

## Ocena skuteczności środków ochrony roślin

### Efekty uboczne na *Trichogramma cacoeciae*

#### Zakres

Niniejsza norma opisuje sposób prowadzenia badań nad oceną skuteczności efektów ubocznych środków ochrony roślin na *Trichogramma cacoeciae*.

#### Zatwierdzenie normy i poprawki

Po raz pierwszy zatwierdzono we wrześniu 1992.  
Zgodnie z poprawkami wniesionymi do tekstu normy w 1998.

Pasożyty rodzaju *Trichogramma* występują globalnie i odgrywają ważną rolę jako naturalni wrogowie łuskoskrzydłych organizmów szkodliwych na szerokim zakresie płodów rolnych. Użycie kruszynka – *Trichogramma* w zwalczaniu biologicznym zyskało szerokie zainteresowanie w wielu krajach. Około 10 różnych gatunków *Trichogramma* jest masowo hodowanych w celu zwalczania szkodników na kukurydzy, trzcinie cukrowej, ryżu, bawelnie, soi, buraku cukrowym, warzywach oraz sośnie przynajmniej w 13 krajach.

Podobnie jak u innych naturalnych wrogów, ważne jest posiadanie pewności, że środki ochrony roślin stosowane przeciwko szkodnikom odnośnej rośliny nie poczynią żadnych szkód w populacjach *Trichogramma*. Dla tego celu podczas procesu rejestracji może okazać się konieczne dostarczenie dowodów na to, że zostały przeprowadzone badania, które wykazują bezpieczeństwo rzeczonego środka. Przedstawione są tu cztery doświadczenia (trzy laboratoryjne i jedno w warunkach polowych), których można użyć w celu dostarczenia takich dowodów poprzez pomiar stopnia obecności pasożytów.

Trzy opisane doświadczenia laboratoryjne są to: (1) wystawienie dorosłych osobników *Trichogramma* na warstwę świeżej pozostałości pestycydu na płytkach szklanych; (2) bezpośredni oprysk larw *Trichogramma* w jajach żywiciela; (3) badanie efektu trwałego działania starych pozostałości na osobniki dorosłe. Do badania został wybrany gatunek *Trichogramma cacoeciae* (TRIGCC) (błonkoskrzydłe, Trichogrammatidae), lecz mogą być użyte wszelkie inne gatunki partenogenetycznych *Trichogramma*. W niniejszej normie skośnik zbożowiaczek – *Sitotroga cerealella* (SITTCE) został wybrany jako żywiciel, ale inne zawisaki – Lepidoptera (np. mklík mączny *Ephestia kuehniella*, EPHEKU) mogłyby zostać użyte. Badania opracowano według standardowych wytycznych (Hassan, 1985) Grupy Roboczej 'Pestycydy a organizmy pożyteczne' IOBC/WPRS (Zachodniej Palearktycznej Sekcji Regionalnej Międzynarodowej Organizacji Zwalczania Biologicznego – West Palaearctic Regional Section of

the International Organization for Biological Control). Wcześniejsza wersja tej normy została opublikowana przez Hassana (1974, 1977, 1980).

Mając rozeznanie, że żadna pojedyncza metoda badania nie może dostarczyć wystarczających informacji do klasyfikacji efektów ubocznych pestycydów na naturalnego wroga, ważne jest

również podkreślenie, iż nie przewiduje się przeprowadzenia wszystkich tych badań. Ponieważ badania w warunkach polowych są czasochłonne i kosztowne, pierwsze badanie laboratoryjne może posłużyć do klasyfikacji wielu produktów jako zdecydowanie nieszkodliwych, bez uciekania się do badań polowych. Decyzje co do tego, które badania należy przeprowadzić i czy przechodzić od jednego badania do drugiego będą uzależnione od charakterystyki środka ochrony roślin, jego sposobu użycia oraz od rezultatów badań już przeprowadzonych. Decyzje te można podjąć na podstawie logicznie skonstruowanego schematu sekwencyjnego podejmowania decyzji. Wspólny panel EPPO/Rady Europy dotyczący oceny zagrożenia ekologicznego ze strony środków ochrony roślin (Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products) opracował obecnie taki schemat (OEPP/EPPO, 1993).

## **I. Badanie laboratoryjne – szczątkowe oddziaływanie toksyczne środków na dorosłą postać *Trichogramma cacoeciae***

### **1. Warunki doświadczenia**

#### **1.1 Zasada doświadczenia**

Doświadczenie przeprowadza się w klatkach. Dorosłe osobniki *T. cacoeciae* (stadium cyklu życiowego, które jest najbardziej eksponowane na środki ochrony roślin) wystawia się na działanie resztek produktu świeżo naniesionych na płytki szklane, a osobnikom przetrwałym podaje się jaja żywiciela, skośnika zbożowiaczka – *Sitotroga cerealella* (Załącznik III). Ocenia się zarówno śmiertelność *T. cacoeciae* jak i procent pasożytowania w jajach żywiciela przez *T. cacoeciae*.

#### **1.2 Warunki doświadczenia**

Klatka do ekspozycji owada na preparat składa się z ramy i dwóch płytek szklanych o powierzchni 13 cm<sup>2</sup>. Obydwie płytki szklane opryskiwane są pestycydem ze stacjonarnego opryskiwacza w laboratorium, np. wieży Pottera. Poddane opryskowi szyby mocuje się na kwadratowej ramie aluminiowej jako dno i wierzch. Rama składa się z czterech elementów o długości 13 cm, wysokości 1,5 cm i szerokości 1 cm (Rys. 1) i osadzana jest na materiale piankowym (Tesamoll), aby uzyskać podkładki dla dwóch szybek. Trzy spośród elementów ramy zawierają 6 otworów wentylacyjnych o średnicy 1 cm (Rys. 1a). Wewnętrzna powierzchnia ramy pokryta jest czarnym, mocno naprężonym porowatym materiałem (np. Helancabast) dla osłony otworów wentylacyjnych. Czwarty bok ramy zawiera pośrodku szczelinowy otwór (3,5 cm długości i 1 cm wysokości), który jest używany do wprowadzenia jaj żywiciela na pasku papieru jak również pożywki dla pasożytów (miód/agar, patrz Załącznik V). Dodatkowy

otwór o średnicy 1 cm usytuowany obok otworu szczelinowego używany jest do wprowadzania pasożytów doświadczalnych (Rys. 1b). Obydwa otwory zakleja się od zewnątrz czarnym papierem i taśmą samoprzylepną. W celu zniechęcenia światłolubnych pasożytów do usuwania się na nieopryskane boki ramy, krawędzie klatki przyciemniane są przez przykrycie z czarnego papieru z pozostawieniem niezakrytego kwadratu o powierzchni 50 cm<sup>2</sup> w centralnej części szybek. Poszczególne elementy klatki mocuje się dwiema klamrami. Badania przeprowadza się w klimatyzowanej komorze przy tej samej temperaturze i warunkach wilgotności względnej jak przy hodowli *T. cacoeciae* (por. Załącznik II).

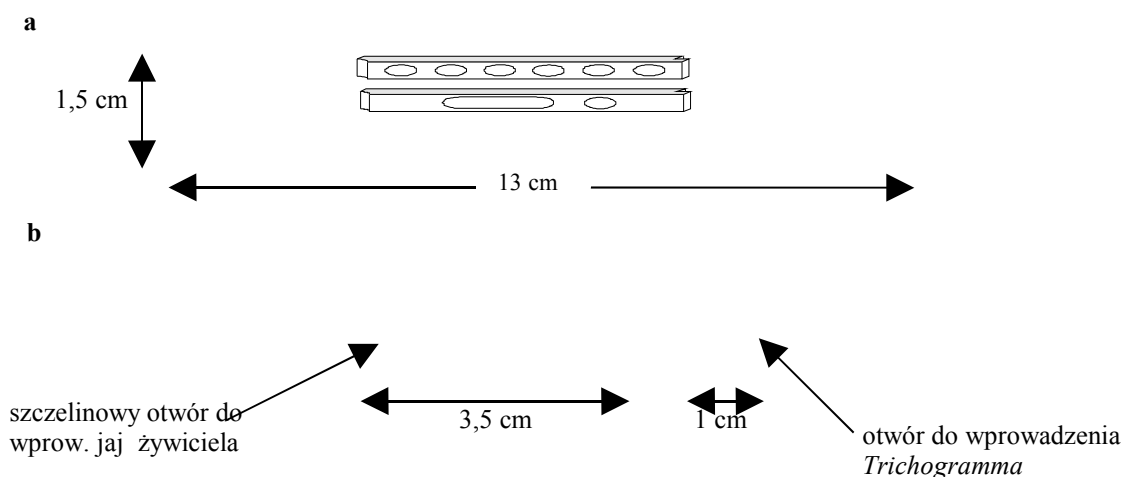
Stałe, słabe, rozproszone oświetlenie dostarczane jest od góry (około 300 luksów, na przykład dostarczane przez pojedynczą białą żarówkę uniwersalną o mocy 30W/25-2 z odległości 30 cm). Dzięki stałemu oświetleniu, pasożyty pozostają w oświetlonej części centralnej i unikają nieopryskanych zaciemnionych boków klatki. Aby zapobiec ewentualnej akumulacji oparów pestycydu w klatkach, powietrze jest stale wypompowywane z komory i wymieniane na świeże. Dodatkowo wszystkie klatki podłączone są do pompek akwariowych systemem rur. Pompy są tak ustawione, żeby całe powietrze w klatkach było wymieniane co 1-2 min. Ta prędkość wymiany powietrza nie przeszkadza owadom i może być skalowana poprzez wprowadzenie pewnej ilości widocznego dymu do jednej z klatek.

### 1.3 Przygotowanie owada

Ponieważ *T. cacoeciae* jest partenogenetyczna (dzieworodna), istnieją tylko samice. Nie jest zatem konieczne selekcjonowanie owadów dla zapewnienia homogeniczności płciowej. Do eksperymentów przygotowywane są pasożyty w jednakowym wieku. Jaja żywiciela porażone są larwami pasożyta *T. cacoeciae* i pozostawiane do pojawienia się pasożytów. Świeże jaja *S. cerealella* są przyklejane substancją o nazwie Traganth (Załącznik IV) w kręgach na paskach cienkiego papieru (Rys. 2). Każdy krążek ma 1,2 cm średnicy i zawiera około 400-500 jaj. W celu uzyskania dorosłych form pasożytów w jednakowym wieku, paski z jajami (arkusze z jajami) *S. cerealella* umieszczane są w miejscach hodowli *Trichogramma* i zabierane po upływie 24 godzin. Pasożyty pozostające na paskach z jajami są zdmuchiwanie; dmuchanie dymem papierosowym jest skuteczniejsze, ponieważ zabija *T. cacoeciae* i zapewnia brak wszelkiego dalszego

pasożytowania. Porażone larwami pasożyta jaja są później przetrzymywane w klimatyzowanej komorze, w identycznych warunkach jak pokazano w Załączniku I. Pasożyt rozwija się do formy dorosłej w ciągu około 12 dni (Rys. 3). Dwa dni przed wykluciem się, czarne jaja zawierające larwy pasożytów są przenoszone do 'rur lęgowych' w celu wykorzystania w eksperymentach (Rys. 4). Rury lęgowe mogą być wykonane z dostępnych w handlu ampulek szklanych (12 cm długości i 22 mm średnicy) z czubkiem ostrego zakończenia odciętym w taki sposób, żeby pozostał otwór o średnicy około 7mm. Jeden krążek porażonych pasożytami jaj żywiciela wraz z paskiem papieru (6 × 1 cm) z pożywką miodowo-agarową (Załącznik V) wprowadza się do rury, którą zatyka się przy obu końcach białym płótnem i opaskami gumowymi. Miód/agar powinien być nałożony cienkimi paskami, aby osobniki *T. cacoeciae* nie przylepiły się do niego. Dorosłe formy pasożytów wylęgają się i są pozostawione w rurze do osiągnięcia wieku 24 godzin.

Rys. 1. Boki ramki aluminiowej



#### 1.4 Przygotowanie organizmu żywiciela

Jak pokazano powyżej, *T. cacoeciae* podaje się jaja żywiciela *S. cerealella* do porażenia pasożytami. Aby ułatwić obróbkę, jaja są naklejone na paski cienkiego białego papieru. Klej Traganth (Załącznik IV) rozprowadza się równo na krążkach papierowych przy użyciu pędzla i okrągłej ramki z tworzywa sztucznego. Ramkę podnosi się ostrożnie, a jaja *S. cerealella* są rozsypywane przez drobne sitko (oczko 0,5 mm) na pokryte klejem obszary (Rys. 2). Tylko świeże, białe lub żółtawe jaja (około jednodniowe) są używane do eksperymentu, natomiast nie używa się starszych, czerwonych jaj lub zlepków.

#### 1.5 Projekt i układ doświadczenia

Kombinacje doświadczenia: poletka chronione badanym preparatem (preparatami) i poletko kontrolne traktowane wodą z kranu.

Rozmiar poletka: jedna klatka (200-300 pasożytów).

Liczba powtórzeń: przynajmniej 3.

#### 2. Stosowanie zabiegów

Środek jest aplikowany w najwyższej koncentracji określonej w zaleceniach dla przewidywanego zastosowania (rozcieńczony wodą z kranu) na płytki szklane, aby zapewnić standardową jednakową warstwę (1-1.5 mg płynu cm<sup>2</sup>). Można to wykonać w laboratoryjnej wieży opryskowej. Kropelki powinny pokryć około 80% powierzchni szkła. Płytki szklane niepoddanej zabiegowi próbki kontrolnej są opryskiwane wodą z kranu. Płytki suszy się w temperaturze pokojowej przez trzy godziny, a następnie składa się klatki (patrz 1.2). Tylko kwadratowy obszar o wymiarach 10 × 10 cm w centralnej części każdej płytki szklanej jest opryskiwany insektycydem. Aby uniknąć skażenia podkładek klatki z pianki Tesamoll, brzeg płytek szklanych jest zabezpieczony przed opryskiem poprzez zasłonięcie go podczas dokonywania oprysku ramką z tworzywa sztucznego o wymiarach 14 × 14 cm z centralną kwadratową przestrzenią o wymiarach 10 × 10 cm.

#### 3. Przeprowadzanie doświadczenia

Dorosłe osobniki *T. cacoeciae* wprowadza się do klatki poprzez otwarcie rury wylęgowej od strony ostro zakończonej, zaciemnienie jej osłoną z czarnego papieru i połączenia jej z klatką przez godzinę. *T. cacoeciae*, zwabione przez światło wyjdą z zaciemnionej rury do oświetlonej klatki; daje to pewność, że wszystkie dorosłe osobniki znajdujące się w klatce wylęgły się już w rurze, zatem ich czas ekspozycji na poddanej zabiegowi powierzchni jest stały. W celu obliczenia liczby pasożytów wchodzących do klatki (patrz następny rozdział), rura wylęgowa jest zamykana ponownie i trzymana przez następne 4 dni w komorze, aby umożliwić wylęg

pozostałym *T. cacoeciae*.

Pasożytom w klatkach dostarcza się pożywkę miodowo-agarową podawaną na wąskim pasku papieru o wymiarach 10 × 0.5 cm. Badanie zaczyna się 24-godzinny okres wymuszonej ekspozycji bez obecności jaj żywiciela, zatem wszelkie możliwe efekty toksyczne produktu pojawią się zanim osy zaczną porażać jaja pasożytami. Razem z okresem wymuszonej ekspozycji doświadczenie trwa przez 7 dni (Rys. 3). Jeśli wystąpi całkowita śmiertelność w ciągu początkowych 24 godzin wstępnej ekspozycji, badanie zostaje przerwane. W innym razie około 5000 jaj *S. cerealella* podaje się w każdej klatce w drugim, trzecim i piątym dniu eksperymentu. Jaja te podaje się na paskach papieru, na każdym z nich jest 6 krążków z jajami, każdy krążek ma 1,45 cm średnicy. Obok jaj, w odległości 3-5 mm umieszcza się pożywkę miodowo-agarową. Paski papieru z jajami żywiciela wprowadza się przez szczelinowy otwór w klatce przy użyciu pęsety. Nowe krążki z jajami umieszcza się nad starymi. Ważne jest umieszczenie wszystkich krążków w oświetlonej części klatki. Liczba jaj podawanych podczas badania jest regulowana w celu dopasowania do maksymalnej wydolności os w porażeniu jaj pasożytami. Pod koniec doświadczenia (w ósmym dniu) klatki demontuje się, a paski z jajami przechowuje w komorze klimatyzowanej w celu ewaluacji. Pożywka miodowo-agarowa na paskach papieru powinna być usunięta przez odcięcie papieru, aby kartoniki z jajami nie przykleiły się do siebie.

#### 4. Sposób oceny

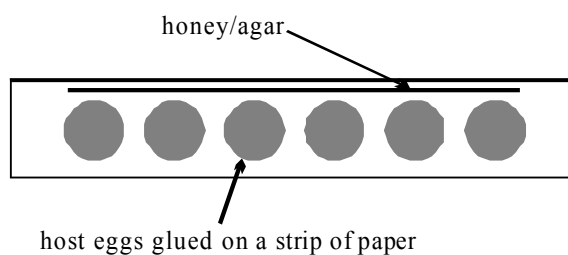
Osy, które weszły do klatki, liczone są poprzez badanie rury lęgowej. Ponieważ pewna liczba pasożytów wylęga się w rurach po rozpoczęciu eksperymentu, rura lęgowa powinna być zbadana nie wcześniej, niż 4 dni po rozpoczęciu badania. Wszystkie porażone pasożytami jaja *S. cerealella* na krążkach z jajami o średnicy 1.2 cm (o czarnym zabarwieniu) są liczone, a liczba dorosłych osobników *T. cacoeciae* przyklejonych na paskach pożywki lub pozostających w rurze jest odejmowana. Jaja gospodarza porażone pasożytami w trakcie doświadczenia są liczone na paskach z jajami 8-9 dni po wprowadzeniu konkretnego paska. W tym czasie porażone jaja szerniały i są łatwo rozpoznawalne. Po wylęgu larw *S. cerealella*, jaja nieporażone pozostają żółtawe. Jeśli jaja porażone nie zostaną policzone do jedenastego dnia po wystawieniu na porażenie, jaja powinny być podgrzane do 70°C przez około 30 min. Powstrzyma to *T. cacoeciae* od wylęgu nie wpływając na czarne zabarwienie jaj porażonych, po czym paski można przechowywać w lodówce do policzenia później.

#### 5. Wyniki

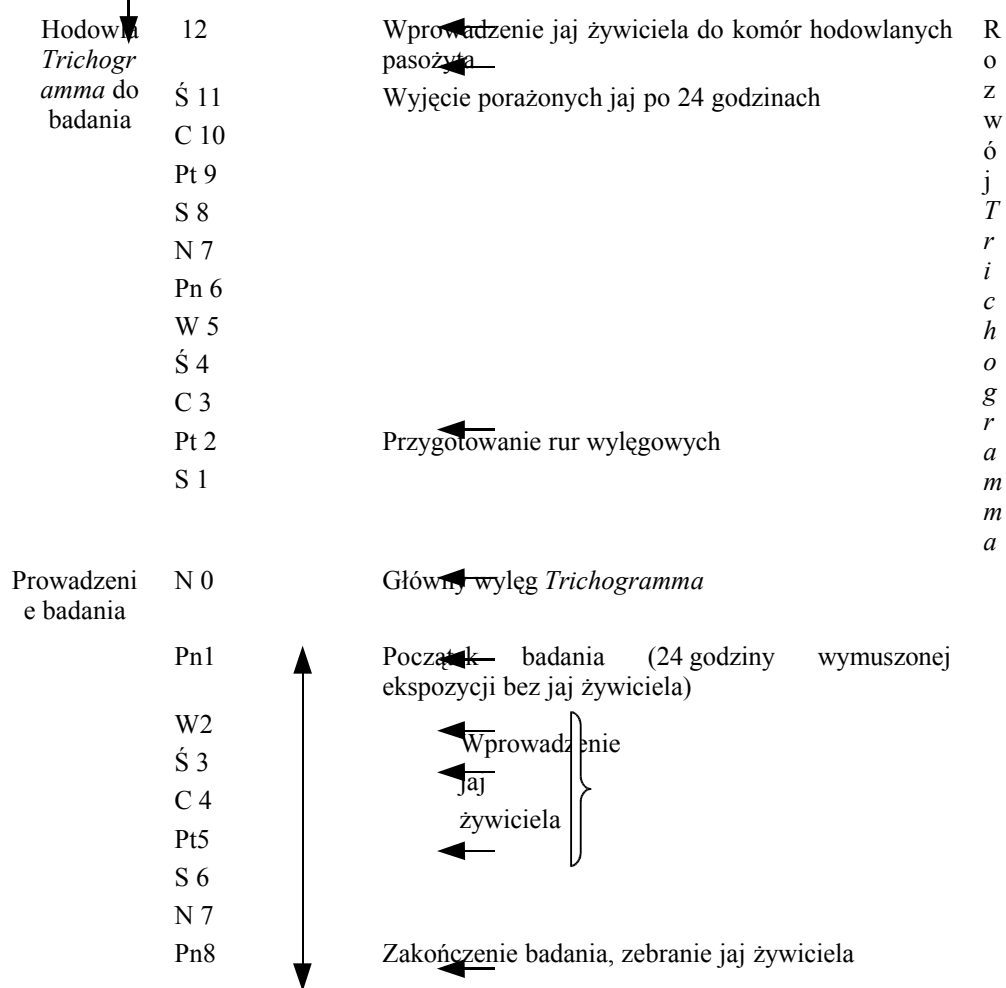
Liczone są porażone jaja na każdą klatkę. Średnia zdolność (rate) porażania na samicę jest obliczana dla wszystkich klatek i pasków z jajami. Dla każdego badanego środka, średnia redukcja zdolności porażania

jest obliczana jako procent od grupy kontrolnej.

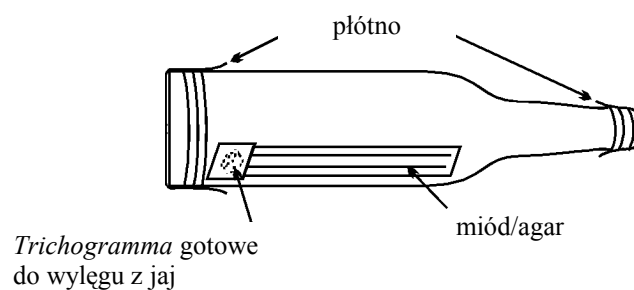
**Rys. 2.** Pasek papieru z jajami żywiciela



**Rys. 3.** Chronologiczne odwzorowanie testu



**Rys. 4.** Rura lęgowa



## **II. Badanie laboratoryjne – bezpośrednia toksyczność środków na larwy *Trichogramma cacoeciae***

### **1. Warunki doświadczenia**

#### **1.1 Zasada doświadczenia**

Dojrzałe larwy *T. cacoeciae* w jajach *S. cerealella* (stadium cyklu życiowego, które jest najmniej eksponowane na środki ochrony roślin) są bezpośrednio opryskiwane preparatem. Zdolność dorosłych osobników do porażania jaj larwami jest porównywana do osobników z grupy kontrolnej traktowanej wodą.

#### **1.2 Warunki doświadczenia**

Około jednodniowe jaja *S. cerealella* są przyklejane do krążków o średnicy 1.2 cm (400-500 jaj) na paskach papieru i eksponowane na porażenie pasożytami przez *T. cacoeciae* w ciągu 24 godzin (patrz I.1.3 oraz I.1.4). Porażone jaja są pozostawiane na 7 dni w celu rozwinięcia się: 16 godzin oświetlenia, 28°C, 50-70% wilgotności względnej 8 godzin zaciemnienia, 18°C, 80-90% wilgotności względnej.

#### **1.3 Projekt i układ doświadczenia**

Kombinacje doświadczenia: poletka chronione badanym preparatem (preparatami) i poletko kontrolne traktowane wodą.

Rozmiar poletka: jeden krążek z jajami (300-400 porażonych jaj).

Liczba powtórzeń: 3.

### **2. Stosowanie zabiegów**

Zabieg przeprowadzany jest w siódmym dniu przez dokonanie oprysku trzech krążków z jajami (czarnymi jajami zawierającymi larwy) każdym ze środków, który ma być wypróbowany. W każdym eksperymencie 3 krążki są opryskane wodą jako grupa kontrolna. Proces oprysku, stężenie i stosowana dawka podane są w rozdziale I.2. Niepoddana zabiegowi grupa kontrolna opryskiwana jest wodą z kranu.

### **3. Przeprowadzenie doświadczenia i sposób oceny**

Po dokonaniu oprysku, poddane zabiegowi jaja są pozostawione na 3 godziny do wyschnięcia, przenoszone do nowych pojemników, a następnie pozostawiane do rozwinięcia się w standardowych warunkach eksperymentalnych. Na dwa dni przed wykluwaniem, opryskiwane czarne jaja zawierające larwy *T. cacoeciae* są przenoszone do rur lęgowych (I.1.3). Wylęgające się pasożyty, jeśli są, poddaje się próbie na zdolność porażania pasożytami jaj żywiciela. Używa się tych samych klatek jak w I.1.2., ale bez traktowania płytek szklanych. Stosowana jest ta sama metoda co w pierwszym badaniu laboratoryjnym. (I.1.3). Ocenę stopnia porażenia jaj przeprowadza się tak, jak podano w I.4.

### **4. Wyniki**

Procent porażenia jaj i jakakolwiek redukcja porażenia dla każdego z badanych produktów są kalkulowane jak w I.5.

## **III. Badanie laboratoryjne – trwała toksyczność środków na dorosłe osobniki *Trichogramma cacoeciae***

### **1. Warunki doświadczenia**

#### **1.1 Zasada doświadczenia**

Aby ocenić długość oddziaływania toksycznego, produkt aplikuje się na doniczkową winorośl *Vitis vinifera* (VITVI). Z doświadczenia wiadomo, że odmiana winorośli Müller-Thurgau jest odpowiednią rośliną doświadczalną, ale może być użyta dowolna inna roślina uprawna z liśćmi odpowiedniej wielkości i umiarkowaną grubością warstwy wosku (taka jak jabłoń *Malus × domestica* (MABSD). Po wysuszeniu i postarzeniu osadu w warunkach polowych lub ich symulacji przez dany okres, dojrzałe osobniki *T. cacoeciae* eksponuje się na osad na liściach w kłatkach doświadczalnych i ocenia zdolność porażania pasożytami.

#### **1.2 Warunki doświadczenia**

Poddane zabiegom rośliny są umieszczane albo na polu, albo w komorze klimatyzowanej w symulowanych warunkach polowych letnich. Eksperymenty wykazały, że między tymi dwoma czynnikami klimatycznymi istnieje ścisły związek. Rośliny trzymane na polu są utrzymywane pod przezroczystą osłoną przeciwdeszczową z folii polietylenowej o wysokości 50-100 cm. W celu ekspozycji roślin na bezpośrednie nasłonecznienie, osłonę przeciwdeszczową co tydzień zdejmuje się na 3 godziny.

W komorze klimatyzowanej (0.40 m<sup>3</sup>), następujące warunki są odpowiednie do symulacji warunków polowych: 13 godzin w temperaturze 27°C, 65% wilgotności względnej – 11 godzin w temperaturze 17°C, 95% wilgotności względnej oraz 15 godzin oświetlenia – 9 godzin zaciemnienia. Światła w komorze mogą dostarczać świetlówki OSRAM-L (2 White-Universal 30 W/25-2; 2 Fluora 30 W/77-2; 2 Warmtone de Luxe 30 W/32-2 i 1 Fluorescence-Black-Light 20 W/73), dostarczając całkowitą ilość 2000 luksów z odległości 30 cm od lamp o znacznej rozpiętości spektrum długości fal. Oprócz dwóch wentylatorów rozprowadzających powietrze w komorze, pompa powietrzna Helios R 10 (Schwenningen, DE) o wydajności 95 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> jest odpowiednia do wymiany powietrza. Te warunki można symulować również w odpowiedniej szklarni. Korzystanie ze sztucznie uzyskanych warunków klimatycznych pozwala prowadzić eksperymenty o każdej porze roku.

### **1.3 Projekt i układ doświadczenia**

Kombinacje doświadczenia: poletka chronione badanym preparatem (preparatami) i poletko kontrolne traktowane wodą.

Rozmiar poletka: jedna klatka z poddanymi zabiegowi liśćmi.

Liczba powtórzeń: przynajmniej 3.

### **2. Stosowanie zabiegów**

Poszczególne rośliny są uprawiane w doniczkach o średnicy 15 cm i wysokości 16 cm w warunkach polowych lub szklarniowych. Rośliny powinny



mieć przynajmniej 30-40 cm wysokości i mieć około 10 liści. Po wypuszczeniu pędów, rośliny potrzebują przynajmniej 6 tygodni dla osiągnięcia wysokości 40 cm; wyższe rośliny są przycinane. Każda roślina jest używana do badania tylko jednokrotnie. Produkt powinien być stosowany na rośliny doświadczalne aż do wyczerpania, przy użyciu sprzętu zapewniającego równe rozprowadzenie produktu na całym poletku. Produkt powinien być stosowany w najwyższej dawce zalecanej dla zamierzonego zastosowania. Po dokonaniu oprysku, rośliny pozostawia się do wyschnięcia w miejscu o dobrej wentylacji.

Doświadczenie można przeprowadzić na dowolnych drzewach owocowych np. jabłoni *Malus × domestica* (MABSD), czereśni *Prunus avium* (PRNAV) lub uprawy polowej, np. pszenicy *Triticum aestivum* (TRZVX). Można użyć dowolnej rośliny.

### **3. Przeprowadzanie doświadczenia i sposób oceny**

Badania ekspozycji prowadzi się po 3, 10, 17, 24 i 31 dniach po dokonaniu zabiegu na krzewach winorośli. Liście z osadem zrywa się i rozkłada wewnątrz klatki ekspozycyjnej (tej samej klatki jak opisana pod I.1.2, ale z szybkami niepoddanymi zabiegowi), aby pokryć całą dolną powierzchnię. Masowo hodowane w laboratorium *T. cacoeciae* wprowadza się do tych klatek ekspozycyjnych. Klatki z liśćmi umieszcza się później w klimatyzowanej komorze. Wpływ na zdolność porażania pasożytami ocenia się w ten sam sposób jak w pierwszym badaniu laboratoryjnym (patrz I.4).

### **4. Wyniki**

Liczba porażonych pasożytami jaj obliczana jest dla każdej klatki.

Średni stopień porażenia pasożytami na samicę jest obliczana dla wszystkich klatek. Dla każdego badanego produktu, średnia redukcja dokonania porażenia obliczana jest jako procentowa część partii kontrolnej.

Redukcja w wydajności porażenia pasożytami obliczona dla każdego badania ekspozycji w różnych interwałach czasowych po zastosowaniu jest naniesiona na skalę probitową w zależności od czasu. Czas trwania aktywności toksycznej jest to czas potrzebny osadowi pestycydu na utratę skuteczności, żeby osiągnąć redukcję w porażaniu pasożytem niższą niż 50%, w porównaniu do grupy kontrolnej.

## **IV. Doświadczenie w warunkach polowych do badania efektów ubocznych produktów na *Trichogramma* spp.**

### **1. Warunki doświadczenia**

Wszystkie produkty nieklasyfikowane po wcześniejszych doświadczeniach powinny być poddane doświadczeniu w warunkach polowych.

#### **1.1 Organizmy badane, wybór rośliny uprawnej i jej odmiany**

Organizm badany: można użyć dowolnego odpowiedniego gatunku *Trichogramma*.

## 1.2 Warunki doświadczenia

Doświadczenie powinno być przeprowadzone w sadzie owocowym lub na polu, które ostatnio nie było traktowane żadnymi środkami ochrony roślin. Gatunek *Trichogramma* sp. wypuszcza się na pole poprzez rozłożenie kartonów z porażonymi jajami *S. cerealella*, niedługo przed wykluciem. Roślinność i warunki uprawowe, temperatura i wilgotność powinny być jednakowe dla wszystkich poletek doświadczalnych.

## 1.3 Projekt i układ doświadczenia

Kombinacje doświadczenia: poletka chronione badanym preparatem (preparatami), preparatem porównawczym i poletko kontrolne, traktowane wodą, powinny być rozmieszczone według odpowiedniego układu statystycznego.

Rozmiar poletka (bez pasów ochronnych): przynajmniej 3 duże drzewa lub 100 m<sup>2</sup> mniejszych drzew lub uprawa polna. Odległość pomiędzy traktowanymi poletkami powinna wynosić przynajmniej 10 m upraw, ale dla roślin niskich może być wskazane zwiększenie odstępów między poletkami. Odległość między traktowanymi a nietraktowanymi poletkami powinna wynosić 30-50 m.

Liczba powtórzeń: przynajmniej 3.

W celu uzyskania dalszych informacji odnośnie projektu badań, zob. Normę EPPO PP 1/152 Planowanie i analiza badań oceniających skuteczność.

## 2. Stosowanie zabiegów

### 2.1 Badany preparat (preparaty)

Oceniany preparat (preparaty) powinien być konkretnym środkiem ochrony roślin o określonej formulacji (zob. Normy EPPO PP 1/181 Przeprowadzanie i raporty z badań nad oceną skuteczności).

### 2.2 Preparat porównawczy

*Preparat porównawczy powinien być środkiem do użytku w uprawach owoców lub polowych, znanym z praktycznej skuteczności w warunkach uprawy i zdrowotności roślin oraz w warunkach środowiskowych (włącznie z klimatycznymi) na obszarze, na którym ma być prowadzone doświadczenie.* Przynajmniej jeden powinien być uznany za nieszkodliwy, a inny uznany za szkodliwy dla gatunków *Trichogramma*. W zasadzie mechanizm działania, terminy i metody stosowania powinny być jak najbardziej zbliżone do tych dla badanego środka.

### 2.3 Sposób stosowania

Sposób stosowania winien odpowiadać dobrym standardom stosowanym w praktyce.

#### 2.3.1 Sposób wykonania zabiegu

Sposób wykonania zabiegu (np. opryskiwanie) powinien być zgodny z zaleceniami dla danego środka ochrony roślin.

#### 2.3.2 Rodzaj sprzętu

Zabiegi należy stosować przy pomocy sprzętu, który zapewnia równomierne rozmieszczenie produktu na całym poletku. Czynniki, które mogą wpłynąć na oddziaływanie na gatunek *Trichogramma* (takie jak ciśnienie robocze, rodzaj dyszy) powinny być zgodne z zaleceniami. Szczególną uwagę należy poświęcić uniknięciu znoszenia preparatu.

#### 2.3.3 Terminy stosowania

Zabieg powinien być przeprowadzony po jednym dniu od wystąpienia głównej fali wylęgu gatunku *Trichogramma*.

#### 2.3.4 Dawki i objętości

Preparat powinien w zasadzie być stosowany w dawkach określonych w zaleceniach. Stosowana dawka powinna być wyrażona w kg (lub litrach) produktu na 1 ha. Przydatnym może również okazać się zapisanie dawek w g substancji aktywnej na ha. W przypadku opryskiwania, należy również podać informacje dotyczące stężenia (%) oraz objętości wody (L ha<sup>-1</sup>).

Należy odnotować wszelkie odchylenia od zalecanego dawkowania.

#### 2.3.5 Dane dotyczące innych środków ochrony roślin

Prawdopodobieństwo współdziałania z innymi środkami ochrony roślin powinno być ograniczone do minimum.

## 3. Sposób zbierania i rejestrowania wyników oraz dokonywania pomiarów

### 3.1 Dane meteorologiczne

Przez cały okres prowadzenia doświadczenia należy zapisywać temperaturę, wilgotność, a jeśli ma to zastosowanie, informacje dotyczące programu sztucznego oświetlenia i podlewania.

### 3.2 Sposób, terminy oraz częstotliwość dokonywania oceny

#### 3.2.1 Rodzaj danych

Ocenę prowadzi się poprzez losowe rozłożenie 60 kartoników z przynętami (jajami *S. cerealella* przyklejonymi na paskach zielonego papieru) na każdym poletku. Kartoniki z jajami o wymiarach 2 × 2 cm są mocowane do spodniej strony liści przy

użyciu zacisków. Po upływie 1 lub 2 dni kartoniki zbiera się i zabiera do laboratorium. Są one przechowywane w temperaturze 25°C aż do czasu badania. Ilość porażonych pasożytami jaj żywiciela (które czerniały) liczy się przynajmniej 8 dni po ekspozycji na polu. Redukcja porażenia, według porównania z partią kontrolną (traktowaną wodą), stosowana jest do pomiaru efektów oddziaływania produktu.

### 3.2.2 Terminy i częstotliwość

Pierwsze kartony z przynętą są rozkładane 24 godziny po zastosowaniu środka i wymieniane przynajmniej 3 razy w odstępach 1-2 dni.

### 3.2.3 Zakłócenia z powodu pogody i obecności ptactwa owadożernego na polu.

Deszcz obniża stężenie preparatu i może uszkodzić kartoniki z przynętą. Eksperymenty powinny być wstrzymane, jeśli podczas pierwszych 2 dni eksperymentu wystąpią opady. Oziębienie obniża aktywność gatunków *Trichogramma*, czego efektem jest obniżona zdolność porażania pasożytami, która utrudnia ocenę. W takich warunkach, monitorowanie można przedłużyć na drugi tydzień. Ptaki owadożerne mogą żerować na kartonikach z przynętą i zakłócać ocenę. Straty te można zredukować przez zwiększenie liczby kartoników z przynętą i ich wymianę w mniejszych odstępach czasu.

## 3.3 Bezpośredni wpływ na roślinę uprawną

Bezpośredni wpływ na roślinę uprawną powinien być już zostać oceniony w badaniach skuteczności produktu (patrz odpowiednie Normy EPPO w serii PP I Ocena skuteczności insektycydów), ale wszelkie poszczególne zauważone efekty powinny być zapisywane.

## 4. Wyniki

Procentowe porażenie pasożytami jest obliczane dla każdego poletka i to, które dotyczy badanych środków porównywane jest z preparatami porównawczymi.

## V. Prezentacja wyników

Wyniki powinny być przedstawione w formie usystematyzowanej a raport powinien obejmować analizę i ocenę. Dane źródłowe (robocze) również powinny być dostępne. Należy też dokonać analizy statystycznej przy użyciu odpowiednich metod, które powinny być podane. Brak takiej analizy powinien być uzasadniony. Zobacz Normę EPPO PP 1/152 Planowanie i analiza skuteczności badań szacunkowych.

### Załącznik I

#### Biologia owada doświadczalnego (*Trichogramma cacoeciae*)

Dorosłe samice atakują i porażają pasożytami jaja

motyli. Ich jaja (0.1 mm długości) są wprowadzane do żywiciela i larwy podczas inkubacji żerują na substancji żółtkowej zarodka żywiciela. Są trzy stadia larwalne między wylinkami, wszystkie workowate. Po nich następuje stadium przedpoczwarkowe, kiedy pojawiają się cechy osobnika dojrzałego i poczwarka. Na początku trzeciego stadium larwalnego między wylinkami jaja żywiciela czernieją z powodu odkładania się czarnych granulek na wewnętrznej powierzchni błony jaja.

W eksperymentach jako żywicieli używa się jaj *Sitotroga cerealella*. W warunkach laboratoryjnych (16 godzin oświetlenia, 28°C, 50-70% wilgotności względnej – 8 godzin zaciemnienia, 18°C, 80-90% wilgotności względnej) długość życia osobnika dorosłego wynosi około 14 dni, okres rozwoju wynosi około 13 dni, a produkcja jaj wynosi około 30 na samiec.

### Załącznik II

#### Hodowla owada doświadczalnego (*Trichogramma cacoeciae*)

Jedynie zdrowe *T. cacoeciae* powinny być używane w badaniach, a ich śmiertelność podczas rozwoju nie powinna przekroczyć 10%. Płodność powinna stale utrzymywać się na wysokim poziomie; można to sprawdzić w nietraktowanych częściach eksperymentów stanowiących część badania.

W celu szybkiego wykrycia wszelkich zmian genetycznych, które mogą nastąpić podczas długotrwałej hodowli laboratoryjnej pasożyta, powinno się regularnie prowadzić porównania z owadami polnymi.

Korzystna jest hodowla *T. cacoeciae* w laboratorium w zmiennych warunkach (np. 16 godzin oświetlenia, 28°C, 50-70% wilgotności względnej – 8 godzin zaciemnienia, 18°C, 80-90% wilgotności względnej). Te symulowane warunki polowe okazały się korzystniejsze niż warunki stałe. Pasożyty można hodować w cylindrycznych szklanych kłatkach (około 25 cm długości i 10 cm średnicy). Pożywka (patrz Załącznik V) i jaja gospodarza wymienia się trzy razy w tygodniu. Jedna trzecia porażonych jaj żywiciela powinna być zwrócona do każdej klatki w celu umożliwienia ciągłej hodowli.

### Załącznik III

#### Hodowla żywiciela, *Sitotroga cerealella*

Wolna od insektycydu pszenica jest mieszana z wodą i ogrzewana w szafce w temperaturze 70°C przez około 6 godzin. Ta procedura pomaga zdezynfekować i zmiękczyć ziarna. Pszenicę rozsypuje się na tacach, skażonych *S. cerealella* i umieszcza w inkubatorze na około 3 tygodni w temperaturze 27 ± 2°C oraz 70 ± 10% wilgotności względnej, aby pozwolić larwom *S. cerealella* porazić ziarna, rozwinąć się i przepoczwaczyć. Tace ze skażonymi ziarnami umieszczane są w kłatkach, a wykluwające się ćmy są zbierane.

Jaja zbiera się przez umieszczenie dorosłych osobników w mniejszych kłatkach zawierających

ekrany ze stali nierdzewnej. Dorosłym ćmom nie podaje się wody ani pożywki. Dla uzyskania dalszych informacji, patrz Hassan (1981).

#### **Załącznik IV**

##### ***Przygotowanie kleju (Traganth)***

Należy użyć drobno sproszkowanego kleju Traganth (Merck, DAB 7, artykuł nr 8405), który jest całkowicie nieszkodliwy dla *T. cacoeciae*. Pół łyżeczki do herbaty proszku Traganth miesza się z wodą destylowaną dla otrzymania 50 mililitrów mieszanki. Po 24 godzinach mikstura przyjmuje białe zabarwienie i jest wolna od grudek. Klej jest wtedy gotowy do użycia i powinien być trzymany w pojemniku szklanym z szerokim otworem, przechowywany w lodówce w temperaturze około 5-7°C. Nowy klej powinno się sporządzać przynajmniej co 3 tygodnie.

#### **Załącznik V**

##### ***Sporządzanie pożywki miodowo-agarowej***

Pożywkę sporządza się ze 120 g miodu i 50 cm<sup>3</sup> agaru w roztworze. Aby uniknąć rozwoju grzybów w pożywce, rozpuszcza się 0.13 mg preparatu Nipagin M (Merck, artykuł nr 6757) w 100 ml wody destylowanej. Dodaje się 2 g proszku agarowego (stężenie żelu 600 g cm<sup>-3</sup>) i podgrzewa miksturę w kąpeli z wrzącej wody aż do całkowitego rozpuszczenia. 50 ml tego roztworu dodaje się do 120 g miodu, a miksturę podgrzewa się aż do uzyskania jednorodności. Pożywka jest nakładana na paski papieru przy użyciu strzykawki medycznej. Napelnioną strzykawkę przechowuje się w pojemniku z igłą stale zanurzoną w wodzie, co zapobiega stwardnieniu pożywki i zatkaniu igły.

#### **Bibliografia**

- HASSAN, S.A. (1974) [Metoda badania oddziaływania środków ochrony roślin na pasożyty jaj z rodzaju *Trichogramma* – wyniki serii doświadczeń z fungicydami]. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **76**, 120-134 (po niemiecku).
- HASSAN, S.A. (1977) Standaryzowane techniki badania efektów ubocznych działania pestycydów na nieszkodliwe stawonogi w warunkach laboratoryjnych. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **84**, 158-163.
- HASSAN, S.A. (1980) [Powtarzalne procedury laboratoryjne do badań trwałych skutków działania środków ochrony roślin na pasożyty jaj *Trichogramma*]. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **89**, 281-289 (po niemiecku).
- HASSAN, S.A. (1981) [Masowa hodowla I wykorzystanie *Trichogramma*. 1. Hodowla żywiciela *Sitotroga cerealella*]. *Entomophaga* **26**, 339-348 (po niemiecku).
- HASSAN, S.A. (1985) Standardowe metody badania efektów ubocznych pestycydów na naturalnych wrogów owadów oraz roztoczy opracowane przez Grupę

Roboczą IOBC/WPRS 'Pestycydy i naturalni wrogowie'. *Biuletyn OEPP/EPPO Billetyn* **15**, 214-255.

OEPP/EPPO (1993) Schemat podejmowania decyzji dla oceny zagrożenia ekologicznego ze strony środków ochrony roślin *Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn* **23**, 1-165.