

Utjecaj entomopatogene gljive *Beauveria pseudobassiana* na prezimljuću generaciju hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*)

Zastavnik, Larisa Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:375150>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Larisa Ana Zastavnik

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**UTJECAJ ENTOMOPATOGENE GLJIVE *BEAUVERIA PSEUDOBASSIANA* NA
PREZIMLJUJUĆU GENERACIJU HRASTOVE MREŽASTE STJENICE
(*CORYTHUCHA ARCUATA*)**

Diplomski rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Larisa Ana Zastavnik

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**UTJECAJ ENTOMOPATOGENE GLJIVE *BEAUVERIA PSEUDOBASSIANA* NA
PREZIMLJUJUĆU GENERACIJU HRASTOVE MREŽASTE STJENICE
(*CORYTHUCHA ARCUATA*)**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv.prof.dr.sc. Ankica Sarajlić, predsjednik
2. prof.dr.sc. Ivana Majić, mentor
3. dr.sc. Milan Pernek, član

Osijek, 2023.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Biološke i ekološke značajke entomopatogenih gljiva	3
2.1.1. Entomopatogene gljive kao bioinsekticidi	5
2.1.2. Preporuke i optimalni uvjeti za primjenu entomopatogenih gljiva u zaštiti bilja	7
2.2. Rod <i>Beauveria</i>	8
2.2.1. Mikoinspekticidi iz roda <i>Beauveria</i>	9
2.2.2. Vrsta <i>Beauveria pseudobassiana</i>	10
2.3. Hrastova mrežasta stjenica (<i>Corythucha arcuata</i>)	14
2.3.1. Značaj hrastove mrežaste stjenice u Europi i Hrvatskoj	16
2.3.2. Domaćini hrastove mrežaste stjenice i rasprostranjenost.....	17
2.3.3. Fiziološki poremećaji u biljkama uslijed napada hrastove mrežaste stjenice	19
3. MATERIJAL I METODE.....	20
4. REZULTATI.....	23
5. RASPRAVA.....	29
6. ZAKLJUČAK	30
7. POPIS LITERATURE	31
8. SAŽETAK.....	35
9. SUMMARY	36
10. POPIS TABLICA.....	37
11. POPIS SLIKA	37
12. POPIS GRAFIKONA	38
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	39
BASIC DOCUMENTATION CARD	40

1. UVOD

Danas, kada se suočavamo s činjenicom o sve izraženijem gubitku, odnosno smanjenju bioraznolikosti, te izumiranju vrsta kako biljnog tako i životinjskog svijeta, čini se pomalo zabrinjavajućom. Najveće zasluge, koje imaju pozitivan ili negativan utjecaj na određeni slijed događaja, su čovjekove. Čovjek je taj koji je velikim dijelom prouzrokovao mijenjanje globalne klime uz niz razloga poput širenja patogena, unošenja invazivnih vrsta, eksploatacije resursa, fragmentacije staništa.

Staništa koja su najviše pogođena su šume. Šume kao ključan pokazatelj zdravlja okoliša, suočene su s mnogim izazovima i opasnostima od raznih štetnika, bolesti i patogena.

Radi zaštite šume od štetnika i patogena, najveći negativni antropogeni utjecaj na okoliš bi bila masovna primjena kemijskih sredstava za zaštitu bilja (SZB). U suzbijanju kukaca se najviše koriste kemijska SZB, pri čemu je tijekom vremena zapažen razvoj otpornosti, odnosno rezistentnosti štetnika na primjenjena SZB. Rezistentnost se može opisati kao postupni porast rezistentnosti jedne populacije štetnika na insekticid koji se koristi za suzbijanje tog štetnika. Očituje se kao gubitak učinkovitosti jednog isprva učinkovitog insekticida (Van Leeuwen i sur., 2020.). Osim toga, insekticidi zbog toksičnosti i rezidua u plodovima, tlu i podzemnim vodama ostavljaju mnogobrojne štetne posljedice na okoliš, neciljne organizme, životinje i ljude. Međutim, upravo zbog toliko negativnog utjecaja, malim koracima se dolazi do osvještavanja i uporabe sigurnijih, manje opasnih i otrovnih sredstava. Stoga, u borbi protiv kemikalija, značajnu ulogu ima primjena bioloških sredstava.

Biološki način suzbijanja štetnih organizama se ubraja u nekemijske metode koje se primjenjuju u integriranim i ekološkim sustavima poljoprivredne proizvodnje. Iako, glavni cilj kod suzbijanja štetnih organizama treba biti sprječavanje šteta, a ne uništavanje štetnika jer njihovim uništavanjem uskraćujemo hranu prirodnim neprijateljima, a time se povećava vjerojatnost njihova izumiranja (Barčić i Maceljski, 2001.). Primjena entomopatogenih gljiva kao bioloških insekticida predstavlja sigurnu alternativu u integriranom upravljanju nametnika, te ima brojne prednosti. Ipak, uz brojne prednosti, ovaj oblik biološke kontrole ima i neke nedostatke. Entomopatogene gljive zahtijevaju posebne uvjete (vlažnost, temperatura, svjetlost). Kukcu je potrebno dulje vrijeme kako bi uginuo, proizvodnja je još uvijek poprilično skupa, a spore zbog kratkog vijeka trajanja moraju biti u klimatski

kontroliranim prostorima (Khan, 2012.). Također, slično kao kod kemijskih SZB, biološka SZB zahtijevaju određene preporuke kako bi se dobili očekivani rezultati kontrole nametnika (Gutierrez i Maldonado, 2010.; Souza i sur., 2019.).

Cilj ovog istraživanja je utvrditi insekticidnu učinkovitost entomopatogene gljive *Beauveria pseudobassiana* na prezimljujuću generaciju hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*). Uz to, zadatak je bio doprinjeti značaju uporabe i ujedno potaknuti na širenje znanja o biološkim sredstvima za zaštitu bilja kako bi postala dio integrirane zaštite.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Biološke i ekološke značajke entomopatogenih gljiva

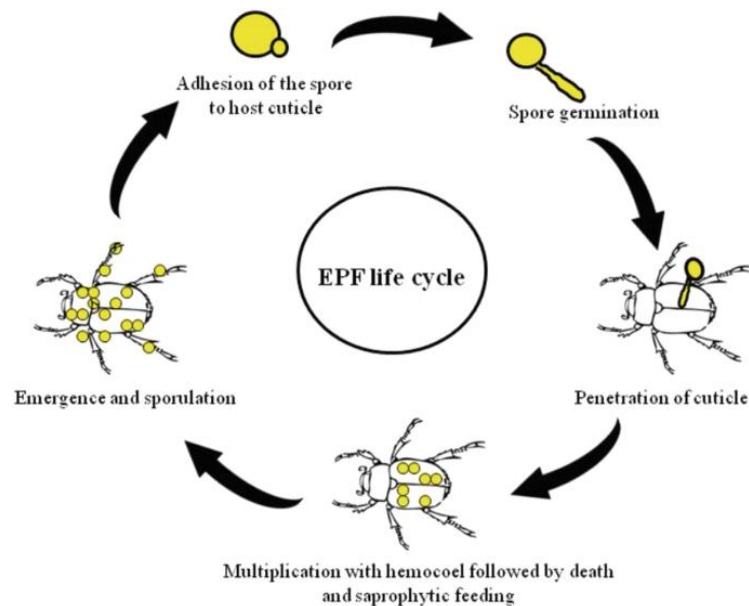
Entomopatogene gljive su najrašireniji organizmi koji su evoluirali kako bi iskoristavali kukce. Obuhvaćaju širok raspon morfološki, filogenetski i ekološki raznolikih vrsta gljiva. Većina ih pripada redu Hypocreales (Ascomycota) ili redu Entomophthorales (odjel Entomophthoromycota), a korisne vrste entomopatogenih gljiva pripadaju rodovima: *Beauveria*, *Entomophthora*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea* i *Verticillium* (Ivezić, 2008.).

Entomopatogeni su također prisutni među ekološki sličnim, ali filogenetski različitim Oomycotama ili vodenom plijesni, koje pripadaju drugom kraljevstvu, Stramenopila. Kao skupina parazita, entomopatogene gljive i vodene plijesni inficiraju veliki broj domaćina kukaca, od vodenih ličinki do odraslih kukaca iz visokih krošnji u tropskim šumama ili čak pustinjama. Njihovi domaćini su rasprostranjeni među 20 do 31 reda kukaca u svim razvojnim stadijima: jaja, ličinke, kukuljice i odrasle jedinke. Navedene činjenice su utjecale na veliku morfološku raznolikost entomopatogenih gljiva, što je doprinjelo enormnoj biološkoj rasprostranjenosti većine vrsta, s pretpostavkom da je dosta vrsta još ostalo nepoznato (Araujo i Hughes, 2016.). Pokazalo se kako entomopatogene gljive imaju dobru akaricidnu učinkovitost u zaštiti sisavaca (npr. krave) od krpelja (Diaz i Salas, 2021.). Velika prednost entomopatogenih gljiva u usporedbi s kemijskim akaricidima, je ta što mogu napasati gotovo sve faze životnog ciklusa člankonožaca, što ih čini jedinstvenom komponentom u integriranom pristupu u borbi protiv nametnika (Rajula i sur., 2020.; Diaz i Salas, 2021.).

Životni ciklus entomopatogene gljive sinkroniziran je s pojavom različitih stadija domaćina kukaca i raznim uvjetima okoliša poput vlage, temperature, vjetra, sunčeve svjetlosti. Ponekad se neke vrste i izolati unutar vrste mogu ponašati vrlo različito. Broj domaćina, stopa klijavosti, virulentnost i optimalna temperatura vezana uz sporulaciju može varirati između vrsta i izolata (Sierotzki i sur., 2000.; Pell i sur., 2001.; Shaw i sur., 2002.).

Sekundarni metaboliti koje proizvode entomopatogene gljive imaju antifungalna i antibakterijska svojstva (Wagner i Lewis 2000.; Parine i sur., 2010.; Bucarei i sur., 2019.). Proizvode metabolite poput: antibiotika, bioaktivnih hlapljivih spojeva (npr. amonijak, cijanovodik, pironi, kiseline, alkoholi, esteri, ketoni i lipidi) i enzimi (Ownley i Windham, 2007.; Ownley i sur., 2010.). Stotine malih molekula s insekticidnim djelovanjem

identificirane su iz entomopatogenih gljiva, kao što su destruksini, oosporein, beauvericin, basianin, basiacridin, beauveriolides, kordicepin i ciklosporin između ostalih (Hamil i sur., 1969.; Susuki i sur., 1977.; Quesada-Moraga i sur., 2006.; Wang i Wang 2017.; Souza i sur., 2019.). Djelovanje ovih metabolita izaziva promjene ponašanja kod kukaca, kao što su bihevioralna groznica, smanjena ili povećana aktivnost, smanjen odgovor na semiokemikalije, promjene u reproduktivnom ponašanju, septikemija i na kraju smrt (Roy i sur., 2006.).



Slika 1. Životni ciklus entomopatogene gljive

(Izvor: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-6949-4_19)

Izdvajanje entomopatogene gljive se obično odvija na temelju rasta micelija na leševima kukaca. Egzoskelet kukca entomopatogene gljive i Oomycota trebaju prodrijeti (Evans, 1988.), što dovodi do infekcije. Aseksualne spore, odnosno konidije, raspršene u okolini u prisutstvu domaćina, odgovorne su za zarazu. Nakon što spore gljive dođu u kontakt s kukcem, one klijaju i hifama penetriraju kutikulu, tada ujedno započinje njihov životni ciklus, zatim izazivaju brzu smrt povezanu s otpuštanjem toksina (Ivezić, 2008). Iako, nekoliko njih, osobito neke Entomophthoromycota, sporuliraju iz živog tijela svojih domaćina i kao takvi se nazivaju biotrofnim (Roy i sur., 2006.). Unutar tjelesne šupljine kukca, dolazi do razvijanja hifa koje napadaju tkiva i organe. Vremenski okvir smrti kukca (između 3 i 7 dana) ovisi o vrsti gljive i broju zaraznih spora. Nakon smrti domaćina, gljiva proizvodi tisuće novih spora na uginulom kukcu, koje se potom raspršuju i razmnožavaju na novim domaćinima (Slika 1.), (Butt i sur., 2001.).

2.1.1. Entomopatogene gljive kao bioinsekticidi

Biološka kontrola kukaca u zaštiti bilja podrazumjeva primjenu prirodnih neprijatelja, poput predatorskih kukaca i grinja, parazitoida, entomopatogenih nematoda, bakterija virusa, i gljiva.

Tijekom posljednjih desetljeća pozornost je bila usmjerena na razvoj entomopatogenih gljiva, uglavnom na *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli), Vuillemin i *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff), Sorokin kao inundativni biopesticidi (Faria i Wraight 2007.). Na tržištu su najzastupljeniji proizvodi upravo na bazi ove dvije gljive (Faria i Wraight 2007.; Lacey i sur., 2015.; Kim i sur., 2019.). Ova biološka sredstva za zaštitu bilja vrlo su važna za razvoj održive poljoprivrede jer značajno doprinose integriranom upravljanju štetocinama i odgovaraju na sve veću svjetsku potražnju za ekološki prihvatljivim proizvodima.

Značaj biološkog sredstva na bazi entomopatogene gljive ogleda se kroz nekoliko važnih karakteristika kao što su sigurnost primjene, razvoj otpornosti kod štetnika i postojanost u okolišu:

- Sigurnost: Sigurnost entomopatogenih gljiva za ljude, okoliš i neciljane organizme predstavlja važan kriterij za razmatranje. Potrebno je promotriti svaki slučaj i odnose kukaca i gljiva zasebno prilikom donošenja zaključaka. Međutim, istraživanja sugeriraju na postojanje minimalnog učinka entomopatogene gljive na neciljane organizme, te svakako predstavljaju sigurniju alternativa za korištenje u integriranom upravljanju nametnicima od kemijskih insekticida (Goettel i Hajek, 2000.; Pell i sur., 2001.; Shahid i sur., 2012.). Iako, postoji istraživanje koje je opisalo kako je *B. bassiana* izazvala bolest oka kod pacijenta, pod nazivom *B. bassiana* keratitis. U literaturi je identificirano 17 slučajeva ljudske infekcije *B. bassiana* (Gurcan i sur., 2006.; Ducange i sur., 2021.).
- Otpornost kukaca: Nije utvrđen razvoj otpornosti kukaca na entomopatogene gljive, iako je poznato da kukci razvijaju strategije prirodnog obrambenog sustava kao rekaciju na infekciju, kao što je npr. sposobnost da proizvode enzime za detoksikaciju, izlučuju antibiotike, te drugi imunološki odgovori (Serebrov i sur., 2006.; Vega i Kaya, 2012.; Pallero, 2022.).

- Selektivnost: Neke vrste gljiva su selektivne. S komercijalizacijom entomopatogenih gljiva, određene vrste ili sojevi mogu parazitirati veliki broj različitih kukaca (Souza i sur., 2019.).
- Postojanost: S obzirom da su entomopatogene gljive fakultativni paraziti, pretpostavka je da gljive opstaju u tlu kao saprofiti čekajući pojavu domaćina kukca (Souza i sur., 2019.). Visoka postojanost u okolišu osigurava dugotrajan učinak entomopatogenih gljiva.
- Masovna proizvodnja: Mogu se proizvoditi u velikim količinama i jednostavno primjenjivati strojevima ili kroz sustav za navodnjavanje. Ovi mikroorganizmi mogu se formulirati kao mikoinsekticidi u tekućim i krutim obliku, a mogu se koristiti kao mamac u privuci i ubij strategiji suzbijanja štetnika (Jaronski i Mascarin, 2017.).
- Kompatibilnost: Mogu se miješati i primjenjivati zajedno s kemijskim insekticidima, herbicidima i nekim fungicidima (Yanez i France, 2010.; Schumacher i Poehling, 2012.; Machado, 2016.; Souza i sur., 2019.). Međutim, važno je uzeti u obzir da neka kemijska sredstva za zaštitu bilja, prvenstveno fungicidi, mogu smanjiti njihovu učinkovitost. Stoga je nužno provjeriti i poznavati kemijske skupine s kojima su kompatibilni.

Prema Khan (2012.) neke od dodatnih prednosti uporabe entomopatogenih gljiva se očituju kroz: visoku razinu specifičnosti kontroliranja štetnika bez da utječu na korisne parazite i prirodne neprijatelje, rezistentnost kukaca je smanjena, sadrže gene za izlučivanje toksina iz kukaca, te zbog toga imaju veliki potencijal za daljnji razvoj biotehnoloških istraživanja, neki od njih imaju endofitsku sposobnost štiteći se od napada štetnih kukaca, a da pritom ne utječu negativno na biljku, djeluju putem različitih načina infekcije (npr. otpornost kukca se ne može razviti i oni se mogu koristiti kao produljena kontrola nametnika).

S druge strane postoje i nedostaci. Zbog visoke specifičnosti potrebno je primijeniti i druga sredstva za suzbijanje štetnika, zahtijevaju posebne uvjete, stoga kod primjene mora biti optimalna temperatura, vlažnost, svjetlost i uz to mali broj štetnika. Kukcu je potrebno dulje vrijeme kako bi uginuo za razliku kod primjene kemijskih insekticida gdje kukac umire nakon 2-3 sata. Proizvodnja je poprilično skupa, a spore se zbog kratkog vijeka trajanja moraju držati u klimatski kontroliranim prostorima. Djelotvornost i postojanost entomopatogenih gljiva kod neke populacije domaćina može varirati između različitih vrsta kukaca, stoga bi tehnike koje se primjenjuju trebale biti optimizirane za određene kukce radi ostvarivanja dugoročnih učinaka.

2.1.2. Preporuke i optimalni uvjeti za primjenu entomopatogenih gljiva u zaštiti bilja

Slično kao kod kemijskih SZB, biološka SZB također zahtijevaju određene preporuke za uporabu kako bi se dobili očekivani rezultati kontrole štetnika. Jedna od važnijih preporuka je da se, ako je moguće, koriste proizvodi razvijeni s lokalnim sojevima koji su prilagođeni na uvjete u kojima će se koristiti. Ovo se smatra ključnim faktorom za uspjeh na uzgojnim površinama (Gutierrez i Maldonado, 2010.; Souza i sur., 2019.).

Čimbenici koji mogu utjecati na učinkovitost entomopatogenih gljiva prema Souza i sur., (2019.) su:

Vlažnost: Jedan od najvažnijih uvjeta za klijanje konidija je vlažnost zraka. Većina entomopatogenih vrsta je hidrofilna, što znači da postižu najveću učinkovitost na stopu smrtnosti kukaca kada je vlažnost visoka. S druge strane ovisno o vrsti i stupnju zahvaćenosti tkiva, te odgovoru domaćina na patogena, neke vrste prilikom infekcije ne uspijevaju obaviti potpunu zarazu, odnosno zaraza je minimalna. Ovo je vrlo važno pri odabiru vrsta i sojeva koji će se koristiti. Vlažnost na kutikuli kukca, može ograničiti klijanje i prodiranje gljive u domaćina. Većina entomopatogenih gljiva zahtijeva oko 95 % relativne vlažnosti na površini domaćina da bi prokljale (Kamga i sur., 2022.).

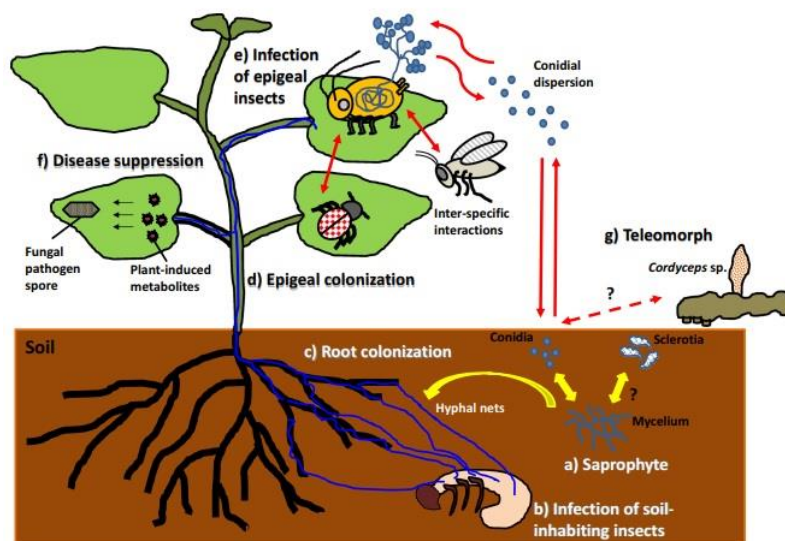
Temperatura: Gljive za optimalan rast zahtijevaju i optimalan raspon temperatura. Većina entomopatogenih gljiva može klijeti i adekvatno se razvijati između 22 i 28 °C. Izvan navedenog temperaturnog raspona se mogu pojaviti razvojni problemi koji im ne bi omogućili da postignu očekivane rezultate.

Ultraljubičasto zračenje: Sunčevo zračenje se sastoji od valnih duljina koje mogu utjecati na učinkovitost entomopatogenih gljiva. Na primjer kratke valne duljine mogu odgoditi ili u nekim ekstremnim slučajevima potisnuti klijanje konidija, uglavnom zbog štete koju te valne duljine uzrokuju kod DNA gljiva. Geografska zona iz koje se prikupljaju sojevi je također značajna. Provedeno je istraživanje s nekoliko *Beauveria sp.* izolata, gdje su izolati pokazali veliku razinu otpornosti na UVB zrake. Otpornost može varirati od 0 % do 80 %, a viši je u izolatima koji su bivali na nižim geografskim širinama (Fernandes i sur., 2007.; Souza i sur., 2019.).

2.2. Rod *Beauveria*

Beauveria je najčešći kozmopolitski, anamorfní rod entomopatogenih gljiva koji ima ekološku i gospodarsku važnost (Rehner i sur., 2011.). *B. bassiana* opisana je prvi put prije više od 180 godina kao patogen dudovog svilca. Može se nalaziti u različitim ekološkim okruženjima uključujući tlo, biljke i kukce. Gljiva preživljava u tlu kao saprofit ili se povezuje s biljkama kao endofit (Goettel i sur., 2005; Bruck. 2010.; Roy i sur., 2010.; Behie i sur., 2015.; Imoulan i sur., 2017.).

Li (1988.; Imoulan i sur., 2017.) je naveo 707 vrsta kukaca koji su domaćini *B. bassiana*, uključujući 521 rod i 149 porodica iz 15 redova (Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae i Embioptera) i 13 domaćina vrste Acarina raspoređenih u 7 rodova i 6 porodica. Iako je *B. bassiana* izdvojena iz ogromnog broja kukaca, poznato je da većina izolata ove gljve ima ograničen raspon domaćina.



Slika 2. Multitrofičke interakcije *Beauveria bassiana* u okolišu
(Izvor: Mascarin, G. M., Jaronski, S. T. (2016.): The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide)

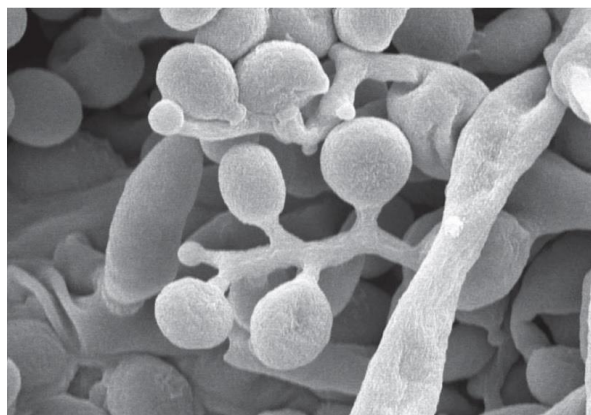
Na slici 2. je prikaz načina života *B. bassiana* i njezine multitrofičke interakcije s biljkama, člankonošcima, tlom i drugim mikrobima unutar krajobrazne zajednice.

B. bassiana je mikoinsekticid koji se koristi za suzbijanje brojnih poljoprivrednih štetnika (Zimmermann, 2007.). U svijetu je također rasprostranjena vrsta *Beauveria brongniartii* koji

se koristi kao biološko sredstvo za suzbijanje kornjaša u tlu (Keller i Zimmermann, 1989.; Robene-Soustrade i sur., 2015.; Wang i sur., 2020.). Preko 80 tvrtki je razvilo 171 mikoinsekticid i mikoakaricid od 1960-ih (de Faria i Wraight, 2007.), a najviše formulacija je na bazi *B. bassiana* (33,9 %) i *B. brongniartii* (4,1 %). Druge vrste iz ovog roda entomopatogenih gljiva, također, imaju veliki potencijal za korištenje u suzbijanju raznih štetnih kukaca (Thomas i Read, 2007.; Imoulan i sur., 2016.).

2.2.1. Mikoinsekticidi iz roda *Beauveria*

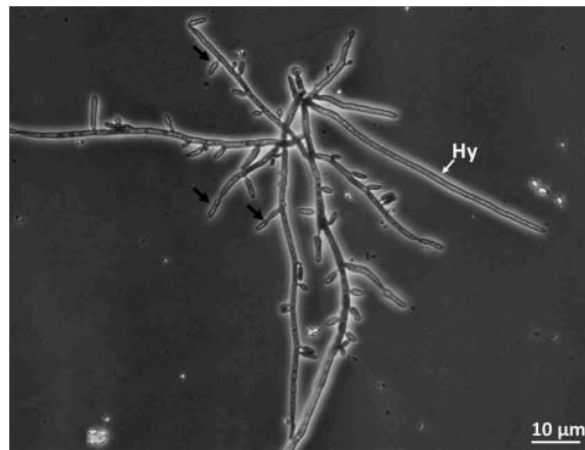
Koppert u Brazilu proizvodi sredstvo na bazi gljive iz roda *Beauveria* (Boveril WP, soj ESALQ-PL63) primjenjujući metode fermentacije u čvrstom stanju na navlaženoj riži s prinosom do 10 tona čistih, suhih konidija za primjenu prskanjem na gotovo 50 000 ha. Sredstvo se uglavnom sastoji od kave i eukaliptusa (Mascarin i Jaronski, 2016.). Ovaj proizvod je preporučen za suzbijanje paukove grinje (*Tetranychus urticae*), bijele mušice (*B. tabaci*), kornjaša koji napada eukaliptus (*Gonipterus scutellatus*) i kornjaša koji napada zrna kave (*Hypothenemus hampei*). U SAD-u, Europi, Japanu i Meksiku, koristi se soj GHA u BotaniGard i Mycotrol proizvodima, a služe u borbi protiv tripsa, velikog broja jednakokrilaca (Hemiptera), uključujući bijelu mušicu, lisne uši, lisne stjenice, te skakavce (Faria i Wraight, 2001, 2007; Lacey i sur., 2008.; Mascarin i Jaronski, 2016.). Još jedan zanimljivi primjer je mješavina *M. anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum* i *B. bassiana* s komercijalnim nazivom MicosPlag i prodaje se u Kolumbiji za suzbijanje biljnih parazitskih nematoda kao i štetnih kukaca, poput kornjaša *Hypothenemus hampei*.



Slika 3. Konidiofore *Beauveria bassiana*

(Izvor: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4020-6359-6_253)

Na slici 3. su prikazane infektivne propagule, konidije *Beauveria* koje su izgledom bezbojne, suhe i okruglastog do ovalnog oblika. Konidiofore se mogu pojaviti pojedinačno ili se mogu grupirati u nepravilne grozdove ili u spirale. Baza konidiofora je najčešće zadebljana, a neke na sebi imaju vršni cik-cak nastavak (Slika 4.), (Pendland i Boucias, 2008.).



Slika 4. Neproklijale i prokljale konidije *Beauveria pseudobassiana*, te formiranje blastospora u kulturama starim 2 dana

(Izvor: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/21501203.2020.1754953>)

2.2.2. Vrsta *Beauveria pseudobassiana*

Wang i sur., (2020.), proveli su istraživanje s ciljem ispitivanja bioraznolikosti i virulentnosti *B. pseudobassiana* izolirane iz različitih domaćina (*Bombyx mori*, dudov svilac i iz ličinke *Tenebrio molitor*, veliki brašnar). Na temelju morfoloških karakteristika i molekularne analize identificirano je 15 izolata *B. pseudobassiana* s 10 različitih geografskih lokacija. Izolati *B. pseudobassiana* su izolirani iz širokog raspona domaćina kukaca iz 5 redova, 11 porodica i 14 vrsta. Uz to, u ovom istraživanju, anamorfnu tipiziranu *B. pseudobassiana* prvi put je uzgojena iz telemorfnih stroma. Rezultati rada pokazuju da je smrtnost *B. mori* uzrokovana izolatima *B. pseudobassiana* izdvojenih iz domaćina iz reda Lepidoptera znatno viša od izolata iz drugih domaćina, te isto tako virulentnost izolata izdvojenih iz reda Coleoptera na *T. molitor* je bila znatno veća od izolata gljiva iz drugih domaćina. Autori studije su zaključili da bi selektivnost domaćina *B. pseudobassiana* trebala biti detaljnije proučena prije budućeg razmatranja izolata za upotrebu u biološkoj kontroli štetnika.

B. pseudobassiana izolirana je iz *Dendroctonus micans* (Kugelann) (Coleoptera: Curculionidae). Ovaj soj korišten je u ispitivanju patogenosti protiv dvije vrste odraslih stadija *Ips*, *Ips sexdentatus* i *Ips typographus*. Kukci su tretirani različitim konidijalnim koncentracijama gljive kako bi se odredila virulentnost. Konidijska suspenzija od 1×10^8 konidija mL^{-1} izazvala je 100 % smrtnost kod *I. sexdentatus* i *I. typographus* tijekom 5, odnosno 7 dana. Rezultati ovog eksperimenta pokazuju da je izolirani soj *B. pseudobassiana* obećavajuće sredstvo za suzbijanje testiranih vrsta *Ips*, te se može horizontalno širiti među populacijom *I. sexdentatus* i *I. typographus* (Kocacevik i sur., 2015.).

Primijećeno je da *B. bassiana* najčešće obitava u stepskim krajevima i da je pretežno izolirana iz kornjaša i leptira, dok *B. pseudobassiana* obitava u šumskim krajevima i nije selektivna kod kukaca (Lendev i sur. 2014; Wang i sur. 2020.).

Prema morfološkim karakteristikama kolonije i konidijalnih spora moguće je razlikovanje *B. pseudobassiana* od *B. bassiana* (Imoulan i sur. 2016; Wang i sur. 2020.). Nadalje, Berestetskiy i sur. (2018.) su zaključili da se *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* mogu razlikovati usporedbom njihovih toksikoloških svojstava (antimikrobno, insekticidno i citotoksično) i putem profila metabolitskih ekstrakata (prinos ekstrakta i kromatografski profili) kada se sojevi uzgajaju u tekućim medijima i na čvrstim podlogama (Wang i sur. 2020.).

U provedenoj studiji koja je objavljena 2021. godine, nalaze se podaci o prezimljujućim hrastovim mrežastim stjenicama (*Corythuca arcuata*) zaraženim *B. pseudobassiana* koje su pronađene u šumama na području Spačve i podaci o ispitivanju virulencije gljiva na *C. arcuata* u laboratorijskim uvjetima (Kovač i sur., 2021.). Prvi cilj u ovom istraživanju je bio procijeniti broj prezimljenih odraslih jedinki mrežaste stjenice po m^2 mahovine, njihovu prirodnu smrtnost i intenzitet zaraženosti prirodnom populacijom gljive *B. pseudobassiana*. Mahovina i stjenice su prikupljene sa hrastovih stabala na šest različitih mjesta. Rezultati su pokazali kako je od pronađenih jedinki 65 % bilo uginulih, od čega je 19 % s prisutnim micelijem. Morfološkom analizom se utvrdilo da je 70 % njih pripadalo vrsti *B. pseudobassiana*. Drugi dio istraživanja se odvijao u laboratoriju, gdje je suspenzija konidija (koncentracija: 1×10^8 konidija/mL) raspršena na zdrave odrasle jedinke *C. arcuata* na mahovini. Koristila su se dva izolata. Laboratorijski test je već nakon 7 dana od tretiranja pokazao visoku stopu smrtnosti (79 % za izolat 1 i 80 % za izolat 2). Međutim, mikoza se razvila samo na 1 % i 8 % jedinki. Kontrolni tretman je imao stopu smrtnosti od 30 %. Nakon

nekog vremena, rezultati nisu pokazali značajnu razliku u stopama smrtnosti između izolata (96-97 %). Jedan izolat je uzrokovao pojavu mikoza kod 49 % uginulih stjenica, dok je kod drugog izolata utvrđeno 32 % , uz 4 % mikoze u kontrolnim tretmanima koja bi se mogla pripisati prirodnoj prisutnosti *B. pseudonassiana*.

Uz hrastovu mrežastu stjenicu, *B. pseudobassiana* je korištena u borbi protiv suzbijanja *Ceratitis capitata*, mediteranske vinske mušice. Istraživanje se bavilo provjerom izvedivosti korištenja *B. pseudobassiana* kao biološkog insekticida u proteinskim mamcima za suzbijanje mušice (Bedini i sur., 2018.). Prvi korak je bio procijeniti patogeni učinak na različitim stadijima muhe (jajima, ličinkama, kukuljicama i odraslim jedinkama). Korak nakon tog je bio testiranje učinkovitosti kao bioinsekticida u obliku sprejeva za proteinske mamce. Podaci istraživanja ukazuju na to da je vjerojatnost preživljavanja muha u kontaktu s proteinskim mamcem *B. pseudobassiana* bila znatno niža u odnosu na kontrolu, a prosječno vrijeme preživljavanja muha koje su tretirane s *B. pseudobassiana* (proteinom) bio je najmanje tri puta kraći nego u kontroli. Rezultati vezani za učinak patogenosti su pokazali da je *B. pseudobassiana* sposobna zaraziti i usmrtniti sve stadije mušice. Potvrđena je i učinkovitost djelovanja kada se entomopatogena gljiva koristi kao bioinsekticid u proteinskim mamcima.

Izvešće s Novog Zelanda iz 2017. godine (Bio-Protection Research Centre) prikazuje istraživanje koje je bilo usmjereno na utvrđivanje prisutnosti prirodnih populacija roda *Beauveria* i osjetljivosti ličinki i odraslih jedinki lanenog žiška, *Anagotus fairburni* na otoku Mana. Ličinke i odrasli kukci lanenog žiška, zajedno s uzorcima tla, prikupljeni su kako bi se utvrdila uloga *B. pseudobassiana* u regulaciji populacije ovog kornjaša. Od 80 ličinki, 3 su bile zaražene gljvom. 60 ličinki je uginulo unutar dva dana prije nego što je provedeno bilo kakvo biološko ispitivanje. Preostalih 29 ličinki je bilo izloženo *B. pseudobassiana* uranjanjem u suspenziju spora. Na kraju pokusa su sve osim jedne ličinke uginule. Prikupljene odrasle jedinke su također biološki tretirane pomoću gljiva. U tretmanu s najvećom koncentracijom, 90 % odraslih je uginulo do 20. dana nakon inokulacije. Uzorci tla s otoka su poslužili kao procjena razine prisutnosti roda *Beauveria*. Tlo koje je došlo s ličinkama je bilo jako zaraženo sa stopom od približno $7,25 \times 10^4$ konidije/mL. Dobiveni rezultati su u konačnici bili neočekivani, sugerirajući kako je *Beauveria* dobro uspostavljena u populaciji lanenog žiška, te da bi trebala ograničavati populaciju u razvoju.

Lobesia botrana je europski moljac vinove loze čije ličinke napadaju *Vitis vinifera* L. i druge gospodarski značajne vrste u velikom broju zemalja. Prave oštećenja na bobicama loze koja

su povezana s pojavom sekundarne bolesti kao što je *Botrytis cinerea*. Altimira i sur. (2019.) su u Čileu istražili učinak *B. pseudobassiana* kao biološke kontrole nad stadijem kukuljice *Lobesia botrana*. Analize su se provodile u nekoliko stadija, poput: EPF formulacije (formulacija temeljena na entomopatogenoj gljivi), zatim in vitro EPF formulacije, terenskog ispitivanja na zemljištu La Platina instituta, te ispitivanja u urbanom dijelu Metropolitanske regije Santiago, Čile. Kontrola moljaca u urbanim područjima se pokazala teškom zbog lošeg kemijskog upravljanja napadnutih biljkaka. Osim toga, *L. botrana* je zimi u fazi kukuljice prekrivena čahuricom koja sprječava prodiranje kemijskih pesticida. Zbog toga je cilj ovoga rada bio kontrolirati stadij kukuljice s formulacijom na bazi entomopatogene gljive *B. pseudobassiana* u urbanim sredinama (Altimira i sur., 2019.). Sve kukuljice *L. botrana* koje su korištene za in vitro i terensko ispitivanje su dobivene uzgojem iz Entomološkog laboratorija INIA La Cruz. Soj je izoliran iz *Polistes gallicus* (Hymenoptera: Vespidae), (Galska osa) i identificiran je kao *B. pseudobassiana* analizom multilokusne sekvence. Da bi se loze zarazile, po jednoj biljci je postavljeno deset kukuljica bez čahure ispod vanjske kore grane koja se obložila mrežicom od tila i pričvrstila ljepljivom trakom kako bi se izbjeglo raspršivanje kukuljica i ulazak drugih člankonožaca. U prvom tretmanu je korištena jedna aplikacija formulacije, zatim u drugom tretmanu dvije formulacije prvog i sedmog dana. U trećem tretmanu formulacije su se primjenile tijekom prvog, sedmog i četrnaestog dana. Četvrti tretman je bila kontrola korištenjem vode. Kako bi se zaražene kukuljice pregledale nakon što su entomopatogene gljive izvršile kolonizaciju, uklonile su se s mjesta na koje su bile postavljene i odložile u posudu s vlažnim papirom. Ova metoda je korištena kod terenskog ispitivanja na zemljištu instituta i kod ispitivanja u urbanom dijelu regije. Ispitivanje u urbanom dijelu je provedeno u nasumičnim blokovima s četiri tretmana, svaki s tri ponavljanja po tri trsa (4x3x3). U ovom ispitivanju raspodjela blokova je postavljena prema zarobljavanju moljaca u feromonskim zamkama tijekom proljeća i ljeta. Provedena biokontrola ispitivanja na zemljištu instituta pokazala je stopostotno djelovanje gljive protiv zaraze vinove loze koja je napadnuta od strane rasplodnih kukuljica bez čahura, 21 dan nakon inokulacije u zimskim uvjetima. Aktivnost biokontrole, u urbanom dijelu regije, u kojoj je korištena formulacija gljiva protiv prirodnih infestacija *L. botrana*, zimi je dosegla učinkovitost od 51%. Ovaj rezultat ukazuje kako formulacija *B. pseudobassiana* može prodrijeti u čahuru i pridonijeti upravljanju integriranog štetnika *L. botrana*.

2.3. Hrastova mrežasta stjenica (*Corythucha arcuata*)

Hrastova mrežasta stjenica (*Corythucha arcuata*) se ubraja među sitne kukce reda Hemiptera. Invazivna je vrsta u Hrvatskoj koja se velikom brzinom proširila u hrastovim šumama. Primarni domaćin je hrast (*Quercus spp.*), a naštena je i na velikom broju drugih listopadnih vrsta kao npr. javor (*Acer spp.*), grab (*Carpinus betulus*), lijeska (*Corylus spp.*), bukva (*Fagus spp.*), lipa (*Tilia spp.*) i brijest (*Ulmus spp.*). Hrastova mrežasta stjenica uzrokuje preuranjeno žućenje i klorotičnost listova uslijed sisanja biljnih sokova s donje strane lista (Miller i sur., 2008.), (Slika 5.). Ne ubija stabla, ali učestali napadi mogu smanjiti vitalitet stabala koja mogu biti manje otporna na druge štetne čimbenike. Isto tako, pojavljuje se i na stablima u urbanim sredinama gdje smanjuje njihovu estetsku funkciju.



Slika 5. Štete na hrastovom listu od hrastove mrežaste stjenice *Corythucha arcuata* (Izvor: I. Majić, 2020.)

C. arcuata pripada porodici fitofagnih stjenica Tingidae (Miller i sur., 2008.). Tingidae su rasprostranjene širom svijeta, a unutar same porodice se nalazi 2000 vrsta raspoređenih u tri podfamilije. Contacaderinae se uglavnom pojavljuju na južnoj hemisferi, Tinginae su zastupljene u cijelom tropskom i umjerenom području, a Vianaidinae su mala neotropska skupina (Miller i sur., 2008.).

Izgledom su mali, pravokutni, dorzoventralno spljošteni kukci, otprilike 2-10 mm duljine. Odrasli imaju prozirna, poput čipke teksturirana krila koja stoje ravno na tijelu kukca, a

vrhovi i vanjski rubovi se protežu izvan tijela. Polupokrilja, prvi par krila, su prozirna kod mnogih vrsta (Slika 6.). Neke vrste imaju oblik krila koja u određenoj mjeri mogu biti smanjena gdje uz to, jedan ili dva stražnja trbušna segmenta mogu biti vidljiva s dorzalne strane (Miller i sur., 2008.). Krem su boje sa smeđim ili crnim mrljama. Nimfe su sive do crne boje s ponekim bijelim pjegama, te su na njima prisutne sitne bodlje. Za razliku od nimfi, kod odraslih je glava u potpunosti prekrivena pronotumom. Mrežaste stjenice nemaju jednostavne oči, a ticala su im segmentirana u četiri dijela (Drake i Ruhoff, 1965.).

Hrastove stjenice prezimljuju kao odrasle jedinke na ili u blizini njihovih domaćina u pukotinama kore, granama ili u mahovini drveta, kao što su u ovom istraživanju bile pronalazene. Odrasle jedinke i nimfe podjednako se hrane sokom biljaka domaćina probijanjem pokožice (Miller i sur., 2008.). Svaka jedinka porodice Tingidae većinom se hrani na specifičnom domaćinu, iako mrežaste stjenice se hrane nizom raznolikih biljaka. Prezimljujuće odrasle jedinke se iz svojih skrovišta krenu seliti na lišće čim se ono krene pojavljivati u proljeće. Jedinke se počinju hraniti i praviti oštećenja na mladom lišću u krošnjama drveća gdje ujedno ženke krenu odlagati svoja crna i izdužena jaja na donjoj strani lista. Zatim, u jesen se spuštaju s krošnje niz stablo do mahovine i u mahovini ponovno prezimljuju. Zaokružuju svoj cijeli životni ciklus na istoj biljnoj vrsti domaćina te na istom dijelu biljke. Većina ih pokazuje društveno ponašanje, odnosno pojavljuju se u skupinama, a neki su pokazali i sposobnost roditeljske brige (Miller i sur., 2008.). Općenito imaju jednu ili više generacije godišnje, iako ih neke vrste imaju i više. *C. arcuata* ih u prosjeku ima 3 generacije godišnje. Brojnost jajašaca je od 15 do više od 100 po ženki (Baker i Brown, 1994.). Za potpun razvoj, mrežastoj stjenici je potrebno od 4 do 6 tjedana ovisno o temperaturi.



Slika 6. Odrasli stadij hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*)
(Izvor: I. Majić, 2020.)

2.3.1. Značaj hrastove mrežaste stjenice u Europi i Hrvatskoj

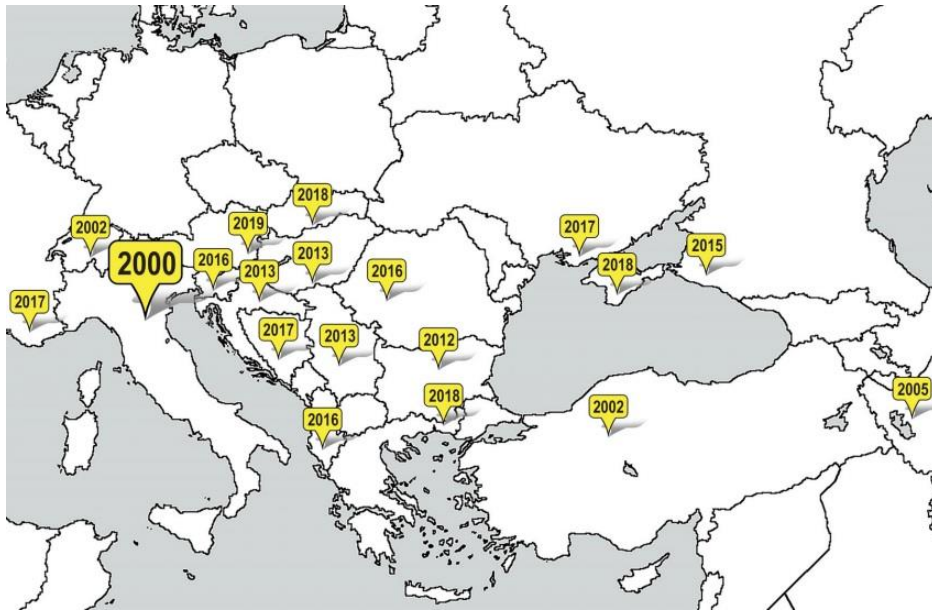
Na globalnoj razini već dugi niz godina postoji problem unosa stranih vrsta organizama i kukaca u okoliš. Takve vrste koje žive izvan svojeg prirodnog staništa se nazivaju stranim (alohtonim) vrstama kukaca koje su slučajno ili namjerno unošene u šumske ekosustave (Nentwig i Josefsson 2010.; Matošević i Pernek, 2011.). U Europi su se najčešće pojavljivale zbog transporta robe s drugih kontinenata. Problem započinje kada strana vrsta uspješno kolonizira područje na kojem prije nije postojala. Nadjača autohtone vrste zbog toga što se brzo širi i prouzrokuje štete što ju čini invazivnom vrstom (Nentwig i Josefsson, 2010.; Matošević i Pernek, 2011.).

Do 2010. godine u Europi je ukupno utvrđeno 12 vrsta stjenica koje su općenito strane za Europu, a najčešće su podrijetlom iz Sjeverne Amerike (Rabitsch, 2010.; Matošević i sur., 2013.). Najviše ih je zabilježeno na središnjem i zapadnom području Europe (Češkoj Republici, Njemačkoj, Francuskoj, Belgiji, Ujedinjenom Kraljevstvu i Nizozemskoj). U Hrvatskoj su do 2013. godine utvrđene 4 invazivne vrste stjenica; dvije sa zapadno mediteranskog područja (*Oxycarenus lavaterae* i *Tuponia brevis*), a preostale dvije iz Sjeverne Amerike (*Corytucha ciliata* i *Leptoglossus occidentalis*) (Matošević i sur., 2013.). Hrastova mrežasta stjenica se u Europi prvi put pojavila na području sjeverne Italije 2000. godine (Bernardinelli i Zandigiacomo, 2000.). Nakon Italije je zamijećena u Turskoj 2003., te u Švicarskoj 2005. godine (Mutun, 2003.; Forster i sur., 2005.; Matošević i sur., 2013.).

Zatim, u ljetu 2013. godine na području Vinkovaca, javila se sumnja o prisutnosti stjenice. Zbog promjene boje, odnosno žućenja hrastovog lišća na određenim geografskim područjima, obavlja se terenski obilazak sastojina kojima upravljaju Hrvatske šume d.o.o. UŠP Vinkovci (Hrašovec i sur., 2013.), gdje se po prvi put u Hrvatskoj utvrđuje prisutnost Hrastove mrežaste stjenice. Obilazilo se sveukupno 5 lokacija (Topolovac, Vrbanjske šume, Trizlovi-Rastovo, Slavir i Kunjevci), gdje je sakupljeno 30 ličinki i 137 odraslih stjenica. Pregledom lišća potvrđeni su tipični simptomi štete koje hrastova mrežasta stjenica pravi usnim ustrojem za bodenje i sisanje popraćeno promjenom boje, posebice u blizini glavne žile lista.

2.3.2. Domaćini hrastovoj mrežastoj stjenici i rasprostranjenost

Od 48 vrsta hrasta, 27 vrsta su prikladni domaćini hrastovoj mrežastoj stjenici. Osim toga, zabilježene su na 33 vrste drvenastih domaćina osim hrastova, a razvrstavaju se u 10 biljnih porodica (Csóka i sur., 2019.).



Slika 7. Prvi zapisi u zemljama u kojima je otkrivena invazija hrastove mrežaste stjenice
(Izvor: <https://resjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/afe.12362>)

Nakon što je hrastova mrežasta stjenica u Europi prvi put otkrivena u sjevernoj Italiji (Bernardinelli i Zandigiacomo, 2000.), stavljena je na EPPO listu u ožujku 2001. godine i ostala je do 2007., kada je postalo jasno da se ne može zaustaviti njezino daljnje širenje. Nakon već spomenute Turske (2003.) i Švicarske (2005.), iste godine stjenica je prvi put pronađena u Turskoj, otprilike 200 km istočno od Istanbula (Mutun, 2003.; Csóka i sur., 2019.). Jedan primjerak je pronađen u Iranu (Zapadni Azerbejdžan) 2005. godine (Samin i Linnavuori, 2011.; Csóka i sur., 2019.). Do ljeta 2008. godine, distribucija se znatno proširila dosežući 28 000 km² samo u Turskoj (Mutun i sur., 2009.; Csóka i sur., 2019.). Upravo ovaj porast populacije u zapadnoj Aziji, kao što se može primjetiti, rezultirao je daljnjim širenjem na sjever kroz Balkan (Slika 7.). Iako, slučajno unošenje od strane čovjeka iz sjeverne Italije u druge zemlje se ne može isključiti (Csóka i sur., 2019.). Nakon prvih zapisa, brzina raspona širenja stjenice je prijavljivana iz gotovo svih zemalja (Csepelényi i sur., 2017.; Simov i sur., 2018.; Csóka i sur., 2019.). Također treba napomenuti da vremenski slijed prvih zapisa u

različitim zemljama ne odražava nužno pravi obrazac širenja stjenice. Vrlo vjerojatno je da je to povezano s vremenom intenzivnog pretraživanja nakon svake pojave ove vrste u određenoj zemlji (Csóka i sur., 2019.).

Klima može značajno utjecati na uspostavu i daljnje širenje alohtonih invazivnih kukaca. Zime koje su blaže i kraće mogu utjecati na veći broj preživljene vrste kao i vrijeme nicanja u proljeće, što bi rezultiralo većim brojem generacija po godini (Berzitis i sur., 2017.; Papp i sur., 2018.; Smith i sur., 2018.; Ward i sur., 2018.; Csóka i sur., 2019.). Zabilježeno je kako su *Q. cerris*, *Q. petraea*, *Quercus pubescens* i posebno *Q. robur* najjače napadnute vrste u svim zemljama. Široko su rasprostranjene i među najbrojnijim su drvećem u istraživanoj regiji. Samo ove četiri vrste hrasta zajedno pokrivaju više od 10 milijuna hektara šumskog zemljišta u Europi (Csóka i sur., 2019.).

2.3.3. Fiziološki poremećaji u biljkama uslijed napada hrastove mrežaste stjenice

Lišće drvenastih biljaka predstavlja glavne fotosintetske organe. Biotički (uključujući napad biljojeda) i abiotički čimbenici okoliša mogu utjecati na fiziološke procese uključene u rast biljaka, odnosno produktivnost i razvoj (Nikolić i sur., 2019.). Zajedno s proizvodnjom novih tkiva (tj. suhe tvari), primarni proizvodi fotosinteze također se koriste ili za disanje ili za proizvodnju drugih ugljikohidrata, masti, proteina i sekundarnih spojeva, od kojih su neki odgovorni za otpornost napada kukca (Kozłowski i sur., 1991.; Nikolić i sur., 2019.). Nikolić i sur., (2019.) ispitali su utjecaj ishrane hrastove mrežaste stjenice (*C. arcuata*) na fotosintetske karakteristike i parametre izmjene plinova (neto fotosinteza, koncentracija klorofila i karotenoida, transpiracija, stomatalna vodljivost, substomatalna koncentracija CO₂), mineralne koncentracije hranjivih tvari i obrambene mehanizme (aktivnost nekih antioksidativnih enzima) lišća hrasta lužnjaka. Prema Taggar i sur., (2012.), čini se da antioksidativni enzimi igraju značajnu ulogu u otpornosti biljaka na kukce biljojede zbog njihovog djelovanja u sintezi obrambenih spojeva, otpornosti biljaka na oksidativni stres i signalnih putova.

Kod fotosintetskih karakteristika, rezultati pokazuju kako su parametri izmjene plinova značajno promijenjeni kod napadnutih biljaka. Stope fotosinteze i transpiracije su smanjene za 21,66 %, u usporedbi s nezaraženim biljkama. Kod napadnutih biljaka zabilježen je pad stomatalne vodljivosti od 35,71 %, a substomatalna koncentracija CO₂ je povećana za 47, 44 %. Najezda hrastove stjenice je negativno utjecala na koncentraciju klorofila a, dok se koncentracija klorofila b i karotenoida nije značajno promijenila. Aktivnost antioksidativnih enzima (katalaza, gvajakol i askorbat peroksidaza), lišća *Q. robur* nije bilo ravnomjerno pogođeno zarazom hrastove stjenice. Aktivnost katalaze je bila znatno smanjena (za 93,9 %) u listovima napadnutih biljaka hrasta, u odnosu na kontrolu, dok je aktivnost askorbat peroksidaza bila znatno povećana. Međutim, aktivnost nitrat reduktaze i gvajakola ostala je nepromijenjena unatoč napadu kukca. Kod ispitivanja mineralnih koncentracija u lišću, napada *C. arcuata* nije značajno utjecao na koncentracije N, P, K i Ca u napadnutom lišću u usporedbi s kontrolnim biljkama. Redosljed koncentracija makroelemenata u suhoj tvari za napadnuto nezaraženo lišće hrasta lužnjaka bio je sljedeći: N>K>P>Ca (Nikolić i sur., 2019.).

3. MATERIJAL I METODE

U Klokočevcima, pored Našica, na zapadu Osječko-baranjske županije (Slika 8.) prikupljeni su uzorci mahovine s prezimljujućom generacijom hrastove mrežaste stjenice (*C. arcuata*).



Slika 8. Sastojina hrasta u kojoj su tretirana stabla s *Beauveria pseudobassiana* i prikupljene hrastove mrežaste stjenice

(Izvor: Google Earth i L. Zastavnik, 2021.)

Kukci su bili u sastojini hrasta (*Q. robur*), točnije s 10 stabala koji su jedno od drugog bili udaljeni u prosjeku 10-15 m. Sa svakog su stabla sastrugani komadi mahovine dimenzija 40*40 cm, uz mala odstupanja od stabla do stabla (Slika 9.).

Ukupno je pohranjeno 10 uzoraka mahovine svaki u zasebnu posudu koje su prethodno označene brojem tretmana. Uzorkovanje mahovine je obavljeno u dva navrata: na kraju vegetacije u jesen 2021. godine kada se stjenice spuštaju iz krošnje u mahovinu, te u proljeće 2022. godine prije listanja hrasta i izlaska stjenice iz mahovine.



Slika 9. Skupljanje mahovine
s hrastovog stabla
(Izvor: L. Zastavnik, 2021.)



Slika 10. Uzorak mahovine
iz koje su se pincetom izdvajale hrastove
mrežaste stjenice
(Izvor: L. Zastavnik, 2021.)

Prvo uzorkovanje mahovine je obavljeno 24. studenoga 2021. godine. Nakon prvog uzorkovanja, preostala mahovina na stablima hrasta je tretirana s pripravkom na bazi entomopatogene gljive *B. pseudobassiana*. Koncentracija formulacije je iznosila 1×10^7 konidijalnih spora/mL. Drugo uzorkovanje mahovine je obavljeno 25. ožujka 2022. godine. Izolat *B. pseudobassiana* je prirodni soj pronađen na uginulim stjenicama hrastove mrežaste stjenice prikupljene u Spačvi, Hrvatska (Kovač i sur., 2020.). Spore gljive su čuvane na inokuliranoj riži. Za pripremu sredstva za tretiranje mahovine, riža je vigorozno miješana u vodi uz dodatak Tween-a kako bi se spore gljive odvojile od zrna riže.

Idućeg je dana nakon uzorkovanja, dolaskom u laboratorij Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek na Katedri za entomologiju i nematologiju započeto izdvajanje stjenica iz prikupljenih uzoraka mahovine. Prethodno su pripremljene Petri posude označene sa zasebnim oznakama za svaki tretman. Na laboratorijskom stolu se rasprostirala mahovina (Slika 10.), izračunata je površina uzorka i uz pomoć pinceta detaljno i pažljivo izvlačili su se odrasli stadiji hrastove mrežaste stjenice. Stjenice su izdvojene iz ukupno $1,10 \text{ m}^2$ površine mahovine uzorkovane u jesen 2021. godine, odnosno $2,14 \text{ m}^2$ uzorkovane u proljeće 2022. godine.

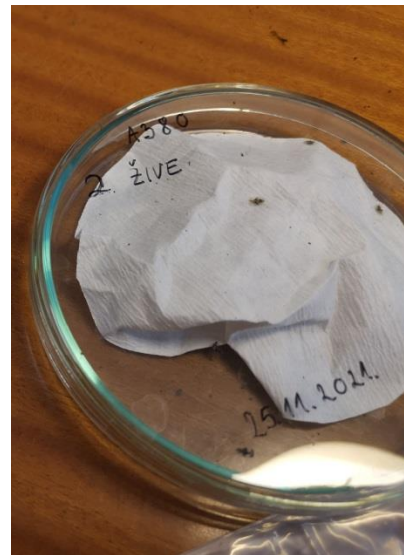
Uginule stjenice položene su na vlažni filter papir u Petri posudu kako bi se potaknuo razvoj micelija entomopatogene gljive (Slika 11.). Žive jedinice hrastove mrežaste stjenice izdvojene su u Petri posudu u koju je postavljen zgužvani filter papir jer se stjenice vole skrivati (Slika 13.). Ovime se postiglo smanjenje stresa kod stjenica koji može utjecati na prirodni mortalitet. Uzorci mahovine su pregledani i stjenice izdvojene u roku od dva dana. Utvrđen je ukupan broj stjenica po površini mahovine, te prirodni mortalitet stjenica. Petri posude sa uginulim stjenicama su praćene svaka dva dana tijekom 14 dana, stjenice su pregledane pod stereomikroskopom Olympus SZ61 kako bi se zabilježio razvoj micelija entomopatogene gljive (Slika 12.). Entomopatogene gljive sa zaraženih kukaca su analizirane na Hrvatskom šumarskom institutu, a identificirane su prema morfološkim značajkama.



Slika 11. Petri posuda s uginulim stjenicama
(Izvor: L. Zastavnik, 2021.)



Slika 12. Mikroskopski pregled stjenica
(Izvor: D. Majer, 2022.)



Slika 13. Petri posuda sa živim stjenicama
(Izvor: L. Zastavnik, 2021.)

Srednje vrijednosti ukupne brojnosti uginulih i živih stjenica, te srednje vrijednosti stjenica s razvijenim micelijom entomopatogene gljive analizirani su u Excel programu, a rezultati su prikazani tablično i grafikonima.

4. REZULTATI

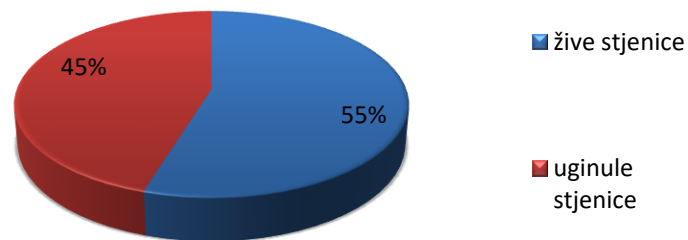
U tablicama i grafikonima su prikazani podaci o brojnosti prezimljujuće generacije te zaraženosti hrastove mrežaste stjenice s entomopatogenom gljivom *B. pseudobassiana*.

Tablica 1. prikazuje prirodni mortalitet prezimljujuće generacije hrastove mrežaste stjenice prije obavljanja tretmana. U 10 uzoraka ukupno je skupljeno i pregledano 1,10 m² mahovine. Na navedenoj površini broj jedinki iznosio je 73 od koji je 33 pronađeno uginulo, izraženo postotkom 45,2 %, a živih jedinki 40, odnosno 54,8 %. Dakle, u ovom slučaju je pronađeno više živih primjeraka hrastove mrežaste stjenice (Grafikon 1.).

Tablica 1. Brojnost populacije i prirodni mortalitet hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*) u jesen

Uzorak	Površina mahovine (m ²)	Broj uginulih jedinki	Broj jedinki s razvijenim micelijem	Broj živih jedinki	Ukupan broj jedinki
A 380	0,16 m ²	5	0	7	12
A 381	0,06 m ²	0	0	3	3
A 382	0,06 m ²	1	0	3	4
A 383	0,10 m ²	3	0	4	7
A 388	0,09 m ²	1	0	8	9
A 412	0,12 m ²	11	0	1	12
A 413	0,10 m ²	2	0	1	3
A 414	0,16 m ²	3	0	9	12
A 415	0,16 m ²	1	0	3	4
A 416	0,08 m ²	6	0	1	7
Srednja vrijednost:	0,11 m ²	3,3	0	4	7,3
Ukupno:	1,10 m ²	33	0	40	73

Ni na jednoj od jedinki nisu bili pronađeni tragovi nastanka, odnosno razvoja micelija te se zaključuje kako su uginule zbog utjecaja raznih okolišnih čimbenika kao i zbog mogućnosti prirodne smrti prilikom transporta od šume do laboratorija.



Grafikon 1. Postotak živih i uginulih jedinki hrastovih mrežastih stjenica prije tretiranja u jesenkom uzorkovanju

U tablici 2. je prikazan utjecaj entomopatogene gljive *Beauveria pseudobassiana* na mortalitet prezimljujuće generacije hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*). Podaci, koji su prikazani u ovoj tablici, prikupljeni su 4 mjeseca nakon tretmana prezimljujuće generacije hrastove mrežaste stjenice.

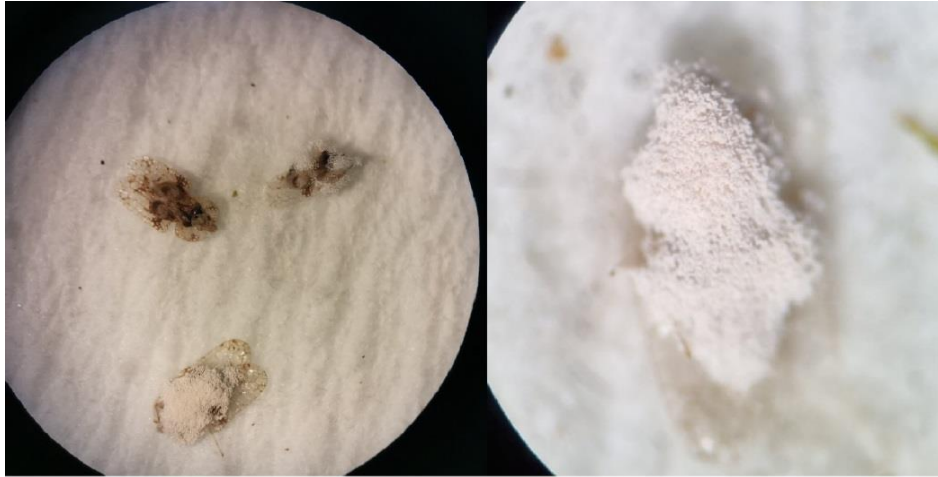
Rezultati nakon tretiranja mahovine prikazuju kako je unutar 10 uzoraka skupljeno 2,14 m² mahovine za pregled i izdvajanje stjenice. Ukupan broj jedinki na ovoj površini iznosi 62, od čega je uginulih 47 (75,8%), od kojih je 20 s razvijenim micelijem na sebi i živih jedinki 15 (24,2%). Dakle, 27 (43,5%) ih je uginulo zbog nekih drugih čimbenika, a na preostalih 20 (32,2%) je uočen razvoj micelija (Grafikon 2.).

Uspoređujući podatke iz tablice 1. i tablice 2. možemo utvrditi kako je u jesen po jednom kvadratnom metru mahovine ukupno pronađeno 73 jedinke, a brojke kontrole u proljeće prikazuju kako je na 1 m² ukupno prikupljena 31 stjenica. Od ukupno 31 stjenice, živih je bilo 7, a uginulih 24, te 10 s razvijenom mikozi.

Tablica 2. Brojnost populacije i prirodni mortalitet hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*) u proljeće

Uzorak	Površina mahovine (m ²)	Broj uginulih jedinki	Broj jedinki s razvijenim micelijem	Broj živih jedinki	Ukupan broj jedinki
A 380	0,16 m ²	8	3	0	8
A 381	0,21 m ²	3	0	1	4
A 382	0,28 m ²	5	2	3	8
A 383	0,18 m ²	2	1	0	2
A 388	0,18 m ²	4	4	4	8
A 412	0,09 m ²	0	0	0	0
A 413	0,18 m ²	5	3	1	6
A 414	0,25 m ²	3	2	1	4
A 415	0,36 m ²	8	1	1	9
A 416	0,23 m ²	9	4	4	13
Srednja vrijednost:	0,21	4,7	2	1,5	6,2
Ukupno:	2,14 m ²	47	20	15	62

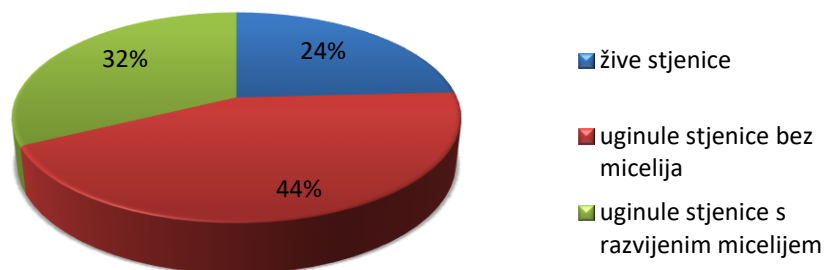
U jesenskom uzorkovanju po 1 m² prosječna vrijednost ukupnog broja jedinki po uzorku mahovine iznosi 7,3, od kojih je 3,3 uginulih, a 4 živih jedinki. Kod proljetnog uzorkovanja, nakon tretmana, prosječna vrijednost za ukupan broj jedinki po jednom kvadratu mahovine je 3,1, dok je prosjek uginulih 2,3 i živih 0,7. U proljetnom uzorkovanju utvrđena je i prosječna vrijednost broja jedinki s razvijenim micelijem, a iznosi 1 po 1 m² mahovine.



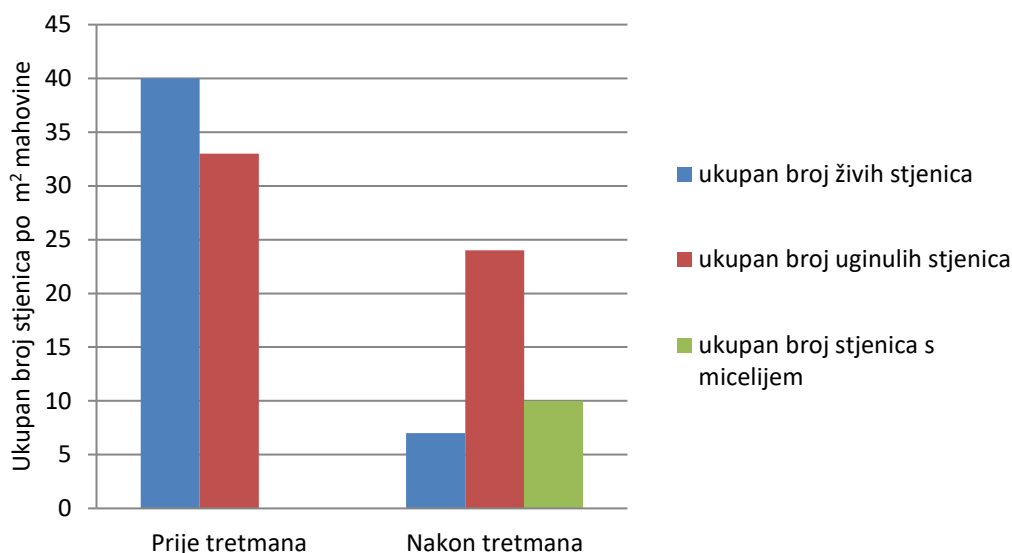
Slika 14. Prikaz razvijene entomopatogene gljive *B. pseudobassiana* na hrastovoj mrežastoj stjenici
(Izvor: L. Zastavnik, 2022.)

Slika 14. prikazuje razvijen micelij na uginulim hrastovim mrežastim stjenicama. Micelij je uočen mikroskopskim pregledom u proljeće, nakon obavljenog tretmana.

Stjenice su nakon pregleda ostavljene u Petri zdjelicama na filter papirima, u periodu od 13 dana na sobnoj temperaturi. Cilj je bio utvrditi hoće li se na njima dodatno razviti micelij (*B. pseudobassiana*). Poslije 13 dana, mikroskopskim pregledom je utvrđeno kako se micelij razvio kod 32 % uginulih stjenica (Slika 14.). Iz čega na kraju možemo zaključiti da nam navedeni postoci potvrđuju učinkovitost ovog tretmana.

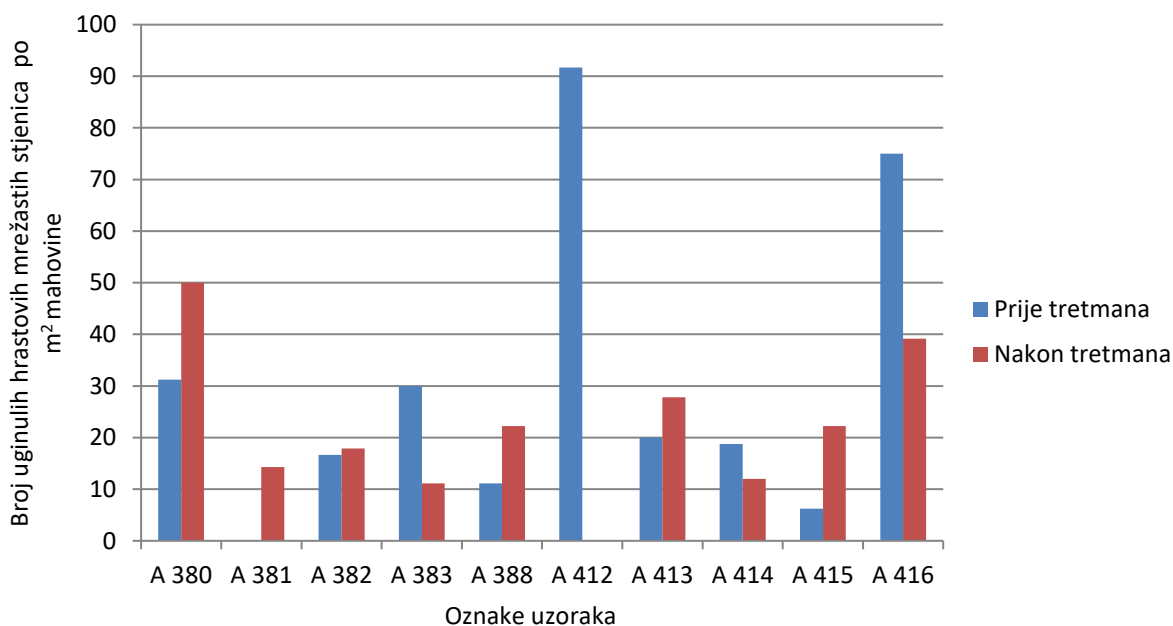


Grafikon 2. Postotak živih i uginulih hrastovih mrežastih stjenica nakon tretmana u proljetnom uzorkovanju



Grafikon 3. Ukupna brojnost populacije i mortalitet hrastove mrežaste stjenice stjenica prije i nakon tretmana

Uspoređujući podatke brojnosti hrastovih mrežastih stjenica prije i poslije tretmana, možemo primjetiti kako je u proljeće bila manja populacija, te znatno manje živih stjenica u usporedbi s podacima prije tretmana. U jesen nije bilo razvijenog micelija na stjenicama, odnosno nisu pronađene stjenice koje su bile zaražene prirodnom populacijom gljiva, iako ne možemo reći jesu li već tad neke jedinke bile zaražene, ali micelij se u tom periodu nije razvio. Podatci nakon tretmana prikazuju pojavu micelija na tretiranoj populaciji stjenica.



Grafikon 4. Mortalitet hrastove mrežaste stjenice po uzorcima prije i nakon tretmana

Iz grafikona 4 mogu se očitati podatci koji prikazuju broj uginulih stjenica po uzorcima, odnosno mjestima s kojih su prikupljane prije i nakon tretiranja. Možemo primjetiti kako se uzorak pod oznakom A 412 ističe od ostalih. Pokazuje iznimno velik broj uginulih stjenica u jesen, prije tretiranja, dok u periodu nakon tretiranja, u proljeće, ne pronalazimo niti jednu stjenicu u navedenom uzorku.

Također, možemo uočiti kako uzorci mortaliteta stjenica poprilično odstupaju jedan od drugoga, što nam pokazuje da svaki uzorak, odnosno svako stablo s kojeg je uzorak prikupljen, predstavlja zasebnu cjelinu pogodnu za istraživanje. Oscilacije bi mogle biti rezultat različitih položaja stabala, utjecaja sunčeve svjetlosti, vlažnosti, perioda prezimljavanja ili djelovanja nekih drugih entomopatogena.

5. RASPRAVA

Rehner i sur. (2011.) tvrde da je *B. pseudobassiana* globalno rasprostranjen entomopatogen koji se prenosi u tlu i ima širok spektar domaćina. Njegov raspon domaćina uključuje četiri reda i šest porodica člankonožaca. Ova studija nije uključivala hrastovu mrežastu stjenicu kao domaćina. Kasnije su Wang i sur. (2020.) proširili listu i uključili red Hemiptera kao domaćine za *B. pseudobassiana*. U ovom diplomskom radu smo potvrdili istraživanja drugih autora koji su zapazili da je hrastova mrežasta stjenica domaćin *B. pseudobassiana*.

U istraživanju Kovač i sur., (2021.) od 65 % pronađenih uginulih prezimljujućih jedinki mrežaste stjenice u mahovini na njih 19% utvrđena je zaraza entomopatogenim gljivama nakon čega su morfološke analize pokazale da od toga čak 70% pripada vrsti *B. pseudobassiana*. U ovom radu prilikom pregleda prezimljujućih mrežastih stjenica nije bio pronađen nijedan trag prirodne prisutnosti entomopatogene gljive. Njih 45,2 % je pronađeno uginulih, a 54,8 % živih. Rezultati koji su dobiveni, u usporedbi s drugim radovima, ne mogu biti jednaki i odnose se samo na određenu populaciju. Razlog bi mogao biti taj jer *C. arcuata* prezimljuje i u drugim mjestima, a neka vjerojatno nisu dovoljno vlažna pa rezultati, recimo u radu iznad, bi bili mnogo niži da su okolnosti bile drugačije, kao što sugeriraju neobjavljeni podaci Paulin i sur., (2020.).

Vezano za morfološke karakteristike entomopatogene gljive, Hassan i sur., (2020.) u svojem radu opisuju izgled gljive koja je izolirana iz tla, s planine Gara, gdje mikroskopskim pregledom uočavaju kolonije koje su imale izgled guste nakupine kuglastih konidiogenih stanica, hijalnih glatkih konidija. Prikazi tipične morfološke karakteristike kao što su pronađene kod *Beauveria* vrsta općenito, opisani u drugim radovima (Rehner i sur., 2005.). Otkrili su da se radi o prvom pronalasku *B. pseudobassiana* u Iraku. Morfološki opis se podudara s opisom izgleda gljive *B. pseudobassiana* koja se u ovome radu razvila na hrastovim mrežastim stjenicama. U radu iz Slovačke (Medo i sur., 2016.) mogu se pronaći informacije o uzorkovanju tla sa svrhom pronalaska *Beauveria* vrsta gdje je između ostalih pronađen soj *B. pseudobassiana*. Zaključili su da izolat više preferira šumska staništa za razliku od livada ili poljoprivrednih površina, uz pretpostavku radi lakše prilagodbe šumskim ekosustavima. Iako, u ovom istraživanju nisu pronađeni prirodni sojevi u sastojini šume u kojoj se izvršio pokus, ne odbacuje mogućnost postojanja ili pronalaska prirodnih sojeva u budućim istraživanjima gdje će uvjeti biti drugačiji.

6. ZAKLJUČAK

Korištenje entomopatogenih gljiva kao bioinsekticida pokazuje brojne uspješne rezultate u borbi protiv štetnih kukaca i patogena, te ima velik broj pozitivnih strana primjene. Osim što suzbijaju štetnike, mikroinsekticidi su sigurni, održivi i pomoću ovog načina suzbijanja bi se zaštitila biološka raznolikost i obnovili prirodni ekosustavi. Svrha ovog istraživanja je utvrditi insekticidno djelovanje entomopatogene gljive *B. pseudobassiana* na prezimljujuću generaciju hrastove mrežaste stjenice *C. arcuata*. Dobiveni rezultati koji su podijeljeni u dva dijela, prije tretmana i nakon tretmana, dali su informacije o stanju živih i uginulih stjenica i o razvoju micelija entomopatogene gljive na uginulim stjenicama, koje su bile ključne za provjeru uspješnosti tretmana.

Ni na jednoj uginuloj stjenici nije se razvio micelij entomopatogenih gljiva nakon jesenskog uzorkovanja, odnosno prirodna populacija entomopatogenih gljiva ako je i prisutna u istraživanoj hrastovoj sastojini, inokulum ili virulentnost joj je izrazito niska. Ovo ukazuje da su hrastove mrežaste stjenice u jesen uginule zbog raznih drugih abiotskih ili biotskih čimbenika. Važno je istaknuti da je za vrijeme prvog uzorkovanja stopa živih jedinki u odnosu na uginule bila veća. Od ukupno 73 jedinice, 45,2% su pronađene uginule, a žive 54,8% na 1,10 m² mahovine. Nakon tretmana mahovine s entomopatogenom gljivom, odnosno nakon proljetnog uzorkovanja mahovine, od ukupno prikupljenih 62 stjenice, pregledom se ustanovilo da je 75,8% uginulih, a 24,2% živih na 2,14 m² tretirane mahovine. Mikroskopskim pregledom se ustanovilo kako je 20 uginulih stjenica (32,2%) razvilo micelij entomopatogene gljive *B. pseudobassiana* što nam potvrđuje djelovanje primjenjenog izolata.

Soj *B. pseudobassiana* kao patogen ciljanog štetnog organizma (hrastove mrežaste stjenice), pokazao se uspješnim u biološkom suzbijanju i predstavlja potencijal za daljnju uporabu u suzbijanju štetnih organizama. Svakako, uz sigurnost utvrđivanja uporabe entomopatogenih gljiva, bilo bi korisno identificirati više virulentnih sojeva, te unatoč brojnim pozitivnim stranama, nastaviti raditi i na njihovim nedostacima kako bi se uklonila ograničenja (npr. osjetljivost sojeva na UV zrake). Uz očigledno spor napredak i nedovoljno informiranosti, važno je da se proizvođačima i široj javnosti približi važnost ove teme tako što bi se u raznim, srodnim ustanovama radile obuke i provodile terenske demonstracije, ujedno radi prilike o shvaćanju i prihvaćanju neophodnosti smanjenja kemijskih sredstava radi očuvanja stabilnosti ekosustava.

7. POPIS LITERATURE

1. Alonso-Diaz, M.A., Fernandez-Salas, A. (2021.): Entomopathogenic fungi for tick control in cattle livestock from Mexico. *Frontiers in fungal biology*, 2: 657694
2. Altimira, F., De La Barra, N., Rebufel, P., Soto, S., Soto, R., Estay, P., Vitta, N., Tapia, E. (2019.): Potential biological control of the pupal stage of the European grapevine moth *Lobesia botrana* by the entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* in the winter season in Chile. *BMC Research Notes*, 12: 548
3. Araujo, J.P.M., Hughes, D.P. (2016.): Chapter one-Diversity of entomopathogenic fungi: which groups conquered the insect body? *Advances in genetics*, 94: 1-39
4. Baker, G.T., Brown, R.I. (1994.): Chorionic fine structure of the egg of the oak tinged, *Corythucha arcuata* (Say) (Hemiptera: Tingidae). *Proceedings of the entomological society of Washington*, 96(1):70–73
5. Barčić, J., Maceljki, M. (2001.): Ekološki prihvatljiva zaštita bilja od štetnika. Čakovec: Zrinski, 247
6. Barra-Bucarei, L., France, A., Torres, C.P. (2019.): Entomopathogenic fungi. Natural enemies of insects pests in neotropical agroecosystems: Biological control and functional biodiversity, 123-136
7. Bedini, S., Sarrocco, S., Baroncelli, R., Vannacci, G. (2018.): Pathogenic potential of *Beauveria pseudobassiana* as bioinsecticide in protein baits for the control of the medfly *Ceratitis capitata*. *Bulletin of insectology*, 71(1): 31-38
8. Boucias, D.G., Pendland, J.C. (2008): Principles of insect pathology. Kluwer academic publisher, Boston, Massachusetts, USA, 97: 235
9. Bueno Pallero, F.A. (2022.): Entomopathogenic fungi from Algarve region (Portugal): Studies on their natural occurrence in the soil and multitrophic interactions that shape their biocontrol potential. Universidade do algarve, Faculdade de ciencias e tecnologia, 157
10. Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N. (2001.): Fungi as biocontrol agents; Progress, problems and potential. CABI publishing, 390
11. Csoka, G., Hirka, A., Mutun, S., Glavendekić, M., Miko, A., Szocs, L., Paulin, M., Eotvos, C.B., Gaspar, C., Csepelenyi, M., Szenasi, A., Franjević, M., Gninenko, Y., Dautbašić, M., Muzejinović, O., Zubrik, M., Netoiu, C., Buzatu, A., Balacenoiu, F., Jurc, M., Jurc, S., Bernardinelli, I., Streito, J.C., Avtzis, D., Hrašovec, B. (2019.):

- Spread and potential host range of the invasive oak lace bug (*Cprythucha arcuata* (Say,1832.) – Heteroptera: Tingidae) in Eurasia. Royal entomological society, 213620
12. Drake, C.J., Ruhoff, F.A. (1965.): Lacebugs of the world: A catalog: (Hemiptera: Tingidae). Bulletin of the United States National Museum, 1-634
 13. Ducange, P., Verdina, T., Stiro, F., Grottola, A., Orlando, G., Delvecchio, G., Mastropasqua, R. (2021.): *Beauveria bassiana* keratitis: Management of an atypical clinical presentation. Medical mycology case reports, 33: 1-4
 14. Faria, M.R., Wraight, S.P. (2007.): Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biological control, 43: 237-256
 15. Glare, T., Brookes, J. (2017.): *Beauveria pseudobassiana* and the Flax weevil from Mana Island. Bio-protection research centre, Lincoln University, 11: 7647
 16. Hassan, F. R., Abdullah, S. K., Assaf, L.H. (2020.): *Beauveria pseudobassiana* Rehner and Humber, 2011, A new entomopathogenic fungus from Gara mountain, Iraq. The journal of animal & plant sciences, 30(6): 1574-1578
 17. Hrašovec, B., Posarić, D., Pernek, M. (2013.): Prvi nalaz hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*) u Hrvatskoj. Šumarski list, 137: 499-503
 18. Imoulan, A., Li, Y., Wang, W.J., Meziane, A.E., Yao, Y.J. (2016): New record of *Beauveria pseudobassiana* from Morocco. Mycotaxon, 131: 913-923
 19. Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P.M., Meziane, A.E. (2017.): Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. Journal of Asia-Pacific entomology, 20(4): 1204-1212
 20. Ivezić, M. (2008): Entomologija: Kukci i ostali štetnici u ratarstvu, Poljoprivredni fakultet, 202
 21. Kamga, S.F., Ndjomatchoua, F.T., Guimapi, R.A., Klingen, I., Tchawoua, C., Hjelkrem, A.G., Thunes, K.H., Kakmeni, F.M. (2022.): The effect of climate variability in the efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum* against the desert locust *Schistocerca gregaria*. Sci Rep, 12: 7535
 22. Khan, S. (2012.): Entomopathogenic fungi as biocontrol agents. Molecular plant breeding, 3(7): 63-79
 23. Kim, J.C., Lee, M.R., Kim, S., Lee, S.J., Park, S.E., Baek, S., Gasmi, L., Shin, T.Y., Kim, J.S. (2019.): Long-term storage stability of *Beauveria bassiana* ERL836 granules as fungal biopesticide. Journal of Asia-Pacific entomology, 22: 537-542

24. Kocacevik Biryol, S., Sevim, A., Eroglu, M., Demirbag, Z., Demir, I. (2015.): Virulence and horizontal transmission of *Beauveria pseudobassiana* S.A. Rehner & Humber in *Ips sexdentatus* and *Ips typographus* (Coleoptera: Curculionidae). Turkish journal of agriculture and forestry, 40(2): 64-1504
25. 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): 679
26. Kovač, M. (2021.): Entomopatogene gljive roda *Beauveria* u Hrvatskoj i mogućnosti njihove uporabe u biološkoj kontroli šumskih štetnika. Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, 108: 136
27. Kovač, M., Linde, A., Lacković, N., Bollmann, F., Pernek, M. (2021.): Natural infestation of entomopathogenic fungus *Beauveria pseudobassiana* on overwintering *Corythucha arcuata* (Say) (Hemiptera: Tingidae) and its efficacy under laboratory conditions. Forest ecology and management, 491: 119193
28. Kovač, M. (2021.): Prirodni inokulum entomopatogenih gljiva u prezimljujućoj populaciji hrastove mrežaste stjenice *Corythucha arcuata* (Heteroptera, Tingidae), Etnomol. Croat., 20 (1): 13-20
29. Lawrence, A.L. (2012.): Manual of techniques in invertebrate pathology (Second edition). Academic press, 504
30. Mascarin, G.M., Jaronski, S.T. (2016.): The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. World J. Microbiol Biotechnol, 32:177
31. Matošević, D., Pernek, M. (2011.): Strane i invazivne vrste fitofagnih kukaca u šumama Hrvatske i procjena njihove štetnosti. Šumarski list- posebni broj, 264-271
32. Miller, L.T., Stange, L., MacVean, C., Rey, J.R., Frank, J.H., Mizell, R.F., Heppner, J.B. (2008.): Lace bugs (Hemiptera: Tingidae). Encyclopedia of entomology, 2099-2102
33. Nikolić, N., Pilipović, A., Drekić, M., Kojić, D., Poljaković-Pajnik L., Orlović, S., Arsenov, D. (2019.): Physiological response of Pedunculate oak (*Quercus robur* L.) to *Corythucha arcuata* (Say, 1832.) attack. Arch Biol Sci., 71(1): 167-76
34. Ownley, B.H, Gwinn, K., Vega, F.E. (2010.): Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. BioControl, 55: 113-128
35. Pajač Živković, I., Barić, B., Matošević, D. (2013.): Strane fitofagne vrste stjenica (Heteroptera) u Hrvatskoj. Entomologia Croatica, 17 (4): 79-88

36. Rabitsch, W. (2008.): Alien true bugs of Europe (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Zootaxa*, 1827: 1-44
37. Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G.H., Luangsa-ard, J.J., Devotto, L, Humber, R.A. (2017.): Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5): 1055-1073
38. Roy, H.E., Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E., Pell, J.K. (2006.): Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual review of entomology*, 51: 331-57
39. Souza, B., Vazquez, L.L., Marucci, R.C. (2019.): Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems. Springer Cham, 546
40. Shahid, A. A., Rao, A. Q., Bakhsh, A., Husnain, T. (2012.): Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci.*, 64(1): 21-42
41. Shaw, K.E., Prince, G., Clark, S.J., Ball, B.V. (2002.): Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. *Biological control*, 24(3): 266-276
42. Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Mavridis, K., & Vontas, J. (2020). Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. *Current opinion in insect science*, 39: 69-76
43. Vega, F.E. (2018.): The use of fungal entomopathogens as entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*, 110(1): 4-30
44. Wang, Y., Tang, D. X., Duan, D.E., Wang, Y. B., Yu, H. (2020.): Morphology, molecular characterization, and virulence of *Beauveria pseudobassiana* isolated from different hosts. *Journal of invertebrate pathology*, 172: 107333
45. Zimmermann, G. (2007.): Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium ansioptiae*. *Biocontrol science and technology*. 17(9): 879-920

Jedinice s interneta:

46. Humber, R.A. (2005.): Entomopathogenic fungal identification. Plant protection research unit <https://www.ars.usda.gov/arsuserfiles/80620520/apswkshoprev.pdf> (Datum pristupa 29.8.2023.)

8. SAŽETAK

Štete na šumskim vrstama biljaka koje su uzrokovane kukcima, gljivama i drugim patogenima, mogu dovesti do znatnih ekoloških i ekonomskih gubitaka. Cilj ovog istraživanja je utvrditi insekticidnu učinkovitost primjene entomopatogene gljive *Beauveria pseudobassiana* na prezimljujuću generaciju hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*). Istraživanje je provedeno u šumskoj sastojini hrasta (*Q. robur*), u blizini Našica gdje se entomopatogena gljiva primjenila na mahovinu na stablima hrasta u jesen 2021. godine. Prije tretmana utvrđena je inicijalna populacija hrastove mrežaste stjenice i njen prirodni mortalitet, a mortalitet prezimljujuće generacije stjenice uvrđen je u proljeće 2022. godine, nakon tretmana. Prvim uzorkovanjem, u jesen, prikupljeno je 1,10 m² mahovine u kojoj je pronađeno 73 jedinke od kojih je 33 (45,2 %) uginulih, a živih 40 (54,8 %). Ni na jednoj jedinki nije pronađen razvijen micelij entomopatogene gljive. Nakon tretmana s entomopatoenom gljivom, na površini od 2,14 m² tretirane mahovine utvrđeno je ukupno 62 jedinke stjenice, od čega je živih 15 (24,2 %), a uginulih 47 (75,8%), a na 20 uginulih stjenica pri pregledu je nađen razvijeni bjeličasti micelij entomopatogene gljive. Nakon pregleda, stjenice su ostavljene na sobnoj temperaturi u periodu od 13 dana s ciljem mogućeg dodatnog razvitka micelija. Poslije 13 dana, mikroskopskim pregledom je utvrđeno kako je na 32,2% stjenica od ukupnog broja stjenica (živih i uginulih) bilo prekriveno micelijem (*B. pseudobassiana*). Ovim istraživanjem smo potvrdili virulentnost i učinkovitost *B. pseudobassiana* jer samo jedan tretman mahovine u jesen je uzrokovao mortalitet na više od 30% prezimljujućih hrastovih mrežastih stjenica. Svakako se preporučuju daljnja istraživanja s različitim koncentracijama entomopatogena, različitim strategijama primjene entomopatogena, kao i različitim vrstama štetnika kako bi se potvrdili rezultati ovog rada.

Ključne riječi: patogenost, *Q. robur*, prirodni mortalitet, mahovina, tretman, micelij

9. SUMMARY

The damage on trees in forests caused by insects, fungi and other pathogens can lead to significant ecological and economic losses. The aim of this research was to determine the insecticidal effectiveness of the application of the entomopathogenic fungi (EPF) *Beauveria pseudobassiana* on the overwintering generation of the oak lace bug (*Corythucha arcuata*). The research was conducted in a oak forest (*Q. robur*), near Našice, where the EPF was applied to moss on oak trees in the fall of 2021. Before the treatment, the initial population of the oak lace bug and the natural mortality were determined. The mortality of the overwintering generation of oak lace bug was determined in the spring of 2022, after the moss treatment with EPF. In the fall, before the treatment, in total 1,10 m² of moss was collected, in which 73 individuals of oak lace bug were found, of which 33 (45,2%) were dead, and 40 (54,8%) were alive. No traces of mycelium were found on any individual. After the EPF treatment, in spring, from 2,14 m² of treated moss a total of 62 individuals was found, of which 15 were alive (24,2%), and 47 (75,8%) were dead, and 20 of them had developed mycelium on them. After the extraction, the oak lace bugs were left at room temperature for a period of 13 days with the aim of possible additional mycelium development. After 13 days, a microscopic examination revealed that 32,2% of the total number of extracted oak lace bugs were covered with mycelium (*B. pseudobassiana*). These results confirm virulence and effectiveness of *B. pseudobassiana* against overwintering population of the oak lace bug, after only one treatment of the EPF.

Key words: pathogenicity, *Q. robur*, natural mortality, moss, treatment, mycelium

11. POPIS TABLICA

Tablica 1. Prirodni mortalitet prezimljujuće generacije hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*)

Tablica 2. Utjecaj entomopatogene gljive *Beauveria pseudobassiana* na mortalitet prezimljujuće generacije stjenice (*Corythucha arcuata*)

12. POPIS SLIKA

Slika 1. Životni ciklus entomopatogene gljive

Slika 2. Multitrofičke interakcije *Beauveria bassiana* u okolišu

Slika 3. Konidiofore *Beauveria bassiana*

Slika 4. Neproklijale i proklijale konidije *Beauveria pseudobassiana*, te formiranje blastospora u kulturama starim 2 dana

Slika 5. Štete na hrastovom listu od *Corythucha arcuata*

Slika 6. Odrasli stadij hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*)

Slika 7. Prvi zapisi u zemljama u kojima je otkrivena invazija hrastove mrežaste stjenice

Slika 8. Sastojina hrasta u kojoj su tretirana stabla s *Beauveria pseudobassiana* i prikupljene hrastove mrežaste stjenice

Slika 9. Skupljanje mahovine s hrastovog stabla

Slika 10. Uzorak mahovine iz koje su se pincetom izdvajale hrastove mrežaste stjenice

Slika 11. Petri posuda s uginulim stjenicama

Slika 12. Mikroskopski pregled stjenica

Slika 13. Petri posuda sa živim stjenicama

Slika 14. Prikaz razvijene entomopatogene gljive *B. pseudobassiana* na hrastovoj mrežastoj stjenici

13. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Postotak živih i uginulih jedinki hrastovih mrežastih stjenica prije tretiranja u jesenskom uzorkovanju

Grafikon 2. Postotak živih i uginulih hrastovih mrežastih stjenica nakon tretmana u proljetnom uzorkovanju

Grafikon 3. Ukupna brojnost populacije i mortalitet hrastove mrežaste stjenice prije i nakon tretmana mahovine

Grafikon 4. Mortalitet hrastove mrežaste stjenice po uzorcima prije i nakon tretmana

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer: Zaštita bilja

Diplomski rad

Larisa Ana Zastavnik

Utjecaj entomopatogene gljive *Beauveria pseudobassiana* na prezimljujuću generaciju hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*)

Sažetak: Štete na šumskim vrstama biljaka koje su uzrokovane kukcima, gljivama i drugim patogenima, mogu dovesti do znatnih ekoloških i ekonomskih gubitaka. Cilj ovog istraživanja je utvrditi insekticidnu učinkovitost primjene entomopatogene gljive *Beauveria pseudobassiana* na prezimljujuću generaciju hrastove mrežaste stjenice (*Corythucha arcuata*). Istraživanje je provedeno u šumskoj sastojini hrasta (*Q. robur*), u blizini Našica gdje se entomopatogena gljiva primjenila na mahovinu na stablima hrasta u jesen 2021. godine. Prije tretmana utvrđena je inicijalna populacija hrastove mrežaste stjenice i njen prirodni mortalitet, a mortalitet prezimljujuće generacije stjenice uvrđen je u proljeće 2022. godine, nakon tretmana. Prvim uzorkovanjem, u jesen, prikupljeno je 1,10 m² mahovine u kojoj je pronađeno 73 jedinke od kojih je 33 (45,2 %) uginulih, a živih 40 (54,8 %). Ni na jednoj jedinki nije pronađen razvijen micelij entomopatogene gljive. Nakon tretmana s entomopagomom gljivom, na površini od 2,14 m² tretirane mahovine utvrđeno je ukupno 62 jedinke stjenice, od čega je živih 15 (24,2 %), a uginulih 47 (75,8%), a na 20 uginulih stjenica pri pregledu je nađen razvijeni bjeličasti micelij entomopatogene gljive. Nakon pregleda, stjenice su ostavljene na sobnoj temperaturi u periodu od 13 dana s ciljem mogućeg dodatnog razvitka micelija. Poslije 13 dana, mikroskopskim pregledom je utvrđeno kako je na 32,2% stjenica od ukupnog broja stjenica (živih i uginulih) bilo prekriveno micelijem (*B. pseudobassiana*). Ovim istraživanjem smo potvrdili virulentnost i učinkovitost *B. pseudobassiana* jer samo jedan tretman mahovine u jesen je uzrokovao mortalitet na više od 30% prezimljujućih hrastovih mrežastih stjenica. Svakako se preporučuju daljnja istraživanja s različitim koncentracijama entomopatogena, različitim strategijama primjene entomopatogena, kao i različitim vrstama štetnika kako bi se potvrdili rezultati ovog rada.

Ključne riječi: patogenost, *Q. robur*, prirodni mortalitet, mahovina, tretman, micelij

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Ivana Majić

Broj stranica: 36

Broj slika: 14

Broj tablica: 2

Broj grafikona: 4

Broj literaturnih navoda: 77

Jezik izvornika: hrvatski

Stručno povjerenstvo:

1. izv.prof.dr.sc. Ankica Sarajlić, predsjednik
2. prof.dr.sc. Ivana Majić, mentor
3. dr.sc. Milan Pernek, član
4. prof.dr.sc. Jasenka Ćosić, zamjenski član

Rad je pohranjen u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek
University Graduate Study Plant production, course: Plant protection

Graduate thesis

Larisa Ana Zastavnik

Effect of entomopathogenic fungi *Beauveria pseudobassiana* on overwintering generation of the oak lace bug (*Corythucha arcuata*)

Summary: The damage on trees in forests caused by insects, fungi and other pathogens can lead to significant ecological and economic losses. The aim of this research was to determine the insecticidal effectiveness of the application of the entomopathogenic fungi (EPF) *Beauveria pseudobassiana* on the overwintering generation of the oak lace bug (*Corythucha arcuata*). The research was conducted in a oak forest (*Q. robur*), near Našice, where the EPF was applied to moss on oak trees in the fall of 2021. Before the treatment, the initial population of the oak lace bug and the natural mortality were determined. The mortality of the overwintering generation of oak lace bug was determined in the spring of 2022, after the moss treatment with EPF. In the fall, before the treatment, in total 1,10 m² of moss was collected, in which 73 individuals of oak lace bug were found, of which 33 (45,2%) were dead, and 40 (54,8%) were alive. No traces of mycelium were found on any individual. After the EPF treatment, in spring, from 2,14 m² of treated moss a total of 62 individuals was found, of which 15 were alive (24,2%), and 47 (75,8%) were dead, and 20 of them had developed mycelium on them. After the extraction, the oak lace bugs were left at room temperature for a period of 13 days with the aim of possible additional mycelium development. After 13 days, a microscopic examination revealed that 32,2% of the total number of extracted oak lace bugs were covered with mycelium (*B. pseudobassiana*). These results confirm virulence and effectiveness of *B. pseudobassiana* against overwintering population of the oak lace bug, after only one treatment of the EPF.

Key words: pathogenicity, *Q. robur*, natural mortality, moss, treatment, mycelium

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Ivana Majić

Number of pages: 36

Number of figures: 14

Number of tables: 2

Number of graphs: 4

Number of literature references: 77

Original language: Croatian

Reviewers:

1. izv.prof.dr.sc. Ankica Sarajlić, predsjednik
2. prof.dr.sc. Ivana Majić, mentor
3. dr.sc. Milan Pernek, član
4. prof.dr.sc. Jasenka Ćosić, zamjenski član

The thesis is deposited in the Library of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek