

Insekticidno i antifungalno djelovanje etnomopatogene gljive *Beauveria bassiana* i korisne bakterije *Bacillus subtilis*

Jelić, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:151:818668>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



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

Tena Jelić

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Zaštita bilja

**INSEKTICIDNO I ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ENTOMOPATOGENE
GLJIVE *BEAUVERIA BASSIANA* I KORISNE BAKTERIJE *BACILLUS SUBTILIS***

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Tena Jelić

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo, smjer Zaštita bilja

**INSEKTICIDNO I ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ENTOMOPATOGENE
GLJIVE *BEAUVERIA BASSIANA* I KORISNE BAKTERIJE *BACILLUS SUBTILIS***

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor
3. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, član

Osijek, 2021.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE..... | 2 |
| 2.1. Entomopatogene gljive | 2 |
| 2.2. <i>Beauveria bassiana</i> | 4 |
| 2.2.1. Biološko suzbijanje kukaca s <i>Beauveria bassiana</i> | 8 |
| 2.3. Korisne bakterije u tlu..... | 9 |
| 2.3.1. <i>Bacillus subtilis</i> | 10 |
| 2.3.2. Biologija i ekologija <i>Bacillus subtilis</i> | 11 |
| 3. MATERIJAL I METODE..... | 14 |
| 4. REZULTATI..... | 18 |
| 5. RASPRAVA..... | 29 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 31 |
| 7. POPIS LITERATURE..... | 32 |
| 8. SAŽETAK..... | 38 |
| 9. SUMMARY..... | 39 |

POPIS TABLICA

POPIS SLIKA

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

Poljoprivredna proizvodnja će se u narednim desetljećima susresti s brojnim izazovima poput potrebe za proizvodnjom 70% više hrane za brzo rastuću svjetsku populaciju i prilagodbe klimatskim promjenama (FAO, 2009.) Sve navedeno zahtjeva učinkovitije korištenje prirodnih resursa uz što manju primjenu kemijskih sredstava za zaštitu bilja i gnojiva.

Sintetički kemijski insekticidi već godinama predstavljaju glavni način suzbijanja štetnih kukaca. Međutim, sve je češća pojava rezistentnosti kukaca na insekticide, kao i njihov negativan utjecaj na okoliš. Sredstva za zaštitu bilja uzrokuju onečišćenje poljoprivrednih površina te negativno utječu na korisnu faunu tla i korijenov sustav biljke. Shodno tome, uporaba bioloških agensa kao što su gljive i bakterije sve više dobiva na važnosti jer se biološkom zaštitom ne onečišćuje okoliš niti narušava zdravlje ljudi i životinja.

Biološko suzbijanje je mjera zaštite koja podrazumijeva primjenu mikroorganizama koji smanjuju populaciju patogena i štetnika te na taj način kontroliraju razvoj bolesti. Korištenjem bioloških agensa kao glavnog načina suzbijanja štetnih kukaca ne samo da bi se obnovili prirodni ekosustavi i zaštitila biološka raznolikost, već bi se i trajno smanjili troškovi samog suzbijanja.

Cilj ovog rada je utvrditi insekticidnu i antifungalnu učinkovitost pojedinačne i kombinirane primjene entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* i korisne bakterije *Bacillus subtilis*.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Entomopatogene gljive

Entomopatogene gljive su najrašireniji mikroorganizmi koji se koriste za suzbijanje štetnih kukaca. Iako su uglavnom izolirani iz tijela člankonožaca, njihovo prirodno stanište je tlo (Behie i Bidochka, 2014). Te su gljive razvrstane u šest koljena: *Oomycota*, *Chytridiomycota*, *Microsporidiomycota*, *Entomophthoromycota*, *Basidiomycota*, a najčešći je *Ascomycota*. Pregledni znanstveni radovi izvrsno prikazuju patogenost ovih gljiva i njihove druge osobine (Skinner i sur. 2014; Lacey i sur. 2015; Mascarin i Jaronski 2016).

Prema Ivezić (2008.) infekcije štetnih kukaca vrše se putem spora entomopatogenih gljiva koje kada dođu u kontakt s kukcem, kličaju te hifama probijaju kutikulu kukca i stvaraju toksine koji izazivaju njihovu smrt. Čimbenici koji određuju učinkovitost procesa infekcije uključuju litičke enzime, sekundarne metabolite i adhezine koje proizvode entomopatogene gljive. Optimalna temperatura za rast i klijanje entomopatogenih gljiva je između 20 i 30 °C. Spore mogu kličati i na temperaturama izvan ovog raspona, što je karakteristično za neke vrste gljiva (Skinner i sur. 2014.)

Najčešći rodovi entomopatogenih gljiva su: *Beauveria*, *Entomophthora*, *Hirsutella*, *Isaria*, *Lecanicillium*, *Nomuraea*, *Metarhizium* i *Verticillium*. Entomopatogene gljive su heterogeni organizmi koji imaju različite ekološke uloge. Primjerice, vrste iz rodova *Metarhizium* i *Beauveria*, koje se obično nalaze u tlu, ne kontroliraju samo prirodnu populaciju kukaca nego i složene odnose s biljkama. Ovi organizmi javljaju se kao prirodni endofiti korijena, stabljike i lista biljaka. Na taj način omogućuju biljkama veću otpornost na kukce, kao i štetne mikroorganizme suzbijanjem uzročnika bolesti. Također, biljci omogućuju dodatne pogodnosti poput bržeg razvitka sadnica i poboljšanog rasta biljaka. Slično, rod *Lecanicillium* također sprječava razvoj gljivičnih uzročnika bolesti biljaka razvijajući se na površini lista i ograničavajući raspoložive hranjive tvari te stvara antimikrobne spojeve (Litwin i sur., 2020.). Među entomopatogenim gljivama, vrsta *Isaria fumosorosea* ne stvara snažne interakcije s biljkama. To je vjerojatno zbog činjenice da su *Isaria* spp. osjetljive na kemijske tvari koje izlučuju biljke te na pripadajući sustav obrane protiv biljnih patogena (Litwin i sur., 2020.). S druge strane, uočeno je antagonističko djelovanje izolata *Isaria fumosorosea* protiv nematode korijenovih kvržica *Meloidogyne javanica*. Također, nedavno je utvrđeno da su endofitne entomopatogene gljive kompatibilne s drugim agensima

za biološko suzbijanje štetnika, poput parazitoïda (Jarber i Ownely 2017.), stoga se mogu koristiti kao komplementarni alat u programima integrirane zaštite bilja.

Prema Wan (2003.) prednosti upotrebe entomopatogenih gljiva kao bioinsekticida su:

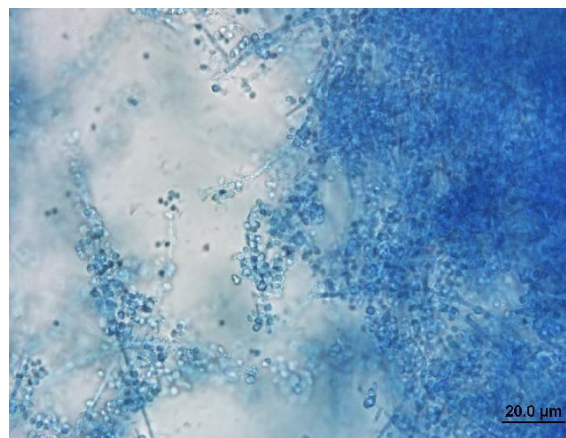
1. Visoka razina specifičnosti, odnosno selektivnosti prema štetnicima. Gljive se mogu koristiti za suzbijanje štetnih kukaca bez utjecaja na prirodne neprijatelje i korisne parazite.
2. Nema štetnog učinka za sisavce i sigurne su za okoliš.
3. Smanjuju problem uzrokovan razvojem rezistentnosti kukaca.
4. Visok potencijal za daljnji razvoj biotehnoških istraživanja.
5. Pruža održivost u okolišu što omogućuje dugoročni učinak entomopatogenih gljiva.

Nedostaci upotrebe entomopatogenih gljiva kao bioinsekticida su:

1. Kako bi kukac uginuo potrebno je više vremena, uspoređujući s kemijskim insekticidima kada štetnik ugiba 2-3 sata nakon primjene.
2. Radi bolje učinkovitosti, kod primjene mora biti visoka relativna vlaga, mali broj štetnika i u razdoblju bez fungicidnih tretmana.
3. Zbog visoke specifičnosti potrebna su dodatna sredstva za suzbijanje štetnika.
4. Njihova je proizvodnja relativno skupa, a zbog kratkog vijeka trajanja spora moraju se držati u hladnjačama.
5. Postojanost i djelotvornost entomopatogenih gljiva u populaciji domaćina razlikuju se između različitih vrsta kukaca, stoga tehnike primjene koje su specifične za kukce trebaju biti optimizirane kako bi zadržale dugoročne učinke.

2.2. *Beauveria bassiana*

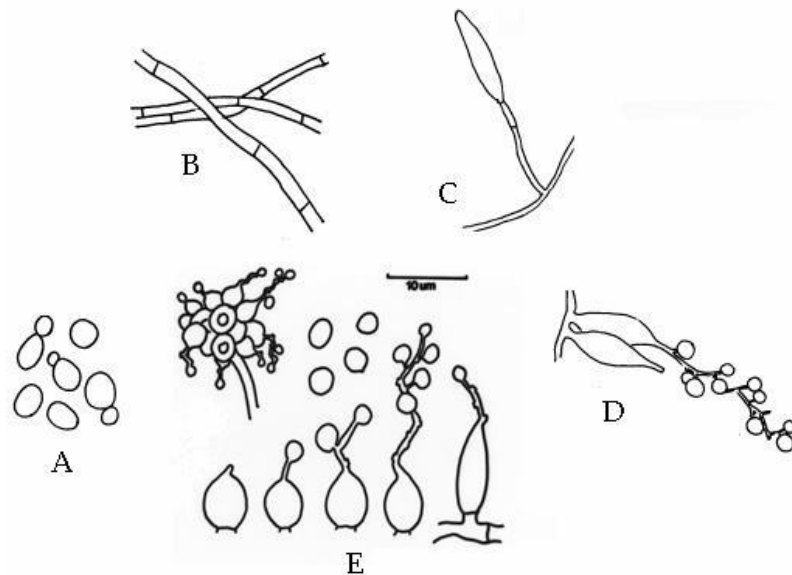
Klasifikacija vrsta iz roda *Beauveria* bila je problematična, s obzirom na to da se naziv *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin koristio za više različitih vrsta zbog nedostatka uočljivih morfoloških razlika. *Beauveria* je rod anamorfnih, potencijalno i teleomorfnih entomopatogenih gljiva (Ascomycota: Hypocreales) koje se javljaju u većini svijeta, a prva opisana vrsta bila je *B. bassiana*, nazvana po Agostinu Bassiju koji je koristio gljivu i dudovog svilca (*Bombyx mori* L.) kao domaćina te je 1834. godine demonstrirao učinak konidija ove gljive na štetniku. Nadalje, Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli prvi je opisao ovu gljivu kao *Botrytis bassiana*, a Jean Beauverie je 1911. godine nastavio istraživati njen mehanizam djelovanja, da bi joj godinu dana kasnije Vuillemin dodijelio naziv roda *Beauveria*. Morfološki je vrlo teško razlikovati vrste unutar ovog roda. Napredovanjem tehnologije i razvojem genetskih analiza (rDNA) utvrđeno je da *Beauveria* pripada podporodici Cordycipitoideae unutar porodice Clavicipitaceae (Sung i sur., 2001.). Najznačajnije vrste uz *B. bassiana* (Slika 1.) su *Beauveria alba*, *Beauveria amorpha*, *Beauveria brongniartii*, *Beauveria caledonica*, *Beauveria velata* i *Beauveria vermiconia*. *B. bassiana* je fakultativni saprofit koji se razvija u tlu. Patogen je člankonožaca i danas se često koristi kao biopesticid. Provedena su brojna istraživanja u kojima su opisani mehanizmi djelovanja gljive i širok raspon domaćina na kojima pokazuju entomopatogeno djelovanje (Adane i sur., 1996.; Fancelli i sur., 2013.; Nankinga i Moore, 2000.; Ortiz-Urquiza i sur., 2015.; Ruiu, 2015).



Slika 1. *Beauveria bassiana*

(izvor: https://v3.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=91436)

B. bassiana je gljiva, nitastog izgleda koja se sastoji od septiranih hifa, promjera veličine od 2,5 do 25 μm , grupiranih na jednostavnim, simpodijalno razgranatim konidioforima koji se stvaraju izravno na miceliju (Slika 2.). Spore ove gljive su prozirne, blago ovalnog do ovalnog oblika, a nazivamo ih blastospore. One se uzgajaju na čvrstim podlogama i tekućim hranjivim medijima (Holder i Keyhani, 2005). Kao i spore, hife *B. bassiana* su hijaline, bijele boje. Također, ova gljiva ima dobro razvijen, razgranat i septiran micelij u kojemu se nalazi više jezgara. *B. bassiana* razmnožava se bespolno pomoću konidija. Budući da joj nedostaje spolni stadij, ona pripada nesavršenim gljivama ili *Fungi imperfecti*.



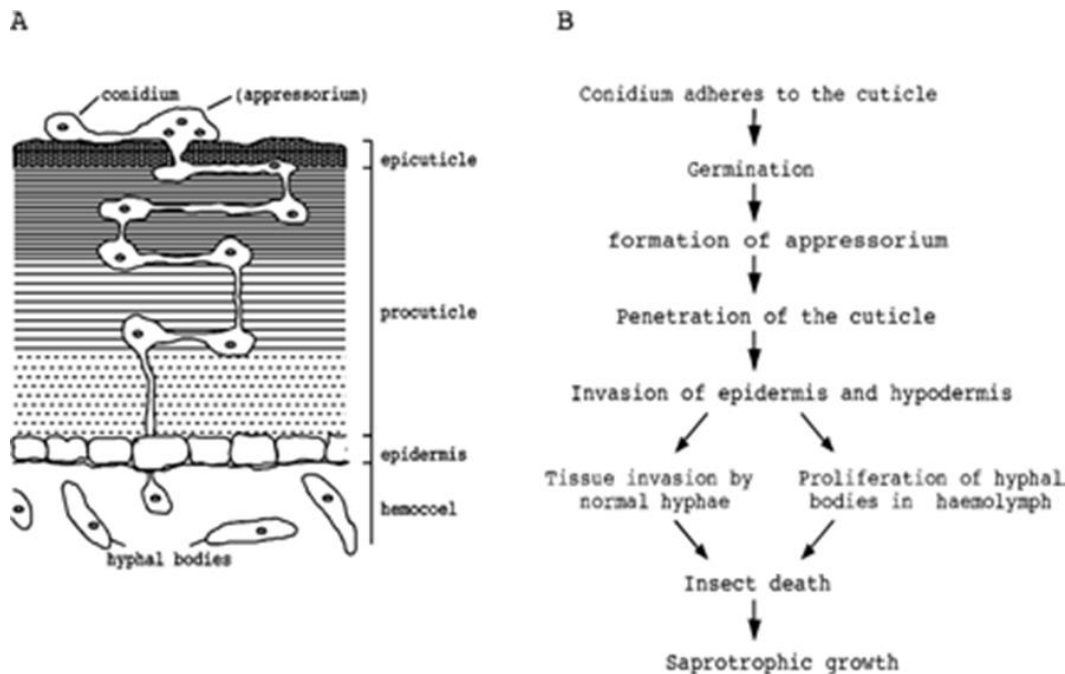
Slika 2. Glavne morfološke strukture gljive *B. bassiana*. A. Blago ovalne kuglaste spore. B. Hife septuma. C. Jednostavni konidiofor. D. Simpodijalna proliferacija konidiofora. E. Shematski prikaz sazrijevanja konidiofora s konidijama (dolje) i prikaz cjelovitog konidiofora (gore lijevo).

(izvor: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/463>)

Postoje određena istraživanja koja dokazuju da kod ove gljive postoji paraseksulanost, odnosno fenomen u kojemu nema fuzije između staničnih jezgri, a time dolazi do udvostučenja broja kromosoma, bez stvarnih seksualnih procesa. Nakon toga se stanične jezgre dijele procesom mitoze, u kojoj dolazi do razmjene genetskog materijala između dva odgovarajuća kromosoma, pa na kraju haploidizacije, zatim nastaju dvije nove jezgre, od kojih svaka ima jedan set kromosoma, ali se genetički razlikuju od prijašnjih staničnih jezgara (Viaud i sur. 2006.).

B. bassiana ima sposobnost živjeti na parazitski i saprofitski način, prema tome ona može preživjeti bez prisutnog domaćina. Kada se nalazi u tlu njezin micelij stvara veliku mrežu nitastih konidija. Međutim, u prisutnosti kukca konidije klijanju i kada napokon uđu u tijelo kukca, počinju formirati mrežu spora (blastospore).

Proces infekcije kukaca s ovom gljivom odvija se kroz nekoliko koraka: prijanjaje, klijanje, diferencijacija i prodiranje (Slika 3.).



Slika 3. Proces zaraze s *B. bassiana* (A.) Građa kutikule kukca. (B.) Način prodiranja u kutikulu kukca.

(izvor:http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/3255/1/Hong_WADissertation.pdf)

Prvi korak nastaje prihvaćanjem konidije za kutikulu kukca za koje je potrebno prepoznavanje i kompatibilnost između konidije i stanice na površini tijela kukca. Nakon što se konidija prihvati za površinu kukca, započinje klijanje koje u najvećoj mjeri ovisi o domaćinu i okolišu (visoka vlaga je potrebna). Treći korak započinje stvaranjem penetrirajućih struktura gljiva, apresorija, koja pomaže prodiranju u kutikulu djelovanjem izvanstaničnih enzima, kao što su hitinaze, lipaze, eteraze, proteaze te mehaničkim pritiskom koji omogućava invaziju epiderme kukca. Nakon smrti kukca, koja je rezultat mehaničkih oštećenja, pothranjenosti i toksikoze dolazi do razmnožavanja gljive u probavnom traktu. Hife luče antibiotik oosporin, koji napada bakterije u crijevima i mumificira kukca, odnosno

antibiotici sprječavaju napad sekundarnih saprofitskih mikroorganizama. Ovo omogućuje gljivi nesmetani razvoj.

Tijekom infekcije, *B. bassiana* učinkovito izbjegava obranu domaćina. Zaraženi domaćini proizvode i izlučuju obrambene spojeve u hemolimfi, kao što su antimikrobni peptidi, koji djeluju inhibitorno na gljivu (Vilcinskas i Wedde, 2002.; Wedde i sur., 2007.; Vertyporokh i Wojda, 2017.; Treviano i Zaragoza, 2019.). Preživaljava onaj organizam (kukac ili gljiva) čiji je mehanizmi obrane ili virulentnosti učinkovitiji.

2.2.1. Biološko suzbijanje kukaca s *Beauveria bassiana*

Iako postoji gotovo 700 vrsta u oko 100 rodova entomopatogenih gljiva (Humber, 2008), većina komercijalno proizvedenih gljiva pripada rodovima *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* i *Lecanicillium*. Gljiva *B. bassiana* pokazuje veliko entomopatogeno djelovanje kod različitih vrsta kukaca diljem svijeta, najčešće iz redova Coleoptera, Lepidoptera, Homoptera i Arthropoda. Lewis i Cossentine (1986.) istraživali su mogućnosti suzbijanja kukuruznog moljca *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) s *B. bassiana* u kukuruzu *Zea mays* L. (Poaceae). Batta (2007.) je suzbijao bademovog potkornjaka (*Scolytus amygdali* Guer) ovom gljivom. Također, Dembilio i sur. (2010.) ispitivali su utjecaj *B. bassiana* na crvenu palminu pipu (*Rhynchophorus ferrugineus*, Oliver 1709.), a Zhang i sur. (2020.) kalifornijskog tripsa (*Franklinella occidentalis*, Pergande 1875.) na cvijeću. *B. bassiana* ima slabi utjecaj na medonosne pčele (*Apis mellifera* L.), ali je bumbar (*Bombus terrestris* L.) dosta osjetljiv. Ramanaidu i Cutler (2012.) navode da se istočni bumbar (*Bombus impatiens* L.) koristi kao vektor *B. bassiana* za suzbijanje kalifornijskog tripsa i bijele mušice (*Trialeurodes vaporariorum*, Westwood 1856.) u staklenicima. Zbog sve veće potražnje za usjevima bez kemikalija i pooštavanja mjera o ostacima pesticida, posebno u Europi i Sjevernoj Americi, potiče se primjena biopesticida. Entomopatogene gljive roda *Beauveria* i *Metarhizium* čine gotovo 70% svih komercijalnih mikroinsekticida u svijetu (Faria i Wraight, 2007.). Formulacije većine proizvoda na bazi ove gljive su močiva prašiva (WP), koncentrirane suspenzije (CS) i emulzije za tretiranje sjemena (ES).

B. bassiana je kompatibilna za miješanje s drugim agrokemikalijama, tako i s botaničkim insekticidima (Mascarin i Jaronski, 2016.) Neke tvrtke poput LAM International (Butte, MT, USA), dodaju botaničke spojeve svojim proizvodima na bazi *B. bassiana*, kao što je azadiraktin (neem) sa svrhom postizanja sinergije u učinkovitosti protiv štetnika.

2.3. Korisne bakterije u tlu

Broj bakterija u rizosferi i rizoplani, veći je u odnosu na tla bez biljaka jer takva tla ne posjeduju mnoge aktivne tvari koje izlučuje korijen, a koje su primarni ili sekundarni izvor hrane za mikroorganizme. Također, 15% površine korijena pokriveno je mikrobnim populacijama kojima pripada nekoliko bakterijskih vrsta (Govindasamy i sur., 2011.; Jha i sur. 2010). Većina rizosfernih bakterija koje doprinose rastu i razvoju biljaka pripadaju rodovima *Actinobacter*, *Agrobacterium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas* i *Bacillus* (Glick, 1995.; Vessey, 2003.).

Ove bakterije izravnim i neizravnim mehanizmima djelovanja postižu značajne učinke na rast biljaka. Razlika između tih mehanizama nije uvijek uočljiva, međutim neizravni mehanizmi su u pravilu oni koji se događaju izvan biljke, dok su izravni oni koji se javljaju unutar biljke i izravno utječu na njezin metabolizam (Glick, 1995; Siddikee i sur., 2010; Vessey, 2003.). Prema tome, bakterije izravno utječu na ravnotežu regulatora rasta biljaka, iz razloga što same bakterije oslobađaju regulatore rasta koji se integriraju u biljku ili su izvor biljnih hormona koji induciraju biljni metabolizam, što dovodi do poboljšanja njihovih adaptivnih sposobnosti (Glick, 2014.; Govindasamy i sur., 2011). S druge strane, neizravni mehanizmi djelovanja omogućuju biljkama sudjelovanje u obrambenim metaboličkim procesima. Ovoj skupini pripadaju dva važna mehanizma, a to su indukcija sustavne otpornosti na biljne patogene (biotički stres) i zaštita biljke od negativnih uvjeta okoliša (abiotički stres) (Aeron i sur., 2011.; Glick, 2014.; Jha i sur., 2011.; Ramos-Solano i sur. 2008.). S obzirom da najvažnije rizobakterije pripadaju rodovima *Pseudomonas* i *Bacillus*, ove bakterije mogle bi se primjeniti u sustavima poljoprivredne proizvodnje u svrhu ublažavanja biotičkih i abiotičkih stresova kao ekološki prihvatljiva metoda (Grover i sur., 2010.; Vejan i sur., 2016). Zbog sve veće potražnje za ekološki prihvatljivim metodama u poljoprivredi, pomoću kojih su ljudi sposobni proizvesti odgovarajuću hranu koja je potrebna za povećanje ljudske populacije i poboljšanje kvalitete i kvantitete poljoprivrednih proizvoda, primjena korisnih mikroorganizama, poput korisnih bakterija, važna je alternativa poljoprivrednim proizvodnim metodama koje u velikoj mjeri mijenjaju ravnotežu agroekosustava te imaju negativan učinak na zdravlje ljudi.

2.3.1. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je gram pozitivna štapićasta bakterija koja se obično nalazi u tlu . Otkrio ju je 1835. godine njemački znanstvenik Christian Gottfried Eherenberg, kao *Vibrio subtilis* (Rasmussen i sur., 2009.). Ferdinand Julius Chon, preimenovao ju je 1872. godine u *B. subtilis*. Nekoliko godina kasnije, Chon je prvi puta dokazao da *B. subtilis* (Slika 4.) može u obliku endospore preživjeti promjene okoliša koje negativno utječu na njen vegetativni rast (Rasmussen i sur. 2009.). S obzirom na to da spore ove bakterije nisu patogene za ljude, pogodne su za aerosolna ispitivanja zbog svoje izrazite sposobnosti preživljavanja nakon procesa aerosolizacije.



Slika 4. *Bacillus subtilis*

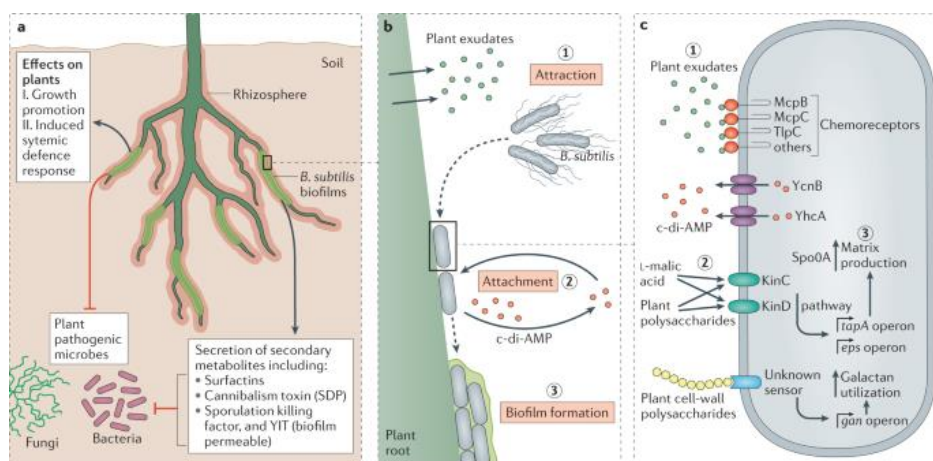
(izvor: <https://www.americanbiosystems.com/products/direct-fed-microbials/bacillus-subtilis-fermentation-product/>)

B. subtilis se koristi kao model organizam u različitim istraživanjima zbog velike količine prikupljenih fizioloških i biokemijskih podataka i dostupnosti genomskih komponenti koje posjeduje. Vegetativne stanice vrste *B. subtilis* često se izoliraju iz rizosfere biljaka. Ova bakterijska vrsta izlučuje lipopeptidne biosurfaktante i antibiotike koji djeluju antifungalno i antibakterijski (Moyné i sur., 2001.; Bais i sur., 2004.) jer uklanjanjem konkurentskih mikroorganizama povećava svoje šanse za preživljavanje. Zbog tih svojstava često se koristi kao sredstvo za zaštitu bilja u okviru biološkog suzbijanja patogenih bakterija i gljiva.

(Bhattacharyya i Jha, 2011.; Bais i sur., 2004.). Također, *B. subtilis* aktivira induciranu sustavnu otpornost u biljkama i potiče rast biljaka.

2.3.2. Biologija i ekologija *Bacillus subtilis*

Kolonizacija korijena bakterijom *B. subtilis* korisna je i za bakteriju i za biljku domaćina. Približno 30% fiksiranog ugljika kojeg proizvede, biljka izlučuje putem eskudata korijena. (Hashem i sur. 2019.). Bakterijama koje koloniziraju korijen, biljke osiguravaju hranjive tvari. S druge strane, bakterije na korijenu stimuliraju biljni rast i omogućuju zaštitu od stresa. *B. subtilis* stvara tanak film stanica na korijenu kako bi se održala u rizosferi kroz duži vremenski period (Slika 5.). Biofilmovi se sastoje od višestanične bakterijske zajednice prekrivene matriksom. Vrijeme potrebno kako bi *B. subtilis* stvorila biofilm na korijenu biljke domaćina također ovisi o promotorima gena odgovornih za stvaranje matriksa kada bakterija dođe u kontakt s korijenom (Beauregard i sur., 2013.). Allard i sur. (2016.). navode da bakterija koristi kemotaktilna osjetila kako bi locirala i kolonizirala mlado korijenje. Prvo istraživanje kemotaksije bakterija provedeno je na međudjelovanju *Escherichia coli* i *Salmonella enterica sero-var.*, a kasnije je prošireno na proučavanje gram pozitivnih bakterija, kao što je *B. subtilis* (Hashem, 2019.).

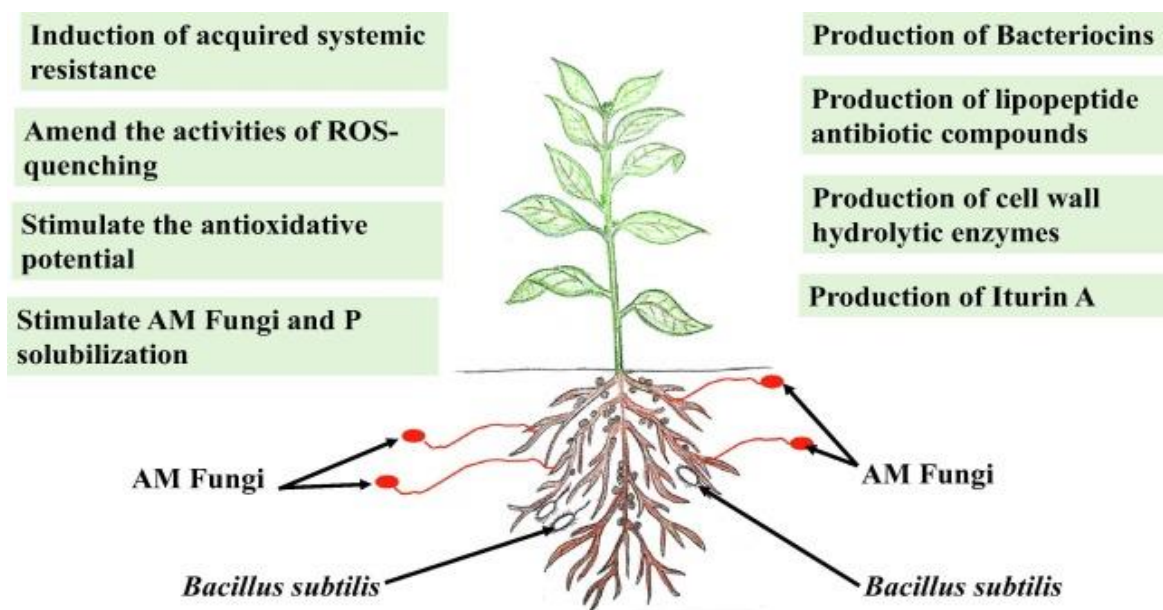


Slika 5. Stvaranje biofilma *B. subtilis* na korijenu

(Izvor: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00540-9>)

Komercijalna proizvodnja poljoprivrednih usjeva zahtijeva upotrebu metoda koje štite usjeve od biljnih patogena i štetnika koji smanjuju prinos i kvalitetu usjeva. Pojavom organske i održive poljoprivrede, istraživanja su bila usmjerena na pronalazak prirodnih

rješenja kako bi se smanjilo intenzivno korištenje sintetičkih kemikalija. Stoga se provode ekološki prihvatljive, sigurnije metode biljne zaštite, posebice pristupi biološkog suzbijanja. Ove bakterije proizvode endospore koje im pomažu da prežive nepovoljne uvjete okoliša. Endospore omogućuju klijanje u različitim okolišnim uvjetima i skladištenje bioloških agensa te smanjuju složenost procesa formulacije (Collins i Jacobsen, 2003.). Korisne *Bacillus* vrste koje se apliciraju u rizosferu su biljni endofiti koji štite biljke od patogena. Ove bakterije proizvode antimikrobne metabolite koji se mogu koristiti kao zamjena za sintetske pesticide ili kao dodatak biopesticidima i gnojivima za suzbijanje uzročnika biljnih bolesti. Različiti sojevi *B. subtilis* sintetiziraju mnogo hidrolitičkih enzima, (Slika 6.) uključujući celulaze, proteaze i b-glukanaze, te antibiotske lipopeptide uključujući fengicin, surfaktin i iturin (Hashem, 2019.). Oni razgrađuju staničnu stijenku i razne metabolite koji mogu ograničiti rast ili aktivnost



Slika 6. Mehanizmi djelovanja *B. subtilis* u uvjetima biotičkog stresa

(Izvor: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S>)

drugih mikroorganizama. Učinkovitost *B. subtilis* ovisi o tri čimbenika: osjetljivosti domaćina, virulenciji patogena i okolišu. Istraživanja pokazuju da lipopeptidi pružaju zaštitu biljkama prije i nakon berbe jer izravno suzbijaju patogene gljive ili izazivaju sistemsku otpornost biljaka. Ova bakterija također proizvodi peptidne antibiotike koji se nazivaju bakteriocini i imaju važnu ulogu za otpornost biljke domaćina.

Nastanak korijenovih kvržica temelji se na razmjeni signala između domaćina i bakterije u rizosferi što dovodi do uspostavljanja rizobija u tkivu domaćina, nodulacije i pospješivanja rasta biljaka pojačanim unosom hranjivih sastojaka iz okolnog tla. Mikrobi koji su povezani s korijenjem, uključujući slobodno živeće, endofite, rizosferne i simbiotske, mogu inducirati sintezu fitohormona u svojim biljnim domaćinima ili u nekim slučajevima izravno proizvode hormone. *B. subtilis* pokazuje sinergijski učinak na rast kada se primjenjuje u kombinaciji s arbuskularnim mikoriznim gljivama (Kohler i sur, 2007.). Kombinirana primjena rezultira povećanom proizvodnjom enzima, antioksidansa, P solubilizacije, nodulacijom korijena i fiksacijom dušika (Hashem, 2019.). S obzirom na to potrebno je poticati razvoj komercijalnih formulacija *B. subtilis*.

3. MATERIJAL I METODE

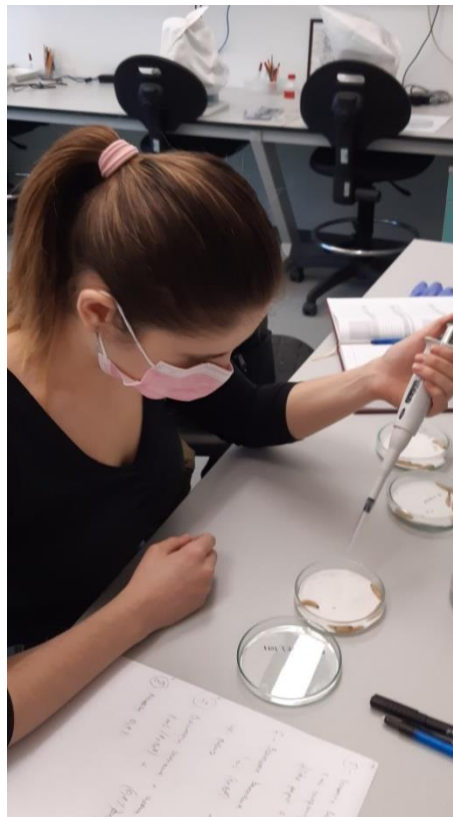
U centralnom laboratoriju za fitomedicinu Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek provedeni su pokusi u kojima je ispitan biopesticidni utjecaj entomopatogene gljive iz roda *Beauveria* i korisne bakterije *B. subtilis*. Proveden je pokus koji je uključivao pojedinačnu i kombiniranu primjenu *B. bassiana*, *B. pseudobassiana*, *B. subtilis* i *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* na ličinke velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.) (Lepidoptera: Pyralidae). *F. oxysporum f. sp. lycopersici* je patogena gljiva na biljkama, pa je korištena kao model za ispitivanje antifungalnog djelovanja testiranih organizama. Kao pozitivna kontrola korišten je komercijalni bioinsekticid, a za negativnu kontrolu destilirana voda. Posljednji stadiji ličinki velikog voskovog moljca, su prikupljeni iz populacije koja je uzgojena u centralnom laboratoriju za fitomedicinu Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Pokusi su provedeni od veljače do svibnja 2021. godine.

Tablica 1. Shema pokusa ispitivanja insekticidnog djelovanja bioagensa

| | Tretman | Koncentracija |
|-----|--|--|
| 1. | Kontrola | destilirana voda |
| 2. | Azadiraktin | 100% preporuč. |
| 3. | Azadiraktin | 0,1% preporuč. |
| 4. | <i>Bacillus subtilis</i> | 1×10^{13} |
| 5. | <i>Bacillus subtilis</i> + azadiraktin | 1×10^{13} + 0,1% preporuč. |
| 6. | <i>Beauveria bassiana</i> | 1×10^8 |
| 7. | <i>Beauveria bassiana</i> | 2×10^8 |
| 8. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> | 1×10^8 |
| 9. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> | 2×10^8 |
| 10. | <i>Beauveria bassiana</i> + azadiraktin | 1×10^8 + 0,1% preporuč. |
| 11. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> + <i>Bacillus subtilis</i> | $(1 \times 10^8) + (1 \times 10^{13})$ |
| 12. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> + <i>Bacillus subtilis</i> | $(2 \times 10^8) + (2 \times 10^{13})$ |
| 13. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> + <i>Fusarium lycopersicum</i> | $(1 \times 10^8) + (1 \times 10^7)$ |
| 14. | <i>Fusarium lycopersicum</i> | 1×10^7 |

U prvom pokusu korišteno je komercijalno sredstvo Naturalis® (Biogard, CBC Europe) koje sadrži entomopatogenu gljivu *B. bassiana*, komercijalno sredstvo Ekstrasol special (BioGenesis) koje sadrži korisnu bakteriju *B. subtilis* te bioinsekticid s djelatnom tvari azadiraktin (komercijalno sredstvo Ozoneem trishul, Ozone Biotech). Sredstva su razblažene do potrebne koncentracije prema uputama proizvođača. *B. pseudobassiana* je izolirana s hrastove mrežaste stjenice *Corythucha arcuate* (Spačva, Hrvatska) (Kovač i sur., 2020.).

Pokus je obavljen u laboratorijskim uvjetima (Slika 7.) u Petrijevim zdjelicama s 14 tretmana i 3 ponavljanja, a negativna kontrola provedena je s destiliranom vodom (Chergui i sur., 2020). U svaku Petrijevu zdjelicu postavljeno je 5 gusjenica velikog voskovog moljca. Pokus je proveden na sobnoj temperaturi, a sve Petrijeve zdjelice bile su posložene u kartonsku kutiju i držane u mraku.



Slika 7. Postavljanje pokusa i tretiranje gusjenica velikog voskovog moljca s bioagensima
(T. Jelić)

Foto: M. Varga, 2021.

Nakon tretmana praćena je vitalnost i mortalitet gusjenica velikog voskovog moljca kroz 24, 48, 72 i 96 sati nakon tretiranja. Gusjenice su pregledavane svakog dana, a pregled se vršio tako da se svaka gusjenica dodirnula s pincetom, kako bi se utvrdilo pomiče li se i je li živa. Ukoliko se gusjenica nije pomicala smatrana je uginulom, a na ostalim preživjelim gusjenicama provjereno je postoji li promjena u boji gusjenica, posebice između kolutića i na nogama, odnosno simptomi patologije radi primijenjenih tretmana.

Osim pokusa provedenog na ličinkama velikog voskovog moljca, u centralnom laboratoriju za fitomedicinu Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku proveden je drugi pokus u kojemu je ispitivano međudjelovanje entomopatogene gljive *B. bassiana* i fitopatogene gljive *F. oxysporum f. sp. lycopersici* prema Barra-Bucarei i sur. (2020). Hranjive podloge (PDA) razlivenne su u staklene Petrijeve zdjelice (ϕ 9cm) prema standardnim metodama te čuvane u hladnjaku na 4°C do upotrebe.



Slika 8. Postavljanje pokusa - antifungalno djelovanje *B. bassiana* (T. Jelić)

Foto: T. Siber, 2021.

Prije provedbe pokusa, obje gljive su uzgojene na hranjivim podlogama, nakon čega su pomoću sterilnog bušača rupa uzeti kružni isječki micelija *B. bassiana* i smješteni pincetom 1,5 cm od ruba Petrijeve zdjelice (Slika 8.). Nakon 2 dana, isječki micelija *F. oxysporum f. sp. lycopersici* smješteni su pincetom suprotno od *B. bassiana* i inkubirani u mraku na

temperaturi 25 °C 10 dana. Pokus je uključivao 2 tretmana i 8 ponavljanja po jednom tretmanu, a kontrolni tretman sadržavao je samo *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.

Nakon što je patogen kolonizirao cijelu Petrijevu zdjelicu, postotak radialne inhibicije rasta patogena (PRIRP) određen je formulom PRIRP: $[(R1 - R2)/R1] \times 100$ (1). Svaka Pretijeva zdjelica pregledana je jedanput dnevno, svakih 2 dana, a radijusi kolonija (R) su mjereni ukupno 3 puta pomoću ravnala.

Rezultati pokusa su obrađeni u statističkom programu SAS 9.3. Prije analize varijance (ANOVA), normalnost distribucije podataka je testirana metodom PROC UNIVARIATE. Utvrđeno je da je potrebno transformirati podatke (Kolmogorov Smirnov test), a to je učinjeno logaritmiranjem podataka mortaliteta ($\log(n+1)$). Nakon toga je učinjena analiza varijance (ANOVA), a razlike između srednjih vrijednosti tretmana su testirane s LSD testom ($P < 0,05$). U rezultatima su prikazane netransformirane vrijednosti.

4. REZULTATI

Tablica 2. prikazuje srednje vrijednosti mortaliteta gusjenica velikog voskovog moljca ovisno o vremenu pregleda po satima nakon tretmana. Prvi pregled gusjenica obavljen je već drugi dan nakon postavljanja pokusa.

Najveći mortalitet gusjenica ostvaren je nakon 24 h. Prvim pregledom nije utvrđen mortalitet gusjenica u negativnoj kontroli i tretmanima s nižom koncentracijom korisne bakterije *B. subtilis* te entomopatogenih gljiva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana*, dok je u tretmanima s višim koncentracijama utvrđen mortalitet gusjenica od 26,6 do 100%. Azadiraktin je djelovao 100% na sve gusjenica, u preporučenoj dozi, dok je u ultra niskoj koncentraciji od 0,1% uzrokovao smrtnost kod 40% gusjenica. U prvih 24 sata, statistički značajno nisu se razlikovali tretmani pozitivne kontrolole, *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* u dvostrukoj koncentraciji. Tretmani s *B. subtilis* i bioagensi u kombiniranoj primjeni su se statistički značajno razlikovali od ostalih tretmana.

Drugi dan nakon postavljanja pokusa utvrđen je 20% mortalitet gusjenica tretiranih s 0,1% azadiraktina. U odnosu na druge tretmane, ovaj tretman je bio statistički značajan.

Trećeg je dana mortalitet gusjenica tretiranih s nižom koncentracijom *B. bassiana*, te suspenzijom *B. pseudobassiana* i *B. subtilis* iznosio 6,66%. Ali, nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana.

Četvrti dan nakon postavljanja pokusa utvrđen je mortalitet 13,33% gusjenica velikog voskovog moljca tretiranih s 0,1% azadiraktina i 20% mortalitet gusjenica tretiranih sa suspenzijom niže koncentracije *B. pseudobassiana* i *B. subtilis*. Ova dva tretmana su se statistički značajno izdvojila u ovom mjerenju.

Tablica 2. Srednje vrijednosti mortaliteta gusjenica velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.) ovisno o vremenu nakon tretmana

| | Tretman | Mortalitet gusjenica (%) nakon tretmana | | | |
|-----|---|---|------|--------|-------------|
| | | 24h | 48h | 72h | 96h |
| 1. | Kontrola | 0 c | 0 b | 0 a | 0 b |
| 2. | Azadiraktin (100% preporuč. konc.) | 100 a | 0 b | 0 a | 0 b |
| 3. | Azadiraktin (0,1% preporuč. konc.) | 40 b | 20 a | 0 a | 13,33 ab |
| 4. | <i>Bacillus subtilis</i> (1×10^{13}) | 0 c | 0 b | 0 a | 0 b |
| 5. | <i>Bacillus subtilis</i> (1×10^{13}) + azadiraktin (preporuč. konc.) | 100 a | 0 b | 0 a | 0 b |
| 6. | <i>Beauveria bassiana</i> (1×10^8) | 0 c | 0 b | 6,66 a | 6,66 ab |
| 7. | <i>Beauveria bassiana</i> (2×10^8) | 100 a | 0 b | 0 a | 0 b |
| 8. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> (1×10^8) | 0 c | 0 b | 0 a | 6,66 ab |
| 9. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> (2×10^8) | 93,33 a | 0 b | 0 a | 0 b |
| 10. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> (1×10^8) + azadiraktin (0,1% preporuč. konc.) | 45 b | 0 b | 5 a | 0 b |
| 11. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> (1×10^8) + <i>Bacillus subtilis</i> (1×10^{13}) | 0 c | 0 b | 6,66 a | 20 a |
| 12. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> (2×10^8) + <i>Bacillus subtilis</i> (2×10^{13}) | 26,6 bc | 0 b | 0 a | 0 b |
| 13. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> (1×10^8) + <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (1×10^7) | 0 c | 0 b | 0 a | 0 b |
| 14. | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (1×10^7) | 0 c | 0 b | 0 a | 0 b |

Srednje vrijednosti mortaliteta u stupcima označene različitim slovima se statistički značajno razlikuju (LSD, $P < 0,05$)

Ukupni mortalitet gusjenica u kontrolnom tretmanu kao i tretmanima s korisnom bakterijom *B. subtilis*, gljivom *F. oxysporum f. sp. lycopersici* te suspenzijom *B. pseudobassiana* i *F. oxysporum f. sp. lycopersici* iznosio je 0%, dok se u ostalim tretmanima ukupni mortalitet gusjenica kretao od 13,32 do 100% (Tablica 3). *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* u dvostruko od preporučene koncentracije je jednako učinkovito djelovala kao i pozitivna kontrola (azadiraktin, 100% preporuč.), te se nisu statistički značajno razlikovali. Kombinirana primjena bioagensa statistički značajno se razlikuje od najučinkovitijih tretmana, ali i od negativne kontrole. *B. pseudobassiana* u kombinaciji s fitopatogenom gljivom nije uzrokovala mortalitet gusjenica kao ni fitopatogena gljiva i *B. subtilis* u pojedinačnoj primjeni.

Tablica 3. Srednje vrijednosti ukupnog mortaliteta gusjenica velikog voskovog moljca

| | Tretman | Ukupni mortalitet (%) |
|-----|--|------------------------------|
| 1. | Kontrola | 0 c |
| 2. | Azadiraktin (100% preporuč. konc.) | 100 a |
| 3. | Azadiraktin (0,1% preporuč. konc.) | 73,33 a |
| 4. | <i>Bacillus subtilis</i> ($1 \cdot 10^{13}$) | 0 c |
| 5. | <i>Bacillus subtilis</i> ($1 \cdot 10^{13}$) + azadiraktin (preporuč. konc.) | 100 a |
| 6. | <i>Beauveria bassiana</i> ($1 \cdot 10^8$) | 13,32 c |
| 7. | <i>Beauveria bassiana</i> ($2 \cdot 10^8$) | 100 a |
| 8. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> ($1 \cdot 10^8$) | 6,66 c |
| 9. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> ($2 \cdot 10^8$) | 93,33 a |
| 10. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> ($1 \cdot 10^8$) + azadiraktin (0,1% preporuč. konc.) | 50 b |
| 11. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> ($1 \cdot 10^8$) + <i>Bacillus subtilis</i> ($1 \cdot 10^{13}$) | 26,66 b |
| 12. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> ($2 \cdot 10^8$) + <i>Bacillus subtilis</i> ($2 \cdot 10^{13}$) | 26,66 b |
| 13. | <i>Beauveria pseudobassiana</i> ($1 \cdot 10^8$) + <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> ($1 \cdot 10^7$) | 0 c |
| 14. | <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> ($1 \cdot 10^7$) | 0 c |

Srednje vrijednosti mortaliteta u stupcima označena različitim slovima se statistički značajno razlikuju (LSD, $P < 0,05$)

U tablici 4. prikazano je praćenje zdravstvenog stanja gusjenica velikog voskovog moljca. Promjene su praćene 24, 48, 72 i 96 sati nakon tretiranja gusjenica. Prvim pregledom uočene su promjene na tijelu gusjenica. Takve promjene, uglavnom su se očitovale u vidu tamnosmeđih točki ili crta na tijelu gusjenica.

Primjerice, na tijelu gusjenica tretiranih s 100% azadiraktina pojavile su se smeđe točke. S druge strane, tijelo gusjenica tretiranih s 0,1% azadiraktina bilo je bez promjene boje, ali je mortalitet gusjenica već nakon 1 sat bio 100%. Također, gusjenice tretirane sa suspenzijom bakterije *B. subtilis* i 0,1% azadiraktina promijenile su boju u crnu od glave ka sredini tijela. Nadalje, gusjenice tretirane s nižom koncentracijom entomopatogenih gljiva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* imale su smeđe crte između kolutića što je upućivalo na prisutnost gljive kao i gusjenice tretirane suspenzijama *B. pseudobassiana* i azadiraktina, *B. subtilis* i *F. oxysporum f. sp. lycopersici* koje su na svome tijelu imale su tamnosmeđe crte između kolutića.

Tablica 4. Praćenje zdravstvenog stanja gusjenica, simptomatologija patoloških promjena i pojava micelija na gusjenicama velikog voskovog moljca 24, 48, 72 i 96 h nakon tretmana

| Tretman | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h |
|--|--|--|--|--|
| Kontrola | Bez promjene | Bez promjene | Bez promjene | Bez promjene |
| Azadiraktin (100% preporuč. konc.) | Smeđe točke na tijelu gusjenica | Smeđe točke na tijelu gusjenica | Smeđe točke na tijelu gusjenica | Smeđe točke na tijelu gusjenica |
| Azadiraktin (0,1% preporuč. konc.) | Bez promjene | Bez promjene | Bez promjene | Bez promjene |
| <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 ¹³) | Bez promjene | Bez promjene | Bez promjene | Bez promjene |
| <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 ¹³) + azadiraktin (preporuč. konc.) | Crna boja gusjenice od glave ka sredini tijela | Crna boja gusjenice od glave ka sredini tijela | Crna boja gusjenice od glave ka sredini tijela | Crna boja gusjenice od glave ka sredini tijela |

| | | | | |
|--|---|---|---|---|
| <i>Beauveria bassiana</i> (1x10 ⁸) | Smeđe crte na gusjenicama između kolutića | Smeđe crte na gusjenicama između kolutića | Smeđe crte na gusjenicama između kolutića | Smeđe crte na gusjenicama između kolutića |
| <i>Beauveria bassiana</i> (2x10 ⁸) | Bez promjene | Smeđe crte na gusjenicama između kolutića | Gusjenice tamnosmeđe boje i pojava micelija | Micelij bijele boje, gust, jasno vidljiv |
| <i>Beauveria pseudobassiana</i> (1x10 ⁸) | Smeđe crte na gusjenicama između kolutića | Smeđe crte na gusjenicama između kolutića | Smeđe crte na gusjenicama između kolutića | Smeđe crte na gusjenicama između kolutića |
| <i>Beauveria pseudobassiana</i> (2x10 ⁸) | Bez promjene | Gusjenice smeđe boje | Pojava micelija | Gusjenica u potpunosti prekrivena gustim, bijelim micelijem |

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| <i>Beauveria pseudobassiana</i> (1×10^8) + azadiraktin (0,1% preporuč. konc.) | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića |
| <i>Beauveria pseudobassiana</i> (1×10^8) + <i>Bacillus subtilis</i> (1×10^{13}) | Bez promjene | Bez promjene | Bez promjene | Bez promjene |
| <i>Beauveria pseudobassiana</i> (2×10^8) + <i>Bacillus subtilis</i> (2×10^{13}) | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića |
| <i>Beauveria pseudobassiana</i> (1×10^8) + <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> (1×10^7) | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića | Tamnosmeđe crte na gusjenicama između kolutića |
| <i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> (1×10^7) | Bez promjene | Bez promjene | Bez promjene | Bez promjene |

Drugim pregledom, uočene su promjene u vidu smeđih crta između kolutića gusjenica tretiranih s *B. bassiana*. Također, gusjenice tretirane s većom koncentracijom *B. pseudobassiana* bile su u potpunosti smeđe boje, dok su gusjenice tretirane sa suspenzijom *B. pseudobassiana* i *B. subtilis*, veće koncentracije, imale tamnosmeđe crte između kolutića. Gusjenice tretirane ostalim tretmanima bile su bez promjene.

Trećim pregledom gusjenica, u tretmanu s većom koncentracijom *B. bassiana* utvrđena je promjena boje gusjenice u smeđu i nastanak micelija. Mjestimični micelij na tijelu gusjenica bio je paučinst, bijele boje. Micelij se također pojavio i na gusjenicama tretiranim s većom koncentracijom *B. pseudobassiana*.

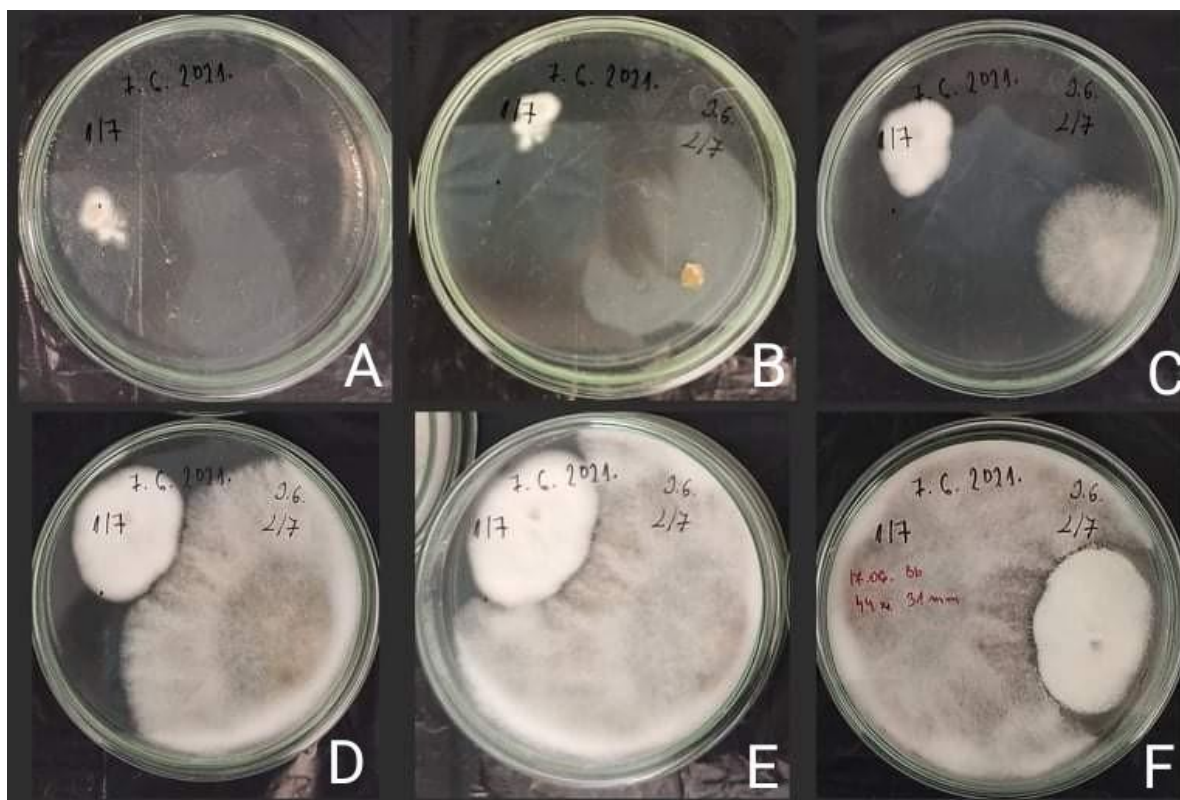


Slika 9. Pojava micelija *B. bassiana* i simptomi oboljenja na gusjenicama *G. mellonella* L.

Foto: Jelić, T. 2021.

Posljednjim pregledom gusjenica uočen je dobro razvijen, bijeli, gusti micelij na tijelu gusjenica (Slika 9.) tretiranih s većim koncentracijama *B. bassiana* i *B. pseudobassiana*, dok su ostale gusjenice bile bez promjena.

Drugim pokusom ispitana je interakcija *B. bassiana* i *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* na hranjivoj podlozi *in vitro* nakon 10 dana inkubacije na $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Slika 10.).



Slika 10. Interakcija *B. bassiana* i *F. lycopersici*. (A) *B. bassiana* na hranjivoj podlozi (B) *F. lycopersici* smeštena na hranjivu podlogu 2 dana nakon *B. bassiana* (C) Polumjeri *B. bassiana* i *F. lycopersici* podjednake veličine (D,E) Ubrzan rast i razvoj *F. lycopersici* (tretman 2) u odnosu na *B. bassiana* (tretman 1) (F) *B. bassiana* inhibira daljnji razvoj *F. lycopersici* pokazujući razliku u gustoći micelija

Foto: T. Jelić, 2021.

Tablica 5. prikazuje rezultate mjerenja postotka radijalne inhibicije rasta patogena (PRIRP) u pokusu broj dva. Rezultati su dobiveni na temelju formule PRIRP (%) : $[(R1 - R2) / R1] \times 100$ gdje je R1 radius rasta kontrolnog uzorka, odnosno *F. oxysporum f. sp. lycopersici* (cm), a R2 radius kolonije patogena (*F. oxysporum f. sp. lycopersici*) koja se natječe s *B. bassiana* (cm). Kontrolni uzorak fitopatogena je u prvom mjerenju popunio 35,56% Petrijeve zdjelice, 87,78% u drugom i 100% u trećem.

U tablici 5 prikazani su rezultati potencijalnog antifungalnog djelovanja *B. bassiana* na *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, odnosno postoci radijalne inhibicije rasta patogena (PRIRP) *F. oxysporum f. sp. lycopersici*.

Tablica 5. Srednje vrijednosti postotka radijalne inhibicije rasta patogena (PRIRP) *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* u interakciji s *Beauveria bassiana* ovisno o vremenu mjerenja nakon tretmana

| Tretman | PRIRP (%) ovisno o vremenu mjerenja | | |
|---|-------------------------------------|------|-------|
| | 1. | 2. | 3. |
| Kontrola (<i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>) | 0 | 0 | 0 |
| <i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i> + <i>B. bassiana</i> | 1,75 | 6,32 | 16,85 |

Prvo mjerenje polumjera *F. oxysporum f. sp. lycopersici* u tretmanu s *B. bassiana*, rezultiralo je radijalnom inhibicijom rasta patogena u postotku od 1,56 % izuzev drugog ponavljanja, u kojem je iznosio 3,12%.

Drugim mjerenjem polumjera *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, izračunat je postotak radijalne inhibicije rasta patogena u rasponu od 2,53 do 9,49%.

Trećim mjerenjem utvrđen je postotak radijale inhibicije patogena *F. oxysporum f. sp. lycopersici* u rasponu od 14,44 do 18,8 %.

Srednje vrijednosti postotka radijalne inhibicije rasta patogena *Fusarium oxysporum* u interakciji s *Beauveria bassiana* ovisno o vremenu mjerenja nakon tretmana kretale su se u rasponu od 1,75 do 16,85%.

Tablica 6. prikazuje antifungalno djelovanje *B. bassiana* na *F. oxysporum f. sp. lycopersici*. Izračunat je ukupni postotak radijalne inhibicije patogena iz sva 3 mjerenja, a rezultati pokazuju da entomopatogena gljiva *B. bassiana* inhibira rast patogena *F. oxysporum f. sp. lycopersici* od 20, 2 do 28,85 %. Ukupno antifungalno djelovanje *B. bassiana* na *F. oxysporum f. sp. lycopersici* iznosi 24, 80%.

Tablica 6. Antifungalno djelovanje *Beauveria bassiana* na *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

| Tretman | Ukupno PRIRP (%) |
|---|------------------|
| Kontrola (<i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i>) | 0 |
| <i>F. oxysporum f. sp. lycopersici</i> + <i>B. bassiana</i> | 24,80 |

PRIRP (%) - postotak radijalne inhibicije rasta patogena

5. RASPRAVA

Quesada – Moraga i sur. (2006.) u svom istraživanju su utvrdili da je djelovanje entomopatogenih gljiva *B. bassiana* u koncentraciji $3,1 \times 10^2$ konidija/ml i *Metarhizium anisopliae* u koncentraciji $4,6 \times 10^3$ konidija/ml, započelo 48 sati nakon inokulacije te su hife prodrle u kutikulu *G. mellonella* kroz traheje, epitelne i epidermalne stanice. Nakon 72 sata, oštećeno je masno tkivo, a mortalitet je iznosio 100% nakon 96 sati. U našem istraživanju, mortalitet ličinki tretiranih s koncentracijom entomopatogenih gljiva 1×10^8 , nakon 96 sati iznosio je 6,66, dok je primjena s duplom koncentracijom već nakon 24 sata rezultirala 100% mortalitetom gusjenica. Ovakav rezultat ukazuje na moguću rezistentnost ličinki velikog voskovog moljca na nižu koncentraciju *B. bassiana*, ali razlozi nisu utvrđeni.

U svom istraživanju, Hussein i sur. (2011.) ispitivali su patogenost *B. bassiana* i *M. anisopliae* na ličinkama velikog voskovog moljca. Utvrdili su da je kutikula gljivama tretirane ličinke postala tamna s crnim točkama zbog pretjerane melanizacije, što je ukazivalo na izravan napad gljive u obrambenom sustavu kukca. U ovom istraživanju 24 sata nakon tretiranja entomopatogenim gljivama između kolutića na kultikuli gusjenica bilo je moguće vidjeti tamnosmeđe crte što je ukazivalo na prisutnost *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* u tijelu gusjenica. Slični rezultati utvrđeni su i u ovom diplomskom radu.

Mohan i sur. (2009.) ispitivali su kompatibilnosti i sinergizam *B. bassiana* i bioinsekticida Neem. U svojem istraživanju utvrdili su da tretiranje kukaca s izolatom BB1 u kombinaciji s neemom nije rezultiralo pojačanim učinkom, a mortalitet ličinki je bio nešto niži u usporedbi s tretmanom koji je uključivao samo gljivu. U našem istraživanju primjena 0,1 azadiraktina na ličinke rezultirala je smrtnošću od 73,33%, dok je kombinirana primjena 0,1 azadiraktina i *B. pseudobassiana* rezultirala smrtnošću ličinki od 50% što nam govori da je gljiva smanjila djelotvornost bioinsekticida. Rezultati potvrđuju nalaze u gore navednoj studiji.

Pimentel de Barros i sur. (2019.) procijenili su korisne učinke *B. subtilis* i *B. atrophaeus* na ličinke velikog voskovog moljca zaražene s *Candida albicans*. Analizirali su osjetljivost *G. mellonella* na vegetativne i sporulativne oblike *Bacillus* spp. Stopa preživljavanja bila je povećana kod ličinki tretiranih s *B. subtilis* u usporedbi s kontrolnim ličinkama koje su bile zaražene s *C. albicans*. U ovom diplomskom radu, povećana koncentracija *B. pseudobassiana* znatno je povećala smrtnost ličinki, a ličinke tretirane kombinacijom *B.*

pseudobassiana i *B. subtilis* rezultirale su jednakim mortalitetom ličinki kao i kod dvostruke primjenjenje koncentracije gljiva. U kombinaciji bakterije i gljive odnosi koncentracija bez obzira na povećanje doze su jednako patogeni. U oba istraživanja *B. subtilis* je djelovao antagonistički na gljive.

Culebro-Ricaldi i sur. (2017.) istražili su postoji li antagonizam između *B. bassiana* i *F. oxysporum lycopersici* na rajčici (*Solanum lycopersicum L.*). Rezultati istraživanja pokazali su da je soj *B. bassiana* 1215 inhibirao rast *F. oxysporum f. sp. lycopersici* učinkovito, i to za 72%. U našem istraživanju, također je utvrđen antagonizam između *B. bassiana* i *F. oxysporum lycopersici*, ali u puno manjem postotku. Srednje vrijednosti radijalne inhibicije rasta patogena kretale su se od 20,2 do 28,85%, dok je prosjek ukupne srednje vrijednosti radijalne inhibicije rasta patogena iznosio 24,80%. Međutim, inhibitorno djelovanje ovisi o soju *B. bassiana* koji se u istraživanju koristi.

6. ZAKLJUČAK

- Dvostruka koncentracija entomopatogenih gljiva *B. bassiana* i *B. pseudobassiana* (u odnosu na preporučenu) pokazala je insekticidno djelovanje na ličinke velikog voskovog moljca kroz 24 sata nakon tretiranja.
- Bioinsekticid Neem uzrokuje 100% smrtnost ličinki kroz 24 sata od tretiranja.
- *B. pseudobassiana* u kombinaciji s azadiraktinom smanjuje smrtnost ličinki jer smanjuje njegov učinak.
- U kombinaciji *B. subtilis* i *B. pseudobassiana* odnosi koncentracija bez obzira na povećanje doze ubijaju jednako, shodno tome *B. subtilis* djeluje antagonistički na *B. pseudobassiana*.
- *B. subtilis* nema insekticidno djelovanje na ličinke velikog voskovog moljca, ali posjeduje antifungalna svojstva.
- *B. bassiana* osim insekticidnog djelovanja, antagonistički djeluje na *F. oxysporum f. sp. lycopersici*, ali ne znatno.

7. LITERATURA

1. Adane, K., Moore, D., Archer, S. A. (1996.): Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *Journal of Stored Products Research*, 32(2), 105–113.
2. Aeron, A., Kumar, S., Pandey, P., Maheshwari, D.K. (2011.): Emerging role of plant growth promoting rhizobacteria in agrobiolology. *Bacteria in Agrobiolology: Crop Ecosystems*. Springer, 1-36.
3. Allard-Massicotte, R., Tessier L., Lécuyer, F., Lakshmanan V., Lucier, J.F., Gameau, D., Caudwell, L., Vlamakis, H., Bais, H. P., Beauregarda, P. B.(2016.): *Bacillus subtilis* early colonization of *Arabidopsis thaliana* roots involves multiple chemotaxis receptors, *ASM Journals*, 7(6): e01664-16.
4. Bais, H. P. (2004.): Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant physiology*, 134(1), 307–319.
5. Barra-Bucarei, L., France Iglesias, A., Gerding González, M., Silva Aguayo, G., Carrasco-Fernández, J., Castro, J. F., Ortiz Campos, J. (2020). Antifungal activity of *Beauveria bassiana* endophyte against *Botrytis cinerea* in two solanaceae crops, *Microorganisms*, 8(1), 65.
6. Batta, Y. A. (2007.): Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdali* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1406–1414.
7. Beauregard, P. B., Chai, Y., Vlamakis, H., Losick, R., i Kolter, R. (2013.): *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), E1621–E1630.
8. Behie, S. W. i Bidocha, M. J. (2014.): Nutrient transfer in plant - fungal symbioses. *Trends in Plant Science*, 19(11): 734-740.
9. Bhattacharyya, P. N., i Jha, D. K. (2011.): Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350.
10. Chergui, S., Boudjemaa, K., Benzehra, A., Karaca, I. (2020.): Pathogenicity of indigenous *Beauveria bassiana* (Balsamo) against *Ceratitidis capitata* Wiedemann

- (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-7.
11. Collins, D. P. i Jacobsen, B. J. (2003.) Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control*, 26(2), 153–161.
 12. Culebro-Ricaldi, J.M., Valdiviezo - Ruiz, V.M, Rodríguez-Mendiola, M.A., Ávila-Miranda, M. E., Gutiérrez-Miceli, F.A., Cruz-Rodríguez, R.I, Dendoove, L., Montes-Molina, J.A. (2017.): Antifungal properties of *Beauveria bassiana* strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in tomato crop, Vol. 38(5): 821-827.
 13. De Barros, P. P., Rossoni, R. D., De Ribeiro, F. C., Silva, M. P., De Souza, C. M., Jorge, A. O. C., Junqueira, J. C. (2019.): Two sporulated *Bacillus* enhance immunity in *Galleria mellonella* protecting against *Candida albicans*. *Microbial Pathogenesis*, 132, 335–342
 14. Dembilio, Ó., Quesada-Moraga, E., Santiago-Álvarez, C., Jacas, J. A. (2010.): Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(3), 214–221.
 15. Fancelli, M., Dias, A. B., Delalibera Júnior, I., Cerqueira de Jesus, S., Souza do Nascimento, A., De Olivera e Silva, S., Caldas, C.R., Da Silva Ledo, C. A.(2013.): *Beauveria bassiana* strains for biological control of *cosmopolites sordidus* (Germ.) (Coleoptera: Curculionidae) in plantain. *BioMed research international*, 2013, 1–7.
 16. Faria, M. R. i Wraight, S. P. (2007.): Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological control*, 43(3), 237–256.
 17. Glick, B. R. (1995.): The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41(2): 109- 117
 18. Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30–39.
 19. Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Bose, P., Kumar, L. V., Ramadoss, D., i Annapurna, K. (2011.): ACC Deaminase containing PGPR for potential exploitation in agriculture. *Bacteria in Agrobiolology: Plant Nutrient Management*, 183–208.

20. Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., Venkateswarlu, B. (2010.): Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1231–1240.
21. Hashem, A., Tabassum, B., Fathi Abd_Allah, E. (2019.): *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6): 1291-1297
22. Holder, D.J. i Keyhani, N.O.(2005.): Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to Substrata. *American Society for Microbiology. Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 5260-5266.
23. Humber, R. A. (2008.): Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 262–266.
24. Hussein, K. A., Abdel-Rahman, M. A. A., Abdel-Mallek, A. Y., El-Maraghy, S. S., Joo, J. H. (2011.): Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella*. *Phytoparasitica*, 40(2), 117–126.
25. Ivezić, M. (2008.): *Entomologija*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek.
26. Jarber, R.L. i Ownley, B.H.(2017.): Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological control*. Elsevier, Volume 116, Pages 36-45
27. Jha, C. K., Patel, D., Rajendran, N., Saraf, M. (2010.): Combinatorial assessment on dominance and informative diversity of PGPR from rhizosphere of *Jatropha curcas* L. *Journal of Basic Microbiology*, 50(3), 211–217.
28. Kohler, J., Caravaca, F., Carrasco, L., Roldán, A. (2007.): Interactions between a plant growth-promoting rhizobacterium, an AM fungus and a phosphate-solubilising fungus in the rhizosphere of *Lactuca sativa*. *Applied Soil Ecology*, 35(3), 480–487.
29. Kovač, Marta, Michał Gorczak, Marta Wrzosek, Cezary Tkaczuk, Milan Pernek (2020): Identification of entomopathogenic fungi as naturally occurring enemies of the invasive oak lace bug, *Corythucha arcuata* (Say)(Hemiptera: Tingidae). *Insects* 11, no. 10 679.
30. Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M. S. (2015.): Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41.
31. Lewis, L. C., i Cossentine, J. E. (1986.): Season long intraplant epizootics of entomopathogens, *Beauveria bassiana* and *Nosema pyrausta*, in a corn agroecosystem. *Entomophaga*, 31(4), 363–369.

32. Litwin, A., Nowak, M., Różalska, S. (2020.): Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19, 23-42.
33. Nankinga, C. M. i Moore, D. (2000.): Reduction of Banana Weevil Populations Using Different Formulations of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 10(5), 645–657.
34. Mascarin, G. M. i Jaronski, S. T. (2016.): The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11).
35. Mohan, M. C., Reddy, N. P., Devi, U. K., Kongara, R., Sharma, H. C. (2007.): Growth and insect assays of *Beauveria bassiana* with neem to test their compatibility and synergism. *Biocontrol Science and Technology*, 17(10), 1059–1069.
36. Moyne, A.-L., Shelby, R., Cleveland, T. E., Tuzun, S. (2001.): Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 622–629.
37. Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., Keyhani, N. O. (2014.): Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1057–1068.
38. Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., Santiago-Álvarez, C. (2006.): Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against Puparia and Adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(6), 1955–1966.
39. Ramanaidu, K. i Cutler, G. C. (2012.): Different toxic and hormetic responses of *Bombus impatiens* to *Beauveria bassiana*, *Bacillus subtilis* and *spirotetramat*. *Pest Management Science*, 69(8), 949–954.
40. Ramos Solano, B., Barriuso Maicas, J., Pereyra de la Iglesia, M. T., Domenech, J., Gutiérrez Mañero, F. J. (2008.): Systemic Disease Protection Elicited by Plant Growth Promoting Rhizobacteria Strains: Relationship Between Metabolic Responses, Systemic Disease Protection, and Biotic Elicitors. *Phytopathology*, 98(4), 451–457.
41. Rasmussen, S., Nielsen, H. B., Jarmer, H. (2009.): The transcriptionally active regions in the genome of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 73(6), 1043–1057.
42. Ruiu, L. (2015.): Insect pathogenic bacteria in Integrated Pest Management. *Insects*, 6(2), 352–367.
43. Siddikee, M. A., Chauhan, P.S., Anandham, R., Gwang-Hyun, H., Tongmin, S. (2010.): Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC

- deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(11): 1577–1584.
44. Skinner, M., Parker, B. L., Kim, J. S. (2014.): Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management. *Integrated Pest Management*, 169–191.
 45. Sung, G. H., Spatafora, J.W., Zare, R., Hodge, K.T. (2001.): A revision of *Verticillium* sect *Prostrata* II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and telemorphs of the Clavicipitaceae. *Nova Hedwigia*, 72: 311-328.
 46. Trevijano-Contador, N., i Zaragoza, O. (2018.): Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. *Journal of Fungi*, 5(1), 3.
 47. Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Nasrulhaq Boyce, A. (2016.): Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*, 21(5), 573.
 48. Vertyporokh, L. i Wojda, I. (2017.): Expression of the insect metalloproteinase inhibitor IMPI in the fat body of *Galleria mellonella* exposed to infection with *Beauveria bassiana*. *The Journal of the Polish Biochemical Society and of the Polish Academy of Sciences*, 64(2):273-278.
 49. Vessey, J. K. (2003.): Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, 255(2), 571–586.
 50. Viaud, M., Fillinger, S., Liu, W., Polepalli, J. S., Le Pêcheur, P., Kunduru, A. R., Leroux, P., Legendre, L. (2006.): Class III Histidine Kinase Acts as a Novel Virulence Factor in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(9), 1042–1050.
 51. Vilcinskas, A. i Wedde, M. (2002.): Insect Inhibitors of Metalloproteinases. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 54(6), 339–343.
 52. Zhang, X., Wu, S., Reitz, S. R., Gao, Y. (2020.): Simultaneous application of entomopathogenic *Beauveria bassiana* granules and predatory mites *Stratiolaelaps scimitus* for control of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Pest Science*. Springer.
 53. Wedde, M., Weise, C., Nuck, R., Altincicek, B., Vilcinskas, A. (2007.): The insect metalloproteinase inhibitor gene of the lepidopteran *Galleria mellonella* encodes two distinct inhibitors. *Biological Chemistry*, 388(1).

Jedinice s interneta:

54. FAO (2009.): A third more mouths to feed. [FAO - News Article: 2050: A third more mouths to feed](#) (Datum pristupa: 11.9. 2021.)
55. Wang, H. (2003.): Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation (Dissertation). University of Heidelberg, Germany.
http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/3255/1/Hong_WAN-Dissertation.pdf
(Datum pristupa: 11.9. 2021.)

8. SAŽETAK

Sintetički kemijski pesticidi već godinama predstavljaju glavni način suzbijanja štetnika i patogena. Međutim, zbog njihovog štetnog utjecaja na zdravlje ljudi i okoliš, suvremena poljoprivredna proizvodnja zahtjeva primjenu ekološki prihvatljivih metoda suzbijanja kojima pripadaju entomopatogene gljive i korisne bakterije. Cilj ovog rada je utvrditi insekticidnu i antifungalnu učinkovitost pojedinačne i kombinirane primjene entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* i korisne bakterije *Bacillus subtilis*. Istraživanje je provedeno u laboratorijskim uvjetima, a svakih 24, 48, 72 i 96 sati od inkubacije, praćen je utjecaj ovih mikroorganizama na ličinke velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella*). Tretmani za ispitivanje insekticidnog djelovanja bioagensa su postavljeni s preporučenom ($1 \cdot 10^8$) i dvostrukom koncentracijom ($2 \cdot 10^8$) *B. bassiana* i *B. pseudobassiana*, te preporučenom koncentracijom ($1 \cdot 10^{13}$) *B. subtilis*. U laboratorijskim uvjetima također je utvrđen postotak radijalne inhibicije rasta fitopatogena (PRIRP) *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* u interakciji s *B. bassiana*. Dvostruka koncentracija *B. bassiana* pokazala je 100% insekticidno djelovanje 24 sata nakon primjene, dok za *B. subtilis* nije utvrđeno insekticidno djelovanje. *B. subtilis* u kombiniranoj primjeni s azadiraktinom izaziva 100% mortalitet ličinki voskovog moljca, jednako kao i pojedinačna primjena azadiraktina. Ovim istraživanjem potvrđeno je insekticidno i antifungalno djelovanje *B. bassiana*, ali se preporučuju dodatna laboratorijska istraživanja s različitim sojevima *B. bassiana* kao i drugim vrstama fitopatogenih gljiva te različite vrste štetnika kako bi se potvrdili ovi rezultati.

Ključne riječi: bioagensi, patogenost, *G. mellonella*, inhibicija, *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

9. SUMMARY

Synthetic chemical pesticides are used as main tool in pest managements programs. However, due to their negative impact on human health and the environment, modern agricultural production requires the application of environmentally friendly control methods, which include entomopathogenic fungi and beneficial bacteria. The aim of this study was to determine the insecticidal and antifungal efficacy of bioagens in single and combined application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and the beneficial bacterium *Bacillus subtilis*. The study was conducted under laboratory conditions, and every 24, 48, 72, and 96 hours after incubation, the influence of these microorganisms on the larvae of the large wax moth (*Galleria mellonella*) was monitored. Treatments to test the insecticidal activity of the bioagent were set with the recommended (1×10^8) and double concentration (2×10^8) of *B. bassiana* and *B. pseudobassiana*, and the recommended concentration (1×10^{13}) of *B. subtilis*. The percentage of radial growth inhibition of the phytopathogen (PRIRP) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by *B. bassiana* was also determined under laboratory conditions. Double the concentration of *B. bassiana* showed 100% insecticidal activity 24 hours after application, while for *B. subtilis* no insecticidal activity was found. *B. subtilis* in combination with azadiractin causes 100% mortality of wax moth larvae, as well as solely azadiractin treatments. This study confirmed the insecticidal and antifungal activity of *B. bassiana*, but additional laboratory studies with different strains of *B. bassiana* as well as other species of phytopathogenic fungi and different types of pests are recommended to confirm these results.

Key words: bioagent, pathogenicity, *G. mellonella*, inhibition, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

POPIS TABLICA

Tablica 1. Shema prvog pokusa ispitivanja insekticidnog djelovanja bioagensa

Tablica 2. Srednje vrijednosti mortaliteta gusjenica velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella*) ovisno o vremenu nakon tretmana

Tablica 3. Srednje vrijednosti ukupnog mortaliteta gusjenica velikog voskovog moljca

Tablica 4. Praćenje zdravstvenog stanja gusjenica, simptomatologija patoloških promjena i pojava micelija na gusjenicama velikog voskovog moljca 24, 48, 72 i 96 h nakon tretmana

Tablica 5. Srednje vrijednosti postotka radijalne inhibicije rasta patogena *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (PRIRP).

Tablica 6. Antifungalno djelovanje *Beauveria bassiana* na *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*

POPIS SLIKA

Slika 1. *Beauveria bassiana*

Slika 2. Glavne morfološke strukture gljive *B. bassiana*

Slika 3. Proces zaraze s *B. bassiana*

Slika 4. *Bacillus subtilis*

Slika 5. Stvaranje biofilma *B. subtilis* na korijenu

Slika 6. Mehanizmi djelovanja *B. subtilis* u uvjetima biotičkog stresa

Slika 7. Postavljanje pokusa i tretiranje gusjenica velikog voskovog moljca s bioagensima

Slika 8. Postavljanje pokusa – antifungalno djelovanje *B. bassiana*

Slika 9. Pojava micelija *B. bassiana* i simptomi oboljenja na gusjenicama *G. mellonella* L.

Slika 10. Interakcija *B. bassiana* i *F. lycopersici*

Insekticidno i antifungano djelovanje entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* i korisne bakterije *Bacillus subtilis*

Tena Jelić

Sažetak: Sintetički kemijski pesticidi već godinama predstavljaju glavni način suzbijanja štetnika i patogena. Međutim, zbog njihovog štetnog utjecaja na zdravlje ljudi i okoliš, suvremena poljoprivredna proizvodnja zahtjeva primjenu ekološki prihvatljivih metoda suzbijanja kojima pripadaju entomopatogene gljive i korisne bakterije. Cilj ovog rada je utvrditi insekticidnu i antifungalnu učinkovitost pojedinačne i kombinirane primjene entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* i korisne bakterije *Bacillus subtilis*. Istraživanje je provedeno u laboratorijskim uvjetima, a svakih 24, 48, 72 i 96 sati od inkubacije, praćen je utjecaj ovih mikroorganizama na ličinke velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella*). Tretmani za ispitivanje insekticidnog djelovanja bioagensa su postavljeni s preporučenom ($1 \cdot 10^8$) i dvostrukom koncentracijom ($2 \cdot 10^8$) *B. bassiana* i *B. pseudobassiana*, te preporučenom koncentracijom ($1 \cdot 10^{13}$) *B. subtilis*. U laboratorijskim uvjetima također je utvrđen postotak radialne inhibicije rasta fitopatogena (PRIRP) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* u interakciji s *B. bassiana*. Dvostruka koncentracija *B. bassiana* pokazala je 100% insekticidno djelovanje 24 sata nakon primjene, dok za *B. subtilis* nije utvrđeno insekticidno djelovanje. *B. subtilis* u kombiniranoj primjeni s azadiraktinom izaziva 100% mortalitet ličinki voskovog moljca, jednako kao i pojedinačna primjena azadiraktina. Ovim istraživanjem potvrđeno je insekticidno i antifungalno djelovanje *B. bassiana*, ali se preporučuju dodatna laboratorijska istraživanja s različitim sojevima *B. bassiana* kao i drugim vrstama fitopatogenih gljiva te različitim vrste štetnika kako bi se potvrdili ovi rezultati.

Rad je izrađen pri: Fakultet za grobrotehničkih znanosti Osijek**Mentor:** prof.dr.sc. Ivana Majić

Broj stranica: 39

Broj slika: 10

Broj tablica: 6

Broj literaturnih navoda: 55

Broj priloga: 1

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *bioagensi, patogenost, G. mellonella, inhibicija, Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***Datum obrane:** 28.9.2021.**Stručno povjerenstvo:**

1. prof. dr. sc. Jasenka Ćosić, predsjednik
2. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor
3. izv.prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta za grobrotehničkih znanosti Osijek, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

University Graduate Study Plant production, course: Plant protection

Insecticidal and antifungal activity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and beneficial bacterium *Bacillus subtilis*

Tena Jelić

Summary: Synthetic chemical pesticides are used as a main tool in pest management programs. However, due to their negative impact on human health and the environment, modern agricultural production requires the application of environmentally friendly control methods, which include entomopathogenic fungi and beneficial bacteria. The aim of this study was to determine the insecticidal and antifungal efficacy of bioagents in single and combined application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and the beneficial bacterium *Bacillus subtilis*. The study was conducted under laboratory conditions, and every 24, 48, 72, and 96 hours after incubation, the influence of these microorganisms on the larvae of the large wax moth (*Galleria mellonella*) was monitored. Treatments to test the insecticidal activity of the bioagent were set with the recommended (1×10^8) and double concentration (2×10^8) of *B. bassiana* and *B. pseudobassiana*, and the recommended concentration (1×10^{13}) of *B. subtilis*. The percentage of radial growth inhibition of the phytopathogen (PRIRP) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by *B. bassiana* was also determined under laboratory conditions. Double the concentration of *B. bassiana* showed 100% insecticidal activity 24 hours after application, while for *B. subtilis* no insecticidal activity was found. *B. subtilis* in combination with azadiractin causes 100% mortality of wax moth larvae, as well as solely azadiractin treatments. This study confirmed the insecticidal and antifungal activity of *B. bassiana*, but additional laboratory studies with different strains of *B. bassiana* as well as other species of phytopathogenic fungi and different types of pests are recommended to confirm these results.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek

Mentor: Ivana Majić

Number of pages: 39

Number of figures: 10

Number of tables: 6

Number of references: 55

Number of appendices: 1

Original in: Croatian

Key words: bioagents, pathogenicity, *G. mellonella*, inhibition, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Thesis defended on date: 28th September 2021

Reviewers:

1. Dr Jasenka Čosić, full professor, chair
2. Dr Ivana Majić, full professor, mentor
3. Dr Gabriella Kanižai Šarić, associate professor, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek