

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 40/12-6.8.
Датум: 25.4.2012. године

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на извештај о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. став 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета" број 131/06), дате сагласност на извештај о урађеној докторској дисертацији кандидата НЕНАДА ТАМАША, дипл.инж.

Кандидат **НЕНАД (Драгољуб) ТАМАШ, дипл. инж.**, пријавио је докторску дисертацију под називом: «Осетљивост зелене лисне ваши јабуке (*Aphis pomi* De Geer) и њених предатора из фамилије *Cecidomyiidae* на инсектициде различитих механизма деловања»,
из научне области Фитомедицина.

Универзитет је дана 25.11.2008. године, својим актом број 612-31/77/08 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «ОСЕТЉИВОСТ ЗЕЛЕНЕ ВАШИ ЈАБУКЕ (*Aphis pomi* De Geer) И ПРЕДАТОРА ИЗ ФАМИЛИЈЕ *Cecidomyiidae* НА ИНСЕКТИЦИДЕ РАЗЛИЧИТИХ МЕХАНИЗАМА ДЕЛОВАЊА».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације НЕНАДА ТАМАША, дипл.инж., образована је на седници одржаној 22.2.2012. године, број 40/10-5.2., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област

1. др Ибрахим Елезовић, редовни професор, пестициди,
2. др Душанка Инђић, редовни професор, фитофармација,
3. др Радослава Спасић, редовни професор, ентомологија и пољопривредна зоологија,
4. др Новица Милетић, пестициди,
5. др Милован Величковић, воћарство.

Наставно-научно веће факултета прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације, на седници одржаној 25.4.2012. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА
Проф. др Небојша Ралевић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 40/12-6.8.
Датум: 25.04.2012. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 70. и 71. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће факултета на седници одржаној 25.04.2012. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднео **НЕНАД ТАМАШ**, дипл. инж. и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: «ОСЕТЉИВОСТ ЗЕЛЕНЕ ВАШИ ЈАБУКЕ (*Aphis pomi* De Geer) И ПРЕДАТОРА ИЗ ФАМИЛИЈЕ *Cecidomyiidae* НА ИНСЕКТИЦИДЕ РАЗЛИЧИТИХ МЕХАНИЗАМА ДЕЛОВАЊА».

II Универзитет је дана **25.11.2008.** године, својим актом број **612-31/77/08** дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Miletić, N., **Tamaš Nenad** and Graora, D., (2011): The control of codling moth (*Cydia pomonella* L.) in apple trees. ŽEMDIRBYSTĖ=Agriculture, 98/2, 213-218. (ISSN: 1392-3196)

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Небојша Ралевић)

Доставити: кандидату, ментору проф. др Ибрахиму Елезовићу, Институту за фитомедицину, Студентској служби и архиви.

**НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**
Датум: 20.03.2012.

**Предмет: Извештај Комисије о урађеној докторској дисертацији
Ненада Тамаша, дипл. инж.**

Одлуком Наставно-научног већа Факултета бр. 40/10-5.2. од 22.2.2012. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом "Осетљивост зелене ваши јабуке (*Aphis pomi* De Geer) и предатора из фамилије *Cecidomyiidae* на инсектициде различитих механизма деловања", кандидата дипл. инж. Ненада Тамаша. Пошто смо проучили завршену и написану докторску дисертацију подносимо следећи:

ИЗВЕШТАЈ И ПРЕДЛОГ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Ненада Тамаша написана је на 137 страна текста стандардног прореда и формата и садржи 69 табела (39 у прилогу), 19 графикана (4 у прилогу), 4 оригиналне колор фотографије. Испред основног текста написан је апстракт са кључним речима на српском и енглеском језику.

Докторска дисертација садржи 7 (седам) основних поглавља и један прилог, и то: 1. Увод (стр. 1. – 4); 2. Преглед литературе (стр. 4. - 39); 3. Материјал и методе (стр. 40. – 53); 4. Резултати (стр. 54. – 86); 5. Дискусија (87. – 101); 6. Закључак (101. – 104); 7. Литература (105. – 118), Прилог (119. - 137). Поглавља под редним бројевима 2, 3 и 4 садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1. Увод

У уводном делу кандидат говори о значају биљних вашију на јабуци и истиче да је од детектованих врста зелена ваш *Aphis pomi* најзначајнија пошто се током целе вегетације налази на јабуци и може изазвати различите морфолошке и физиолошке промене биљних органа. Даље, наводи значај спровођења мера интегралне заштите јабуке, које поред хемијских мера подразумевају и очување аутохтоних популација природних непријатеља штеточина. Наводи се и проблем резистентности биљних вашију који је проучаван различитим методама нарочито код врсте *Myzus persicae*, при чему је резистентност зелене ваши јабуке врло мало истраживана. У уводном делу истиче се и значај предатора у регулисању бројности биљних вашију који потичу из различитих инсекатских фамилија.

Циљ истраживања у овој докторској дисертацији био је да се утврди: Ефикасност инсектицида, представника органофосфата, карбамата, пиретроида и неоникотиноида и резидуалност њиховог деловања у сузбијању зелене ваши јабуке (*A. pomi*) у пољским условима, потреба поновног третирања као и сагледавање могућих промена осетљивости испитиване популације на инсектициде; Степен резистентности популација *A. pomi* на поједине инсектициде са испитиваних локалитета поређењем параметара акутне токсичности (LC_{50}) за популацију која потиче са нетретираних стабала јабуке и истих параметара за популације ове ваши које су под дуготрајним селекционим притиском различитих инсектицида; Утврђивање биохемијских параметара који су индикатори развоја резистентности биљних вашију (прекомерна продукција естеразних ензима и промена осетљивости ацетилхолин естеразе);

Утврђивање селективности, односно штетних ефеката инсектицида за предаторе зелене ваши јабуке из фам. *Cecidomyiidae* у пољским условима;

Утврђивање ефеката инсектицида за предаторе из фам. *Cecidomyiidae* у лабораторијским условима. Слична истраживања на овој врсти вашију у Србији нису до сада вршена.

2.2. Преглед литературе

Преглед литературе садржи пет потпоглавља заснована на адекватним литературним изворима из области проучавања ове докторске дисертације.

У првом потпоглављу, кандидат говори о биологији и значају биљних вашију. Као последица исхране биљних вашију јављају се видљиве, морфолошке промене биљних органа односно оштећења. Детаљно су описане морфолошке карактеристике, као и полиморфизам и специфичан циклус развоја и класификација ове групе организама. *Aphis pomi* насељава Европу, Блиски Исток, Северну Америку, Нови Зеланд. Моноецична је врста, са холоцикличним животним циклусом. Презимљава у стадијуму јајета и има више генерација годишње. Поред бескрилних јављају се и крилате женке које насељавају суседне биљке и тако шире инфестацију у засаду. Целокупан развој (четири ларвена ступња, адулт) ова ваш заврши за 6 дана на константној температури од 25 °C у контролисаним условима, односно за 10 дана на 15 °C. *A. pomi* захтева 159,07 степен-дана за своје развиће на температурама које су изнад температурног минимума за ову ваш од 0,3 °C (Malina и сар., 2010).

У другом потпоглављу, кандидат говори о значају предатора у регулисању бројности популација биљних вашију. Истичу се конкретни подаци о ефикасности појединих предаторских врста из фамилија Syrphidae, Cecidomyiidae, Coccinellidae i Chrysopidae у контролисању бројности вашију. *A. aphidimyza* је најзаступљенија врста предатора из фам. *Cecidomyiidae* код нас (Вуковић, 1990). Ларве се хране искључиво вашима и то широким спектром врста. У једном истраживању дошло се до прорачуна да једна ларва ове мушице усмрти 45 јединки зелене ваши јабуке под повољним условима средине (Morse и Croft, 1987). Ова врста може бити један од најефикаснијих агенаса биолошке борбе против биљних вашију, при чему је њена масовна репродукција једноставна и економична. Кокони су погодни за транспорт и манипулацију (Hodek и Honek, 1988).

У трећем потпоглављу говори се о хемијском сузбијању биљних вашију и механизмима деловања инсектицида из група органофосфата, карбамата, пиретроида и неоникотиноида. Према подацима из 2010. године (Јањић и Елезовић, 2010) код нас се примењују: азинофос-метил, диметоат, фенитрогион, фосалон, хлорпирифос, комбинације хлорпирифоса са бифентрином, односно циперметрином, малатион, пириминос-метил, алфа - циперметрин, бифентрин, делтаметрин, ламбда – цихалотрин, тауфлувалинат, метомил, имидаклоприд, ацетамиприд, тиаклоприд, комбинација тиаклоприда и делтаметрина, тиаметоксам, пиметрозин, минерална уља и уље уљане репице. Пиримикарб више није у промету код нас, а раније се користио као специфичан афицид, препарат Пиримор (Митић, 2002). Органофосфати и карбамати су инхибитори ацетилхолин-естеразе. Пиретроиди су модулатори натријумових канала на нервним мембранама. Неоникотиноиди су агонисти никотинског рецептора за ацетилхолин.

У четвртном потпоглављу говори се о резистентности биљних вашију на инсектициде. Резистентност зелене ваши јабуке (*A. pomi*) је врло мало истраживана и то тестирањем популација у лабораторији ради утврђивања LC₅₀ инсектицида и применом биохемијских метода, док истраживања на молекуларном нивоу нису вршена. Појава, као и механизми резистентности откривени су и детаљно описани код многих других врста биљних вашију. Међу различитим популацијама биљних вашију присутна су два механизма резистентности: повећан капацитет деактивације инсектицида услед прекомерне продукције појединих ензима (естеразе и цитохром Р₄₅₀ монооксигеназе) и промена осетљивости места деловања (промена у структури АСhЕ, никотинског рецептора за ацетилхолин и натријумових канала на нервној мембрани). Убрзана деактивација инсектицида настала је као последица повећања

броја копија, односно амплификације гена носилаца резистентности, док је мутација гена узрок промене осетљивости места деловања.

У петом потпоглављу кандидат наводи бројне примере селективности различитих инсектицида за предаторе биљних вашију. Колико је неко једињење безбедно за примену са аспекта деловања на корисне организме, одређује, поред његове акутне токсичности, и резидуално деловање, односно временски период током кога ће се обновити популације корисних организама и успоставити првобитна равнотежа биљних вашију и њихових природних непријатеља.

2.3. Материјал и методе

Поглавље Материјал и методе садржи 4 потпоглавља. Истраживања у овој дисертацији се могу поделити на пољске огледе који су изведени у засадима јабуке сорте ајдаред на локалитетима Радмиловац (Огледно школско добро Пољопривредног факултета, Земун); Бела Црква (ПИК “Јужни Банат” а.д.) и Сурчин (приватни посед), као и огледе у контролисаним условима изведене на Пољопривредном факултету у Београду у лабораторији за пестициде и биохемијска испитивања спроведена на Хемијском факултету у Београду у лабораторији за биохемију, у периоду од 2008. – 2011. године.

Пољски огледи су изведени сагласно стандардној ЕРРО методи за испитивање ефикасности инсектицида у сузбијању биљних вашију у засадима воћака. Третмани су распоређени по типу потпуног случајног блок система у четири понављања. Изведено је по једно третирање за сузбијање бескрилних јединки *A. pomi* и то 2008. и 2009. године на локалитету Радмиловац, односно 2008. на локалитету Бела Црква и 2010. године на локалитету Сурчин. Третирања су изведена током маја, на почетку формирања првих колонија вашију. Третирања у циљу утврђивања ефеката на предаторске ларве из фам. *Cecidomyiidae* изведена су касније, током јуна. Идентификацијом ларви предатора из фам. *Cecidomyiidae* у узорцима са локалитета Радмиловац, Бела Црква и Сурчин, потврђено је да су ларве, које су биле присутне током трајања пољских огледа, припадале врсти *Aphidoletes aphidimyza*. Инсектициди су примењени прскањем до почетка капања течности, употребом леђног орошивача. На локалитету Радмиловац током 2008. године испитани су ефекти хлорпирифоса (конц. 0,072%), диметоата (0,06%), пиримикарба (0,02%), ацетамиприда (0,005%) и ламбда – цихалотрин (0,00125%). Током 2009. године на истом локалитету, поред претходно наведених инсектицида, испитани су и ефекти пиметрозина (0,025%), као и комбинација хлорпирифоса и циперметрина (0,05% + 0,005%), пиримикарба и ацетамиприда (0,02% + 0,002%), као и диметоата са пиперонил-бутоксидом и минералним уљем (0,06% + 0,46% + 0,28%). На локалитету Бела Црква испитани су ефекти инсектицида који су примењени и на локалитету Радмиловац 2008. године, док су на локалитету Сурчин испитани ефекти истих инсектицида осим хлорпирифоса. На обележеним младарима утврђивана је бројност бескрилних јединки биљних вашију, односно ларви предатора у свим периодима оцењивања. Оцењивање бројности вашију и предатора вршено је у четири периода, и то: непосредно пре третирања (НПТ) и у 3 периода, односно неколико дана после третирања (ДПТ). Статистичка обрада резултата: Утврђена је средња вредност броја вашију, односно ларви предатора и варирање (стандардна девијација) у третманима. Ефекти инсектицида су израчунати помоћу Хендерсон-Тилтонове формуле. Обрада података обављена је сагласно постављеном типу огледа, анализом варијансе (*ANOVA: Two-Factor Without Replication, MS Office 2007, Excel*) и применом Т-теста. Пошто подаци изражени у процентима имају биномну расподелу, извршена је њихова трансформација помоћу статистике: $y = 2 \arcsin \sqrt{(x/100)}$.

Лабораторијски огледи са јединкама *Aphis pomi* су имали за циљ утврђивање LC₅₀ испитиваних инсектицида за узорак јединки из популација зелене ваши јабуке, а спроведени су према протоколу ИРАС-а. Огледи су изведени са одраслим бескрилним јединкама *A. pomi* из популација ове врсте које потичу са локалитета Радмиловац (РА), Бела Црква (БЦ) и Сурчин (СУ). Тестиране су серије концентрација пиримикарба, диметоата, ацетамиприда и

ламбда – цихалотрина. Серије концентрација су добијене на основу резултата прелиминарних лабораторијских огледа. Припремљена је радна течност највеће концентрације за тестирање, а остала разблажења су направљена од ове радне течности. Ваши су узорковане по њиховој појави током априла 2011. године са локалитета и наношене на неинфестиране листове садница јабуке које су биле изоловане у три кавеза направљена од дрвених рамова и пластичне мрежице. На овако изолованим садницама колоније вашију су се развијале, и коришћене су за тестирања у лабораторији. Идентификацијом, утврђено је да јединке вашију са сва три локалитета припадају врсти *A. pomi*. Поступак извођења лабораторијског огледа са јединкама *A. pomi*: Здрави листови јабуке су потапани у радне течности. Оглед је изведен у 5 понављања. Листови су смештани појединачно у Петри судове, а затим је извршена инфестација сваког листа са 20 јединки вашију под стереомикроскопом. Петри судови су одлагани у термостат. Помоћу стерео микроскопа оцењиван је морталитет 24h после третирања. Јединке су сматране живим уколико су правиле координисане покрете. Статистичка обрада: Резултати су изражени као проценат морталитета јединки израчунат помоћу Аботове формуле. Медијална летална концентрација је утврђена применом пробит анализе (Finney, 1971; Raymond, 1985).

У циљу утврђивања биохемијских параметара који су индикатори развоја резистентности вашију, у биохемијској лабораторији Хемијског факултета у Београду обављена су тестирања јединки *A. pomi* пореклом са локалитета Радмиловац, Бела Црква и Сурчин 2011. године. Тестирања су изведена у складу са методама описаним у радовима иностраних аутора (Devonshire и сар., 1992; Owusu и сар., 1996a; Moores и сар., 1994a), уз мање модификације. Узорци јединки вашију су замрзавани у 50 % раствору глицерола (m/m). Замрзнуте ваши су прво хомогенизоване, а затим је вршена екстракција ензима – карбоксиестераза и ацетилхолин естеразе. Укупна естеразна активност одређена је према 1 – нафтил ацетату као супстрату спектрофотометријском методом. Зимограмска детекција укупне естеразне активности је рађена после изоелектричног фокусирања (IEF) естераза у акриламидном гелу уз коришћење раствора који су прописани за овај поступак. Изоелектрично фокусирање је урађено на *focusing Multiphor II* систему за електрофорезу према упутству произвођача. Као маркери за изоелектричну тачку (pI) коришћени су стандардни протеин и боје. Након фокусирања у гелу детектоване су естеразе зимограмом. Одређивање ацетилхолин естеразне активности је рађено према прописаној методи (Moores и сар., 1994a), уз одређене модификације. За овај поступак је коришћен апарат *Philips PU8620 series UV/VIS* спектрофотометар. Мерење промене апсорбанце је рађено на талсној дужини од 405 nm. Промена апсорбанце је мерена на узорцима који су садржали пиримикарб као инхибитор и на узорцима без пиримикарба. Статистичка обрада резултата је вршена поређењем 10 последњих упросечених вредности апсорбанци са и без присуства инхибитора за узорке са сва 3 локалитета (групе). Резултати су статистички обрађени употребом програма *GraphPad Prism 5 (trial version)* применом “one way” анализе варијансе и F –, односно T–теста за међусобно поређење група.

Лабораторијски оглед са јединкама *Aphidoletes aphidimyza* је имао за циљ утврђивање ефеката тестираних инсектицида на ларве овог предатора. Оглед је изведен са ларвама трећег ступња (L3) из популације која потиче са локалитета Радмиловац. Тестирани су инсектициди у следећим концентрацијама: диметоат (600 mg/l), ламбда – цихалотрин (12,5 mg/l), пиримикарб (200 mg/l) и ацетамиприд (50 mg/l). Узорковане су ларве предатора сакупљањем инфестираних листова. Сакупљено је неколико здравих листова јабуке који су одлагани у Петри судове, а затим је на сваки лист нането по 10 ларви *A. aphidimyza*. Третирање листова инсектицидима изведено је ручном прскалицом која ствара фин депозит на површини листа. Оглед је изведен у четири понављања. Исхрана ларви предатора вашима вршена је свакодневно током трајања експеримента. Петри судови су одлагани у термостат. Помоћу стереомикроскопа оцењен је морталитет ларви након експозиције у трајању од 24h, 48h, 72h и 96h. Ларве су сматране живим уколико су правиле координисане покрете. Резултати су изражени у процентима морталитета применом Аботове формуле, а LT₅₀ вредности су

израчунате пробит анализом (Finney, 1971; Raymond, 1985). Подаци су обрађени и анализом варијансе (*ANOVA: Two-Factor Without Replication, MS Office 2007, Excel*) и применом Т-теста.

2.4. Резултати

Резултати истраживања обрађени су у пет потпоглавља и написани су јасно и документовани пратећим табелама, графицима и сликама.

Прво потпоглавље односи се на испитивања ефикасности инсектицида у сузбијању *A. pomi* на јабуци на локалитетима Радмиловац, Бела Црква и Сурчин. На локалитетима Радмиловац (2008. и 2009. година) и Бела Црква (2008. година) највећу ефикасност испољио је ацетамиприд. Ефикасност ацетамиприда кретала се од 91,8% до 100%. На локалитету Бела Црква, хлорпирифос је испољио добро иницијално и нешто слабије резидуално деловање (96,6%, 95,9% и 83,1%). Добро иницијално (91,8%) и резидуално деловање 8 ДПТ (90,9%) испољио је ламбда – цихалотрин, али слабо резидуално деловање 15 ДПТ (71,4%). Слабу ефикасност испољио је пиримикарб (од 77,5% до 82,7%). Најслабије иницијално и резидуално деловање испољио је диметоат (од 78,4% до 52,6%). На локалитету Радмиловац, добру ефикасности и резидуално деловање испољио је хлорпирифос и то од 98,3% до 96,9% и слабије резидуално деловање 14 и 15 ДПТ (81,6% и 80,4%). Слабију ефикасност у односу на хлорпирифос испољио је ламбда – цихалотрин, уз нешто боље иницијално (88,0% до 90,5%) и резидуално деловање 7, односно 9 ДПТ (87,5% и 88,2%) и врло слабо резидуално деловање 14 и 15 ДПТ (57,7% и 60,4%). Диметоат је на овом локалитету испољио слабо иницијално и резидуално деловање, при чему се ефикасност кретала од 40,9% до 75,7%. Веома слабу ефикасност у обе године испитивања испољио је пиримикарб и то од 37,6% до 48,4%. Током 2009. године на локалитету Радмиловац, пиметрозин је испољио добро деловање 7 ДПТ (92,8%), али слабије резидуално деловање 14 ДПТ (81,6%). Добру ефикасност испољила је комбинација пиримикарба и ацетамиприда (94,6% до 98,8%), као и диметоат + пиперонил бутоксид + минерално уље (91,8% до 95,7%). Добре резултате показала је и комбинација хлорпирифоса и циперметрина, уз нешто слабије резидуално деловање 14 ДПТ (еф. од 82,5% до 98,6%). На локалитету Сурчин сви испитивани инсектициди су испољили веома добро иницијално и резидуално деловање, при чему је ефикасност износила и до 100%. Анализа варијансе и изведени Т-тест показали су значајне разлике, нарочито између високо ефикасних инсектицида и оних који су испољили слабију ефикасност у сузбијању *A. pomi*.

У другом потпоглављу приказани су резултати биотестова изведених са три различите популације *A. pomi* (РА, БЦ, СУ) и примењеним серијама концентрација инсектицида. Обрадом података методом пробит анализе добијене су вредности основних параметара, као и LC_{50} вредности тестираних једињења, а на основу ових параметара приказане су линије пробит регресије. LC_{50} вредности (mg/l) за пиримикарб су износиле: 134,16 (РА), 30,17 (БЦ) и 0,57 (СУ); за диметоат: 189,96 (РА), 158,92 (БЦ) и 17,71 (СУ); за ацетамиприд: 1,49 (РА), 1,14 (БЦ) и 0,68 (СУ); за ламбда-цихалотрин: 1,24 (РА), 0,94 (БЦ) и 0,36 (СУ). Фактори резистентности су износили за: пиримикарб 235,4 (РА) и 52,9 (БЦ); диметоат 10,7 (РА) и 9,0 (БЦ); ацетамиприд 2,2 (РА) и 1,7 (БЦ); ламбда – цихалотрин 3,4 (РА) и 2,6 (БЦ).

У трећем потпоглављу приказани су резултати биохемијских тестова са јединкама зелене ваши јабуке пореклом са испитиваних локалитета. Резултати теста укупне естеразне активности показали су да се популација СУ може сврстати у категорију осетљиве (S), популација РА у категорију резистентне (R1), а такође и популација БЦ у категорију резистентне (R1), на основу вредности очитаних апсорбанци (A_{620}). Индекси резистентности су износили 1,7 за популацију РА, односно 1,6 за популацију БЦ. Зимограмска детекција укупне естеразне активности са 1-нафтил ацетатом као супстратом: на зимограму се уочава да ваши из популације РА имају 7 изоформи естераза. У РА групи су се издвојиле две интензивне траке и оне су присутне само у овој групи, а у осталим групама (БЦ и СУ) недостају (естеразе E1 и E2). Такође, у групи РА издвојиле су се траке изоформи естераза од

ЕЗ до Е7. У групи БЦ се издвојило пет изоформи естераза (ЕЗ до Е7), као и у групи СУ. Траке на зимограму разликују се и квантитативно, тј. по интензитету, при чему је интензитет трака највећи у групи РА, нешто мањи у групи БЦ, а најмањи у групи СУ. То значи да су естеразе у групама РА и БЦ присутне у већој количини и да су активније. Слично се може видети и на зимограму где је супстрат био 2-нафтил ацетат, као и при бојењу протеина СВВ-ом после IEF-а. Тест активности ацетилхолин естеразе (АChE): према нагибу криве активности у присуству инхибитора (пиримикарба) може се видети да је АChE највише инхибирана у узорцима из популација СУ и БЦ, а мање код узорака вашију из популације РА. Када се упореде подаци за апсорбанцу АChE на 405 nm у присуству и без присуства пиримикарба, при чему се за поређење узму вредности последњих 10 читавања и упросече, добија се вредност која говори колико је пута апсорбанца мања у присуству инхибитора. Ове вредности износе: 1,53 пута за узорак вашију из популације РА, 1,70 пута за узорак вашију из популације БЦ и 1,72 пута за узорак вашију из популације СУ.

Четврто потпоглавље се односи на утврђивање штетних ефеката инсектицида на *A. aphidimyza* у пољским условима. Резултати огледа изведеног током 2008. године на локалитету Радмиловац указују на штетне ефекте диметоата (морталитет 89,3%, 92,3% и 95,2%), ламбда – цихалотрина (87,4%, 95% и 100%), хлорпирифоса (81%, 84,4% и 96,6%) и ацетамиприда (79,9%, 93,1% и 100%). Најнижи степен морталитета ларви овог предатора изазвала је примена пиримикарба и он је износио 33,8%, 57,5%, односно 67,6%. Резултати огледа изведеног током 2009. године на локалитету Радмиловац, указали су на штетност комбинације диметоата са пиперонил бутоксидом и минералним уљем (94,4% до 100%), хлорпирифос са циперметрином (93,7%, 98,8%, 100%), диметоата (91,2%, 96,6%, 96,9%), ацетамиприда (81,6%, 92,6%, 100%), ламбда – цихалотрина (80,4%, 92,4%, 100%), хлорпирифоса (77,4%, 87,5%, 98,6%), и комбинације пиримикарба са ацетамипридом (74,8%, 90,3%, 95,5%). У истом периоду оцењивања, пиримикарб се показао као умерено до незнатно штетан (37,9%, 44,7%, 59,0%), а пиметрозин као нешкодљив до незнатно штетан (18,8%, 22,8%, 25,6%). Резултати огледа изведеног током 2008. године на локалитету Бела Црква указали су да су диметоат (95,6%, 95,2%, 100%), хлорпирифос (96,7%, 95,2%, 100%), ламбда – цихалотрин (91,6% и 100%), и ацетамиприд (86,7% и 100%) били штетни за ларве *A. aphidimyza*. Најнижи степен морталитета ларви овог предатора изазвао је пиримикарб (45,5%, 47,4%, 48,3%). Анализа варијансе и Т-тест показали су значајне разлике, нарочито између штетних инсектицида и оних који су били нешкодљиви до умерено штетни.

У петом потпоглављу приказани су резултати лабораторијског огледа са ларвама *A. aphidimyza* пореклом са локалитета Радмиловац на којима су тестирани инсектициди: диметоат (600 mg/l), ламбда – цихалотрин (12,5 mg/l), пиримикарб (200 mg/l) и ацетамиприд (50 mg/l). Јединке предатора су третиране одређеном концентрацијом сваког инсектицида, а ефекти су праћени после експозиције у трајању од 24h, 48h, 72h и 96h. У периодима оцењивања ефеката, морталитет ларви износио је за: диметоат 30,0%, 47,5%, 72,5% и 87,5%; ламбда-cichалотрин: 25,0%, 45,0%, 62,5% и 80,0%; ацетамиприд: 27,5%, 40,0%, 60,0% и 72,5%; пиримикарб: 10,0%, 20,0%, 35,0% и 57,5%;. Обрадом података методом пробит анализе добијене су вредности основних параметара на основу којих су приказане линије пробит регресије, као и LT_{50} вредности тестираних једињења, на ларве *A. aphidimyza*, и оне су износиле за: диметоат ($LT_{50} = 42,07h$) > ламбда - цихалотрин ($LT_{50} = 49,20h$) > ацетамиприд ($LT_{50} = 53,43h$) > пиримикарб ($LT_{50} = 92,37h$).

2.4. Дискусија

У овом делу аутор детаљно дискутује сопствене резултате и упоређује их са резултатима других истраживача који су радили на сличној проблематици.

У дискусији о ефикасности примењених инсектицида за сузбијање зелене ваши јабуке, кандидат у недостатку паралелних истраживања, детаљно коментарише своје резултате, поредећи ефикасност различитих инсектицида, као и истих инсектицида на различитим локалитетима. Такође, пореди иницијално и резидуално деловање и на основу тога закључује

о потреби за поновним третирањем засада јабуке и када се она указује након сваког примењеног једињења или комбинације једињења. Поред остварене добре ефикасности са ацетамипридом и хлорпирифосом, у циљу изналажења нових решења за сузбијање биљних вашију на јабуци, кандидат је испитао ефикасност још неких третмана у другој години испитивања на локалитету Радмиловац. Резултати су указали на позитивне ефекте примене једињења са новијим механизмом деловања, комбинација инсектицида различитих механизма деловања као и примене инсектицида у комбинацији са синергистима. Ово је у складу са новијим истраживањима која су показала да пиперонил бутоксид, не само што инхибира микрозомалне оксидазе, већ слично делује и на естеразе које су у функцији резистентности биљних вашију (Mooges и сар., 2009). Овакви системи заштите у складу су и са препорукама IRAC-а који даје основне принципе у стратегији управљања резистентношћу штеточина.

Резултати који се односе на утврђивање LC_{50} појединих једињења као и фактора резистентности популација зелене ваши јабуке из Беле Цркве и Радмиловца указали су на висок степен резистентности популација РА и БЦ на пиримикарб и диметоат, слаб степен резистентности на ламбда – цихалотрин и незнатан на ацетамиприд. Упоредни подаци сличних испитивања осетљивости *A. pomi* су оскудни. Утврђене LC_{50} неких инсектицида за различите популације *A. pomi* пореклом из засада јабуке из северне Америке у којима се спроводе различите мере сузбијања штеточина (Lowery и сар., 2005; Lowery и сар., 2006) биле су врло сличне са упоредним вредностима за популације РА и БЦ на диметоат, ламбда – цихалотрин и ацетамиприд. Међутим популације РА и БЦ су развиле далеко већи степен резистентности на пиримикарб (235,4 и 52,9) у поређењу са америчким популацијама *A. pomi*.

Резултати теста укупне естеразне активности су показали, да је популација СУ осетљива, док су популације РА и БЦ генерално, резистентне популације. У овом поступку откривена је разлика у осетљивости три испитиване популације и потврђено да се механизам повећане продукције естераза развио код популација РА и БЦ. У телу најрезистентнијих вашију око 60 пута може бити већа естеразна активност него у високо осетљивим (Hedley и сар., 1998). Зимограмска детекција укупних естераза представља још један доказ да се код популација РА и БЦ развио механизам резистентности прекомерне продукције естераза при чему код популације РА постоји 7 изоформи, а код популације БЦ 5 изоформи естераза. Такође, естеразе су активније код јединки ових популација него код оних које потичу са локалитета Сурчин, где се такође детектује 5 изоформи естераза као и код популације БЦ, али се оне изразито квантитативно разликују. Ови резултати су у складу са истраживањима других аутора. Код ваши *S. graminum* постоји скоро потпуна идентичност састава изоензима естераза код осетљивог као и код резистентног клона што наводи на закључак да је узрок резистентности искључиво квантитативни састав естераза, тј. прекомерна продукција изоензимских форми (Siegfried и Zera, 1994). Резултати теста активности ацетилхолин естеразе у присуству и без присуства инхибитора наводе на закључак да је код популација СУ и БЦ ацетилхолин естераза високо осетљива на пиримикарб. Код популације РА постоји изванредно модификоване ацетилхолин естеразе, која доприноси њеној високој резистентности на инсектициде инхибиторе АСhЕ, уз преовлађујући механизам прекомерне продукције естеразних ензима. Током 1994. године Mooges, Devin и Devonshire први пут помињу механизам резистентности услед модификације ацетилхолин естеразе код *M. persicae*.

У дискусији резултата пољског огледа са ларвама *A. aphidimyza* и примењеним инсектицидима, опет у недостатку паралелних истраживања, кандидат детаљно сагледава резултате до којих је дошао и користећи усвојену категоризацију класификује инсектициде према штетности, на основу оствареног морталитета у оценама након третирања на испитиваним локалитетима. У пољским условима на локалитету Радмиловац штетни за ларве *A. aphidimyza* били су: комбинација диметоата са пиперонил бутоксином и минералним уљем, комбинација хлорпирифоса и циперметрина, диметоат, ацетамиприд, ламбда –

цихалотрин, хлорпирифос и комбинација пиримикарба и ацетамиприда, док је нешкодљив био пиметрозин и незнатно штетан пиримикарб. На локалитету Бела Црква штетни су били: диметоат, хлорпирифос, ламбда – цихалотрин, и ацетамиприд, док је незнатно штетан био пиримикарб.

Према резултатима лабораторијског огледа, посматрајући степен mortalитета ларви током експозиције, кандидат је инсектициде разврстао према штетним ефектима за јединке *A. aphidimyza* на следећи начин: диметоат (600 mg/l) > ламбда - цихалотрин (12,5 mg/l) > ацетамиприд (50 mg/l) > пиримикарб (200 mg/l). Разврставајући испитивана једињења према брзини деловања на јединке *A. aphidimyza* (LT₅₀) поредак је сличан. Кандидат наводи да битан фактор који утиче на штетност инсектицида за популације предаторских врста може бити и степен њихове резистентности који се током дужег временског периода развија и код ових организама, као што је то случај код штеточина услед дуготрајне селекције инсектицидима.

2.5. Закључци

Закључци су правилно изведени, коректно интерпретирани и у потпуности произилазе из добијених резултата.

- Добра ефикасност диметоата ($\geq 90,4\%$), ламбда – цихалотрина ($\geq 92,6\%$), пиримикарба ($\geq 94,9\%$) и ацетамиприда ($\geq 98,8\%$) у сузбијању *A. pomi* на јабуци постигнута је на локалитету Сурчин (СУ). На Радмиловцу (РА) и у Белој Цркви (БЦ) добру ефикасност (91,8-100%) и дуго резидуално деловање имао је ацетамиприд.

- На локалитету РА добра ефикасност у сузбијању *A. pomi* постигнута је и применом хлорпирифоса и циперметрина, као и пиримикарба и ацетамиприда што се огледа у доброј иницијалној ефикасности оваквих комбинација (98,0-98,8%). Пиримикарб + ацетамиприд испољио је добро резидуално деловање (94,6%), док је хлорпирифос са циперметрином имао нешто слабију ефикасност (82,5%) у последњој оцени. Добри резултати су остварени применом диметоата са ПБО и минералним уљем (91,8-95,7%). Пиметрозин је имао добру ефикасност 7 ДПТ (92,8%), уз нешто слабије резидуално деловање 14 ДПТ (81,6%).

- Хлорпирифос је испољио високу иницијалну ефикасност (95,9-98,3%), добро резидуално деловање 7 и 9 ДПТ (96,6 и 97,9%) и нешто слабије деловање 14 и 15 ДПТ (80,4 и 83,1%) на локалитетима БЦ и РА.

- На локалитету БЦ, ламбда–cichалотрин је испољио добро иницијално (91,8%) и резидуално деловање 8 ДПТ (90,9%), али слабо деловање 15 ДПТ (71,4%). Сличну ефикасност испољио је ламбда–cichалотрин на локалитету РА уз добро иницијално (88,0-90,5%) и резидуално деловање 7 и 9 ДПТ (87,6 и 88,2%). Веома слабо резидуално деловање испољио је 15 ДПТ (57,7-60,4%).

- Слабу ефикасност (77,5-82,7%) на локалитету БЦ испољио је пиримикарб. Веома слабу ефикасност (37,6-48,4%) у обе године испитивања пиримикарб је испољио на локалитету РА.

- На локалитету БЦ, слабу ефикасност (52,6-78,4%) у сузбијању *A. pomi* испољио је диметоат, тако да се потреба за поновним третирањем указала већ 8 ДПТ. Диметоат је имао још нижу ефикасност (40,9-75,7%) током обе године испитивања на локалитету РА.

- Поређењем резултата пољских огледа на локалитетима РА и БЦ, произилази да популације зелене ваши јабуке испољавају слабу осетљивост на диметоат и пиримикарб, нешто већу на ламбда – цихалотрин, а високо су осетљиве на хлорпирифос и ацетамиприд.

- Према фактору резистентности (RF), популације РА и БЦ *A. pomi* су најосетљивије на ацетамиприд (RF 2,2 и 1,7). Одређени степен резистентности развиле су на ламбда–cichалотрин (RF 3,4 и 2,6), висок степен на диметоат (RF 10,7 и 9,0) и веома висок на пиримикарб (RF 235,4 и 52,9).

- Тест укупне естеразне активности доказао да се механизам повећане продукције естераза развио код популација РА и БЦ пружајући им висок степен резистентности на поједине инсектициде, при чему је популација СУ осетљива.

- Зимограмска детекција укупних естераза потврдила је да се код популација РА и БЦ развио механизам резистентности прекомерне продукције естераза при чему код популације РА постоји 7, а код популације БЦ 5 изоформи естераза. Такође, естеразе су активније код јединки ових популација него код популације СУ, где се такође детектује 5 изоформи естераза као и код популације БЦ, али су оне присутне у већој количини, те отуда и разлика у степену резистентности на поједине инсектициде.

- Тест активности ацетилхолин естеразе (AChE) у присуству и одсуству инхибитора доказао је да је код популација СУ и БЦ AChE високо осетљива на пиримикарб, док код популације РА постоји извесан удео модификоване AChE, неосетљиве на ово једињење, која доприноси већем степену резистентности на инсектициде инхибиторе AChE.

- Према морталитету ларви *A. aphidimyza* у огледима на локалитету РА, пиметрозин је био нешкодљив (морталитет 18,8-22,8%), пиримикарб незнатно до умерено штетан (33,8-67,6%), пиримикарб са ацетамипридом умерено штетан до штетан (74,8-95,5%), док су штетни били хлорпирифос (77,4-98,6%), ацетамиприд (79,9-100%), ламбда – цихалотрин (80,4-100%), диметоат (89,3-96,9%), хлорпирифос са циперметрином (93,7-100%) и диметоат са ПБО и минералним уљем (94,4-100%). За популацију БЦ, пиримикарб је био незнатно штетан (45,5-48,3%), док су штетни били ацетамиприд (86,7-100%), ламбда – цихалотрин (91,6-100%), хлорпирифос (95,2-100%) и диметоат (95,2-100%).

- Након изведеног лабораторијског огледа, а на основу морталитета ларви *A. aphidimyza* из популације РА после експозиције у трајању од 96h, произилази да су диметоат (600 mg/l) и ламбда – цихалотрин (12,5 mg/l) били умерено штетни (морталитет 87,5% и 80,0%), а ацетамиприд (50 mg/l) и пиримикарб (200 mg/l) незнатно штетни (морталитет 72,5% и 57,5%) за јединке ове популације.

2.7. Литература:

Цитирано је 127 референци (од којих 17 домаћих), чији је избор актуелан и примерен тематици која је проучавана.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу свега изложеног чланови комисије сматрају да добијени резултати докторске дисертације дипл. инж. Ненада Тамаша представљају значајан допринос науци и струци. По први пут у нашој земљи утврђени су фактори резистентности зелене ваши јабуке на локалитетима где се спроводе различити програми заштите од ове штеточине и то на једињења која су и данас актуелна, а такође је по први пут биохемијским тестовима утврђена повећана продукција као и број естераза код резистентних популација са интензивних засада. Тестом активности ацетилхолин естеразе у присуству и без инхибитора доказано је да се на локалитету Радмиловац појавио извесан удео јединки зелене ваши са модификованом AChE која повећава општи ниво резистентности ове популације на инхибиторе овог ензима.

Пиримикарб, специфичан афицид, и како су огледи доказали, нешкодљив за најприсутније предаторе (ларве *A. aphidimyza*) у засаду јабуке није регистрован за примену код нас. С обзиром на високу резистентност *A. pomi* која се развила код популација где се спроводе интензивне мере хемијског сузбијања, не би се могла препоручити његова поновна регистрација. Међутим, са друге стране, његова висока селективност и безбедност за корисне организме препоручују га за укључивање у програме интегралне заштите поготово на локалитетима где су присутне осетљиве популације зелене ваши. Пиметрозин и ацетамиприд су се показали као нешкодљив, односно слабо штетан за ларве *A. aphidimyza*, а истовремено и високо ефикасни за сузбијање *A. pomi* што их препоручује за укључивање у програме интегралне заштите јабуке. У интензивним засадама јабуке могу се примењивати мање селективни инсектициди за предаторе и високо ефикасни за ваши (хлорпирифос, ламбда – цихалотрин, хлорпирифос + циперметрин, диметоат + ПБО + минерално уље, пиримикарб + ацетамиприд), у ранијим фазама вегетације, када предатори нису присутни у значајнијој бројности. Ово је у складу са антирезистентном стратегијом која подразумева 5 основних

принципа: 1. алтернативну примену инсектицида током вегетације (ацетамиприд, пиметрозин, хлорпирифос, комбинације више инсектицида, као и комбинације са синергистима); 2. примену комбинација инсектицида различитих механизма деловања (хлорпирифос + циперметрин, пиримикарб + ацетамиприд); 3. примену комбинација инсектицида са синергистима (диметоат + ПБО + минерално уље); 4. примену инсектицида са новијим механизмом деловања (пиметрозин); 5. спровођење мера интегралне заштите које подразумевају и очување аутохтоних популација предатора и других корисних организама.

Дисертација је урађена према одобреној пријави, она је оригинално и самостално научно дело те комисија предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета да прихвати овај реферат и одобри јавну одбрану докторске дисертације дипл. инж. Ненада Тамаша под насловом: "Осетљивост зелене ваши јабуке (*Aphis pomi* De Geer) и предатора из фамилије Cecidomyiidae на инсектициде различитих механизма деловања".

Комисија:

др Ибрахим Елезовић, редовни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
(Пестициди)

др Душанка Инђић, редовни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Новом Саду
(Фитофармација)

др Радослава Спасић, редовни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
(Ентомологија и пољопривредна зоологија)

др Новица Милетић, доцент
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
(Пестициди)

др Милован Величковић, редовни професор
Пољопривредни факултет Универзитета у Београду
(Воћарство)

Прилог:

Рад дипл. инж. Ненада Тамаша објављен у часопису од међународног значаја:

Miletić, N., **Tamaš, N.** and Graora, D.: The control of codling moth (*Cydia pomonella* L.) in apple trees. ŽEMDIRBYSTĖ=Agriculture, 98/2, 213-218, 2011.
(ISSN: 1392-3196)

Припада категорији индикатора компетентности M23 (часопис међународног значаја са импакт фактором 0,232 за 2010. годину).

Категоризација часописа је утврђена у бази:

<http://www.kobson.nb.rs.proxy.kobson.nb.rs:2048/servisi.131.html?issn=1392-3196>

проф. др Ибрахим Елезовић, ментор