., Baldwin L.A. (2003): Hormesis: the dose-response revolution. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:175-197.
- Carey, J.R. (1982): Demography of the twospotted spider mite, *Tetranychusurticae* Koch. *Oecologia* 52:389-395.
- Carey, J.R. (1993): *Applied Demography for Biologists, with Special Emphasis on Insects*. New York - Oxford, Oxford University Press, 206 pp.
- Castagnoli, M., Liguori, M., Simoni, S., Duso, C. (2005): Toxicity of some insecticides to *Tetranychusurticae*, *Neoseiuluscalifornicus* and *Tydeuscalifornicus*. *BioControl* 50:611-622.
- Chandler, D., Davidson, G., Pell, J.G., Ball, B.V., Shaw, K., Sunderland, K.D. (2000): Fungal biocontrol of Acari. *Biocontrol Sci. Techn.* 10:357-384.
- Chandler, D., Davidson, G., Jacobson, R.J. (2005): Laboratory and glasshouse evaluation of entomo- pathogenic fungi against the two-spotted spider mite, *Tetranychusurticae* (Acari: Tetranychidae), on tomato, *Lycopersiconesculentum*. *Biocontr. Sci. Techn.* 15:37-54.
- 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. *Phil. Trans. R. Soc. Part B* 366:1987-1998.

- Charnley, A.K., Collins, S.A. (2007): Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek C.P., Druzhinina I.S. (Eds.), Environmental and Microbial Relationships: The Mycota IV, 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 159-187.
- Chi, H. (2015): TWSEX-MSChart: a computer program for population projection based on age-stage two-sex life table analysis, Version20150606. <http://140.120.197.173/Ecology/>
- Chiasson, H., Bostanian, N.J., Vincent, C. (2004): Acaricidal properties of a *Chenopodium*-based botanical. J. Econ. Entomol. 97:1373-1377.
- Cloyd, R. A., Galle, C. L., Keith, S. R., Kalscheur, N.A., Kemp, K.E. (2009): Effect of commercially available plant-derived essential oil products on arthropod pests. J. Econ. Entomol. 102:1567-1579.
- Copping, L.G., Menn, J.J. (2000): Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. Pest Manag. Sci. 56:651-676.
- Copping, L.G., Duke, S.O. (2007): Natural products that have been used commercially as crop protection agents – a review. Pest Manag. Sci. 63:524-554.
- Cordeiro, E.M.G., de Moura, I.L.T., Fadim, M.A.M., Guedes, R.N.C. (2013): Beyond selectivity: are behavioral avoidance and hormesis likely causes of pyrethroid-induced outbreaks of the southern red mite *Oligonychus ilicis*? Chemosphere 93:1111-1116.
- Cote, K.W., Lewis, E.E., Schultz, P.B. (2002): Compatibility of acaricide residues with *Phytoseiulus persimilis* and their effects on *Tetranychus urticae*. Hort Sci. 37:906-909.
- Cowles, R.S. (1998): Effect of spinosad formulations and other miticides on twospotted spider mite. Arthropod Manag. Tests 23:342-343.
- Cranham, J.E., Helle, W. (1985): Pesticide Resistance in Tetranychidae. In: Helle W., Sabelis M.W. (Eds.) Spider Mites, Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. 1B. Elsevier, Amsterdam, pp. 405-421.
- Croft, B.A., van de Baan, H.E. (1988). Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. Experimental and Applied Acarology, 4:277-300.
- Cutler, G.C. (2013): Insects, insecticides and hormesis: evidence and consideration for study. Dose-Response 11:154-177.
- Dabrowski, Z.T., Sereżyńska, U. (2007): Characterisation of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch, Acari: Tetranychidae) response to aqueous extracts from selected plant species. J. Plant Prot. Res. 47:113-124.
- Daniel, C. (2014): *Rhagoletis cerasi*: oviposition reduction effects of oil products. Insects 5:319-331.
- Dekeyser, MA. (2005): Acaricide mode of action. Pest Manag. Sci. 61:103-110.

- Dennehy, T.J., Granett, J., Leigh, T.F. (1983): Relevance of slide-dip and residual bioassay comparisons to detection of resistance in spider mites. *J. Econ. Entomol.* 76:1225-1230.
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M. (2007): The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52:81-106.
- Diawara, M.M., Trumble, J.T., White, K.K., Carson, W.G., Martinez, L.A. (1993): Toxicity of linear furanocoumarins to *Spodoptera exigua*: evidence for antagonistic interactions. *J. Chem. Ecol.* 19:2473–2484.
- Dimetry, N.Z., Amer, S.A.A., Reda, A.S. (1993): Biological activity of two neem seed kernel extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Applied Entomology*, 116:308–312.
- Dimetry, N.Z., Amer, S.A.A., Saber, S.A. (2008): Laboratory evaluation of neem formulations with and without additive against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Acarologia*, 48:171-176.
- Dekeyser, M.A. (2005): Acaricide mode of action. *Pest Manag. Sci.* 61:103–110.
- Duso, C., Malagnini, V., Pozzebon, A., Castagnoli, M., Liguori, M., Simoni, S. (2008): Comparative toxicity of botanical and reduced-risk insecticides to Mediterranean populations of *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae). *Biol. Control* 47:16-21.
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. (2001): Suggestion for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46:387-400.
- Efron, B., Tibshirani, R.J. (1993): An introduction to the bootstrap. Chapman and Hall, New York.
- Estevez, Filho A.B. (2012): Toxicity, residual effect and repellency of synthetic acaricides and natural products on *Tetranychus urticae* Koch and *Phytoseiulus macropilis* (Banks) in cotton. Ph.D. Thesis, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 71pp.
- EU (2016): EU Pesticides Database. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=PL> Last update 07/04/2016
- Faria, M.R.de, Wraight, S.P. (2007): Mycoinsecticides and mycoacaricides. a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control*, 43:237-256.
- Finney, D.J. (1971): Probit Analysis, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fisher, S.W., Wrench, D.L. (1986): Quantification of biological effectiveness for pesticides against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 79:1472-1476.

- Flores, A.E., Landeros, J., Badii, M.H. (2000): Evaluation of population parameters of *Tetranychusurticae* Koch (Acari: Prostigmata: Tetranychidae) exposed to avermectin. *Southwest. Entomol.* 25:287-293.
- Forbes, V.E., Calow, P. (1999): Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? *Environ. Toxicol. Chem.* 18:1544-1556.
- Forbes, V.E., Calow, P. (2002): Population growth rate as a basis for ecological risk assessment of toxic chemicals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 357:1299-1306.
- Fu, Y., Wang, C., Ye, F. (2005): The applications of *Sophora flavescens* Ait. alkaloids in China. *Pestic. Sci. Admin.* 26:30–33.
- Gahukar, R.T. (2014): Factors affecting content and bioefficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) phytochemicals used in agricultural pest control: A review. *Crop Prot.* 62:93–99.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L., Stewart, A. (2012): Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.* 30:250-258.
- Guedes, R.N.C., Cutler G.C. (2014): Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Manag. Sci.* 70:690-697.
- Guedes, R.N.C., Smagghe, G., Stark, J.D., Desneux, N. (2016): Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annu. Rev. Entomol.* 61:43-62.
- Haynes, K.F. (1988): Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annu. Rev. Entomol.* 33:149-168.
- He, H.G., Jiang, H.B., Zhao, Z.M., Wang, J.J. (2011): Effects of a sublethal concentration of avermectin on the development and reproduction of citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae). *Int. J. Acarol.* 37:1-9.
- Helle, W., Overmeer, W.P.J. (1985): Toxicological test methods. In: Helle W., Sabelis M.W. (Eds.) *Spider mites, their biology, natural enemies and control*, Vol. 1A. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 391-395.
- Hernandez, M.M., Martinez-Villar, E., Peace, C., Perez-Moreno, I., Marco, V. (2012): Compatibility of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with flufenoxuron and azadirachtin against *Tetranychusurticae*. *Exp. Appl. Acarol.* 58:395-405.
- Hidayat, Y., Heather, N., Hassan, E. (2013): Repellency and oviposition deterrence effects of plant essential and vegetable oils against female Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). *Aust. J. Entomol.* 52:379-386.
- Holland, J.M., Chapman, R.B. (1994): A comparison of the toxic and sub-lethal effects of fluvalinate and esfenvalerate on the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 18:3-22.

- Holland, J.M., Chapman, R.B., Penman, D.R. (1994): Effects of fluvalinate on two-spotted spider mite dispersal, fecundity and feeding. *Entomol. Exp. Appl.* 71:145-153.
- Holland, J.M., Chapman, R.B. (1995): Comparative toxic and sub-lethal effects of fluvalinate on twospotted spider mite and European red mite. *Exp. Appl. Acarol.* 19:549-570.
- Holt, K.M., Opit, G.P., Nechols, J.R., Margolies, D.C. (2006): Testing for non-target effects of spinosad on twospotted spider mites and their predator *Phytoseiulus persimilis* under greenhouse conditions. *Exp. Appl. Acarol.* 38:141-149.
- Hoy, M.A. (2011): *Agricultural Acarology - Introduction to Integrated Mite Management*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- Huang, Y.B., Chi, H. (2012): Assessing the application of the jackknife and bootstrap techniques to the estimation of the variability of the net reproductive rate and gross reproductive rate: a case study in *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *J. Agric. For.* 61:37-45.
- Iftner, D.C., Hall, F.R., Sturm, M.M. (1986): Effects of residues of fenvalerate and permethrin on the feeding behaviour of *Tetranychus urticae* (Koch). *Pestic. Sci.* 17:242-248.
- Ismail, M.S.M., Soliman, M.F.M., Naggar, E., Ghallab, M.M. (2007): Acaricidal activity of spinosad and abamectin against two-spotted spider mites. *Exp. Appl. Acarol.* 43:129-135.
- Isman, M.B. (2006): Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Ann. Rev. Entomol.* 51:45-66.
- Isman, M.B. (2015): A renaissance for botanical insecticides? *Pest Manag. Sci.* 71:1587–1590.
- James, D.G., Price, T.S. (2002): Fecundity in twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) is increased by direct and systemic exposure to imidacloprid. *J. Econ. Entomol.* 95:720-732.
- Jones, V.P., Parella, M.P. (1984): The sublethal effects of selected insecticides on life table parameters of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae). *Can. Entomol.* 116:1033-1040.
- Jones, T., Scott-Dupree, C., Hariss, R., Shipp, L., Harris, B. (2005): The efficacy of spinosad against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its impact on associated biological control agents on greenhouse cucumbers in southern Ontario. *Pest Manag. Sci.* 61:179-185.
- Kabir, K.H., Chapman, R.B., Penman, D.R. (1993): Miticide bioassays with spider mites (Acari: Tetranychidae): effect of test method, exposure period and mortality criterion on the precision of response estimates. *Exp. Appl. Acarol.* 17:695-708.
- Kashenge, S.S., Makundi, R.H. (2001): Comparative efficacy of neem (*Azadirachtaindica*) formulations and amitraz (Mitac) against the two-spotted spider mites (*Tetranychusurticae*) on tomatoes: Mortality, repellence, feeding deterrence and effects on predatory mites, *Phytoseiuluspersimilis*. *Arch. Phytopath. Pflanz.* 34:265-273.

- Kavousi, A., Chi, H., Talebi, K., Bandani, A., Ashouri A., Naveh, V.H. (2009): Demographic traits of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on leaf discs and whole leaves. *J. Econ. Entomol.* 102:595-601.
- Kim, D.I., Paik, C.H., Park, J.D., Kim, S.S., Kim, S.G. (2000): Relative toxicity of NeemAzal-T/S to the predacious mite, *Amblyseius womersleyi* (Acari: Phytoseiidae) and the twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Korean J. Appl. Entomol.* 39:53-58.
- Kim, D.I., Park, J.D., Kim, S.G., Kuk, H., Jang, M.S., Kim, S.S. (2005): Screening of some crude plant extracts for their acaricidal and insecticidal efficacies. *J. Asia-Pacific Entomol.* 8:93-100.
- Kim, M.K., Sim, C., Shin, D., Suh, E., Cho, K. (2006): Residual and sublethal effects of fenpyroximate and pyridaben on the instantaneous rate of increase of *Tetranychusurticae*. *Crop Prot.* 25:542-548.
- Kim, S.S., Yoo, S.S. (2002): Comparative toxicity of some acaricides to the predatory mite, *Phytoseiuluspersimilis* and the two-spotted spider mite, *Tetranychusurticae*. *BioControl* 47:563-573.
- Kleeberg, H. (2004): Neem based products: registration requirements, regulatory processes and global implications. In: Koul O., Wahab S. (Eds.) *Neem: Today and in the New Millennium*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 109–123.
- Knapp, M., Kashenge, S.S. (2003): Effects of different neem formulations on the twospotted spider mite, *Tetranychusurticae* Koch, on tomato (*Lycopersicumesculentum* Mill.). *International Journal of Tropical Insect Science*, 23:1–7.
- Knight, A.L., Beers, E.H., Hoyt, S.C., Riedl, H. (1990): Acaricide bioassays with spider mites (Acari:Tetranychidae) on pome fruits: evaluation of methods and selection of discriminating concentrations for resistance monitoring. *J. Econ. Entomol.* 83:1752-1760.
- Knowles, C.O. (1997): Mechanisms of resistance to acaricides. In: Sjut V., Butters J.A. (Eds.) *Molecular mechanisms of resistance to agrochemicals*. Springer, Berlin, pp 58–78.
- Kolmes, S.A., Dennehy, T.J., Frisicano, L. (1990): Behavioral aspects of dicofol resistance in the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Entomol. Exp. Appl.* 57:259-269.
- Kolmes, S.A., Dennehy, T.J., Broadwater, E. (1991): Effects of residence time and webbing upon dicofol-avoidance behavior in two-spotted spider mites (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 12:181-193.
- Kumral, N.A., Çobanoğlu, S., Yalcin, C. (2010): Acaricidal, repellent and oviposition deterrent activities of *Daturastramonium* L. against adult *Tetranychusurticae* (Koch). *J. Pest Sci.* 83:173-180.
- Lancaster, A.L., Deyton, D.E., Sams, C.E., Cummins, J.C., Pless, C.D., Fare, D.C. (2002): Soybean oil controls two-spotted spider mites on burning bush. *J. Environ. Hortic.* 20:86-92.

- Lasota, J.A., Dybas, R.A. (1991): Avermectins, a novel class of compounds: implications for use in arthropod pest control. *Annu. Rev. Entomol.* 36:91-117.
- Li, J., Margolies, D.C. (1993): Effects of mite age, mite density and host quality on aerial dispersal behaviour in the twospotted spider mite. *Entomol. Exp. Appl.* 68:79-86.
- Li, D., Tian, J., Shen, Z. (2006): Assessment of sublethal effects of clofentezine on life-table parameters in hawthorn spider mite (*Tetranychusviennensis*). *Exp. Appl. Acarol.* 38:255-273.
- Liu, L.Z., Goh, S.H., Ho, S.H. (2007): Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophiluszeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J. Stored Prod. Res.* 43:290-296.
- López, M.A., López, V.L., Sobrino, C.C. (2003): Repellency and toxicity of oils from different origins on *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae) in pepper. *Span. J. Agric. Res.* 1:73-77.
- Lou, W.C., Mu, L.Y., Li, Y.S. (1997): Toxic effects of alkaloids from plants against insect pests. *Pesticides* 36:11-15.
- Luckey, T.D. (1968): Insecticide hormoligosis. *J. Econ. Entomol.* 61:7-12.
- Maggi, V.L., Leigh, T.F. (1983): Fecundity response of the twospotted spider mite to cotton treated with methyl parathion or phosphoric acid. *J. Econ. Entomol.* 76:20-25.
- Maniania, N.K., Bugeme, D.M., Wekesa, V.W., Delalibera, I.Jr. (2008): Role of entomopathogenic fungi in the control of *Tetranychusevansi* and *Tetranychusurticae* (Acari: Tetranychidae), pests of horticultural crops. *Exp. Appl. Acarol.* 46:259-274.
- Mansour, F.A., Ascher, K.R.S., Abo-Moch, F. (1993): Effects of Margosan-OTM, AzatinTM and RD9-Repelin® on spiders, and on predacious and phytophagous mites. *Phytoparasitica*, 21:205-211.
- Mansour, F.A., Ascher, K.R.S., Abo-Moch, F. (1997): Effects of Neemgard on phytophagous and predacious mites and on spiders. *Phytoparasitica*, 25:333-336.
- Mao, L., Henderson G. (2007): Antifeedant activity and acute and residual toxicity of alkaloids from *Sophora flavescens* (Leguminosae) against Formosan subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.* 100:866-870.
- Marčić, D. (2003): The effects of clofentezine on life-table parameters in two-spotted spider mite *Tetranychusurticae*. *Exp. Appl. Acarol.* 30:249-263.
- Marčić, D. (2005): Sublethal effects of tebufenpyrad on the eggs and immatures of two-spotted spider mite, *Tetranychusurticae*. *Exp. Appl. Acarol.* 36:177-185.
- Marčić, D. (2007): Sublethal effects of spiroadiclofen on life history and life-table parameters of two-spotted spider mite (*Tetranychusurticae*). *Exp. Appl. Acarol.* 42:121-129.

- Marčić, D. (2012): Acaricides in modern management of plant-feeding mites. *J. Pest. Sci.* 85:395-408.
- Marčić, D., Perić, P., Prijović, M., Ogurlić, I. (2009): Field and greenhouse evaluation of rapeseed spray oil against spider mites, green peach aphid and pear psylla in Serbia. *Bull. Insectol.* 62:159-167.
- Marčić, D., Ogurlić, I., Mutavdžić, S., Perić, P. (2010): The effects of spiromesifen on life history traits and population growth of two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 50:255-267.
- Marčić, D., Petronijević, S., Drobnjaković, T., Prijović, M., Perić, P., Milenković, S. (2012): The effects of spirotetramat on life history traits and population growth of *Tetranychusurticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 56:113-122.
- Marčić, D., Prijović, M., Drobnjaković, T., Međo, I., Perić, P., Milenković, S. (2012b): Greenhouse and field evaluation of two biopesticides against *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *Pestic. Phytomed.* 27:313–320.
- Marrone, P.G. (2008): Pesticidal formulation containing oxymatrine or matrine. U.S. Patent Application No. 12/018,196.
- Martinez-Villar, E., Saenz-de-Cabezón, F.J., Moreno-Grijalba, F., Marco, V., Perez-Moreno, I. (2005): Effects of azadirachtin on the two-spotted spider mite, *Tetranychusurticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 35:215-222.
- Martini, X., Kincy, N., Nansen, C. (2012): Quantitative impact assessment of spray coverage and pest behavior on contact pesticide performance. *Pest Manag. Sci.* 68:1471–1477.
- Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L., Boyce, M.S. (1986): Estimating uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. *Ecology* 67:1156-1166.
- Migeon, A., Dorkeld, F. (2015): Spider Mites Web - a comprehensive database for the Tetranychidae. <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>
- Miranova, M.K., Khorkhordin, E.G. (1997): Effect of NeemAzal- T/S on *Tetranychus urticae* Koch. In: Kleeberg H., Zebitz C.P.W. (eds.) Practice oriented results on use and production of neem-ingredients and pheromones (Proceedings of the 5th workshop, Wetzlar, Germany, January 22.-25.th 1996), Lahnau, Trifolio-M GmbH, pp. 129-137.
- Miresmailli, S., Isman, M.B. (2006): Efficacy and persistence of rosemary oil as an acaricide against twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on greenhouse tomato. *J. Econ. Entomol.* 99:2015-2023.
- Miresmailli, S., Isman, M.B. (2014): Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. *Trends Plant Sci.* 19:29–35.
- Mordue [Luntz], A.J., Blackwell, A. (1993): Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39:903-924.

Mordue [Luntz], A.J., Morgan, E.D., Nisbet, A.J. (2010): Azadirachtin, a natural product in insect control. In: Gilbert L.I., Gill S.S. (Eds.) Insect control - biological and synthetic agents. Elsevier, Amsterdam, pp. 185-206.

Moriarty, F. (1969): The sublethal effects of synthetic insecticides on insects. Biol. Rev. 44:321-356.

Neal, D. (2004): Introduction to Population Biology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Pavela, R. (2009): Effectiveness of some botanical insecticides against *Spodoptera littoralis* Boisduvala (Lepidoptera: Noctuidae), *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) and *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). Plant Protect. Sci. 45:161-167.

Penman, D.R., Chapman, R.B., Bowie, M.H. (1986): Direct toxicity and repellent activity of pyrethroids against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Econ. Entomol. 79:1183-1187.

Penman, D.R., Chapman R.B. (1988): Pesticide-induced mite outbreaks: pyrethroids and spider mites. Exp. Appl. Acarol. 4:265-276.

Petanović, R., Vidović, B. (2009): Grinje paučinari (Tetranychidae) – štetočine u zaštićenom prostoru. Biljni lekar, 37(5):553-561.

Petanović, R., Marčić, D., Vidović, B. (2010): Štetne grinje gajenih biljaka – aktuelni problemi, inovativni pristupi proučavanju i mogućnosti suzbijanja (1). Pestic. Fitomed. 25:9-27.

Pless, C.D., Deyton, D.E., Sams, C.E. (1995): Control of San Jose scale, terrapin scale, and European red mite on dormant fruit trees with soybean oil. HortScience 30:94-97.

Pozzebon, A., Duso, C., Tirelo, P., Bermudez, Ortiz P. (2011): Toxicity of thiamethoxam to *Tetranychus urticae* Koch and *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) through different routes of exposure. Pest Manag. Sci. 67:352-359.

Rahman, T., Spafford, H., Broughton, S. (2011): Compatibility of spinosad with predaceous mites (Acari) used to control *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). Pest. Manag. Sci. 67:993-1003.

Regnault-Roger, C., Vincent, C., Arnason, J.T. (2012): Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. Annu. Rev. Entomol. 57:405–24.

Rhodes, E.M., Liburd, O.E., Kelts, C., Rondon, S.I., Francis, R.R. (2006): Comparison of single and combination treatments of *Phytoseiulus persimilis*, *Neoseiulus californicus*, and Acramite (bifenazate) for control of twospotted spider mites in strawberries. Exp. Appl. Acarol. 39:213–225.

Riedl, H., Shearer, P.W. (1991): Double-leaf-disk residue assay for assessing the toxicity of repellent acaricides to spider mites (Acari: Tetranychidae). Exp. Appl. Acarol. 11:149-157.

- Robertson, J.L., Worner, S.P. (1990). Population toxicology: suggestion for laboratory bioassays to predict pesticide efficacy. *J. Econ. Entomol.* 83:8-12.
- Robertson, J.L., Russell, R.M., Preisler, H.K., Savin, N.E. (2007): *Bioassays with Arthropods* (2nd edition). CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2007.
- Roh, H.S., Lim, E.G., Kim, J., Park, C.G. (2011): Acaricidal and oviposition deterring effects of santalol identified in sandalwood oil against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *J. Pest Sci.* 84:495-501.
- Roh, H.S., Lee, B.H., Park, C.G. (2013): Acaricidal and repellent effects of myrtacean essential oils and their major constituents against *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). *J. Asia-Pacific Entomol.* 16:245-249.
- Roubos, C.R., Rodriguez-Saona, C., Isaacs, R. (2014): Mitigating the effects of insecticides on arthropod biological control at field and landscape scales. *Biol. Control* 75:28-38.
- Sabelis, M.W. (1985): Reproductive strategies. In: Helle W., Sabelis M.W. (eds.) *Spider mites, their biology, natural enemies and control*, vol. 1A. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 265-278.
- Sáenz-de-Cabezón, Irigaray F.J., Marco-Mañebón, V., Perez-Moreno, I. (2003): The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and its compatibility with triflumuron: effects on the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biol. Control* 26:168-173.
- Sáenz-de-Cabezón, Irigaray F.J., Zalom, F.G. (2009): Comparative repellent effects of different acaricide residues on predatory and spider mites. Is there a need for including behavior into standardized testing methods? *IOBC/wprs Bull.* 50:95-98.
- Saito, Y. (2010): *Plant mites and sociality: diversity and evolution*. Springer, Tokyo-Berlin-Heidelberg-New York.
- Schmutterer, H. (1990): Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu. rev. Entomol.* 35:271-297.
- Seiedy, M., Saboori, A., Allahyari, H., Talaei-Hassanloui, R., Tork, M. (2010): Laboratory investigation on the virulence of two isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Int. J. Acarol.* 36:527-532.
- Seyed-Talebi, F.S., Kheradmand, K., Talaei-Hassanloui, R., Talebi-Jahromi, K. (2012): Sublethal effects of *Beauveria bassiana* on life table parameters of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Biocontrol Sci. Techn.* 22:293-303.
- Seyed-Talebi, F.S., Kheradmand, K., Talaei-Hassanloui, R., Talebi-Jahromi, K. (2014). Synergistic effect of *Beauveria bassiana* and spirodiclofen on the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). *Phytoparasitica* 42:405-412.

- Shi, W.B., Jiang, Y., Feng, M.G. (2005): Compatibility of ten acaricides with *Beauveria bassiana* and enhancement of fungal infection to *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) eggs by sublethal application rates of pyridaben. *Appl. Entomol. Zool.* 40:659-666.
- Shi, W.B., Feng, M.G., Liu, S.S. (2008): Sprays of emulsifiable *Beauveria bassiana* formulation are ovicidal towards *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) at various regimes of temperature and humidity. *Exp. Appl. Acarol.* 46:247-257.
- Shi, W.B., Feng, M.G. (2009): Effect of fungal infection on reproductive potential and survival time of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 48:229-237.
- Shields, V.D.C., Smith, K.P., Arnold, N.S., Gordon, I.M., Shaw, T.E., Waraneh, D. (2008): The effect of varying alkaloid concentrations on the feeding behavior of gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantridae). *Arthropod Plant Interact.* 2:101-107.
- Snell, T.W. (1978): Fecundity, developmental time and population growth rate. *Oecologia* 32:119-125.
- Sparks, T.C., Dripps J.E., Watson G.B., Paroonagian D. (2012): Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 102:1-10.
- Stark, J.D., Tanigoshi, L., Bounfour, M., Antonelli, A. (1997): Reproductive potential: its influence on the susceptibility of a species to pesticides. *Ecotox. Environ. Saf.* 37:273-279.
- Stark, J.D., Banks, J.E. (2003): Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 48:505-519.
- Stavriniades, M.C., Mills, N.J. (2009): Demographic effects of pesticides on biological control of Pacific spider mite (*Tetranychus pacificus*) by the western predatory mite (*Galendromus occidentalis*). *Biol. Control* 48:267-273.
- Stern, R.S. (2012): The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: a 30-year prospective study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 66:553-562.
- Sundaram, K.M.S., Sloane, L. (1995): Effects of pure and formulated azadirachtin, a neem-based biopesticide, on the phytophagous spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *J. Environ. Sci. Health (B)*, 30:801-814.
- Szczepaniec, A., Creary, S.F., Laskowski, K.L., Nyrop, J.P., Raupp, M.J. (2011): Neonicotinoid insecticide imidacloprid causes outbreaks of spider mites on elm trees in urban landscapes. *PLoS One* 6(5): e20018.
- Takakura, K. (2009): Reconsiderations on evaluating methodology of repellent effects: validation of indices and statistical analysis. *J. Econ. Entomol.* 102:1977-1984.
- Thompson, G.D., Dutton, R., Sparks, T.C. (2000): Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Manag. Sci.* 56:696-702.

- Tjosvold, S.A., Chaney, W.E. (2001): Evaluation of reduced risk and other biorational miticides in the control of spider mites (*Tetranychus urticae*). *Acta Hort.* 547:93-96.
- Tsolakis, H., Ragusa, E., Ragusa, S. (2002): Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Tetranychus urticae* Koch (Acariformes: Tetranychidae) in laboratory tests. In: Bernini F., Nannelli R., Nuzzaci G., de Lillo E. (Eds.) *Acarid phylogeny and evolution-Adaptations in mites and ticks*. Kluwer, the Netherlands, pp. 351-362.
- Tsolakis, H., Ragusa, S. (2008): Effects of a mixture of vegetable and essential oils and fatty acid potassium salts on *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70:276-282.
- Ullah, M.S., Lim, U.T. (2015): Laboratory bioassay of *Beauveria bassiana* against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on leaf discs and potted bean plants. *Exp. Appl. Acarol.* 65:307-318.
- Van Leeuwen, T., Dermauw, W., van de , M., Tirry, L. (2005): Systemic use of spinosad to control the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on tomatoes grown in rockwool. *Exp. Appl. Acarol.* 37:93-105.
- Van Leeuwen, T., Vontas, J., Tsagkarakou, A., Tirry, L. (2009): Mechanisms of Acaricide Resistance in the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae*. In: Ishaaya I., Horowitz A.R. (Eds.) *Biorational Control of Arthropod Pests*. Springer, Dordrecht, the Netherlands, 347-393.
- Villanueva, R.T., Walgenbach, J.F. (2006): Acaricidal properties of spinosad against *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 99:843-849.
- Villaverde, J.J., Sevilla-Moran, B., Sandin-Espana, P., Lopez-Goti, C., Alonso-Prados, J.L. (2014): Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. *Pest Manag. Sci.* 70:2-5.
- Wang, S., Wang, R., Zhang, Y., Xu, B., (2009): Toxicity bioassay of 11 common acaricides to carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus*. *Chin. Agric. Sci. Bull.* 25:386-388.
- Wang, S., Tang, X., Wang, L., Zhang, Y., Wu, Q., Xie, W. (2014): Effects of sublethal concentrations of bifenthrin on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Syst. Appl. Acarol.* 19:481-490.
- Wang, L., Wang, Y., Xie, W., Wu, Q., Wang, S. (2016): Sublethal effects of spinetoram on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* [doi:10.1016/j.pestbp.2016.02.002](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.02.002)
- Wang, S.L., Wang, R., Zhang, Y.J., Xu, B.Y., Wu, Q.J. (2010): Field trials of different insecticides against vegetable spider mites. *China Vegetables*, 4:71-74.
- Wekesa, V.W., Hountondji, F.C.C., Dara, S.K. (2015): Mite pathogens and their use in biological control. In: *Prospects for Biological Control of Plant Feeding Mites and Other Harmful Organisms*. Carrillo, D., de Moraes, G.J., Pena, J.E. (Eds.) , *Progress in Biological Control* 19, Springer International Publishing Switzerland, pp. 309-328.

Whalon, M.E., Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M. (2008): Global pesticide resistance in arthropods. CAB International, Wallingford, UK.

Whalon, M.E., Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M., Duynslager, L. (2016): Arthropod Pesticide Resistance Database. www.pesticideresistance.com

Wink, M. (1992): The role of quinolizidine alkaloids in plant-insect interactions. In: Bernays E. (Ed.) Insect-plant interactions. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 133-169.

Wittstock, U., Gershenzon, J. (2002): Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:303-307.

Wraight, S.P., Jackson, M.A., De Kock, S.L. (2001): Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (eds.) *Fungi As Biocontrol Agents*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 253-287.

Yang, N.W., Li, A.L., Wan, F.H., Liu, W.X., Johnson, D. (2010): Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* biotype B. *Crop Prot.* 29:1200-1207.

Yuan, J., Lu, L.Z., Cong, B., Zhang, Z.J., Wang, F.Y. (2004): Biological activity of alkaloids from *Sophora flavescens* Ait to pests. *Pesticides-Shenyang* 43:284–286.

Zanardi, O.Z., Ribero, LdP., Ansante, T.F., Santos, M.S., Bordini, G.P., Yamamoto, P.T., Vendramin, J.D. (2015): Bioactivity of matrine-based biopesticide against four pest species of agricultural importance. *Crop Prot.* 67:160-167.

Zhang, Z.Q. (2003): *Mites of Greenhouses – Identification, Biology and Control*. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK.

Zhang, Z.Q., Sanderson, J.P. (1990). Relative toxicity of abamectin to the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) and two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 83:1783-1790.

Zheng, Y.Q., Yao, J.R., Shao, X.D. (2000): Review of the constituents and agricultural application of *Sophoraflavescens* Ait. *Pestic. Sci. Admin.* 21:24-26.

8. PRILOZI

Biografija autora

Irena S. Međo rođena Ogurlić, 15. avgusta 1979. godine u Beogradu. Nakon završetka XII beogradske gimnazije, upisala je Poljoprivredni fakultet u Beogradu-Zemunu školske 1998/99 godine, Odsek za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda. Fakultet je završila sa prosečnom ocenom 8,66 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Na istom fakultetu upisala je posle diplomске studije na grupi Fitofarmacija 22. decembra 2004. U skladu sa reformom Univerziteta i usklađivanjem nastavnog programa sa Bolonjskom deklaracijom, 15. juna 2007. godine je upisala drugu godinu doktorskih studija.

Zaposlena je u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, kao istraživač-saradnik, u Laboratoriji za primenjenu entomologiju, od 8. februara 2006. godine. Tokom istraživačkog rada učestvovala je na 3 projekta tadašnjeg Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (TR6890B: Razvoj i usavršavanje fungicida i zoocida u cilju njihove racionalne primene (2005-2008). U narednom projektnom ciklusu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije angažovana je na projektu TR20036 – Razvoj i unapređenje bioracionalnih metoda zaštite bilja od bolesti i štetočina (2008-2011). U novom projektnom ciklusu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije kao istraživač saradnik angažovana je na projektu TR 31043: Proučavanje biljnih patogena, ertropoda, korova i pesticida u cilju razvoja metoda bioracionalne zaštite bilja i proizvodnje bezbedne hrane.

Saopštila i objavila ukupno 40 radova.

Član je Društva za zaštitu bilja Srbije. Govori engleski jezik.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Ирена Међо

Број индекса : 11/46

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Акарицидни и сублетални ефекти биопестицида на *Tetranychus urticae* Koch

(Acari: Tetranychidae)

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, септембар 2016.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Ирена Међо

Број индекса: 11/46

Студијски програм: Пољопривредне науке, модул: Фитомедицина

Наслов рада: Акарицидни и сублетални ефекти биопестицида на *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

Ментор: проф. Др Радмила Петановић и др Дејан Марчић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, септембар 2016.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Акарицидни и сублетални ефекти биопестицида на *Tetranychus urticae* Koch

(Acari: Tetranychidae)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, септембар 2016.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.