

Ocena skuteczności rodentycydów

Zaprawy nasienne odstrasżające gryzonie

Zakres

Niniejsza norma opisuje sposób prowadzenia badań nad oceną skuteczności zapraw nasiennych odstrasżających gryzonie.

Zatwierdzenie normy i poprawki

Po raz pierwszy zatwierdzona we wrześniu 1996.

1. Wstęp

Pokrywanie nasion substancjami chemicznymi odstrasżającymi gryzonie jest zwyczajowym sposobem stosowanym podczas programów zalesiania w wielu krajach (Radwan, 1970; Martell, 1981). Jednakże, szczegółowe protokoły oceny skuteczności środków odstrasżających gryzonie do tej pory nie zostały ustalone. Niniejsza norma ma na celu normalizację procedur badań wśród Członków Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin EPPO. Została ona stworzona na potrzeby przeprowadzania doświadczeń na gryzoniach ziarnożernych i wszystkożernych, mogących powodować poważne straty finansowe poprzez żerowanie na nasionach w leśnictwie i rolnictwie. Zalesianie poprzez bezpośredni zasiew często staje się niemożliwe z powodu żerowania na nasionach, zazwyczaj przez gatunki z rodzaju myszy polnej (*Apodemus*) oraz nornic (*Clethrionomys*). Również ryjówki (gatunek *Sorex*) mogą mieć znaczny w tym udział (Myllymäki & Paasikallio, 1976). To samo dzieje się w przypadku szkółek drzew leśnych. Najpowszechniejsze i najdotkliwsze finansowo szkody w rolnictwie są powodowane przez *Apodemus sylvaticus*, żerujące na nowo posianych nasionach buraka cukrowego w granulach. Mysz domowa (*Mus* spp.) może niekiedy również żerować na nasionach.

Celem środków odstrasżających jest raczej ochrona nasion niż zmniejszenie liczby gryzoni poprzez stosowanie rodentycydów. Biorąc pod uwagę tę różnicę, niniejsza norma jest uzupełniająca względem wcześniejszej serii norm dotyczących oceny skuteczności rodentycydów, norm EPPO PP 1/97 Ocena skuteczności rodentycydów w postaci preparatu do opylania w doświadczeniach laboratoryjnych i polowych, PP 1/113 Ocena toksyczności i dopuszczalności stosowania rodentycydów w doświadczeniach laboratoryjnych., PP 1/114 Doświadczenia polowe preparatów przeciwko gryzoniom synantropijnym (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *R. rattus*), PP 1/169 O gryzoniach polnych (*Microtus*, *Arvicola*). W przeciwieństwie do badań z użyciem rodentycydów, podczas badań z użyciem

substancji odstrasżających (repelentów), należy również wziąć pod uwagę fitotoksyczność, jako że żywotność materiału roślinnego nie może zostać zbyt ograniczona poprzez te zabiegi. Podobne czynniki mają zastosowanie w przypadku środków odstrasżających, stosowanych przy okorowywaniu drzew, określonych w osobnej normie EPPO PP1/200 O repelentach stosowanych przeciw okorowywaniu drzew.

Substancje odstrasżające mogą być również przydatne, przy minimalizacji prawdopodobieństwa, że gryzonie i inne kręgowce, niebędące przedmiotem badań ulegną zatruciu po spożyciu nasion pokrytych substancjami chroniącymi rośliny (środkami owadobójczymi, molluskocydami, etc.).

Środek odstrasżający nie musi być śmiertelny dla szkodliwych gryzoni, lecz powinien raczej odstraszać zwierzęta poprzez swój zapach, smak lub inne wrażenia. W przeszłości granica pomiędzy trucizną a repelentem nie zawsze była jasno określona, a silnie trujące związki (np. endryna) były używane jako repelenty. Z tego powodu, osoba przeprowadzająca doświadczenia powinna przed rozpoczęciem testu zbadać dostępne dane toksykologiczne repelentu.

2. Warunki doświadczenia

2.1 Zaprawianie nasion, zwierzęta badane

Na potrzeby badania skuteczności repelentów można użyć jakichkolwiek nasion podatnych na szkody wyrządzane przez gryzonie. Jeśli jednak działanie odstrasżające ma być wywołane poprzez awersję smakową, badacz powinien pamiętać, że nasiona w łuskach są zazwyczaj rozłupywane przez gryzonie w taki sposób, że nie spożywają one łuski, a jedynie nasiona. Takie rodzaje nasion nie mogą być najprawdopodobniej chronione repelentami o działaniu smakowym.

Jeśli preparaty nie zostały nałożone na nasiona poprzez dostawcę, nałożenie to powinno zostać dokonane zgodnie z zaleceniami. Istnieją różne sposoby nakładania repelentów na nasiona, np. poprzez nasączanie, opryskiwanie, jako skład nawozu,

zmieszane z substancją pokrywającą lub jako wierzchnia warstwę pokrycia. W każdym przypadku, zastosowanie powinno zapewnić jednakowe nasaczenie nasion. Jeśli jest dostępny jakikolwiek repelent o znanej skuteczności w zastosowaniu w terenie, zalecane jest, aby został użyty w procedurze badawczej.

Najlepiej, jeśli doświadczenia będą przeprowadzane na zwierzętach schwytych niedawno na wolności. Jeśli jest to możliwe, każda seria doświadczeń powinna być przeprowadzana na nietestowanych wcześniej zwierzętach. Jeśli doświadczenia są przeprowadzane na odmianach wychowanych w warunkach laboratoryjnych, powinno zostać potwierdzone genetyczne zróżnicowanie okazów (patrz norma Eppo PP 1/198 Badanie odporności gryzoni na rodentycydy o działaniu antykoagulacyjnym). W badaniu należy wykorzystać równą ilość zwierząt obu płci. Doświadczenie wskazuje, że podczas wstępnych badań zadowalające efekty daje użycie minimum 10 sztuk zwierząt z każdej płci. W przypadku silnego zróżnicowania pomiędzy jednostkami, należy przeprowadzić doświadczenia na większej liczbie egzemplarzy.

Zanim rozpocznie się doświadczenia na pokrytych repelentem nasionach, badacz powinien przeprowadzić badania akceptacji na niebadanej dotąd grupie zwierząt. Ma to na celu stwierdzenie, czy jest prawdopodobne, że wszystkie jednostki chętnie spożyją dany typ nasion. Jeśli nie jest to zagwarantowane (tak jak w przypadku nasion buraka cukrowego w postaci granulki, pomimo, że mogą one ulec znacznym zniszczeniom w polu), a zamiana na inne nasiona nie jest możliwa, może okazać się wskazane uprzednie poddanie zwierząt diecie składającej się z niepreparowanych nasion (z gatunku, który ma być chroniony przez repelenty), aby zmniejszyć zmienność spożycia w wynikach badań.

2.2 Rodzaje doświadczeń

Wydajność repelentu powinna być oceniana w warunkach laboratoryjnych, na wybiegu i podczas doświadczeń polowych, przy użyciu gatunków przeznaczonych do tego typu doświadczeń. Badania laboratoryjne i na wybiegu powinny być zaprojektowane tak, aby dowieść wydajności repelentu w warunkach kontrolowanych, gdzie możliwe są szczegółowe obserwacje, oceny i odpowiednie rozmnażanie. Badania laboratoryjne powinny ilościowo określić względny stopień repelencji w badaniach wyboru i bez wyboru. Jedynie, gdy badania wyboru wskazują na wysoki stopień repelencji badanego składnika, badacz powinien przejść do badań bez wyboru. Powinny one wskazać na stopień repelencji w warunkach braku pożywienia.

Jeśli badane repelenty są substancjami łatwo parującymi, efekt stężenia w pojemniku z pokarmem może spowodować silniejszą repelencję, w przeciwieństwie do pojedynczych nasion zasianych w glebie. Aby rozwiązać ten problem, należy przeprowadzić badania na wybiegach lub w terenie. W badaniach przeprowadzanych na wybiegach obserwuje

się zwiększoną wydajność w bardziej naturalnych warunkach (np. z nasionami w glebie) oraz wpływ dodatkowych czynników (np. temperatury, opadów).

Doświadczenia polowe powinny dowieść skuteczności repelentu, gdy również naturalne pożywienie znajduje się w zasięgu zwierząt – taka sytuacja nie może być dokładnie odtworzona podczas badań przeprowadzanych na wybiegach. Jednym z problemów, mogących wystąpić podczas przeprowadzania badania jest prawdopodobieństwo wystąpienia różnic w akceptacji konkretnych nasion przez zwierzęta wybrane do badań. Utrudnia to wybór odpowiedniego pola do wykorzystania podczas badań.

3. Układ i przeprowadzenie doświadczenia

3.1 Badania laboratoryjne

3.1.1 Badania "z wyborem"

Badania powinny być przeprowadzane na zwierzętach trzymanyh w osobnych klatkach. Jednakowe pojemniki z nasionami powleczonymi i niepowleczonymi repelentem powinny być dostarczone *ad libitum* przez okres czterech dni. Położenie pojemników powinno być codziennie zmieniane, po zarejestrowaniu spożycia pokarmu i ponownym napełnieniu pojemników, tak, aby wykluczyć jakiegokolwiek preferencje zwierząt dotyczące położenia pojemnika z pokarmem. Na potrzeby badań wstępnych lub do porównania różnych stężeń składnika, dodatkowe pojemniki mogą zostać dostarczone do testów "z wyborem" (Pelz, 1989). Każdy z badanych składników powinien być podany w ilości wystarczającej do karmienia badanych zwierząt przez 24 godziny. Średnia ilość spożywanych w ciągu jednego dnia nasion da wskazanie co do repelencji testowanych substancji.

Dodatkowo, aby zaobserwować wybór badanych zwierząt, co do miejsca, w jakim zostały umieszczone pojemniki zawierające badane repelenty oraz nasiona niepotraktowane repelentem, można przeprowadzić testy typu Y (olfaktometryczne) lub badania powiązanych systemów. Również wysiłek włożony przez zwierzęta w zdobycie preferowanej karmy może zostać zmierzony odpowiednio skonstruowanym przyrządem, choć tego typu badania były do tej pory przeprowadzane jedynie na szczurach doświadczalnych.

3.1.2 Badania "bez wyboru"

Można również, po wprowadzeniu niewielkich zmian użyć procedury badawczej opisanej przez Nolte et al. (1993): 10 zwierząt trzymanyh w osobnych klatkach zostaje przypisanych do każdej grupy badawczej oraz jednej grupy kontrolnej i przystosowanych do 16-godzinnej harmonogramu pozbawienia pożywienia. Woda pitna jest dostarczana *ad libitum*. Ogólnie, masa ciała gryzoni nie powinna spaść poniżej 85 proc. pierwotnego poziomu. Należy jednak pamiętać, że zagrożeniem dla życia ryjówek może być choćby kilkugodzinna głódówka.

Po okresie adaptacji następuje czterodniowy okres poprzedzający rozpoczęcie właściwych badań. Każdego dnia fazy poprzedzającej, wszystkie zwierzęta mają zapewniony czterogodzinny dostęp do nasion nienasączonych repelentem, z gatunku będącego przedmiotem badań. Pod koniec czterodniowego okresu mierzone jest przyswajanie pokarmu, a zwierzętom pozwala się na dodatkowy czterogodzinny dostęp *ad libitum* do zwyczajowego laboratoryjnego pokarmu, takiego, jaki przyjmowały przez rozpoczęciem badań. Następnie pokarm jest usuwany z klatek, a zwierzęta są pozbawione pokarmu do następującego dnia.

Po okresie poprzedzającym następuje czterodniowy okres właściwego badania.

Metody są podobne do opisanych dla fazy poprzedzającej, z wyjątkiem tego, że badanym grupom podaje się akceptowane przez nie nasiona, nasączone badanym repelentem. Grupie kontrolnej podaje się w tym czasie nasiona niemające styczności z repelentem.

Repelencja może zostać oceniona pozytywnie, jeśli w badaniach „bez wyboru” zostanie osiągnięta co najmniej 60 % średnia redukcja spożycia pokarmu z repelentem.

Więcej informacji o reakcjach behawioralnych badanych zwierząt na karmę z repelentem można uzyskać po zainstalowaniu sprzętu video. Bardzo użytecznym jest rejestrowanie czasu upływającego przed przyjęciem karmy z repelentem po raz pierwszy w każdym dniu badania.

3.2 Badania na wybiegu

Badane repelenty, osiągające pozytywne rezultaty w badaniach „z wyborem” i „bez wyboru” powinny być następnie ocenione podczas badań przeprowadzonych na wybiegu. Można użyć wybiegów o powierzchni co najmniej czterech metrów kwadratowych, umieszczonych w zamkniętym pomieszczeniu i na zewnątrz. Wybiegi powinny być zabezpieczone przed dostępem zwierząt innych gatunków. Zwierzęta badanych gatunków mogą przebywać na nich pojedynczo lub w grupach, w zależności od powierzchni wybiegu. Zwierzętom należy zapewnić odpowiednie budki lęgowe i wodę pitną. Ilość każdego rodzaju podawanego pokarmu powinna być nieco większa niż ilość podawana zwierzętom badanym przez 24 godziny. Zwierzęta powinny być umieszczone na wybiegu kilka dni przed rozpoczęciem badań, tak, aby mogły przywyknąć do otoczenia.

Możliwych jest wiele sposobów planowania badań „z wyborem” lub „bez wyboru”: nasiona traktowane i nietraktowane repelentem mogą być podawane przez kilka dni na niewielkich tackach, rozstawionych w różnych miejscach powierzchni wybiegu. Usuwanie nasion powinno być rejestrowane każdego dnia, a tacki na nasiona napełniane. W przeciwieństwie do badań przeprowadzanych na zwierzętach przebywających w klatkach, większa powierzchnia wybiegu pozwala na oszacowanie starań zwierząt w celu zdobycia preferowanego rodzaju pokarmu.

Pokrycie podłoża wybiegu ziemią i zasadzenie w niej nasion nasączonych repelentem ułatwi uzyskanie innych istotnych dla badania danych. W jednym miejscu można zasadzić dwa lub więcej nasion. Można symulować określone warunki środowiskowe, takie jak temperatura czy opady. Jeśli wiele pokrytych repelentem nasion jest spożywanych każdego dnia, przeprowadzanie badań może okazać się żmudne i czasochłonne. Dawki należy rejestrować, a spożyte nasiona zastępować innymi. Należy starannie usunąć wszystkie pozostałości łupin nasiennych lub powłoki, mogące zawierać repelent. Jeśli przeprowadzane są testy „bez wyboru”, niezwykle istotnym jest upewnienie się, że żadne zapasy pokarmu z fazy poprzedzającej badanie nie znajdują się w zasięgu badanych zwierząt. Jeśli zwierzęta stworzą zapasy znacznych ilości nasion potraktowanych repelentem, których po wykopaniu nie spożyją, należy przyjąć, że taki rodzaj zachowania również przyczynia się do strat na polach. Aby uzyskać dane o zachowaniu badanych zwierząt, zalecane jest użycie sprzętu video.

Podczas oceny bierze się pod uwagę stopień ograniczenia uszkodzenia nasion poprzez podawanie repelentu podczas różnych/zmiennych warunków przeprowadzania badania. Stopień repelencji będzie oszacowany pozytywnie, jeśli poprzez podanie repelentu można zredukować niemal do zera usuwanie nasion podczas wszystkich badań. Jednakże, nawet substancje, dzięki którym osiąga się redukcję rzędu 60 %, należy poddać dalszym badaniom, i najprawdopodobniej należy je zastosować podczas badań w terenie.

3.3 Badania w terenie

Jeśli wymagane są badania przeprowadzane w terenie, należy przed ich rozpoczęciem schwytać odpowiednie okazy w naturalnych warunkach, tak, aby na każdym poletku doświadczalnym występowały badane gatunki. Aby uzyskać informacje o metodologii chwytania gatunków w naturalnych warunkach patrz: Norma EPPO PP 1/169 Gryzonie polowe (*Microtus*, *Arvicola*). Badania w terenie powinny być przeprowadzane w okresie od zasiewu do wschodu nasion z każdym badanym repelentem, preparatem porównawczym (jeśli jest dostępny) oraz doświadczalnym kontrolnym bez użycia repelentu, powtórzonym trzy do czterech razy. Niepoddane zabiegowi poletko oraz poletka przeznaczone do badania różnych rodzajów repelentów powinny być rozmieszczone tak, aby nie przylegały do siebie – uniemożliwi to gryzoniom przyjmowanie różniących się od siebie próbek repelentów (dobór karmienia może odzwierciedlać określone preferencje, lecz nie odpowiadać podobnej sytuacji w warunkach naturalnych, kiedy dostępny jest tylko jeden rodzaj pokarmu). W przypadku, kiedy niedostępne są duże powierzchnie, zaleca się korzystanie z układu zawierającego próby kontrolne (patrz norma EPPO PP 1/152 Planowanie i analiza badań oceniających skuteczność).

Należy policzyć zniszczone nasiona w każdym wybranym do badania obszarze, na każdym z dziesięciu poletek. Na każdym badanym obszarze powinno znajdować się około 100 nasion, stąd powierzchnia obszaru zależy od badanej uprawy. Jako że niewielkim ssakom często udaje się dostać na poletko od zewnątrz, podczas oceny strat na danym obszarze, należy wziąć pod uwagę odległość między skrajami poletek oraz ich rozmieszczenie przestrzenne. Każdy z dwóch obszarów podlegających badaniu w poletku traktowanym i kontrolnym powinien być rozmieszczony w taki sposób, aby ich odległość od przylegającego poletka i skraju była co najmniej taka sama.

Oceny można dokonać po zakiełkowaniu nasion. Konieczna jest szczegółowa obserwacja poletek od zasiewu do wschodu nasion, tak, aby zarejestrować obecność szkodników (np. gołębi) i formę wyrządzonych szkód. Jeśli obecność ptactwa stanowi duży problem, należy rozważyć ochronę badanych obszarów siatką. Szkody wyrządzone nasionom mogą zostać zauważone dzięki pozostałościom powłoki nasion lub łupin porzuconych obok niewielkich otworów, z których nasiona zostały wykopane.

Zasiew należy przeprowadzać na wszystkich poletkach w taki sam sposób. Należy zarejestrować rodzaj gleby (zgodnie z krajową lub międzynarodową normą), jakość podłoża przeznaczonego do wysiewu, głębokość zasiewu oraz prędkość kiełkowania. Aby zmierzyć kiełkowanie w warunkach polowych, można zastosować osłony z drucianej siatki. Od momentu zasiewu do momentu kiełkowania należy rejestrować dane meteorologiczne, jako że wpływają one zarówno na zachowanie nasion i/lub zachowanie gatunków zwierząt będących przedmiotem zwalczania, a także działanie repelentu. Zazwyczaj opis zawiera dane dotyczące co najmniej dziennego opadu (rodzaj i

wielkość w milimetrach) oraz temperatury (najwyższa, średnia i najniższa w stopniach Celsjusza). Najlepiej, aby wszystkie dane zostały zebrane bezpośrednio na miejscu obserwacji, choć można je również uzyskać w najbliższej stacji meteorologicznej. Protokół badania powinien także zawierać szczegółowy opis miejsca, w którym przeprowadzono badanie (położenie geograficzne, topografia, użytkowanie gruntów, zbiory, substancje stosowane w otoczeniu, itp.).

4. Statystyka i ocena skuteczności

Raport badań powinien przybrać usystematyzowaną formę, zawierać analizę i ocenę. Należy również udostępnić w nim dane początkowe (robocze). Sugeruje się przeprowadzenie następujących obliczeń: w badaniach laboratoryjnych „z wyborem”, spożycie nasion poddanych działaniu substancji, w porównaniu z całkowitym spożyciem (stosunek repelencji); w badaniach laboratoryjnych „bez wyboru”, spożycie w każdej poddanej działaniu substancji grupie w stosunku do niepoddanej działaniu substancji grupy kontrolnej oraz spożycie w fazie poddawania działaniu substancji w porównaniu do spożycia w fazie przed poddaniem działaniu. Aby oszacować wyniki, należy porównać spożycie nasion w grupach kontrolnych - poddanej i niepoddanej działaniu substancji oraz pomiędzy fazami - poddawania działaniu substancji i przed poddawaniem działaniu substancji. Do zbadania wyników okresowych i dobowych można zastosować analizę ANOVA.

W badaniach przeprowadzanych na wybiegu i w warunkach naturalnych, stopień redukcji (R) zniszczenia nasion dzięki zastosowaniu repelentu może zostać obliczony poprzez poniższy wzór:

$$R = 100 \times \left(1 - \frac{\% \text{ dawka nasion z repelentem}}{\% \text{ dawka zwykłych nasion}} \right)$$

Powinna występować znacząca różnica pomiędzy stopniami zniszczeń na poletkach kontrolnych i badanych, a jeśli taka sytuacja nie wystąpi, wyniki badania powinny zostać odrzucone. Jeśli będzie to potrzebne, należy też skorzystać z analizy statystycznej. Można połączyć dane pozyskane w ciągu kilku dni badania, jeśli nie nastąpią żadne istotne zmiany w preferencjach badanych zwierząt – w innym przypadku każdy dzień należy podsumowywać oddzielnie.

Analizy ANOVA można użyć do oceny wyników badań laboratoryjnych, na wybiegach oraz polowych:

- w dwóch badaniach „z wyborem” do badania wyników w ciągu dnia
- w badaniach wielokrotnego wyboru do zbadania efektów działania substancji i wyników pozyskanych w ciągu dnia.
- w badaniach „bez wyboru” do badania wyników okresowych i dziennych

Stopień repelencji nasion pokrytych badanym preparatem powinien zostać oceniony w odniesieniu do

nasion niepokrywanych repelentem i, jeśli to możliwe, do nasion pokrytych preparatem porównawczym. Patrz także norma EPPO PP 1/152 Planowanie i analiza badań oceniających skuteczność.

5. Fitotoksyczne skutki użycia nasion pokrytych repelentem

Badania kiełkujących nasion powinny zostać przeprowadzane dla wszystkich preparatów i ich stosowanych stężeń, aż do momentu, gdy nie zauważa się żadnego efektu w porównaniu do poletka porównawczego. Podczas doświadczeń polowych efekty fitotoksyczne na posianych nasionach powinny zostać oszacowane przez porównanie nasiona skażonego i nieskażonego repelentem. Oznaki szkód wyrządzonych zbiorom powinny zostać szczegółowo opisane, a efekt może zostać policzony lub zmierzony, zaś w innych przypadkach można także oszacować częstotliwość i rozmiar szkód. Należy także dodać ocenę wschodów nasion, tempo wzrostu, jakiegokolwiek odstępstwa od normy, obecność chlorozy/martwicy lub jakiegokolwiek innych skutków. Należy też wziąć pod uwagę wpływ przechowywania nasion pokrytych repelentem na otoczenie. W celu uzyskania dalszych informacji, patrz norma EPPO PP 1/135 Ocena fitotoksyczności.

Bibliografia

- MARTELL, A.M. (1981) Effects of pelleting and repellent coating of conifer seeds on feeding by deer mice. *Information Report O-X-330*. Great Lakes Forest Research Centre, Sault Ste Marie (CA).
- MYLLYMÄKI, A. & PAASIKALLIO, A. (1976) Scots pine seed depredation by small mammals as revealed by radioactive tagging of the seeds. *Annales Agriculturae Fenniae* 15, 89-96.
- NOLTE, D.L., MASON, J.R. & CLARK, L. (1993) Avoidance of bird repellents by mice (*Mus musculus*). - *J. Chem. Ecol.* 19, 427-432.
- PELZ, H.-J. (1989) Ecological aspects of damage to sugar beet seeds by *Apodemus sylvaticus*. In *Mammals as Pests* (ed. Putman, R.J.), pp. 34-48. Chapman and Hall, London (GB).
- RADWAN, M.A. (1970) Destruction of conifer seed and methods of protection. In *Proceedings of the Fourth Vertebrate Pest Conference*, pp.77-82.