

# Gusjenice velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.) kao mamac za izolaciju entomopatogenih

---

Petrović, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

*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:151:169193>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-25**



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

Nikolina Petrović

Sveučilišni prijediplomski studij Poljoprivreda

Modul: Bilinogojstvo

**Gusjenice velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.) kao  
mamac za izolaciju entomopatogenih nematoda i gljiva**

Završni rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Nikolina Petrović

Sveučilišni prijediplomski studij Poljoprivreda

Modul: Bilinogojstvo

**Gusjenice velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.) kao  
mamac za izolaciju entomopatogenih nematoda i gljiva**

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. Prof.dr.sc. Ivana Majić, mentor
2. Izv.prof.dr.sc. Ankica Sarajlić, član
3. Prof.dr.sc. Gabriella Kanižai Šarić, član

Osijek, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek  
Sveučilišni prijediplomski studij Poljoprivreda, modul Bilinogojstvo  
Nikolina Petrović

Završni rad

### **Gusjenice velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.) kao mamac za izolaciju entomopatogenih nematoda i gljiva**

#### **Sažetak:**

Veliki voskov moljac (*Galleria mellonella* L.) često je korištena vrsta u raznim vrstama istraživanja, s obzirom da je ova vrsta odličan model za ispitivanje virulentnosti patogenih organizama. Cilj rada je utvrditi prisutnost prirodnih populacija entomopatogenih nematoda i gljiva u tlima u mediteranskom dijelu Republike Hrvatske pomoću gusjenica velikog voskovog moljca kao mamaca. Uzorci tla su prikupljeni 2023. godine s područja Istre, Primorja, Kvarnera i Dalmacije. Nakon postavljanja pokusa, tijekom deset dana, svaki drugi dan su praćene patomorfološke promjene na kutikuli kukaca, te je utvrđen mortalitet gusjenica. Istraživanje je provedeno u laboratorijskim uvjetima, u mraku, na sobnoj temperaturi. Utvrđena je niska zastupljenost entomopatogena u uzorcima tla. Na većini gusjenica zamjećene su patomorfološke promjene. U uzorku tla iz Srinjine, na uginuloj gusjenici se razvio bijeli micelij entomopatogene gljiva *Beauveria bassiana*, dok na ostalim lokalitetima nije izdvojen niti jedan entomopatogeni organizam.

**Ključne riječi:** Istra, Primorje, Kvarner, Dalmacija, entomopatogena gljiva, *Beauveria bassiana*

25 stranice, 6 tablica, 10 slika, 43 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih radova i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek  
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek  
Undergraduate university study Agriculture, course Plant production  
Nikolina Petrović

BSc Thesis

### **Isolation of entomopathogenic nematodes and fungi from soil using *Galleria mellonella* L. for insect bait method**

#### **Summary:**

The large wax moth larva (*Galleria mellonella* L.) is frequently used species in various types of research, considering that this species is an excellent model for testing the virulence of pathogenic organisms. The aim of the work is to determine the presence of natural populations of entomopathogenic nematodes and fungi in soils in the Mediterranean part of the Republic of Croatia using larvae of the large wax moth as bait. Soil samples were collected in 2023. From areas of Istria, Croatian Littoral, Kvarner and Dalmatia. After setting up the experiment pathomorphological changes on the cuticle of the insects were monitored for ten days, every other day, and the mortality of the caterpillars was determined. The research was conducted in laboratory conditions, in the dark, at room temperature. A low prevalence of entomopathogens in soil samples was determined. Pathomorphological changes were observed on most of the caterpillars. In the soil sample from Srinjina, white mycelium of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* developed on the dead caterpillar, while not a single entomopathogenic organism was isolated in the other localities.

**Keywords:** Istria, Croatian Littoral, Kvarner, Dalmatia, entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*

25 pages, 6 tables, 10 pictures, 43 references

BSc thesis is archived in: Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Entomopatogeni organizmi .....	2
1.2. Entomopatogene nematode .....	2
1.3. Entomopatogene gljive .....	4
1.4. Entomopatogene bakterije .....	6
1.5. Entomopatogeni virusi .....	7
1.6. Entomopatogeni organizmi u Republici Hrvatskoj.....	8
2. MATERIJALI I METODE .....	10
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	15
4. ZAKLJUČAK .....	21
5. POPIS LITERATURE.....	22

## 1. UVOD

Kukci u poljoprivredi mogu biti štetni i korisni ovisno o kojim vrstama kukaca je riječ. Korisni kukci su prirodni neprijatelji poljoprivrednih štetnika, doprinose razgradnji organske tvari, oprašuju biljke i imaju značajnu ulogu u očuvanju ekosustava i dr.

Korištenje kemijskih insekticida preventivno i kurativno ključno je za zaštitu usjeva jer pružaju brzu i vidljivu učinkovitost u suzbijanju štetnika. S druge strane kemijski insekticidi su opasni jer se ispiru u podzemne vode, mogu naštetiti korisnim kukcima i životinjama, a mogu naštetiti i ljudima u slučaju konzumiranja hrane s ostacima pesticida. Loš utjecaj kemijskih insekticida na okoliš, ljude i životinje je pokrenuo pojavu i razvijanje integrirane zaštite bilja. Integrirana zaštita bilja (IPM – *Integrated Pest Management*) kombinira različite metode zaštite bilja i obrade tla kako bi se što je više moguće smanjila upotreba kemijskih sredstava. Glavni cilj upotrebe integrirane zaštite bilja u poljoprivredi je održavanje štetnika ispod ekonomski štetnog praga, a da se pritom koriste prirodni neprijatelji štetnika, biološki preparati, mehaničke metode, a tek kao posljednje sredstvo selektivni kemijski preparati. Zbog toksičnosti kemijskih insekticida i sposobnosti kukaca da razviju rezistentnost, javlja se problem nedostatka učinkovitosti sredstava za zaštitu bilja koja pritom ne ugrožavaju okoliš i zdravlje ljudi.

Uvođenjem Zakona o održivoj uporabi pesticida pokušava se kontrolirati način i količina korištenja. Poljoprivrednici koji koriste pesticide u profesionalne svrhe moraju ispuniti određene uvijete, uključujući obaveznu izobrazbu, vođenje detaljne evidencije o korištenju pesticida i korištenje elektroničke vjerodajnice. Glavni je cilj Zakona očuvanje bioraznolikosti te zaštita zdravlja životinja i ljudi. Također teži smanjiti rizike od negativnih učinaka uporabe pesticida i potaknuti korištenje alternativnih i nekemijskih mjera zaštite bilja za suzbijanje štetnih organizama.

Kako je već navedeno zbog zaštite okoliša, ljudi i životinja, životne sredine dolazi do potrebe za razvojem bioloških insekticida. Biološki insekticidi spadaju u grupu nekemijskih metoda, te se koriste za suzbijanje štetnih organizama. Borba protiv štetnih kukaca uz pomoć bioloških mjera zaštite biljaka temelji se na korištenju prirodnih neprijatelja, beskrležnjaka i mikroorganizama (Forić i sur., 2018.).

Cilj je ovoga rada je utvrditi prisutnost prirodnih populacija entomopatogenih nematoda i gljiva u tlima u mediteranskom dijelu Republike Hrvatske.

## 1.1. Entomopatogeni organizmi

Entomopatogeni organizmi imaju važnu ulogu u biološkoj kontroli štetnih kukaca. Entomopatogeni organizmi su nematode, gljive, bakterije i virusi. Ovi organizmi imaju ključnu ulogu u održavanju ekološke ravnoteže u prirodnim i poljoprivrednim sustavima. U Hrvatskoj je prisutan velik broj entomopatogenih organizama od kojih su neki istraženi i zabilježeni u prethodno objavljenim znanstvenim radovima te završnim i diplomskim radovima (Majić i sur., 2018.; Majić i sur., 2018.; Majić i sur., 2029.; Matek i sur, 2021.; Kovač i sur, 2020.; Kovač i sur., 2021.; Kovač i sur., 2021.; Kelemen i sur., 2019.; Barić i Pajač Živković, 2020.; Forić i sur, 2018.). Znanstvena istraživanja provodila su se u različitim dijelovima Hrvatske u poljoprivrednim i šumskim ekosustavima, a identificirane vrste pružaju temelj za daljnje istraživanje i primjenu ovih organizama u biološkom suzbijanju poljoprivrednih štetnika. Neki od najvažnijih i najraširenijih entomopatogenih organizama jesu: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, virus poliedrije, virus granuloze, *Bacillus thuringiensis* i mnogi drugi (Majetić i sur., 2017.).

## 1.2. Entomopatogene nematode

Najčešća korištena dva roda entomopatogenih nematoda su *Stenernema* (Slika 1.) i *Heterorhabditis* (Slika 2.). Žive u tlu i aktivno traže domaćine koje inficiraju bakterijama iz rodova *Xenorhabdus* (simbioza s nematodama roda *Steinernema*) i *Photorhabdus* (simbioza s nematodama roda *Heterorhabditis*). Navedene bakterije i nematode žive u simbiozi, pri čemu nematode bakterijama omogućuju pristup unutrašnjosti kukaca, a bakterije nematodama omogućuju hranjive tvari za rasti i razvoj unutar kukca (Nježić, 2016).

U tijelo kukca nematode ulaze direktno kroz kutikulu ili kroz prirodne otvore (usta, anus i spirakule). Ulaskom entomopatogene nematode u tijelo domaćina počinju se oslobađati simbiotske bakterije koje uzrokuju smrt kukca uzrokujući septikemiju (Majić i sur., 2018.). Nakon što dođe do smrti domaćina, nematode se razmnožavaju u uginulom kukcu. Nove generacije nematoda, najčešće ličinke trećeg stadija, koje se nazivaju infektivne ličinke, izlaze iz uginulog kukca u okolno tlo u potrazi za novim domaćinom kukcem.

Istraživanjem u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, nematode su pokazale vrlo visoku učinkovitost, ali na žalost u poljskim uvjetima njihova učinkovitost može biti smanjena zbog utjecaja okolišnih faktora kao što su vlaga i temperatura (Nježić, 2016.). Na tržištu su dostupne komercijalne formulacije entomopatogenih nematoda koje se mogu koristiti za

suzbijanje raznih vrsta štetnika, kao na primjer klisnjaka u povrću. Također, entomopatogene nematode se mogu kombinirati s određenim kemijskim pesticidima, ali pri tome je važno odabrati ona kemijska sredstva koja neće imati negativan učinak na nematode. Entomopatogene nematode su otporne na veliki broj kemijskih pesticida (Vale, 2019., Laznik i sur, 2017) .

Imaju minimalan utjecaj na neciljane organizme što ih čini ekološki prihvatljivim izborom za suzbijanje štetnika. Smatraju se sigurnim sredstvom za korisne organizme, ljude i životinje. Također, doprinose poboljšanju tla povećavajući mikrobiološku aktivnost i plodnost, čime potiču održivu poljoprivredu i dugoročnu produktivnost tla (Nježić, 2016.). Prednost korištenja entomopatogenih nematoda u sredstvima za zaštitu bilja je njihova jednostavna primjena. Osim toga, u većini zemalja sredstva koja sadrže entomopatogene nematode ne zahtijevaju registraciju, što olakšava njihovu upotrebu u poljoprivredi.



Slika 1. Entomopatogena nematoda iz roda *Steinernema*

(Izvor: <https://www.evergreengrowers.com/millennium-group-carpo.html> )





Slika 2. Entomopatogena nematoda iz roda *Heterorhabditis*

(Izvor: <https://www.biopol.nl/heterorhabditis-bacteriophora-en> )

### 1.3. Entomopatogene gljive

Uz entomopatogene bakterije, entomopatogene gljive najčešće su korišteni mikroorganizmi za biološko suzbijanje štetnih kukaca (Šimić i Bažok, 2019.). Neke od najvažnijih vrsta entomopatogenih gljiva za poljoprivrednu proizvodnju pripadaju rodovima: *Beauveria*, *Verticillium*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* i *Hirsutella*.

Entomopatogene gljive u prirodi javljaju se u obliku spora, a kukci se mogu zaraziti dolazeći u kontakt s njima na različitim podlogama, poput površine biljaka, tla, zraka, ili čak tijela uginulih insekata. Infektivne spore gljiva zaraze kukca ulazeći u njegovo tijelo kroz kutikulu. Entomopatogene gljive nastanjuju se unutar tijela kukca kako bi si osigurale hranjive tvari neophodne za svoj rast, razvoj i razmnožavanje, koristeći pritom tlak i enzimske procese za razgradnju tkiva.

Često entomopatogene gljive proizvode i toksine koji ubrzavaju uginuće kukca, a nakon smrti kukca iz njegovog skeleta izraste entomopatogena gljiva. (Omkar, 2016.) (Slika 3.).



Slika 3. Bijeli micelij *Beauveria bassiana* razvijen na uginulom kukcu

(Izvor: Petrović, N., 2023.)

Za razvoj entomopatogenih gljiva ključne su optimalne temperature, koje variraju ovisno o vrsti gljive, kao i visoka vlažnost zraka. Osim toga, važni faktori uključuju pH vrijednost tla, vlažnost tla te postotak i sastav organskih tvari u tlu. Tijekom evolucije, entomopatogene gljive su razvile specijalizirane mehanizme biokemijske razgradnje kukaca, stoga razlikujemo tri tipa entomopatogenih gljiva ovisno o načinu ishrane. Postoje entomopatogene gljive koje isključivo uzimaju hranjive tvari iz živih stanica poznate kao biotrofi, zatim gljive koje se hrane samo tkivima uginulih kukaca nazivamo nektrofi, a entomopatogene gljive koje se hrane i iz živih stanica i sa uginulih kukaca nazivamo ih hemibiotrofi.

Entomopatogene gljive izuzetno su važne za proizvodnju bioloških sredstava za suzbijanje štetnika jer ih je lako proizvesti u velikim količinama, a i cijena proizvodnje je ekonomski isplativa.

Danas su komercijalne formulacije s raznim vrstama entomopatogenih gljiva dostupne poljoprivrednicima gotovo u cijelom svijetu. Industrijska proizvodnja bioloških insekticida

s entomopatogenim gljivama koristi biljne materijale kao medij. Primjerice, proso se koristi kao medij zbog svoje sposobnosti pružanja hranjive tvari gljivama u tlu, čak i kada nema prisutnih domaćina za gljivu (Gouli i sur., 2008.). Dokazano je da supstrat na kojem je uzgajana gljiva može utjecati na temperaturnu toleranciju konidija. U proizvodnji entomopatogenih gljiva, najčešće se koristi formulacija močivo prašivo (WP).

Biološke insekticide na bazi entomopatogenih gljiva moguće je miješati s kemijskim insekticidima, no važno je osigurati da kemijski insekticid ne šteti gljivama i da pH vrijednost smjese bude u skladu s zahtjevima specifičnim za vrstu entomopatogene gljive prisutne u preparatu. (de Prado Ribeiro i sur., 2023.)

#### **1.4. Entomopatogene bakterije**

Bakterijska mikroflora kukaca je vezana za njihov probavni sustav i bogata je različitim vrstama bakterija, iako samo nekoliko njih ima patogeni učinak na kukca domaćina. Bakterije u probavnom sustavu kukaca nisu u potpunosti istražene, najveći naglasak stavlja se na njihov potencijal za suzbijanje poljoprivrednih štetočina i prijenosnika bolesti.

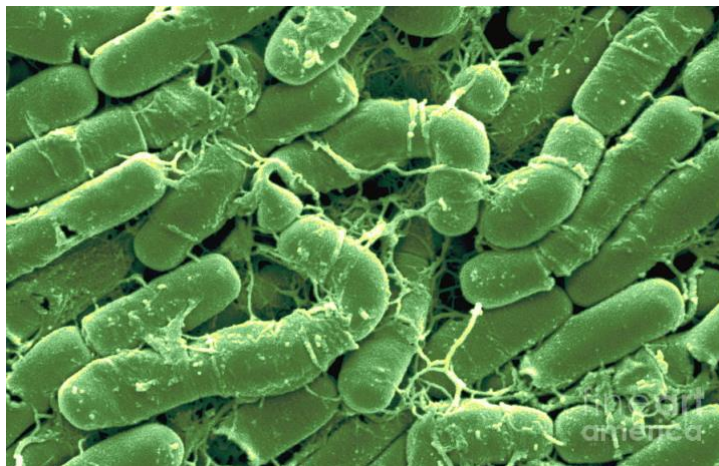
Entomopatogene bakterije ulaze u tijelo kukca kroz rane na ekzoskeletu ili, češće, kroz peritrofičnu membranu crijeva. Neke gram-negativne bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* prepoznate su kao patogeni za kukce. Vrsta *Serratia* je najčešće povezana s bolestima kukaca, a *Serratia entomophila* se na Novom Zelandu koristila za kontroliranje *Costelytra zealandica* (Grimont i Grimont, 2006.).

Premda se gram-negativne bakterije mogu koristiti za kontrolu štetnih kukaca pokazalo se da su gram pozitivne bakterije učinkovitije. Među ovim bakterijama, patogenost se gotovo uvijek javlja kod onih koje formiraju endospore. To uključuje bakterije iz rodova *Bacillus* i *Clostridium*.

Entomopatogene bakterije, za razliku od tradicionalnih pesticida, usmjereni su na područja gdje je veća vjerojatnost pojave rezistentnih kukaca (Ruiu, 2015.). Iako entomopatogene bakterije mogu biti učinkovite same po sebi u kontroli štetnika, postižu bolji učinak korištenjem u kombinaciji s insekticidima.

Preparati za biološku kontrolu koji sadrže entomopatogene bakterije smatraju se sigurnijima za rukovanje i ljudsko zdravlje u usporedbi s kemijskim pesticidima. Najveća količina bakterijskih insekticida proizvode se na bazi *Bacillus thuringensis* (Slika 4.). Preparati koji

sadrže navedenu bakteriju vrlo su učinkoviti zbog bakterijske proizvodnje kristala koji su toksični za kukce.



Slika 4. Entomopatogena bakterija *Bacillus thuringiensis* pod mikroskopom

(Izvor: <https://u.osu.edu/cmifsud7588/2019/05/18/bacillus-thuringiensis/> )

Biološki pesticidi na bazi bakterija moraju se primjenjivati višekratno i učestalo kako bi njihova učinkovitost bila zadovoljavajuća. Premda preparati s entomopatogenim bakterijama pokazuju dobru učinkovitost u laboratorijskim uvjetima, u prirodi situacija često nije idealna. Bakterije, zbog kratkog životnog vijeka izvan tijela domaćina, nisu uvijek optimalan entomopatogeni organizam za suzbijanje štetnika na terenu.

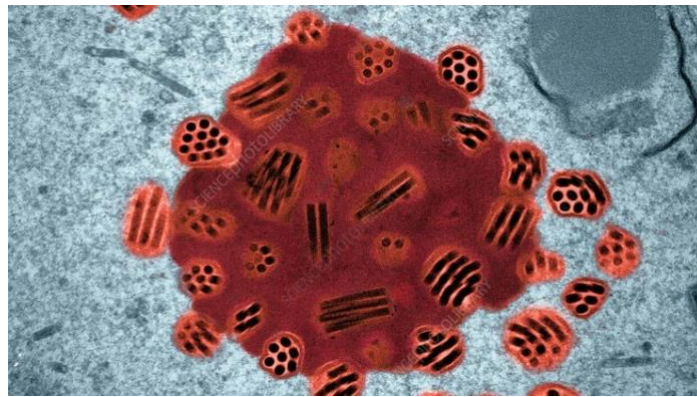
### 1.5. Entomopatogeni virusi

U prirodi je velik broj entomopatogenih virusa identificiran i prijavljen za različite skupine kukaca i nekih člankonožaca. Entomopatogeni virusi su obvezni intracelularni paraziti s DNA ili RNA molekulom koja je kapsulirana u proteinski omotač poznat kao kapsida za formiranje viriona i nukleokapsida. Navedeni virusi su izvrsni za primjenu u biološkoj kontroli jer su vrlo specifični u prirodi i nisu opasni ni za ljude ni za ne ciljane vrste.

Od entomopatogenih virusa najpoznatiji su bakulovirusi (Slika 5.). Poznati su po svojoj složenosti u pogledu forme, funkcionalnosti, različitosti, veličine, organizacije i genskog sadržaja svog genoma. Smatra se da se više od 700 vrsta kukaca može prirodno zaraziti bakulovirusima, od kojih je 90% izdvojeno iz porodice Lepidoptera (Sosa-Gomez i sur., 2020.).

Do zaraze kukca najčešće dolazi unošenjem prethodno kontaminirane hrane. Kada entomopatogeni virus djelomično uđe u stanicu njegova nukleinska kiselina preuzima kontrolu nad metaboličkim sustavom domaćina duplicirajući se sve dok stanica ne umre. Tri porodice virusa specifičnih za kukce domaćine (*Baculoviridae*, *Polydnviridae* i *Ascoviridae*) ne samo da su izuzetno specifične za svoje domaćine, već nisu patogene za korisne kukce niti za druge neciljane organizme (Deka i sur., 2021.).

Preparati koji sadrže entomopatogene viruse djeluju puno brže i bolje o kemijskih preparata jer napadaju samo ciljanog štetnika, a ne sve kukce na polju.



Slika 5. Bakulovirus

(Izvor: <https://www.sciencephoto.com/media/710835/view/tem-of-baculovirus> )

## 1.6. Entomopatogeni organizmi u Republici Hrvatskoj

U entomopatogene organizme prisutne u Hrvatskoj spadaju prirodne populacije entomopatogenih nematoda i gljiva u tlu.

Članak Majić i sur. (2018.) opisuje prvi nalaz entomopatogenih nematoda iz porodice *Steinernematidae* u Hrvatskoj. Tlo je uzorkovano s različitih lokacija u kontinentalnom dijelu Hrvatske, te je izdvojena vrsta *Steinernema feltiae* iz tla. Pronalaženje entomopatogenih nematoda u Hrvatskoj omogućuju njihovu primjenu u biološkom suzbijanju štetnika u poljoprivredi.

Majetić i sur. (2017.) su utvrdili prisutnost entomopatogenih nematoda *Steinernema feltiae* i *Heterorhabditis bacteriophora* u tlima u različitim dijelovima Hrvatske, kao i prisutnost entomopatogene gljive *Beauveria bassiana*. Tijekom istraživanja autori su zaključili da se

pronađeni entomopatogeni organizmi mogu koristiti za suzbijanje štetnike bez korištenja kemijskih sredstava.

Na tržištu u Hrvatskoj su dostupne entomopatogene nematode rodova: *Steinernema* i *Heterhabditis*, a dostupne su i entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* i *Metarhizium anisopliae*. Entomopatogene nematode se najčešće koriste za suzbijanje ličinki kukaca, a mogu se pronaći u komercijalnim preparatima. Kao biološki insekticidi se koriste entomopatogene gljive koje su poznate po učinkovitosti u borbi protiv lisnih uši, gusjenica i skakavaca.

Entomopatogeni organizmi predstavljaju važan dio biološke zaštite bilja u Hrvatskoj, posebice u mediteranskom i kontinentalnom dijelu zemlje. Iako je njihova prirodna prisutnost u tlu potvrđena u brojnim istraživanjima, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se optimizirala njihova primjena u suzbijanju različitih štetnika. Komercijalno dostupni preparati na bazi entomopatogenih nematoda i gljiva već se koriste u različitim poljoprivrednim sektorima te su zamjena kemijskim insekticidima.

## 2. MATERIJALI I METODE

Na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek u laboratoriju za entomologiju i nematologiju provedeno je istraživanje s ciljem utvrđivanja prisutnosti entomopatogenih gljiva i entomopatogenih nematoda u tlu iz maslinika. Za izdvajanje entomopatogenih nematoda i gljiva iz uzoraka tla korištena je *insect bait* metoda.. U ovoj metodi za kukca mamca korištene su gusjenice velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.) (Slika 6.).



Slika 6. Gusjenica *Galleria mellonella* L.  
(Izvor: Petrović, N., 2023.)

Uzorci tla iz maslinika uzeti su tijekom rujna i listopada 2023. godine sa 16 lokaliteta: Vrana, Sikovo, Punat, Kornić, Krk, Grožnjan, Završje, Karojba, Rovinj, Sveti Lovreč Pazenatički, Poreč, Stomorska, Donje Selo, Žrnovnica, Blato na Cetini i Srinjine. Izdvajanje entomopatogena je započelo 8. studenog 2023. godine.

Uzorkovanje tla provedeno je nasumičnom metodom, pri čemu je sa više mjesta u svakom masliniku prikupljeno ukupno 1 kg uzorka tla, iz kojeg se su se kasnijom obradom tla načinili poduzorci. Do postavljanja pokusa uzorci tla čuvani su u hladnjaku na temperaturi od 6,9 °C i uz vlažnost zraka od 65 %.

Zadnji stadiji razvoja gusjenica velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.) korištene u istraživanju izdvojene su iz laboratorijskog uzgoja. Gusjenice su uzgajane u laboratoriju na sobnoj temperaturi i hranjene hranom prilagođenom njihovim potrebama (Smith i Jones, 2010.). Za potrebe istraživanja, gusjenice ranijih stadija razvoja su izdvojene i uzgajane u posebnoj kutiji neposredno prije postavljanja pokusa, kako bi se umanjio njihov stres.



Prije postavljanja pokusa, uzorci tla pripremljeni su stavljanjem u plastične vrećice i ostavljanjem na sobnoj temperaturi kako bi se tlo prilagodilo okolnim uvjetima, te potaknula aktivnost entomopatogena. Osim pripreme tla, pripremljene su i plastične kivete, s probušenim sitnim rupicama. Kako bi gusjenice mogle disati i omogućile entomopatogenim organizmima da dopru do gusjenica velikog voskovog moljca. Gusjenice su postavljene u plastične kivete, potom u uzorak tla. (Slika 7.).



Slika 7. Gusjenice velikog voskovog moljca u kivetama spremne za umetanje u uzorke tla  
(Izvor: Petrović, N., 2023.)

Postavljanje pokusa izvedeno je tako što su uzorci tla stavljani u kartonske kutije s poklopcima, a zatim je u svaki uzorak tla dodano pet kiveta s gusjenicama velikog voskovog moljca. Svaki uzorak je imao tri poduzorka, odnosno tri ponavljanja. Tlo je navlaženo destiliranom vodom pomoću boce sa štrcaljkom. Nakon postavljanja pokusa, kutije su zatvorene i ostavljene na sobnoj temperaturi (Slika 8.). Zdravstveno stanje gusjenica velikog voskovog moljca praćeno je svaki drugi dan u razdoblju od 8. do 20. studenog 2023. godine.





Slika 8. Izgled postavljenog pokusa

(Izvor: Petrović, N., 2023.)

Uginule gusjenice velikog voskovog moljca stavljanje su na *white trap* kako bi se identificirao entomopatogeni organizam koji je izazvao njihovu smrt. *White trap* metoda postavlja se tako da se manja Petrijeva zdjelica stavi unutar veće Petrijeve zdjelice, s otvorom manje zdjelice okrenutim prema dolje. Na manju Petrijevu zdjelicu stavlja se filter papir dovoljno velik da dodiruje dno veće Petrijeve zdjelice, a zatim se sipa destilirana voda tek toliko da prekrije dno veće zdjelice.

Uginule gusjenice stavlja se na filter papir, nakon čega se veća Petrijeva zdjelica pokrije svojim poklopcem, a dodatno se čuvaju u mraku kako bi se entomopatogeni organizmi mogli bolje razviti. Stanje uginulih gusjenica praćeno je tijekom sljedećih deset dana kako bi se utvrdilo koji entomopatogeni organizam će se razviti.

Kako bi se uspješno identificirali entomopatogeni organizmi u uzorcima tla, stanje uginulih gusjenica velikog voskovog moljca praćeno je mikroskopom. Svaki drugi dan *white trap* je pregledan kako bi se utvrdila prisutnost entomopatogenih nematoda, dok je izgled tijela

gusjenice praćen pod mikroskopom kako bi se uočila prisutnost entomopatogenih nematoda i/ili razvoj micelija gljiva (Slika 9.).

Kako bi se utvrdila prisutnosti gljive na uginuloj gusjenici u sterilnom okruženju, pomoću mikrobiološke ušice, uzet je uzorak gljive s tijela gusjenice i prebačen u Petrijevu zdjelicu s PDA podlogom. Petrijeva zdjelica s PDA podlogom zatvorena je parafilmom kako bi se spriječila kontaminacija i razvoj drugih mikroorganizama. PDA podloga s nacijepljenom gljivom ostavljena je deset dana na sobnoj temperaturi dok se gljiva potpuno razvila, nakon čega je prebačena u hladnjak na 4 °C kako bi se očuvala duži period.



Slika 9. *Galleria mellonella* L. prekrivena micelijom entomopatogene gljive

(Izvor: Petrović, N., 2023.)

Izdvojene entomopatogene nematode prikupljene su u vodi, sterilizirane pomoću 5 % varikine i čuvane u plastičnim posudama za razvoj kultura, u otopini M9 do pregleda pod mikroskopom.

U svim poduzorcima praćen je mortalitet gusjenica, te su zabilježene morfološke promjene na kukcu. Iz literature je poznato, da entomopatogene nematode i gljive uzrokuju projmenu

boje u kutikuli kukca (od tamije bež do ciglasto crvene i crne boje). Uginule gusjenice u uzorcima tla su zamjenjene s novim gusjenicama do kraja pokusa.

Entomopatogene gljive identificirane su molekularnim metodama pri čemu je utvrđena ITS i TEF regija gljive i uspoređena sa sličnim podacima iz NCBI baze. Identifikacija gljive je obavljena u laboratoriju za molekularnu mikologiju, fitopatologiju i entomologiju Politehnika Bydgoska, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii u Poljskoj.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 1. prikazuje da je dva dana nakon postavljanja pokusa jedino u uzorku tla s lokaliteta Punat pronađena jedna uginula gusjenica velikog voskovog moljca. Gusjenica je, kao što je navedeno u tablici, promijenila boju u crnu. Nakon primjene White trap metode, na gusjenici nije utvrđeno prisustvo entomopatogenih organizama. Na ostalim lokalitetima, gdje su primijećene određene promjene, jedino su uočene paučinaste prevlake oko gusjenica, što upućuje da su se gusjenice zakukuljile. Nakon završetka pregleda svih gusjenica sa svih lokaliteta, uginula gusjenica zamijenjena je novom živom gusjenicom kako bi se moglo nastaviti pratiti aktivnost entomopatogenih organizama u tlu.

Tablica 1. Srednje vrijednosti mortaliteta i patomorfološke promjene gusjenica velikog voskovog moljca – drugi dan nakon postavljanja pokusa

Lokalitet	Mortalitet	Patomorfološke promjene na gusjenicama
Vrana	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Sikovo	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Punat	1	Uginula gusjenica je pocrnila i još dvije gusjenice su se zakukuljilo
Kornić, otok Krk	0	Tri od pet gusjenica su se zakukuljile
Krk, otok Krk	0	Tri gusjenice su se zakukuljile
Grožnjan	0	Dvije gusjenice su se zakukuljile
Završje	0	Tri gusjenice su se zakukuljile
Karojba	0	Četiri gusjenice su se zakukuljile
Rovinj	0	Tri gusjenice su se zakukuljile
Sveti Lovreč Pazenatički	0	Dvije gusjenice su se zakukuljile
Poreč II	0	Tri gusjenice su se zakukuljile
Stomorska, otok Šolta	0	Tri gusjenice su se zakukuljile
Donje Selo, Šolta	0	Dvije gusjenice su se zakukuljile
Žrnovnica	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Blato na Cetini	0	Dvije gusjenice su se zakukuljile
Srinjine	0	Svih pet gusjenica se zakukuljilo

Rezultati pokusa četiri dana nakon postavljanja prikazani su u Tablici 2. Kontrolom je jedina uginula gusjenica pronađena je u uzorku tla iz Donjeg Sela na otoku Šolti. Gusjenica je, kao i ona iz Tablice 1, promijenila boju u crnu. Daljnjom analizom i praćenjem pod mikroskopom na gusjenici nisu otkriveni entomopatogeni organizmi. U uzorku tla s lokacije Poreč II, kontrolom pokusa utvrđeno je da je iz jedne kivete gusjenica voskovog moljca izašla, pri čemu se zaključilo da je gusjenica smanjena i uspjela izaći kroz malo veću rupicu za zrak. Također su se neke gusjenice smanjile, što može biti posljedica nedostatka hrane u tlu.

Tablica 2. Srednje vrijednosti mortaliteta i patomorfološke promjene gusjenica velikog voskovog moljca – četvrti dan nakon postavljanja pokusa

Lokalitet	Mortalitet	Patomorfološke promjene na gusjenicama
Vrana	0	Nije bilo nikakvih promjena na gusjenicama
Sikovo	0	Nije bilo nikakvih promjena na gusjenicama
Punat	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Kornić, otok Krk	0	Jedna gusjenica se smanjila
Krk, otok Krk	0	Jedna gusjenica se smanjila
Grožnjan	0	Nije bilo nikakvih promjena na gusjenicama
Završje	0	Nije bilo nikakvih promjena na gusjenicama
Karojba	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Rovinj	0	Jedna gusjenica se zakukuljila i jedna gusjenica se smanjila
Sveti Lovreč Pazenatički	0	Nije bilo nikakvih promjena na gusjenicama
Poreč II	0	Jedna gusjenica je izašla iz kivete, a jedna se zakukuljila
Stomorska, otok Šolta	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Donje Selo, Šolta	1	Uginula gusjenica je pocrnila
Žrnovnica	0	Nije bilo nikakvih promjena na gusjenicama
Blato na Cetini	0	Nije bilo nikakvih promjena na gusjenicama
Srinjine	0	Nije bilo nikakvih promjena na gusjenicama

Tablica 3. prikazuje rezultate pokusa šesti dan nakon postavljanja. Tijekom ove kontrole primijećeno je da se značajan broj gusjenica smanjio, što može biti posljedica djelovanja entomopatogenih organizama iz tla ili nedostatka hranjivih tvari u tlu. Na lokalitetu Završje pronađena je jedna uginula gusjenica, pri čemu nisu uočene promjene boje tijela gusjenice.

Tablica 3. Srednje vrijednosti mortaliteta i patomorfološke promjene gusjenica velikog voskovog moljca – šesti dan nakon postavljanja pokusa

Lokalitet	Mortalitet	Patomorfološke promjene na gusjenicama
Vrana	0	Dvije gusjenice su se smanjile
Sikovo	0	Jedna gusjenica se smanjila
Punat	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Kornić, otok Krk	0	Dvije gusjenice su se smanjile
Krk, otok Krk	0	Jedna gusjenica se jako smanjila
Grožnjan	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Završje	1	Uginula gusjenica je bila bez promjene boje i jedna gusjenica se smanjila
Karojba	0	Jedna gusjenica se smanjila
Rovinj	0	Dvije gusjenice su se zakukuljile i jedna se smanjila
Sveti Lovreč Pazenatički	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Poreč II	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Stomorska, otok Šolta	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Donje Selo, Šolta	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Žrnovnica	0	Jedna gusjenica se zakukuljila i jedna se smanjila
Blato na Cetini	0	Jedna gusjenica se smanjila
Srinjine	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena

Rezultati osmog dana nakon postavljanja pokusa prikazani su u Tablici 4. Primijećeno je da su se pojavile dvije uginule gusjenice voskovog moljca, za razliku od prethodnih kontrola kada je bila prisutna samo po jedna uginula gusjenica. Na lokalitetu Poreč II, uginula gusjenica nije imala promjenu boje tijela, dok je na lokalitetu Srinjine uginula gusjenica

imala tijelo svijetlo roza boje. Pregledom ostalih uzoraka nisu uočene značajnije promjene, osim što se primijetilo da se velik broj gusjenica zakukuljio.

Tablica 4. Srednje vrijednosti mortaliteta i patomorfološke promjene gusjenica velikog voskovog moljca – osmi dan nakon postavljanja pokusa

Lokalitet	Mortalitet	Patomorfološke promjene na gusjenicama
Vrana	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Sikovo	0	Dvije gusjenice su se smanjile
Punat	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Kornić, otok Krk	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Krk, otok Krk	0	Jedna gusjenica se smanjila
Grožnjan	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Završje	0	Jedna gusjenica se zakukuljila i jedna se smanjila
Karojba	0	Dvije gusjenice su se zakukuljile
Rovinj	0	Dvije gusjenice su se zakukuljile
Sveti Lovreč Pazenatički	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Poreč II	1	Uginula gusjenica nije imala promjenu boje i jedna gusjenica se zakukuljila
Stomorska, otok Šolta	0	Dvije gusjenice su se zakukuljile i jedna se smanjila
Donje Selo, Šolta	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Žrnovnica	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Blato na Cetini	0	Jedna gusjenica se smanjila
Srinjine	1	Uginula gusjenica je bila svijetlo roze boje i dvije gusjenice su se zakukuljile

Posljednji dan kontroliranja pokusa prikazan je u Tablici 5. Nisu uočene veće promjene na gusjenicama velikog voskovog moljca. Na lokalitetu Kornić na otoku Krku, jedna gusjenica promijenila je boju u tamnosmeđu, ali nije uginula. Na lokalitetu Rovinj uočena je gusjenica koja se zakukuljila (Slika 10.). Kukuljica nije imala patomorfološke promjene. Jedina uginula gusjenica tijekom ove kontrole pronađena je na lokalitetu Blato na Cetini; gusjenica nije pokazivala promjenu boje tijela niti bilo kakve dodatne promjene.

Tablica 5. Srednje vrijednosti mortaliteta i patomorfološke promjene gusjenica velikog voskovog moljca – deseti dan nakon postavljanja pokusa

Lokalitet	Mortalitet	Patomorfološke promjene na gusjenicama
Vrana	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Sikovo	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Punat	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Kornić, otok Krk	0	Jedna gusjenica je postala tamnosmeđa, ali nije uginula
Krk, otok Krk	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Grožnjan	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Završje	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Karojba	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Rovinj	0	Jedna gusjenica se zakukuljila
Sveti Lovreč Pazenatički	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Poreč II	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Stomorska, otok Šolta	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Donje Selo, Šolta	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Žrnovnica	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena
Blato na Cetini	1	Uginula gusjenica nije promijenila boju
Srinjine	0	Gusjenice nisu imale nikakvih promjena



Slika 10. Kukuljica velikog voskovog moljca

(Izvor: Petrović, N., 2023.)



Tijekom praćenja pokusa, svaka uginula gusjenica stavljena je na *White trap* metodu i praćena je tijekom deset dana kako bi se uočila prisutnost entomopatogenih organizama. Tablica 6. pokazuje da je entomopatogena gljiva *Beauveria bassiana* pronađena samo na gusjenici velikog voskovog moljca s lokaliteta Srinjine. Nažalost, na ostalim gusjenicama nije utvrđena prisutnost niti entomopatogenih nematoda niti entomopatogenih gljiva, stoga nije moguće sa sigurnošću utvrditi uzrok njihovog uginuća.

Tablica 6. Izdvojeni entomopatogeni organizmi iz uginulih gusjenica velikog voskovog moljca

Lokalitet	Izdvojeni entomopatogeni
Punat	-
Donje Selo, Šolta	-
Završje	-
Poreč II	-
Srinjine	Entomopatogena gljiva, <i>Beauveria bassiana</i>
Blato na Cetini	-

Prema Sharma i sur. (2021.) iako je metoda *insect bait* najčešće korištena u izolaciji entomopatogenih organizama iz tla treba je pažljivo koristiti jer su neki kukci otporniji na određene vrste gljiva koje se pokušavaju izdvojiti iz tla. Također korištenje kukca kao mamca povećava mogućnost otkrića entomopatogenih organizama u tlu čak i kada je broj entomopatogena u tlu mali.

Liu i sur. (2021.) dokazali su da u usporedbi s ostalim kukcima gusjenice *Galleria mellonella* i *Tenebrio molitor* pokazuju najveću mogućnost izdvajanja *Beauveria* i *Metarhizium* spp. iz tla. U ovom istraživanju su uz pomoć *insect bait* metode izdvojene dvije entomopatogene gljive: *Beauveria bassiana* i *Metarhizium anisopliae*, uz pomoć gusjenice velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.). Uspoređujući istraživanje Liu i sur. (2021.) i istraživanje opisano u ovome radu vidljivo je da jedna od dvije gljive uspjela biti izdvojena iz tla.

#### 4. ZAKLJUČAK

Cilj provedenog istraživanja bio je potvrditi prisutnost prirodnih populacija entomopatogenih nematoda i gljiva u uzorcima tla uzetim s lokaliteta mediteranskog dijela Republike Hrvatske. Korištenjem gusjenica velikog voskovog moljca (*Galleria mellonella* L.) kao mamca i *white trap* metode, uspješno je izdvojena entomopatogena gljiva *Beauveria bassiana* iz uzorka tla s lokaliteta Srinjine. Entomopatogeni organizmi nisu se pronašli na ostalim lokalitetima, što može uputiti na njihovu odsutnost ili nedostatak učinkovitosti korištenih metoda izolacije zbog specifičnih zahtjeva ovih organizama za rast i razmnožavanje. Dakle, potrebno je istražiti alternativne metode izoliranja i širenja entomopatogena, te kako bi se pružila učinkovitija uporaba u biološkoj kontroli štetnika. Na kraju, rezultati ovog istraživanja omogućuju razumijevanje prisutnosti i potencijala entomopatogenih organizama u zaštiti poljoprivrednih kultura, a posebice smanjenju primjene kemijskih sredstava za zaštitu bilja.

## 5. POPIS LITERATURE

1. Barić, B., Pajač Živković, I. (2020.): Suppression of overwintering codling moth population using entomopathogenic nematodes, *Fragmenta phytomedica*, 34 (5): 23-31
2. Charles, J.F., Delécluse, A., Nielsen-Le Roux, C., (ur.) (2000.): *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*, Springer Science+Business Media, Dordrecht, 524
3. Čačija, M., Bažok, R., Lemić, D., Mrganić, M., Virić Gašparić, H., Drmić, Z., (2018.): Spinosini – insekticidi biološkog podrijetla, *Fragmenta phytomedica*, 32 (2): 43-60
4. do Prado Ribeiro, L., Amandio, D. T. T., Rakes, M., Belegante, F., Moresco, C., Nesi, C. N., Zanardi, A. M., Grützmacher, A. D., Bernardi, D., Zanardi, O. Z. (2023.): Insecticides for corn leafhopper management versus entomopathogenic fungal isolates: In vitro compatibility, physical-chemical interactions, and on-farm assessments, *Crop Protection*, 174, 106417
5. Debelić, M.: *Biološko suzbijanje štetnih kukaca*, Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 2017.
6. Deka, B., Baruah, C., Babu, A., (2021.): Entomopathogenic microorganisms: their role in insect pest management, *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31 (121)
7. Forić, N., Sarajlić, A., Vrandečić, K., Majić, I., (2018.): Potencijal entomopatogenih gljiva *Metarhizium* spp. u suzbijanju štetnih kukaca, *Glasnik zaštite bilja*, 41 (4): 22-30
8. Gouli, V., Gouli, S., Skinner, M., Shternshis, M.V., (2008.): Effect of the entomopathogenic fungi on mortality and injury level of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 4 (2): 37–47
9. Grimont, P. A. D., Grimont, F., (2006.): The genus *Serratia*, U: *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY, 219-244
10. Igrc Barčić, J. (2000.) : Što su uistinu biobpesticidi?, *Glasnik zaštite bilja*, 1: 5-6
11. Igrc Barčić, J., Maceljki, M., (2001.): Ekološki prihvatljiva zaštita bilja od štetnika, *Zrinski, Čakovec*, 247

12. Jelić, T.: Insekticidno i antifungalno djelovanje entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* i korisne bakterije *Bacillus subtilis*, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek, 2021.
13. Kaya, H.K., Koppenhöfer, A.M., (1996.): Effects of Microbial and Other Antagonistic Organisms and Competition on Entomopathogenic Nematodes, *Biocontrol Sciences and Technology*, 6 (3): 357-372
14. Kelemen, B., Čosić, J., Brkić, A., Raspudić, E., Sarajlić, A., Šarić, G. K., Majić, I. (2019.): Virulentnost entomopatogenih nematoda i prirodne populacije endofitnih organizama u gusjenicama kukuruznog moljca (*Ostrinia nubilalis*), U: Proceedings & abstracts 12th international scientific, professional conference Africulture in Nature and Environment Protection, Jug, D., Brozović, B. (ur.), Osijek: Glas Slavonije, 2019., 157-161
15. Keshavareddy, G., Kumar, A.R.V., (2016.): Chapter 14 – *Bacillus thuringiensis*, U: Ecofriendly Pest Management for Food Security, Omkar, (ur.), Elsevier Inc., London, UK, 443-473
16. Kovač, M., Lacković, N., Pernek, M. (2020.): Effect of *Beauveria bassiana* fungal infection on survival and feeding behavior of pine-tree lappet moth (*Dendrolimus pini* L.). *Forests*, 11(9), 974
17. 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
18. Kovač, M., Tkaczuk, C., Pernek, M. (2021.): First report of entomopathogenic fungi occurrence in forest soils in Croatia, *Forests*, 12(12), 1690.
19. Laznik, Ž., Trdan, S. (2017.): Compatibility between entomopathogenic nematodes and phytopharmaceuticals. In *Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes* (pp. 581-595). Wallingford UK: CABI.
20. Liu, Y., Ni, N., Chang, J., Li, Y., Lee, M.R., Kim, J.S., Nai, Y., (2021.): Isolation and Selection of Entomopathogenic Fungi from Soil Samples and Evaluation of Fungal Virulence against Insect Pests, <https://app.jove.com/t/62882/isolation-selection-entomopathogenic-fungi-from-soil-samples> (Datum pristupa: 06.09.2024.)
21. Majetić, N., Kos, K., Kovačević, Z. (2017.): Prisutnost entomopatogenih organizama u tlu i njihova uloga u biološkoj kontroli štetnika, *Glasnik zaštite bilja*, 40(4): 315-322

22. Majić, I., Sarajlić, A., Lakatos, T., Tóth, T., Raspudić, E., Puškadija, Z., Kanižai Šarić, G., Laznik, Ž. (2019.): Virulence of new strain of *Heterorhabditis bacteriophora* from Croatia against *Lasioptera rubi*, *Plant protection science*, 55(2): 134-141
23. Majić, I., Sarajlić, A., Lakatos, T., Tóth, T., Raspudić, E., Zebec, V., Kanižai Šarić, G., Kovačić, M., Laznik, Ž. (2018.): First report of entomopathogenic nematode (Rhabditida: *Steinernematidae*) from Croatia, *Helminthologia*, 55(3), 256-260
24. Majić, I., Sarajlić, A., Veselovac, D., Dorić, D., Tambolaš, A., Mađar, M., Ereš, H., Kanižai Šarić, G., Liška, A. (2021.: Mortality of the red flour beetle (*Tribolium castaneum*) when exposed to croatian strain of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae*, In Presented at the 1st International Electronic Conference on Entomology (IECE 2021) , 1: p. 15
25. Matek, M., Pernek, M. (2018.): First record of *Dendrolimus pini* outbreak on *Aleppo pine* in Croatia and severe case of population collapse caused by entomopathogen *Beauveria bassiana*, *South-east European forestry: SEEFOR*, 9(2): 91-96
26. Mustapić, L., Poje, I., Rehak Biondić, T., (2023.): Entomopatogene nematode – potencijal u zaštiti bilja od štetnika, *Glasilo biljne zaštite*, 23 (4): 473-481
27. Myllymäki, A., (1979.): Importance of small mammals as pests in agriculture and stored products, U: *Ecology of small mammals*, Stoddart, D.M., (ur.), Springer Netherlands, 239-279
28. Nježić, B., (2016.): Entomopatogene nematode u biološkoj zaštiti bilja, *Glasnik zaštite bilja*, 39 (4): 10-14
29. Prasad, V., Srivastava, S. (2016.): Chapter 13 – Insect Viruses, U: *Ecofriendly Pest Management for Food Security*, Omkar, (ur.), Elsevier Inc., London, UK, 411-442
30. Raj, M.N., Samal, I., Paschapur, A., Subbanna, A.R.N.S., (2022.): Chapter 3 - Entomopathogenic viruses and their potential role in sustainable pest management, U: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, Singh, H.B., Vaishnav, A., (ur.), Elsevier Inc., 47-72
31. Ruiu, L., (2015.): Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management, *Insects*, 6 (2): 352-367
32. Shah, P.A., Pell, J.K., (2003.): Entomopathogenic fungi as biological control agents, *Applied Microbiology and Biotechnolog*, 61: 413-423

33. Sharma, L., Bohra, N., Rajput, V.D., Quiroz-Figueroa, F.R., Kumar Singh, R., Marques, G., (2021.): Advances in Entomopathogen Isolation: A Case of Bacteria and Fungi, *Microorganisms*, 9 (1): p 16
34. Sinha, K.K., Choudhary, A.K., Kumari, P., (2016.): Chapter 15 - Entomopathogenic Fungi, U: *Ecofriendly Pest Management for Food Security*, Omkar, (ur.), Elsevier Inc., London, UK, 475-505
35. Smith, R. J., Jones, D. H. (2010.): Laboratory rearing techniques for lepidopteran larvae, *Journal of Insect Science*, 15(4): 120-126
36. Sosa-Gomez, D.R., Morgado, F.S., Correa, R.F.T., Silva, L.A., Ardisson-Araujo, D.M.P., Rodrigues, B.M.P., Ribeiro, B.M., 2020.: Entomopathogenic viruses in the neotropics: current status and recently discovered species, *Neotropical Entomology* 49 (3): 315–331.
37. Subramanian, S., Muthulakshmi, M. (2016.): Chapter 12 - Entomopathogenic Nematodes, U: *Ecofriendly Pest Management for Food Security*, Omkar, (ur.), Elsevier Inc., London, UK, 367-410
38. Šimić, D., Bažok, R. (2019.): Učinkovitost entomopatogenih gljiva u biološkoj kontroli štetnika: pregled primjena i istraživanja, *Agronomski glasnik*, 81(2): 123-130
39. Uglješić, I.: Biološko suzbijanje štetnika u zaštićenim prostorima republike hrvatske, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Poljoprivredna zoologija, Zagreb, 2019.
40. Vale, A.: Utjecaj insekticida tiametoksam na entomopatogene nematode, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek, 2019.
41. Vasiljević, Lj., Injac, M., (1974.): Primena entomopatogenih mikroorganizama u suzbijanju štetnih insekata u poljoprivredi i šumarstvu, *Agronomski glasnik: Glasnik Hrvatskog agronomskog društva*, 36 (9-12): 529-536
42. Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S.A., (2008.): Entomopathogenic fungal endophytes, *Biological Control* , 46 (1): 72-82
43. Veselovac, D.: Učinkovitost entomopatogenih nematoda (*Steinernema feltiae*) u suzbijanju kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum*), Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek, 2019.

## POPIS TABLICA

Tablica 1. Srednje vrijednosti mortaliteta i patomorfološke promjene gusjenica velikog voskovog moljca – drugi dan nakon postavljanja pokusa .....	15
Tablica 2. Srednje vrijednosti mortaliteta i patomorfološke promjene gusjenica velikog voskovog moljca – četvrti dan nakon postavljanja pokusa .....	16
Tablica 3. Srednje vrijednosti mortaliteta i patomorfološke promjene gusjenica velikog voskovog moljca – šesti dan nakon postavljanja pokusa .....	17
Tablica 4. Srednje vrijednosti mortaliteta i patomorfološke promjene gusjenica velikog voskovog moljca – osmi dan nakon postavljanja pokusa.....	18
Tablica 5. Srednje vrijednosti mortaliteta i patomorfološke promjene gusjenica velikog voskovog moljca – deseti dan nakon postavljanja pokusa .....	19
Tablica 6. Izdvojeni entomopatogeni organizmi iz uginulih gusjenica velikog voskovog moljca .....	20

## POPIS SLIKA

Slika 1. Entomopatogena nematoda iz roda <i>Steinernema</i> (Izvor: <a href="https://www.evergreengrowers.com/millennium-group-carpo.html">https://www.evergreengrowers.com/millennium-group-carpo.html</a> ) .....	3
Slika 2. Entomopatogena nematoda iz roda <i>Heterorhabditis</i> (Izvor: <a href="https://www.biopol.nl/heterorhabditis-bacteriophora-en">https://www.biopol.nl/heterorhabditis-bacteriophora-en</a> ).....	4
Slika 3. Bijeli micelij <i>Beauveria bassiana</i> razvijen na uginulom kukcu (Izvor: Petrović, N., 2023.).....	5
Slika 4. Entomopatogena bakterija <i>Bacillus thuringensis</i> pod mikroskopom (Izvor: <a href="https://u.osu.edu/cmifsud7588/2019/05/18/bacillus-thuringiensis/">https://u.osu.edu/cmifsud7588/2019/05/18/bacillus-thuringiensis/</a> ) .....	7
Slika 5. Bakulovirus (Izvor: <a href="https://www.sciencephoto.com/media/710835/view/tem-of-baculovirus">https://www.sciencephoto.com/media/710835/view/tem-of-baculovirus</a> ) .....	8
Slika 6. Gusjenica <i>Galleria mellonella</i> L. (Izvor: Petrović, N., 2023.) .....	10
Slika 7. Gusjenice velikog voskovog moljca u kivetama spremne za umetanje u uzorke tla (Izvor: Petrović, N., 2023.).....	11
Slika 8. Izgled postavljenog pokusa (Izvor: Petrović, N., 2023.).....	12
Slika 9. <i>Galleria mellonella</i> L. prekrivena micelijom entomopatogene gljive (Izvor: Petrović, N., 2023.).....	13
Slika 10. Kukuljica velikog voskovog moljca (Izvor: Petrović, N., 2023.) .....	19