

Laboratorijsko preizkušanje zatiranja plodove vinske mušice *Drosophila suzukii* z biopesticidi

***Končno poročilo o rezultatih poskusov izvedenih v letih
2017 in 2018***

Strokovna naloga integrirano varstvo rastlin

Jaka Razinger, Špela Modic, Primož Žigon

**Ljubljana
januar 2019**

Kmetijski inštitut Slovenije

Naročnik:

**Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
UPRAVA RS ZA VARNO HRANO, VETERINARSTVO
IN VARSTVO RASTLIN
Dunajska 22
1000 Ljubljana**

Izvajalec:

**Kmetijski inštitut Slovenije
Hacquetova ulica 17
1000 Ljubljana**

Vsebina

Uvod	2
Metode in materiali.....	2
Gojenje plodove vinske mušice	2
Postopki	2
Zasnova poskusa.....	3
Rezultati in diskusija	3
Preventivni nanos bioinsekticidov.....	3
Kurativni nanos bioinsekticidov.....	5
Sklepi	7
Literatura	8

Uvod

Plodova vinska mušica (PVM) (*Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931), Diptera, Drosophilidae) izvira iz Azije in je od l. 2008 zastopana v Severni Ameriki in Evropi, kjer povzroča škodo na jagodičevju (Cini in sod., 2014). Od ostalih sorodnih vrst vinskih mušic, ki se prehranjujejo na gnijočih in poškodovanih plodovih, se samice PVM razlikujejo po ostro nazobčani leglici, s katero lahko odlagajo jajčeca v nepoškodovane zoreče plodove in povzročijo večje izgube pridelka (Lee in sod., 2011).

PVM ima velik razmnoževalni potencial in ima skozi celo rastno dobo na razpolago številne gostiteljske rastline, zato je njeno zatiranje oteženo. Poleg tega lahko dorasle žerke zapustijo plod in se zabubijo v tleh sadovnjaka, kjer so varne pred insekticidi (Cuthbertson in sod., 2014a). Proučevanih je bilo že več strategij varstva PVM v nasadih ameriških borovnic, jagodnjaka, malinjaka (e.g. Bruck in sod., 2011; Van Timmeren and Isaacs, 2013) in drugih sadnih vrst. V ekološki pridelavi sadja je raba insekticidov močno omejena, poleg tega njihova raba negativno vpliva na koristne organizme. Z namenom iskanja učinkovitih strategij biotičnega zatiranja PVM je bilo v svetu več raziskav usmerjenih v proučevanje parazitoidov in plenilcev (Chabert in sod. 2012; Gabarra in sod. 2015; Rossi Stacconi in sod. 2015; Woltz in sod. 2015), entomopatogenih ogorčic (Cuthbertson in sod., 2014b; Gargani in sod., 2013; Woltz in sod., 2015) in entomopatogenih gliv (Naranjo-Lázaro in sod., 2014)..

Naša hipoteza je bila, da lahko bioinsekticidi na osnovi entomopatogenih gliv uspešno okužijo in uničijo PVM. Želeli smo preveriti tudi, če bioinsekticidi na osnovi entomopatogenih gliv okužujejo in posledično zmanjšujejo pritisk škodljivca, če so naneseni na predhodno s PVM okužene plodove. Cilji raziskave so bili, a) določiti vpliv mikrobnih bioinsekticidov na zmanjšanje populacije mušic v plodovih ameriških borovnic pred okužbo s PVM (preskus preventivne aplikacije bioinsekticidov), ter b) določiti vpliv mikrobnih bioinsekticidov na zmanjšanje populacije mušic v plodovih ameriških borovnic, ki so že napadeni s PVM (preskus kurativne aplikacije bioinsekticidov).

Metode in materiali

Gojenje plodove vinske mušice

PVM smo gojili kot je to opisano v Razinger in sod. (2017).

Postopki

V poskusih v letih 2017 in 2018 smo preizkusili insekticid Laser, dva bioinsekticida, Naturalis in Mycotal, ter 3 KIS seve entomopatogenih gliv:

1. Naturalis (a.u. *Beauveria bassiana*; 0,1% raztopina)
2. Mycotal (a.u. *Verticillium lecanii*; 0,1% raztopina)
3. Laser 240 SC (a.u. spinosad 240 g/L; 0,09% raztopina)
4. *Metarhizium brunneum* (HJS 1154; konc. 1×10^6 CFU/ml)
5. *Metarhizium brunneum* (HJS 1868; konc. 1×10^6 CFU/ml)
6. *B. bassiana* (HJS 2121; konc. 1×10^6 CFU/ml)
7. Negativna kontrola (destilirana voda)

Zasnova poskusa

Poskus zatiranja *D. suzukii* smo v letih 2017 in 2018 izvedli pod nadzorovanimi pogoji v laboratoriju KIS. Poskus je bil osnovan na izpostavitvi borovnic laboratorijsko vzgojeni populaciji PVM. Borovnice smo nabrali v sadovnjaku Brdo pri Lukovici. Poskus smo izvajali na dva načina. Glede na čas nanosa bioinsekticidov (pred ali po izpostavitvi PVM) smo v laboratoriju simulirali preventivno ali kurativno uporabo mikrobnih biopesticidov.

a) Preventivni nanos bioinsekticidov

V tem poskusu smo najprej po 70 (2017) oz. 60 (2018) borovnic na postopek tretirali (nanos s pršenjem) z bioinsekticidi in jih nato pa izpostavili 10 samicam in 10 samcem *D. suzukii* (v nadaljevanju vhodne mušice) v 1,5 L plastičnih škatlah. Poskus je potekal v nadzorovanih razmerah v rastni komori (25°C, 77 % zračna vlaga, 10:14 h dan:noč). Tri, šest in 9 dni po izpostavitvi (v nadaljevanju DPI) smo ocenili smrtnost in glivična obolenja (mikoze) vhodnih mušic. Deveti dan (9 DPI) smo 70 oz. 60 preventivno tretiranih in s PVM napadenih borovnic razdelili v alikvote po 10 borovnic v 250 ml plastične škatle, ter odstranili vse vhodne mušice. Petnajsti dan (15 DPI) smo ocenili število mušic, bub in ličink, ki so se razvile v 250 ml posodicah iz desetih tretiranih in napadenih borovnic.

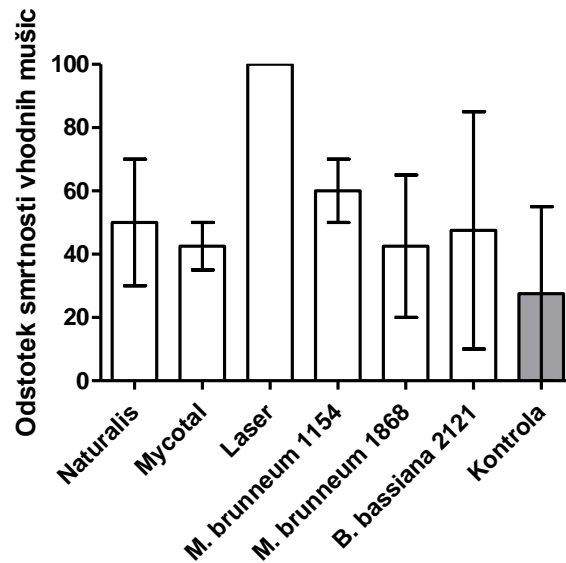
b) Kurativni nanos bioinsekticidov

V tem poskusu smo borovnice najprej izpostavili laboratorijsko gojeni populaciji PVM za 3 dni (umetna infestacija oz. napad škodljivca), nato pa smo na borovnice nanесли bioinsekticide s pršenjem. Borovnice smo okuževali tako, da smo v 27-litrski insektarij v rastni komori dali po dve 1000 ml plastični škatli, od katerih je vsaka vsebovala 250 ml borovnic (skupaj 0,5 L borovnic, oz. približno 400 borovnic). V insektariju je bilo približno 400 PVM obeh spolov in različnih starosti. Tako smo borovnice izpostavili umetnemu napadu PVM za 72 h. Po izpostavitvi umetnemu napadu PVM smo borovnice vzeli iz insektarija ter vse PVM odstranili. Na 50 (2017) oz. 60 (2018) napadenih borovnic na postopek smo nanесли ustrezni bioinsekticid, nato pa smo skupine 50 oz. 60 napadenih in tretiranih borovnic razdelili v skupine po 10 borovnic, ki smo jih dali v 250 ml plastične posodice in prestavili v rastno komoro (25°C, 77 % RH, 10:14 h dan:noč). Po šestnajstih dneh (16 DPI) od začetka napada PVM, oz. 13 dni po nanosu bioinsekticidov, smo prešteli mušice, bube in ličinke (nove generacije) v posodicah.

Rezultati in diskusija

Preventivni nanos bioinsekticidov

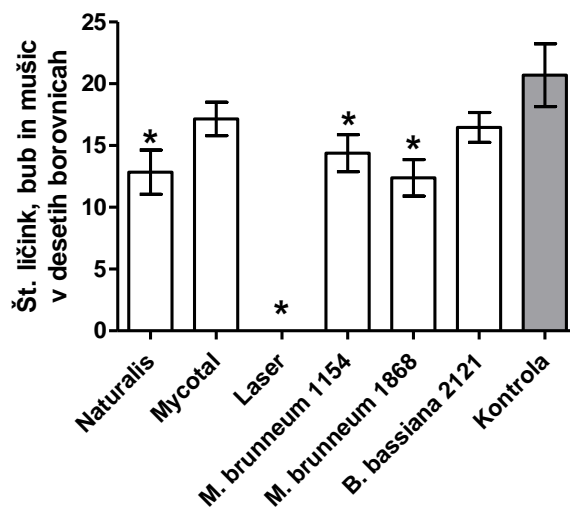
Največjo smrtnost 20 vhodnih PVM smo zabeležili pri postopku Laser (100 % smrtnost že pri 3 DPI), sledil je postopek *M. brunneum* 1154 (60 % smrtnost 9 DPI) in Naturalis (50 % smrtnost 9 DPI) (Slika 1). Opomba: zaradi razkroja mušic in okuženosti z entomopatogenimi glivami se spola mrtvih PVM ni dalo zanesljivo ločiti.



Slika 1: Smrtnost 20 vhodnih PVM 9 dni po izpostavitvi (DPI) v okviru preventivnih poskusov. *Naturalis* - bioinsekticid na osnovi glive *Beauveria bassiana*; *Mycotal* - bioinsekticid na osnovi glive *Verticillium lecanii*; *Laser* - bioinsekticid na osnovi aktivne snovi spinosad.

Najboljšo učinkovitost proti vhodnim PVM je izkazovalo sredstvo Laser, kar ni presenetljivo, saj ima spinosad dokazano učinkovitost delovanja na muhe (Diptera). Ob uporabi sredstva Laser je bila dosežena 100 % smrtnost vhodnih mušic PVM (10 samcev in 10 samic) že po treh dneh, in to zgolj ob posrednem tretiranju (sredstvo smo nanesli na borovnice in ne neposredno na mušice). Od obeh komercialnih bioinsekticidov na osnovi entomopatogenih gliv, *Naturalis* in *Mycotal*, je prvi v večji meri vplival na smrtnost vhodnih PVM.

Preučevana obravnavanja so imela značilen vpliv na število ličink, bub in mušic PVM, ki so se razvile v plodovih ameriških borovnic, na katere so bili pred izpostavitvijo PVM naneseni bioinsekticidi ($F_{7, 90} = 17,3$; $P < 0,0001$; Slika 2). Značilno zmanjšanje napadenosti borovnic z drugim rodом PVM smo zabeležili pri postopkih Laser ($0,0 \pm 0,0$), *Naturalis* ($12,8 \pm 1,8$), *M. brunneum* 1154 ($14,4 \pm 1,5$) in *M. brunneum* 1868 ($12,4 \pm 1,5$). V kontrolnem obravnavanju se je razvilo $20,7 \pm 2,6$ ličink, bub in mušic PVM druge generacije na 10 borovnic.

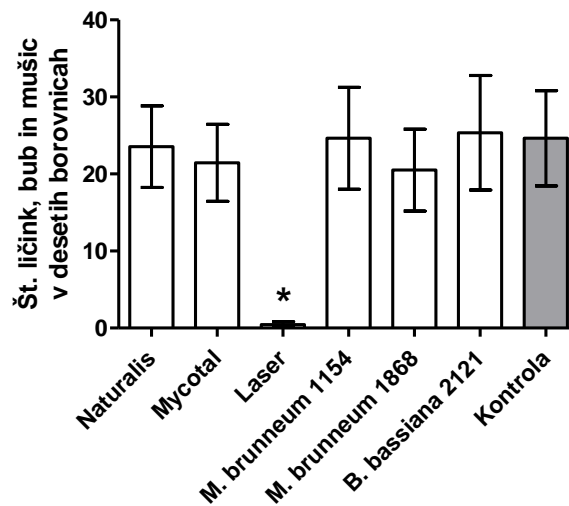


Slika 2: Število ličink, bub in mušic drugega rodu, ki so se razvile v borovnicah, ki so bile tretirane z bioinsekticidi pred izpostavitvijo PVM. Prikazano je povprečje \pm standardna napaka ($N = 13$) 15 dni po tretiranju. *Naturalis* - bioinsekticid na osnovi glive *Beauveria bassiana* izolat ATCC 74040; *Mycotal* - bioinsekticid na osnovi glive *Verticillium lecanii*; *Laser* - bioinsekticid na osnovi aktivne snovi spinosad.

Sredstvo Laser je izkazovalo visoko učinkovitost delovanja na PVM, saj nismo opazili nobenih ličink, bub ali mušic drugega rodu 15 dni po tretiranju z bioinsekticidi. Kot kažejo rezultati je sredstvo delovalo na vse vhodne PVM, preden so oplojene samice prvega rodu (vhodne mušice) lahko legle jajčeca v borovnice. Čeprav smo značilno zmanjšanje napadenosti borovnic z drugo generacijo PVM zabeležili tudi pri bioinsekticidu *Naturalis* in entomopatogenih glivah *M. brunneum* seva 1154 in 1868, sredstva v teh treh obravnavanjih niso bila dovolj učinkovita na PVM, saj so bile borovnice 15 DPI popolnoma požrte in poškodovane od številnih ličink PVM.

Kurativni nanos bioinsekticidov

Preizkušena obravnavanja večinoma niso značilno vplivala na število izleglih ličink, bub in mušic PVM iz borovnic, ki so bile pred nanosom bioinsekticidov za tri dni izpostavljene PVM ($F_{6, 74} = 2,52$; $P = 0,0288$; Slika 3). Značilno zmanjšanje napadenosti borovnic s PVM smo zabeležili le pri postopku Laser ($0,5 \pm 6,6$). V kontrolnem obravnavanju se je razvilo $24,6 \pm 6,2$ ličink, bub in mušic PVM na 10 borovnic.



Slika 3: Število ličink, bub in mušic PVM, ki so se razvile v borovnicah, najprej umetno okuženih s PVM in nato tretiranih z bioinsekticidi. Prikazano je povprečje \pm standardna napaka (N = 11) 13 dni po tretiranju z bioinsekticidi. *Naturalis* - bioinsekticid na osnovi glive *Beauveria bassiana* izolat ATCC 74040; *Mycotal* - bioinsekticid na osnovi glive *Verticillium lecanii*; *Laser* - bioinsekticid na osnovi aktivne snovi spinosad.

Bioinsekticid Laser je dotikalni (kontaktni) in želodčni insekticid, ki je izkazoval tudi učinkovito kurativno delovanje na borovnicah. V borovnicah, ki smo jih za tri dni izpostavili kulturi spolno zrelih in oplojenih PVM in nato poškopili s sredstvom Laser, se je razvilo le $0,5 \pm 6,6$ ličink, bub in mušic PVM 13 dni po tretiranju z bioinsekticidom. Ostala obravnavanja se niso značilno razlikovala od kontrolnega.

Sklepi

- **Sredstvo Laser (240 SC)** ima močan posredni učinek na PVM: nanesen na borovnice učinkovito varuje borovnice pred napadom PVM. Tako **v laboratorijskih pogojih izkazuje možnost preventivne uporabe.**
- **Sredstvo Laser v laboratorijskih pogojih izkazuje kurativni učinek na PVM:** v borovnicah izpostavljenih PVM za tri dni pred nanosom sredstva Laser se je razvilo značilno manj ličink, bub ali mušic PVM ($0,5 \pm 6,6$), napram negativni kontroli ($24,6 \pm 6,2$).
- **V laboratorijskih poskusih preizkušani bioinsekticidi na osnovi entomopatogenih gliv nezadostno zaščitijo borovnice v smislu preventivne uporabe:** kljub značilnem zmanjšanju napadenosti borovnic z drugo generacijo PVM v postopkih Naturalis in *M. brunneum* (seva 1154 in 1868) so borovnice 15 dni po tretiranju popolnoma propadle.
- **V laboratorijskih poskusih preizkušani bioinsekticidi na osnovi entomopatogenih gliv ne izkazujejo kurativnega učinka.**

Literatura

- Bruck, D.J., Bolda, M., Tanigoshi, L., Klick, J., Kleiber, J., DeFrancesco, J., Gerdeman, B., Spitler, H., 2011. Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops. *Pest Manag. Sci.* 67, 1375–85. doi:10.1002/ps.2242
- Chabert, S., Allemand, R., Poyet, M., Eslin, P., Gibert, P., 2012. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biol. Control* 63, 40–47. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.05.005
- Cini, A., Anfora, G., Escudero-Colomar, L.A., Grassi, A., Santosuosso, U., Seljak, G., Papini, A., 2014. Tracking the invasion of the alien fruit pest *Drosophila suzukii* in Europe. *J. Pest Sci.* (2004). 87, 559–566. doi:10.1007/s10340-014-0617-z
- Cuthbertson, A.G.S., Blackburn, L.F., Audsley, N., 2014. Efficacy of Commercially Available Invertebrate Predators against *Drosophila suzukii*. *Insects* 5, 952–960. doi:10.3390/insects5040952
- Cuthbertson, A.G.S., Collins, D.A., Blackburn, L.F., Audsley, N., Bell, H.A., 2014. Preliminary screening of potential control products against *Drosophila suzukii*. *Insects* 5, 488–498. doi:10.3390/insects5020488
- Gabarra, R., Riudavets, J., Rodríguez, G. a., Pujade-Villar, J., Arnó, J., 2015. Prospects for the biological control of *Drosophila suzukii*. *BioControl* 60, 331–339. doi:10.1007/s10526-014-9646-z
- Gargani, E., Tarchi, F., Frosinini, R., Mazza, G., Simoni, S., 2013. Notes on *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera Drosophilidae): field survey in Tuscany and laboratory evaluation of organic products. *Redia*.
- Lee, J.C., Bruck, D.J., Dreves, A.J., Ioriatti, C., Vogt, H., Baufeld, P., 2011. In Focus: Spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, across perspectives. *Pest Manag. Sci.* 67, 1349–1351. doi:10.1002/ps.2271
- Naranjo-Lázaro, J.M., Mellín-Rosas, M.A., González-Padilla, V.D., Sánchez-González, J.A., Moreno-Carrillo, G., Arredondo-Bernal, H.C., 2014. Susceptibility of *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae) to Entomopathogenic Fungi. *Southwest. Entomol.* 39, 201–203. doi:10.3958/059.039.0119
- Razinger, J., Fink, K., Kerin, A., Modic, Š., Urek, G., 2017. Dovzetnost bub plodove vinske mušice (*Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931)) za okužbo z entomopatogenimi glivami / Susceptibility of spotted wing drosophila (*Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931)) pupae to entomopathogenic fungi. *Acta Agric. Slov.* 109, 125–134. doi:10.14720/aas.2017.109.1.12
- Rossi Stacconi, M.V., Buffington, M., Daane, K.M., Dalton, D.T., Grassi, A., Kaçar, G., Miller, B., Miller, J.C., Baser, N., Ioriatti, C., Walton, V.M., Wiman, N.G., Wang, X., Anfora, G., 2015. Host stage preference, efficacy and fecundity of parasitoids attacking *Drosophila suzukii* in newly invaded areas. *Biol. Control* 84, 28–35. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.02.003
- Rota-Stabelli, O., Blaxter, M., Anfora, G., 2013. *Drosophila suzukii*. *Curr. Biol.* 23, R8–R9. doi:10.1016/j.cub.2012.11.021
- Van Timmeren, S., Isaacs, R., 2013. Control of spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, by specific insecticides and by conventional and organic crop protection programs. *Crop Prot.* 54, 126–133. doi:10.1016/j.cropro.2013.08.003
- Walse, S.S., Krugner, R., Tebbets, J.S., 2012. Postharvest treatment of strawberries with methyl

bromide to control spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*. J. Asia. Pac. Entomol. 15, 451–456. doi:10.1016/j.aspen.2012.05.003

Woltz, J.M., Donahue, K.M., Bruck, D.J., Lee, J.C., 2015. Efficacy of commercially available predators, nematodes and fungal entomopathogens for augmentative control of *Drosophila suzukii*. J. Appl. Entomol. 139, 759–770. doi:10.1111/jen.12200