Entomopatogene gljive roda Beauveria u Hrvatskoj i mogućnosti njihove uporabe u biološkoj kontroli šumskih štetnika

Kovač, Marta

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry and Wood Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:108:160333

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology

Sveučilište u Zagrebu

ŠUMARSKI FAKULTET

Marta Kovač

ENTOMOPATOGENE GLJIVE RODA *BEAUVERIA* U HRVATSKOJ I MOGUĆNOSTI NJIHOVE UPORABE U BIOLOŠKOJ KONTROLI ŠUMSKIH ŠTETNIKA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.

University of Zagreb

FACULTY OF FORESTRY

Marta Kovač

ENTOMOPATHOGENIC FUNGI OF THE GENUS *BEAUVERIA* IN CROATIA AND POSSIBILITIES OF THEIR APPLICATION IN BIOLOGICAL CONTROL OF FOREST PESTS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021.

Sveučilište u Zagrebu

ŠUMARSKI FAKULTET

Marta Kovač

ENTOMOPATOGENE GLJIVE RODA *BEAUVERIA* U HRVATSKOJ I MOGUĆNOSTI NJIHOVE UPORABE U BIOLOŠKOJ KONTROLI ŠUMSKIH ŠTETNIKA

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof.dr.sc. Danko Diminić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF FORESTRY

Marta Kovač

ENTOMOPATHOGENIC FUNGI OF THE GENUS *BEAUVERIA* IN CROATIA AND POSSIBILITIES OF THEIR APPLICATION IN BIOLOGICAL CONTROL OF FOREST PESTS

DOCTORAL THESIS

Supervisor: prof. Danko Diminić, Ph.D.

Zagreb, 2021.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

TI (naslov)	Entomopatogene gljive roda *Beauveria* u Hrvatskoj i mogućnosti njihove uporabe u biološkoj kontroli šumskih štetnika
AU (autor)	Marta Kovač
AD (adresa)	Jaruščica 5, 10 020 Zagreb, Hrvatska email: martam@sumins.hr
SO (izvor)	Šumarska knjižnica, Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu Svetošimunska 25, 10002 Zagreb
PY (godina objave)	2021.
LA (izvorni jezik)	Hrvatski
DE (ključne riječi)	*Beauveria*, biokontrola, entomopatologija, šumski štetnici
GE (zemlja objave)	Republika Hrvatska
PT (vrsta objave)	Doktorski rad
VO (obujam)	I – XIX + 112 str. + 16 tablica + 42 slike + 181 literaturni navod
AB (sažetak)	Entomopatogene gljive roda *Beauveria* spadaju u najpoznatije i jedne su od najistraživanijih uzročnika bolesti kukaca. To svojstvo čovjek nastoji iskoristiti u suzbijanju i regulaciji populacija štetnih organizama. U zaštiti šuma još ne nalaze veliku primjenu, a u Hrvatskoj su općenito vrlo malo istraživane. Prisutne su u kopnenim ekosustavima diljem svijeta, a predstavljaju prirodne neprijatelje brojnim vrstama kukaca. Do danas su zabilježene kao uzročnici bolesti na preko 700 vrsta u 15 različitih redova domaćina, uključujući redove Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Thysanoptera i Orthoptera u koje spadaju štetni kukci koji se komercijalno najviše suzbijaju. Primjerice, od biološkiih preparata na tržištu kojima su entomopatogene gljive djelatna tvar njih gotovo 40% pripada gljivama roda *Beauveria*. Osim što su sposobne regulirati populacije štetnih kukaca, mogu biti i antagonisti biljnih patogena, endofiti u biljkama, promotori biljnog

rasta, te mogu štititi korijenski sustav biljaka od različitih štetnih kukaca u tlu. Brojna istraživanja dokazala su njihovu sposobnost da endofitski koloniziraju biljke te se javljaju prirodno ili su uspješno introducirane u brojnim biljnim vrstama kako bi štitile biljke domaćine od štetnih kukaca. Iz roda *Beauveria* poznato je više vrsta, no dugo se govorilo uglavnom o vrsti *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (*Ascomycota, Hypocreales, Cordycipitaceae*), koja se koristi kao sredstvo biološke kontrole poljoprivrednih štetnika diljem svijeta, a njezina patogenost dokazana je i na različitim štetnim šumskim kukcima. Zbog sve većeg postrožavanja mjera uporabe kemijskih sredstava u šumarstvu, i sve učestalijeg okretanja biološkim metodama kontrole štetnih kukaca i u šumama, otkrivanje novih vrsta i sojeva entomopatogenih gljiva i istraživanje metoda njihove primjene predstavlja potencijal za biološku kontrolu različitih ekonomski važnih i/ili invazivnih vrsta štetnika.

Svrha ovog istraživanja bila je odgovoriti na određena fundamentalna pitanja o entomopatogenima u šumskim ekosustavima Hrvatske, a posebno su obrađivane gljive roda *Beauveria.* Kroz laboratorijske pokuse istraživala se mogućnost njihove upotrebe u terenskoj aplikaciji, posebice za tretiranje štetnih kukaca koji trenutno predstavljaju problem u šumarstvu. Odabrana su dva vrlo različita ciljana štetna organizma: invazivna vrsta hrastova mrežasta stjenica *Corythucha arcuata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) i domaća vrsta borov prelac *Dendrolimus pini* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae). Obje vrste pokazale su veliku štetnost na većim ili vrlo velikim površinama. Za izolaciju, analizu i identifikaciju gljiva korištene su morfološke, molekularne i filogenetske metode (bioinformatičke analize), a neke metode (primjerice endofitska detekcija *Beauveria* gljiva) modificirane su i/ili razvijene u samom istraživanju. Provedeno je više desetaka laboratorijskih pokusa u kontroliranim uvjetima temperature, vlage i svjetla gdje se ispitivao učinak primjene izolata *Beauveria* gljiva na navedene ciljane organizme u različitim dozama i koncentracijama suspenzija spora (u nekim pokusima i u kombinaciji s

insekticidima), da bi se definirao optimalan učinak.

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su prirodnu prisutnost vrsta roda *Beauveria* na našem području na različitim vrstama kukaca i utvrdili njihovu distribuciju u tlu u različitim šumskim zajednicama u Hrvatskoj. Nadalje je utvrđeno kako *B. bassiana* ne može biti inokulirana kao endofit u biljnom tkivu hrasta lužnjaka te ga tako štititi od napada štetnih kukaca jer za razliku od zeljastih vrsta biljaka za drvenaste vrste vjerojatno postoji prejaka prodorna barijera. U eksperimentalnom dijelu istraživanja utvrđena je patogenost i efikasnost domaćih sojeva gljiva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana,* te dobar potencijal u biološkoj kontroli borovog prelca i hrastove mrežaste stjenice. Dobivene su optimalne doze i koncentracije suspenzija te uvjeti temperature i vlage kojima se može postići željeni efekt u laboratorijskim uvjetima, stoga se u budućnosti može istraživati i njihova terenska primjena. U pokusima gdje su te gljive kombinirane s konvencionalnim insekticidom (u malim, ekološki prihvatljivim 'ultra low' dozama) pokazalo se da insekticid ne inhibira njihov rast i klijavost i nema štetan učinak na njihovu virulentnost što ukazuje na mogućnost takve kombinirane primjene. Dobivene spoznaje predstavljaju temelj za razvijanje i uključivanje biološke kontrole entomopatogenim gljivama kao komponente u integriranoj zaštiti šuma, te pokazuju njihov potencijal kao ekološki prihvatljivije i održivije alternative. Primjenom ovih gljiva podizao bi se prirodni inokulum već prisutan u određenom području, što bi značilo dugotrajniju kontrolu populacije ciljanog štetnika a time dugoročno i smanjenu upotrebu kemijskih insekticida i manje negativnog utjecaja na neciljane vrste, što se uklapa u sam kocept integrirane zaštite šuma.

Cilj je ujedno i potaknuti razvoj entomopatologije kao znanstvene grane koja se bavi patologijom (bolestima) kukaca u Hrvatskoj i otvoriti mogućnosti za provedbu novih, sličnih istraživanja.

BASIC DOCUMENTATION CARD

TI (Title)	Entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* in Croatia and possibilities of their application in biological control of forest pests
OT (Original title)	Entomopatogene gljive roda *Beauveria* u Hrvatskoj i mogućnosti njihove uporabe u biološkoj kontroli šumskih štetnika
AU (Author)	Marta Kovač
AD (Address)	Jaruščica 5, 10 020 Zagreb, Croatia email: martam@sumins.hr
SO (Source)	Library of Faculty of Forestry, University of Zagreb Svetosimunska 25, 10002 Zagreb
PY (Publication year)	2021.
LA (Text language)	Croatian
DE (Descriptors)	*Beauveria*, biocontrol, entomopathology, forest pests
GE (Geo. headings)	Republic of Croatia
PT (Publication type)	Doctoral Thesis
VO (Volume)	I – XIX + 112 p. + 16 tables + 42 figures + 181 reference
AB (Abstract)	Entomopathogenic fungi from the genus *Beauveria* are one of the most common and most-studied insect pathogenic fungi. This feature man seeks to use in the control and regulation of pest populations. In forest protection, they still haven't been extensively applied, and in Croatia they have generally been very little researched. They are present in terrestrial ecosystems around the world and represent natural enemies to many insect species. To date, those fungi have been reported to cause disease on over 700 species in 15 different orders, including Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Thysanoptera, and Orthoptera, which include commercially most controlled insect pests. From mycoinsecticides available on market almost 40% are based on *Beauveria* fungi. Besides being able to regulate pest

populations, they can also be antagonists of plant pathogens, endophytes in plants, plant growth promoters, and can protect plant root system from various harmful insects in the soil. Numerous studies have proven their ability to endophytically colonize plants, and they occur naturally or are being successfully introduced into numerous plant species. Today, many *Beauveria* species are known, but for a long time it was thought this genus contains only several species, including most common *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota, Hypocreales, Cordycipitaceae), which is used for biological control of agricultural pests around the world. Its pathogenicity has been proven on forest insects as well. Due to the increasing tightening of measures for the use of chemicals in forestry, and the increasing use of biological methods to control forests pests, discovery of new species and strains of entomopathogenic fungi and research of their application methods represents the potential for biological control of various economically important and/or invasive pests. The purpose of this study was to answer fundamental questions about entomopathogens in Croatian forest ecosystems, with special reference to the genus *Beauveria*. Through laboratory experiments, the possibility of their use in field application was investigated, especially against insect pests that currently present a problem in forestry. Two very different target pests were selected: the invasive oak lace bug *Corythucha arcuata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) and the native pine pest *Dendrolimus pini* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae). Both species have shown great harmfulness over larger or very large areas. Morphological, molecular and phylogenetic methods (bioinformatics analysis) were used for isolation, analysis and identification of fungi, and some methods (e.g. endophytic detection of *Beauveria* fungi) were modified and/or developed in the study itself. Dozens of laboratory experiments were performed under controlled temperature, humidity, and light conditions to investigate the effect of applying *Beauveria* isolates to these target organisms at different

doses and concentrations of spore suspensions (in some experiments in combination with insecticides), to determine optimal effect. The results of this study confirmed the natural presence of *Beauveria* species on different insect species and determined their distribution in the soil in different forest communities in Croatia. It was further found that *B. bassiana* cannot be inoculated as an endophyte in pedunculate oak and thus protect it from harmful insects, because unlike herbaceous plant species for woody species a penetrating barrier is probably too strong. In the experimental part of the research, the pathogenicity and efficacy of native strains of *B. bassiana* and *B. pseudobassiana* were determined, and their potential in the biological control of pine-tree lappet moth and oak lace bug was proven. Optimal doses and concentrations of suspensions, as well as temperature and humidity conditions that can achieve the desired effect in laboratory conditions have been obtained, so their field application can be investigated in the future. In experiments where these fungi were combined with a conventional insecticide (in small, environmentally friendly 'ultra low' doses) it was shown that the insecticide does not inhibit their growth and germination, and has no detrimental effect on their virulence indicating the possibility of such combined application. The obtained knowledge represents the basis for the development and inclusion of biological control with entomopathogenic fungi as a component in integrated forest protection, and shows their potential as environmentally friendly and sustainable alternative. Application of these fungi would raise the natural inoculum already present in a certain area, which would mean longer-term control of the target pest population and thus long-term reduction of chemical insecticides use and less negative impact on non-target species, which fits into the concept of integrated forest protection. The aim is also to encourage the development of entomopathology as a scientific branch that deals with pathology (diseases) of insects in Croatia and open opportunities for the implementation of new, similar research.

SADRŽAJ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA I
BASIC DOCUMENTATION CARD IV
SADRŽAJ VII
PREDGOVOR I ZAHVALE X
PODACI O MENTORU XII
KAZALO KRATICA XIV
POPIS SLIKA XV
POPIS TABLICA XIX
1. UVOD 1
1.1. Entomopatogene gljive: klasifikacija, distribucija i uloga u prirodnim ekosustavima 3
1.2. *Beauveria* spp. 4
1.2.1. Otkrivanje, taksonomija, morfološka i molekularna identifikacija 4
1.2.2. Biologija, ekologija i proces infekcije kukca 6
1.2.3. Praktična primjena entomopatogenih gljiva u biološkoj kontroli 7
1.2.4. Uloga Beauveria sp. kao endofita 11
1.3. Štetni kukci korišteni u istraživanju 12
1.3.1. Borov prelac (Dendrolimus pini) 13
1.3.2. Hrastova mrežasta stjenica (Corythucha arcuata) 15
1.4. Hipoteze i ciljevi istraživanja 17
2. MATERIJALI I METODE 18
2.1. Morfološka i molekularna identifikacija vrsta iz roda *Beauveria* na području Hrvatske 18
2.1.1. Sakupljane uzoraka i izolacija gljiva s kukaca 18
2.1.2. Morfološka identifikacija izolata s kukaca 20
2.1.3. Molekularna identifikacija izolata s kukaca i filogenetske analize 20
2.1.4. Sakupljanje uzoraka i izolacija gljiva iz tla 21
2.1.5. Morfološka identifikacija izolata iz tla 23
2.1.6. Molekularna identifikacija izolata iz tla 23
2.2. Ispitivanje utjecaja insekticida na razvoj izolata 25
2.2.1. Utjecaj insekticida na klijavost spora izolata BBS, BBC10 i BBNK1 25

2.2.2. Utjecaj insekticida na razvoj kultura izolata BBS, BBC10 i BBNK1 26
2.3. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćeg soja *B. bassiana* na borovom prelcu 27
2.4. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćih sojeva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* na hrastovoj mrežastoj stjenici 32
2.4.1. Preliminarni pokus ispitivanja patogenosti gljive B. bassiana na odraslim jedinkama hrastove mrežaste stjenice 32
2.4.2. Pokus ispitivanja patogenosti soja BBS na prezimljavajućoj i ljetnoj generaciji hrastove mrežaste stjenice 33
2.4.3. Pokus ispitivanja patogenosti dva izolata B. pseudobassiana izoliranih sa hrastove mrežaste stjenice 35
2.4.4. Brojanje jedinki prezimljavajućih imaga hrastove mrežaste stjenice u mahovini 37
2.5. *Beauveria* gljive kao endofiti 38
2.5.1. Ispitivanje endofitizma kod hrasta lužnjaka 38
2.5.2. Ispitivanje endofitizma kod alepskog bora 41
3. REZULTATI 44
3.1. Izolacija i morfološka identifikacija izolata s kukaca 44
3.2. Molekularne i filogenetske analize izolata s kukaca 46
3.3. Izolacija i morfološka i molekularna identifikacija izolata iz tla 48
3.4. Rezultati ispitivanja utjecaja insekticida na klijavost spora i razvoj izolata 50
3.5. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćeg soja *B. bassiana* na borovom prelcu 53
3.6. Rezultati laboratorijskog ispitivanja patogenosti domaćih sojeva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* na hrastovoj mrežastoj stjenici 67
3.6.1. Preliminarni pokus ispitivanja patogenosti gljive B. bassiana na odraslim jedinkama hrastove mrežaste stjenice 67
3.6.2. Pokus ispitivanja patogenosti soja BBS na prezimljavajućoj i ljetnoj generaciji hrastove mrežaste stjenice 67
3.6.3. Pokus ispitivanja patogenosti dva izolata B. pseudobassiana izoliranih sa hrastove mrežaste stjenice 69
3.6.4. Brojanje jedinki prezimljavajućih imaga hrastove mrežaste stjenice u mahovini 71
3.7. *Beauveria* gljive kao endofiti 72
3.7.1. Ispitivanje endofitizma kod hrasta lužnjaka 72
3.7.2. Ispitivanje endofitizma kod alepskog bora 73
4. DISKUSIJA 74
4.1. Morfološka i molekularna identifikacija vrsta iz roda *Beauveria* na području Hrvatske 74
4.2. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćih sojeva gljiva roda *Beauveria* na ciljane štetne organizme 76

4.2.1. Ispitivanje utjecaja insekticida na razvoj izolata 77

4.2.2. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćeg soja B. bassiana na borovom prelcu 79

4.2.3. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćih sojeva B. bassiana i B. pseudobassiana na hrastovoj mrežastoj stjenici 82

4.2.4. Brojanje jedinki prezimljavajućih imaga hrastove mrežaste stjenice u mahovini 87

4.3. *Beauveria* gljive kao endofiti 88

5. ZAKLJUČCI 90

6. LITERATURA 92

ŽIVOTOPIS 109

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA I SUDJELOVANJA 110

PREDGOVOR I ZAHVALE

„*I firmly believe in the rule of compensation. True rewards are always proportionate to work and sacrifice*.“

Nikola Tesla

Moj znanstveni put i doktorsko istraživanje započeli su jednim pozivom. Taj poziv u kojem sam morala obećati da ću dobivenu priliku iskoristiti maksimalno, da ću biti marljiva i predana u zadacima koji mi predstoje shvatila sam vrlo ozbiljno, duboko svjesna da se takva prilika ne pruža svaki dan. I zato bih se prvenstveno htjela zahvaliti osobi koja mi je taj poziv uputila, kolegi i mentoru dr.sc. Milanu Perneku. Nema riječi kojima bih se mogla zahvaliti što sam od upravo takve osobe mogla učiti i razvijati se kao mladi znanstvenik. Njegovo nesebično dijeljenje znanja i stečenog iskustva, savjeti, strpljivost, usmjeravanje na pravi put kada bih zalutala i podrška u svemu ima neprocjenjivu vrijednost.

Hvala i cijelom mom Zavodu za zaštitu šuma (Nikoli, Dinki, Blaženki, Borisu, Zlatku, Sanji) na pomoći i podršci. Zahvalna sam na svim danima i vikendima provedenima nad pokusima u laboratoriju, svim zajedničkim poslovima i terenima, suradnjama i zajedničkim publikacijama, kao i uvijek zabavnim druženjima i zgodama. Posebno bih se zahvalila svojoj Ivani, pravoj prijateljici i kolegici, koja mi je uvijek uskakala kada treba, brinula za mene i s kojom su i teški dani bili lakši.

Također bih se zahvalila i kolegi dr.sc. Nikoli Lackoviću na svemu što me naučio, od moje prve inokulacije gljive *Beauveria* na hranjivu podlogu, preko molekularnih analiza i svih caka u molekularnom laboratoriju, pa sve do pomoći oko statističkih analiza prilikom izrade mog doktorskog rada. Njegova kolegijalnost i spremnost da uvijek bezrezervno pomogne svakome i prenese svoje znanje je primjer koji treba slijediti.

Hvala mome mentoru prof. dr.sc. Danku Diminiću na svim sugestijama i ohrabrenjima tokom mog doktorskog istraživanja, te posebno hvala na toploj preporuci temeljem koje sam dobila DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) stipendiju za znanstveno istraživanje.

Veliko hvala i mojoj mentorici sa Julius Kühn Instituta za biološku kontrolu u Darmstadtu Dr. Regini Kleespies, kao i profesorici Dr. Corneliji Ullrich. Uz njih sam naučila što znači predan znanstveni rad i iskrena ljubav prema znanosti, te da ponekad, uz sav uloženi trud i energiju, ne mora sve ići po željenom planu, kao i to da su upravo „negativni“ rezultati zapravo vrlo

vrijedan i sastavan dio istraživanja koji ga mogu usmjeriti u novom, često puta boljem pravcu. Rad s njima oblikovao je moje doktorsko istraživanje i otvorio mi nove mogućnosti i smjerove u koje ono treba ići.

Hvala i prof. dr.sc. Borisu Hrašovcu na svim inputima i zalaganju oko izrade mog doktorskog rada, na uvijek pozitivnom duhu, kao i entuzijazmu oko istraživane teme koji bi pokazivao pri svakom našem susretu.

Zahvalila bih se i doc. dr.sc. Sanji Perić, dr.sc. Dijani Vuletić i svim članovima Znanstvenog vijeća Hrvatskog šumarskog instituta na svim pruženim prilikama za odlaske na trening škole, radionice, STSM-ove (znanstvene misije) i konferencije gdje sam mogla razvijati svoje vještine i znanja. Kroz takve događaje upoznala sam brojne divne ljude, znanstvenike i suradnike koji su me puno toga naučili, proširili mi vidike i obogatili moj život.

Ovim putem bih se zahvalila i osobama koje su me preporučile dr. Perneku, mojoj prvoj mentorici dr.sc. Silviji Krajter Ostojić i dr.sc. Željku Zgrabliću koji su me potaknuli da se javim na natječaj i iskreno me bodrili.

Zahvaljujem i Darku Posariću, dipl.ing.šum. iz UŠP Vinkovci (Hrvatske šume d.o.o.) koji je od početka vjerovao u ovo istraživanje i bio uvijek na usluzi prilikom dolaska na teren.

Veliko hvala mojoj obitelji, mojim roditeljima Blaženki i Tomislavu što su me uvijek hrabrili, vjerovali u mene i veselili se svakom mom uspjehu. Oni, kao i moje sestre Zlatka i Klara, moj su oslonac i „baza“ koja je nepromjenjiva i uvijek tu za mene.

Na kraju, hvala mom mužu Josipu, mom najboljem prijatelju i životnom suputniku. Uvijek si bio tu i ništa od ovoga ne bi bilo moguće da nema tebe.

….

Ovaj doktorski rad posvećujem svim budućim mladim znanstvenicima koji dolaze i koji bi se voljeli baviti ovakvim i sličnim „neuobičajenim“ temama za ovo područje. Budite hrabri, nemojte se bojati izlaziti iz okvira i njegujte svoj entuzijazam i želju za promjenama. Upornost se isplati!

PODACI O MENTORU

Prof. dr. sc. Danko Diminić rođen je 1961. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađa u Labinu, gdje 1980. godine završava i srednju školu stekavši zvanje suradnika u nastavi. Studij šumarstva na Šumarskom odsjeku Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu završava 1989. godine diplomskim radom "Životni ciklus nekih gljiva uzročnika osipanja iglica četinjača u nas". Poslijediplomski studij iz područja zaštita šuma završava 1993. godine na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, znanstvenim magistarskim radom "Prilog poznavanju mikoza borovih kultura u Istri" pod mentorstvom prof. dr. sc. Milana Glavaša. Godine 1997. doktorirao je na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, iz područja biotehničkih znanosti, polje šumarstvo, grana zaštita šuma, obranivši doktorski rad "Istraživanje gljive *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton na borovima u Hrvatskoj" pod mentorstvom prof. dr. sc. Milana Glavaša.

Od ožujka do prosinca 1989. godine zaposlen je u Šumarskom institutu u Jastrebarskom gdje radi na poslovima zaštite šuma. Od 1990.-1993. godine zaposlen je na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u Katedri za zaštitu šuma kao mlađi istraživač. Od 1993.-1997. radi kao asistent na predmetu Šumarska fitopatologija, a od 1997.-1998. kao viši asistent. U znanstveno-nastavno zvanje docent na predmetu Šumarska fitopatologija izabran je 1998., a 2003. ponovno je izabran u isto zvanje na predmetima Šumarska fitopatologija i Zaštita šuma na Šumarskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U znanstveno zvanje viši znanstveni suradnik izabran je 2005., a u znanstveno-nastavno zvanje izvanredni profesor 2007. godine. U znanstveno zvanje znanstveni savjetnik u znanstvenom području biotehničkih znanosti, polje šumarstvo, grana zaštita šuma izabran je 2009., a u znanstveno-nastavno zvanje redoviti profesor 2011. godine, te 2016. godine izabran je u trajno zvanje redovitog profesora. Nastavnik je na preddiplomskim, diplomskim i poslijediplomskim studijima Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, od 1999-2005. na 9 kolegija i od 2005. na 8 kolegija. Na poslijediplomskom studiju Gozdarstvo in obnovljivi gozdni viri, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, bio je sunositelj predmeta „Gozdna fitopatologija" u razdoblju akad. god. 2001/2002. do 2009/2010.

U razdoblju od 01. listopada do 25. prosinca 1995. boravi u Instituut voor Bosen Natuuronderzoek (IBN-DLO) Wageningen, Nizozemska (današnja Alterra). Tijekom znanstvenog i stručnog boravka savladava moderne laboratorijske metode u fitopatologiji i mikologiji, te radi na istraživanju gljive *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko et Sutton u okviru XVIII teme svoje doktorske disertacije. Bio je gost krajobraznog projektnog biroa Nieuwland

Advies iz Wageningena. U razdoblju od 23. rujna do 08. listopada 2001. je u sklopu COST akcije E12, Urban Forests and Trees, boravio u Instituto Madrileño de Investigacion Agraria y Amlimentaria (IMIA) u Madridu (Španjolska).

Bio je voditelj 8 nacionalnih znanstveno-istraživačkih projekta i suradnik na njih 10. Trenutno je suradnik na jednom nacionalnom znanstveno-istraživačkom projektu. Sudjelovao je u radu više međunarodnih i nacionalnih skupova u Europi i Hrvatskoj, od toga aktivno prezentiravši rezultate vlastitih ili timskih istraživanja na 18 međunarodnih znanstvenih skupova (20 priopćenja) i 24 nacionalna znanstvena skupa (31 priopćenja). Od akademske godine 2005./2006. do 2017./2018. voditelj je diplomskog studija Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2009. godine predstavnik je Republike Hrvatske u European Mycological Network (EMN).

Član je Povjerenstva za utvrđivanje kriterija i potvrdu izbora u zvanja Vijeća biotehničkog područja od listopada 2013., Predsjednik istoga povjerenstva od listopada 2017., te od iste godine i član Povjerenstva Senata Sveučilišta u Zagrebu, član je Povjerenstva Sveučilišta u Zagrebu za akademsko priznavanje inozemnih visokoškolskih kvalifikacija (IVK) od prosinca 2014. U akad. god. 2014./2015. i 2015./2016. obnaša dužnost Prodekana za međunarodnu suradnju Šumarskog fakulteta. Član je Akademije šumarskih znanosti (izvanredni član), Hrvatskog šumarskog društva, Hrvatskog društva biljne zaštite, British Mycological Society i European Mycological Network. Član je bio upravnih odbora dviju COST Akcija FP1102 DIAROD i FP1103 FRAXBACK do njihova završetka 2016. Kao član European Mycological Network (EMN) sudjelovao je 2009., 2011. i 2013. u izradi 18 protokola za dijagnosticiranje fitopatogenih gljiva u okviru European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) - Diagnostic Protocols for Fungi. Predstavnik je Republike Hrvatske u radnoj skupini Europske komisije, Directorate-General for the Environment, Working Group on Forests and Nature, od studenog 2019. godine.

Objavio je 56 znanstvenih radova i to: 23 rada iz skupine a1; 16 iz skupine a2; 3 rada iz skupine a3; te 14 radova koji nisu indeksirani u navedenim skupinama. Koautor je jednog sveučilišnog priručnika i pet znanstvenih knjiga. Aktivno se služi engleskim jezikom.

KAZALO KRATICA

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bloc	B locus nuklearna intergenska regija
BSA	Bovine Serum Albumin (serumski albumin protein)
CFU	Colony forming units
CLSM	Konfokalni laserski pretražni mikroskop
DABCO	1.4-diazabiciklo [2.2.2] oktan
DDT	Diklor-difenil-trikloretanom
DNA	Deoxyribonucleic Acid (deoksiribonukleinska kiselina)
FITC	Fluorescein izotiocijanat
GJ	Gospodarska jedinica
ITS	Internal Transcribed Spacer (unutarnja prijepisna razmaknica)
LD	Letalna doza
MEA	Malt Extract Agar
MPA	Malt Peptone Agar
MTSB	Microtubule Stabilizing Buffer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphate Buffer Saline (puferirana otopina fosfatnih soli)
PCR	Polymerase Chain Reaction (lančana reakcija polimerazom)
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Glucose Broth
PFA	Paraformaldehid
PRA	Pest Risk Analysis
RPB1	RNA polimeraza II najveća podjedinica
RPB2	RNA polimeraza II druga najveća podjedinica
RPM	Rounds per minute (okretaji po minuti)
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija
TEF	Translacijski elongacijski faktor
TEM	Transmisijska elektronska mikroskopija
UL	Ultra low

POPIS SLIKA

Slika 1. Proces infekcije entomopatogenim gljivama, razvoj bolesti, smrt kukca i redisperzija konidija 7

Slika 2. Rasprostranjenost borovog prelca u Europi; svijetlo sivo-trenutna prisutnost, tamno sivo-jaki napadi štetnika (preuzeto iz: Skrzecz i sur. 2020) 13

Slika 3. Širenje hrastove mrežaste stjenice u Europi (preuzeto iz: Csóka i sur. 2019) 15

Slika 4. A) sakupljanje uzoraka tla; B) priprema uzoraka za izolaciju entomopatogenih gljiva 22

Slika 5. Primjer razvijanja kolonija nakon 10 dana inkubacije 23

Slika 6. Primjer obrade i analize sekvence 24

Slika 7. Ispitivanje utjecaja insekticida na klijavost spora A) priprema otopina; B) inokulacija otopina na hranjivu podlogu; C) određivanje postotka proklijalih i neproklijalih konidija 26

Slika 8. Ispitivanje utjecaja insekticida na razvoj kultura A) priprema inokuluma; B) mjerenje radijalnog rasta gljive 27

Slika 9. Ispitivanje patogenosti izolata BBS na borovom prelcu A) primjer postavljanja pokusa-grupa D (E2CAD) u Pokusu 2; B) pipetiranje suspenzije na zadak gusjenice; C) pojava micelija gljive *B. bassiana* 30

Slika 10. Sakupljanje uzoraka mahovine A) način sakupljanja; B) pozicije sakupljanja uzoraka 37

Slika 11. A) i B) pregled sakupljene mahovine; C) nađene zaražene jedinke u mahovini 37

Slika 12. Priprema pokusa A) sadnice hrasta lužnjaka; B) suspenzije blastospora; C) filtriranje suspenzije 39

Slika 13. Potvrda vitaliteta spora *Beauveria brongniartii* 56 s Acridine orange bojilom: zelene blastospore- vitalne; crvene blastospore- mrtve A) prevladavanje vitalnih zelenih blastospora; B) prevladavanje mrtvih crvenih blastospora (epifluorescentni mikroskop) 40

Slika 14. Obrada uzoraka iglica A) površinska sterilizacija; B) nasađivanje na hranjivu podlogu 41

Slika 15. Obrada uzoraka lišća, korijenja i iglica A) uzorci korijenja hrasta lužnjaka; B) ugrađivanje u Steedmanov vosak; C) rezanje uzoraka u mikrotomu; D) apliciranje otopine sa *Beauveria* specifičnim antitijelima 43

Slika 16. Pregled obrađenih uzoraka pomoću CLSM konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa 43

Slika 17. Identificirane vrste *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* iz prirodno zaraženih kukaca na različitim lokacijama i tipovima šumskih zajednica u Hrvatskoj 44

Slika 18. *Beauveria pseudobassiana* A) i B) zaraženi adult *Corythucha arcuata*; C) kultura razvijena na PDA podlozi nakon 14 dana prednja strana; D) kultura razvijena na PDA podlozi nakon 14 dana stražnja strana; E) konidije; F), G) i H) konidije i konidiofori 45

Slika 19. *Beauveria bassiana* A) i B) zaraženi adult *Dendrolimus pini*; C) kultura razvijena na PDA podlozi nakon 14 dana- prednja strana; D) kultura razvijena na PDA podlozi nakon 14 dana- stražnja strana; E) konidije; F) i G) konidije i konidiofori 45

Slika 20. Filogenetsko stablo odabranih izolata i srodnih vrsta na temelju ITS and Bloc molekularnih markera 47

Slika 21. Udio identificiranih vrsta entomopatogenih gljiva u tlu po lokacijama 49

Slika 22. Ukupan udio identificiranih vrsta entomopatogenih gljiva u tlu na svim lokacijama 50

Slika 23. Grafički prikaz stope mortaliteta po tretmanima. Sive kolone (Bb) predstavljaju mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana* (mikozu), dok bijele kolone (m) u pozadini predstavljaju ukupan mortalitet 54

Slika 24. Tukey-ev test višestruke usporedbe razlika u brzinama ugibanja između tretmana sa intervalom pouzdanosti od 95%. Slovne oznake označavaju tretmane za koje je testom utvrđeno da temeljem razlika pripadaju određenoj grupi. Tretman koji nosi više slovnih oznaka temeljem testa nije mogao biti izdiferenciran između grupa čije slovne oznake nosi 56

Slika 25. Box-Whiskers dijagram brzina ugibanja po tretmanima. E1T20 tretman pokazuje najnižu srednju vrijednost i najmanje rasipanje podataka, a slijede ga tretmani E1T5 i E1T1, dok tretman E1T01 pokazuje najvišu vrijednost, čak i višu od kontrolnog tretmana. Simbol + predstavlja aritmetičku sredinu, središnja linija pravokutnika predstavlja medijanu, donja i gornja linija pravokutnika predstavljaju prvi (donji) i treći (gornji) kvartil, vodoravne linije na krajevima raspona predstavljaju standardnu devijaciju, dok ostali simboli predstavljaju vrijednosti koje odudaraju od statistički objašnjivih opservacija 57

Slika 26. Tukey-ev test višestruke usporedbe razlika u brzinama prestanka hranjenja između tretmana sa intervalom pouzdanosti od 95%. Slovne oznake označavaju tretmane za koje je testom utvrđeno da temeljem razlika pripadaju određenoj grupi. Tretman koji nosi više slovnih oznaka temeljem testa nije mogao biti izdiferenciran između grupa čije slovne oznake nosi 58

Slika 27. Box-Whiskers dijagram brzina prestanka hranjenja po tretmanima. E1T20 tretman pokazuje najnižu srednju vrijednost i najmanje rasipanje podataka, a slijede ga tretmani E1T5 i E1T1, dok tretman E1T01 pokazuje najvišu vrijednost, čak i višu od kontrolnog tretmana. Simbol + predstavlja aritmetičku sredinu, središnja linija pravokutnika predstavlja medijanu, donja i gornja linija pravokutnika predstavljaju prvi (donji) i treći (gornji) kvartil, vodoravne linije na krajevima raspona

predstavljaju standardnu devijaciju, dok ostali simboli predstavljaju vrijednosti koje odudaraju od statistički objašnjivih opservacija 59

Slika 28. Grafički prikaz stope mortaliteta po tretmanima. Sive kolone (Bb) predstavljaju mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana* (mikozu), dok bijele kolone (m) u pozadini predstavljaju ukupan mortalitet 60

Slika 29. Tukey-ev test višestruke usporedbe razlika u brzinama ugibanja između tretmana sa intervalom pouzdanosti od 95%. Slovne oznake označavaju tretmane za koje je testom utvrđeno da temeljem razlika pripadaju određenoj grupi 62

Slika 30. Box-Whiskers dijagram brzina ugibanja po tretmanima. E2C pokazuje najnižu srednju vrijednost, dok ostali tretmani pokazuju nešto višu vrijednost, a tretman E2BA ne odstupa značajnije od prve dvije skupine. Simbol + predstavlja aritmetičku sredinu, središnja linija pravokutnika predstavlja medijanu, donja i gornja linija pravokutnika predstavljaju prvi (donji) i treći (gornji) kvartil, dok vodoravne linije na krajevima raspona predstavljaju standardnu devijaciju 63

Slika 31. Grafički prikaz stope mortaliteta u tretmanu s temperaturom 16 °C. Tamno sive kolone predstavljaju ukupan mortalitet, dok svijetlo sive kolone predstavljaju mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana* 64

Slika 32. Grafički prikaz razvoja ukupnog mortaliteta (plava linija) i mikoze-mortaliteta uzrokovanog zarazom gljive *B. bassiana* (narančasta linija) kroz 28 dana u tretmanu s temperaturom od 16 °C 65

Slika 33. Usporedba kumulativnih mortaliteta jedinki *D. pini* u tretmanima s temperaturom 16 °C (n=49) i temperaturom 23 °C (n=48) kroz vrijeme. U oba tretmana korištena je koncentracija suspenzije spora *B. bassiana* od 5,6 x 10^4 spora/µl i doza od 20 µl po jedinki 66

Slika 34. Usporedba kumulativnog razvoja mikoze na jedinkama *D. pini* u tretmanima s temperaturom 16 °C (n=49) i temperaturom 23 °C (n=48) kroz vrijeme. U oba tretmana korištena je koncentracija suspenzije spora *B. bassiana* od 5,6 x 10^4 spora/µl i doza od 20 µl po jedinki 66

Slika 35. Grafički prikaz mortaliteta prezimljavajuće generacije u svakom tretmanu nakon 10 dana i pojava micelija gljive *B. bassiana* nakon 20 dana 67

Slika 36. Grafički prikaz mortaliteta prezimljavajuće i ljetne generacije i pojava micelija gljive *B. bassiana* kroz vrijeme 68

Slika 37. Grafički prikaz mortaliteta prezimljavajuće i ljetne generacije nakon 10 dana i pojava micelija gljive *B. bassiana* nakon 20 dana 68

Slika 38. Grafički prikaz stope mortaliteta hrastove mrežaste stjenice u tretmanima kroz vrijeme 69

Slika 39. Grafički prikaz stope mortaliteta hrastove mrežaste stjenice uzrokovanog zarazom gljive *B. pseudobassiana* u tretmanima kroz vrijeme 69

Slika 40. Zaraženi neciljani kukci (neidentificirana vrsta mrava i pipe) nađeni u mahovini nakon tretmana gljivom *B. pseudobassiana*..... 70

Slika 41. *Beauveria* sp. vizualizirana pomoću specifičnih imunofluorescentnih antitijela A) poprečni presjek hrastovog lista inokuliranog gljivom *B. bassiana*: proklijale spore i hife (strelica) na površini lista- nisu prisutne u mezofilu nego ostaju s vanjske strane epiderme; B) fini hrastovi korijenčići obavijeni hifama (strelica) gljive *B. brongniartii* (CLSM) 73

Slika 42. Kulture endofitskih gljiva dobivene iz iglica alepskog bora..... 73

POPIS TABLICA

Tablica 1. Prednosti i ograničenja u korištenju entomopatogenih gljiva u biološkoj kontroli 8

Tablica 2. Izolati gljiva dobiveni sa zaraženih kukaca odabrani za morfološke i molekularne analize 19

Tablica 3. Glavne morfološke karakteristike dvije prepoznate vrste *Beauveria* gljiva pronađenih na različitim kukcima domaćinima 46

Tablica 4. Identificirane vrste gljiva i gustoća njihovih kolonija (CFU g-1) u tlu po lokacijama uzorkovanja 48

Tablica 5. Klijavost spora (konidija) ispitivanih izolata nakon 24 h u različitim tretmanima; proklijale konidije (G), neproklijale konidije (N)..... 51

Tablica 6. Razvoj kultura ispitivanih izolata nakon 14 dana u različitim tretmanima; prosječna razvijenost u odnosu na kontrolu u postotku 52

Tablica 7. Apsolutne i relativne stope ukupnog mortaliteta i mortaliteta uzrokovanog zarazom gljive *B. bassiana* (mikoze) u tretmanima i odgovarajući rezultati Hi-kvadrat testa. Vrijednosti koje nisu statistički značajno različite od LD_{100} su istaknute podebljano, dok su vrijednosti za koje H0 ne može biti prihvaćena niti odbijena prikazane u kurzivu 54

Tablica 8. Deskriptivna statistika i rezultati parametarskih i neparametarskih testova razlika u brzini ugibanja između tretmana 55

Tablica 9. Rezultati višestruke usporedbe parova korištenjem Steel-Dwass-Critchlow-Flinger metode / Dvosmjerni test..... 56

Tablica 10. Deskriptivna statistika i rezultati parametarskih i neparametarskih testova razlika u brzini prestanka hranjenja između tretmana 58

Tablica 11. Rezultati višestruke usporedbe parova korištenjem Steel-Dwass-Critchlow-Flinger metode / Dvosmjerni test 59

Tablica 12. Apsolutne i relativne stope ukupnog mortaliteta i mortaliteta uzrokovanog zarazom gljive *B. bassiana* (mikoze) u tretmanima i odgovarajući rezultati Hi-kvadrat testa. Vrijednosti koje nisu statistički značajno različite od LD_{100} su istaknute podebljano..... 61

Tablica 13. Deskriptivna statistika i rezultati parametarskih i neparametarskih testova razlika u brzini ugibanja između tretmana 62

Tablica 14. Rezultati višestruke usporedbe parova korištenjem Steel-Dwass-Critchlow-Flinger metode / Dvosmjerni test 63

Tablica 15. Neciljani organizmi nađeni u mahovini nakon tretmana gljivom *B. pseudobassiana*..... 70

Tablica 16. Prezimljavajuća imaga hrastove mrežaste stjenice nađena u mahovini na različitih lokacijama na području Spačve; brojnost (n) i postotak (%) živih, mrtvih i zaraženih jedinki po 1 m^2 71

1. UVOD

Entomopatogene gljive su skupina filogenetski raznolikih eukariotskih heterotrofnih mikroorganizama koji su uzročnici bolesti na kukcima, a mogu imati važnu ulogu u njihovoj populacijskoj dinamici u prirodnim ekosustavima (Samson i sur. 1988, Wraight i sur. 2007). Prema dosadašnjim istraživanjima otprilike 80% bolesti koje se javljaju kod kukaca za uzročnika imaju patogene gljive. Gotovo na svakoj vrsti kukaca dolazi neka vrsta entomopatogenih gljiva, od kojih su neke smrtonosne (Batista 1989).

Najpoznatije i jedne od najistraživanijih uzročnika bolesti kukaca su entomopatogene gljive roda *Beauveria*. Prisutne su u kopnenim ekosustavima diljem svijeta (Bidochka i sur. 1998, Meyling i Eilenberg 2007), a osim što predstavljaju prirodne neprijatelje brojnim vrstama kukaca te su sposobne regulirati njihove populacije, mogu biti i antagonisti biljnih patogena, endofiti u biljkama, promotori biljnog rasta, te mogu štititi korijenski sustav biljaka od različitih štetnih kukaca u tlu (Jaber i Ownley 2018, Sánchez-Peña i sur. 2011, Vega i sur. 2009, Barra-Bucarei i sur. 2020). Do danas su zabilježene kao uzročnici bolesti na preko 700 vrsta u 15 različitih redova domaćina, uključujući redove Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Thysanoptera i Orthoptera u koje spadaju štetni kukci koji se komercijalno najviše suzbijaju (De Faria i Wraight 2007, Li 1988). Među domaćine spadaju ekonomski važne šumske i poljoprivredne vrste štetnih kukaca (Imoulan i Elmeziane 2013, Boomsma i sur. 2014, Wright i Lax 2016), kao i kukci vektori bolesti (Heinig i sur. 2015, Rehner i sur. 2011).

Iz roda *Beauveria* poznato je više vrsta, no dugo se govorilo uglavnom o vrsti *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (*Ascomycota, Hypocreales, Cordycipitaceae*), koja se već dugi niz godina koristi kao sredstvo biološke kontrole u svijetu. *Beauveria bassiana* je polifagna gljiva koja prirodno dolazi u tlu, no brojna provedena istraživanja pokazala su da ima sposobnost i endofitski kolonizirati biljke te je uspješno umjetno inokulirana ili se javlja prirodno u različitim biljnim vrstama (Wagner i Lewis 2000, Vidal i Jaber 2015, Kranjec 2017, Rondot i Reineke 2018).

Biološka kontrola definira se kao namjerno/ciljano korištenje živih organizama (prirodnih neprijatelja) radi suzbijanja štetnih organizama (Vincent i sur. 2007). Uporaba entomopatogenih gljiva u biološkoj kontroli dobiva sve veću važnost, a od 1960-ih brojni

proizvodi na bazi entomopatogenih gljiva formulirani su, proizvedeni i uspješno korišteni (Faria i Wraight 2007). Prema podacima iz 2007 na svjetskom tržištu registriran je ukupno 171 proizvod za komercijalnu upotrebu, od čega je gotovo 40 % tih proizvoda na bazi *Beauveria* spp., od toga 33.9% na bazi gljive *B. bassiana* (Faria i Wraight 2007). U međuvremenu su neki proizvodi povučeni s tržišta a pojavili su se novi, te posljednji podaci iz literature pokazuju da je na svjetskom tržištu trenutno dostupno 59 komercijalnih proizvoda na bazi gljive *B. bassiana* (Mascarin i Jaronski 2016), u što nije uključeno indijsko tržite na kojemu postoje dostupni proizvodi, no nažalost nedostaju potpuni i relevantni podatci (https://dir.indiamart.com/search.mp?ss=beauveria). Također, u brojnim zemljama ti proizvodi još uvijek nisu dostupni, a zbog ograničenog tržišta, visokih troškova proizvodnje te nedovoljno reguliranog zakonodavnog i političkog okvira razvoj, registracija i sama implementacija takvih proizvoda uvelike je otežana.

Dosadašnja praktična primjena ovih gljiva u biološkoj kontroli bila je usmjerena više prema poljoprivrednim štetnicima, no postoje i primjeri gdje je uspješno korištena za suzbijanje štetnih kukaca u šumama (npr. Pan i Zheng 1988, Keller i sur. 1997, Strasser 1999). Zbog sve većeg postrožavanja mjera uporabe kemijskih sredstava u šumarstvu, i sve učestalijeg okretanja biološkim metodama suzbijanja štetnih organizama, otkrivanje novih vrsta i sojeva entomopatogenih gljiva i istraživanje metoda njihove primjene predstavlja velik potencijal za biološku kontrolu različitih ekonomski važnih i/ili invazivnih vrsta šumskih štetnika. Kako u svijetu, tako i u Hrvatskoj je to još uvijek relativno nepoznato područje koje treba istražiti i pronaći mogućnosti za njegovo uključivanje kao komponente u integriranom pristupu zaštite šuma.

U nastavku se daju osnovna dosadašnja saznanja o entomopatogenim gljivama, o biologiji i ekologiji gljiva roda *Beauveria*, taksonomiji, endofitizmu, te o njihovoj dosadašnjoj praktičnoj primjeni u biološkoj kontroli.

1.1. Entomopatogene gljive: klasifikacija, distribucija i uloga u prirodnim ekosustavima

Pripadnici carstva Gljiva (Fungi) naseljavaju gotovo sve kopnene i vodene ekosustave na svijetu, a od procijenjenih 1.5- 5.1 milijuna i opisanih otprilike 100 000 vrsta, njih oko 750-1000 pripada entomopatogenim gljivama smještenima u preko 100 rodova (Roberts i Humber 1981, McCoy i sur. 1988, St. Leger i Wang 2010). S obzirom na komplekse kriptičnih vrsta kod brojnih skupina gljiva, a zahvaljujući razvoju molekularno-filogenetskih analiza neprestano se otkrivaju nove vrste (Bickford i sur. 2007, Humber 2017).

Većina poznatih i važnih entomopatogenih gljiva pripada ili redu *Hypocreales* (odjel *Ascomycota*) ili redu *Entomophthorales* (odjel *Entomophthoromycota*), a velik broj njih predstavlja vrijedan potencijal za biološku kontrolu štetnih organizama (Hajek 1997, Roy i sur. 2010). Pripadnici reda *Hypocreales* su oportunistički patogeni i specijalisti u seksualnom (teleomorfnom) stadiju, dok su u aseksualnom (anamorfnom) stadiju generalisti. Drugi važan red *Entomophthorales* se razlikuje od *Hypocreales* po tome što su oba stadija specijalisti i uglavnom obligatorni patogeni te za letalni učinak ne koriste toksine, već samo koloniziraju tkivo domaćina (Balazy 1993, Charnley i Collins 2007).

Uspješnost procesa zaraze entomopatogenim gljivama ovisi o kombinaciji različitih faktora kao što su uvjeti okoliša (temperatura, vlaga, sunčevo zračenje, vjetar) i biologija samog domaćina, te se vrste entomopatogenih gljiva, a ponekad i izolati unutar jedne vrste mogu ponašati sasvim drugačije. Primjerice, broj domaćina, virulentnost, klijavost te optimalna temperatura za rast i sporulaciju može se razlikovati između vrsta i izolata (Pell i sur. 2001, Shaw i sur. 2002). Za početak samog procesa zaraze odgovorne su aseksualne spore (konidije) koje su raspršene u okolini u kojoj su prisutni domaćini (Samson i sur. 1988).

Sve veći broj nedavnih studija pokazuje da entomopatogene gljive reda *Hypocreales* imaju i dodatne uloge u prirodi, uključujući endofitizam, antagonizam biljnih bolesti, poticanje biljnog rasta i kolonizacija rizosfere u korist korijenovog sustava biljaka. Takve dodatne, iako još uvijek nedovoljno istražene korisne ekološke funkcije ovih gljiva šire mogućnosti njihove upotrebe u integriranom upravljanju štetnim organizmima, te one kao biološki preparati dobivaju sve veću važnost (Vega i sur. 2009, Lacey i sur. 2015).

1.2. *Beauveria* spp.

1.2.1. Otkrivanje, taksonomija, morfološka i molekularna identifikacija

Proučavanje gljiva roda *Beauveria* započelo je još 1800-ih kada se na farmama dudovog svilca (*Bombyx mori* L.) u Francuskoj i Italiji počela pojavljivati bolest koja je periodički pogađala ovu vrstu kukaca i tako ugrožavala industriju proizvodnje svile. Agostino Bassi di Lodi (1773-1856) je svojim dugogodišnjim istraživanjem potvrdio da je uzročnik bolesti dudovog svilca mikroorganizam (Bassi 1835, 1836, Porter 1973), entomopatogena gljiva čiji je tip vrste prvi predložio Balsamo-Crivelli (1835a, 1835b), nazvavši ju njemu u čast *Botrytis bassiana* Bals.-Criv. (Steinhaus 1949). Početkom 20-tog stoljeća kada je rod *Beauveria* i službeno opisan (Vuillemin 1912), ova vrsta dobiva ime *Beauveria bassiana* Bals. (Vuill.) sensu lato kao priznanje Jeanu Beauverieu (1874-1938) koji je dao veliki doprinos utemeljenju i istraživanju tog roda (Steinhaus 1949, Rehner 2005).

Prema posljednjoj klasifikaciji Nacionalnog centra za biotehnološke informacije (NCBI) temeljenoj na molekularnim filogenetskim analizama iz 2008. dokazano je da rod *Beauveria* pripada odjelu *Ascomycota*, razredu *Sordariomycetes*, redu *Hypocreales* i porodici *Cordycipitaceae* (Kirk i sur. 2008). Dugo vremena gljive roda *Beauveria* smatrale su se aseksualnom (anamorfnom) skupinom gljiva, no razvitkom molekularnih istraživanja i filogenetskih analiza otkriven je i njihov seksualni (teleomorfni) stadij. Premda *Beauveria* teleomorfe rijetko nalazimo u prirodi, i to uglavnom opisane u nekim istočnoazijskim zemljama, nedavnim istraživanjima potvrđena je filogenetska veza između *Beauveria* anamorfa i *Cordyceps* teleomorfa (Rehner i Buckley 2005, Sung i sur. 2007, Shrestha i sur. 2014).

Na razini roda *Beauveria* može biti lako identificirana prema svojim morfološkim karakteristikama, no unutar samog roda prema obliku i veličini konidija kao i izgledu kulture uglavnom je teško uočiti razliku između samih vrsta, posebice jer i one vrste koje su filogenetski udaljene mogu imati iste morfološke karakteristike (Rehner i sur. 2006, 2011). Iz tog razloga, dugo vremena govorilo se samo o tri vrste, *B. bassiana*, *B. brongniartii* i *B. album* (De Hoog 1972), a taksonomija roda *Beauveria* nije dodatno istraživana (Rehner i sur. 2011). Do promjene je došlo 1980-ih kada je otkrivena lančana reakcija polimerazom (PCR) i molekularna identifikacija vrsta analizom DNA sekvenci postala široko prihvaćena metoda

(Atkins i Clark 2004). Od 1990-ih ova metoda intenzivno se koristi i za entomopatogene gljive (Imoulan i sur. 2017). Osim identifikacije brojnih novih vrsta unutar roda *Beauveria*, važno je bilo i otkriće postojanja velikog broja kriptičnih vrsta koje je prije bilo nemoguće identificirati. S obzirom da se još uvijek redovno otkrivaju, taj broj neprestano raste (Rehner i Buckley 2005, Rehner i sur. 2011). Na stranici Index Fungorum (www.indexfungorum.org; zadnji pristup 04. listopad 2020) do sada je upisano 70 vrsta iz roda *Beauveria*.

Morfološka identifikacija *Beauveria* sp. vrsta obuhvaća izgled konidiofora i konidiogenih stanica, veličinu i oblik konidija (spora), te morfologiju kolonija (kultura). Konidiofori se uobičajeno sastoje od gustih nakupina simpodijalnih, kratkih konidiogenih stanica, okruglog ili kruškolikog izgleda pri bazi s nazubljenim drškom na vrhu, karakterističnog cik-cak izgleda. Konidije su jednostanične, sesilne, hijalinske, holoblastične, brojne i mogu biti različitih oblika, od okruglih, okruglasto-sferičnih, elipsoidnih do cilindričnih. Kulture su najčešće spororastuće, pahuljaste, rijetko formiraju sinemate, bijele ili žućkaste boje, ponekad i nježno ružičaste. Zračne hife hijalinske, glatkih i tankih stijenki, labave, ponekad nakupljene u snopovima. Starije kulture postaju praškaste zbog velikog broja razvijenih konidija (De Hoog 1972, Rehner 2005, Rehner i sur. 2011).

Neke *Beauveria* vrste ili sojevi proizvode specifične sekundarne metabolite (toksine) koji mogu mijenjati boju hranjive podloge na kojoj rastu, primjerice crveni dibenzokinon oosporein (De Hoog 1972, Strasser i sur. 2000) i žuti 2-piridon tenelin i bassianin (Wat i sur. 1977) koje proizvodi vrsta *B. bassiana*.

Od 1990-ih, ITS (interni transkripcijski spacer) bio je najčešće korišten genetski marker u molekularnoj taksonomiji i identifikaciji gljiva prvenstveno zbog jednostavne amplifikacije ITS-nrDNA regije kod svih rodova gljiva (White i sur. 1990, Schoch i sur. 2012, Kõljalg i sur. 2013), te je dobar za prvi korak determinacije, no za mnoge grupe gljiva pa tako i većinu vrsta roda *Beauveria* to nije dovoljno za razlikovanje vrsta, posebno onih usko povezanih (Atkins i Clark 2004, Rehner i Buckley 2005, Imoulan i sur. 2016a, 2016b). Iz tog razloga, za točno razgraničavanje između vrsta posljednjih godina koriste se i drugi filogenetski markeri kao što su translacijski elongacijski faktor-1 alfa (TEF), Bloc nuklearna intergenska regija (Bloc), RNA polimeraza II najveća podjedinica (RPB1) i RNA polimeraza II druga najveća podjedinica (RPB2), koji pouzdano mogu odrediti granice unutar kompleksa vrsta (Sung i sur. 2007, Rehner i sur. 2006, Rehner i sur. 2011).

1.2.2. Biologija, ekologija i proces infekcije kukca

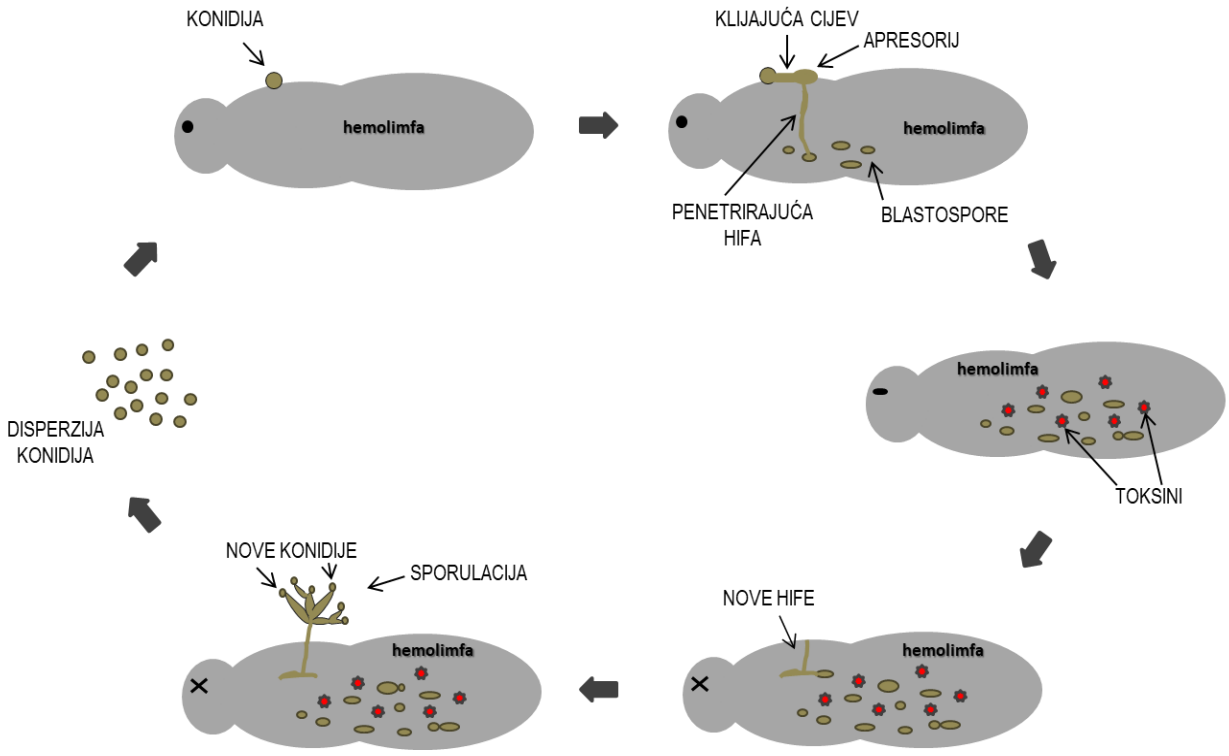
Gljive roda *Beuveria* mogu imati multifunkcionalni životni stil u različitim okruženjima uključujući tlo, biljke i kukce. U tlu preživljavaju u obliku saprotrofnog micelija ili kao mirujuće (neaktivne) propagule sve dok ne nađu pogodnog domaćina u svojoj mikro-okolini ili se endofitski povežu s biljkama (Goettel i sur. 2005, Bruck 2010, Roy i sur. 2010, Behie i sur. 2015).

Njihove pojave u obliku infekcija u kukcima su vjerojatno jedini dio njihovog životnog ciklusa u kojem one mogu značajno povećati svoje populacije producirajući ogroman broj konidija (Meyling i Eilenberg 2007).

Za razliku od drugih patogenih mikroorganizama na kukcima kao što su bakterije, virusi i mikrosporidije koji u domaćina ulaze i vrše zarazu preko probavnog trakta, entomopatogene gljive to uglavnom čine direktnim prodiranjem kroz kutikulu (Evans i Hywel-Jones 1997) (Slika 1).

Enzimi poput hitinaze, proteaze i lipaze tu imaju važnu ulogu jer razgrađuju kutikulu kako bi omogućili ulazak gljive u domaćina. Nakon prianjanja na površinu tijela kukca u povoljnim uvjetima spore (konidije) klijaju (formiraju penetrirajuće strukture tzv. klijajuće cijevi- 'germ tubes' i apresorije), te kombinacijom enzimatske aktivnosti i mehaničkog pritiska ulaze u unutrašnjost kukca (Ortiz-Urquiza i Keyhani 2013) (Slika 1). Iz apresorija izlaze penetrirajuće hife koje svojim rastom dolaze do hemocela gdje klijaju u nove vegetativne jednostanične strukture zvane blastospore, koje koloniziraju unutrašnje tkivo i uzimaju hranjive tvari za svoj brzi rast i reprodukciju (Humber 2008). Kao i mnoge druge entomopatogene gljive *Beauveria* sp. vrste proizvode sekundarne metabolite, odnosno toksine (primjerice beauvericin, bassianolid i oosporein) koji svojim insekticidnim djelovanjem slabe imunološki sustav domaćina, što u kombinaciji s fizičkim razaranjem tkiva i crpljenjem hranjivih tvari remeti fiziološke procese u tijelu kukca te može dovesti do prestanka hranjenja, pada težine, neplodnosti, različitih malformacija i promjena u ponašanju, te naposljetku ugibanja (Müller-Kögler 1965, Ortiz-Urquiza i sur. 2010, Gibson i sur. 2014). Inkubacijski period ovisi o domaćinu i njegovom razvojnom stadiju, soju gljive i njegovoj virulentnosti, te temperaturi. Ubrzo nakon smrti hife izlaze iz kukca i u povoljnim okolišnim uvjetima (prvenstveno vlage)

produciraju spore (zračne konidije) koje se dalje prenose vjetrom, kišom i drugim abiotičkim i biotičkim faktorima (Slika 1). U veoma suhim uvjetima, gljiva može opstati u obliku hifa unutar kadavera dok se ne stvore povoljni uvjeti za njezin izlazak (Inglis i sur. 2001, Zimmermann 2007).



Slika 1. Proces infekcije entomopatogenim gljivama, razvoj bolesti, smrt kukca i redisperzija konidija

1.2.3. Praktična primjena entomopatogenih gljiva u biološkoj kontroli

Postoje tri glavne kategorije biološke kontrole: klasična, augmentativna (inundativna) i konzervacijska. U klasičnoj biološkoj kontroli živi organizmi unose se kao prirodni neprijatelji ili kompetitori u područje u kojem nisu prije obitavali, a cilj je osigurati dugoročnu i samoodrživu kontrolu ciljanih štetnika, koji također najčešće nisu autohtoni u tom ekosustavu. U augmentativnoj biološkoj kontroli živi organizmi se periodički unose u

područje u količinama koje su dovoljne za barem privremeno suzbijanje populacija štetnika, te se tretmani obično ponavljaju kao i kod primjene pesticida. Konzervacijska biološka kontrola koristi žive organizme koji su već prisutni u određenom području za suzbijanje i kontrolu ciljanih štetnika u tom području (Lazarovits i sur. 2007). Ona predstavlja strategiju biološke kontrole u kojoj je poboljšavanje uvjeta života određenim prirodnim neprijateljima, kao i očuvanje ili povećanje njihovih populacija dio upravljačke prakse (Barbosa 1998, Eilenberg i sur. 2001).

Entomopatogene gljive kao prirodni neprijatelji brojnih štetnih kukaca imaju određene karakteristike koje ih za primjenu u biološkoj kontroli čine prikladnom alternativom kemijskim insekticidima, ili barem dodatkom u integriranom pristupu zaštite šuma. Prednosti i ograničenja u korištenju entomopatogenih gljiva prikazana su u Tablici 1 (Goettel i sur. 1990, Strasser i sur. 2000, Shah i Pell 2003, O'Callaghan i Brownbridge 2009, Garrido-Jurado i sur. 2011, Maina i sur. 2018).

Tablica 1. Prednosti i ograničenja u korištenju entomopatogenih gljiva u biološkoj kontroli

PREDNOSTI	OGRANIČENJA
Ne utječu štetno na okoliš, a pomažu očuvanju bioraznolikosti ekosustava kojim se upravlja	Za svoje djelovanje trebaju određene povoljne okolišne uvjete
Nisu toksične za ljude* i druge žive organizme, kao ni za većinu korisnih kukaca (pčele, prirodne neprijatelje) i drugih korisnih organizama (primjerice gliste u tlu itd.)	Još uvijek je proizvodnja za komercijalnu upotrebu skuplja od proizvodnje kemijskih insekticida
Mogu smanjiti upotrebu sintetičkih kemijskih insekticida	Imaju kratak rok trajanja (životni vijek spora)
Mogu se koristiti u kombinaciji sa sintetičkim kemijskim insekticidima	Da bi se tretiralo štetnik mora biti prisutan u području- preventiva tretiranja gotovo nemoguća
U povoljnim okolišnim uvjetima su dugoročno samoodržive	Nakon tretiranja imaju sporije djelovanje od kemijskih insekticida
Za razliku od kemijskih insekticida kukci rjeđe i sporije razvijaju otpornost na njihovo djelovanje	Tretiranja moraju biti obilna i temeljita

*u vrlo rijetkim slučajevima su zabilježene alergije i infekcije tkiva kod pojedinaca s vrlo oslabljenim imunološkim sustavom (Henke i sur. 2002, Tucker i sur. 2004, Westwood i sur. 2005)

Prvi pokušaj biološkog suzbijanja nekog štetnika entomopatogenim gljivama u prirodi provedeno je 1888. u Rusiji (nekadašnji SSSR), kada je tretirana repina pipa (*Cleonus punctiventris* Germar) gljivom *Metarhizium anisopliae* (Metschn.), zahvaljujući mikrobiologu (dobitniku Nobelove nagrade) Elieu Metchnikoffu (1845-1916), koji je još 1870-ih počeo provoditi istraživanja te gljive i predložio koncept suzbijanja ovog štetnika konidijama proizvedenima na sterilnoj pivskoj kaši (Metchnikoff 1880, Steinhaus 1975). Njegov rad nastavio je Krassilstschik, koji je osnovao pogon za masovnu proizvodnju koristeći pivsku kašu za proizvodnju znatne količine konidija za daljnju distribuciju (Krassilstschik 1888).

U SAD-u su 1880-tih i 1890-tih zabilježeni pokušaji povećanja prirodnog inokuluma entomopatogene gljive, danas poznate pod nazivom *B. bassiana*, sporulirajućim kadaverima kukca *Blissus leucopterus* (Say), štetnika iz reda polukrilaca (Hemiptera) (Billings i Glenn 1911). Primjer primjene gljive *B. bassiana* u širokim razmjerima zabilježen je u kasnim 1980-ima u Kini, gdje je masovna proizvodnja konidija od oko 10 000 t godišnje omogućila tretiranje oko 0,8–1,3 milijuna ha šumskih i poljoprivrednih površina (Feng i sur. 1994). Glavni šumski štetnici u Kini su borovi prelci (*Dendrolimus* spp.), a masovna primjena gljive *B. bassiana* u uljnim ili uljno-emulzijskim pripravcima omogućila je vrlo učinkovito suzbijanje gusjenica ovih vrsta. Tijekom petogodišnjeg razdoblja nad više od 300 000 ha šuma na 14 različitih lokacija provedena su aviotretiranja, što je rezultiralo mortalitetom u rasponu od 43 do 93% zabilježenim u tom razdoblju (Pan i Zheng 1988).

U Austriji, Italiji i Švicarskoj testirani su brojni pripravci na bazi entomopatogene gljive *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (*Deuteromycotina, Hyphomycetes*) na područjima gdje obični hrušt (*Melolontha melolontha* L.) radi velike štete (Keller i sur. 1997, Strasser 1999), a tretiranje manjih površina uz rubove šuma s ciljem da ženke koje odlažu jaja posluže kao vektori gljive pokazalo se vrlo uspješnim. Zahvaljujući ženkama spore gljiva raširene su na područje 50 puta veće od tretiranog, što je u konačnici dovelo do redukcije populacije tog štetnika za 50-80% na 2/3 od ukupno 15 ciljanih lokacija (Keller i sur. 1997). Također, korištena je i metoda primjene gljive *B. brongniartii* uzgojene na zrnima ječma inkorporacijom inokuluma u tlo na dubini 5-10 cm na različitim površinama kao što su pašnjaci, travnjaci, sportski tereni, voćnjaci, šume, rasadnici i vinogradi, a rezultati terenskih ispitivanja provedenih između 1995. i 1999. pokazali su uspješnost u suzbijanju populacija *M. melolontha* samo 2 godine nakon primjene (> 20% raširenost mikoze), a populacija je smanjena s više od 70 ličinki po m^2 na manje od 22 ličinke po m^2 nakon 5 godina (Strasser 1999). Korištenje gljive *B. bassiana* u obliku močivog praha pokazalo se korisnim prilikom

tretiranja štetnih štitastih moljaca (bijelih mušica) koji se uobičajeno pojavljuju na donjoj strani lišća poljoprivrednih kultura, te su takva tretiranja usmjerena od ispod lisnog pokrova prema gore bila vrlo uspješna, reducirajući populaciju tog štetnog kukca za 65–75% (Wraight i sur. 2000)

Nakon što je 1965. u SSSR-u na tržište stavljen biološki preparat Boverin na bazi gljive *B. bassiana* (proizveden za tretiranje krumpirove zlatice i jabukovog savijača), uspješno je tretiran velik broj poljoprivrednih štetnika, te su formulirani brojni drugi preparati na bazi entomopatogenih gljiva za kontrolu različitih štetnih kukaca diljem svijeta, koji su u zadnjem desetljeću zauzeli drugo mjesto (nakon proizvoda na bazi bakterije *Bacillus thuringiensis*) na globalnom tržištu biopesticida s 27 % udjela, sa tendencijom povećanja (Kabaluk i sur. 2010, Maina i sur. 2018). *Beauveria bassiana* (Boverin) je također uspješno korištena i u kombinaciji s kemijskim insekticidima, primjerice diklor-difenil-trikloretanom (DDT) u subletalnim dozama (Ferron 1978) ili prirodnim insekticidima kao što su oni na bazi Neem-a (Islam i sur. 2010), te u kombinaciji s bakterijom *B. thuringiensis* (Drummond i Groden 1996, Wraight i Ramos 2005), što predstavlja dobar primjer njezinih uključivanja u integriranu zaštitu od štetnih organizama.

Dosadašnja istraživanja u Hrvatskoj uključivala su analizu prisutnosti gljive *B. bassiana* u populaciji jelovih potkornjaka te njezin utjecaj na redukciju populacije vrsta iz roda *Pityokteines*, gdje je utvrđen relativno visok mortalitet potkornjaka uzrokovan zarazom ove gljive (Pernek 2007). Također, u pokusima tretiranja imaga jasenove pipe, *Stereonychus fraxini* Deg. (Coleoptera, Curculionidae) sporama ove gljive potvrđena je njezina visoka efikasnost u laboratorijskim uvjetima (Lacković i Pernek 2012).

Masovna produkcija ovih gljiva za biološko suzbijanje štetnih kukaca je proces stvaranja velikog broja infektivnih propagula, a iziskuje detaljne prethodne laboratorijske analize (biološke testove) kojima se ispituje potencijalna efikasnost (virulentnost) izolata i njegov potencijal da formira stabilne propagule prilagođene željenoj metodi aplikacije, koje su okolišno i toksikološki prihvatljive, te su sposobne održati se u okolišnim i ekološkim uvjetima u kojima se nalazi ciljani organizam (Jackson i sur. 2010). Infektivne propagule kao što su konidije ili blastospore mogu biti masovno proizvedene kroz procese fermentacije. Fermentacija na čvrstim supstratima (eng. solid-state fermentation) uključuje proizvodnju konidija na sterilnom krutom hranjivom supstratu (analogno površini tijela kukca) kao što je riža, ječam, raž, pšenica, proso ili kukuruz, dok se tekućom fermentacijom (eng. submerged

liquid fermentation) proizvode blastospore u hranjivom tekućem supstratu (analogno hemocelu kukca). Iako je dokazano da blastospore klijaju i vrše zarazu kukca brže od konidija, što ih zbog bržeg djelovanja i kraće izloženosti nepovoljnim uvjetima okoliša (sunčevo zračenje, manjak vlage) ponekad čini boljim izborom, u praksi se puno češće proizvode i upotrebljavaju konidije te se gotovo 90 % bioloških preparata na bazi entomopatogenih gljiva sastoji od konidija proizvedenih fermentacijom na čvrstom supstratu. One bolje podnose proces skladištenja, te imaju duži životni vijek i bolju perzistentnost nakon aplikacije u prirodnim uvjetima, što predstavlja potencijalan dodatni izvor zaraze (sekundarni inokulum- primjerice horizontalnim prijenosom ili kretanjem kukca po tretiranoj površini) čime se povećava krajnji efekt. Proizvodi na bazi *Beauveria* gljiva mogu doći u tekućim (voda, ulje ili emulzije) i čvrstim (močivi prah, granule ili prašivo) formulacijama (Jaronski i Mascarin 2016, 2017).

1.2.4. Uloga Beauveria sp. kao endofita

Endofitske gljive su mikroorganizmi koji cijeli ili dio svog životnog ciklusa provode u zdravom biljnom tkivu, ne uzrokujući vidljive simptome bolesti. U endofite spada više funkcionalnih skupina kao što su latentni patogeni, latentni saprotrofi, mutualistički simbionti i komenzalisti (De Bary 1884, Wilson 1995, Vega i sur. 2008). Neke endofitske gljive mogu štititi biljku domaćina od različitih štetnih kukaca i bolesti proizvodnjom određenih toksičnih spojeva (Saikkonen i sur. 2010) ili mijenjanjem obrambenog odgovora biljke i stvaranjem otpornosti (McKinnon i sur. 2017).

Brojna provedena istraživanja u posljednjih 30 godina pokazala su da gljive roda *Beauveria* imaju dobar potencijal u biološkoj kontroli kao endofiti u biljkama, koji ih koloniziranjem biljnog tkiva štite od napada štetnih kukaca, a da pritom ne utječu negativno na samu biljku (npr. Vega 2008, Vega i sur. 2009, Vidal i Jaber 2015).

Prva takva istraživanja provedena su na kukuruzu (*Zea mays* L.) gdje je pokazano kako gljiva *B. bassiana* nakon tretiranja može kolonizirati biljke i tako posljedično reducirati populaciju štetnog kukuruznog moljca (*Ostrinia nubilalis* Hübner) (Bing i Lewis 1991, Wagner i Lewis 2000). Nakon toga velik broj istraživanja usmjerio se prema detekciji ovih gljiva u biljkama, njihovom utjecaju na štetne kukce, umjetnim inokulacijama (nadzemnih i podzemnih biljnih organa), te se jedan manji broj istraživanja usmjerio na sam proces kolonizacije, održivosti

gljive u biljci i njenom utjecaju na rast i razvoj biljke (Wagner i Lewis 2000, Vega 2008, Quesada-Moraga i sur. 2014, Jaber i Enkerli 2017, Kranjec 2017).

Kako i da li će uspjeti endofitska kolonizacija gljive *B. bassiana* ovisi o inokulacijskoj metodi, odabranom izolatu gljive i vrsti biljke domaćina (Russo i sur. 2015), kao i o metodi detekcije gljive (McKinnon i sur. 2017). Da bi se ispitao endofitski potencijal gljive i njezina moguća funkcionalna uloga najvažniji korak je pravilna i točna detekcija gljive unutar biljke, odnosno identifikacija samog procesa kolonizacije biljnog tkiva. Za detekciju endofitskih gljiva koriste se različite metode kao što su direktna izolacija iz biljnog tkiva na hranjivu podlogu, molekularna detekcija DNA iz biljnog materijala pomoću PCR-a, te manje popularna histološka mikroskopija. Kod prve metode problem može predstavljati pojava drugih „dominantnijih" endofitskih gljiva, čak i na selektivnoj podlozi, dok se kod molekularne detekcije pomoću PCR-a zadržavanje ostataka DNA inokuluma na površini biljnih organa, čak i nakon površinske sterilizacije mora uzeti u obzir, stoga kombiniranje ovih dviju metoda može dati bolje i točnije podatke. Histološka mikroskopija uključuje transmisijsku (TEM) i skenirajuću (SEM) elektronsku mikroskopiju, te fluorescentnu i konfokalnu mikroskopiju, kojima se lociranjem i vizualiziranjem endofita u biljnom tkivu daje bolji uvid u aktivnost endofitskih gljiva, njihov rast i proces kolonizacije (McKinnon i sur. 2017). Zbog svoje dugotrajnosti i vremena koje se mora uložiti za provedbu, ova metoda se rjeđe koristi, no ona je ipak najbolja i najpouzdanija za detekciju endofita u biljkama (Schulz i Boyle 2005, Ullrich i sur. 2017).

1.3. Štetni kukci korišteni u istraživanju

Za ovo istraživanje i provedbu pokusa kao modelni organizmi (u daljnjem tekstu ciljani štetni organizmi) odabrani su borov prelac *Dendrolimus pini* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae) i hrastova mrežasta stjenica *Corythucha arcuata* (Say) (Hemiptera: Tingidae). To su štetni kukci koji su posljednjih godina aktualni kako u Hrvatskoj tako i u Europi (Csóka i sur. 2019, Skrzecz i sur. 2020), a za čije suzbijanje i kontrolu područje zaštite šuma za sada nema adekvatne odgovore. Također, kod oba organizma nađeni su razvojni stadiji prekriveni micelijem gljiva za koje se kasnije utvrdilo da između ostalog pripadaju i različitim vrstama entomopatogenih gljiva roda *Beauveria*, što je odredilo daljnji tijek ovog istraživanja. Kod borovih prelaca koji su holometabolni kukci to je bio razvojni stadij ličinke (gusjenice), dok je kod hrastove mrežaste stjenice koja je hemimetabolna vrsta to bio razvojni stadij imaga.

1.3.1. Borov prelac (Dendrolimus pini)

Borov prelac *Dendrolimus pini* L. (Lepidoptera: Lasiocampidae) je uobičajen i široko rasprostranjen štetnik u Europi (Sierpińska 1998, Björkman i sur. 2013) čije se gusjenice hrane prvenstveno iglicama običnog bora (*Pinus sylvestris* L.), ali može raditi štete i na drugim vrstama bora (Ray i sur. 2016). Nakon ljetnog brsta, gusjenice se spuštaju na tlo u šumsku stelju gdje prezimljavaju, a odande izlaze u proljeće, te se penju ponovno u krošnju na brštenje. Proljetni brst je opasniji jer su gusjenice u ovoj fazi mnogo veće i konzumiraju veću količinu hrane, te mogu potpuno obrstiti nove iglice koje su tek potjerale, kao i dijelove zelenih izbojaka. Time se znatno oslabljuje vitalitet domaćina, a posljedica je umiranje stabala ili napad sekundarnog štetnika (Sierpińska 1998, Moore i sur. 2017). Borov prelac pojavljuje se na području od zapadne Europe do srednje Azije (Kine i Rusije) a zabilježen je i u Sjevernoj Africi. Najjači i najčešći napadi zabilježeni su u šumama središnje i istočne Europe (Slika 2).

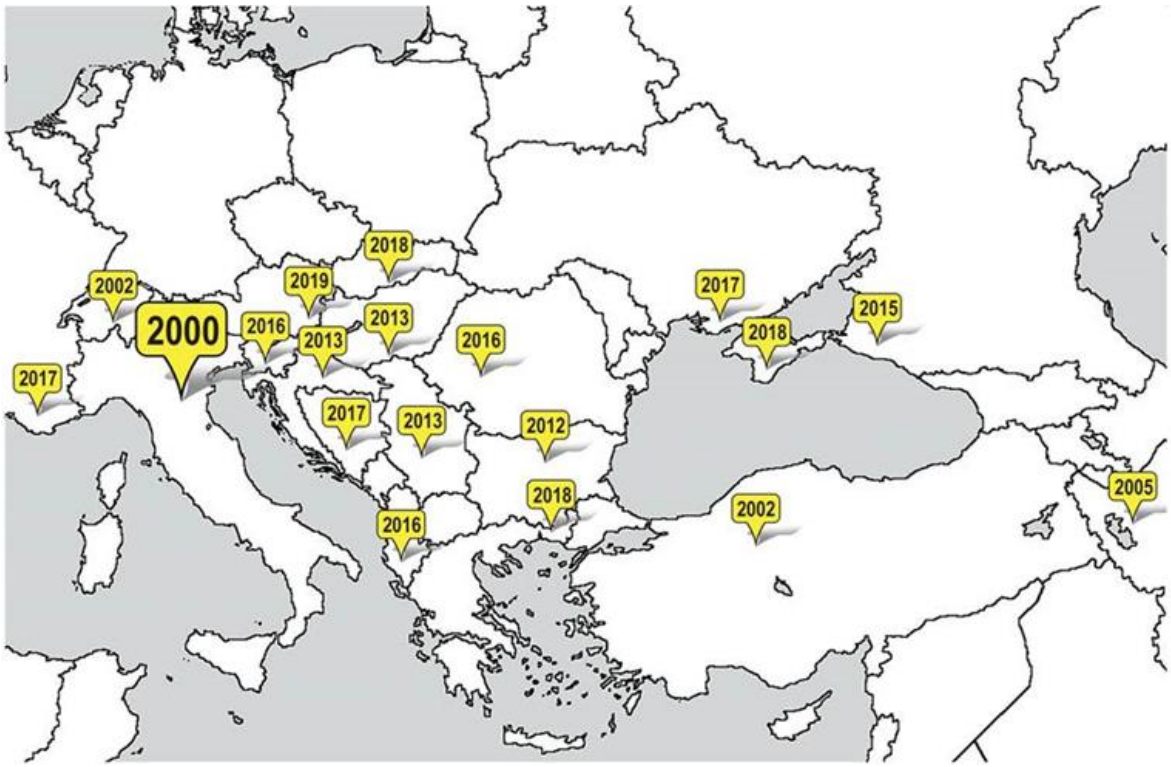


Slika 2. Rasprostranjenost borovog prelca u Europi; svijetlo sivo-trenutna prisutnost, tamno sivo-jaki napadi štetnika (preuzeto iz: Skrzecz i sur. 2020)

Ova vrsta masovno se pojavljuje ciklički i može raditi ozbiljne štete u borovim šumama na širokom području. U zadnjih 30 godina zabilježeni su češći i intenzivniji napadi u Europi, a pretpostavlja se da su uzrok tome klimatske promjene obilježene porastom prosječnih temperatura, smanjenjem padalina te produljenjem vegetacijske sezone (Skrzecz i sur. 2020). Iako se u Hrvatskoj spominje samo kao štetnik kontinentalnih borova gdje do sada nisu zabilježene veće štete, u jesen 2014. godine na području šumarije Šibenik, u okolici Skradina, na nekoliko lokaliteta dogodio se golobrst na alepskom boru (*Pinus halepensis* Mill.), a isto se ponovilo i na području Parka prirode Telašćica u 2017-toj godini (Matek i Pernek 2018). Osim neuobičajene pojave ovog štetnika na alepskom boru na području Mediterana, još je više iznenadila pojava entomopatogene gljive *B. bassiana* koja je prilikom golobrsta u Skradinu na prezimljavajućim gusjenicama izazvala mortalitet viši od 98%, nakon čega se alepski bor gotovo u potpunosti oporavio, uz tek manji broj stabala koje je sekundarno napao potkornjak *Tomicus destruens* (Wollaston). Istraživanja provedena na području PP Telašćica također su dokazala prisutnost gljive *B. bassiana* kao prirodnog neprijatelja borovog prelca, čime se potvrđuje njezina važna uloga i potencijal koji ima u redukciji populacija ovog štetnog kukca (Matek i Pernek 2018). Njegova pojačana aktivnost u ovom dijelu Europe kao i u našoj zemlji, dinamika i cikličko pojavljivanje, struktura naših mediteranskih šuma (jednodobne, monotipske šume) te vremenske prilike koji pogoduju njegovom učestalijem pojavljivanju upućuju na to da bi se ovakvi napadi na našem području mogli ponavljati u budućnosti. Također, s obzirom na pojavljivanje borovog prelca u područjima gdje nije dozvoljena upotreba kemijskih insekticida (zaštićena i/ili turistička područja), vrlo je važno istraživati alternativne metode suzbijanja ovog štetnog organizma. Zbog svega navedenog, borov prelac odabran je kao modelni organizam za ovo istraživanje, u kojem će se pokušati dobiti odgovor na utjecaj entomopatogenih gljiva roda *Beauveria* na njegove larvalne stadije, ispitati optimalni uvjeti temperature i vlage, te doze i koncentracije suspenzija spora, kompatibilnost i efikasnost kombiniranja suspenzija spora s ultra niskim (u nastavku UL) koncentracijama i dozama konvencionalnog insekticida, kao i mogućnost horizontalnog prijenosa spora gljive između jedinki.

1.3.2. Hrastova mrežasta stjenica (Corythucha arcuata)

Hrastova mrežasta stjenica, *Corythucha arcuata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) je važan štetnik na hrastovima (*Quercus* spp.) porijeklom iz sjeverne Amerike (Drake i Ruhoff 1965). U Europi je prvi puta zabilježena 2000 u sjevernoj Italiji (Bernardinelli i Zandigiacomo 2000) te je 2002 nađena u Turskoj (Mutun 2003), a kombinacija različitih faktora kao što su trgovina i transport biljnog materijala, te lako prenošenje putem ljudi i vozila duž prometnih pravaca i unutar gradova omogućila joj je da se brzo proširi i u druge europske zemlje (npr. Forster i sur. 2005, Dobreva i sur. 2013, Hrašovec i sur. 2013, Streito i sur. 2018) (Slika 3).



Slika 3. Širenje hrastove mrežaste stjenice u Europi (preuzeto iz: Csóka i sur. 2019)

Svojim usnim ustrojem za bodenje i sisanje adulti i nimfe probijaju epidermu lišća i sišu biljne sokove, što prouzrokuje promjenu boje, klorotičnost i žućenje lišća, smanjenje fotosinteze, pa čak i preuranjeno opadanje lišća. Također, uzastopni napadi mogu povećati osjetljivost domaćina na napad drugih kukaca i bolesti (Connell i Beacher 1947).

Osim hrastova, od kojih su najintenzivniji napadi zabilježeni na hrastu lužnjaku (*Quercus robur* L.), hrastu kitnjaku (*Q. petraea* (Matt.) Liebl), sladunu (*Q. frainetto* Ten.) i ceru (*Q. cerris* L.) (Csóka i sur. 2019), kao domaćini se spominju i vrste: pitomi kesten (*Castanea sativa* Mill.), divlja ruža (*Rosa canina* L.), malina (*Rubus idaeus* L.), kupina (*R. fruticosus* L.), divlja jabuka (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) i nizinski brijest (*Ulmus minor* Mill.) (Bernardinelli 2006, Hrašovec i sur. 2013).

U Hrvatskoj se pojavila 2013. u nizinskim šumama hrasta lužnjaka u Spačvanskom bazenu (Hrašovec i sur. 2013), odakle se vrlo brzo proširila na zapad, te do danas njezina brojnost i intenzitet napada ne bilježe opadanje. Još uvijek nije poznato da li hrastova mrežasta stjenica može uzrokovati smrt domaćina, no vrlo visoka brojnost populacije koju je dosegnula u nekim zemljama kao što je Hrvatska zabrinjavajuće je u smislu negativnog kumulativnog stresnog utjecaja koji bi mogla imati na ionako već osjetljive vrijedne hrastove šume (Rapid Pest Risk Analysis (PRA) 2018). Njezino brzo i uspješno širenje je vjerojatno između ostalog posljedica i manjka prirodnih neprijatelja, koji u području njezina prirodnog pridolaska uključuju različite predatorske grinje, stjenice, paukove i bubamare (Dreistadt i Perry 2014), a neki izvještaji spominju i osjetljivost stjenica na gljivična oboljenja, posebice tijekom kišnog vremena (Dr. Steve H. Dreistadt, UC Statewide IPM Program, Agriculture and Natural Resources, University Of California, osobno priopćenje u 2019).

Dosadašnja pokusna tretiranja hrastove mrežaste stjenice kemijskim insekticidima pokazala su se neučinkovitima, stoga je jedan dio ovog istraživanja posvećen i alternativnim mogućnostima njezinog suzbijanja. Biološka kontrola hrastove mrežaste stjenice do sada je uključivala samo laboratorijske pokuse tretiranja adulta i nimfi suspenzijama spora različitih entomopatogenih gljiva, gdje je *B. bassiana* pokazala najveću smrtnost (80% i 90%), sa 77% i 83% mikoze (Sönmez i sur. 2016). Uspješnost takvih tretmana daje poticaj za dodatna istraživanja ovih gljiva i njihovog potencijala za suzbijanje ovog invazivnog štetnog organizma. Zbog toga je hrastova mrežasta stjenica izabrana kao drugi modelni organizam za ovo istraživanje, gdje će se također ispitati učinkovitost suspenzija spora gljiva roda *Beauveria* u tretiranju odraslih stadija, optimalne doze i koncentracije tih suspenzija, te će se dodatno istražiti prezimljavajuća generacija i ispitati prisutnost entomopatogenih gljiva na jedinkama u mahovini, gdje dio populacije uobičajeno prezimljava.

1.4. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Hipoteze:

1. Postoji više vrsta entomopatogenih gljiva iz roda *Beauveria* prisutnih u različitim dijelovima Hrvatske u tlu, kao i na različitim vrstama kukaca
2. Entomopatogene gljive roda *Beauveria* patogene su na odabranim ciljanim štetnim organizmima, te imaju dobar potencijal u njihovoj biološkoj kontroli
3. Vrste *B. bassiana* i *B. brongniartii* mogu biti inokulirane kao endofiti u biljno tkivo te tako štititi biljku od napada štetnih kukaca
4. Tretiranje štetnih kukaca kombiniranjem entomopatogenih gljiva iz roda *Beauveria* s konvencionalnim insekticidom(ima) u UL (ultra low) koncentraciji i dozi može biti učinkovitija metoda suzbijanja štetnih kukaca od njihove samostalne upotrebe. U usporedbi s dosadašnjom primjenom kemijskih insekticida u velikim koncentracijama i dozama u suzbijanju i redukciji populacija štetnika, ovakva kombinacija je i ekološki prihvatljivija

Ciljevi:

1. Morfološkim i molekularnim metodama identificirati vrste gljiva iz roda *Beauveria* na području Hrvatske, izolirane s različitih vrsta kukaca i iz tla uzorkovanog na različitim lokalitetima
2. Nakon što su određeni ciljani štetni organizmi (borov prelac, hrastova mrežasta stjenica) u laboratorijskim pokusima tretiranja entomopatogenim gljivama iz roda *Beauveria* utvrditi njihovu patogenost i potencijal u biološkoj kontroli, te odrediti optimalne doze i koncentracije suspenzija spora
3. Laboratorijskim pokusima utvrditi efikasnost kombiniranja entomopatogenih gljiva iz roda *Beauveria* s konvencionalnim insekticidom(ima) u UL koncentraciji i dozi i potencijal takvog kombiniranja u biološkoj kontroli
4. Ispitati mogućnosti korištenja vrsta *B. bassiana* i *B. brongniartii* kao endofita u hrastu lužnjaku

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Morfološka i molekularna identifikacija vrsta iz roda *Beauveria* na području Hrvatske

Istraživanje prisutnosti entomopatogenih gljiva roda *Beauveria* na različitim staništima i lokalitetima u Hrvatskoj obuhvaćalo je morfološke, molekularne i filogenetske analize izolata dobivenih s prirodno zaraženih kukaca, te morfološke i molekularne analize izolata entomopatogenih gljiva dobivenih iz tla.

2.1.1. Sakupljane uzoraka i izolacija gljiva s kukaca

Uzorci kukaca sakupljeni su na različitim lokalitetima i staništima u Hrvatskoj, te u različitim dijelovima godine tijekom 2014., 2017. i 2018. Odabirane su mrtve jedinke koje su na tijelu imale vidljive simptome zaraze entomopatogenim gljivama, te su donošene u Laboratorij za entomološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta na daljnju analizu. Svaka jedinka je prvo stavljana nekoliko dana u uvjete vlage radi poticanja sporulacije gljive, nakon čega je pregledavana pod stereo mikroskopom (Olympus, model SZX7, Tokyo, Japan). Komadići micelija sa svake jedinke pažljivo su odvajani i nacjepljivani na PDA (Potato Dextrose Agar) hranjivu podlogu te inkubirani na 25 ± 1°C s fotoperiodom D:N = 16:8 h. Kroz 2 tjedna pratio se razvoj kultura koje su po potrebi precjepljivane radi dobivanja čistih kultura. Dobivene kulture selektirane su po morfotipovima te je odabrano 12 izolata za daljnje morfološke i molekularne analize. Podaci o odabranim izolatima prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Izolati gljiva dobiveni sa zaraženih kukaca odabrani za morfološke i molekularne analize

IZOLAT	DOMAĆIN	STADIJ	LOKALITET	MJESTO SAKUPLJANJA	VRIJEME SAKUPLJANJA
BBITS	*Ips typographus*	adult	Mrkopalj (Sungerski Lug)	hodnici u kori obične smreke (*Picea abies*)	veljača/2017
BBNK1	*Corythucha arcuata*	adult	Spačva (GJ Ceranski lugovi)	mahovina na stablu hrasta lužnjaka (*Quercus robur*)	lipanj/2018
BBC1	*Corythucha arcuata*	adult	Spačva (GJ Ceranski lugovi, šumski predjel Jelje)	mahovina na stablu hrasta lužnjaka (*Quercus robur*)	svibanj/2018
BBC2	*Corythucha arcuata*	adult	Spačva (GJ Ceranski lugovi, šumski predjel Jelje)	mahovina na stablu hrasta lužnjaka (*Quercus robur*)	svibanj/2018
BBC3	*Corythucha arcuata*	adult	Spačva (GJ Ceranski lugovi, šumski predjel Jelje)	mahovina na stablu hrasta lužnjaka (*Quercus robur*)	svibanj/2018
BBC4	*Corythucha arcuata*	adult	Spačva (GJ Ceranski lugovi, šumski predjel Jelje)	mahovina na stablu hrasta lužnjaka (*Quercus robur*)	svibanj/2018
BBC6	*Corythucha arcuata*	adult	Spačva (GJ Ceranski lugovi, šumski predjel Jelje)	mahovina na stablu hrasta lužnjaka (*Quercus robur*)	svibanj/2018
BBC8	*Corythucha arcuata*	adult	Spačva (GJ Ceranski lugovi, šumski predjel Jelje)	mahovina na stablu hrasta lužnjaka (*Quercus robur*)	svibanj/2018
BBC10	*Corythucha arcuata*	adult	Spačva (GJ Ceranski lugovi, šumski predjel Jelje)	mahovina na stablu hrasta lužnjaka (*Quercus robur*)	svibanj/2018
BBS	*Dendrolimus pini*	larva	Skradin	tlo ispod alepskog bora (*Pinus halepensis*)	listopad/2014
BBT	*Dendrolimus pini*	larva	Dugi otok, park prirode Telašćica	tlo ispod alepskog bora (*Pinus halepensis*)	rujan/2017
MCP	*Calliteara pudibunda*	larva	Požega (Milan Lug, općina Čaglin)	tlo u sastojini bukve i hrasta kitnjaka	siječanj/2017

2.1.2. Morfološka identifikacija izolata s kukaca

Morfološke analize provedene su u Laboratoriju za fitopatološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta. Izolati su identificirani na osnovu veličine i oblika konidija i konidiogenih stanica, te morfologije kultura (Rehner i sur. 2011, Humber 2012, Imoulan i sur. 2016a) uzgajanih 14 dana na PDA (Potato Dextrose Agar) hranjivoj podlozi na 25 ± 1 °C s fotoperiodom D:N = 16:8 h. Za svaki izolat izmjerene su dužine i širine po 100 konidija i konidiogenih stanica korištenjem fazno-kontrastnog mikroskopa (Olympus, model BX53, Tokyo, Japan) na povećanju 400x, prema Inglis i sur. (2012). Za fotografiranje zaraženih kukaca korišten je stereo mikroskop (Olympus, model SZX7, Tokyo, Japan) i Olympus XC30 kamera, za kulture izolata Olympus E-30 (Tokyo, Japan) kamera, dok je za fotografiranje mikroskopskih struktura korišten mikroskop Leica (model DM3000 LED, Wetzlar, Njemačka) i digitalna kamera Leica, model MC170 HD. Kulture 12 analiziranih izolata pohranjene su u Laboratorij za fitopatološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta (Jastrebarsko).

2.1.3. Molekularna identifikacija izolata s kukaca i filogenetske analize

Molekularne analize provedene su u laboratoriju Zavoda za molekularnu filogenetiku i evoluciju na Biološkom odsjeku Sveučilišta u Varšavi. Analize su uključivale ekstrakciju DNA, lančanu reakciju polimerazom (PCR), sekvenciranje i filogenetske analize.

Za ekstrakciju DNA korišten je *ExtractMe Genomic DNA Kit* tvrtke Blirt (Gdańsk, Poljska), prema uputama proizvođača, iz micelija izolata uzgajanih minimum 7 dana na PDA i MEA hranjivim podlogama na temperaturi 25 ± 1 °C s fotoperiodom D:N = 16:8 h.

Lančanom reakcijom polimerazom (PCR) umnažali su se molekularni markeri:

I. Interni transkripcijski spacer (ITS)

II. Bloc nuklearna intergenska regija (Bloc)

PCR uvjeti za ITS regiju uključivali su početnu denaturaciju u trajanju od 5 min pri 95°C, s 34 ciklusa izmjenične denaturacije (15 sek pri 95°C), nalijeganja početnica (30 sek pri 52°C) i elongacije (1,5 min pri 72°C) te finalnu elongaciju od 7 min na 72°C, dok je za Bloc regiju

početna denaturacija trajala 2 min pri 95°C, s 34 ciklusa izmjenične denaturacije (30 sek pri 95°C), nalijeganja početnica (30 sek pri 56°C) i elongacije (2 min pri 72°C), te finalnom elongacijom od 10 min na 72°C. PCR produkti pročišćeni su pomoću *ExtractMe DNA Clean-up & Gel-out Kit*-a tvrtke Blirt (Gdańsk, Poljska) te potom sekvencirani radi utvrđivanja nukleotidnog slijeda sekvenci pomoću *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 3.1 Kit*-a (Applied Biosystems, Warrington, UK) korištenjem istih početnica kao u PCR reakciji. Da bi se izolati identificirali dobivene sekvence uspoređivane su s odgovarajućima u međunarodnoj bazi gena NCBI GenBank primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Za obradu sekvenci korišten je program Lasergene v15 (DNASTAR, Inc. Madison, USA), a za njihovo poravnavanje (multiple sequence alignment) program MAFFT v7.271 (Katoh i Standley 2013). Filogenetsko stablo generirano je korištenjem modula RAxML-NG v. 0.8.0 (Kozlov i sur. 2019) pomoću filogenetskog stabla dobivenog u Imoulan i sur. (2016b).

2.1.4. Sakupljanje uzoraka i izolacija gljiva iz tla

Uzorci tla sakupljani su krajem 2018-te i tijekom cijele 2019-te godine na različitim lokalitetima u Hrvatskoj, odabranima prema dosadašnjim nalazima kukaca zaraženih *Beauveria* sp. gljivama. Sa svakog lokaliteta uzorci su uzimani s po 5 nasumično odabranih točaka udaljenih jedne od druge minimalno 100 metara. Tlo je iskopavano lopaticom (koja se između svakog uzorkovanja dezinfincirala u 70% ETOH) na dubini 10-15 cm te pohranjeno u plastičnim posudama na temperaturi 3-4 °C do izolacije (Slika 4A). Prije same izolacije tlo se promiješalo, prosijalo i lagano prosušilo, te se od uzoraka od svake točke odvagalo po 2 g tla, koje se potom miješalo otopinom sterilne destilirane vode i sredstva za smanjivanje njezine površinske napetosti Tween (0,05%), u omjeru 1:10 ili 1:100 (Slika 4B). Tubice s otopinama (Corning® 50 mL) su snažno mućkane oko 30-40 sekundi, nakon čega je po 100 µL otopine pipetirano i sterilnom trokutastom špatulom ravnomjerno raspoređeno u Petrijeve zdjelice sa selektivnom hranjivom podlogom namijenjenoj za izolaciju entomopatogenih gljiva (Strasser i sur. 1996, Keller i sur. 2003). Za svaku otopinu radila su se po 3 ponavljanja.



Slika 4. A) sakupljanje uzoraka tla; B) priprema uzoraka za izolaciju entomopatogenih gljiva

Selektivna hranjiva podloga:

1 L destilirane H_20
20 g glukoze
18 g agara
10g peptona

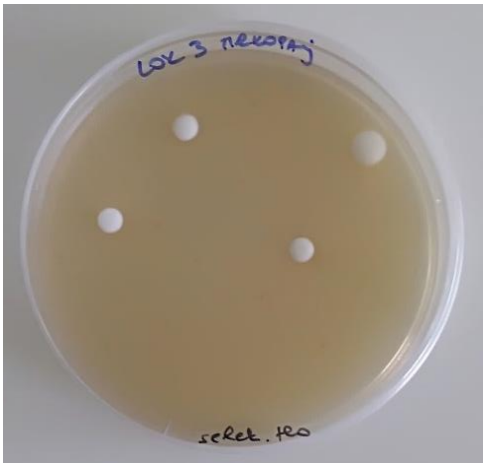
Nakon sterilizacije i hlađenja, u podlogu su dodani:

0.6 g streptomicin sulfata
0.05 g of klortetraciklina
0.05 g cycloheximida
0.1 g of dodina.

Petrijeve zdjelice inkubirane su na 22 °C 10-14 dana, nakon čega su se brojale kolonije svake pojedine vrste (Slika 5), a rezultati su izraženi kao koncentracija/broj kolonija (CFU→colony-forming units) u 1 g tla. Za izračunavanje broja kolonija po 1 g tla korištena je formula:

$$\textbf{CFU/g tla} = \frac{\textit{prosječan broj kolonija x faktor razrjeđenja}}{\textit{volumen ispipetiran na hranjivu podlogu}}$$

Kolonije svake vrste na lokalitetu (selektirane na osnovu njihove morfologije) presađivane su na novu hranjivu podlogu radi dobivanja čistih kultura za dodatnu morfološku i molekularnu identifikaciju.



Slika 5. Primjer razvijanja kolonija nakon 10 dana inkubacije

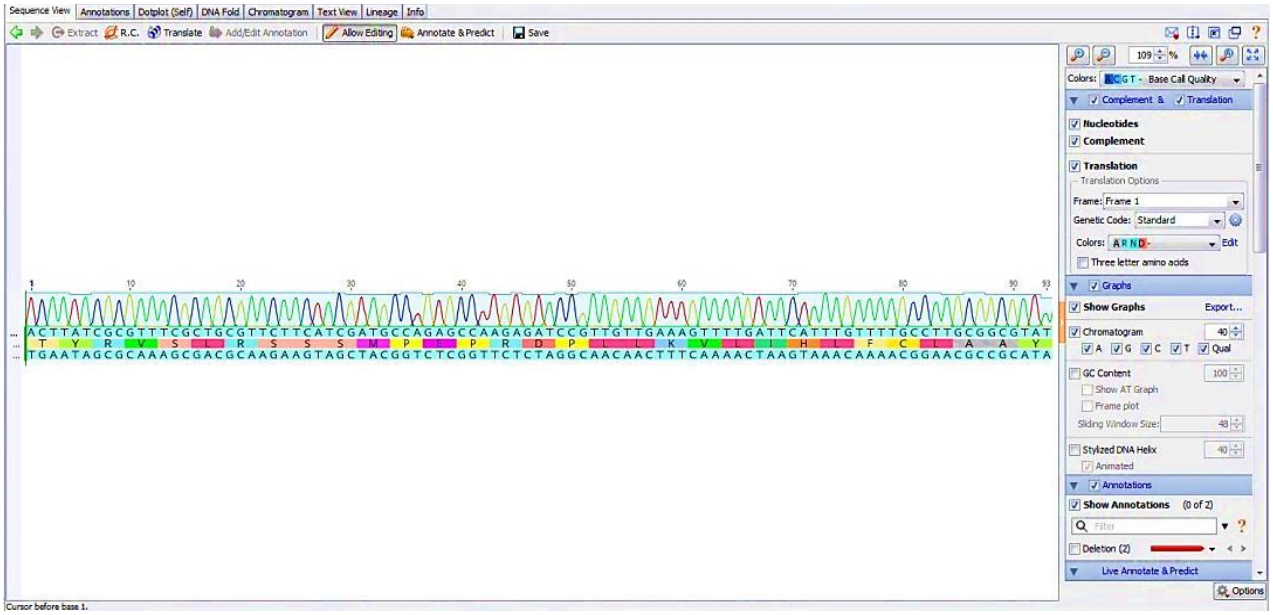
2.1.5. Morfološka identifikacija izolata iz tla

Morfološka identifikacija izolata uključivala je vizualni pregled kultura, te mikroskopski pregled konidija i konidiogenih stanica za što je korišten fazno-kontrastni mikroskop (Olympus, model BX53). Inicijalna identifikacija rodova dobivenih gljiva napravljena je prema ključu u Humber (2012). Kulture 42 analizirana izolata pohranjene su u Laboratorij za fitopatološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta (Jastrebarsko).

2.1.6. Molekularna identifikacija izolata iz tla

Molekularne analize provedene su u Laboratoriju za molekularno-genetička ispitivanja Zavoda za zaštitu šuma Hrvatskog šumarskog instituta (Jastrebarsko). Analize su uključivale ekstrakciju DNA, lančanu reakciju polimerazom (PCR), elektroforezu u agaroznom gelu, slanje uzoraka na pročišćavanje i sekvenciranje te obradu i analizu dobivenih sekvenci.

Za ekstrakciju DNA korišten je *NucleoSpin Plant II Kit* tvrtke Macherey-Nagel (Düren, Njemačka), prema uputama proizvođača, iz micelija izolata dobivenih iz tla (opisano u potpoglavlju 2.1.4.). Umnažanje DNA je obavljeno metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) upotrebom molekularnih markera ITS 1-F i ITS 4 (interni transkripcijski spacer). PCR uvjeti za ITS regiju uključivali su početnu denaturaciju u trajanju od 5 min pri 95°C, s 34 ciklusa izmjenične denaturacije (15 sek pri 95°C), nalijeganja početnica (30 sek pri 52°C) i elongacije (1,5 min pri 72°C) te finalnu elongaciju od 7 min na 72°C. Provjera uspješnosti PCR reakcija obavljana je elektroforezom u agaroznom gelu, a produkti su vizualizirani na UV transiluminatoru te su na temelju postojanja ili ne postojanja PCR produkta odabirani uzorci za daljnju obradu. Uzorci su potom slani na pročišćavanje i sekvenciranje tvrtki Macrogen Europe B.V. (Amsterdam, Nizozemska), a dobivene sekvence isporučene su elektronički. Za obradu i analizu sekvenci korišten je program Geneious Prime (Slika 6), a izolati su identificirani uspoređivanjem dobivenih sekvenci s odgovarajućima u međunarodnoj bazi gena NCBI GenBank primjenom algoritma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).



Slika 6. Primjer obrade i analize sekvence

2.2. Ispitivanje utjecaja insekticida na razvoj izolata

Za ispitivanje utjecaja insekticida na klijavost spora i razvoj izolata korišteni su izolati *B. bassiana* BBS, *B. pseudobassiana* BBC10 i *B. pesudobassiana* BBNK1, i insekticid ASSET u koncentraciji preporučenoj po proizvođaču (0,1%) i u nižoj, 'ultra low' (UL) koncentraciji (0,003 %, odnosno 3 % od preporučene koncentracije- korištene kasnije u eksperimentu s borovim prelcem).

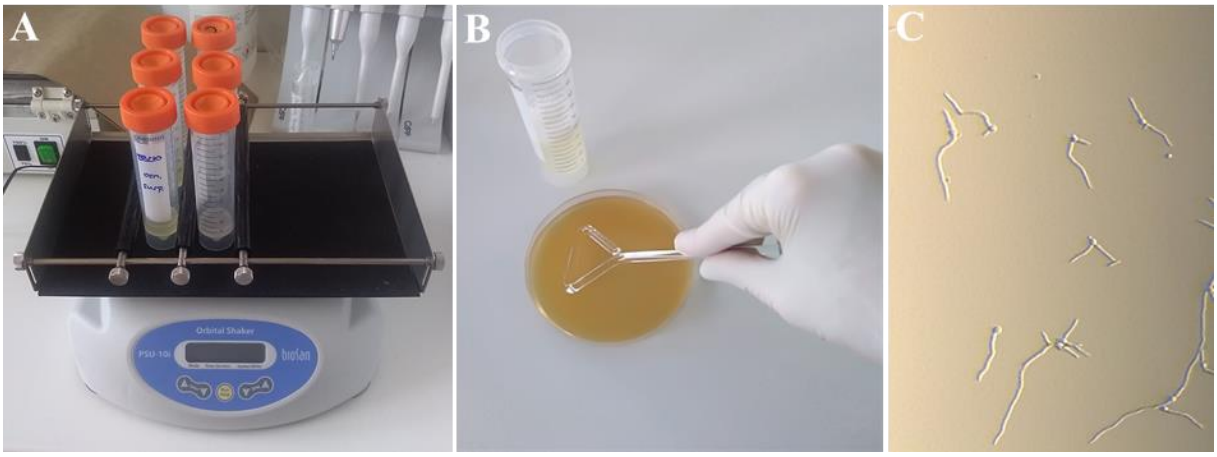
2.2.1. Utjecaj insekticida na klijavost spora izolata BBS, BBC10 i BBNK1

Suspenzije spora pripremljene su od kultura izolata BBS, BBC10 i BBNK1 uzgojenih presađivanjem komadića micelija gljive na PDA (Potato Dextrose Agar) hranjivu podlogu i inkubiranih najmanje 14 dana na 25 ± 1 °C s fotoperiodom D:N = 16:8 h. Za pripremu suspenzija odabirane su one kulture koje su potpuno sporulirale.

Po 5 mL insekticida u preporučenoj (0,1%) i u UL koncentraciji (0,003 %) dodano je u po 5 mL svake od suspenzija spora, dok je u kontrolnim grupama korištena samo suspenzija spora. Svaka smjesa vorteksirana je po 1 min te stavljena u orbitalni shaker 15 min na sobnu temperaturu i 250 rpm (okretaja po minuti-rotacijska brzina) da bi se otopine insekticida i suspenzija spora dobro izmiješale (Slika 7A).

Po 100 µl svake otopine ispipetirano je na PDA hranjivu podlogu i sterilnom trokutastom špatulom ravnomjerno raspoređeno u Petrijevim zdjelicama (Slika 7B), koje su zatim pohranjene na 25 ± 1 °C s fotoperiodom D:N = 16:8 h. Svaki tretman, kao i kontrola, ponovljeni su 2 puta.

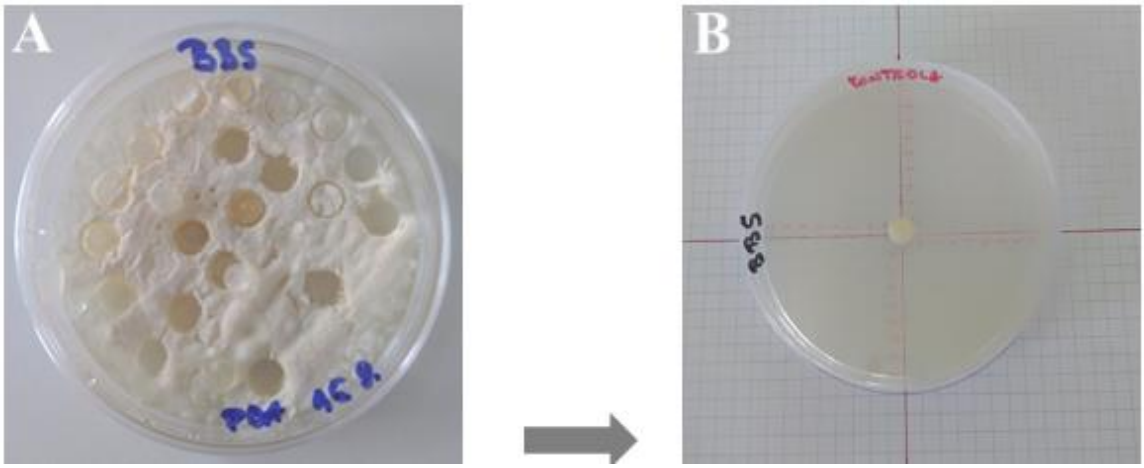
Udio proklijalih konidija kvantificiran je nakon 24 h brojanjem po 100 konidija u 3 različita slučajno odabrana dijela Petrijeve zdjelice pod mikroskopom povećanja 400 X, da bi se odredio postotak proklijalih i neproklijalih konidija. Proklijalim konidijama smatralo se one koje su proklijale (engl. germ tube) za dužinu istu ili veću od promjera same konidije (Inglis i sur. 2012) (Slika 7C).



Slika 7. Ispitivanje utjecaja insekticida na klijavost spora A) priprema otopina; B) inokulacija otopina na hranjivu podlogu; C) određivanje postotka proklijalih i neproklijalih konidija

2.2.2. Utjecaj insekticida na razvoj kultura izolata BBS, BBC10 i BBNK1

PDA (Potato Dextrose Agar) hranjiva podloga sterilizirana je u autoklavu na 121 °C 15 minuta, te je nakon hlađenja na temperaturu 50-60 °C dio razliven u Petrijeve zdjelice za kontrolu (hranjiva podloga bez dodatka insekticida), a u preostalu podlogu umješan je insekticid prvo u UL, a zatim u preporučenoj koncentraciji. U sredinu svake Petrijeve zdjelice stavljan je inokulum veličine 5 mm izrezan iz kultura svakog izolata pomoću sterilnog metalnog borera (Slika 8A). Za pokus su korištene kulture stare 10 dana, uzgojene na PDA (Potato Dextrose Agar) hranjivoj podlozi. Za svaki izolat svaki je tretman ponovljen 4 puta, dok je kontrola ponovljena 3 puta. Inokulirane Petrijeve zdjelice pohranjene su na 25 ± 2 °C, s fotoperiodom D:N = 16:8 h. Sljedeća 2 tjedna svaki drugi dan mjeren je radijalni rast gljive (dužina i širina u mm) (Slika 8B), a rezultati su prikazani u obliku prosječnih vrijednosti dužina i širina (u daljnjem tekstu prosječni promjer ili promjer) razvijenih kultura u odnosu na kontrolu u postotku.



Slika 8. Ispitivanje utjecaja insekticida na razvoj kultura A) priprema inokuluma; B) mjerenje radijalnog rasta gljive

2.3. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćeg soja *B. bassiana* na borovom prelcu

Terensko sakupljanje štetnika

Gusjenice borovog prelca sakupljane su u kolovozu i rujnu 2017. na području Parka prirode Telašćica na Dugom Otoku. Prema potrebama postavljanja laboratorijskih pokusa u kolovozu je sakupljeno 300 gusjenica, dok je u rujnu sakupljeno njih 600. Odabirane su gusjenice 3. i 4. larvalnog stadija s iglica, grana i debla alepskog bora i okolnog tla, nakon čega su u plastičnim cilindrima, s prozračnom tkaninom na otvoru, prenesene u entomološki laboratorij Hrvatskog šumarskog instituta gdje su preko noći inkubirane u laboratorijskim uvjetima (12:12, 25 ± 1 °C).

Izolacija gljive i priprema suspenzije spora

Za provedbu pokusa odabran je izolat gljive *B. bassiana* dobiven iz kadavera gusjenica borovog prelca (BBS), sakupljenih u okolici Skradina na području šumarije Šibenik 2014. Suspenzije spora pripremljene su od kultura starih 14 dana uzgojenih na PDA (Potato Dextrose Agar) hranjivoj podlozi na isti način kao i u potpoglavlju 2.2.1.

Za pripremu suspenzija prvo je bilo potrebno odvojiti micelij sa sporama gljive od hranjive podloge pipetiranjem 10 mL sterilne otopine vode i Tween-a (0,1%) u Petrijevoj posudi s kulturom i nježnim struganjem micelija s površine pomoću sterilnog fitopatološkog pribora namijenjenog za to. Dobivena suspenzija se potom razrijedila sa sterilnom otopinom vode i Tween-a (0,1%) u omjeru 1:10 i izvorteksirala 1 min. Nakon toga, suspenzija spora filtrirana je kroz sterilnu gazu radi uklanjanja eventualnog viška komadića podloge i micelija. U Neubauerovom hemocitometru izbrojane su spore i utvrđena je njihova koncentracija u suspenziji. Za prvi pokus jedan dio suspenzije je odvojen i dodatno razrijeđen u omjeru 1:100 (za grupu D), dok se za drugi pokus suspenzija nije dodatno razrjeđivala.

Postavljanje i praćenje pokusa

Od gusjenica sakupljenih na terenu odabrane su najvitalnije, te su raspoređene po grupama, pojedinačno u Petrijeve posude (Slika 9A). Provedena su dva pokusa, u kojima je svaka pojedina gusjenica tretirana u zavisnosti o svojoj grupnoj pripadnosti, pipetiranjem izravno na zadak (Slika 9B). U Pokusu 2 proveden je i tretman s insekticidom ASSET gdje je korištena koncentracija preporučena po proizvođaču tog sredstva (0,1%) i doza od 20 µl po gusjenici, ali je već drugi dan mortalitet bio 100% stoga ta grupa nije uključena u daljnje analize, a doze i koncentracije su se postupno smanjivale dok se nije došlo do pogodne (UL), odnosno do one koja ne izaziva smrt gusjenica, ali ih oslabljuje.

POKUS 1

broj jedinki po skupini **(n)= 40**
temperatura (t)= **23 °C**, fotoperiod **16:8 h** (D:N)
praćenje pokusa: **15 dana**

Grupa	A (E1T1)	B (E1T5)	C (E1T20)	D (E1T01)	E-kontrola (E1C)
Tretman	suspenzija spora	suspenzija spora	suspenzija spora	suspenzija spora	H_2O+Tween (0,1%)
doza po gusjenici [µl]	**1**	**5**	**20**	**1**	**20**
koncentracija suspenzije spora [spore/µl]	**$7{,}9 \times 10^4$**	**$7{,}9 \times 10^4$**	**$7{,}9 \times 10^4$**	**$7{,}9 \times 10^2$ (otopina 1:100)**	**-**

POKUS 2

temperatura (t)= **23 °C**, fotoperiod **16:8 h** (D:N)
praćenje pokusa: **15 dana**

Grupa	A (E2B20)	B (E2A10)	C (E2BA)		D (E2CAD)	E-kontrola (E2C)
Tretman	*Beauveria bassiana*	Asset ultra low konc.	*B. bassiana* + ASET ultra low		KADAV ERI	H_2O+Tween (0,1%)
Broj jedinki po skupini (n)	54	68	54		60	43
doza po gusjenici [µl]	**20**	**10**	**20**	**10**	**30 min**	**20**
koncentracija suspenzije spora [spore/µl] / otopine insekticida [%]	**5,6 x 10^4**	**0,003%**	**5,6 x 10^4**	**0,003%**	**-**	**-**

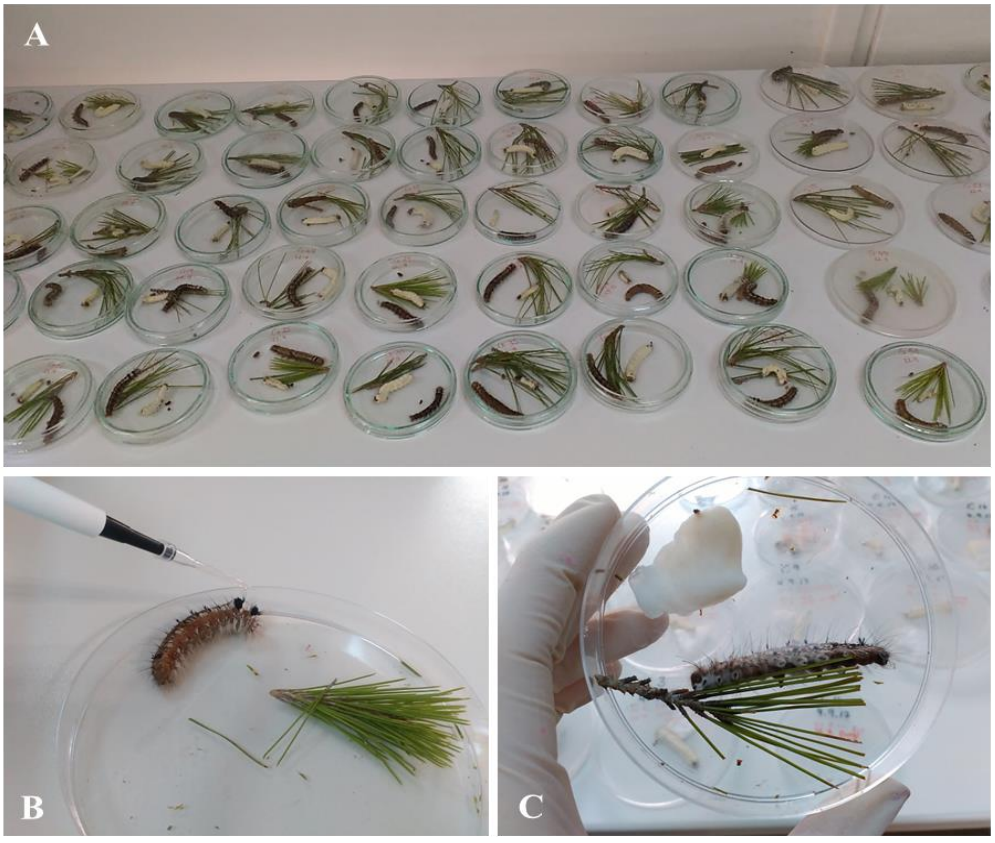
TRETMAN S TEMPERATUROM 16 °C

temperatura (t)= **16 °C**, fotoperiod **16:8 h** (D:N)
praćenje pokusa: **28 dana**

Grupa	16 °C	kontrola
Tretman	*Beauveria bassiana*	H_2O+Tween (0,1%)
Broj jedinki po skupini (n)	54	40
doza po gusjenici [µl]	**20**	**20**
koncentracija suspenzije spora [spore/µl] / otopine insekticida [%]	**5,6 x 10^4**	-

Nakon tretiranja, gusjenice su svakodnevno hranjene svježim iglicama alepskog bora, čišćene od ekskremenata, te se pratio mortalitet i pojava micelija gljive kod uginulih jedinki (Slika 9C). Uz sve navedeno, u Pokusu 1 gusjenice su još i svakodnevno vagane (analitička vaga Acculab ATILON ATL-224-I,220 X 0.0001g), svaka pojedinačno, da bi se ispitalo postoji li korelacija između zaraze entomopatogenom gljivom *B. bassiana* i pada težine, odnosno prestanka hranjenja štetnika.

U Pokusu 2 osim ispitivanja učinkovitosti tretmana u kojima se uz suspenziju spora koristi i insekticid ASSET, ispitivala se i mogućnost horizontalnog prijenosa zaraze sa kadavera obavijenih sporulirajućim micelijem gljive na zdrave jedinke. Svaka gusjenica je u zasebnoj Petrijevoj posudi 30 minuta bila izložena po jednom kadaveru (kadaveri su dobiveni u Pokusu 1) nakon čega su isti uklonjeni te se pokus dalje pratio kako je prethodno opisano (Slika 9A).



Slika 9. Ispitivanje patogenosti izolata BBS na borovom prelcu A) primjer postavljanja pokusa-grupa D (E2CAD) u Pokusu 2; B) pipetiranje suspenzije na zadak gusjenice; C) pojava micelija gljive *B. bassiana*

Tijekom oba pokusa, pokraj svake uginule jedinke u Petrijevoj posudi stavljen je komadić vatice navlažene destiliranom vodom, da bi se potaknula sporulacija gljive. Da bi se provjerio uzrok uginuća, kod onih gusjenica kod kojih se nakon smrti pojavio bijeli micelij, obavljena je reizolacija gljive na novu PDA hranjivu podlogu, a svaka nova kultura dobivena reizolacijom mikroskopski je pregledana.

Statistička analiza podataka

Efektivnost tretmana ispitana je određivanjem mortaliteta, mikoze (zaraze gljivom *B. bassiana*), prosječne brzine ugibanja i brzine prestanka hranjenja gusjenica, te uspoređivanjem razlika između tretmana. Stope mortaliteta analizirane su Hi-kvadrat testom korištenjem apsolutnih vrijednosti ukupnog mortaliteta i mortaliteta uzrokovanog zarazom gljive *B. bassiana* da bi se odredilo postoji li značajna razlika između dobivenih mortaliteta i LD_{100} (letalna doza za 100% tretiranih gusjenica). Brzine ugibanja (letalno vrijeme) i prestanak hranjenja gusjenica analizirani su parametarskim (ANOVA) i neparametarskim (Kruskal–Wallis) testovima da bi se odredilo postoje li statistički značajne razlike između provedenih tretmana. Za testiranje normalnosti distribucije podataka korišten je Shapiro-Wilks test. Kako bi se utvrdili odnosi i razlike između pojedinih tretmana obuhvaćenih testovima, korišten je Tukey-ev test usporedbe parova sa intervalom pouzdanosti 95% na temelju razultata parametarskog testa te procedura Steel-Dwass-Critchlow-Flinger za višestruku komparativnu analizu na temelju rezultata neparametarskog testa. Za provedbu svih statičkih analiza i izradu grafičkih prikaza korišten je računalni program MS Office Excel (Microsoft) i XLSTAT (Addinsoft) programski dodatak za analizu i statistiku.

2.4. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćih sojeva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* na hrastovoj mrežastoj stjenici

Sojevi gljiva odabrani za ove pokuse potvrđeni su morfološkim i molekularnim laboratorijskim metodama i korišteni u skladu sa Koch-ovim postulatima, te su izolati istih pohranjeni u Laboratorij za fitopatološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta (Jastrebarsko).

2.4.1. Preliminarni pokus ispitivanja patogenosti gljive B. bassiana na odraslim jedinkama hrastove mrežaste stjenice

Uzorci su sakupljani na području UŠP Vinkovci, GJ Banov dol i Vinkovačke šume (01. i 02.10.2016.), te GJ Kragujna (04.10.2016). Odrasle jedinke hrastove mrežaste stjenice sakupljene su sa zaraženih stabala hrasta lužnjaka, nizinskog brijesta, kupine i sviba (*Cornus sanguinea* L.). Sakupljani su cijeli listovi, te stavljani u plastične posude (20X20 cm) s izbušenim rupicama za zrak na poklopcima. Uzorci su nakon toga preneseni u Laboratorij za entomološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta, gdje je cca 300 odraslih jedinki pažljivo kistom raspoređeno po listovima 10 mladih netretiranih sadnica hrasta lužnjaka dobivenih iz rasadnika Hrvatskog šumarskog instituta, po 30 na svaku biljku, koje su 05.10. pohranjene u insektarije na temperaturi 21 °C s fotoperiodom D:N = 12:12. U laboratorijskim uvjetima držane su 7 dana.

Vitalna imaga stjenice s mladih hrastova sakupljena su i raspoređena u Petrijeve zdjelice u kojima su se nalazile uginule gusjenice borovog prelca zaražene entomopatogenom gljivom *B. bassianom*, a koje su sakupljene 2014. u Skradinu nakon što je *B. bassiana* slomila masovni napad borovog prelca na alepskom boru (Matek i Pernek 2018). U 4 Petrijeve zdjelice s gusjenicama stavljeno je po 50 jedinki. Svaka gusjenica je prethodno držana 2 dana u uvjetima vlage sa sterilnom vaticom natopljenom destiliranom vodom da bi se potakla sporulacija gljive. Imaga stjenice držana su 24 sata sa kadaverima borovog prelca u prethodno opisanim laboratorijskim uvjetima, te su nakon toga vraćena na mlade hrastove biljke.

Njihova smrtnost praćena je kroz 7 dana, nakon čega su sakupljene prve uginule jedinke. Nakon 14 dana sakupljena su nova uginula imaga. Sva uginula imaga stavljena su u uvjete vlage nakon čega se pratio razvoj micelija gljive te mikroskopski potvrđivala prisutnost gljive *B. bassiana*.

2.4.2. Pokus ispitivanja patogenosti soja BBS na prezimljavajućoj i ljetnoj generaciji hrastove mrežaste stjenice

POKUS 1 (PREZIMLJAVAJUĆA GENERACIJA)

Sakupljanje uzoraka

Imaga hrastove mrežaste stjenice sakupljana su u travnju 2018. sa zaraženih grana stabala hrasta lužnjaka u Petkovcu i Županji i donesena u Laboratorij za entomološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta. Mahovina je sakupljena na 5 lokacija na području Spačve.

Priprema suspenzije spora

Za pripremu suspenzije spora korišten je izolat BBS izoliran prvotno s borovog prelca sakupljenog 2014. u Skradinu, a koji je korišten u preliminarnom pokusu pa ponovno izoliran sa zaražene hrastove mrežaste stjenice. Kulture su uzgojene nacjepljivanjem micelija gljive na PDA (Potato Dextrose Agar) i MEA (Malt Extract Agar) hranjivu podlogu i inkubacijom na 25 ± 1 °C s fotoperiodom D:N = 16:8 h minimum 14 dana da bi potpuno sporulirale. Korišteno je 6 kultura za pripremu suspenzije spora. Spore su sakupljane dodavanjem po 20 mL otopine ster.dest. H_20 i Tween (0,05%) i struganjem micelija sterilnom trokutastom špatulom, nakon čega je otopina procjeđivana kroz četveroslojnu sterilnu gazu da bi se uklonili ostaci micelija i agara, te je ponovno razrijeđena otopinom ster.dest. H_20 i Tweena (0,05%) u omjeru 1:10. Nakon kratkog vorteksiranja spore su izbrojane Neubauerovim hemocitometrom i izračunata je koncentracija spora u 1 mL po formuli:

$$\textbf{Koncentracija (spore/mL)} = \frac{\textit{prosječan broj spora u velikom kvadratu} \times 1000\ \mu L}{\textit{volumen velikog kvadrata}\ 0{,}004\ \mu L}$$

(Izvor: https://membs.org/membs/uploads/education_images/1462615559Counting%20cells.pdf)

Dobivena suspenzija razrjeđena je do željene koncentracije **(1 x 10^8 spora/mL)** po formuli:

$$\mathbf{C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2}$$

Gdje je: $\mathbf{C_1}$ koncentracija početne otopine, $\mathbf{V_1}$ volumen početne otopine potreban za dobivanje nove, $\mathbf{C_2}$ željena koncentracija nove otopine, $\mathbf{V_2}$ željeni volumen nove otopine

Postavljanje i praćenje pokusa

Mahovina je raspoređena u 4 kutije veličine 0,5 m^2, i u svaku je stavljeno po 200 imaga te pohranjeno 4 dana na 3,5 °C radi simulacije prezimljavanja. Metoda tretiranja uključivala je sprejanje mahovine u 3 kutije suspenzijom spora sterilnim sprejem, u koncentraciji 1 x 10^8 spora/mL i dozi 25 mL po kutiji (25 mL na 0,5 m^2 mahovine), dok je mahovina u kontrolnoj kutiji sprejana sterilnom dest. H_20 u istoj dozi. Temperatura je potom dignuta na 18 °C, pa postepeno dizana do 23 °C, radi simulacije završetka prezimljavanja. Nakon 4 dana jedinke su svakodnevno pregledavane na mortalitet do 10-og dana i prisutnost micelija gljive do 20-og dana nakon tretmana. Tijekom pokusa, uginule jedinke stavljane su na vlagu radi poticanja sporulacije ukoliko je gljiva uzročnik uginuća. Jedinke na kojima se micelij tipičan za *Beauveria* gljive dobro razvio i sporulirao pregledane su prvo pod stereolupom, a potom i mikroskopski radi utvrđivanja identiteta putem spora. Micelij koji se razvio ali je sporulacija izostala precjepljivan je na MEA (Malt Extract Agar) hranjivu podlogu te je nakon dobivanja čiste kulture i sporulacije gljive stavljan pod mikroskop radi utvrđivanja identiteta putem spora. Jedinke na kojima se micelij slabo razvio i nije ga bilo moguće precijepiti na hranjivu podlogu, te jedinke na kojima je primijećena pojava micelija i nekih drugih (možda saprofitskih) gljiva površinski su sterilizirane 1 min u natrijevom hipokloritu (NaOCl) (1%), 1X isprane u 70% ETOH, 2X isprane u sterilnoj destiliranoj H_20, te ponovno stavljene na vlagu. One na kojima se razvio i sporulirao micelij tipičan za *Beauveria* gljive stavljane su prvo pod stereolupu, a potom je micelij i mikroskopski pregledavan radi utvrđivanja identiteta putem spora. Učinkovitost suspenzije spora svakog izolata izmjerena je određivanjem stope mortaliteta i računanjem postotka uginuća uzrokovanog zarazom gljive.

POKUS 2 (LJETNA GENERACIJA)

Sakupljanje uzoraka

Imaga hrastove mrežaste stjenice (s obzirom da se generacije preklapaju bilo je teško utvrditi koje su točno bile u pitanju, no pretpostavlja se da se radilo o 2. i 3. generaciji) sakupljana su u rujnu 2018. sa zaraženih grana stabala hrasta lužnjaka u parku Erdődy u Jastrebarskom i donesena u Laboratorij za entomološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta. Također, sakupljana je i mahovina s obližnjih stabala.

Priprema suspenzija spora

Suspenzija u koncentraciji 1 x 10^8 spora/mL je pripravljena na isti način kao i u prethodnom pokusu sa prezimljavajućom generacijom, korištenjem istog izolata BBS.

Postavljanje i praćenje pokusa

Mahovina je raspoređena u 20 staklenih Petrijevih zdjelica (150 x 25 mm), i u svaku je stavljeno po 20 zdravih i vitalnih imaga te pohranjeno 4 dana na 18 °C (D:N 14:10). Metoda tretiranja uključivala je sprejanje 10 Petrijevih zdjelica suspenzijom spora sterilnim sprejem, u koncentraciji 1 x 10^8 spora/mL i dozi 2,5 mL otopine po Petrijevoj zdjelici (25 mL na 0,5 m^2 mahovine- 10 Petrijevih zdjelica predstavlja otprilike 0,5 m^2 mahovine.), dok je 10 kontrolnih Petrijevih zdjelica sprejano sa ster.dest. H_20 u istoj dozi. Temperatura je postepeno dizana do 23 °C, radi induciranja pokretljivosti jedinki. Pokus se pratio u istom vremenskom razmaku kao i u prethodnom pokusu sa prezimljavajućom generacijom, te su korištene iste metode kontroliranja jedinki i određivanja učinkovitosti suspenzije spora.

2.4.3. Pokus ispitivanja patogenosti dva izolata B. pseudobassiana izoliranih sa hrastove mrežaste stjenice

Sakupljanje uzoraka

Imaga hrastove mrežaste stjenice sakupljana su u listopadu i studenom 2018. sa zaraženih grana stabala hrasta lužnjaka u parku Erdődy u Jastrebarskom i donešena u Laboratorij za entomološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta. Također, sakupljena je i mahovina sa obližnjih stabala.

Priprema suspenzija spora

Za pripremu suspenzija spora korištena su 2 izolata entomopatogene gljive *B. pseudobassiana* izolirana s prirodno zaraženih jedinki hrastove mrežaste stjenice nađenih krajem svibnja 2018. na području šumarije Cerna, GJ Ceranski lugovi, u mahovini na stablima hrasta lužnjaka. Kulture su uzgojene nacjepljivanjem micelija gljive na PDA (Potato Dextrose Agar) hranjivu podlogu i inkubacijom na 25 ± 1 °C s fotoperiodom D:N = 16:8 h 14 dana da bi potpuno sporulirale. Korištena je jedna kultura po izolatu. Suspenzije spora u koncentraciji 1 x 10^8 spora/mL je pripravljene su isti način kao i u prethodna dva pokusa.

Procjena klijavosti spora

Da bi se procijenila klijavost spora 100 µL suspenzije spora je odvajano i ispipetirano u sredinu Petrijeve zdjelice napunjene s Malt Extract Agar hranjivom podlogom, te sterilnom staklenom trokutastom špatulom pravilno raspoređeno po podlozi. Klijavost je provjerena nakon 24 sata brojanjem po 100 konidija u 3 različita slučajno odabrana dijela Petrijeve zdjelice, da bi se odredio postotak proklijalih i neproklijalih konidija. Proklijalim konidijama smatralo se one koje su proklijale (germ tube) za dužinu istu ili veću od dužine same konidije.

Postavljanje i praćenje pokusa

Kao i u prethodnom pokusu s ljetnom generacijom mahovina je raspoređena u 15 staklenih Petrijevih zdjelica (150 x 25 mm), po 5 za svaki izolat i 5 za kontrolu. U svaku je stavljeno po 20 zdravih i vitalnih imaga te su preko noći pohranjene na laboratorijske uvjete (14:10, 18 ± 1 °C). Metoda tretiranja uključivala je sprejanje mahovine s jedinkama suspenzijom spora sterilnim sprejem, u količini 2 mL otopine po Petrijevoj zdjelici (10 mL po izolatu, tj. 10 mL na 100 jedinki). Kontrolna skupina nije tretirana s ničim. Nakon tretmana temperatura je dignuta na 23 °C radi induciranja pokretljivosti jedinki. Nakon 4 dana jedinke su svakodnevno pregledavane na mortalitet i prisutnost micelija gljive do 20-og dana nakon tretmana. Tijekom pokusa, uginule jedinke stavljane su na vlagu radi poticanja sporulacije da bi se utvrdio uzročnik uginuća. Svaka pojedina jedinka pregledana je prvo pod stereolupom, a potom i mikroskopski ako su bili vidljivi znakovi pojave micelija tipičnog za *Beauveria* gljive. Učinkovitost suspenzije spora svakog izolata izmjerena je određivanjem stope mortaliteta i računanjem postotka uginuća uzrokovanog zarazom gljive. Također, tijekom pokusa odvajane su i pregledavane ostale vrste kukaca te se pratio mortalitet i eventualna prisutnost micelija gljive.

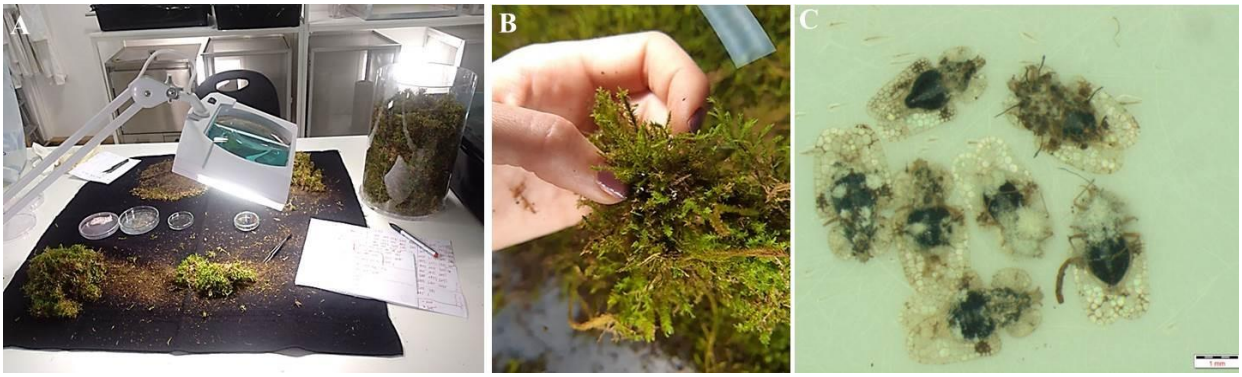
2.4.4. Brojanje jedinki prezimljavajućih imaga hrastove mrežaste stjenice u mahovini

Mahovina se sakupljala u veljači i ožujku 2019 (prije listanja hrasta i izlaženja prezimljavajućih jedinki) na 6 lokacija međusobno udaljenih minimalno 1 km na području Spačve, otprilike 1 m^2 mahovine po lokaciji, te je raspoređena u po 2 kutije veličine 0,5 m^2 (Slika 10). Na kraju se računao prosječan broj prezimljavajućih jedinki u 1 m^2 mahovine računajući svih 6 lokacija.



Slika 10. Sakupljanje uzoraka mahovine A) način sakupljanja; B) pozicije sakupljanja uzoraka

Tijekom brojanja, odvajale su se žive, mrtve i zaražene jedinke, da bi se utvrdila moguća prisutnost patogenih gljiva na prezimljavajućim jedinkama (Slika 11). Nađene mrtve jedinke stavljane su na vlagu radi eventualnog poticanja sporulacije.



Slika 11. A) i B) pregled sakupljene mahovine; C) nađene zaražene jedinke u mahovini

2.5. *Beauveria* gljive kao endofiti

Ovo istraživanje provedeno je na Julius Kühn Institutu za biološku kontrolu u Darmstadtu (Njemačka), a uključivalo je ispitivanje endofitizma *Beauveria* gljiva kod hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) i alepskog bora (*Pinus halepensis* Mill.).

Pokusi s hrastom lužnjakom provedeni su tretiranjem mladih biljaka suspenzijama spora s ciljem inokulacije entomopatogenih gljiva *B. bassiana* i *B. brongniartii* u biljke kroz lišće i korijen, te se njihova endofitska kolonizacija ispitivala primjenom imunoloških tehnika. Njihova primjena bazira se na korištenju specifičnih antitijela obojanih fluorescentnim markerom koja omogućavaju vizualiziranje finih struktura spora i hifa *Beauveria* gljiva i promatranje pomoću konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa (CLSM) pod svjetlošću određene specifične valne duljine. Ispitivanje endofitizma *Beauveria* gljiva kod alepskog bora provedeno je da bi se utvrdilo da li su ove gljive prirodno prisutne u iglicama alepskog bora te postoji li korelacija između slamanja populacije borovog prelca opisanog u Matek i Pernek (2018) i endofitske prisutnosti ovih gljiva tj. da li su možda iglice bile izvor zaraze tih gusjenica. Ispitivanje je provedeno metodom površinske sterilizacije i nasađivanja iglica u hranjivu podlogu te prethodno opisanim imunološkim metodama.

2.5.1. Ispitivanje endofitizma kod hrasta lužnjaka

Priprema biljnog materijala, kultura i suspenzija spora

Sadnice hrasta lužnjaka dobivene su iz "die-forstpflanze.de" (Schlegel & Co. d.o.o., Riedlingen, Njemačka) gdje su uzgajane u posudama u klasičnom supstratu (Frustorfer Erde Typ LD 80, HAWITA Gruppe d.o.o., Vechta, Njemačka). Za pokuse su korišteni sojevi entomopatogenih gljiva *Beauveria bassiana* ATTC 74040 (reizoliran iz preparata NATURALIS®) i *Beauveria brongniartii* JKI-BI 1249 dobiveni iz kolekcije uzoraka kultura gljiva Julius Kühn Instituta. Da bi se pripremile suspezije s blastosporama kulture su prvo uzgajane minimum 14 dana na Potato Dextrose Agar (PDA, Carl Roth d.o.o., Njemačka) hranjivoj podlozi na 25 ± 2 °C, nakon čega su njihove konidije inokulirane u tekuću Potato

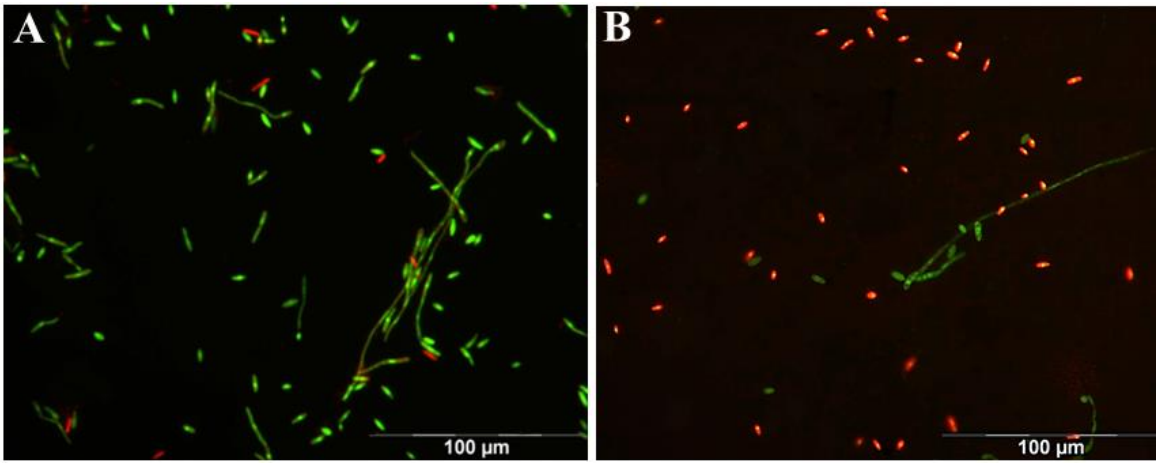
Glucose Broth (PDB, Carl Roth d.o.o., Njemačka) hranjivu podlogu. Tikvice s inokuliranim hranjivim podlogama inkubirane su 4 dana u orbitalnom shakeru na 25 °C i 150 rpm (okretaja po minuti-rotacijska brzina). Dobivena suspenzija blastospora filtrirala se kroz sterilnu pamučnu gazu (Mullro®), te se mikroskopski provjerila njezina čistoća radi eventualne prisutnosti drugih patogena (Slika 12).



Slika 12. Priprema pokusa A) sadnice hrasta lužnjaka; B) suspenzije blastospora; C) filtriranje suspenzije

Ispitivanje vitaliteta spora i određivanje koncentracija suspenzija

Koncentracija suspenzija spora određena je brojanjem spora u Thoma hemocitometru (BRAND d.o.o.+ CO KG, Wertheim, Njemačka) i suspenzije su razrijeđene do željene koncentracije (1 x 10^7spora/mL). Vitalitet spora ispitivao se miješanjem nekoliko kapi suspenzija s nekoliko kapi 0.01% Acridine orange bojila i pregledavanjem pod plavim fluorescentnim svjetlom (ekscitacija na 450–490 nm) Aristoplan epifluorescentnog mikroskopa (Leica, Wetzlar, Njemačka), temeljem čega se odredilo koje će se suspenzije koristiti u pokusu, odnosno koristile su se one suspenzije gdje je procijenjena vitalnost spora preko 80%. Spore su potom fotografirane sa CCD kamerom (ColorView II, Olympus) korištenjem softvera AnalySIS FIVE (Slika 13).



Slika 13. Potvrda vitaliteta spora *Beauveria brongniartii* 56 s Acridine orange bojilom: zelene blastospore- vitalne; crvene blastospore- mrtve A) prevladavanje vitalnih zelenih blastospora; B) prevladavanje mrtvih crvenih blastospora (epifluorescentni mikroskop)

Inokulacija lišća i korijena hrasta lužnjaka

Za inokulaciju lišća četiri biljke tretirane su uranjanjem lišća u suspenziju spora *B. bassiana,* dok su dvije kontrolne biljke uranjane u običnu vodu. Četiri manje biljke stavljane su u eksikator spojen na vakum pumpu gdje su okrenute naopako i uronjene u suspenziju spora držane po 30 i 90 min. Cilj je bio izvući zrak iz lišća kroz stome (puči) i potom ga polako vraćati nazad čime bi se potaknuo i eventualni ulazak spora u uronjene listove kroz prirodne otvore. Dvije kontrolne biljke držane su po 30 i 90 min u eksikatoru uronjene u običnu vodu.

Za inokulaciju korijena korištene su četiri biljke kojima je tlo zalijevano s po 100 mL suspenzije spora *B. brongniartii,* dok su dvije kontrolne biljke zalijevane s po 100 mL čiste PDB tekuće podloge.

Biljke su držane u kontrolnim uvjetima u stakleniku na temperaturi 21–22°C, sa 60–80% relativne vlažnosti zraka i dodatnim svjetlom iz natrijskih lampi (PLANTASTAR®, 400 W, NDL, 725 µmol s–1 photons, OSRAM), s fotoperiodom D:N = 16:8 h. Također, one biljke kojima je inokulirano lišće su prva tri dana nakon tretmana bile zamotane u plastične vrećice radi zadržavanja vlage.

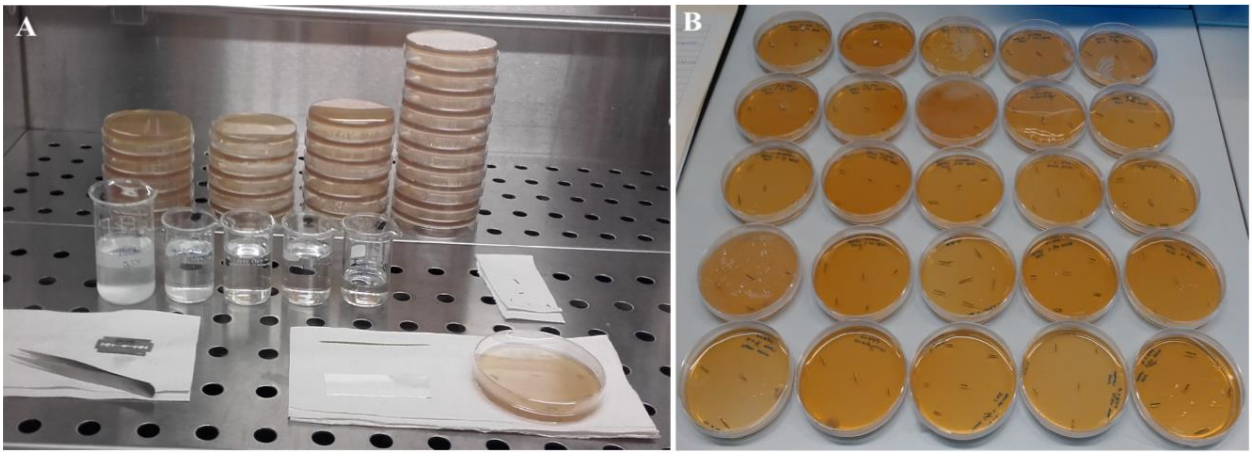
2.5.2. Ispitivanje endofitizma kod alepskog bora

Sakupljanje uzoraka

Sakupljanje uzoraka iglica alepskog bora provedeno je u rujnu i listopadu 2017. godine na području Dugog otoka i Skradina, na mjestima gdje su nađeni uzorci borovog prelca zaraženih gljivom *B. bassiana*. Uzimane su grančice s 5 stabala, iz donjeg i gornjeg dijela krošnje svakog stabla. U papirnatim vrećicama su prenesene u Laboratorij za fitopatološka ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta gdje su držane na 4 °C do daljnje obrade u laboratoriju Julius Kühn Instituta.

Metoda nasađivanja iglica na hranjivu podlogu

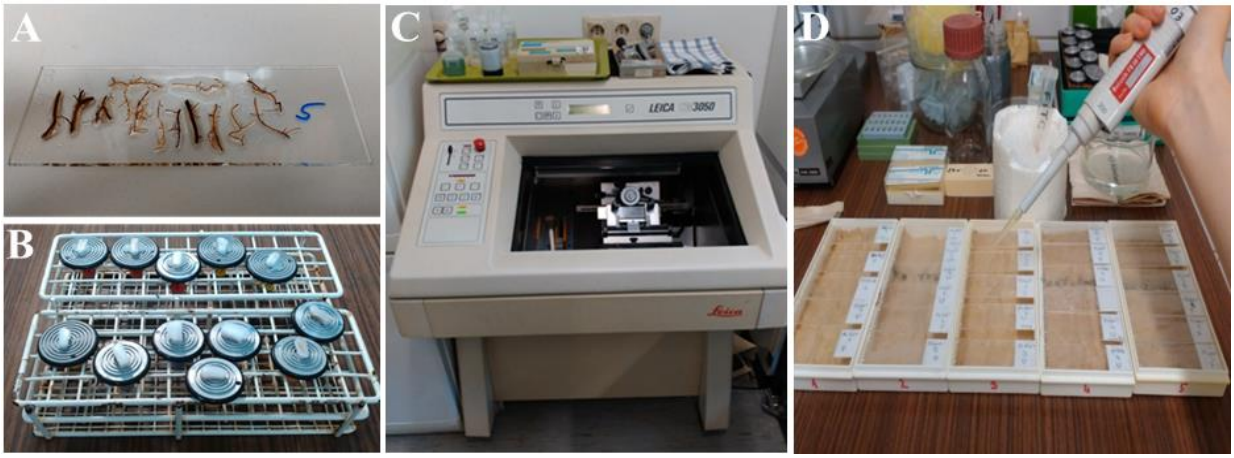
Odabrano je 30 iglica alepskog bora koje su površinski sterilizirane 3 min u natrijevom hipokloritu (NaOCl), 1 min u etanolu (70%), 2X po 15 sek u sterilnoj destiliranoj vodi i 1X 15 sek u otopini sterilne destilirane vode i Tween-a (0,005 %). Svaka iglica rezana je sterilnim priborom na 5-6 manjih komadića koji su potom nasađivani na MPA+A (Malt Peptone Agar) hranjivu podlogu oplemenjenu antibiotikom, te inkubirani na sobnoj temperaturi 14 dana (Slika 14). Pratio se razvoj endofitskih gljiva nakon čega je svaka i mikroskopski pregledana.



Slika 14. Obrada uzoraka iglica A) površinska sterilizacija; B) nasađivanje na hranjivu podlogu

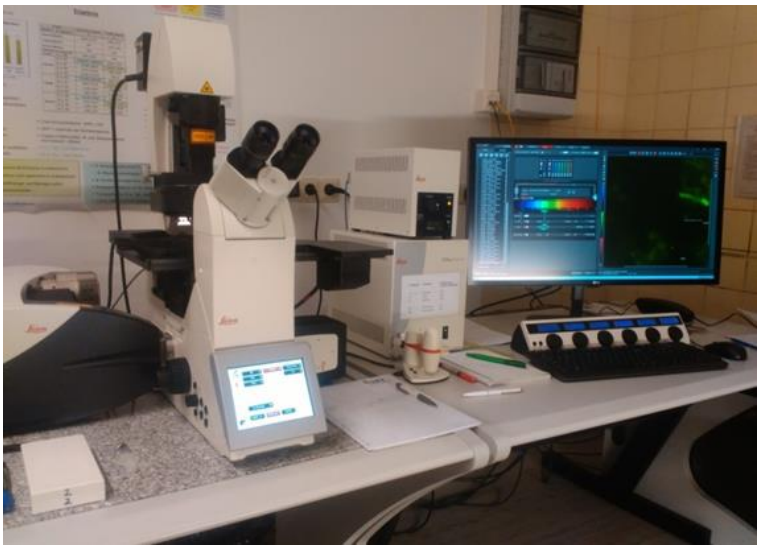
Detekcija prisutnosti Beuveria gljiva metodom imunofluorescencije

Prvo uzorkovanje inokuliranog lišća i korijenja hrasta lužnjaka izvršeno je nakon pet dana, i ponavljalo se sljedećih deset mjeseci, nasumičnim odabirom uzoraka. Za analizu iglica alepskog bora odabrano je ukupno 50 iglica. Uzorci listova i korijenja hrasta lužnjaka i iglica alepskog bora rezani su na komadiće veličine 5 mm (Slika 15A) i držani preko noći na 5°C u 4% paraformaldehidu (PFA) za fiksaciju tkiva. Komadići tkiva su potom dobro isprani u 0.1 x PBS fosfatnom puferu nakon čega su dehidrirani u etanolu i ugrađivani u Steedmanov vosak (sintetički poliesterski vosak s niskom točkom taljenja) prema metodologiji opisanoj u Ullrich i sur. (2017); prema Vitha i sur. (1997) (Slika 15B). Tako ugrađeni uzorci rezani su na tanke dijelove veličine 10–12 μm u mikrotomu (Cryocut CM 3050, Leica, Njemačka) (Slika 15C) i stavljani na predmetna stakalca obložena albumin-glicerolom. Vosak je uklonjen ispiranjem uzoraka u etanolu (20 min u 96% ETOH, 20 min u 90% ETOH, 15 min u 70% ETOH i 15 min u 50% ETOH), 5 min u 0.1 x PBS puferu, 30 min u MTSB puferu (Microtubule-stabilizing buffer) te 10 min u 100%-tnom metanolu ohlađenom na –20°C. Uzorci su potom 1,5 h inkubirani u otopini 1% serumskog albumin proteina BSA (Aurion) i 0.1 x PBS pufera na 22°C. Da bi se provela metoda imunofluorescencije, na uzorke je aplicirano po 200 μL otopine sa *Beauveria* primarnim specifičnim antitijelima (razrijeđenima u 1 x PBS puferu u omjeru 1:200) te su tijekom noći inkubirani na 4 °C. Sljedeći dan ispirani su u MTSB puferu te je na njih aplicirano po 200 μL otopine s fluorescentnim FITC sekundarnim specifičnim antitijelima (Molecular Probes, Göttingen, Njemačka), također razrijeđenima u 1 x PBS puferu u omjeru 1:200, nakon čega su inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi, ispirani 2 X po 5 min u PBS puferu te je na njih aplicirano 2.5%-tno 1.4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) sredstvo protiv izbljeđivanja (Slika 15D).



Slika 15. Obrada uzoraka lišća, korijenja i iglica A) uzorci korijenja hrasta lužnjaka; B) ugrađivanje u Steedmanov vosak; C) rezanje uzoraka u mikrotomu; D) apliciranje otopine sa *Beauveria* specifičnim antitijelima

Uzorci su se analizirali pomoću CLSM konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa (Leica TCS SP8 confocal microscope, Njemačka) pod plavim fluorescentnim svjetlom (ekscitacija na 450–490 nm), a spore i hife fotografirane su korištenjem Leica Application Suite X (LAS X) imaging softvera za konfokalnu mikroskopiju (Slika 16). Mikroskopski je pregledano 350 preparata s više od 5000 uzoraka komadića lišća i korijenja hrasta lužnjaka te 42 preparata s oko 800 uzoraka komadića iglica alepskog bora obrađenih ovom metodom.



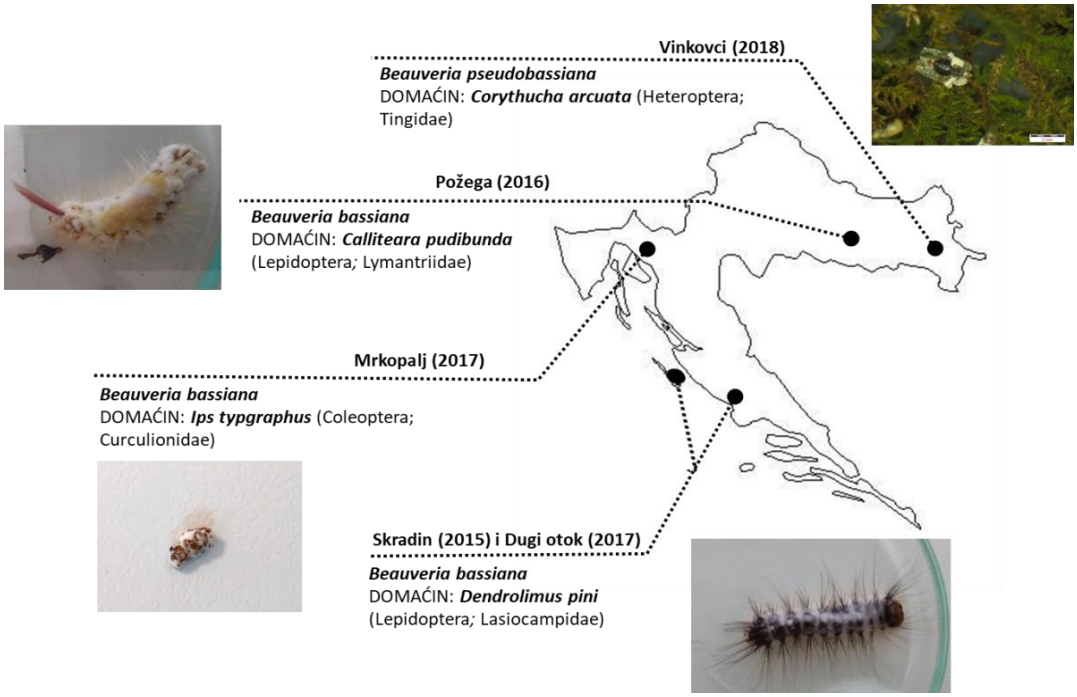
Slika 16. Pregled obrađenih uzoraka pomoću CLSM konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa

3. REZULTATI

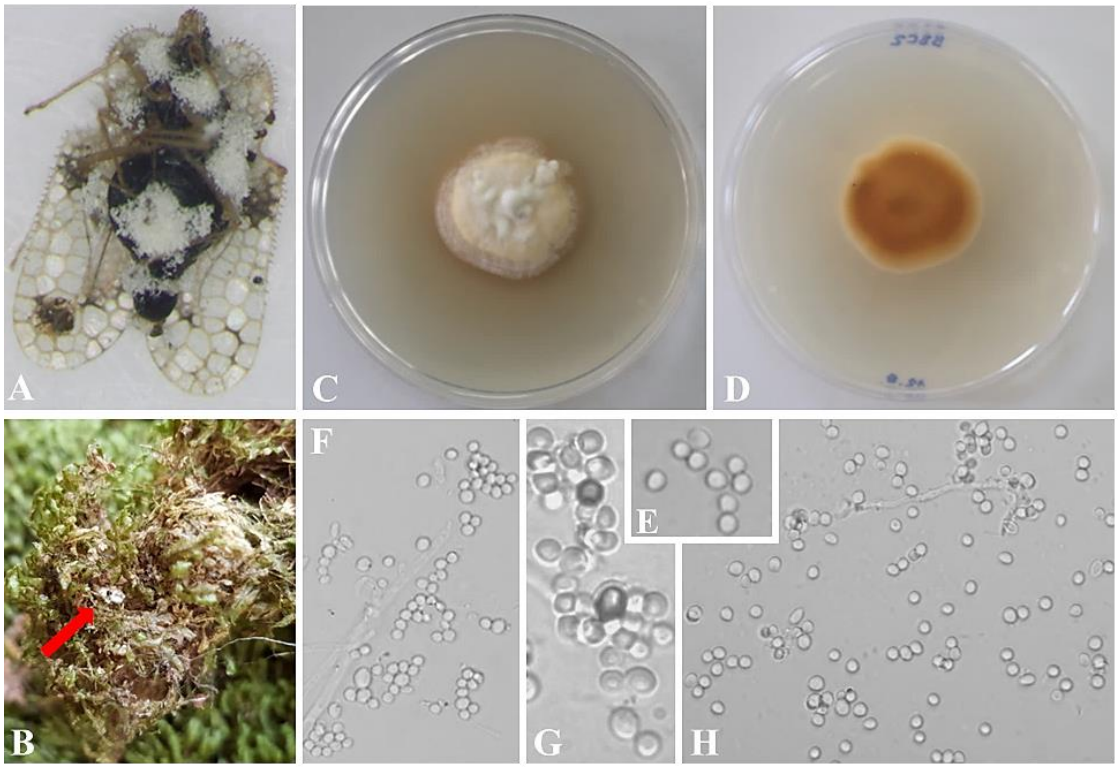
Morfološke, molekularne i filogenetske analize izolata dobivenih s prirodno zaraženih kukaca potvrdile da se radi o sojevima entomopatogenih gljiva koje pripadaju vrstama iz roda *Beauveria*, a morfološke i molekularne analize izolata entomopatogenih gljiva dobivenih iz tla pokazale su da su gljive roda *Beauveria* prirodno prisutne u šumskom tlu na većini istraživanih lokaliteta.

3.1. Izolacija i morfološka identifikacija izolata s kukaca

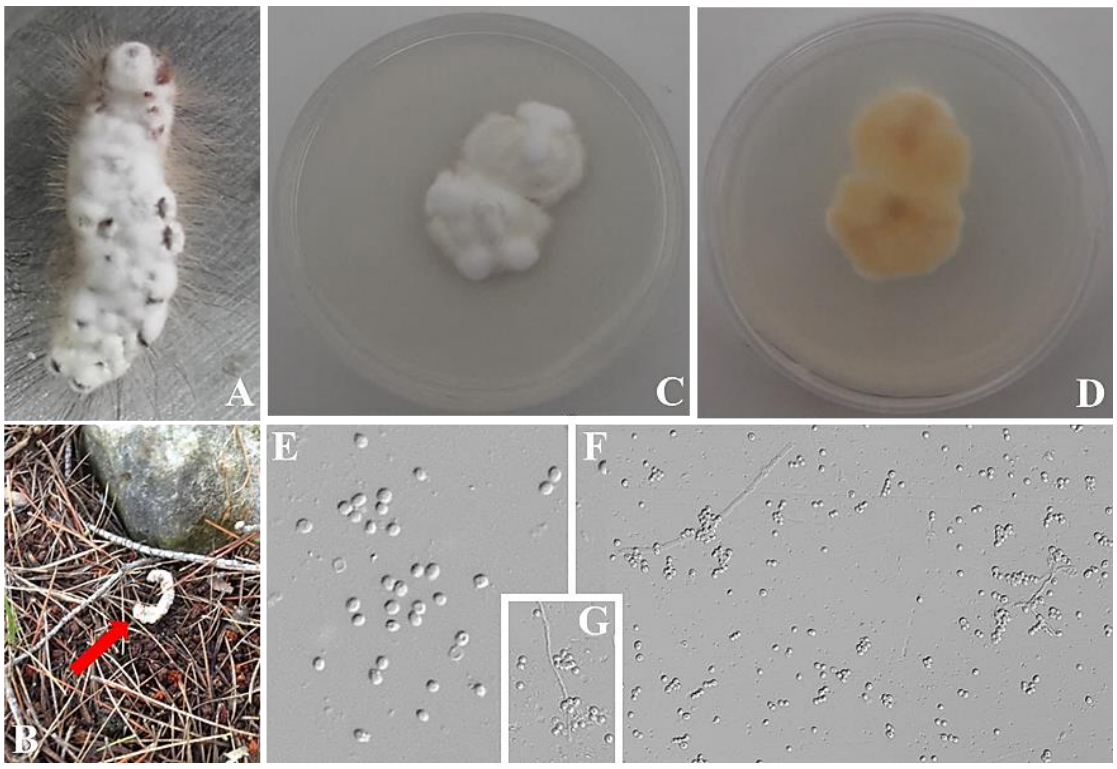
Sveukupno 12 izolata dobiveno je iz prirodno zaraženih kukaca sakupljenih na različitim lokacijama u različitim tipovima šumskih zajednica u Hrvatskoj. Na temelju njihovih morfoloških značajki identificirane su vrste *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* (Slika 17). Vrsti *B. pseudobassiana* pripadali su izolati dobiveni iz domaćina *C. arcuata* (BBC1, BBC2, BBC3, BBC4, BBC6, BBC8, BBC10 i BBNK1), dok su izolati dobiveni iz ostalih domaćina pripadali vrsti *B. bassiana* (BBITS, BBS, BBT i MCP). Morfološke značajke identificiranih vrsta opisane su u Tablici 3, te vizualno prikazane na Slikama 18. i 19.



Slika 17. Identificirane vrste *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* iz prirodno zaraženih kukaca na različitim lokacijama i tipovima šumskih zajednica u Hrvatskoj



Slika 18. *Beauveria pseudobassiana* A) i B) zaraženi adult *Corythucha arcuata*; C) kultura razvijena na PDA podlozi nakon 14 dana prednja strana; D) kultura razvijena na PDA podlozi nakon 14 dana stražnja strana; E) konidije; F), G) i H) konidije i konidiofori



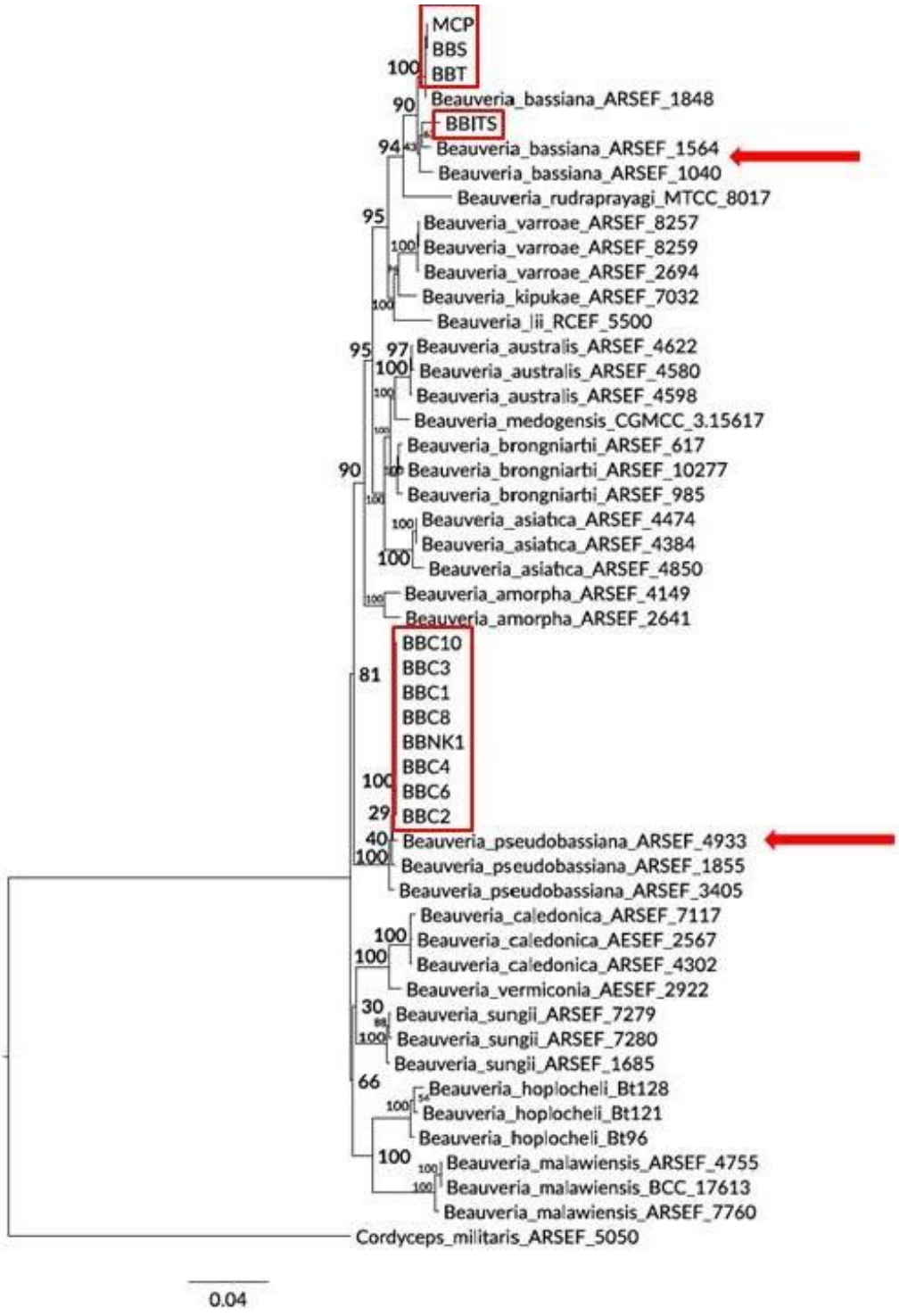
Slika 19. *Beauveria bassiana* A) i B) zaraženi adult *Dendrolimus pini*; C) kultura razvijena na PDA podlozi nakon 14 dana- prednja strana; D) kultura razvijena na PDA podlozi nakon 14 dana- stražnja strana; E) konidije; F) i G) konidije i konidiofori

Tablica 3. Glavne morfološke karakteristike dvije prepoznate vrste *Beauveria* gljiva pronađenih na različitim kukcima domaćinima

Izolat	**Vrsta**	**Kultura**	**Konidiogene stanice**	**Konidije**
BBC1 BBC2 BBC3 BBC4 BBC6 BBC8 BBC10 BBNK1	*Beauveria pseudobassiana*	u početku bijela, s vremenom postaje blijedo žuta do žućkasto-smeđa, micelij gust i praškast tijekom sporulacije, s vremenom manje praškast; ponekad stvara eksudate u obliku kapljica; mijenja boju hranjive podloge u svijetlo smeđkasto-ljubičastu; naličje žuto-smeđe boje s bijelim rubom	konidiofori pojedinačni i obično se sastoje od gustih sferičnih lateralnih nakupina konidiogenih stanica; konidiogene stanice okruglaste ili oblika boce, s izduženim simpodijalnim nastavcima koji daju cik-cak izgled, 3−6 × 1.3−2.5 µm	okrugle do subglobozne, ponekad elipsoidne, jednostanične, hijalinske, 2.5−3.7 × 1.4−3.1 µm
BBITS BBS BBT MCP	*Beauveria bassiana*	bijela do prljavo bijela, micelij gust i praškast, s vremenom sve više praškast; nisu zabilježeni eksudati; ne mijenja boju hranjive podloge; naličje bijelo do žućkasto	konidiofori 1-2 µm široki i sastoje se od gustih nakupina kratkih konidiogenih stanica; konidiogene stanice okruglaste, jajolike ili oblika boce, s uskim izduženim simpodijalnim nastavcima istaknutog cik-cak izgleda, 3–6 x 3–5 µm	okrugle do subglobozne, jednostanične, hijalinske, 2–3 × 2–3 µm

3.2. Molekularne i filogenetske analize izolata s kukaca

Molekularnim analizama potvrđeno je da se radi o navedenim vrstama te su filogenetskim analizama izolati MCP, BBS, BBT i BBITS grupirani s referentnim *B. bassiana* sojevima, dok su izolati BBC1, BBC2, BBC3, BBC4, BBC6, BBC8, BBC10 i BBCNK1 grupirani s referentnim *B. pseudobassiana* sojevima (Slika 20).



Slika 20. Filogenetsko stablo odabranih izolata i srodnih vrsta na temelju ITS and Bloc molekularnih markera

3.3. Izolacija i morfološka i molekularna identifikacija izolata iz tla

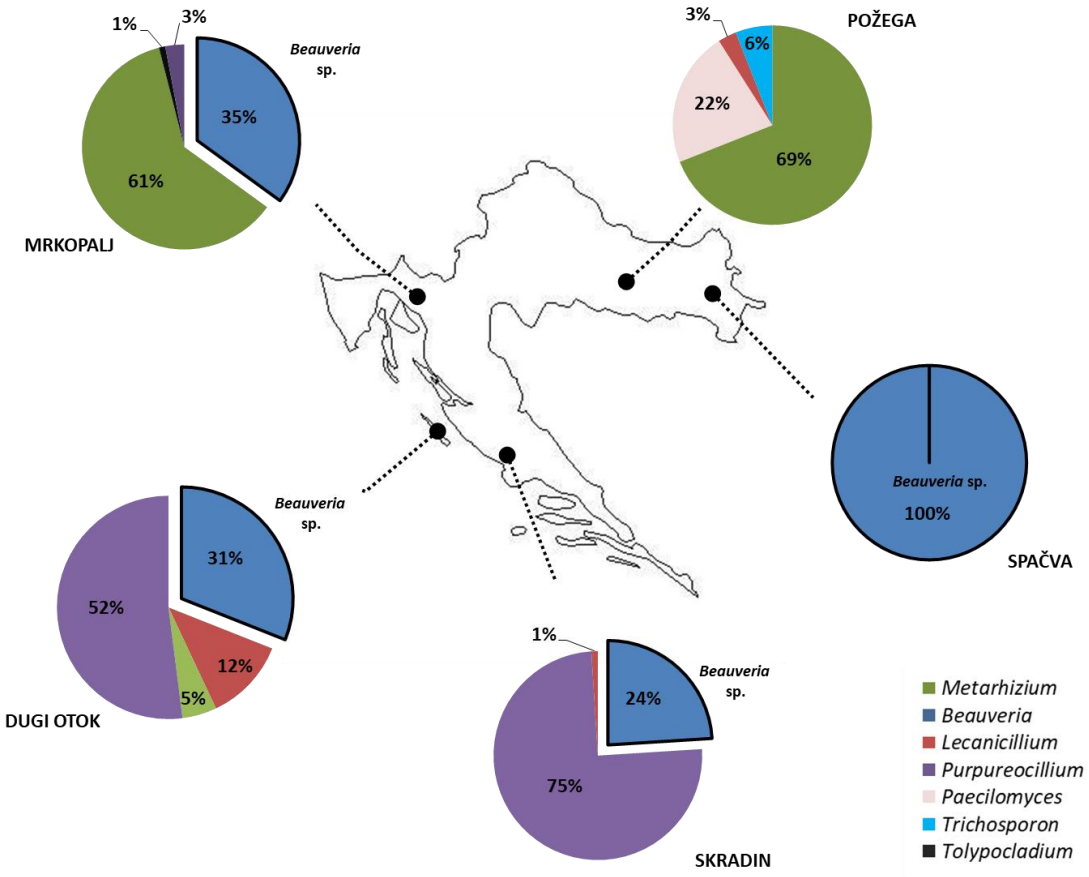
Izolacijom entomopatogenih gljiva iz tla metodom korištenja selektivne hranjive podloge dobiveno je 42 izolata s po pet točaka na pet lokacija u Hrvatskoj: Dugi otok (8), Skradin (11), Spačva (7), Mrkopalj (8) i Požega (8). Nakon morfoloških i molekularnih analiza potvrđeno je da njih 28 pripada rodovima entomopatogenih gljiva: *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Purpureocillium* sp., *Lecanicillium* sp., *Tolypocladium* sp., *Paecilomyces* sp. i *Trichosporon* sp., dok njih 14 pripada rodovima gljiva kojima nije potvrđena patogenost na kukcima, ali koje mogu biti patogene na drugim organizmima (npr. vrste roda *Pochonia* koje su patogene na štetnim nematodama u tlu i razvijaju se i komercijaliziraju kao biološki pesticidi). To ujedno pokazuje i da selektivna hranjiva podloga namijenjena izolaciji isključivo entomopatogenih gljiva (Strasser i sur. 1996) nije selektivna i za ove vrste.

Gustoća kolonija (eng. CFU- colony-forming units) dobivena izračunom prosječnog broja kolonija u 1 g tla po ponavljanjima i po točkama svake lokacije pokazala je da se raspon ukupne gustoće kolonija entomopatogenih gljiva u tlu kreće od 4 X 10^3 do 29 X 10^3 CFU g^{-1}. Najveća sveukupna prosječna gustoća (broj) kolonija entomopatogenih gljiva zabilježena je na lokaciji 5 (Požega), dok je najmanja zabilježena na lokaciji 3 (Spačva) (Tablica 4).

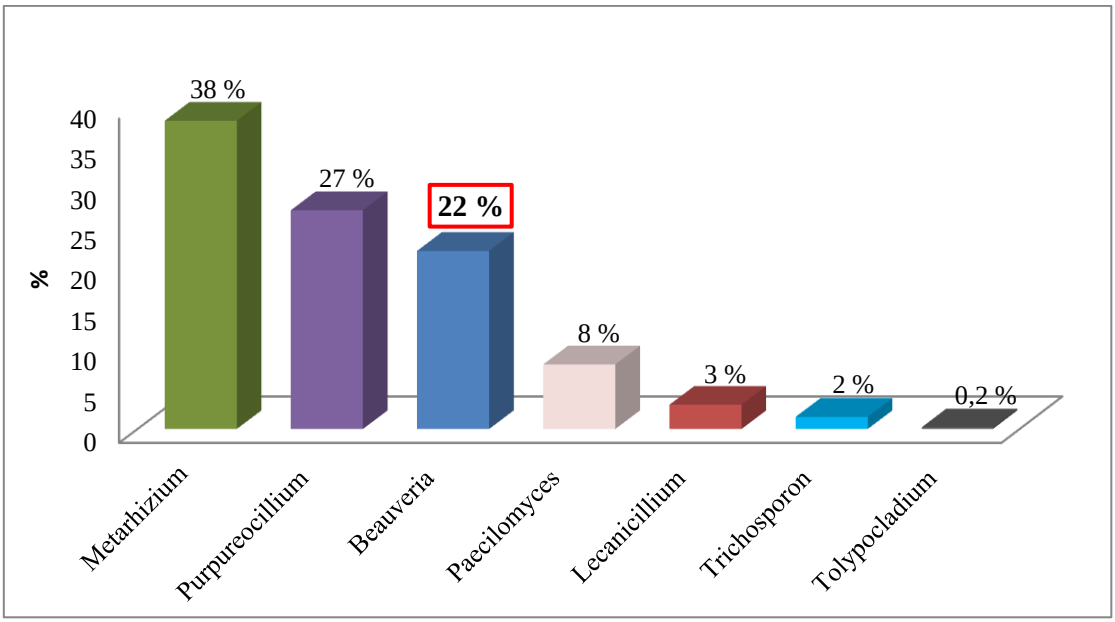
Tablica 4. Identificirane vrste gljiva i gustoća njihovih kolonija (CFU g^{-1}) u tlu po lokacijama uzorkovanja

IDENTIFICIRANE VRSTE	prosječan broj kolonija-CFU u 1 g tla po lokacijama uzorkovanja (CFU X 10^3 g^{-1})				
	LOKACIJA 1 (Dugi otok)	**LOKACIJA 2** (Skradin)	**LOKACIJA 3** (Spačva)	**LOKACIJA 4** (Mrkopalj)	**LOKACIJA 5** (Požega)
Entomopatogene gljive					
***Beauveria* sp.**	**2,6**	**5,3**	**4**	**6,2**	**-**
Metarhizium sp.	0,4	-	-	11	20
Purpureocillium sp.	4,4	17	-	0,6	-
Lecanicillium sp.	1	0,3	-	-	1
Tolypocladium sp.	-	-	-	0,2	-
Paecilomyces sp.	-	-	-	-	6,4
Trichosporon sp.	-	-	-	-	1,6
∑	8,4	22,6	**4**	18	**29**
Gljive kojima nije potvrđena patogenost na kukcima					
Pochonia sp.	10	3,3	8,7	5,4	-
Absidia sp.	0,08	-		-	5
Pseudogymnoascus sp.	-	-	0,6	-	-
∑	10,1	3,3	9,3	5,4	5
ukupan ∑	18,5	25,9	13,3	23,4	34

Najčešće pojavljivane bile su entomopatogene gljive roda *Beauveria*, koje su zabilježene na 4/5 lokacija, te na 16/25 točaka uzorkovanja. Sveukupan prosječan broj njihovih kolonija na svim lokacijama iznosio je 3,6 X 10^3 CFU g^{-1}, a njihov ukupan udio bio je 22 %. Samo na lokaciji 3 njihov udio bio je 100 %, na ostalim lokacijama bio je 31 % (1), 24 % (2) i 35 % (4), dok na lokaciji 5 ove gljive nisu nađene niti na jednoj točki uzorkovanja. Na lokacijama 1, 4 i 5 zabilježena je veća raznolikost entomopatogenih gljiva nego na lokacijama 2 i 3 (Slika 21). Ukupan udio svih identificiranih vrsta entomopatogenih gljiva u tlu na svim lokacijama grafički je prikazan na Slici 22.



Slika 21. Udio identificiranih vrsta entomopatogenih gljiva u tlu po lokacijama



Slika 22. Ukupan udio identificiranih vrsta entomopatogenih gljiva u tlu na svim lokacijama

3.4. Rezultati ispitivanja utjecaja insekticida na klijavost spora i razvoj izolata

Radi što točnijih rezultata ispitivanja kompatibilnosti insekticida ASSET i izolata *B. bassiana* (BBS), *B. pseudobassiana* (BBC10) i *B. pesudobassiana* (BBNK1) ispitan je utjecaj insekticida na klijavost spora i na razvoj kultura izolata, i to u preporučenoj koncentraciji (0,1%) i u nižoj, 'ultra low' (UL) koncentraciji (0,003 %). Rezultati ispitivanja prikazani su u Tablici 5 i Tablici 6.

Utjecaj insekticida na klijavost spora izolata BBS, BBC10 i BBNK1

Tablica 5. Klijavost spora (konidija) ispitivanih izolata nakon 24 h u različitim tretmanima; proklijale konidije (G), neproklijale konidije (N)

BBC10	osnovna suspenzija		preporučena koncentracija		ultra low koncentracija	
	G	**N**	**G**	**N**	**G**	**N**
Petri 1	99	1	100	0	99	1
	100	0	100	0	100	0
	100	0	99	1	100	0
Petri 2	99	1	99	1	99	1
	100	0	99	1	98	2
	100	0	100	0	99	1
average	≥ 99 %		≥ 99 %		≥ 99%	

BBS	osnovna suspenzija		preporučena koncentracija		ultra low koncentracija	
	G	**N**	**G**	**N**	**G**	**N**
Petri 1	99	1	99	1	100	0
	100	0	99	1	100	0
	99	1	100	0	99	1
Petri 2	100	0	100	0	100	0
	100	0	99	1	99	1
	100	0	100	0	100	0
average	≥ 99 %		≥ 99 %		≥ 99%	

BBNK1	osnovna suspenzija		preporučena koncentracija		ultra low koncentracija	
	G	**N**	**G**	**N**	**G**	**N**
Petri 1	99	1	98	2	99	1
	99	1	99	1	100	0
	99	1	100	0	99	1
Petri 2	99	1	99	1	99	1
	100	0	98	2	100	0
	99	1	99	1	99	1
average	≥ 99 %		≥ 98 %		≥ 99%	

Rezultati pokusa pokazali su da je prosječna klijavost spora u većini tretmana i ponavljanja bila jednaka ili veća od 99 % te da insekticid ASSET u preporučenoj i ultra low koncentraciji nije inhibirao klijavost spora niti jednog *Beauveria* izolata 24 h nakon inokulacije.

Utjecaj insekticida na razvoj kultura izolata BBS, BBC10 i BBNK1

Tablica 6. Razvoj kultura ispitivanih izolata nakon 14 dana u različitim tretmanima; prosječna razvijenost u odnosu na kontrolu u postotku

Izolat	Koncentracija insekticida	Prosječna razvijenost kultura (% u odnosu na kontrolu)		
		nakon 3 dana	nakon 5 dana	nakon 7 dana
BBS	A	101.6 ± 0.5	95.5 ± 0.5	97.4 ± 1
	B	96.6 ± 0.4	95.5 ± 0.7	101.7 ± 1.3
BBC10	A	109.4 ± 0.3	92.7 ± 0.5	78.4 ± 0.7
	B	105,6 ± 0.5	98.8 ± 0.8	97.3 ± 0.9
BBNK1	A	105.6 ± 0.5	106.4 ± 1.5	105 ± 1.6
	B	105.6 ± 0.5	103.8 ± 0.9	98.3 ± 1

A- preporučena (0.1 %) koncentracija
B- ultra low (3 % od preporučene koncentracije, tj. 0.003%)
±- standardna devijacija

Rezultati pokusa pokazali su da insekticid ASSET nema negativni učinak na rast i razvoj kultura izolata BBS (*B. bassiana*) i BBNK1 (*B. pseudobassiana*).

Prosječni promjer kultura oba izolata u svim ponavljanjima dosezao je preko 95 % prosječnog promjera kultura u kontroli, s čak pomalo stimulirajućim efektom kod izolata BBNK1, gdje je kultura na podlozi u kombinaciji s insekticidom u preporučenoj koncentraciji nakon 7 dana razvila promjer duljine 105 % duljine promjera kultura u kontroli, dok je kod izolata BBS kultura na podlozi u kombinaciji s insekticidom u ultra low koncentraciji razvila promjer duljine 101.7 % duljine promjera kultura u kontroli.

Kod izolata BBC10 (*B. pseudobassiana*) na podlozi s preporučenom koncentracijom insekticida promjer kulture se nakon 7 dana razvio u duljini 78.4 % duljine promjera u kontroli. Također, uobičajeno obojenje PDA podloge u smećkasto-ljubičastu izostalo je ili je bilo vrlo blago u odnosu na obojenje podloge u kontroli i u kombinaciji s insekticidom u ultra low koncentraciji (Slika), gdje je razvoj kulture neznatno inhibiran (otprilike 2.7 % u usporedbi s kontrolom).

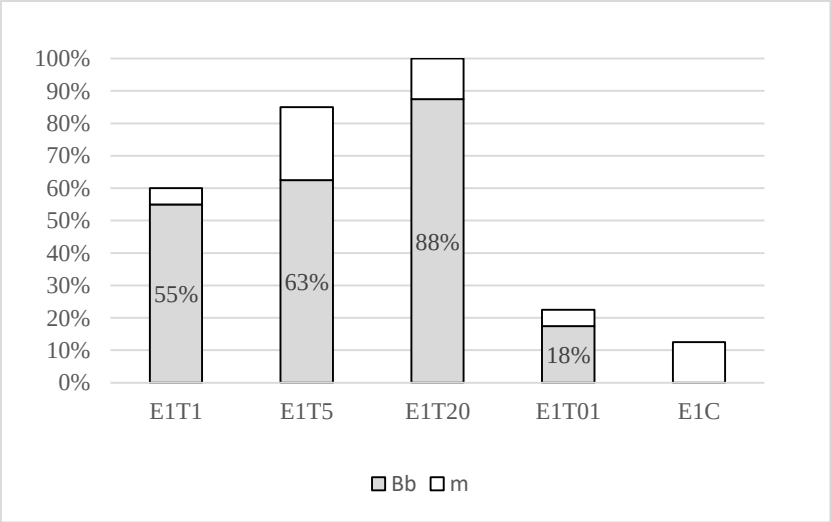
3.5. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćeg soja *B. bassiana* na borovom prelcu

U oba provedena pokusa korišten je izolat BBS dobiven s kadavera borovog prelca prirodno zaraženog gljivom *B. bassiana*. Nakon pripreme suspenzija spora vitalnost spora (konidija) provjerena je i rezultati su pokazali da je njihova klijavost u svim ponavljanjima bila jednaka ili veća od 99%, stoga su pripremljene suspenzije bile pogodne za korištenje u pokusima. U svrhu provođenja Pokusa 2 također je provjerena i kompatibilnost izolata BBS i insekticida ASSET, koji je za ovaj pokus korišten u UL koncentracijama i dozama. Prethodno je ispitan i učinak ASSET-a na gusjenice borovog prelca korištenjem doza i koncentracija preporučenih po proizvođaču tog sredstva, no to je rezultiralo mortalitetom od 100% već drugi dan od postavljanja pokusa i taj tretman je uklonjen iz daljnjih analiza, a doze i koncentracije su se dodatno ispitale postupnim smanjivanjem dok se nije došlo do pogodne (UL) za daljnje korištenje u pokusu. Također, ispitao se i utjecaj niže temperature (16 °C) na učinak izolata BBS, a analiza tog tretmana je provedena zasebno jer se taj dio pokusa pratio 28 dana (4 tjedna), radi mogućeg prolongiranog učinka zaraze, odnosno sporijeg djelovanja gljive na mortalitet i razvoj micelija na gusjenicama.

POKUS 1

Mortalitet

Rezultati su pokazali da je najviši mortalitet zabilježen u Grupi C gdje je korištena doza od 20 µL po gusjenici s koncentracijom od 7,9 x 10^4 spora/µl, a iznosio je 100% s mikozom, odnosno postotkom uginuća uzrokovanim zarazom gljive *B. bassiana* od 88%. Ista koncentracija s dozom od 5 µL po gusjenici u grupi B rezultirala je mortalitetom od 85% i mikozom na 63% gusjenica, dok je također ista koncentracija s dozom od 1 µL po gusjenici u grupi A rezultirala mortalitetom od 60% i mikozom ona 55% gusjenica. Najniža stopa mortaliteta zabilježena je u Grupi D gdje je iznosila 23% s mikozom od 18%, u kojoj je korištena doza od 1 µL po gusjenici s koncentracijom od 7,9 x 10^2 spora/µl, odnosno suspenzija razrijeđena u omjeru 1:100. U kontrolnoj grupi zabilježen je mortalitet od 13%, te niti jedna gusjenica nije pokazala simptome zaraze gljivom *B. bassiana* (Slika 23).



Slika 23. Grafički prikaz stope mortaliteta po tretmanima. Sive kolone (Bb) predstavljaju mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana* (mikozu), dok bijele kolone (m) u pozadini predstavljaju ukupan mortalitet

Tablica 7. Apsolutne i relativne stope ukupnog mortaliteta i mortaliteta uzrokovanog zarazom gljive *B. bassiana* (mikoze) u tretmanima i odgovarajući rezultati Hi-kvadrat testa. Vrijednosti koje nisu statistički značajno različite od LD_{100} su istaknute podebljano, dok su vrijednosti za koje H0 ne može biti prihvaćena niti odbijena prikazane u kurzivu

Grupa (tretman)	A (E1T1)		B (E1T5)		C (E1T20)		D (E1T01)		E (E1C)	
Stopa mortaliteta	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel
Ukupno	*24*	*60%*	**34**	**85%**	**40**	**100%**	9	23%	5	13%
$\chi 2$ (p)	*6,40 (0,0114)*		**0,90 (0,3428)**		**0,00 (1,0000)**		24,03 (<0,0001)		30,63 (<0,0001)	
B. bassiana	22	55%	*25*	*63%*	**35**	**88%**	7	18%	0	0%
$\chi 2$ (p)	8,10 (0,0044)		*5,63 (0,0177)*		**0,63 (0,4292)**		27,23 (<0,0001)		40,00 (0,0000)	

Prema Hi-kvadrat testu tretman u Grupi C jedini je pokazao da nije statistički značajno različit od LD_{100} i za ukupni mortalitet i za mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana*. Tretman u Grupi B je pokazao da nije statistički značajno različit od LD_{100} ali samo za ukupni mortalitet, dok je za mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana* statistički značajna razlika ipak morala biti prihvaćena. Tretmani u grupi A i D kao i u kontrolnoj grupi E su se u oba slučaja pokazali kao statistički značajno različiti od LD_{100} (Tablica 7).

Brzina ugibanja

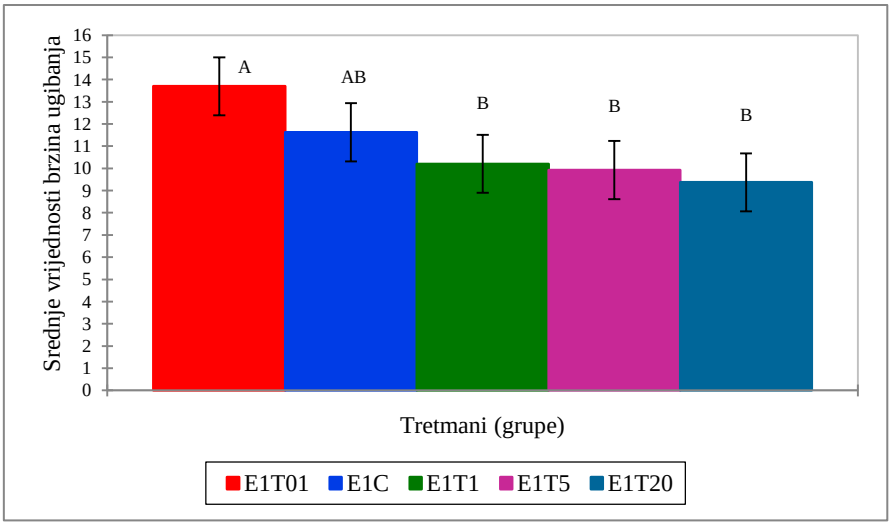
Najveća prosječna brzina ugibanja od 9,4 dana od početka tretmana zabilježena je u Grupi C, te su ju slijedile Grupa B sa 9,9 dana, te Grupa A sa 10,2 dana u prosjeku. Najviše vrijednosti, odnosno najniže brzine ugibanja imale su Grupa D sa najnižom korištenom dozom i koncentracijom spora te kontrolna grupa E. Pomoću ANOVA statističke metode utvrđeno je da postoje značajne razlike u brzini ugibanja između grupa (tretmana) (Tablica 8).

Međutim, za testiranje mogućih odstupanja od normalne distribucije podataka korišten je Shapiro-Wilks test koji je pokazao da podaci ne slijede normalnu distribuciju (W = 0,961; p-vrijednost (dvosmjerna) = 0,009), ukazujući na to da uvjeti valjanosti nisu ispunjeni, stoga je napravljen i neparametarski test s istim skupom podataka.

Tablica 8. Deskriptivna statistika i rezultati parametarskih i neparametarskih testova razlika u brzini ugibanja između tretmana

Tretman	N	min	max	$\bar{x}$	Sd	ANOVA		Kruskal-Wallis	
E1C	40	0,000	15,000	11,625	5,092	DF	4	K (Promatrana vrijednost)	40,230
E1T01	40	2,000	15,000	13,700	3,164	Suma kvadrata odstupanja	484,430	K (Kritična vrijednost)	9,488
E1T1	40	0,000	15,000	10,200	4,794	Srednji kvadrati odstupanja	121,108	DF	4
E1T20	40	2,000	15,000	9,375	2,862	F	6,901	**p-vrijednost (jednosmjerna)**	**< 0,0001**
E1T5	40	0,000	15,000	9,925	4,543	**Pr > F**	**<0,0001**		

Korištenjem Tukey testa višestruke usporedbe razlika između kategorija sa intervalom pouzdanosti od 95% tretmani su grupirani u dvije skupine; skupina A)- tretman sa najnižom korištenom dozom i koncentracijom spora (E1T01); skupina B)- tretmani u kojima je korišteno 1 µl (E1T1), 5 µl (E1T5) i 20 µl (E1T20) suspenzije spora; dok se kontrolni tretman (E1C) nije razlikovao između skupina (Slika 24).

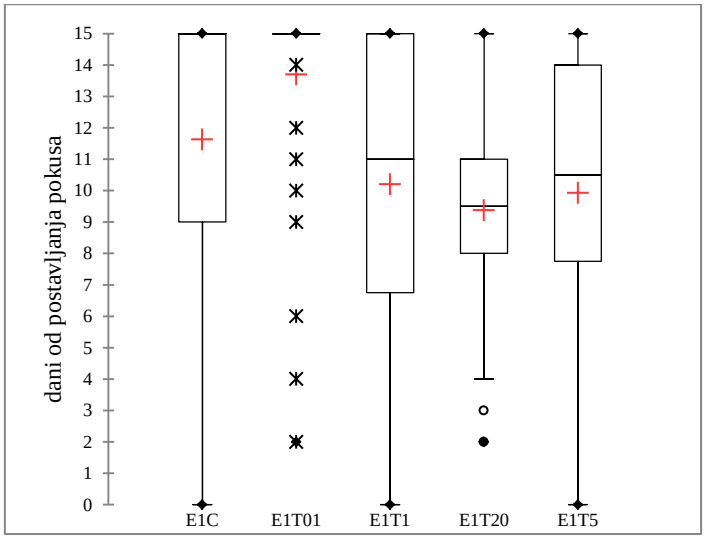


Slika 24. Tukey-ev test višestruke usporedbe razlika u brzinama ugibanja između tretmana sa intervalom pouzdanosti od 95%. Slovne oznake označavaju tretmane za koje je testom utvrđeno da temeljem razlika pripadaju određenoj grupi. Tretman koji nosi više slovnih oznaka temeljem testa nije mogao biti izdiferenciran između grupa čije slovne oznake nosi

Neparametarski test također je pokazao značajnu razliku u brzini ugibanja između tretmana (Tablica 8), a višestruka usporedba parova korištenjem Steel-Dwass-Critchlow-Flinger metode rezultirala je grupiranjem tretmana u tri skupine (Tablica 9). Prema ovoj analizi tretman E1T20 je jasno dodijeljen skupini A), tretmani E1T1 i E1T5 se nisu razlikovali od skupina A) i B), kontrolni tretman (E1C) se nije razlikovao od skupina B) i C), dok se tretman sa najnižom korištenom dozom i koncentracijom spora (E1T01) jasno razlikovao od ostalih, odnosno dodijeljen je skupini C). Razlike između tretmana su jasno vidljive u Box-Whiskers dijagramu (Slika 25).

Tablica 9. Rezultati višestruke usporedbe parova korištenjem Steel-Dwass-Critchlow-Flinger metode / Dvosmjerni test

Tretman	Frekvencije	Zbroj rangova	Srednja vrijednost rangova	Grupe		
E1T20	40	2802,000	70,050	A		
E1T5	40	3396,500	84,913	A	B	
E1T1	40	3626,500	90,663	A	B	
E1C	40	4632,500	115,813		B	C
E1T01	40	5642,500	141,063			C



Slika 25. Box-Whiskers dijagram brzina ugibanja po tretmanima. E1T20 tretman pokazuje najnižu srednju vrijednost i najmanje rasipanje podataka, a slijede ga tretmani E1T5 i E1T1, dok tretman E1T01 pokazuje najvišu vrijednost, čak i višu od kontrolnog tretmana. Simbol + predstavlja aritmetičku sredinu, središnja linija pravokutnika predstavlja medijanu, donja i gornja linija pravokutnika predstavljaju prvi (donji) i treći (gornji) kvartil, vodoravne linije na krajevima raspona predstavljaju standardnu devijaciju, dok ostali simboli predstavljaju vrijednosti koje odudaraju od statistički objašnjivih opservacija

Prestanak hranjenja

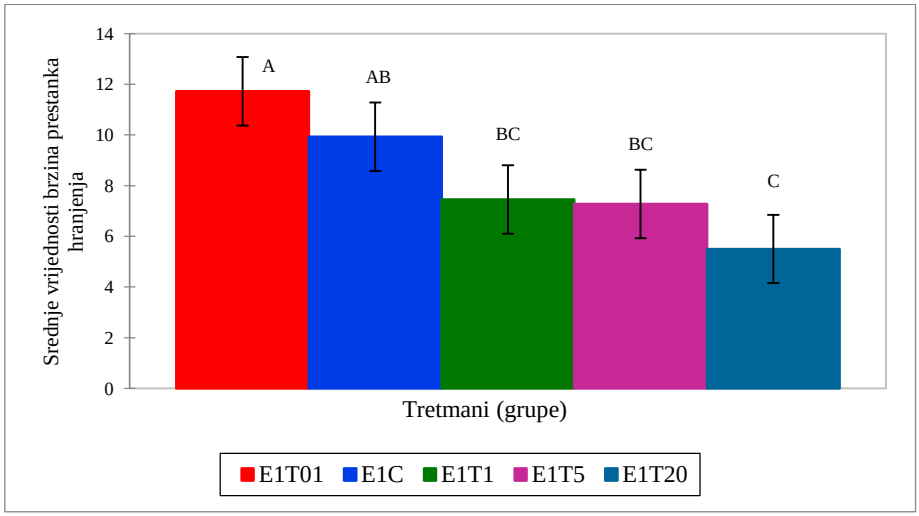
Najniža vrijednost brzine prestanka hranjenja zabilježena je u tretmanu E1T20 (Grupi C), kojeg su slijedili tretmani E1T5 (Grupa B) i E1T1 (Grupa A). Najviše vrijednosti, odnosno najniže brzine prestanka hranjenja zabilježene su očekivano u kontrolnom tretmanu (E1C) i tretmanu E1T01 sa najnižom korištenom dozom i koncentracijom spora (Grupa D) (Slika 26). Razlike između grupa (tretmana) bile su značajne, što je određeno pomoću ANOVA statističke metode (Tablica 10).

Međutim, Shapiro-Wilks test pokazao je da podaci ne slijede normalnu distribuciju (W = 0,977; p-vrijednost (dvosmjerna) = 0,002), ukazujući na to da uvjeti valjanosti nisu ispunjeni, stoga je napravljen i neparametarski test s istim skupom podataka.

Tablica 10. Deskriptivna statistika i rezultati parametarskih i neparametarskih testova razlika u brzini prestanka hranjenja između tretmana

Tretman	N	min	max	$\bar{x}$	Sd	ANOVA		Kruskal-Wallis	
E1C	40	0	15	9,925	5,498	DF	4	K (Promatrana vrijednost)	39,359
E1T01	40	1	15	11,725	3,803	Suma kvadrata odstupanja	958,250	K (Kritična vrijednost)	9,488
E1T1	40	0	15	7,450	4,766	Srednji kvadrati odstupanja	239,563	DF	4
E1T20	40	1	15	5,500	2,755	F	12,782	**p-vrijednost (jednosmjerna)**	**< 0,0001**
E1T5	40	0	15	7,275	4,326	**Pr > F**	**<0,0001**		

Tukey-ev test višestruke usporedbe razlika između kategorija sa intervalom pouzdanosti od 95% grupirao je tretmane u tri skupine; tretman sa najnižom korištenom dozom i koncentracijom spora (E1T01) dodijeljen je skupini A); kontrolni tretman (E1C) se nije razlikovao od skupina A) i B); tretmani E1T1 i E1T5 se nisu razlikovali od skupina B) i C); a tretman E1T20 dodijeljen je skupini C) (Slika 26).

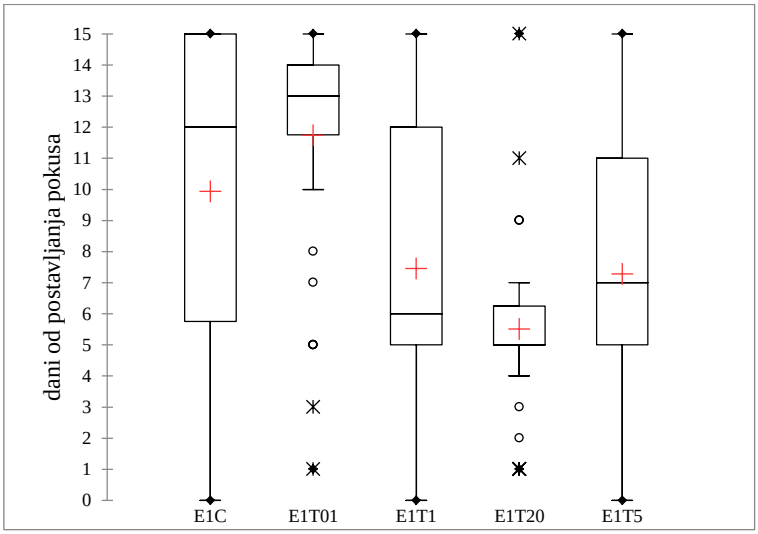


Slika 26. Tukey-ev test višestruke usporedbe razlika u brzinama prestanka hranjenja između tretmana sa intervalom pouzdanosti od 95%. Slovne oznake označavaju tretmane za koje je testom utvrđeno da temeljem razlika pripadaju određenoj grupi. Tretman koji nosi više slovnih oznaka temeljem testa nije mogao biti izdiferenciran između grupa čije slovne oznake nosi

Neparametarski test također je pokazao značajnu razliku u brzini prestanka hranjenja između tretmana (Tablica 10), a višestruka usporedba parova korištenjem Steel-Dwass-Critchlow-Flinger metode rezultirala je grupiranjem tretmana u tri skupine (Tablica 11). Prema ovoj analizi tretman E1T20 je jasno dodijeljen skupini A), tretmani E1T1 i E1T5 se nisu razlikovali od skupina A) i B), kontrolni tretman (E1C) se nije razlikovao od skupina B) i C), dok se tretman sa najnižom korištenom dozom i koncentracijom spora (E1T01) jasno razlikovao od ostalih, odnosno dodijeljen je skupini C). Razlike između tretmana vidljive su u Box-Whiskers dijagramu (Slika 27).

Tablica 11. Rezultati višestruke usporedbe parova korištenjem Steel-Dwass-Critchlow-Flinger metode / Dvosmjerni test

Tretman	Frekvencije	Zbroj rangova	Srednja vrijednost rangova	Grupe		
E1T20	40	2677,000	66,925	A		
E1T5	40	3511,000	87,775	A	B	
E1T1	40	3558,000	88,950	A	B	
E1C	40	4821,500	120,538		B	C
E1T01	40	5532,500	138,313			C

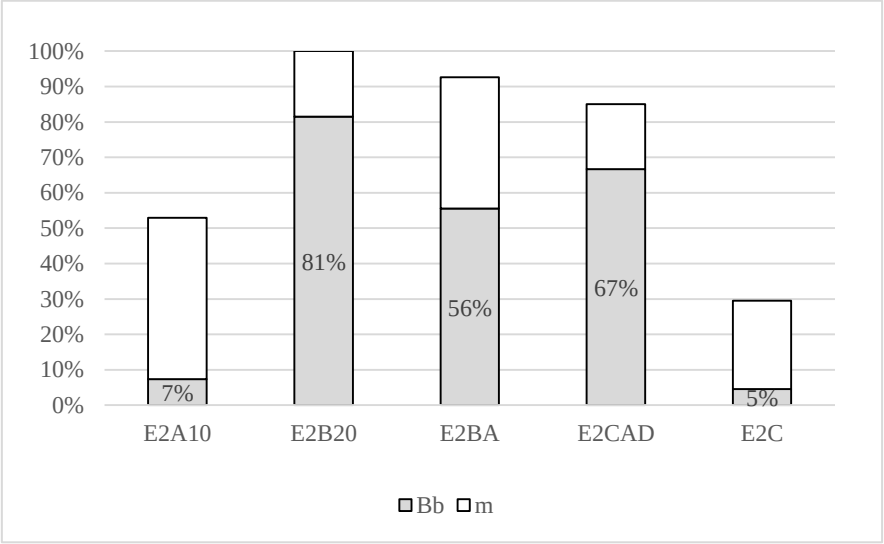


Slika 27. Box-Whiskers dijagram brzina prestanka hranjenja po tretmanima. E1T20 tretman pokazuje najnižu srednju vrijednost i najmanje rasipanje podataka, a slijede ga tretmani E1T5 i E1T1, dok tretman E1T01 pokazuje najvišu vrijednost, čak i višu od kontrolnog tretmana. Simbol + predstavlja aritmetičku sredinu, središnja linija pravokutnika predstavlja medijanu, donja i gornja linija pravokutnika predstavljaju prvi (donji) i treći (gornji) kvartil, vodoravne linije na krajevima raspona predstavljaju standardnu devijaciju, dok ostali simboli predstavljaju vrijednosti koje odudaraju od statistički objašnjivih opservacija

POKUS 2

Mortalitet

Rezultati su pokazali da je najviši mortalitet zabilježen u Grupi A (E2B20) gdje je korištena suspenzija spora gljive *B. bassiana* u dozi od 20 µL po gusjenici s koncentracijom od 5,6 x 10^4 spora/µl, a iznosio je 100% s mikozom od 81%. Doza insekticida ASSET od 10 µL po gusjenici s ultra low koncentracijom (0,003%) u Grupi B (E2A10) rezultirala mortalitetom od 53%. Kombinacija tih istih doza i koncentracija suspenzije spora i insekticida ASSET u Grupi C (E2BA) rezultirala je mortalitetom od 93% i mikozom od 56%. U tretmanu u kojem su zdrave gusjenice bile 30 min izložene sporulirajućim kadaverima (E2CAD) dobiven je ukupan mortalitet od 85% sa mikozom, odnosno postotkom uginuća uzrokovanim zarazom gljive *B. bassiana* od 67%. U kontrolnoj grupi zabilježen je mortalitet od 30%, dok je simptome zaraze gljivom *B. bassiana* pokazalo 5% gusjenica (Slika 28).



Slika 28. Grafički prikaz stope mortaliteta po tretmanima. Sive kolone (Bb) predstavljaju mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana* (mikozu), dok bijele kolone (m) u pozadini predstavljaju ukupan mortalitet

Tablica 12. Apsolutne i relativne stope ukupnog mortaliteta i mortaliteta uzrokovanog zarazom gljive *B. bassiana* (mikoze) u tretmanima i odgovarajući rezultati Hi-kvadrat testa. Vrijednosti koje nisu statistički značajno različite od LD_{100} su istaknute podebljano

Grupa (tretman)	A (E2B20)		B (E2A10)		C (E2BA)		D (E2CAD)		E (E2C)	
Stopa mortaliteta	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel	Abs	Rel
Ukupno	**54**	**100%**	36	53%	**50**	**93%**	**51**	**85%**	13	30%
$\chi 2$ (p)	**0,00 (1,0000)**		15,06 (0,0001)		**0,30 (0,5862)**		**1,35 (0,2453)**		21,84 (<0,0001)	
B. bassiana	**44**	**81%**	5	7%	30	56%	40	67%	2	5%
$\chi 2$ (p)	**1,85 (0,1736)**		58,37 (<0,0001)		10,67 (0,0011)		6,67 (0,0098)		40,09 (<0,0001)	

Prema Hi- kvadrat testu tretman u Grupi A (E2B20) jedini je pokazao da nije statistički značajno različit od LD_{100} i za ukupni mortalitet i za mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana*. Tretman u Grupi C (E2BA) je pokazao da nije statistički značajno različit od LD_{100} ali samo za ukupni mortalitet, dok je za mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana* statistički značajna razlika postojala. Tretman samo insekticidom ASSET u Grupi B (E2A10) kao i u kontrolnoj Grupi E (E2C) su se u oba slučaja pokazali kao statistički značajno različiti od LD_{100}. U Grupi D (E2CAD) u kojoj se ispitivao horizontalni prijenos zaraze preko kadavera nije bilo statistički značajne razlike za ukupni mortalitet, dok je mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana* pokazao statistički značajnu razliku od LD_{100}, premda je iznosio 67% (Tablica 12).

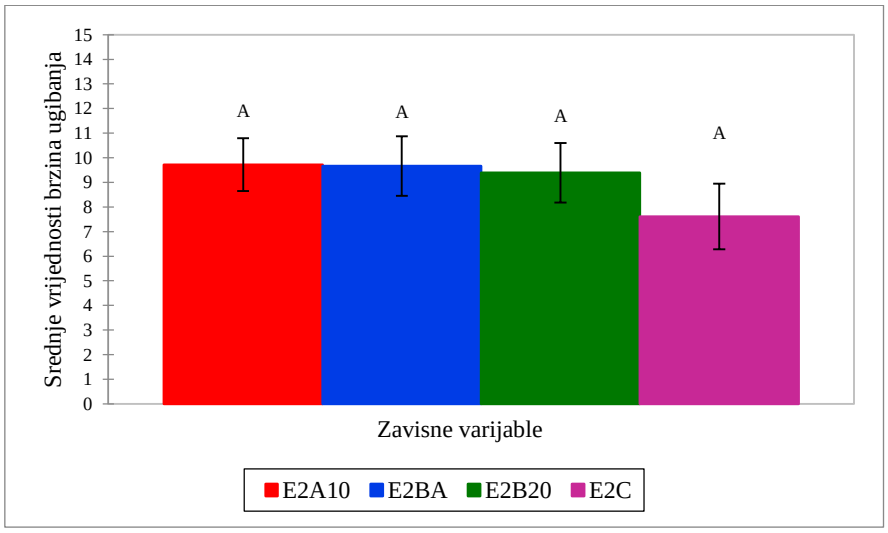
Brzina ugibanja

Korištenjem ANOVA statističke metode utvrđeno je da ne postoje značajne razlike između grupa (tretmana) (Tablica 13), no rezultati Shapiro-Wilks testa pokazali su da podaci ne slijede normalnu distribuciju (W = 0,935; p-vrijednost (dvosmjerna) < 0,0001), stoga je napravljen i neparametarski test s istim skupom podataka.

Tablica 13. Deskriptivna statistika i rezultati parametarskih i neparametarskih testova razlika u brzini ugibanja između tretmana

Tretman	N	min	max	$\bar{x}$	Sd	ANOVA		Kruskal-Wallis	
E2A10	68	2,000	15,000	9,721	5,093	DF	3	K (Promatrana vrijednost)	6,947
E2B20	54	1,000	15,000	9,389	3,882	Suma kvadrata odstupanja	142,839	K (Kritična vrijednost)	7,815
E2BA	54	3,000	15,000	9,667	3,497	Srednji kvadrati odstupanja	47,613	DF	3
E2C	44	1,000	15,000	7,614	5,275	F	2,348	**p-vrijednost (jednosmjerna)**	**< 0,074**
						Pr > F	<0,074		

Tukey-ev test višestruke usporedbe razlika između kategorija sa intervalom pouzdanosti od 95% grupirao je tretmane u jednu skupinu, što znači da u kontekstu brzine ugibanja ne postoje razlike između tretmana (Slika 29).

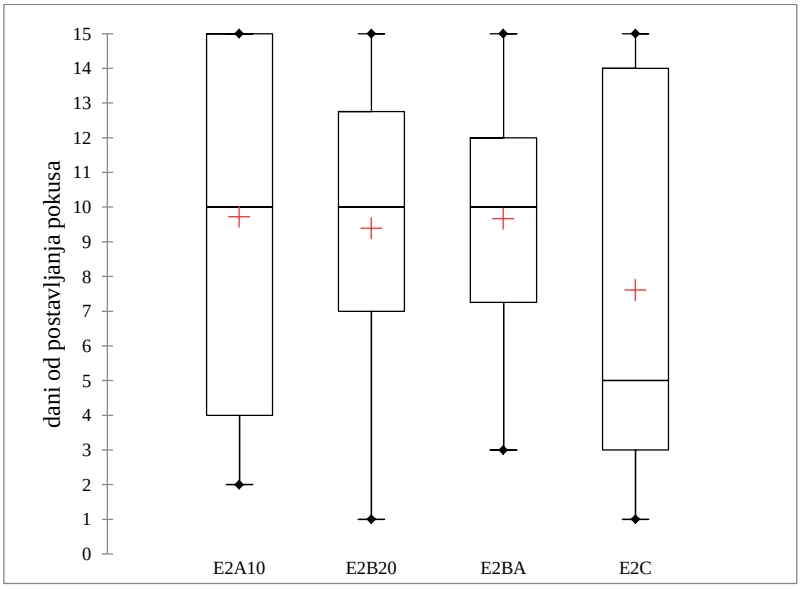


Slika 29. Tukey-ev test višestruke usporedbe razlika u brzinama ugibanja između tretmana sa intervalom pouzdanosti od 95%. Slovne oznake označavaju tretmane za koje je testom utvrđeno da temeljem razlika pripadaju određenoj grupi

Neparametarski test također je pokazao da ne postoji značajna razlika u brzini ugibanja između tretmana (Tablica 13), i višestruka usporedba parova korištenjem Steel-Dwass-Critchlow-Flinger metode rezultirala je grupiranjem tretmana u jednu skupinu (Tablica 14). Sličnost između tretmana vidljiva je u Box-Whiskers dijagramu (Slika 30).

Tablica 14. Rezultati višestruke usporedbe parova korištenjem Steel-Dwass-Critchlow-Flinger metode / Dvosmjerni test

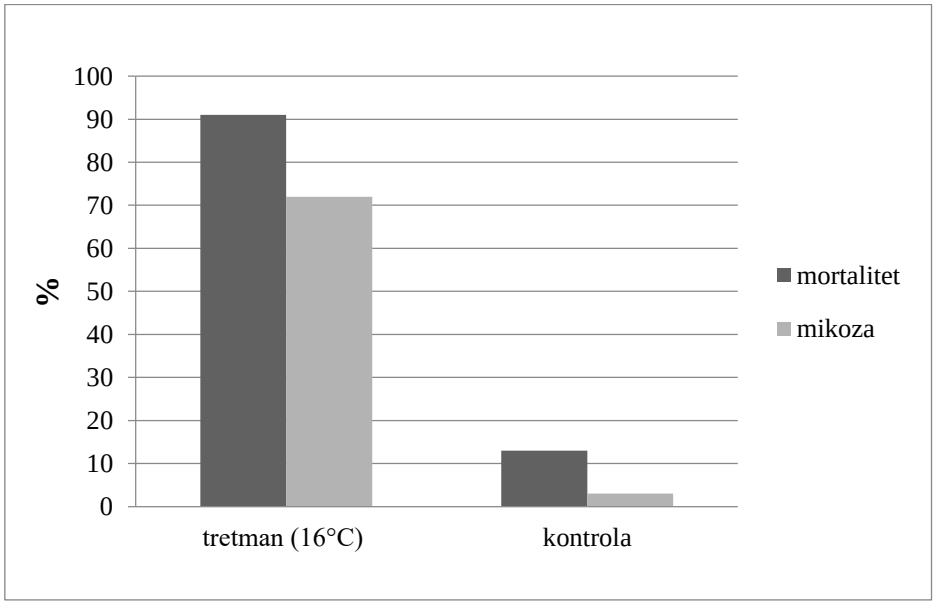
Tretman	Frekvencije	Zbroj rangova	Srednja vrijednost rangova	Grupe
E2C	44	3927,500	89,261	A
E2B20	54	6004,000	111,185	A
E2BA	54	6165,000	114,167	A
E2A10	68	8213,500	120,787	A



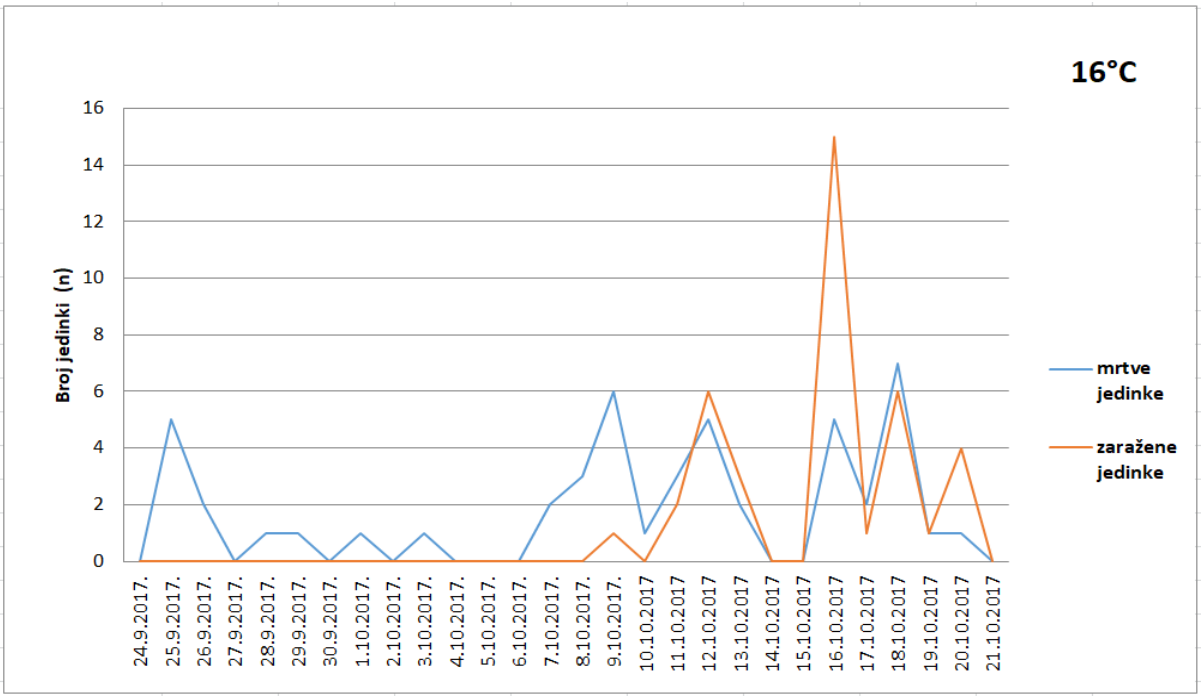
Slika 30. Box-Whiskers dijagram brzina ugibanja po tretmanima. E2C pokazuje najnižu srednju vrijednost, dok ostali tretmani pokazuju nešto višu vrijednost, a tretman E2BA ne odstupa značajnije od prve dvije skupine. Simbol + predstavlja aritmetičku sredinu, središnja linija pravokutnika predstavlja medijanu, donja i gornja linija pravokutnika predstavljaju prvi (donji) i treći (gornji) kvartil, dok vodoravne linije na krajevima raspona predstavljaju standardnu devijaciju

TRETMAN S TEMPERATUROM 16 °C

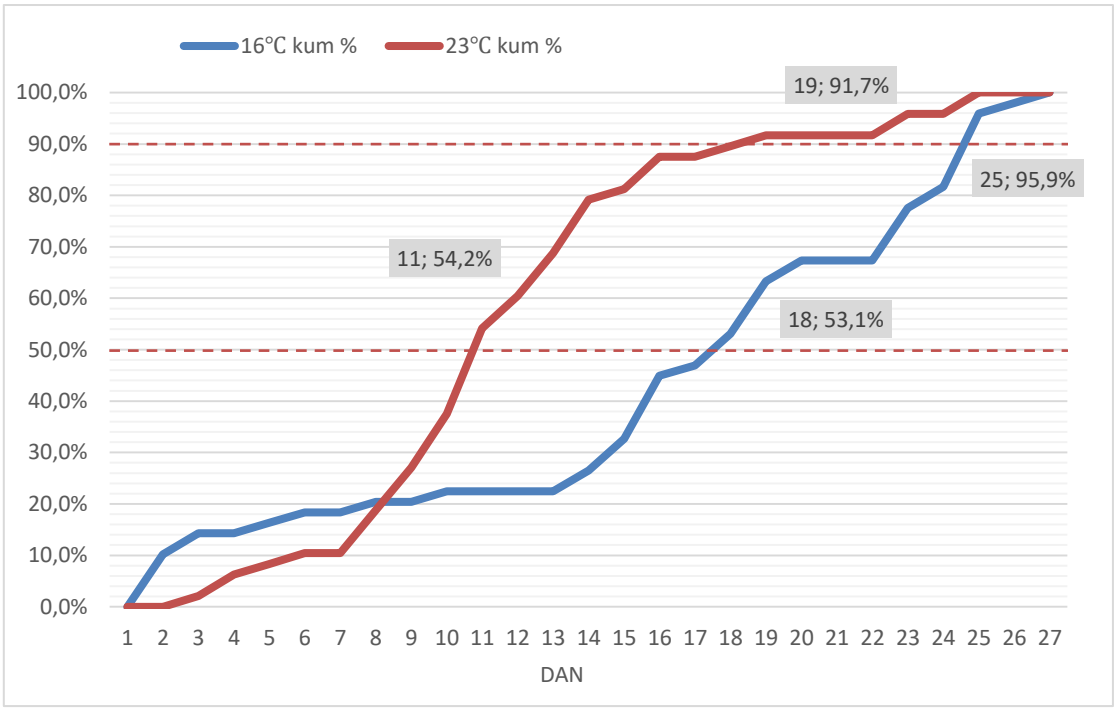
U tretmanu u kojem su gusjenice tretirane s istom koncentracijom i dozom suspenzije spora kao i u Pokusu 2 (20 µl po gusjenici i 5,6 x 10^4 spora/µl), ali s uvjetima temperature od 16 °C, ukupna stopa mortaliteta iznosila je 91%, dok je mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana* zabilježen na 72% gusjenica. U kontrolnom tretmanu mortalitet je iznosio 13%, sa simptomima zaraze gljivom *B. bassiana* na 3% gusjenica (Slika 31). Pokus je praćen 28 dana, a prva pojava mikoze uočena je tek 16 dana od postavljanja pokusa, premda je mortalitet zabilježen i u prethodnim danima. Micelij gljive *B. bassiana* zabilježen je na najvećem broju gusjenica (n=15) 23. dana od postavljanja pokusa (Slika 32). Usporedba kumulativnih mortaliteta i razvoja mikoze u tretmanima s temperaturom 16 °C i temperaturom 23 °C kroz vrijeme grafički je prikazana na Slikama 33 i 34.



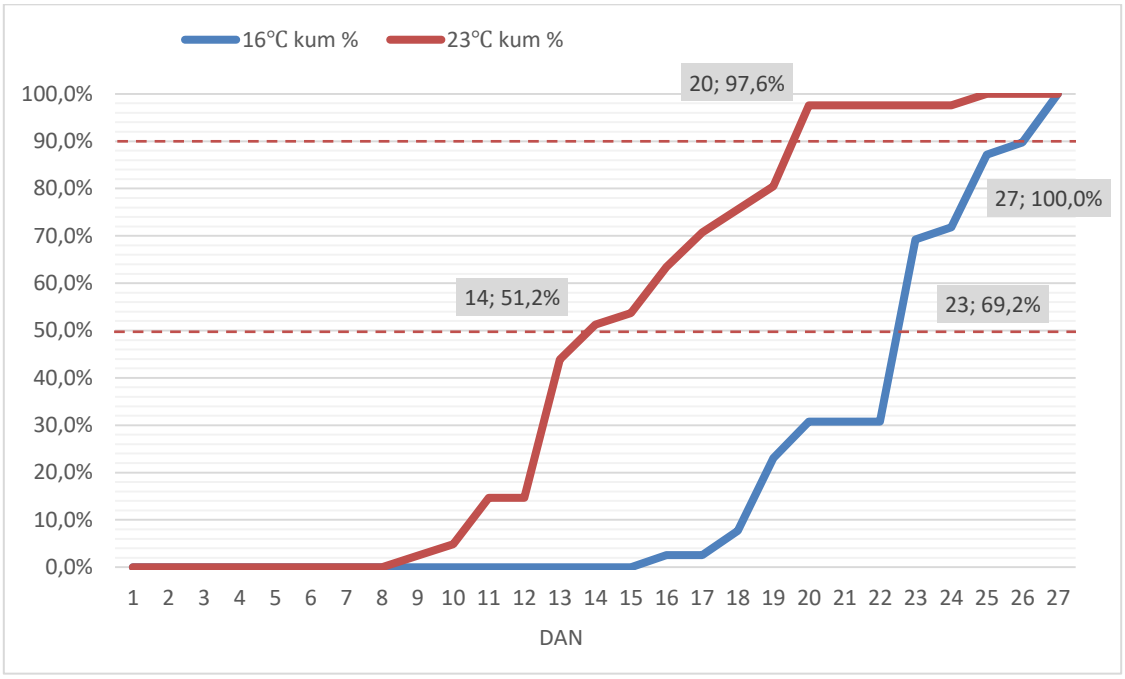
Slika 31. Grafički prikaz stope mortaliteta u tretmanu s temperaturom 16 °C. Tamno sive kolone predstavljaju ukupan mortalitet, dok svijetlo sive kolone predstavljaju mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana*



Slika 32. Grafički prikaz razvoja ukupnog mortaliteta (plava linija) i mikoze-mortaliteta uzrokovanog zarazom gljive *B. bassiana* (narančasta linija) kroz 28 dana u tretmanu s temperaturom od 16 °C



Slika 33. Usporedba kumulativnih mortaliteta jedinki *D. pini* u tretmanima s temperaturom 16 °C (n=49) i temperaturom 23 °C (n=48) kroz vrijeme. U oba tretmana korištena je koncentracija suspenzije spora *B. bassiana* od 5,6 x 10^4 spora/µl i doza od 20 µl po jedinki



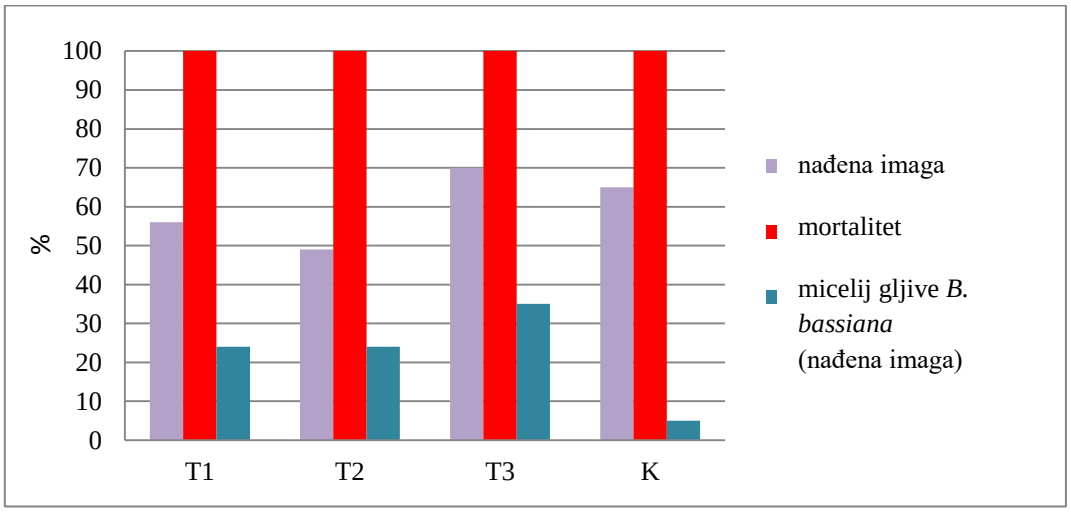
Slika 34. Usporedba kumulativnog razvoja mikoze na jedinkama *D. pini* u tretmanima s temperaturom 16 °C (n=49) i temperaturom 23 °C (n=48) kroz vrijeme. U oba tretmana korištena je koncentracija suspenzije spora *B. bassiana* od 5,6 x 10^4 spora/µl i doza od 20 µl po jedinki

3.6. Rezultati laboratorijskog ispitivanja patogenosti domaćih sojeva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* na hrastovoj mrežastoj stjenici

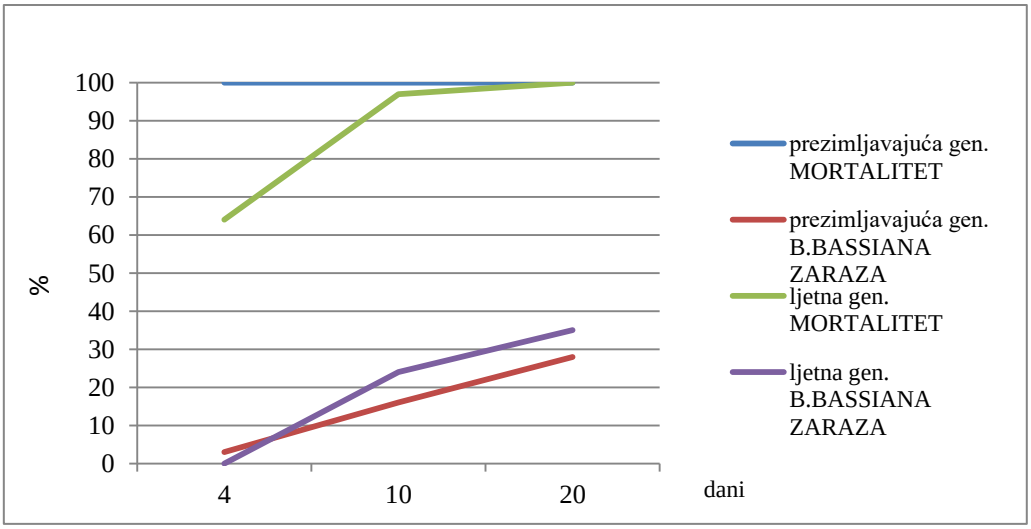
3.6.1. Preliminarni pokus ispitivanja patogenosti gljive B. bassiana na odraslim jedinkama hrastove mrežaste stjenice

Sveukupan broj nađenih uginulih odraslih jedinki iznosio je 55 (28%), dok se prisutnost gljive utvrdila na njih 19 (35%), odnosno 10% od ukupnog broja jedinki u tretmanu. Zaraza kontaktom sa kadaverima borovog prelca zaraženim gljivom *B. bassiana* pokazala je da je entomopatogena gljiva *B. bassiana* patogena na odraslim jedinkama hrastove mrežaste stjenice.

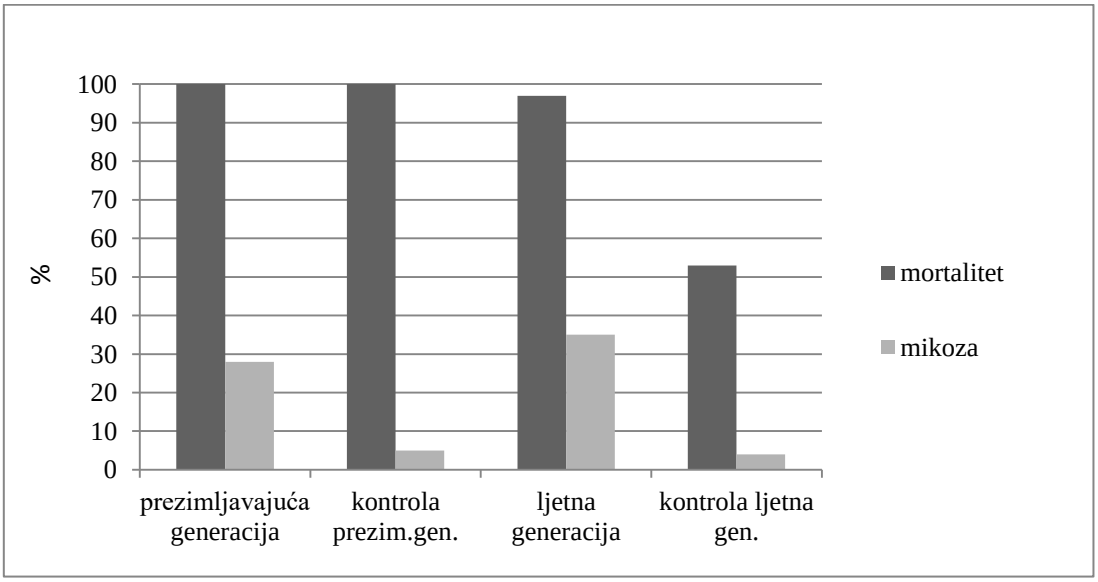
3.6.2. Pokus ispitivanja patogenosti soja BBS na prezimljavajućoj i ljetnoj generaciji hrastove mrežaste stjenice



Slika 35. Grafički prikaz mortaliteta prezimljavajuće generacije u svakom tretmanu nakon 10 dana i pojava micelija gljive *B. bassiana* nakon 20 dana



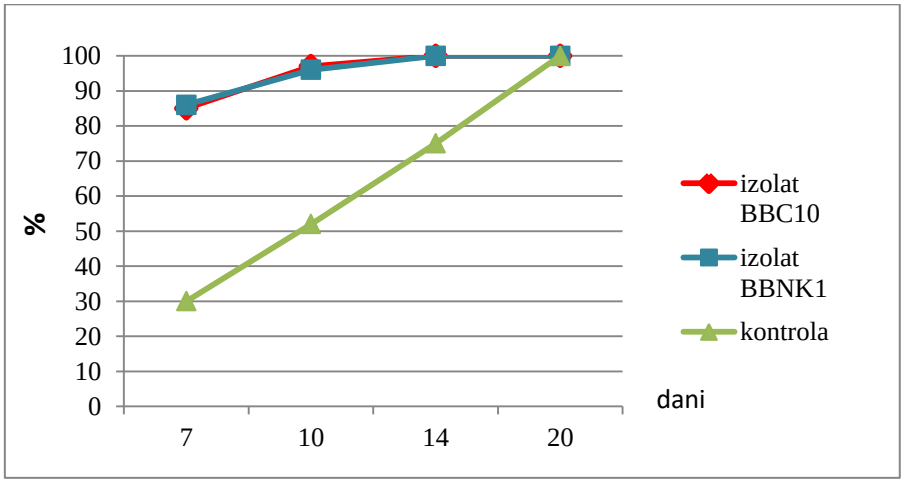
Slika 36. Grafički prikaz mortaliteta prezimljavajuće i ljetne generacije i pojava micelija gljive *B. bassiana* kroz vrijeme



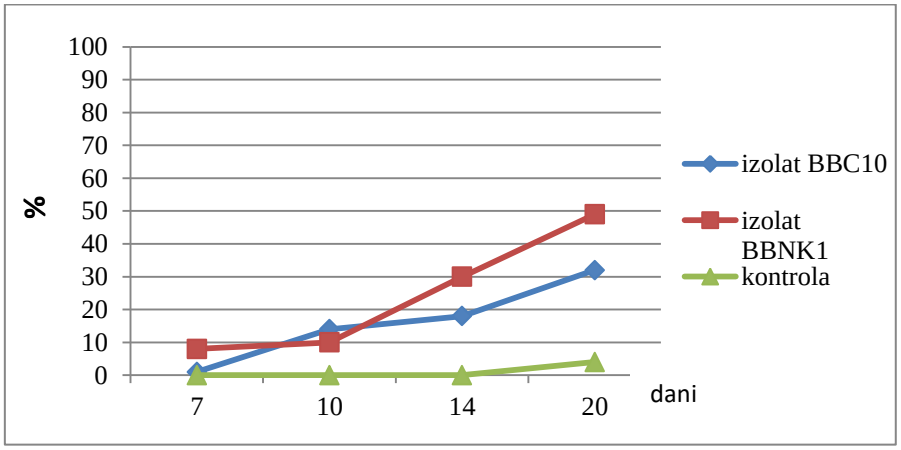
Slika 37. Grafički prikaz mortaliteta prezimljavajuće i ljetne generacije nakon 10 dana i pojava micelija gljive *B. bassiana* nakon 20 dana

Kod prezimljavajuće generacije inokulum se povećao 6X, a kod ljetne 9X, što ukazuje na razlike u otpornosti na zarazu. Zaraza odraslih jedinki hrastove mrežaste stjenice tretiranjem suspenzijama spora u mahovini pokazala je da je moguće reducirati dio populacije koja prezimljava u mahovini i tako potencijalno spriječiti njihov napad u proljeće prije listanja hrasta, uz razmatranje korištenja većih koncentracija i doza suspenzija spora radi potencijalno boljeg učinka.

3.6.3. Pokus ispitivanja patogenosti dva izolata B. pseudobassiana izoliranih sa hrastove mrežaste stjenice



Slika 38. Grafički prikaz stope mortaliteta hrastove mrežaste stjenice u tretmanima kroz vrijeme



Slika 39. Grafički prikaz stope mortaliteta hrastove mrežaste stjenice uzrokovanog zarazom gljive *B. pseudobassiana* u tretmanima kroz vrijeme

Pokus proveden s izolatima gljive *B. pseudobassiana* rezultirao je mortalitetom od 85% i 86% nakon 7 dana, koji je u oba slučaja 14-tog dana iznosio 100%, te mikozom koja je prvih 10 dana bila vrlo niska (manja od 15%), da bi tek 20-tog dana dosegnula 32% i 49% (Slika 38 i 39). Rezultati pokazuju da se korištenjem izolata BBC10 inokulum gljive *B. pseudobassiana* povećao 8X, a korištenjem izolata BBNK1 povećanje inokuluma bilo je 12X, te da postoje razlike u virulentnosti između izolata ove gljive.

Neciljani organizmi

Od neciljanih organizama nađenih tijekom evaluacije tretmana u mahovini njih 25% bilo je zaraženo gljivom *B. pseudobassiana*. U kontrolnom tretmanu nije zabilježen mortalitet uzrokovan zarazom gljive. Nađeni organizmi navedeni su u Tablici 15, a primjer zaraženih neciljanih kukaca prikazan je na Slici 40.

Tablica 15. Neciljani organizmi nađeni u mahovini nakon tretmana gljivom *B. pseudobassiana*

	živi			zaraza gljivom *B. pseudobassiana*		
	BBC10	BBNK1	KONTROLA	BBC10	BBNK1	KONTROLA
pipe (*Curculionidae*)	4	6	2	1	1	0
paukovi (*Araneae*)	1	0	0	0	0	0
mravi (*Formicidae)*	0	0	2	2	0	0
gujavice (*Lumbricidae*)	1	1	0	0	0	0
nepoznato	1	1	3	1	0	0
UKUPNO	7	8	7	4	1	0
	22			**5**		
	5/20= **25 %** ostalih kukaca zaraženih u tretmanima					



Slika 40. Zaraženi neciljani kukci (neidentificirana vrsta mrava i pipe) nađeni u mahovini nakon tretmana gljivom *B. pseudobassiana*

3.6.4. *Brojanje jedinki prezimljavajućih imaga hrastove mrežaste stjenice u mahovini*

Brojanjem imaga u mahovini sakupljenoj na području Spačve potvrđeno je da jedan dio populacije (4. generacija) hrastove mrežaste stjenice ondje prezimljava te je utvrđen prosječan broj od 612 jedinki po 1 m^2 mahovine na šest različitih lokacija, s određenim razlikama u lokacijama. Od nađenih jedinki njih 65 % bilo je mrtvo od čega je na 19 % jedinki utvrđena zaraza entomopatogenim gljivama, između ostalog i gljivama roda *Beauveria*, što je potvrđeno morfološkim analizama. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 16.

Tablica 16. Prezimljavajuća imaga hrastove mrežaste stjenice nađena u mahovini na različitih lokacijama na području Spačve; brojnost (n) i postotak (%) živih, mrtvih i zaraženih jedinki po 1 m^2

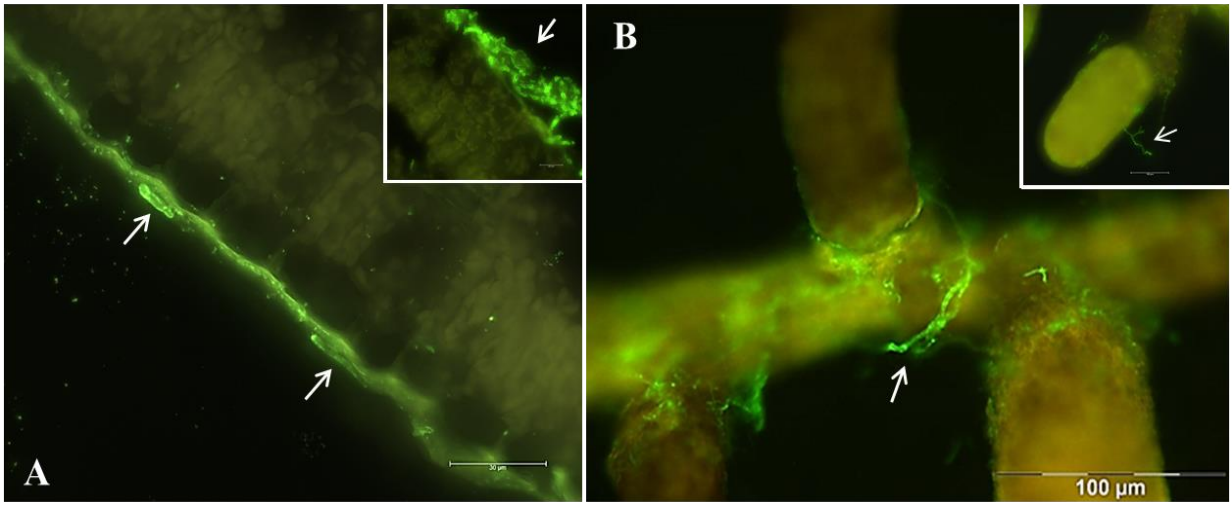
LOKACIJA	**UKUPNO NAĐENIH/ m^2 mahovine**	**ŽIVI**		**MRTVI**		**ZARAŽENI**		
	n	n	%	n	%	n	zaraza od ukupno mrtvih (%)	zaraza od ukupno nađenih (%)
1	477	310	65	148 (+19)	35	19	11	4
2	559	138	25	348 (+73)	75	73	17	13
3	877	258	29	525 (+94)	71	94	15	11
4	219	49	22	130 (+40)	78	40	24	18
5	607	175	29	339 (+93)	71	93	22	15
6	931	355	38	431 (+145)	62	145	25	16
Average	**612**	**214**	**35**	**320 (+77)**	**65**	**77**	**19**	**13**

3.7. *Beauveria* gljive kao endofiti

Ispitivanje endofitskog potencijala gljiva roda *Beauveria* uključivalo je pokuse inokulacije suspenzija spora vrsta *B. bassiana* i *B. brongniartii* u mlade biljke hrasta lužnjaka i detekciju njihove endofitske kolonizacije, te ispitivanje potencijalnog endofitizma gljiva roda *Beauveria* u iglicama alepskog bora.

3.7.1. Ispitivanje endofitizma kod hrasta lužnjaka

Mikroskopska analiza uzoraka lišća i korijenja hrasta pokazala je da gljive *B. bassiana* i *B. brongniartii* nakon inokulacije nisu kolonizirale unutrašnjost mladih biljaka hrasta lužnjaka. Niti u jednom od 5000 pregledanih uzoraka nije zabilježena prisutnost hifa i blastospora u lisnom i korijenskom parenhimu. Na presjecima lisnih i korijenskih dijelova nakon vizualizacije pomoću specifičnih imunofluorescentnih antitijela spore i rastuće hife gljiva *B. bassiana* i *B. brongniartii* bile su vidljive samo na površini biljnih dijelova. Čak i 10 mjeseci nakon inokulacije detektirane su hife gljive *B. brongniartii* kako obavijaju korijenski sustav, posebno mlade fine korjenčiće (Slika 41). Prilikom pregleda kontrolnih biljaka utvrđena je prisutnost samo gljiva koje se prirodno pojavljuju (primjerice pepelnica na površini hrastovog lišća ili uobičajeno prisutne rizosferne gljive), no ne i gljiva roda *Beauveria*.



Slika 41. *Beauveria* sp. vizualizirana pomoću specifičnih imunofluorescentnih antitijela A) poprečni presjek hrastovog lista inokuliranog gljivom *B. bassiana*: proklijale spore i hife (strelica) na površini lista- nisu prisutne u mezofilu nego ostaju s vanjske strane epiderme; B) fini hrastovi korijenčići obavijeni hifama (strelica) gljive *B. brongniartii* (CLSM)

3.7.2. Ispitivanje endofitizma kod alepskog bora

Metodom površinske sterilizacije i nasađivanja komadića iglica alepskog bora na hranjivu podlogu dobivene su kulture različitih endofitskih gljiva od kojih nakon makroskopskog i mikroskopskog pregleda niti u jednom slučaju nije potvrđena prisutnost gljiva roda *Beauveria* (Slika 42). Metodom imunofluorescencije gljive roda *Beauveria* također nisu detektirane niti u jednom od 800 pregledanih uzoraka komadića iglica alepskog bora.



Slika 42. Kulture endofitskih gljiva dobivene iz iglica alepskog bora

4. DISKUSIJA

4.1. Morfološka i molekularna identifikacija vrsta iz roda *Beauveria* na području Hrvatske

Identifikacija izolata dobivenih s prirodno zaraženih kukaca nađenih na različitim lokacijama u Hrvatskoj prilikom koje je morfološkim, molekularnim i filogenetskim analizama potvrđeno da se radi o sojevima entomopatogenih gljiva koje pripadaju vrstama iz roda *Beauveria* pokazala je da su ove vrste prirodno prisutne na našem području te da vrste kukaca iz redova-Lepidoptera, Coleoptera i Heteroptera mogu biti njihovi domaćini.

Entomopatogene gljive često nije jednostavno detektirati u prirodi, što istraživanje njihove distribucije u okolišu čini vrlo izazovnim. Gljivične strukture na kadaveru kukca domaćina su pouzdani znakovi njihove prisutnosti, ali domaćini često mogu biti malih dimenzija i/ili uginuti na neprimjetnim mjestima, primjerice u tlu, listincu, ispod kore stabla ili u vodenom staništu (Vega i sur. 2012).

Osim na kadaverima domaćina spore (konidije) entomopatogenih gljiva mogu se pronaći i u drugim dijelovima staništa kao što je primjerice tlo. Tlo je stabilna struktura koja ublažava fluktuaciju populacija gljiva i čuva ih od štetnih abiotskih i biotskih utjecaja (van der Putten i sur. 2001). Općenito, tlo predstavlja prirodni repozitorij entomopatogenih gljiva gdje one mogu živjeti kao saprofiti, kolonizirajući fragmente kadavera kukaca i organske materije (Solter i sur. 2017).

Detekcija entomopatogenih gljiva u tlu podrazumijeva primjenu specifičnih metoda kao što je izolacija na selektivnu hranjivu podlogu koja sadrži komponente koje potiču razvoj entomopatogenih gljiva, a inhibiraju razvoj drugih saprofitskih gljiva i bakterija (Strasser i sur. 1996), te se uobičajeno koristi za izolaciju entomopatogenih gljiva iz tla (npr. Keller i sur. 2003, Meyling i Eilenberg 2006, Tkaczuk i sur. 2012, Tkaczuk i sur. 2014). Ta metoda korištena je i u ovom istraživanju, te su nakon izolacije, brojanja kolonija gljiva i određivanja njihove gustoće u 1 g tla na različitim točkama i lokalitetima u Hrvatskoj te dobivanja čistih kultura, gljive identificirane morfološkim i molekularnim metodama. S obzirom da su se za molekularne analize, odnosno za lančanu reakciju polimerazom (PCR) umnažali molekularni

markeri ITS 1-F i ITS 4 (interni transkripcijski spacer) koji za mnoge grupe gljiva nisu dovoljni za točno razgraničavanje vrsta unutar rodova, posebno onih usko povezanih (Atkins i Clark 2004), izolati su identificirani do razine roda.

Rezultati su pokazali da su u uzorkovanom tlu u Hrvatskoj prisutne različite vrste entomopatogenih gljiva, a njihova raznolikost i gustoća pojavnosti variraju ovisno o istraživanim lokalitetima. Iako su najveći ukupan udio, odnosno prosječan broj (gustoću) kolonija imale gljive roda *Metarhizium,* one su nađene na samo 3/5 lokaliteta, dok su češće pojavljivane bile gljive roda *Beauveria,* za koje se pokazalo da su prirodno prisutne u šumskom tlu na većini istraživanih lokaliteta (4/5), te na najvećem broju točaka uzorkovanja (16/25) u usporedbi s drugim nađenim vrstama. Slično je dobiveno i u Tkaczuk i sur. (2012, 2014) gdje su ta dva roda (zajedno sa rodom *Isaria*-nekadašnji *Paecilomyces* od kojeg je odvojen novi rod *Purpureocillium*) bila najzastupljenija, a njihova učestalost i brojnost kolonija ovisila je o vrsti tla (npr. kultivirano, šumsko, organsko).

U ovakvom istraživanju veći broj uzoraka kao i gušća mreža uzorkovanja (više točaka i lokaliteta) mogu promijeniti konačan rezultat brojnosti i raznolikosti entomopatogenih gljiva u nekom području (Niu i sur. 2019), što bi vjerojatno bio slučaj i ovdje, no bez obzira na to, ovi rezultati su prvi koji daju uvid u distribuciju i bioraznolikost entomopatogenih gljiva u tlu u Hrvatskoj, a mogu predstavljati podlogu za buduća slična istraživanja.

Prisutnost entomopatogenih gljiva roda *Beauveria* na različitim staništima i lokalitetima u Hrvatskoj, nađenih kako u tlu tako i na različitim vrstama kukaca, ukazuje na to da su ove gljive dio prirodnog ekosustava naših šuma i kao njihov element predstavljaju važnu kariku biološke raznolikosti. Entomopatogene gljive imaju široku distribuciju i žive u gotovo svim terestričkim ekosustavima na svijetu. Njihova najveća raznolikost zabilježena je u tropskim šumama, ali mogu se naći i u ekstremnim staništima kao što je arktička tundra (Eilenberg 2002) i Antarktika (Bridge i Worland 2004). Teleomorfni stadiji gljiva reda *Hypocreales,* u koje spada i *Beauveria* sp. se najviše mogu naći u tropskom pojasu, dok se anamorfni stadiji mogu naći i u tropskom i u umjerenom pojasu (Vega i sur. 2012).

Njihova prilagodba na život u tlu predstavlja potencijal za zarazu štetnih kukaca koji dio svog životnog ciklusa provode upravo ondje (Lovett i St. Leger 2015, St. Leger 2008). Primjer tog potencijala prikazan je i u istraživanju u Matek i Pernek (2018) gdje je vrsta *B. bassiana* izazvala mortalitet na preko 98% populacije gusjenica borovog prelca prilikom njihovog odlaska na prezimljavanje u tlo. Nakon što su se prenamnožile i potpuno obrstile oko 20 ha

sastojine alepskog bora njihova populacija je na ovaj način prirodno reducirana, nakon čega je uslijedio gotovo potpuni oporavak sastojina. To pokazuje veliki doprinos koji ove vrste entomopatogenih gljiva mogu imati u održavanju prirodne ravnoteže jedne biocenoze. Potvrdom da su te gljive prirodno prisutne u tlu na toj lokaciji gdje su se gusjenice zarazile daje smisao cijeloj priči i kompletno ju zaokružuje, a rezultati ispitivanja endofitizma koji su pokazali da te gljive nisu prirodno prisutne u iglicama alepskog bora (na koje se prvotno sumnjalo da predstavljaju izvor zaraze) potvrđuju da je do zaraze najvjerojatnije došlo preko tla.

Istraživanje virulentnih izolata gljiva za suzbijanje nekog ciljanog štetnog organizma započinje ponajprije traženjem prisutnih (domaćih/lokalnih) sojeva, prvenstveno zbog njihove prilagođenosti prisutnim stanišnim uvjetima, stoga su izolati vrsta *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* identificirani na odabranim modelnim organizmima određeni za korištenje u daljnjim laboratorijskim ispitivanjima. Adaptacija lokalnih sojeva na određeni tip staništa, uvjete klime, geografsku lokaciju, karakteristike tla, kao i na utjecaj drugih prisutnih biotičkih čimbenika čini ih prihvatljivijim kandidatima za suzbijanje ciljanog štetnog organizma od sojeva stranog podrijetla (Sánchez-Peña i sur. 2011, Gava i sur. 2019). Istraživanje ovih gljiva kroz različite aspekte kao što je njihova distribucija, brojnost, raspon domaćina, interakcija s drugim organizmima i okolinom, patogenost i mehanizmi djelovanja, taksonomija i filogenija te metode proizvodnje, formuliranja i praktične primjene u biološkoj kontroli dovelo je do brojnih novih spoznaja o njihovom potencijalu, ali i otvorilo nova pitanja i prostor za buduća istraživanja.

4.2. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćih sojeva gljiva roda *Beauveria* na ciljane štetne organizme

Nakon što je određeno da će se za modelne organizme (ciljane štetne organizme) koristiti borov prelac i hrastova mrežasta stjenica provedeni su laboratorijski pokusi da bi se utvrdila patogenost i potencijal domaćih sojeva ovih gljiva u biološkoj kontroli, te odredile optimalne doze i koncentracije suspenzija spora i mogućnost njihovog kombiniranja sa „Ultra low“ (UL) koncentracijama i dozama konvencionalnog insekticida. UL su koncentracije i doze određenog sredstva niže od onih koje preporučuje proizvođač tog sredstva, a koje imaju subletalni efekt na štetni organizam, odnosno ne izazivaju smrt ali slabe kukca narušavajući

mu različite aspekte biologije i fiziologije (slabiji razvoj, smanjenje ili prestanak hranjenja, reproduktivni potencijal itd.) (Inglis i sur. 2001). Nekadašnji pristup u korištenju gljiva roda *Beauveria*, kao i ostalih entomopatogenih askomicetnih gljiva u biološkoj kontroli bio je uglavnom inundativnog (augmentativnog) karaktera, što nije ispunjavalo visoka očekivanja u usporedbi s učinkovitošću kemijskih insekticida (Mascarin i Jaronski 2016). Da bi se taj problem prevladao počele su se istraživati mogućnosti kombiniranog, odnosno integriranog pristupa zaštiti od štetnih organizama gdje bi se entomopatogene gljive koristile u kombinaciji sa subletalnim, odnosno UL koncentracijama i dozama insekticida (Mascarin i Jaronski 2016). Brojna provedena istraživanja pokazala su da je takvo kombiniranje kemijske i biološke kontrole isplativija, učinkovitija i dugoročno bolje održiva metoda suzbijanja štetnika od njihovog samostalnog korištenja (npr. Sahayaraj i sur. 2011, Hernández i sur. 2012, Santos i sur. 2018). Korištenje nižih doza i koncentracija insekticida osim što je ekološki prihvatljivije smanjuje troškove tretiranja i može sačuvati vrijedne populacije prirodnih neprijatelja (Hull i Beers 1985) te usporiti razvijanje rezistentnosti štetnog organizma istodobno omogućavajući prirodnim neprijateljima da ju razviju (Tabashnik i Croft 1982, Roubos i sur. 2014). Optimalna UL koncentracija i doza insekticida koja ima minimalni negativni učinak na okoliš ali i dalje ima učinak slabljenja ciljanog štetnog organizma ovisi o vrsti sredstva i osjetljivosti tog organizma na sredstvo. Za laboratorijske pokuse u ovom istraživanju odabran je insekticid ASSET koji je dostupan na hrvatskom tržištu od 2017. godine (Ministarstvo poljoprivrede). To je kontaktni insekticid na bazi prirodnog piretrina koji djeluje na širok spektar štetnika a karakterizira ga vrlo brzo djelovanje i kratko trajanje što ga čini praktičnim kod metoda integriranog biološkog suzbijanja (https://www.agroklub.com/).

4.2.1. Ispitivanje utjecaja insekticida na razvoj izolata

Prije ispitivanja potencijalno boljeg učinka koji entomopatogene gljive *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* u kombinaciji s insekticidom mogu imati na mortalitet ciljanog štetnog organizma, bilo je potrebno ispitati i njihovu kompatibilnost. Zbog mogućeg negativnog djelovanja koje insekticid može imati na učinkovitost entomopatogene gljive vrlo je važno prethodno *in vitro* ispitati njegov utjecaj na rast i razvoj gljive, odnosno razvoj kultura i klijavost spora (Inglis i sur. 2001). U ovom istraživanju odabrani lokalni izolati vrsta *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* nisu pokazali nikakve promjene u postotku proklijalih konidija prilikom miješanja suspenzija spora s različitim koncentracijama insekticida ASSET.

Promjene u rastu i razvoju kultura na hranjivoj podlozi pomiješanoj s insekticidom ASSET-om pokazao je samo jedan izolat (BBC10-*B. pseudobassiana*) čiji je razvoj kulture na podlozi s preporučenom koncentracijom insekticida inhibiran u prosjeku 21.6%, te na podlozi s UL koncentracijom insekticida 2.7 % u odnosu na razvoj u kontroli. Također, zanimljivo je da su kod ovog izolata zabilježene promjene u obojenju hranjive podloge, gdje je uobičajeno obojenje PDA podloge u smećkasto-ljubičastu kod preporučene koncentracije insekticida izostalo ili je bilo vrlo blago u odnosu na obojenje podloge kod UL koncentracije insekticida i kontrole. S obzirom na već spomenuto da neke *Beauveria* vrste ili sojevi proizvode specifične sekundarne metabolite koji mogu mijenjati boju hranjive podloge na kojoj rastu (De Hoog 1972, Strasser i sur. 2000), a koji posjeduju širok spektar bioloških aktivnosti: insekticidno, antimikrobno, fitotoksično i citotoksično (Zimmermann 2007), izostanak obojenja može značiti i izostanak tih aktivnosti, što u konačnici može dovesti do smanjenog željenog učinka entomopatogene gljive prilikom tretiranja zbog kombiniranja s insekticidom.

Kod ostalih izolata nisu zabilježene značajne negativne promjene u rastu i razvoju kultura (do 2.6 %), a u nekim tretmanima je zabilježen čak i pomalo stimulirajući efekt gdje su se nakon 7 dana kulture razvile do 5 % bolje nego kulture u kontroli. Ovakav primjer zabilježen je i u istraživanju u Mietkiewski i sur. (1997) gdje je insekticid aldikarb stimulirao rast gljive *B. bassiana* u svim tretmanima, osim u onima gdje je korištena koncentracija insekticida 10 puta veće od preporučene. Također, gljiva *B. bassiana* pokazala je bolji rast i razvoj u tlu prethodno tretiranom fungicidom triadimefonom (Mietkiewski i sur. 1997).

Klingen i Haukeland (2006) u svom pregledu dosadašnjih objavljenih istraživanja utjecaja kemijskih pesticida na entomopatogene gljive zaključuju da insekticidi i herbicidi uglavnom ne inhibiraju njihov razvoj, dok fungicidi u nekim slučajevima pokazuju štetno djelovanje. To se ne podudara s nekim istraživanjima vezanima uz entomopatogenu gljivu *B. bassiana*, gdje je dokazan značajan (u nekim slučajevima i potpuni) inhibitorni učinak različitih vrsta testiranih insekticida na rast i razvoj kultura i klijavost spora, što je variralo ovisno o vrsti sredstva i njegovoj dozi i koncentraciji (Anderson i Roberts 1983, Puzari i sur. 2006).

Dosadašnja istraživanja također pokazuju i da se rezultati laboratorijskih i terenskih ispitivanja ne moraju nužno podudarati, te su tako primjerice neki fungicidi pokazali puno veće inhibitorno djelovanje na gljivu u laboratoriju nego u prirodnim uvjetima (Keller i sur. 1993, Mietkiewski i sur. 1997). Primjerice, u prethodno navedenom primjeru gdje je fungicid

triadimefon imao stimulirajuće djelovanje na gljivu *B. bassiana* u prirodnim uvjetima, u laboratorijskom ispitivanju je inhibirao njezin rast (Mietkiewski i sur. 1997).

U Inglis i sur. (2001) navodi se da inhibitorni učinak pesticida na rast i klijavost entomopatogenih gljiva često varira između vrsta i sojeva. Sve navedeno potvrđuje da je utjecaj kemijskih sredstava na učinkovitost entomopatogenih gljiva varijabilan te da ovisi o brojnim faktorima kao što su vrsta sredstva, ispitivane doze i koncentracije, te vrsta i soj gljive. Bez obzira na mogućnost nepodudaranja rezultata laboratorijskih testiranja i terenske aplikacije, prije donošenja odluke o kombiniranju entomopatogene gljive i insekticida nužno je prethodno ispitati njihovu kompatibilnost. Informacija o kompatibilnosti soja gljive i insekticida koji se želi koristiti za tretiranje važna je radi odabira pravog insekticida, njegovih doza i koncentracija te tempiranja vremena aplikacije.

Ovo istraživanje pokazalo je da insekticid ASSET ne inhibira rast i razvoj lokalnih sojeva gljiva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* i da je pogodan za korištenje u kombiniranoj varijanti za daljnja pokusna tretiranja.

4.2.2. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćeg soja B. bassiana na borovom prelcu

Pokus 1.

Ovo ispitivanje je provedeno s ciljem da se istraži potencijal gljive *B. bassiana* za kontrolu borovog prelca. Kroz različite tretmane uspoređivala se osjetljivost gusjenica na različite doze i koncentracije suspenzija spora. Pokazalo se da je primjena doze od 20 µL s koncentracijom od 7,9 x10^4 spora/µl rezultirala mortalitetom od 100% s mikozom od 88%. Iste koncentracije s dozama od 5 µL i 1 µL su se pokazale nešto manje učinkovite, ali i dalje s postotkom uginuća uzrokovanim zarazom gljive *B. bassiana* na preko 50% gusjenica. Mortalitet od 13% zabilježen u kontrolnom tretmanu pripisao se zarazi parazitoida *Drino inconspicua* Meigen (Diptera: Tachinidae) (Matek i Pernek 2018) ili je upućivao na bakterijsku infekciju. Prosječna razlika između ukupnog mortaliteta i mortaliteta uzrokovanog zarazom gljive *B. bassiana* u tretmanima bila je 11%. Prema tome, dobiveni mortalitet može se smatrati rezultatom ovog tretiranja. Relativni porast stope mortaliteta kao rezultat povećanja doze suspenzije spora bio je 2,73% po µL za dozu od 5 µL i 2,95% po µL za dozu od 20 µL, sve u usporedbi s dozom od 1 µL. To pokazuje da povećanje doze na 20 µL rezultira većim

relativnim porastom mortaliteta od doze 5 µL, što dodatno podupire zaključak da je povećanje doze na 20 µL opravdano kako bi se postigao značajno veći mortalitet. Analiza brzina ugibanja pokazala je da je tretman s dozom od 20 µL u usporedbi s drugim tretmanima imao značajno veću brzinu, koja je bila prosječno 9,4 dana od početka tretmana i 2,2 dana brža od kontrolnog tretmana. Rezultati su također pokazali da su učinkoviti tretmani uzrokovali promjenu u hranjenju kod zaraženih gusjenica, tj. prestanak hranjenja. Kod tretmana gdje je korištena doza od 20 µL suspenzije spora po gusjenici prestanak hranjenja nastupio je u prosjeku 5,5 dana od početka pokusa, što je 3,9 dana ranije od samog uginuća gusjenice. Kada se to usporedi s kontrolnom grupom u kojoj je prestanak hranjenja nastupio nakon prosječno 9,9 dana, prestanak hranjenja u tom tretmanu pojavio se 4,4 dana ranije nego u kontroli. Iz aspekta zaštite šuma i donošenja odluka oko tretiranja tog štetnika to je vrlo zanimljiv podatak, jer ne samo da bi takva tretiranja reducirala populaciju borovog prelca kroz uginuće gusjenica, nego bi i štete na domaćinu nastale njihovim hranjenjem prestale puno prije. Takvi rezultati podudaraju se s drugim istraživanjima u kojima je zabilježena redukcija u hranjenju i proizvodnji ekskremenata zbog gljivične infekcije. Primjerice, smanjen unos hrane uočen je nakon tretmana entomopatogenim gljivama *B. bassiana* i *Metarhizium anisopliae* kod kukca *Chilo partellus*, čije gusjenice rade štetu na kukuruzu (Tefera i Pringle 2003) i kod komaraca prijenosnika malarije (Scholte i sur. 2006, Blanford i sur. 2011). Značajna redukcija u hranjenju zabilježena je i kod zelene breskvine uši *Myzus persicae* zaražene entomopatogenom gljivom *Lecanicillium longisporum* (Roditakis i sur. 2008), te kod pustinjskog skakavca *Schistocerca gregaria* (Moore i sur. 1992) i kod skakavca *Zonocerus variegatus* (Thomas i sur. 2010), gdje su oba bila zaražena entomopatogenom gljivom *Metarhizium flavoviride*.

Pokus 2.

Kombiniranje suspenzije spora *B. bassiana* i UL doze i koncentracije insekticida ASSET nije u potpunosti ispunilo očekivanja. Najviša stopa mortaliteta zabilježena je u tretmanu gdje je korištena samo suspenzija spora *B. bassiana* koja je za ukupni mortalitet iznosila 100%, a za mortalitet uzrokovan zarazom gljive *B. bassiana* 81% (slično kao i u Pokusu 1 što dodatno potvrđuje efektivnost ovakvog tretmana), no u kombiniranom tretmanu gdje je korištena i suspenzija spora i insekticid ASSET ukupni mortalitet iznosio je 93%, s mikozom razvijenom na 56% gusjenica. To je iznenađujuć rezultat s obzirom na ukupne mortalitete u samostalnim tretmanima (100% u tretmanu samo sa suspenzijom spora i 53% u tretmanu samo s insekticidom) i činjenicu da je u prethodnim pokusima dokazano da insekticid ASSET nema

inhibitorno djelovanje na izolat BBS. Isto tako, prilikom analize brzina ugibanja i usporedbe između grupa utvrđeno je da ne postoje značajne razlike u brzini ugibanja između tretmana. U ovom trenutku teško je objasniti razloge ovakvih ishoda te bi trebalo provesti dodatna ispitivanja. Također, u kontrolnoj grupi gdje je zabilježen mortalitet od 30%, na 5% gusjenica pojavili su se simptomi zaraze gljivom *B. bassiana*, što je uočeno i u tretmanu gdje je korišten samo insekticid ASSET te je ondje to iznosilo čak 7%, a da li je to prirodno prisutna zaraza ili samo posljedica kontaminacije prilikom postavljanja pokusa ostaje nejasno. Bez obzira na to, stope mortaliteta dobivene u tretmanima pokazale su se kao visoke, čime ovi rezultati ostaju neosporno značajni.

Tretman u kojem su zdrave gusjenice bile izložene kadaverima zaraženim gljivom *B. bassiana* rezultirao je visokim ukupnim mortalitetom od 85% i mikozom od 67%, što potvrđuje horizontalni prijenos zaraze. Horizontalni prijenos zaraze gljivom *B. bassiana* dokazan je i na primjeru odraslih jedinki kukca *Diaphorina citri* adults (Conceschi i sur. 2016) i smrekinog pisara *Ips typographus* (Kreutz i sur. 2004) gdje su prijenosom zaraze na zdrave jedinke dobivene visoke stope mortaliteta, upućujući na to da biološka kontrola entomopatogenim gljivama može ima još i dodatan bolji učinak kroz cirkuliranje konidija (spora), odnosno kroz stvaranje novih ciklusa infekcije. U istraživanju u Drummond i Groden (1996) zaraza sporulirajućim kadaverima zaraženim gljivom *B. bassiana* značajno je reducirala populaciju krumpirove zlatice *Leptinotarsa decemlineata* u narednim godinama nakon tretmana. Horizontalni prijenos posljedično dodatno podiže stopu mortaliteta i omogućuje samoodrživost gljive, odnosno daljnji prijenos zaraze na druge jedinke, što predstavlja važnu osobinu u modernom pristupu biološki orijentiranoj, odnosno integriranoj zaštiti šuma.

Tretman s temperaturom 16 °C

U prvih 15 dana ovaj tretman pokazivao je vrlo slab učinak s niskom stopom mortaliteta i bez pojave micelija gljive na tijelu gusjenica, no 16-og dana zabilježena je pojava mikoze, a mortalitet je zabilježio porast. Taj je trend nastavljen i u narednim danima, da bi 23. dan broj jedinki zaraženih gljivom *B. bassiana* naglo porastao, te je sveukupno nakon 28 dana praćenja dosegao 72%, sa ukupnim mortalitetom od 91%. Takvi rezultati pokazatelj su da bez obzira na niže temperature gljiva *B. bassiana* ne gubi svoju patogenost i djelovanje a željeni učinak i dalje može biti postignut, no sam razvoj zaraze i finalni mortalitet su u tom slučaju prolongirani. Ti rezultati važni su za planiranje provedbe tretiranja i evaluacije tretmana na terenu.

Zaključno, biološka metoda suzbijanja borovog prelca upotrebom entomopatogene gljive *B. bassiana* kao prirodnog neprijatelja predstavlja ekološki prihvatljivo rješenje koje bi moglo zamijeniti ili barem smanjiti upotrebu kemijskih insekticida. Ova laboratorijska istraživanja treba proširiti i na terensku aplikaciju kako bi se ispitao utjecaj testiranih koncentracija i doza na tog štetnika i u prirodnim uvjetima.

4.2.3. Laboratorijsko ispitivanje patogenosti domaćih sojeva B. bassiana i B. pseudobassiana na hrastovoj mrežastoj stjenici

U preliminarnom pokusu ispitivanja patogenosti gljive *B. bassiana* na odraslim jedinkama *C. arcuata* u kojem je kao metoda zaraze korištena metoda horizontalnog prijenosa gljive sa zaraženih gusjenica borovog prelca na imaga stjenice dobiven je mortalitet jedinki od 28 % od čega je na njih 35% potvrđena prisutnost micelija gljive, odnosno uginuće od zaraze gljivom *B. bassiana* iznosilo je 10% od ukupnog broja jedinki u tretmanu. Time je potvrđena hipoteza da je entomopatogena gljiva *B. bassiana* patogena na odraslim jedinkama hrastove mrežaste stjenice, no trebalo je utvrditi zašto je postotak uginuća od zaraze tako mali. U istraživanju u Sönmez i sur. (2016) svi ispitivani *B. bassiana* izolati (izolirani s kukaca i iz tla) su se također pokazali patogeni na odraslim jedinkama hrastove mrežaste stjenice, u laboratorijskim uvjetima.

U sljedeća dva pokusa sa odraslim jedinkama prezimljavajuće i ljetne generacije pokušalo se sa metodom tretiranja jedinki suspenzijama spora u mahovini gdje dio populacije prezimljava (u stadiju adulta) s ciljem da se ispita metoda i usporedi eventualna razlika u otpornosti između dviju generacija. Već kroz par dana nakon tretmana uočena je vrlo visoka stopa mortaliteta kod obje generacije, s tim da je već nakon 4 dana kod prezimljavajuće generacije iznosio 100%, dok je kod ljetne tek 20-tog dana dosegao 100%. Prisutnost micelija gljive potvrđena je na 28% jedinki prezimljavajuće generacije, dok kod ljetne generacije na 35% jedinki. Vrlo visok mortalitet u kontrolnoj skupini kod prezimljavajuće generacije koji je iznosio 95% već nakon 4 dana, za razliku od onog u ljetnoj koji je iznosio samo 5% u istom razdoblju, a dosegnuo 95 % tek 20-tog dana, ukazuje na to da prezimljavajuća generacija vrlo vjerojatno ima slabiji vitalitet. Postoji mogućnost i da se njezina uloga svodi samo na

održavanje populacije preko zime, da bi jedinke u proljeće položile jaja, a nastavio se razvoj vitalnije generacije koja radi veću štetu na prolistalim hrastovima.

Kukci su poikilotermni organizmi te su vrlo ovisni o vanjskoj temperaturi. Zimi se stoga primire i ne hrane se, a istovremeno se bore sa različitim stresorima kao što su niske temperature, manjak vode, te usmjeravanje fizioloških procesa prema čuvanju energije. U tu svrhu kukci koriste lipide koji su primarni izvor energije tijekom prezimljavanja, te na taj način čuvaju svoj imunološki sustav kako bi bili što bolje pripremljeni za novu vegetacijsku sezonu. Sposobnost kukaca da se prilagode na zimske uvjete i prežive ih, odnosno njihova osjetljivost varira ovisno o vrsti (Sinclair i sur. 2013, Williams i sur. 2015).

Treba uzeti u obzir i moguće propuste u metodologiji, odnosno u postavljanju ovog pokusa. Jedinke koje su prezimile i otišle u krošnju na hranjenje/polaganje jaja su nakon što su sakupljene i transportirane, ponovno izložene niskoj temperaturi (pohranjene 4 dana na 3,5 °C radi simulacije prezimljavanja), koja je potom dignuta na 18 °C, pa postepeno na 23 °C (radi simulacije završetka prezimljavanja). Takav stres bi mogao biti uzrokom dodatnog slabljenja i brzog uginuća jedinki. Iz tog razloga, u pokusu sa ljetnom generacijom preskočen je korak s jako niskom temperaturom i jedinke su umjesto na 3,5 °C pohranjene odmah na 18 °C 4 dana, s postepenim dizanjem do 23 °C.

Zbog vrlo visokog mortaliteta u kontrolnim skupinama, posebno kod prezimljavajuće generacije teško je i tvrditi da su sve jedinke na kojima je potvrđena prisutnost micelija gljive *B. bassiana* uginule isključivo zbog zaraze. S obzirom da je i u kontrolnim skupinama potvrđena prisutnost micelija gljive *Beauveria* sp. (5% kod prezimljavajuće i 4% kod ljetne generacije odraslih jedinki), zaključeno je da u populaciji postoji prirodni inokulum ovih gljiva. Iz tog razloga, usporedbom tih postotaka u tretmanima i u kontroli može se zaključiti da se nakon tretmana kod prezimljavajuće generacije inokulum povećao 6X, a kod ljetne 9X, što je potencijalno dobro za daljnje širenje zaraze na druge jedinke. Sama metoda tretiranja suspenzijama spora pokazala se dobra zbog preciznosti i kontrole nad korištenim dozama i koncentracijama. Povećanje doza ili koncentracija u tretmanu potencijalno bi moglo dodatno povećati inokulum, odnosno zarazu, ali potrebno je provesti dodatna istraživanja kojima bi se to potvrdilo.

Također, tretiranje mahovine u kojoj dio populacije prezimljava, i to u proljeće neposredno prije listanja hrasta čini se kao praktično rješenje iz nekoliko razloga: čuvanja vlage i zaštite od sunčevog zračenja, povoljnijih temperatura, potencijalnog sprječavanja razvoja proljetne

generacije, mogućnosti novih zaraza zbog zadržavanja tzv. 'sekundarnog inokuluma', te boljeg planiranja i kontrole terenske aplikacije i jednostavnije evaluacije nakon tretmana.

Mahovina čuva vlagu i štiti od sunčevog zračenja

Jedan od najvažnijih preduvjeta za klijanje i održivost spora entomopatogenih gljiva je vlaga (Ignoffo 1992). Vlaga je također ključna i za konidiogenezu (proces razvoja konidija) na površini tijela uginulih kukaca (kadavera), što utječe i na horizontalni prijenos patogena, odnosno širenje zaraze (Inglis i sur. 2001). Primjerice, Fargues i Luz (2000) u svom istraživanju utjecaja vlage i temperature na sporulaciju gljive *B. bassiana* na kadaverima stjenice *Rhodnius prolixus* (Stäl), 1859 (Hemiptera: Reduviidae) zaključuju da je za proizvodnju konidija potrebna relativna vlaga od barem 97 %, te da bez tako visoke vlage nema njihove proizvodnje i daljnje širenja. Neka istraživanja pokazala su da niska ambijentalna vlaga iako nije pogodovala konidiogenezi, nije utjecala negativno na infektivnost gljive *B. bassiana* (primjerice Ferron 1977, Ramoska 1984 itd.). Sposobnost klijavosti i vršenja infekcije čak i u uvjetima niske ambijentalne vlage može se pripisati dovoljnoj količini vlage unutar mikrostaništa, odnosno vlažnim mikroklimatskim uvjetima (na primjer između biljaka ili u sloju koji okružuje vegetaciju, ili u kutikularnim pregibima na tijelu kukca) (Inglis i sur. 2001). To potvrđuje jednu od teza ovog istraživanja da je mikrostanište kao što je mahovina koja prirodno čuva vlagu pogodna zona za provedbu tretiranja. Također, mahovina je zbog svog položaja bolje zaštićena od direktnih sunčevih zraka (za razliku od npr. krošnje), te zbog svoje strukture može potencijalno štititi konidije koje padnu na njezinu površinu. Sunčeva svjetlost je vjerojatno najdestruktivniji okolišni čimbenik koji utječe na održivost entomopatogena u prirodnim uvjetima (Ignoffo 1992). Entomopatogene gljive izuzetno su osjetljive na oštećenja od sunčevog zračenja, posebice UVB zraka (285-315 nm) koje skraćuju životni vijek i učinkovitost konidija i vrlo brzo mogu dovesti do njihove inaktivacije (Inglis i sur. 2001). Istraživanje u Inglis i sur. (1993) pokazalo je da je preživljenje konidija na položajima izloženima direktnom sunčevom zračenju bilo bitno manje u usporedbi s onima na zaštićenim položajima. Mikrostanište tu predstavlja važan faktor koji utječe na preživljenje i održivost konidija (Inglis i sur. 2001).

Temperature su povoljnije

Tretiranjem u proljeće neposredno prije listanja hrasta povećavaju se šanse za zarazu zbog viših temperatura koje povoljnije utječu na gljivu i potiču pokretljivost stjenica koje izlaze iz faze mirovanja. Temperatura je također jedan od vrlo važnih čimbenika koji utječe na

efikasnost entomopatogenih gljiva. Optimalna temperatura za većinu entomopatogenih gljiva je između 20°C i 25°C, ali do infekcije i razvoja bolesti može doći pri temperaturama u rasponu od 15°C do 30°C (Inglis i sur. 2001). Iako postoje manje razlike unutar vrsta gornji temperaturni limit za rast i razvoj gljiva roda *Beauveria* je 34-36 °C (Mascarin i Jaronski 2016). S obzirom da se prosječna proljetna temperatura zraka u kontinentalnim podnebljima naše zemlje kreće u rasponu od 10°C do 20°C, s danima od čak 25°C, tempiranjem tretiranja u to vrijeme povećava se mogućnost uspješnosti tretmana.

Potencijalno se sprječava razvoj proljetne generacije

Tretiranjem prezimljavajuće populacije potencijalno bi se mogla smanjiti mogućnost razvoja proljetne generacije, odnosno izlazak i odlazak imaga na hranjenje/polaganje jaja. U tom slučaju zarazu vrši tzv. 'primarni inokulum', odnosno inokulum koji prvi inicira razvoj bolesti unutar neke populacije (Inglis i sur. 2001).

Veća potencijalna zaraza zbog 'sekundarnog inokuluma'

Sekundarni inokulum je inokulum koji stvaraju već zaražene jedinke i koji potencijalno predstavlja izvor zaraze za druge jedinke unutar populacije, a može se ostvariti horizontalnim prijenosom direktnim kontaktom sa živim kukcima ili sporulirajućim kadaverima (Inglis i sur. 2001) ili zarazom konidijama koje su jedinke proširile svojim kretanjem, primjerice po vegetaciji s kojom onda zdrave jednike dođu u kontakt (engl. secondary spore pick-up) (Bateman i sur. 1998). Dodatan potencijalni izvor zaraze može biti i tzv. prezimljavajući inokulum koji se pri povoljnim uvjetima može zadržati u prirodi, odnosno prezimiti (Ignoffo i sur. 1977). U primjeru ovog istraživanja izvor sekundarnog inokuluma odnosno dodatne zaraze može biti:

a) kontakt sa zaraženim stjenicama ili njihovim kadaverima
b) konidije koje su stjenice prilikom izlaženja iz mahovine pokupile i svojim kretanjem ih dalje raširile, na primjer duž debla prema krošnji
c) inokulum koji je dobro zaštićen u mahovini i može predstavljati izvor zaraze za novu generaciju koja dolazi na prezimljavanje

Bolje planiranje i kontrola terenske aplikacije i jednostavnija evaluacija nakon tretmana

Jednostavnije je odrediti kolika je otprilike površina koja se želi tretirati i time je lakše izračunati i količinu potrebne suspenzije (primjerice po 1 m^2 mahovine), odnosno potrebnu

dozu i koncentraciju spora. Nakon provedenog tretmana pregledavanje tretiranih površina i praćenje procesa zaraze bilo bi jednostavnije jer potencijalne zone tretiranja ne bi prelazile visinu čovjekovih očiju (mahovina uobičajeno raste do 1-2 m visine na stablu). Treba napomenuti i da s obzirom da se prezimljavajuća generacija ne nalazi samo u mahovini nego i u utorima kore i u otpalom lišću i drugim ostatcima ispod zaraženog stabla tretiranjem mahovine (primjerice prskanjem) obuhvatile bi se i te zone.

No ovakav način tretiranja može imati i potencijalna ograničenja, kao što je primjerice provedba procesa evaluacije, koja da bi bila kvalitetna i precizna iziskuje vrijeme i veći broj ljudi koji bi detaljno pregledavali tretirane površine. Limit može predstavljati i tempiranje tretiranja zbog okolišnih uvjeta (npr. temperature i vlage) koji se moraju poklapati, odnosno biti povoljni. Također, pitanje je i opstanka inokuluma, tj. koliko bi inokuluma pri takvom tretiranju ušlo u samu mahovinu te tako bilo zaštićeno od prethodno navedenih nepovoljnih okolišnih uvjeta. Takva pitanja iziskuju provedbu daljnjih istraživanja.

U četvrtom provedenom pokusu ispitivala se patogenost dva izolata entomopatogene gljive *B. pseudobassiana* koji su izolirani sa kadavera hrastove mrežaste stjenice nađene u mahovini na stablu hrasta lužnjaka u Spačvi. Pokusi su izvedeni na isti način kao i prethodni, s ciljem da se usporedi da li postoji razlika u djelovanju gljive *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* kao prirodnog patogena stjenice u istim uvjetima. Također, u pokusu su korištena dva izolata iste vrste da se vidi postoji li i unutarvrsna razlika u patogenosti te gljive.

Rezultati su pokazali da je nakon 7 dana mortalitet iznosio 85% i 86%, s mikozom prisutnom na samo 1% i 8% jedinki. Nakon 14 dana mortalitet je u oba tretmana došao do 100% s mikozom od 18% i 30%, koja se daljnjim praćenjem do 20-tog dana popela na 32% i 49%. Takvi rezultati ne pokazuju veliko odudaranje od rezultata u pokusima s gljivom *B. bassiana*. Rezultati u Sönmez i sur. (2016) su također pokazali dobar potencijal vrste *B. pseudobassiana* s mortalitetom od 80% i mikozom od 70% na odraslim jedinkama stjenice nakon 14 dana.

U kontrolnoj skupini potvrđena je mikoza od 4% isto kao i kontrolnoj skupini u prethodnom pokusu. Uspoređivanjem s postotkom mikoze u tretmanu znači da bi se korištenjem izolata BBC10 inokulum povećao 8X, a korištenjem izolata BBCNK1 12X, što je bolji rezultat nego u prethodnim pokusima. Također, usporedbom patogenosti između dva izolata pokazalo se da unutarvrsna razlika ipak može postojati te se za eventualno buduće daljnje korištenje predlaže izolat BBNK1 koji je pokazao bolje rezultate u razvoju mikoze na jedinkama. Prosječni mortalitet kontrolnih skupina nakon 14 dana u pokusu provedenom u Sönmez i sur. (2016) bio

je oko 30%, što je u usporedbi s mortalitetom od 75% u kontrolnoj skupini ovog pokusa manje, no i dalje pokazuje da određeni prirodni mortalitet postoji, te se on javio vrlo brzo, odnosno u oba istraživanja već 4-ti dan nakon postavljanja pokusa. S obzirom da je biologijom hrastova mrežasta stjenica slična svojoj srodnici plataninoj mrežastoj stjenici (*Corythucha ciliata* Say) (Mendel i sur. 2016), a životni vijek njezinih odraslih stadija u prirodi je 4-10 dana (Kim i Jeong 1999), može se izvući zaključak da ni životni vijek adulta hrastove mrežaste stjenice nije dug (do 20 dana), što u nekoj mjeri objašnjava moralitet u kontrolnim skupinama svih provedenih pokusa.

4.2.4. Brojanje jedinki prezimljavajućih imaga hrastove mrežaste stjenice u mahovini

Svrha brojanja prezimljavajućih imaga u mahovini bila je dobiti okvirnu brojku koliko prosječno imaga prezimljava u mahovini te dobiti detaljniju sliku o prirodnom mortalitetu prezimljavajućih stjenica i prirodnom inokulumu entomopatogenih gljiva koji se može ondje naći. Detaljnim pregledom mahovine koja se sakupljala tijekom veljače i ožujka 2019-te na 6 različitih lokacija na području Spačve, dobiveno je da po 1 m^2 prezimljava u prosjeku 612 odraslih jedinki, s iznenađujuće visokim mortalitetom od 65%. Od nađenih mrtvih, na njih 19% bio je prisutan micelij gljive, što kao i u prethodnim pokusima pokazuje da u mahovini postoji prirodni inokulum entomopatogenih gljiva. Do sada nigdje u literaturi nije zabilježena identifikacija patogenih gljiva izoliranih sa hrastove mrežaste stjenice u prirodi, ali je zabilježen nalaz patogenih gljiva na prezimljavajućim adultima platanine stjenice u Italiji nađenih pod korom stabala od kojih su identificirane vrste *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas (današnji *Lecanicillium lecanii*) i *Paecilomyces farinosus* (Holm ex S. F. Gray) Brown and Smith (Ozino-Marletto i Menardo 1984). Provedbom ovakvih istraživanja kroz sljedeće zimske periode moglo bi se ustanoviti da li dolazi do rasta ili pada mortaliteta i prirodnog inokuluma, te može li se naći poveznica s promjenama vremenskih uvjeta zimi (temperatura, oborine, vlaga), odnosno klimatskim promjenama.

4.3. *Beauveria* gljive kao endofiti

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da gljive *B. bassiana* i *B. brongniartii* ne mogu endofitski kolonizirati mlade biljke hrasta lužnjaka inokulacijom putem lista i korijena. Ispitivanje potencijalnog prirodnog endofitizma gljiva roda *Beauveria* u iglicama alepskog bora također nije potvrdilo nalaz tih gljiva niti u jednom ispitivanom uzorku.

Endofitska priroda entomopatogenih gljiva roda *Beauveria* do sada je ispitivana na brojnim poljoprivrednim vrstama (npr. Bing i Lewis 1991, Wagner i Lewis 2000, Ullrich i sur. 2017, Rondot i Reineke 2018 itd.), dok je vrlo malo istraživanja provedeno na šumskim vrstama (npr. Reay i sur. 2010, Brownbridge i sur. 2012), stoga je istraživanje ove problematike na hrastu lužnjaku i alepskom boru vrlo izazovno. U Kranjec Orlović i sur. (2020) gljiva *B. bassiana* nađena je u poljskom jasenu (*Fraxinus angustifolia* Vahl) i to je jedini primjer gdje se ova vrsta spominje kao endofit neke šumske vrste u Hrvatskoj.

Prilikom detaljnih mikroskopskih (histoloških) analiza oko 5000 uzoraka lišća i korijenja hrasta lužnjaka nakon inokulacije, niti u jednom slučaju nije zabilježena prisutnost hifa i blastospora gljiva *B. bassiana* i *B. brongniartii* u lisnom i korijenskom parenhimu, već su se zadržale samo na površini biljnih dijelova.

Za razliku od prethodnih istraživanja u kojima su korištene samo metode molekularne detekcije DNA iz biljnog materijala, u nekim novijim histološkim istraživanjima pokazalo se da unutarnja (endofitska) kolonizacija tkiva lišća nakon inokulacije sojeva gljiva *Beauveria bassiana* nije bila moguća, ili je eventualno imala samo prolazni karakter (Landa i sur. 2013, Ullrich i sur. 2017, Koch i sur. 2018). To se podudara i s rezultatima ovog istraživanja gdje su također korištene histološke metode (fluorescentna i konfokalna mikroskopija) koje, premda su dugotrajnije i iscrpnije, s najvećom sigurnošću mogu detektirati prisutnost hifa i spora u biljnom tkivu. Nemogućnost ovih gljiva da endofitski koloniziraju tkivo može se objasniti ili kroz obrambeni mehanizam biljaka koje proizvode sekundarne metabolite koji inhibiraju klijanje spora (Peng i Kuc 1992, Bednarek i sur. 2009) ili kroz nedostatak enzima tih gljiva koji bi im omogućio da razgrađuju stanične stijenke i stanične membrane biljnog tkiva i da priskrbljuju hranjive tvari iz međustaničnog prostora biljaka (Ullrich i sur. 2017, Koch i sur.

2018). Nije isključeno da bi ista ispitivanja s nekim drugim sojevima ovih gljiva ili drugim šumskim vrstama kao domaćinima dala drugačije rezultate.

No bez obzira na neuspješnu kolonizaciju, potpuno razvijene hife gljive *B. brongniartii* nađene su kako obavijaju korijenski sustav hrasta lužnjaka čak 10 mjeseci nakon inokulacije, što je pokazatelj njihove perzistentnosti. Neka prethodna istraživanja već su pokazala da *Beauveria* sp. gljive mogu opstati u tlu duže vrijeme nakon inokulacije, pa su tako u Coombes i sur. (2016) detektirane nakon pet mjeseci, u Dolci i sur. (2006) nakon dvije godine, dok su u Enkerli i sur. (2004) i Mayerhofer i sur. (2015) nađene u tlu čak 14 i 15 godina nakon aplikacije.

Poznato je da vrste roda *Beauveria* mogu kolonizirati rizosferu biljaka, odnosno razvijati se u tlu oko korijena te tako pružati zaštitu biljkama od zemljišnih štetnika (kukaca koji žive u tlu ili na samoj površini tla i rade štete na podzemnim organima biljaka) (npr. Keller i sur. 1997, Mayerhofer i sur. 2015, Ramos i sur. 2017). Razvijene hife oko mladih finih korjenčića hrasta lužnjaka identificirane u ovom istraživanju i njihova održivost tijekom dužeg perioda mogu ukazivati na razvoj neke vrste simbioze, odnosno uravnoteženog bliskog odnosa ovih gljiva s domaćinom, gdje gljiva štiti korijenski sustav biljke od štetnih kukaca, istodobno uzimajući potrebne hranjive tvari iz eksudata korijena. Takvi odnosi već su istraživani u Zitlalpopoca-Hernandez i sur. (2017) kod gljive *B. bassiana* i korijenskog sustava kukuruza.

Kod ispitivanja prirodne prisutnosti gljiva roda *Beauveria* u iglicama alepskog bora niti u jednom slučaju nije potvrđen njihov identitet. Korištenjem metode površinske sterilizacije i nasađivanja komadića iglica alepskog bora na hranjivu podlogu dobivene su kulture različitih endofitskih gljiva, ali niti jedna nije pripadala *Beauveria* sp. vrstama, te je metodom imunofluorescencije nakon pregledanih oko 800 uzoraka komadića iglica alepskog bora to dodatno potvrđeno. Iako je gljiva *B. bassiana* već nađena kao endofit u iglicama i sjemenu vrsta *Pinus* sp. (Reay i sur. 2010, Ganley i Newcombe 2006), pretpostavlja se da ta pojava nije toliko učestala, ovisi o soju gljive, te se može pojaviti u različitim razdobljima života biljke (Brownbridge i sur. 2012), što dodatno otežava samu detekciju.

5. ZAKLJUČCI

I. U ovom istraživanju identificirane su dvije vrste entomopatogenih gljiva iz roda *Beauveria* nađene na različitim vrstama kukaca iz rodova Lepidoptera, Coleoptera i Heteroptera te na različitim lokalitetima u Hrvatskoj, koje su morfološkim, molekularnim i filogenetskim analizama potvrđene kao *Beauveria bassiana* i *Beauveria pseudobassiana.* Ovo je ujedno i prvi nalaz gljive *B. pseudobassiana* u Hrvatskoj.

II. Analize tla uzorkovanog na različitim lokalitetima u Republici Hrvatskoj potvrdile su prisutnost različitih vrsta entomopatogenih gljiva, koje su nakon morfoloških i molekularnih analiza svrstane u rodove *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Purpureocillium* sp., *Lecanicillium* sp., *Tolypocladium* sp., *Paecilomyces* sp. i *Trichosporon* sp. Rezultati izračuna prosječnog broja kolonija u 1 g tla po ponavljanjima i po točkama svake lokacije pokazali su da se raspon ukupne gustoće kolonija (CFU) entomopatogenih gljiva u tlu kreće od 4×10^3 do 29×10^3 CFU g^{-1}.

III. Gljive roda *Beauveria* zabilježene su na najviše točaka uzorkovanja tla, te je njihova zastupljenost u ukupnom udjelu nađenih i identificiranih rodova gljiva iznosila 22 %, sa sveukupnim prosječnim brojem kolonija na svim lokacijama od $3{,}6 \times 10^3$ CFU g^{-1}.

IV. Ispitivanje utjecaja insekticida ASSET na klijavost spora i razvoj izolata BBS, BBC10 i BBNK1 pokazalo je da je on kompatibilan sa lokalnim sojevima gljiva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* i da je pogodan za korištenje u kombiniranoj varijanti za daljnja pokusna tretiranja.

V. Laboratorijskim pokusima pokazalo se da su domaći sojevi gljiva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* patogeni za ciljane štetne organizme (hrastovu mrežastu stjenicu i borovog prelca) te da imaju dobar potencijal u biološkoj kontroli, a njihovo korištenje kao prirodnog neprijatelja protiv tih organizama predstavlja ekološki prihvatljivo rješenje koje bi moglo zamijeniti ili barem smanjiti upotrebu kemijskih insekticida.

VI. Provedena laboratorijska ispitivanja treba proširiti i na terensku aplikaciju kako bi se ispitao utjecaj dobivenih optimalnih doza i koncentracija na ciljane štetne organizme i u prirodnim uvjetima.

VII. Ispitativanje mogućnosti korištenja vrsta *B. bassiana* i *B. brongniartii* kao endofita u hrastu lužnjaku pokazale su da one ne mogu biti inokulirane kao endofiti u biljno tkivo te tako štititi biljku od napada štetnih kukaca.

VIII. Ispitivanje endofitizma *Beauveria* gljiva kod alepskog bora provedeno da bi se utvrdilo da li su ove gljive prirodno prisutne u iglicama alepskog bora te postoji li korelacija između slamanja populacije borovog prelca opisanog u Matek i Pernek (2018) i njihove endofitske prisutnosti pokazalo je da te gljive nisu prirodno prisutne u iglicama i da one ne predstavljaju izvor zaraze, do koje je vjerojatno došlo preko tla.

IX. Sve provedene analize i pokusi u ovom istraživanju ukazuju na to da konzervacijska biološka kontrola, odnosno korištenje sojeva gljiva roda *Beauveria* koji su već prisutni kao prirodni neprijatelji hrastove mrežaste stjenice i borovog prelca, ima dobar potencijal kao alternativa dosadašnjim metodama kontrole ovih štetnika. Rezultati pokusa u kojima se za suzbijanje hrastove mrežaste stjenice kao invazivne vrste koristio domaći soj dobiven s borovog prelca također su se pokazali zadovoljavajućima, stoga se i ovakav način kontrole nameće kao potencijalno rješenje. S obzirom da takav pristup ne spada niti u jednu od tri do sada opisane kategorije biološke kontrole (klasična, augmentativna (inundativna) i konzervacijska) predlažemo uvođenje akomodacijske/adaptacijske biološke kontrole kao četvrte moguće kategorije. Akomodacijska/adaptacijska biološka kontrola bi se prema tome definirala kao vrsta biološke kontrole gdje se za suzbijanje i kontrolu strane invazivne vrste štetnog organizma koriste domaće vrste, tj. prirodni neprijatelji ili kompetitori već prisutni u tom području.

X. Ovo je prvo istraživanje koje daje uvid u biološku kontrolu entomopatogenim gljivama kao još uvijek relativno nepoznato područje u šumarstvu koje treba dalje razvijati i uključiti kao komponentu u integriranom sustavu zaštite šuma, a metodološki slično istraživanje do sada nije provedeno na području Republike Hrvatske

6. LITERATURA

Anderson TE, Roberts DW, 1983. Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *J Econ Entomol* 76(6): 1437-1441.

Atkins SD, Clark IM, 2004. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J Appl Genet* 45(1): 3-15.

Balazy S, 1993. *Entomophthorales*. *Państwowe Wydawn Nauk* 24. Krakow, Poland, Polish Academy of Sciences, 356 str.

Balsamo-Crivelli G, 1835a. Aufstellung von zwei neuen Arten Mucedineen, *Botrytis bassiana* und *Mucor radicans*, etc. *Linnaea* 10: 609–618.

Balsamo-Crivelli G, 1835b. Observazione sopra una nuova spezie dimucedinea del genere *Botrytis*. *Bibl Ital* 79: 125–129.

Barbosa P, 1998. Conservation Biological Control. Academic Press, University of Maryland, College Park, Maryland, 396 str.

Barra-Bucarei L, France-Iglesias A, Gerding-González M, Silva-Aguayo G, Carrasco-Fernández J, Castro JF, Ortiz Campos J, 2020. Antifungal activity of *Beauveria bassiana* endophyte against *Botrytis cinerea* in two *Solanaceae* crops. *Microorganisms* 8(1): 65.

Bassi A, 1835. Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, malattia che affligge i bachi da seta, e sul modo di liberarne le bigattaje anche le più infestate. Parte prima: della teoria. Tipografia Orcesi, Lodi, Italy.

Bassi A, 1836. Del mal del segno e di altre malattie dei bachi da seta. Parte seconda: practica. Tipografia Orcesi, Lodi, Italy.

Bateman RP, Douro-Kpindou OK, Kooyman C, Lomer C, Ouambama Z, 1998. Some observations on the dose transfer of mycoinsecticide sprays to desert locusts. *Crop Prot* 17(2): 151–158.

Batista FA, 1989. Controle biológico e o manejo integrado de pragas. *Biológico* 55: 36-39.

Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Svatos A, Schneider B, Doubsky J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, Molina A, Schulze-Lefert P, 2009. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 323: 101-106.

Behie SW, Jones SJ, Bidochka MJ, 2015. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecol* 13: 112–119.

Bernardinelli I, 2006. Potential host plants of *Corythucha arcuata* (Het., Tingidae) in Europe: a laboratory study. *J Appl Entomol* 130:480-484.

Bernardinelli I, Zandigiacomo P, 2000. Prima segnalazione di *Corythucha arcuata* (Say) (Heteroptera, Tingidae) in Europa. *Informatore Fitopatologico* 50: 47–49.

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I, 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trend Ecol Evol* 22: 148–155.

Bidochka MJ, Kasperski JE, Wild GAM, 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near- northern habitats. *Can J Botany* 76(7): 1198–1204.

Billings FH, Glenn PA, 1911. Results of the artificial use of the white-fungus disease in Kansas. USDA *Bur Entomol Bull* 107: 58.

Bing LA, Lewis LC, 1991. Suppression of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Environ Entomol* 20: 1207–1211.

Bing DS, Xing ZL, 2008. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Appl Soil Ecol* 39: 100- 108.

Björkman C, Lindelöw A, Eklund K, Kyrk S, Klapwijk Mj, Fedderwitz F, Nordlander G, 2013. A rare event- an isolated outbreak of the pine-tree lappet moth (*Dendrolimus pini*) in the Stockholm archipelago. *Entomol Tidskr* 134(1-2): 1-9.

Boomsma JJ, Jensen AB, Meyling NV, Eilenberg J, 2014. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annu Rev Entomol* 59: 467–485.

Bridge PD, Worland MR, 2004. First report of an entomophthoralean fungus on an arthropod host in Antarctica. *Polar Biol* 27: 190-192.

Brownbridge M, Reay SD, Nelson TL, Glare TR, 2012. Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of radiata pine seed and seedlings. *Biol Control* 61(3): 194-200.

Bruck DJ, 2010. Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *BioControl* 55: 103–112.

Charnley AK, Collins SA, 2007. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek CP, Druzhinina IS (eds) The Mycota IV, Environmental and Microbial Relationships, 2nd ed. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 159–187.

Csóka G, Hirka A, Mutun S, Glavendekić M, Mikó Á, Szőcs L, Paulin M et al., 2019. Spread and potential host range of the invasive oak lace bug [*Corythucha arcuata* (Say, 1832) - Heteroptera: Tingidae] in Eurasia. *Agr Forest Entomol* 22: 61-74.

Connell WA, Beacher JH, 1947. Life history and control of the oak lace bug. *Bulletin of the University of Delaware Agricultural Experiment Station* 265, pp. 27-28.

Coombes CA, Hill MP, Moore SD, Dames JF, 2016. Entomopathogenic fungi as control agents of *Thaumatotibia leucotreta* in citrus orchards: field efficacy and persistence. *BioControl* 61: 729–739.

De Bary A, 1884. Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bacterien. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, Berlin.

De Hoog GS, 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium*, and *Acrodontium*, gen. nov. *Stud Mycol* 1: 1–41.

Dobreva M, Simov N, Georgiev G, Mirchev P, Georgieva M, 2013. First Record of *Corythucha arcuata* (Say) (Heteroptera: Tingidae) on the Balkan Peninsula. *Acta Zool Bulg* 65(3): 409–412.

Dolci P, Guglielmo F, Secchi F, Ozino OI, 2006. Persistence and eficacy of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against *Melolontha melolontha* in the Valley of Aosta (northwest Italy). *J Appl Microbiol* 100: 1063-1072.

Drake CJ, Ruhoff FA, 1965. Lacebugs of the world, a Catalog (Hemiptera: Tingidae). *Bulletin of the United States National Museum* 243: 1–634.

Dreistadt SH, Perry EJ, 2014. Lace Bugs: Integrated pest management for home gardeners and landscape professionals. Pest Notes, University of California Agricultural and Natural Resources, *Bulletin* 1-4.

Drummond FC, Groden E, 1996. Insect pests and natural enemies. In: Marra MC, Harrity BA (eds) The Ecology, Economics, and Management of Potato Cropping Systems: A Report of the First Four Years of the Maine Potato Ecosystem Project. *Maine Agricultural and Forest Experiment Station Bulletin* 843, Maine, SAD, pp. 80–118.

Eilenberg J, Hajek A, Lomer C, 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387–400.

Eilenberg J, 2002. Biology of fungi from the order *Entomophthorales*. DSc thesis. Denmark, Royal Veterinary and Agricultural University.

Enkerli J, Widmer F, Keller S, 2004. Long-term field persistence of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. *Biol Control* 29: 115–123.

Evans HC, Hywel-Jones NL, 1997. Entomopathogenic fungi. In: World Crop Pests 7, Elsevier, pp. 3-27.

Farenhorst M, Knols BGJ, Thomas MB, Howard AFV, Takken W, Rowland M, N'Guessan R, 2010. Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against West African insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PLoS One* 5(8): e12081.

Fargues J, Luz C, 2000. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Biocontrol Sci Techn* 8: 323–334.

Faria MRD, Wraight SP, 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* 43: 237-256.

Feng MG, Poprawski TJ, Khachatourians GG, 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci Techn* 4: 3–34.

Ferron P, 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annu Rev Entomol* 23: 409–442.

Ferron P, 1977. Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti: Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae). *Entomophaga* 22: 393–396.

Forster B, Giacalone I, Moretti M, Dioli P, Wermelinger B, 2005. Die Amerikanishe Eichennetzwaanze *Corythucha arcuata* (Say) (Heteroptera, Tingidae) hat die Südschweitz erreicht. *Mitt Schweiz Entomol Ges, Bulletin de la Societe Entomologue Suisse* 78: 317–323.

Ganley RJ, Newcombe G, 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycol Res* 110: 318–327.

Garrido-Jurado I, Ruano F, Campos M, Quesada-Moraga E, 2011. Effects of soil treatments with entomopathogenic fungi on soil dwelling non-target arthropods at a commercial olive orchard. *Biol Control* 59(2): 239-244.

Gava CAT, Tavares PFDS, Gonçalves JS, Paranhos BAJ, 2019. Applying local entomopathogenic fungi strains to the soil can control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Wiedemann adults. *Biocontrol Sci Techn* 30(2): 1-13.

Gibson DM, Donzelli BGG, Krasnoff SB, Keyhani NO, 2014. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. *Nat Prod Rep* 31: 1287–1305.

Goettel MS, Eilenberg J, Glare TR, 2005. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S (eds) Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier, Amsterdam, pp. 361–405.

Goettel MS, Poprawski TJ, Vandenberg JD, Li Z, Roberts DW, 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird M, Lacey LA, Davidson EM (eds) Safety of microbial insceticides. CRC Press Inc.

Hajek A, 1997. Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. In: Jones GJ (ed) Advances in Microbial Ecology. Springer, New York, USA, Volume 15, pp. 193–249.

Heinig RL, Paaijmans KP, Hancock PA, Thomas MB, 2015. The potential for fungal biopesticides to reduce malaria transmission under diverse environmental conditions. *J Appl Ecol* 52: 1558–1566.

Henke MO, de Hoog GS, Gross U, Zimmermann G, Kraemer D, Weig M, 2002. Human deep tissue infection with an entomopathogenic *Beauveria* species. *J Clin Microbiol* 40: 2698–2702.

Hernández MM, Martinez-Villar E, Peace C, Pérez-Moreno I, Marco V, 2012. Compatibility of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with flufenoxuron and azadirachtin against *Tetranychus urticae*. *Exp Appl Acarol* 58(4): 395-405.

Hrašovec B, Posarić D, Lukić I, Pernek M, 2013. Prvi nalaz hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*) u Hrvatskoj. *Sumar List* 137: 499–503.

Hull LA, Beers EH, 1985. Ecological selectivity: modifying chemical control practices to preserve natural enemies. In: Herzog DC, Hoy MA (eds) Biological Control in Agricultural IPM Systems. Academic Press, pp. 103-123.

Humber RA, 2008. Evolution of entomopathogenicity in fungi. *J Invertebr Pathol* 98: 262–266.

Humber RA, 2012. Identification of Entomopathogenic Fungi. In: Lacey LA (ed) Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Academic Press, London, pp. 151–187.

Humber RA, 2017. Back to the future: cordycipitoid fungi in a postgenomic world. *Mycology* 8(4): 267-275.

Ignoffo CM, 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Fla Entomol* 75(4): 516-525.

Ignoffo CM, Garcia C, Hostetter DL, Pinnel RE, 1977. Laboratory studies of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*: soil-borne contamination of soybean seedlings and dispersal of diseased larvae of *Trichoplusia ni. J Invertebr Pathol* 29(2): 147–152.

Imoulan A, Elmeziane A, 2013. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* isolated from Moroccan Argan forests soil against larvae of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in laboratory conditions. *World J Microbiol Biotechnol* 30: 959–965.

Imoulan A, Li Y, Wang WJ, El Meziane A, Yao YJ, 2016a. New record of *Beauveria pseudobassiana* to Morocco. *Mycotaxon* 131: 913–923.

Imoulan A, Wu HJ, Lu WL, Li Y, Li BB, Yang RH, Wang WJ, Wang XL, Kirk PM, Yao YJ, 2016b. *Beauveria medogensis* sp. nov., a new fungus of the entomopathogenic genus from China. *J Invertebr Pathol* 139: 74–81.

Imoulan A, Hussain M, Kirk PM, El Meziane A, Yao YJ, 2017. Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *J Asia-Pac Entomol* 20(4): 1204-1212.

Inglis GD, Goettel MS, Johnson DL, 1993. Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa. *Biol Control* 3: 258–270.

Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H, 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. *Fungi as biocontrol agents* 23-69.

Inglis GD, Enkerli J, Goettel MS, 2012. Laboratory Techniques Used for Entomopathogenic Fungi: Hypocreales. In: Lacey LA (ed) Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Academic Press, London, pp. 189–253.

Islam MT, Castle SJ, Ren S, 2010. Compatibility of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* with neem against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, on eggplant. *Entomol Exp Appl* 134(1): 28-34.

Jaber LR, Enkerli J, 2017. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? *Biocontrol Sci Techn* 27(1): 28-41.

Jaber LR, Ownley BH, 2018. Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biol Control* 116: 36-45.

Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski S, 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl* 55: 129–145.

Jaronski ST, Mascarin GM, 2017. Mass production of fungal entomopathogens. In: Microbial Control of Insect and Mite Pests. Academic Press, pp. 141-155.

Kabaluk JT, Svircev AM, Goettel MS, Woo SG, 2010. The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide. International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants (IOBC), p. 99.

Keller S, Kessler P, Schweizer C, 2003. Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *BioControl* 48: 307–319.

Keller S, Pärli B, Lujan M, Schweizer C, 1993. Der Einfluß von Fungiziden auf den insektenpathogenen Pilz *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. *Anz Schädlingskd Pfl* 66: 108–114.

Keller S, Schweizer C, Keller E, Brenner H, 1997. Control of white grubs (*Melolontha melolontha* L.) by treating adults with the fungus *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Techn* 7: 105–116.

Khetan SK, 2001. Microbial Pest Control, 1st edition. Marcel Dekker, New York, pp. 167-190.

Kim C, Jeong J, 1999. Ecological studies on the sycamore lace bug, *Corythucha ciliata* (Hemiptera: Tingidae). I. Developmental characteristics, adult behavior and sex ratio. *Journal of Research Forests of Kangwon National University* 19: 1–5.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA, 2008. Dictionary of the Fungi, 10th ed. CABI Publisher, Wallingford, UK, pp. 784.

Klingen I, Haukeland S, 2006. The soil as a reservoir for natural enemies of pest insects and mites with emphasis on fungi and nematodes. In: Eilenberg J, Hokkanen HMT (eds) An Ecological and Societal Approach to Biological Control. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 145–211.

Koch E, Zink P, Ullrich CI, Kleespies RG, 2018. Light microscopic studies on the development of *Beauveria bassiana* and other putative endophytes in leaf tissues. *Journal of Cultivated Plants* 70: 94-106.

Kõljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K, Tedersoo L, Taylor AFS, Bahram M, Bates ST, Bruns TT, Bengtsson-Palme J et al., 2013. Towards a unified paradigm for sequence–based identification of fungi. *Mol Ecol* 22: 5271–5277.

Krassilstschik IM, 1888. La production industrielle des parasites vegetaux pour la destruction des insectes nuisibles. *Bull Sci Fr Belg* 19: 461–472.

Lackovic N, Pernek M, 2012. Mogucnost primjene entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* za suzbijanje jasenove pipe (*Stereonychus fraxini*). *Radovi* (Hrvat. šumar. inst.) 44(2): 101-111.

Landa BB, Lopez-Diaz C, Jimenez-Fernandez D, Montes-Borrego M, Munoz- Ledesma FJ, Ortiz-Urquiza A et al., 2013. In-planta detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *J Invertebr Pathol* 114: 128–138.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS, 2015. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *J Invertebr Pathol* 132: 1–41.

Li ZZ, 1988. List on the insect hosts of *Beauveria bassiana*. In: Study and Application of Entomogenous Fungi in China, Vol 1. Academic Periodical Press, Beijing, pp. 241–255. (in Chinese with Latin names and English summary)

Lovett B, St. Leger RJ, 2015. Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. *Curr Genet* 61(3): 253–261.

Maina UM, Galadima IB, Gambo FM, Zakaria D, 2018. A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *J Entomol Zool Stud* 6(1): 27-32.

Mascarin GM, Jaronski ST, 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J Microb Biot* 32(11): 177.

Matek M, Pernek M, 2018. First Record of *Dendrolimus pini* Outbreak on Aleppo Pine in Croatia and Severe Case of Population Collapse Caused by Entomopathogen *Beauveria bassiana*. *South-east Eur for* 9(2): 91-96.

Mayerhofer J, Enkerli J, Zelger R, Strasser H, 2015. Biological control of the European cockchafer: persistence of *Beauveria brongniartii* after long-term applications in the Euroregion Tyrol. *BioControl* 60(5): 617-629.

McCoy CW, Samson RA, Boucias DG, 1988. Entomogenous fungi. In: Ignoffo C, Mandava NB (eds) CRC Handbook of Natural Pesticides, Vol 5. Microbial Insecticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 151–234.

McKinnon AC, Saari S, Moran-Diez ME, Meyling NV, Raad M, Glare TR, 2017. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. *BioControl* 62: 1-17.

Mendel Z, Branco M, Battisti A, 2016. Invasive Sap-Sucker Insects in the Mediterranean Basin. In: Paine TD, Lieutier F (eds) Insects and Diseases of Mediterranean Forest Systems. Springer, Cham, pp. 261-291.

Metchnikoff EA, 1880. Zur Lehre über Insektenkrankenheiten. *Zool Anz* 3: 44–47.

Meyling NV, Eilenberg J, 2006. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycol Res* 110(2): 188-195.

Meyling NV, Eilenberg J, 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biol Control* 43(2): 145-155.

Mietkiewski RT, Pell JK, Clark SJ, 1997. Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK: field and laboratory comparisons. *Biocontrol Sci Technol* 7: 565–575.

Moore R, Cottrell J, A'hara S, Ray D, 2017. Pine-tree lappet moth (*Dendrolimus pini*) in Scotland: Discovery, timber movement controls and assessment of risk. *Scott For* 71(2): 34-43.

Mutun S, 2003. First report of the oak lace bug, *Corythucha arcuata* (Say, 1832) (Heteroptera: Tingidae) from Bolu, Turkey. *Israel J Zool* 33: 263–268.

Müller-Kögler E, 1965. Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schädlingsbekämpfung und Grundlagen der Insektenmykologie. Berlin, P. Parey Verlag, p. 444.

Niu X, Xie W, Zhang J, Hu Q, 2019. Biodiversity of entomopathogenic fungi in the soils of South China. *Microorganisms* 7(9): 311.

O'Callaghan M, Brownbridge M, 2009. Environmental Impacts of Microbial Control Agents Used for Control of Invasive Pests. In: Hajek AE, Glare TR, O'Callaghan M (eds) Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods. Progress in Biological Control, Vol 6. Springer, Dordrecht, pp. 305-327.

Orlović JK, Moro M, Diminić D, 2020. Role of Root and Stem Base Fungi in *Fraxinus angustifolia* (Vahl) Dieback in Croatian Floodplain Forests. *Forests* 11(6): 607.

Ortiz-Urquiza A, Keyhani NO, 2013. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4: 357–374.

Ortiz-Urquiza A, Riveiro-Miranda L, Santiago-A´ lvarez C, Quesada-Moraga E, 2010. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol* 105(3): 270–278.

Ozino-Marletto OI, Menardo R, 1984. Micromiceti isolati da *Corythucha ciliata* (Say). *Boll Lab Ent Agr Filippo Silvestri* 41: 183–188.

Pan WY, Zheng H, 1988. Report on application of *Beauveria bassiana* against *Dendrolimus tabulaeformis* in arid forest region. In: Li YW, Wu JW, Wu ZK, Xu QF (eds) Study and Application of Entomogenous Fungi in China, Vol 1. Academic Periodical Press, Beijing, China, pp. 7–76.

Pell JK, Eilenberg J, Hajek AE, Steinkraus DC, 2001. Biology, ecology and pest management potential of *Entomophthorales*. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, pp. 71–153.

Peng M, Kuc J, 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopathology* 82: 696-699.

Pernek M, 2007. Utjecaj gljive *Beauveria bassiana* na jelove potkornjake. *Radovi* (Šumar. inst. Jastrebar.) 42(2): 143–153.

Porter JR, 1973. Agostino Bassi bicentennial (1773–1973). *Bacteriol Rev* 37: 284-288.

Puzari KC, Hazarika LK, Dutta P, Das P, 2006. *In vitro* inhibition of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. growth by different commonly used insecticides in rice. *Journal of Biological Control* 20(1): 51-56.

Ramos Y, Portal O, Lysøec E, Meyling NV, Klingen I, 2017. Diversity and abundance of *Beauveria bassiana* in soils, stink bugs and plant tissues of common bean from organic and conventional fields. *J Invertebr Pathol* 150: 114–120.

Ramoska WA, 1984. The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the chinch bug *Blissus leucopterus. J Invertebr Pathol* 43(3): 389–394.

Rapid Pest Risk Analysis (PRA) for: *Corythucha arcuata*. November 2018, UK government Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra), London, United Kingdom.

Quesada-Moraga E, López-Díaz C, Landa BB, 2014. The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: first demonstration of vertical plant transmission. *PLoS One* 9(2): e89278.

Ray D, Peace A, Moore R, Petr M, Grieve Y, Convery C, Ziesche T, 2016. Improved prediction of the climate-driven outbreaks of *Dendrolimus pini* in *Pinus sylvestris* forests. *Forestry* 89(2): 23-244.

Reay SD, Brownbridge M, Gicquel B, Cummings NJ, Nelson TL, 2010. Isolation and characterization of endophytic *Beauveria* spp. (Ascomycota: Hypocreales) from *Pinus radiata* in New Zealand forests. *Biol Control* 54(1): 52-60.

Rehner SA, 2005. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: Vega FE, Blackwell M (eds) Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution. Oxford University Press, New York, pp. 3–27.

Rehner SA, Buckley EP, 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1–α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: 84–98.

Rehner SA, Posada F, Buckley EP, Infante F, Castillo A, Vega FE, 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s. l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *J Invertebr Pathol* 93: 11–21.

Rehner SA, Minnis AM, Sung GH, Luangsaard JJ, Devotto L, Humber RA, 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103: 1055–1073.

Roberts DW, Humber RA, 1981. Entomogenous fungi. In: Cole GT, Kendrick B (eds) Biology of Conidial Fungi. Academic Press, New York, pp. 201-236.

Rondot Y, Reineke A, 2018. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biol Control* 116: 82-89.

Roubos CR, Rodriguez-Saona C, Isaacs R, 2014. Mitigating the effects of insecticides on arthropod biological control at field and landscape scales. *Biol Control* 75: 28–38.

Roy HE, Vega FE, Chandler D, 2010. The Ecology of Fungal Entomopathogens. Springer, The Netherlands, pp. 204.

Russo ML, Pelizza SA, Cabello MN, Stenglein SA, Scorsetti AC, 2015. Endophytic colonization of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). *Biocontrol Sci Technol* 25: 475-480.

Sahayaraj K, Namasivayam SKR, Rathi JM, 2011. Compatibility of entomopathogenic fungi with extracts of plants and commercial botanicals. *Afr J Biotechnol* 10(6): 933-938.

Saikkonen K, Saari S, Helander M, 2010. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Divers* 41: 101–113.

Samson R, Evans H, Latgé JP, 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi, 1st ed. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, p. 187.

Sánchez-Peña SR, Lara J, Medina RF, 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. *J Insect Sci* 11(1): 1-10.

Santos TTMD, Quintela ED, Mascarin GM, Santana MV, 2018. Enhanced mortality of *Bemisia tabaci* nymphs by *Isaria javanica* combined with sublethal doses of chemical insecticides. *J Appl Entomol* 142(6): 598-609.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc Natl Acad Sci* 109: 6241–6246.

Schulz B, Boyle C, 2005. The endophytic continuum. *Mycol Res* 109: 661-686.

Shah PA, Pell JK, 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotech* 61: 413–423.

Shaw KE, Davidson G, Clark SJ, Ball BV, Pell JK, Chandler D, Sunderland KD, 2002. Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. *Biol Control* 24: 266–276.

Shrestha B, Hyun MW, Oh J, Han JG, Lee TH, Cho JY, Kang H, Kim SH, Sung GH, 2014. Molecular evidence of a teleomorph-anamorph connection between *Cordyceps scarabaeicola* and *Beauveria sungii* and its implication for the systematics of *Cordyceps sensu stricto*. *Mycoscience* 55: 231–239.

Sierpinska A, 1998. Towards an integrated management of *Dendrolimus pini* L. In: McManus ML, Liebhold AM (eds) Proceedings: Population Dynamics, Impacts, and Integrated Management of Forest Defoliating Insects. USDA Forest Service General Technical Report NE-247, pp. 129-142.

Sinclair BJ, Ferguson LV, Salehipour-Shirazi G, MacMillan HA, 2013. Cross-tolerance and cross-talk in the cold: relating low temperatures to desiccation and immune stress in insects. *Integr Comp Biol* 53(4): 545-556.

Skrzecz I, Ślusarski S, Tkaczyk M, 2020. Integration of science and practice for *Dendrolimus pini* (L.) management – A review with special reference to Central Europe. *Forest Ecol Manag* 455: 117697.

Solter LF, Hajek AE, Lacey LA, 2017. Exploration for entomopathogens. In: Lacey LA (ed) Microbial control of insect and mite pests. London, Academic Press, pp. 13–23.

Sönmez E, Demirbag Z, Demir I, 2016. Pathogenicity of selected entomopathogenic fungal isolates against the oak lace bug, *Corythucha arcuata* Say. (Hemipteran: Tingidae), under controlled conditions. *Turk J Agric For* 40: 715-722.

Steinhaus EA, 1949. Principles of Insect Pathology. Hafner Publishing Company, New York.

Steinhaus EA, 1975. Disease in a Minor Chord. Ohio State University Press, Columbus.

St. Leger RJ, 2008. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *J Invertebr Pathol* 98(3): 271–276.

St. Leger RJ, Wang C, 2010. Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve efficacy against insect pests. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 901-907.

Strasser H, Vey A, Butt TM, 2000. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium, Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Sci Tech* 10: 717–735.

Strasser H, Forer A, Schinner F, 1996. Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. In: Jackson TA, Glare TR (eds) Proceedings of the Third International Workshop on Microbial Control of Soil Dwelling Pests. AgResearch, Lincoln, New Zealand, pp. 125–130.

Strasser H, 1999. Beurteilung der Wirksamkeit des biologischen Pflanzenschutz präparates Melocont- Pilzgerste zur Maikäferbekämpfung. Der Förderungsdienst 5: 158–164.

Streito JC, Balmès V, Aversenq P, Weill P, Chapin E, Clément M, Piednoir F, 2018. *Corythucha arcuata* (Say, 1832) et Stephanitis lauri Rietschel, 2014, deux espèces invasives nouvelles pour la faune de France (Hemiptera, Tingidae). *L'Entomologiste* 74: 133–136.

Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-Ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW, 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 57: 5–59.

Tabashnik BE, Croft BA, 1982. Managing pesticide resistance in crop-arthropod complexes: Interactions between biological and operational factors 1. *Environ Entomol* 11(6): 1137–1144.

Tkaczuk C, Krzyczkowski T, Wegensteiner R, 2012. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from mid-field woodlots and adjacent small-scale arable fields. *Acta Mycol* 47(2): 191–202.

Tkaczuk C, Król A, Majchrowska-Safaryan A, Nicewicz Ł, 2014. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. *J Ecol Eng* 15(4): 137-144.

Tucker DL, Beresford CH, Sigler L, Rogers K, 2004. Disseminated *Beauveria bassiana* infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Microbiol* 42: 5412–5414.

Ullrich CI, Koch E, Matecki C, Schäfer J, Burkl T, Rabenstein F, Kleespies RG, 2017. Detection and growth of endophytic entomopathogenic fungi in dicot crop plants. *Journal of Cultivated Plants* 69: 291-302.

Van der Putten WH, Vet LEM, Harvey JA, Wäckers FL, 2001. Linking above- and belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. *Trends Ecol Evol* 16(10): 547-554.

Vega FE, 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *J Invertebr Pathol* 98(3): 277-279.

Vega FE, Posada F, Aime MC, Pava-Ripoll M, Infante F, Rehner SA, 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol Control* 46: 72-82.

Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzón A, Ownley BH, Pell JK, Rangel DEN, Roy HE, 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol* 2(4): 149-159.

Vidal S, Jaber LR, 2015. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte- herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Curr Sci* 109: 46–54.

Vincent C, Goettel MS, Lazarovits G, 2007. Biological control: A global perspective: case studies from around the world. CABI International, Wallingford, UK, pp. 1–6.

Vuillemin P, 1912. *Beauveria*- nouveau genre de Verticilliacies. *Bull Soc Bot Fr* 59: 34–40.

Wagner BL, Lewis LC, 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Environ Microb* 66: 3468-3473.

Wat CH, McInnes AG, Smith DG, Wright JLC, Vining LC, 1977. The yellow pigments of *Beauveria* species. Structures of tenellin and bassianin. *Can J Chem* 55: 4090-4098.

Westwood GS, Huang SW, Keyhani NO, 2005. Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Clin Mol Allergy* 3: 1–8.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, California, pp. 315–322.

Williams CM, Henry HAL, Sinclair BJ, 2015. Cold truths: how winter drives responses of terrestrial organisms to climate change. *Biol Rev* 90(1): 214-235.

Wilson D, 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73: 274–276.

Wraight SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ, Galaini-Wraight S, 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biol Control* 17: 203–217.

Wraight SP, Ramos ME, 2005. Synergictic interaction between *Beauveria bassiana*- and *Bacillus thuringiensis tenebrionis*-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *J Invertebr Pathol* 90: 139–150.

Wraight S, Inglis G, Goettel M, 2007. Fungi. In: Lacey L, Kaya H (eds) Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, 2nd ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 223–248.

Wright MS, Lax R, 2016. Improved mortality of the Formosan subterranean termite by fungi, when amended with cuticle-degrading enzymes or eicosanoid biosynthesis inhibitors. *Folia Microbiol* 61: 73–83.

Zimmermann G, 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Techn* 17: 553–596.

Zitlalpopoca-Hernandez G, Najera-Rincon MB, Del-Val E, Alarcon A, Jackson T, Larsen J, 2017. Multitrophic interactions between maize mycorrhizas, the root feeding insect *Phyllophaga vetula* and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Soil Ecol* 115: 38-43.

ŽIVOTOPIS



Marta Kovač (dj. Matek) rođena je 13. travnja 1990. godine u Našicama. U Orahovici završava osnovnu školu i upisuje srednju školu 'Stjepan Ivšić', smjer opća gimnazija, nakon čega 2008. godine upisuje Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Preddiplomski studij završava 2011. godine, a 2014. godine diplomski studij, smjer Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša. Preko ERASMUS+ programa 2013. godine boravi jedan semestar na studentskoj razmjeni na Biotehničkom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani (Slovenija). Od ožujka do rujna 2014. godine radi kao voditeljica edukativnih programa u Javnoj ustanovi Park prirode Medvednica, a 2015. godine zapošljava se na Zavodu za međunarodnu znanstvenu suradnju jugoistočne Europe (EFISEE) u Hrvatskom šumarskom institutu. Od rujna 2016. godine počinje raditi kao asistentica na Zavodu za zaštitu šuma i lovno gospodarenje (HŠI), kada upisuje i poslijediplomski doktorski studij Šumarstvo i drvna tehnologija na Šumarskom fakultetu.

Na prvoj godini svog doktorskog studija od Vlade Savezne Republike Njemačke dobiva DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) stipendiju za znanstveno istraživanje u sklopu koje u dva navrata (2 mjeseca i 2 tjedna) boravi u Institutu za biološku kontrolu Julius Kühn u Darmstadtu (Njemačka). Te iste godine odlazi i na jednomjesečno usavršavanje na Institut za nizinsko šumarstvo u Novom Sadu (Srbija). Znanstveno se usavršava i na Zavodu za molekularnu filogenetiku i evoluciju Sveučilišta u Varšavi i Zavodu za zaštitu bilja Sveučilišta u Siedlicama (Poljska) te na Institutu WSL (Swiss Federal Research Institute for Forest, Snow and Landscape) u Birmensdorfu (Švicarska). U sklopu COST Akcije FP1401 Global Warning dobiva financiranje za odlaske na kratkotrajne znanstvene misije (STSM-Short Term Scientific Mission), na Šumarski fakultet u Beograd (Srbija) te ponovno na Institut WSL (Švicarska). Kao autorica ili koautorica objavljuje osam znanstvenih radova, sudjeluje kao predavač na pet međunarodnih znanstvenih konferencija i dva domaća stručna skupa, s poster izlaganjima na tri međunarodna znanstvena skupa, te na tri inozemne trening škole. Kao suradnica sudjeluje na nekoliko domaćih i inozemnih znanstvenih projekata. Aktivno se služi engleskim te pasivno njemačkim jezikom. Članica je Hrvatske udruge za arborikulturu, Hrvatskog društva biljne zaštite, Hrvatskog entomološkog društva te Hrvatskog šumarskog društva ogranak Karlovac.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA I SUDJELOVANJA

Objavljeni znanstveni radovi A1 kategorije

1. **Matek, M**; Pernek, M. 2018. First Record of *Dendrolimus pini* Outbreak on Aleppo Pine in Croatia and Severe Case of Population Collapse Caused by Entomopathogen *Beauveria bassiana*. SEEFOR-South-east European forestry 9(2): 91-96.

2. **Kovač, M**; Gorczak, M; Wrzosek, M; Tkaczuk, C; Pernek, M. 2020. Identification of Entomopathogenic Fungi as Naturally Occurring Enemies of the Invasive Oak Lace Bug, *Corythucha arcuata* (Say) (Hemiptera: Tingidae). Insects 11(10): 1-12.

3. **Kovač, M**; Lacković, N; Pernek, M. 2020. Effect of *Beauveria bassiana* Fungal Infection on Survival and Feeding Behavior of Pine-Tree Lappet Moth (*Dendrolimus pini* L.). Forests 11(9): 0974.

4. Pernek, M; **Matek, M**; Maretić, T; Lacković, N; Matošević, D. 2020. First Record of *Cacopsylla pulchella* (Hemiptera, Psyllidae) in Croatia. SEEFOR-South-east European forestry 11(1): 91-94.

5. Çota, E; **Kovač, M**; Pernek, M. 2020. First Record of *Cacopsylla pulchella* (Hemiptera, Psyllidae) in Albania. SEEFOR-South-east European forestry 11(2): 1-4.

6. Pernek, M; **Kovač, M**; Lacković, N. 2020. Testiranje biološke učinkovitosti feromona i klopki za ulov mediteranskog potkornjaka *Orthotomicus erosus* (Coleoptera, Curculionidae). Šumarski list (7-8): 339-350.

Objavljeni znanstveni radovi A2 kategorije

7. **Matek, M**; Ullrich, CI; Rabenstein, F; Koch, E; Kleespies, RG. 2019. In situ immunofluorescence localization: A method for rapid detection of *Beauveria* spp. in the rhizosphere of *Quercus robur* saplings. Journal für Kulturpflanzen/ Journal of Cultivated Plants 71(7): 211-218.

8. Pernek, M; Zorić, N; **Matek, M**; Lukić, I; Novak Agbaba, S; Liović, B; Mihaljević, I; Lacković, N. 2019. Sušenje alepskog bora i gradacija potkornjaka *Orthotomicus erosus* u Park šumi Marjan. Radovi - Šumarski institut Jastrebarsko (Izvanredno izd.) 46(1): 1-18.

Izlaganje na međunarodnom znanstvenom skupu

1. **Matek, M**; Kleespies, RG; Ullrich CI. 2018. Establishment of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii* as endophytes in pedunculate oak seedlings and different methods of their detection. Conference 'Natural resources, green technology and sustainable development- Green/3'; Zagreb (predavač)

2. **Matek, M**; Zlatković, M. 2018. Early detection of diseases in urban sentinel plantings: A case study with *Botryosphaeriaceae* associated with the die-back of *Sequoiadendron giganteum* in Croatia. COST Conference: Sentinel plantings for detecting alien, potentially damaging tree pests; Campus Sursee, Švicarska (predavač)

3. **Matek, M**; Zlatković, M. 2018. *Botryosphaeriaceae* kao potencijalni uzročnici sušenja *Sequoiadendron giganteum* stabala u Zagrebu. Međunarodna znanstvena konferencija "Šumarska znanost: sjećanje na prošlost, pogled u budućnost"; Jastrebarsko (predavač)

4. **Matek, M**; Pernek, M. 2019. Effectiveness of entomopathogenic *Beauveria pseudobassiana* on *Corythucha arcuata* in laboratory conditions. SIP/IOBC (International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control); Valencia, Španjolska (predavač)

5. **Matek, M**; Pernek, M. 2019. Prvi nalaz entomopatogenih gljiva kao prirodnih neprijatelja hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*). V. Međunarodni seminar- Integralna zaštita šuma; Bihać, Bosna i Hercegovina (predavač)

---

6. **Matek, M**; Pernek, M. 2018. Laboratory treatment of Oak Lace Bug (*Corythucha arcuata*), (Hemiptera: Tingidae) with entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. The 15th International Phytotechnology Conference; University of Novi Sad, Srbija (poster)

7. **Matek, M**; Zlatković, M. 2018. Pathogenicity of croatian isolates of *Neofusicoccum parvum* and *Botryosphaeria dothidea* on *Sequoiadendron giganteum*. 3. Hrvatski simpozij o invazivnim vrstama, Hrvatsko ekološko društvo; Zagreb (poster)

8. Majić, I; **Matek, M**; Sarajlić, A; Pernek, M. 2020. Pathogenicity of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* combined with entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B. pseudobassiana*. 55. hrvatski i 15. međunarodni simpozij agronoma; Zagreb (poster)

Izlaganje na domaćem znanstvenom skupu

1. **Matek, M**; Lukić, I; Balta, D; Pernek, M. 2017. Utjecaj entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* kao endofita na različite vrste štetnika. 61. seminar biljne zaštite; Opatija (predavač)

2. **Matek, M**; Pernek, M. 2018. Učinkovitost primjene entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* protiv borovog prelca (*Dendrolimus pini* L.) u laboratorijskim uvjetima. 62. seminar biljne zaštite; Opatija (predavač)

Trening škole

1. "Social science methods for studying invasive alien species", trening škola u sklopu COST akcije ES1304 (ParrotNet), 2016, Marseille, Francuska

2. "Fungal taxonomy and identification using traditional (i.e. not molecular) techniques", trening škola u sklopu COST akcije FP1401 (Global Warning), 2017, Varšava, Poljska

3. "Capacity Building in Forest Policy and Governance in Western Balkan Region", trening škola u sklopu COST akcije TN1401 (CAPABAL), 2018, Soča, Slovenija

Znanstveni projekti

1. 'DIFPEST-Defoliators as Invasive Forest Pests in Changing Climate Conditions' (HRZZ)- suradnica

2. 'Utjecaj entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* na štetnike hrasta lužnjaka' (Izvještajno prognozni poslovi, Ministarstvo poljoprivrede)- suradnica

3. 'Zdravstveno stanje borova na otoku Lokrumu i mjere integrirane zaštite šuma za mediteranskog potkornjaka *Orthotomicus* erosus (Woll.)' (Javna ustanova „Rezervat Lokrum")- suradnica

4. 'Istraživanje gljiva iz porodice *Ophiostomataceae* asocirane sa mediteranskim potkornjakom' (Izvještajno prognozni poslovi, Ministarstvo poljoprivrede)- voditeljica

5. 'Sušenje borova u Park šumi Marjan' (Javna ustanova „Park šuma Marjan")- suradnica

6. 'Mogućnost biološke kontrole hrastove mrežaste stjenice' (Hrvatske šume d.o.o.)- suradnica