

Entomopatogeni potencijal mikrogljive *Beauveria bassiana* na odrasle oblike repičinog sjajnika (*Brassicogethes aeneus*)

Grozdanić, Vedran

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:370880>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Entomopatogeni potencijal mikrogljive *Beauveria
bassiana* na odrasle oblike repičina sjajnika
(*Brassicogethes aeneus*)**

DIPLOMSKI RAD

Vedran Grozdanić

Zagreb, Kolovoz, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Fitomedicina

**Entomopatogeni potencijal mikrogljive *Beauveria
bassiana* na odrasle oblike repičina sjajnika
(*Brassicogethes aeneus*)**

DIPLOMSKI RAD

Vedran Grozdanić

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Ivan Juran

Zagreb, Kolovoz, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Vedran Grozdanić**, JMBAG 0246074816, rođen/a 31.07.1998.. u Zadru, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Entomopatogeni potencijal mikrogljive *Beauveria bassiana* na odrasle oblike repičina sjajnika (*Brassicogethes aeneus*)

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Vedran Grozdanić**, JMBAG 0246074816, naslova

**Entomopatogeni potencijal mikroglijive *Beauveria bassiana* na odrasle oblike repičina
sjajnika (*Brassicogethes aeneus*)**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Ivan Juran, mentor

2. dr. sc. Katarina Martinko, član

3. prof. dr. sc. Tanja Gotlin Čuljak, član

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj istraživanja.....	2
2. Repičin sjajnik.....	3
2.1. Morfologija.....	4
2.2. Životni ciklus.....	5
2.3. Štete na uljanoj repici.....	6
2.4. Suzbijanje.....	7
3. <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. (1912).....	14
3.1. Taksonomija i filogenija.....	14
3.2. Morfologija.....	15
3.3. Ekologija.....	17
3.4. Patogeneza.....	19
3.5. Sekundarni metaboliti.....	23
3.6. Primjena <i>Beauveria bassiana</i> u biološkom suzbijanju.....	25
4. Materijali i metode	27
5. Rezultati i rasprava	30
6. Zaključci	34
7. Literatura	35
Životopis.....	39

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Vedran Grozdanić**, naslova

Entomopatogeni potencijal mikrogljive *Beauveria bassiana* na odrasle oblike repičinog sjajnika (*Brassicogethes aeneus*)

Repičin sjajnik (*Brassicogethes aeneus*) najvažniji je štetnik uljane repice te je zabilježena pojava rezistentnosti ovog štetnika na kemijske insekticide što otežava njegovo suzbijanje. *Beauveria bassiana* entomopatogena je mikrogljiva koja se koristi u svrhu biološkog suzbijanja brojnih vrsta kukaca. Istraživanje učinkovitosti *B. bassiana* u suzbijanju odraslih oblika repičinog sjajnika provedeno je u laboratorijskim uvjetima u tri varijante i četiri ponavljanja tijekom 14 dana. Jedinke su bile izložene sporama *B. bassiana* tretiranjem cvatova uljane repice ili podloge s filter papirom te su mortalitet i pojava micelija praćeni svakodnevno. Devetog dana postignut je potpuni mortalitet u svim varijantama. Uspješna infekcija potvrđena je mikroskopskim pregledom micelija uginulih jedinki. Učinkovitost *B. bassiana* u inficiranju repičina sjajnika iznosila je 75% u tretmanu cvatova i 83% u tretmanu podloge.

Ključne riječi: *Beauveria bassiana*, repičin sjajnik, *Brassicogethes aeneus*

Summary

Of the master's thesis - student **Vedran Grozdanić**, entitled

Entomopathogenic potential of the fungus *Beauveria bassiana* on adult pollen beetles (*Brassicogethes aeneus*)

Pollen beetle (*Brassicogethes aeneus*) is the most important pest of oilseed rape, the emergence of resistance to chemical insecticides in this pest has been recorded, complicating its control. *Beauveria bassiana* is an entomopathogenic fungus used as a biological control agent of numerous insect pests. The study on the efficacy of *B. bassiana* in controlling adult pollen beetles was conducted under laboratory conditions in three variants and four repetitions over 14 days. The beetles were exposed to *B. bassiana* spores by treating oilseed rape inflorescences or a substrate filter paper, with mortality and mycelium appearance monitored daily. By the ninth day, complete mortality was observed in all variants. Successful infection was confirmed by microscopic examination of the mycelium on dead beetles. The efficacy of *B. bassiana* in infecting pollen beetles was 75% in the inflorescence treatment and 83% in the substrate treatment.

Keywords: *Beauveria bassiana*, pollen beetle, *Brassicogethes aeneus*

1. Uvod

Uljana repica (*Brassica napus* L.) jednogodišnja je zeljasta biljka visine 1-2 metra čije se sjeme koristi za ekstrakciju ulja u kulinarske svrhe, te za proizvodnju goriva (biodizel) i industrijske lubrikante, sjeme se također koristi u proizvodnji stočne hrane. Jedna je od važnijih kultura u Europi i Sjevernoj Americi te ima visok potencijal prinosa pod učinkovitim načinom uzgoja, također je vrlo važna kao međukultura u plodoredu sa žitaricama (Alford, 2003.; Williams, 2010.). U Republici Hrvatskoj površine pod ovom kulturom zadnjih godina značajno opadaju, prema Državnom zavodu za statistiku (2024.) 2018. godine površine pod uljanom repicom obuhvaćale su 55 000 ha, dok je ukupna površina 2023. godine iznosila svega 15 000 ha što je smanjenje od 72.73 % u periodu od 5 godina.

Repičin sjajnik najvažniji je štetnik uljane repice koji u rano proljeće napada i izgriza još ne otvorene pupove uljane repice. Suzbijanje repičinog sjajnika od izuzetne je važnosti za očuvanje prinosa uljane repice, te ukoliko se ne suzbija može izazvati štete veće od 50 %. Zabilježena je rezistentnost ovog štetnika na piretroide kao i na neonikotinoide, što u kombinaciji sa sve manjim brojem dostupnih aktivnih tvari onemogućava učinkovito suzbijanje ovoga štetnika. Upravo je nemogućnost suzbijanja repičinog sjajnika jedan od glavnih razloga velikog smanjenja površina na kojima se uzgaja uljana repica u RH (Maceljki, 2002.; Gotlin Čuljak i sur., 2019.).

Integrirana zaštita bilja ima potencijal poboljšati učinkovitost, profitabilnost i ekološku prihvatljivost proizvodnje ratarskih kultura, čime doprinosi održivoj proizvodnji. Prirodni agensi biološkog suzbijanja štetnika, tj. parazitoide, predatori i patogeni koji napadaju štetnike uljane repice, mogu pružiti ekonomski isplativu kontrolu nekih štetnika i smanjiti potrebu za insekticidima (Williams, 2010.). Entomopatogene mikrogljive su mikroorganizmi koji imaju sposobnost inficirati i usmrćivati kukce, te se stoga koriste kao biološka sredstva za suzbijanje štetnika. Među njima, mikrogljiva *Beauveria bassiana* je jedna od najčešće istraživanih i primjenjivanih zbog svoje široke patogenosti, ekološke sigurnosti i učinkovitosti. *B. bassiana* ima potencijal suzbijanja različitih vrsta štetnika u poljoprivredi, uključujući repičinog sjajnika. *B. bassiana* entomopatogena je mikrogljiva prisutna u tlima diljem svijeta. Sposobna je inficirati velik broj domaćina, oko 700 vrsta kukaca, iako je poznato da većina izolata ove mikrogljive ima ograničen raspon domaćina (Zimmerman, 2007.). Mikrogljiva *B. bassiana* djeluje tako da kada spore dođu u kontakt s kutikulom kukca, kličaju i prodiru kroz kutikulu te potom koloniziraju tijelo domaćina. Ovaj proces uzrokuje smrt domaćina najčešće unutar nekoliko dana. Mikrogljiva potom proizvodi nove spore koje mogu inficirati druge jedinice, čime se ciklus nastavlja. Osim direktne patogenosti, *B. bassiana* ima i potencijal inducirati obrambene odgovore kod biljaka, povećavajući njihovu otpornost na druge štetnike i bolesti (Chandler, 2017.; Imoulan, 2017.).

Proizvode se brojni preparati na bazi ove mikrogljive te se istražuje mogućnost njene primjene u biološkom suzbijanju raznih štetnih kukaca uključujući repičina sjajnika. Kako bi se potvrdila mogućnost infekcije repičina sjajnika mikrogljivom *B. bassiana* provedeno je istraživanje u laboratorijskim uvjetima u trajanju od 14 dana. U istraživanju su korišteni odrasli

oblici repičina sjajnika nasumično prikupljeni s biljaka uljane repice, koji su potom izloženi sporama *B. bassiana* u laboratorijskim uvjetima tretiranjem podloge ili cvatova. Istraživanje je provedeno u tri varijante i četiri repeticije te su rezultati statistički obrađeni.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovoga istraživanja je potvrditi mogućnost zaraze odraslih oblika repičina sjajnika mikroglijivom *Beauveria bassiana* u laboratorijskim uvjetima.

2. Repičin sjajnik

Sistematsko mjesto prema EPPO (2024.):

Razred – Insecta

Red – Coleoptera

Podred – Polyphaga

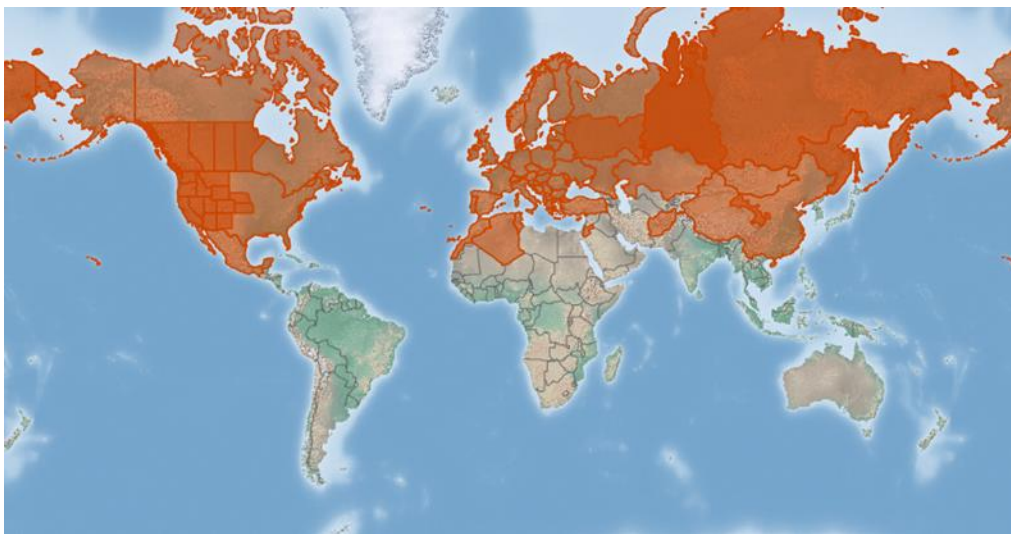
Porodica - Nitidulidae

Potporodica - Meligethinae

Rod - *Brassicogethes*

Vrsta – *Brassicogethes aeneus* Fabricius, 1775 (sinonim *Meligethes aeneus*)

Prema CABI (2024.) repičin sjajnik česta je i široko rasprostranjena vrsta u cijeloj Holarktičkoj regiji te je prisutna u cijeloj Europi i Sjevernoj Americi, većini Azijskih zemalja te u nekoliko sjeverozapadnih zemalja Afrike (slika 2.1.). CABI (2024.) također navodi da neki autori smatraju Sjevernoameričke i Azijske populacije kao odvojene podvrste sjajnika dok ih drugi autori smatraju istom vrstom kao i Europske populacije. IRAC (2024.) za rasprostranjenost populacije repičinog sjajnika navodi isključivo zemlje Europe, dok GBIF (2024.) navodi Europu, SAD i Kanadu, nekoliko zemalja Azije te Australiju.



Slika 2.1. Rasprostranjenost repičina sjajnika

Izvor: CABI <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.33259> - pristup 2.4.2024.

2.1. Morfologija

Odrasli je oblik repičina sjajnika (slika 2.1.1.a) tamnozeleno do tamnoplave boje, metalna sjaja te duljine tijela 2-2,5 mm. (Maceljski, 2002.). Odrasli oblik ima kijačasta ticala s 11 članaka od kojih su zadnja tri zadebljana, glava mu je prognatnog položaja a tijelo ovalno i spljošteno. Pokrilja su mu na zadnjem dijelu skraćene. Ličinke (slika 2.1.1.b) su dugačke do 5 mm, kremasto-bijele boje s crnom do smeđom glavom i tri para nogu (Williams, 2010.).



Slika 2.1.1. Odrasli oblik (a) i ličinka repičina sjajnika (b)

Izvori: UK Beetles <https://www.ukbeetles.co.uk/meligethes-aeneus> -pristup 2.4.2024.

Bug guide <https://bugguide.net/node/view/1033976> -pristup 2.7.2024.

2.2. Životni ciklus

Repičin sjajnik (slika 2.2.1.) prezimi kao odrasli oblik u tlu, vegetaciji i lišću na rubovima polja, šumama i živicama, izlazeći u rano proljeće (Williams, 2010.). Kada temperatura tla dosegne 8°C, a zraka 12°C odrasli oblici izlaze s prezimljenja i počinju letjeti no let je intenzivniji kada temperature dosegnu 15°C (Maceljki, 2002.). Polifagni su kukci i po izlasku s prezimljenja hrane se peludi biljaka iz različitih porodica. Kada temperature pređu 12°C, traže biljke porodice Brassicaceae, za parenje i polaganje jaja; obično stižu na usjeve uljane repice kada su u fazi zelenih pupova i hrane se peludom u pupovima i cvjetovima. Polažu svoja jaja (2-3 mm duga) u pupove duge najmanje 3 mm, kroz rupu koju izgrizu na dnu pupa (Williams, 2010. cit. Free i Williams, 1978.). Za nekoliko dana iz jaja izlaze ličinke koje se hrane peludom. Prolaze kroz dva stadija razvoja prije nego odlaze u tlo na kukuljenje (Alford, 2003.). Krajem svibnja i u lipnju javljaju se mladi kornjaši, koji se hrane na cvjetovima različitih biljaka te u kolovozu odlaze na prezimljenje (Maceljki, 2002.). Razvoj repičina sjajnika od jaja do novog odraslog oblika traje oko mjesec dana te ovaj štetnik ima jednu generaciju godišnje (Alford, 2003.).



Slika 2.2.1. Životni ciklus repičina sjajnika

Izvor: Lehrman 2007.

https://www.researchgate.net/publication/30072985_Oilseed_rape_transformed_with_a_pea_lectin_gene - pristup 2.4.204.

2.3. Štete na uljanoj repici

Maceljski (2002.) navodi da ukoliko se sjajnik ne suzbija štete na uljanoj repici mogu biti i preko 50 %, dok su prema Williams (2010.) zabilježene i štete od 70% u slučaju ne tretiranja ovoga štetnika. Usjevi uljane repice najosjetljiviji su na štete koje uzrokuju smanjenje prinosa pri ranim fazama pupanja dok se s razvojem biljke štete smanjuju (Williams, 2010.).

Repičin sjajnik oštećuje i potpuno zatvorene pupove u zbijenom cvatu pokrivenom lišćem. Hrane se pupovima koje buše te izgrizaju iznutra ulazeći u njih te tako oštećeni pupovi ne cvatu. S otvaranjem pupova štete prestaju budući da se sjajnici mogu neometano hraniti peludom. Zbog postepenog otvaranja cvjetova uljane repice štete se nastavljaju i nakon što počne cvatnja na još neotvorenim pupovima (Maceljski, 2002.). Ženke odlažu jaja u pupove pored prašnika, iz jaja se potom razvija ličinka koja se razvija unutar pupa prije odlaska na kukuljenje u tlo (Williams, 2010. ; Maceljski, 2002.).

Ne rezultira svako oštećenje biljke od strane sjajnika gubitkom prinosa uljane repice budući da uljana repica može pokazati znatnu kompenzacijsku sposobnost u odgovoru na napad sjajnika. Šteta uzrokovana hranjenjem sjajnika na terminalnom cvatu dovodi do pojavi bočnih izbojaka i pupova. Kranji prinos sjemena može ostati nesmanjen ako se šteta dogodi rano, iako sjeme iz mahuna koje se razvija iz bočnih izbojaka sadrži manje ulja (Williams, 2010.).

Štete nastale ishranom sjajnika mogu rezultirati prisutnošću slijepih stabljika (umjesto mahuna) na razvijajućim cvatovima. Šteta koju uzrokuju kukci potiče reakciju kompenzacije biljke, što rezultira povećanom proizvodnjom novih cvatova i pupoljaka. Tada često dolazi do normalnog, konačnog broja mahuna čak i nakon velike štete. U mnogim slučajevima to rezultira neusklađenim punjenjem mahuna s fotosintetskom površinom biljke što dovodi do manjeg broja sjemenki po mahuni i nešto većom masom tisuću sjemenki (Alford, 2003.). Biljke mogu čak i prekomjerno nadoknaditi štetu i dati veći prinos no takve mahune kasnije dozrijevaju što onemogućava ujednačenu žetvu (Williams, 2010.).

Najveće štete nastaju s ranim doletom sjajnika za ranog i toplog proljeća pa kada u vrijeme pojave cvjetnih pupova dođe do zahlađenja, budući da se tada period otvaranja cvjetnih pupova produžuje, a sjajnik se nastavlja hraniti peludom iz zatvorenih cvjetnih pupova čime se produžuje osjetljiva faza uljane repice. Štete od sjajnika veće su na slabo gnojenim usjevima zbog smanjene sposobnosti regeneracije biljke (Maceljski, 2002.).

2.4. Suzbijanje

Prema Maceljskom (2002.) jedno vrijeme smatralo se da napad sjajnika i nije štetan budući da samo dio cvjetova uljane repice daje plod, dok se kasnije kao prag odluke navodilo 3-5 sjajnika po biljci. Daljnja su istraživanja utvrdila da šteta ovisi o zarazi terminalnog cvata te o fazi razvoja pupova u vrijeme početka napada. Pragovi odluke prikazani su u tablici 2.4.1. Utvrđivanje visine populacije odnosno prognoza pojave štetnika provodi se od fenofaze 38-39 do fenofaze 55 otresanjem terminalnih cvatova (Gotlin Čuljak i sur., 2015.).

Tablica 2.4.1. Pragovi odluke za suzbijanje repičina sjajnika prema Maceljski (2002.)

Stadij	Opis stadija	Prag odluke (broj sjajnika / terminalnom cvatu)
BBCH 50	Cvjetni pupovi pokriveni lišćem, jedva se zamjećuju	0,8 – 1
BBCH 51	Pupovi postali vidljivi, stisnuti su zajedno i nediferencirani	1 – 1,5
BBCH 53-55	Početak diferencijacije pojedinih pupova	2 – 3
BBCH 60	Početak cvatnje	Prestanak šteta

Prema FIS-u (2024.) u Republici Hrvatskoj trenutno je registrirano 10 kemijskih sredstava za zaštitu uljane repice od repičina sjajnika, s time da je jednom od sredstava istekla registracija te je dozvoljena prodaja zaliha toga sredstva (Tablica 2.4.2.). Od 10 dozvoljenih sredstava za suzbijanje repičinog sjajnika osam ih pripada skupini sintetskih piretroida, a dva skupini neonikotinoida.

Tablica 2.4.2. Registrirana sredstva za suzbijanje repičinog sjajnika (FIS 2024.)

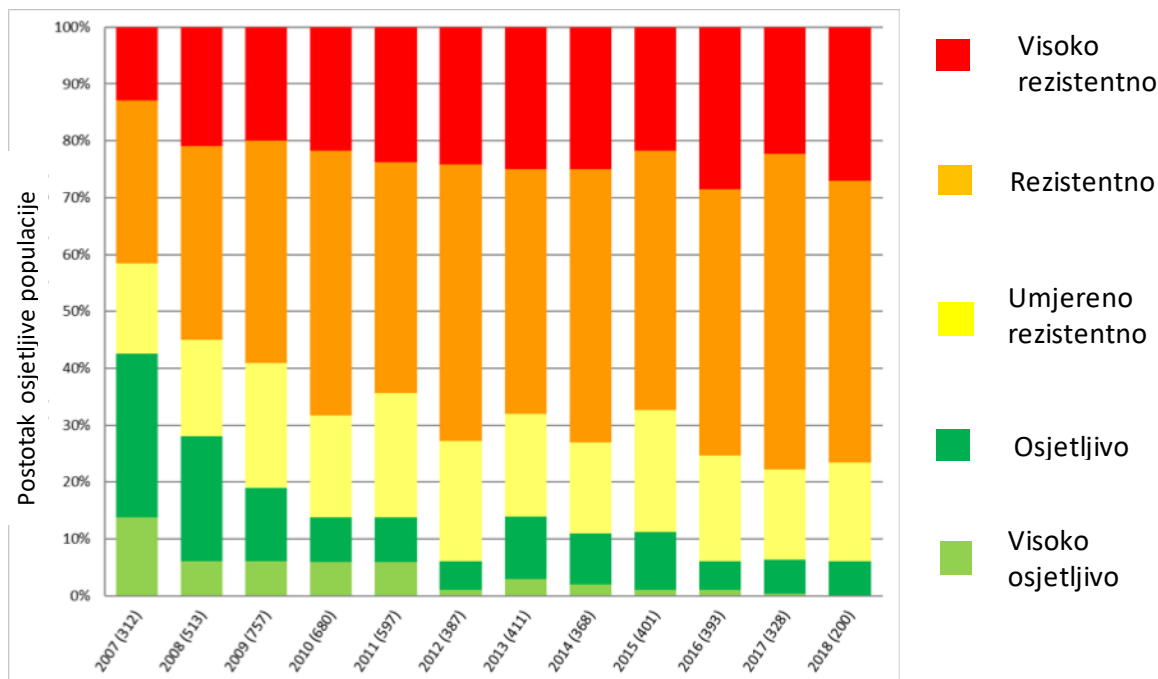
Naziv sredstva	Djelatna tvar	Vlasnik registracije
DECIS 2,5 EC	Deltametrin	BAYER AG
KARATE ZEON	Lambda-cihalotrin	Syngenta Crop Protection AG
SUMIALFA 5 FL	Esfenvalerat	Sumitomo Chemical Agro Europe S.A.S.
MOSPILAN 20 SG	Acetamiprid	Nisso Chemical Europe GmbH
POLECI	Deltametrin	Sharda Cropchem Limited
CYTHRIN MAX	Cipermetrin	Arysta Lifescience Benelux Srl
MOSPILAN 20 SP	Acetamiprid	Nisso Chemical Europe GmbH
CYCLONE (sredstvu istekla registracija, dozvoljena prodaja zaliha)	Lambda-cihalotrin	Sparta Research Ltd

POLECI PLUS	Deltametrin	Sharda Cropchem Limited
CYPGOLD	Cipermetrin	Arysta Lifescience Benelux

Prilikom početka uzgoja uljane repice na većim površinama u Republici Hrvatskoj pojava repičinog sjajnika bila je mala te se smatralo da će uvođenje pragova odluke smanjiti nepotrebnu potrošnju pesticida. Budući da se repica uzgajala na istim ili blizu prošlogodišnjih parcela došlo je do porasta populacije ovog štetnika zbog čega je napad sjajnika nakon 1980. godine svake godine bio iznad praga odluke o suzbijanju te se insekticidi počiju primjenjivati na svim površinama (Maceljski, 2002.). Korištenje piretroida za suzbijanje repičinog sjajnika bilo je puno učinkovitije od do tada korištenih organofosfornih insekticida koji nisu bili toliko djelotvorni pri niskim temperaturama (Maceljski, 2002.; Gotlin Čuljak i sur., 2015.).

U Republici Hrvatskoj kao i brojnim zemljama Europe utvrđena je rezistentnost repičinog sjajnika na piretroide zbog česte primjene ovih sredstava (Hansen, 2003.; Müller i sur., 2008.; Tiiliakanen i Hokkanen, 2008.; Philippou i sur., 2010.; Gotlin Čuljak i sur., 2015.; Gotlin Čuljak i sur., 2017.). Rezistentnost repičina sjajnika na piretroide prvi je put zabilježena na području sjeverne Francuske 1999. godine te se pojava rezistentnosti tijekom sljedećih nekoliko godina proširila Europom (IRAC, 2024.). Prva pojava rezistentnosti repičina sjajnika na piretroide u Republici Hrvatskoj dokazana je 2007. godine (Gotlin Čuljak i sur., 2013.).

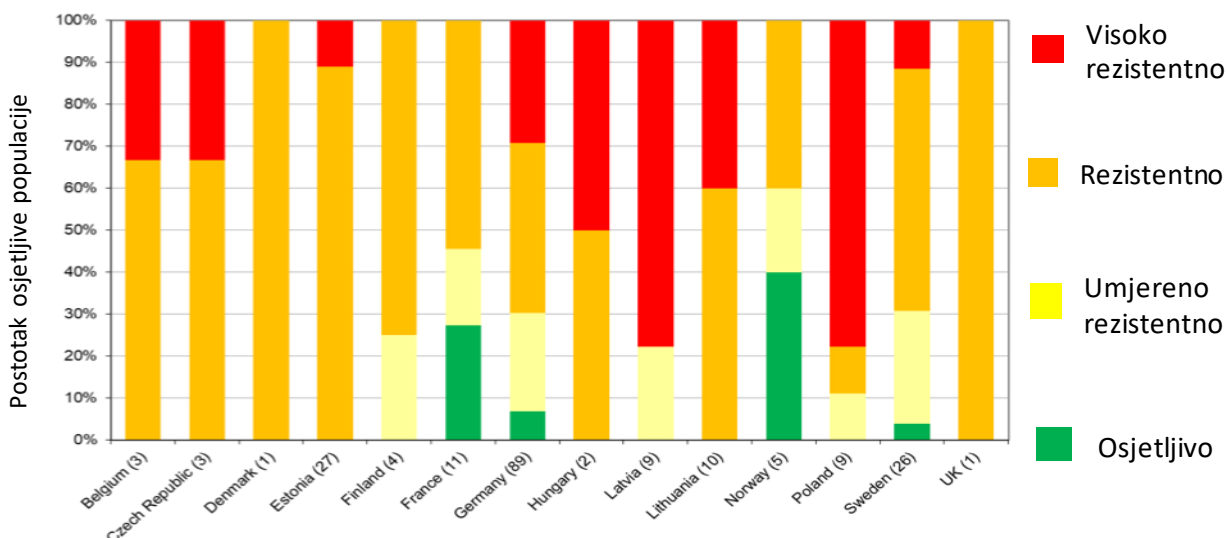
U istraživanju Gotlin Čuljak i sur. (2015.) provedenom tijekom 2013. i 2014. godine u Republici Hrvatskoj od 52 populacije repičinog sjajnika samo su četiri populacije bile osjetljive na piretroide (7,7 %) dok ih je 25 bilo umjereno rezistentno, a 23 rezistentno na piretroide. Prema IRAC (2018.) 2018. godine manje od 10 % testiranih populacija repičinog sjajnika može se smatrati osjetljivim na piretroide. Istraživanja osjetljivosti sjajnika na piretroide provedena od 2007. do 2018. godine (slika 2.4.1.) u Europskim zemljama pokazuju trend porasta rezistentnih populacija od 2007. godine na dalje, pretpostavlja se da su se rezistentne populacije stabilizirale na oko 85%. Nakon početnog pada broja osjetljivih populacija repičinog sjajnika primijećenog u Europi otkad su započela istraživanja 2007. godine, zabilježene su samo male varijacije u postotku osjetljivih i rezistentnih populacija repičinog sjajnika nakon 2010. godine (IRAC, 2018.).



Slika 2.4.1. Grafički prikaz promjena učinkovitosti piretroida u suzbijanju repičinog sjajnika

Izvor: IRAC <https://irac-online.org/documents/pollen-beetle-monitoring-poster-2018/?ext=pdf> -pristup 15.4.2024.

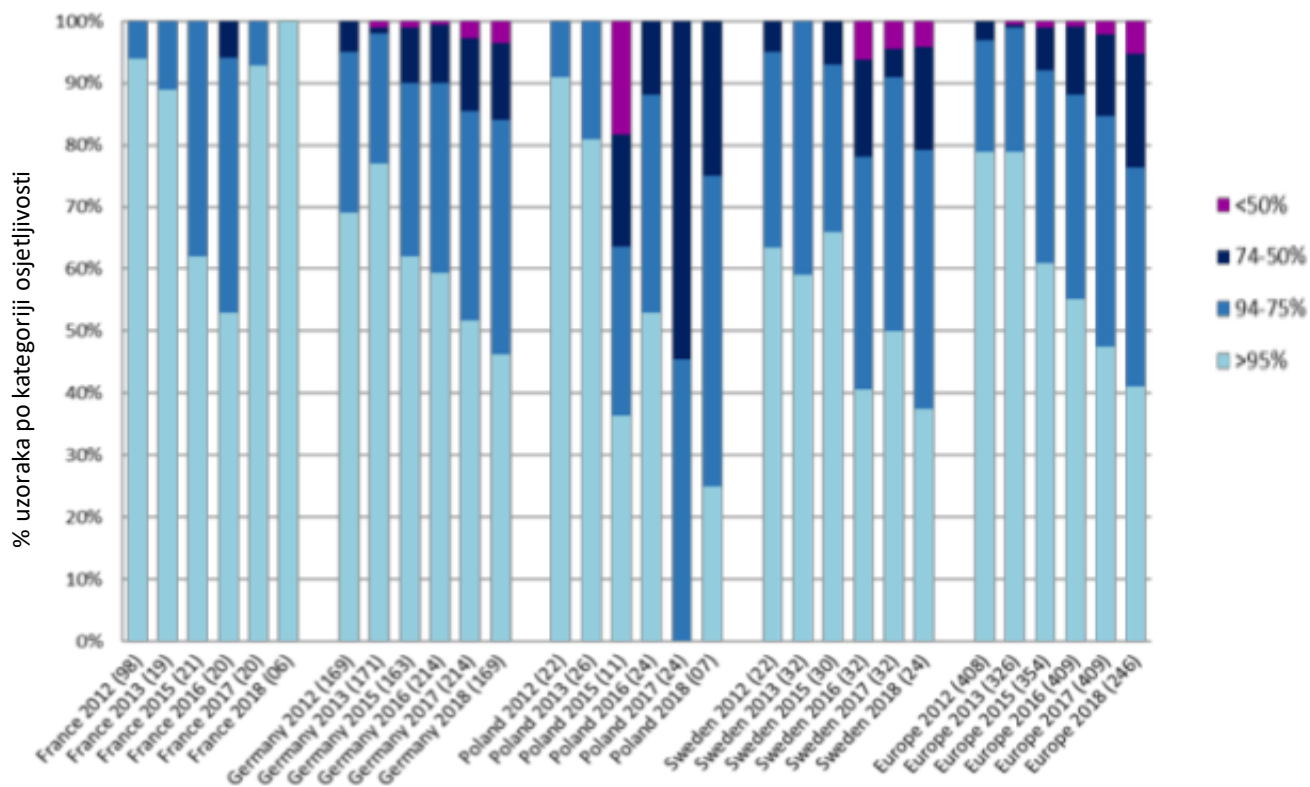
Prema IRAC (2018.) u većini Europskih zemalja gdje su provedena testiranja dominantne su populacije repičinog sjajnika rezistentne na piretroide te čine više od 60 %. Istraživanje osjetljivosti repičinog sjajnika na piretroide 2018. godine provedeno je u 14 zemalja Europe na ukupno 200 populacija repičinog sjajnika koristeći lambda-cihalotrin u dozama od 0.075 i 0.015 µg/cm² (slika 2.4.2.).



Slika 2.4.2. Osjetljivost repičina sjajnika na piretroide u Europi

Izvor: IRAC <https://irac-online.org/documents/pollen-beetle-monitoring-poster-2018/?ext=pdf> -pristup 15.4.2024.

Prema IRAC (2018.) u istraživanju provedenom od 2012. do 2018. (slika 2.4.3.) godine većina populacija repičinog sjajnika testiranih diljem Europe ostala je prilično osjetljiva na neonikotinoide insekticide. Međutim, postoji jasan trend povećanja populacije s nižom osjetljivošću (<75% mortaliteta). Uočena smanjena osjetljivost na neonikotinoide insekticide stalno se povećavala tijekom posljednje četiri godine istraživanja te je statistički značajna. Istraživanje je provedeno pri dozama od 1,44 µg/cm² tiakloprida.



Slika 2.4.3. Grafički prikaz promjene osjetljivosti repičina sjajnika na neonikotinoide u Europi

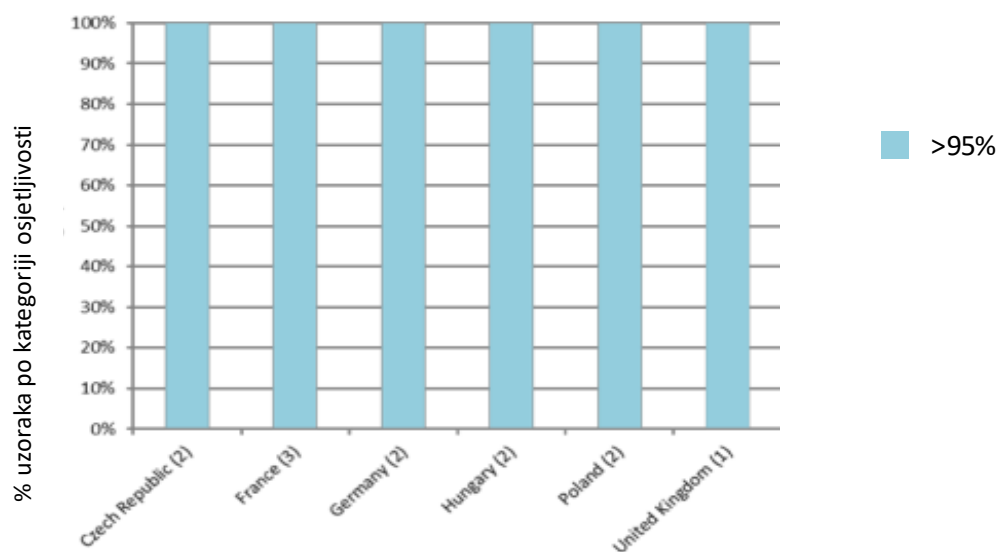
Izvor: IRAC <https://irac-online.org/documents/pollen-beetle-monitoring-poster-2018/?ext=pdf> -pristup 15.4.2024.

U istraživanju provedenom 2019. godine na području Republike Hrvatske (slika 2.4.4.) sve testirane populacije repičina sjajnika bile su rezistentne ili visoko rezistentne na neonikotinoide odnosno tiaklopid i acetamiprid. Na piretroide lambda-cihalotrin i cipermetrin bilo je osjetljivo svega 16,6%, dok su sve testirane populacije bile osjetljive na klorpirifos iz skupine organofosfornih insekticida koji su u međuvremenu izgubili dozvolu za primjenu u RH (Gotlin Čuljak i sur., 2019.). U zemljama Europe 2018. godine također su sve testirane populacije bile osjetljive na organofosforne insekticide (slika 2.4.5.) te je mortalitet testiranih populacija bio veći od 95% pri dozi od 0,3 µg/cm² klorpirifosa (IRAC, 2018.).

lokaliteti/doza	Rezultati provedenih testova osjetljivosti repičina sjajnika na insekticide (2019.)									
	OP insekticidi (1 B)		Piretroidi (3 A)				Neonikotinoidi (4 A)			
	klorpirifos		lambda-cihalotrin		cipermetrin		acetamiprid		tiakloprid	
	20%	100%	20%	100%	20%	100%	20%	100%	20%	100%
GRAD ZAGREB										
Sašincec	100	100	10	30	85	100	80	65	45	45
SISAČKO-MOSLAVAČKA ŽUPANIJA										
Janja Lipa	100	100	0	0	80	95	25	55	0	30
Lipovljani	100	100	0	0	80	95	50	20	10	25
BRODSKO-POSAVSKA ŽUPANIJA										
Dragalić	100	100	75	100	65	90	75	60	10	40
Rešetari	100	100	40	40	35	80	50	65	10	10
Lužani	100	100	5	10	30	75	45	75	25	25
KOPRIVNIČKO-KRIŽEVAČKA ŽUPANIJA										
Koprivnica	100	100	35	40	90	90	50	50	7,5	10
Đurđevac	100	100	25	25	50	75	30	30	5	10
VIROVITIČKO-PODRAVSKA ŽUPANIJA										
Sedlarica	100	100	5	10	5	25	0	10	0	20
Virovitica	100	100	50	55	75	95	10	15	0	5
POŽEŠKO-SLAVONSKA ŽUPANIJA										
Kula	100	100	0	0	80	100	65	75	0	20
Vetovo	100	100	50	100	65	80	15	40	5	20
legenda	visoko osjetljivo	osjetljivo	umjereno rezistentno	rezistentno	visoko rezistentno					

Slika 2.4.4. Osjetljivost repičina sjajnika na insekticide u Hrvatskoj

Izvor: Gotlin Čuljak i sur. (2019.) https://rezistentnost-szb.hr/images/uploads/Letak_repicin_sjajnik_TGC_final_2019.pdf -pristup 15.4.2024.



Slika 2.4.5. Osjetljivost repičina sjajnika na klorpirifos u Europi

Izvor: IRAC <https://irac-online.org/documents/pollen-beetle-monitoring-poster-2018/?ext=pdf> -pristup 15.4.2024.

U suzbijanju repičinog sjajnika važne su i preventivne mjere koje osim prognoze i signalizacije obuhvaćaju plodored, sjetvu uljane repice što dalje od prošlogodišnje parcele, *trap cropping* odnosno sjetva lovnih biljaka (ogrštica) na rubove parcela te *push-pull* strategija koja podrazumijeva primjenu volatilnih semiokemikalija (ulje lavande) koje imaju repelentno djelovanje na repičina sjajnika te je taj štetnik privučen na zasijane pojase ogrštice i štete na uljanoj repici su smanjene. Za smanjenje šteta u uljanoj repici važno je i očuvanje prirodnih neprijatelja repičina sjajnika odnosno konzervacijska metoda biološkog suzbijanja (Gotlin Čuljak i sur., 2019.).

Push-pull je formalizirana strategija borbe protiv štetnika koja kombinira atraktantne i repelentne semiokemikalije za manipuliranje populacijom štetnika i prirodnih neprijatelja. Štetnici su odvrćeni od naseljavanja usjeva tj. 'izgurani' (*push*) koristeći repelentne sorte usjeva ili repelentne volatilne tvari, tvari koje odvrćaju od hranjenja (*antifeedant*) i feromoni koji sprječavaju ovipoziciju. Štetnici se istovremeno 'odvlače' od usjeva (*pull*) u zamke ili lovne biljke koristeći atraktante kao što su volatilne tvari biljke domaćina ili spolni feromoni (Mauchline i sur., 2017.) .

Kao najvažnije parazitoide repičinog sjajnika u Europi Ubler (2017.) navodi vrste *Phradis interstitialis* (Thomson 1889), *Phradis morionellus* (Holmgren 1860), *Tersilochus heterocerus* (Thomson 1889), *Diospilus capito* (Nees 1834). Prema Alfordu (2003.) i Williams (2010.) u Europi je prisutno devet vrsta parazitoida repičinog sjajnika, te su sve vrste endoparaziti ličinki ili jaja te pripadaju redu Hymenoptera. Parazitoidi odraslih oblika repičinog sjajnika nisu zabilježeni. Zabilježene predatorske vrste koje se hrane repičinim sjajnikom su uglavnom generalni predatori kao što su trčci i pauci. Pauci iz porodice Lycosidae hrane se ličinkama repičinog sjajnika koje su se spustile na tlo radi kukuljenja, dok pauci iz porodice Theridiidae pletu mrežu među cvatovima. Trčci su često prisutni u visokim populacijama u usjevima uljane repice, hrane se jajima, ličinkama i kukuljicama repičinog sjajnika većinom na površini, ali i u gornjim slojevima tla (Alford, 2003.). Prema Alfordu (2003.) rezultati istraživanja provedena kako bi se utvrdio utjecaj trčaka na smanjenje populacije repičinog sjajnika znatno se razlikuju. Neki autori navode smrtnost ličinki repičinog sjajnika u tlu i do 65% (Scherney, 1959.) dok drugi (Goltermann, 1994.) navode smrtnost od 20%, Hokkanen i sur. (1988.) zabilježili su smrtnost repičinog sjajnika uzrokovanu predatorima od samo 3% u Finskoj.

Patogene mikrogljive čija infekcija repičinog sjajnika je zabilježena prema Alford (2003.) su: *Metarhizium anisopliae* (Sorokin 1883) , *Beauveria bassiana* ((Bals.-Criv.) Vuill. (1912)) i *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize 1904). Iako su entomopatogene mikrogljive prisutne u većini tala na kojima se uzgaja uljana repica, niska brojnost spora u tlu može ograničiti njihovu učinkovitost u suzbijanju repičinog sjajnika. Jedinstvena eko-kemija rizosfere usjeva biljaka iz porodice Brassicaceae može suzbiti aktivnost mikrogljiva u tlu (Alford, 2003.).

Entomopatogene nematode *Steinernema* sp. i *Heterorhabditis* sp. prisutne su u kultiviranim tlima, ali često u premalom broju da bi imali značajan utjecaj na populaciju repičinog sjajnika i drugih insekata. Infekcija i uginuće ličinki repičinog sjajnika ovim

nematodama dokazano je u laboratorijskim uvjetima te je provedeno nekoliko istraživanja u polju koja nisu dala konzistentne rezultate (Alford, 2003.).

3. *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1912)

3.1. Taksonomija i filogenija

Domena: Eukaryota

Carstvo: Fungi

Odjel: Ascomycota

Razred: Sordariomycetes

Red: Hypocreales

Porodica: Cordycipitaceae

Rod: *Beauveria*

Vrsta: *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (1912)

Prva istraživanja s *B. bassiana* započela su 1835. godine kada je Agostino Bassi di Lodi dokazao da mikrogljive mogu zaraziti kukce. Zabilježio je bolest uzrokovanu *B. bassiana* na dudovom svilcu (*Bombyx mori* L. 1758) te ju je nazvao 'bolest bijelog muskardina'. Mikrogljivu je potom proučavao talijanski naturalist Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli koji ju je nazvao *Botrytis bassiana* u čast Bassiu. 1912. godine mikolog Jean Paul Vuillemin je nazvao rod *Beauveria* po botaničaru i mikologu Jeanu Beauverieu koji je proučavao mikrogljivu prije njega (Zimmermann, 2007.).

Zbog nedostatka poznatog spolnog ciklusa, rod *Beauveria* smatrao se anamorfnim (nespolnim) rodnom mikrogljiva, skupinom bez ikakve teleomorfne veze. Nedavna molekularna istraživanja uspostavila su filogenetsku vezu između anamorfnog stadija roda *Beauveria* s teleomorfnim stadijem roda *Cordyceps* te je dokazana anamorf-teleomorf veza između vrsta *B. bassiana* i *Cordyceps bassiana*. Teleomorfi roda *Bassiana* rijetko se nalaze u prirodi te su dosad zabilježeni i opisani u istočno-azijskim zemljama. Mikrogljiva *C. bassiana* zabilježena je u Kini i Južnoj Koreji (Imoulan, 2017.). U filogenetskom istraživanju *B. bassiana* Rehner i Buckley (2005.) navode da ta vrsta nije mono-filetska, odnosno da postoje dvije različite linije tj. kladusa *B. bassiana*. Jedan je kladus globalno prisutan i uključuje azijski teleomorf, dok je drugi kladus anamorfan i prisutan u Europi i Sjevernoj Americi.

Vrsta *B. bassiana* uključuje još uvijek nedeterminirani broj kriptičnih linija, mnoge od njih s interkontinentalnom distribucijom koje se pojavljuju kao viševrsne skupine u prirodnim i poljoprivrednim staništima (Rehner i sur., 2011.).

3.2. Morfologija

Vrste roda *Beauveria* lako se mogu identificirati na razini roda koristeći morfološke karakteristike no raspoznavanje vrsta unutar roda otežano je zbog sličnih morfoloških karakteristika vrsta koje su filogenetski udaljene (Rehner i sur., 2011.). Konidiofori mikroglijiva roda *Beauveria* sastoje se od prstenastih i gustih skupina konidiogenih stanica, koje su prozirne s glatkim stijenkama, konidiogene su stanice simpodialne, kratke i globularne ili bačvaste s apikalnim nazubljenim drškom koji im daje izražen cik-cak izgled. Proizvode niz jednostaničnih, nepokretnih, prozirnih, holoblastičnih konidija (Imoulan, 2017.). Vrste roda *Beauveria* prvenstveno se razlikuju prema karakteristikama njihovih konidija, koje su obično glatkih stjenki, prozirne, 1,5–5,5 μm duge i okruglog do cilindričnog oblika ili vermiformne (Rehner i sur., 2011.). U kulturi, vrste roda *Beauveria* općenito rastu sporo, vunastog su izgleda, rijetko formirajući sinemate, bijele su ili žućkaste boje, ponekad roze. Zračne hife su prozirne, s glatkim i tankim stijenkama, labave ili ponekad fascikulirane. Stare kolonije postaju praškaste zbog velikog broja konidija različitih oblika, od globularnih, podglobularnih i elipsoidnih do cilindričnih (Imoulan, 2017.).

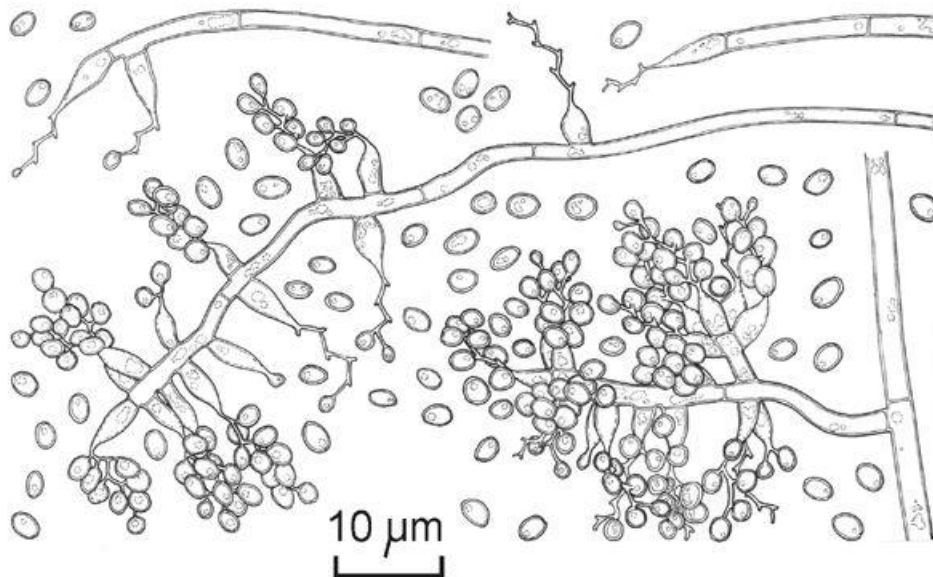
Vrsta *B. bassiana* stvara gusti bijeli micelij na egzoskeletu domaćina (slika 3.1.1.), ponekad sinematozan (tvoreći uspravne nakupine hifa), konidiogene stanice obično se nalaze u gustoj skupini, bezbojne, s globularnom ili bačvastom bazom i dentikuliranim drškom koji nosi po jednu konidiju na dršku, konidije su neseptirane. Konidiogene stanice apikalno se produžuju u simpodijalni držak. Konidije su gotovo globularne duge $<3.5 \mu\text{m}$ (Goettel i Inglis, 1997.). Mikroglijivu *B. bassiana* karakteriziraju bijele, kasnije žućkaste ili povremeno crvenkaste kolonije. S donje strane nema boje, ili je žućkasta do crvenkasta. Konidiogene stanice (slika 3.1.2.) sastoje se od globularnog do bačvastog baznog dijela i drškom dugom do 20 μm , uglavnom tvoreći cik-cak izgled. Konidije su prozirne, globularne do široko eliptične, uglavnom 2–3 x 2–2,5 μm duge. Konidije se formiraju u grozdovima, poput snježnih grudica ili vate (Zimmerman, 2007.).

B. bassiana može proizvesti tri različite vrste infektivnih jedinica pod različitim uvjetima okoline. Zračne konidije, blastospore i submerzne konidije definirane su kao "vrste infektivnih jedinica" prema Vega i Kaya (2012.): (1) tankozidna, jednostanična hifalna tijela, poznata kao blastospore, koje nastaju pod submerznim uvjetima, (2) konidije nastale na čvrstom mediju, i (3) submerzne konidije nastale u tekućim kulturama. Ove tri infektivne jedinice koje proizvodi *B. bassiana* pokazuju različite morfološke i biokemijske karakteristike. Zračne konidije imaju površine stanica koje su hidrofobne, dok su površine stanica blastospora i submerznih konidija hidrofилne (Sui i sur., 2022.).



Slika 3.1.1. *Beauveria bassiana* na domaćinu

Izvor: Wikipedia https://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana -pristup 25.4.2024.



Slika 3.1.2. Konidiofore i konidije mikrogljive *Beauveria bassiana*

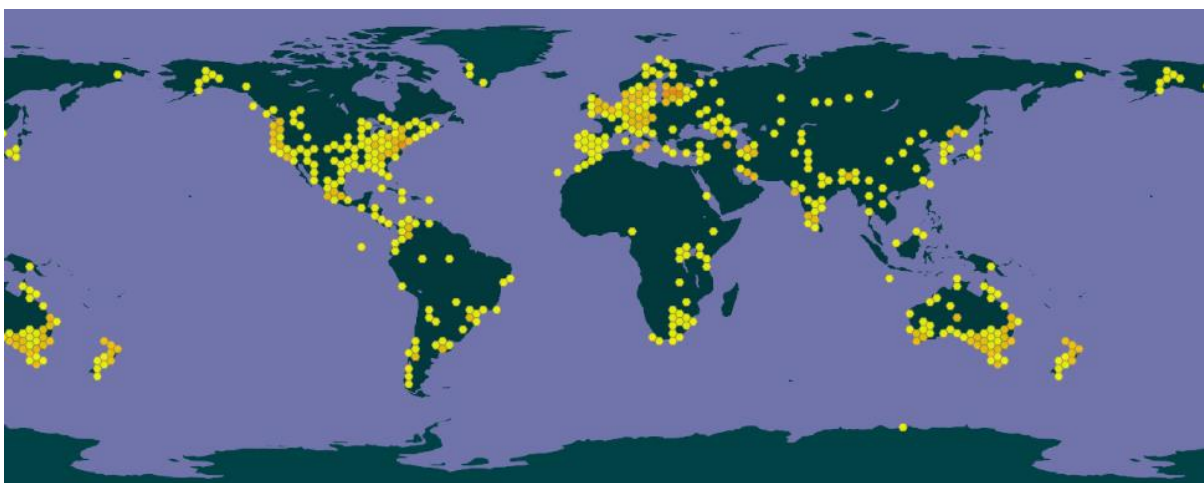
Izvor: CABI <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/PWKB.Species.8785> -Pristup 25.4.2024.

3.3. Ekologija

B. bassiana sveprisutna je kozmopolitska entomopatogena mikrogljiva (slika 3.3.1) koja je pronađena i izolirana iz širokog spektra kukaca različitih redova. Vrsta *B. bassiana* ima 707 vrsta kukaca domaćina, uključujući 521 rod i 149 porodicu iz 15 redova (Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattaria i Embioptera), te 13 vrsta domaćina iz podrazreda Acarina raspoređenih u sedam rodova i šest porodica. Iako je vrsta *B. bassiana* izolirana iz velikog broja vrsta kukaca, poznato je da većina izolata ove mikrogljive ima ograničen raspon domaćina (Imoulan, 2017.).

Staništa vrste *B. bassiana* variraju od alpskog tla, livada, tresetišta, tla s vegetacijom savane, šuma i obrađenih tala, pješčanih nasipa i dina, pustinskog tala do tekuće vode. Također, izolacije s rizoplana močvarnih biljaka, rizosfere djeteline, mrtve kore drveta, gnijezda, perja i izmeta ptica su zabilježene. *B. bassiana* izolirana je i s površine i unutrašnjosti biljaka kao i iz zraka (Zimmerman, 2007.).

Istraživanja pokazuju da se *B. bassiana* može potencijalno uključiti u interakciju s biljkama. Endofitska aktivnost *B. bassiana* zabilježena je na kukuruзу (*Zea mays*), kakau (*Theobroma cacao*), maku (*Papaver somniferum*), kavi (*Coffea* spp.) i rajčici (*Solanum lycopersicum*). *B. bassiana* također je izolirana iz filoplana raznih biljaka živice u Danskoj. Endofitska aktivnost mikrogljiva često se smatra kao mutualizam između biljke i mikrogljive u kojem mikrogljive imaju obrambenu ulogu štiteći biljke od herbivornih kukaca (Meyling i Eilenberg, 2007.). Endofitska aktivnost *B. bassiana* također dokazano djeluje stimulirajuće na rast biljaka te štiti biljku od fitopatogenih mikrogljiva kao što su *Botrytis* sp. i *Alternaria* sp. (Sui i sur., 2020.; Sino i sur., 2021.).



Slika 3.3.1. Distribucija mikrogljive *B. bassiana*

Izvor: GBIF <https://www.gbif.org/species/2560612> -pristup 15.4.2024.

Na razmnožavanje i preživljavanje svakog mikroorganizma u okolišu snažno utječu nekoliko abiotičkih i biotičkih čimbenika. Najvažniji abiotički okolišni ograničavajući faktori za

mikrogljive uključujući *B. bassiana* su temperatura, vlaga ili vlažnost te sunčevo zračenje (Zimmerman, 2007.).

Temperatura može utjecati na mikrogljivu *B. bassiana* na različite načine, utječući na klijanje, rast i sposobnost preživljavanja mikrogljive *B. bassiana* na i u domaćinu te u okolišu. Visoke temperature mogu inaktivirati mikrogljivu *B. bassiana* prije kontakta s kukcem domaćinom ili mogu smanjiti ili ubrzati rast unutar kukca, ovisno o temperaturnim zahtjevima mikrogljive i domaćina. Suprotno tome, niske temperature mogu smanjiti ili zaustaviti klijanje i rast, time zaustaviti ili produžiti uspješnu infekciju, primjerice protiv štetnih kukaca koji žive u tlu. Kod *B. bassiana*, optimalna temperatura je između 23°C i 28°C, minimalna je između 5°C i 10°C, a maksimalna je oko 30°C do 38°C, ovisno o testiranim izolatima (Zimmerman, 2007.).

Vlažnost je vrlo važan okolišni faktor koji utječe na učinkovitost i preživljavanje mikrogljive. Klijanje spora na kutikuli kukca i sporulacija nakon izbijanja iz mrtvog domaćina insekta zahtijevaju visoku vlažnost. S druge strane, visoka ili niska vlažnost zajedno s visokom temperaturom može utjecati na održivost i postojanost spora. Kod razmatranja učinka vlage u poljskim uvjetima, nužno je razlikovati makroklimat ili makrovlažnost i mikroklimat ili mikrovlažnost na površini lista ili kukca domaćina. Uglavnom, raspon relativne vlažnosti (RV) potreban za klijanje konidija *B. bassiana* iznosi 100 – 92 %. Pri relativnoj vlažnosti od 99% dolazi do blagog smanjenja klijanja, dok je klijanje i rast usporen pri 94% i 92%. Međutim, gljivične infekcije kukaca primijećene su pri relativno niskim makrovlažnostima od 60% do 70%. Pretpostavlja se da je mikrovlažnost na površini integumenta domaćina ili lišća bila veća u tim slučajevima. Uspješna infekcija pri niskim relativnim vlažnostima također je primijećena kod uljnih formulacija (Zimmerman, 2007.).

Sunčeva svjetlost, posebno UV-B (290–330 nm) i UV-A (330–400 nm), najštetniji je okolišni faktor koji utječe na vijabilnost konidija u polju. U laboratorijskim eksperimentima pod simuliranom sunčevom svjetlošću, 99% svih konidija *B. bassiana* bilo je inaktivirano nakon gotovo 16 minuta pod UV-C zrakama, te nakon otprilike 31 minute pod UV-A i UV-B zrakama (Zimmerman, 2007.).

3.4. Patogeneza

Zimmerman (2007.) podijelio je proces infekcije na sljedeće faze:

- 1) Pričvršćivanje spora na kutikulu kukca
- 2) Klijanje spora
- 3) Penetracija kroz kutikulu
- 4) Nadvladavanje reakcije i odgovora imunološkog sustava domaćina
- 5) Proliferacija unutar tijela domaćina hifalnim tijelima ili blastosporama
- 6) Saprofitski rast hifa iz tijela mrtvog domaćina i tvorba novih konidija

Razdoblje inkubacije ovisi o vrsti domaćina, stadiju domaćina, temperaturi i virulenciji soja mikrogljive. Kod lisnih uši može trajati 3 – 4 dana, dok kod ličinki truležara (*Scarabaeidae*) traje 2 - 4 tjedna. Tijekom razdoblja inkubacije, gljiva može utjecati na domaćina uzrokujući promjene u ponašanju i prehrani, smanjenje tjelesne težine ili plodnosti, malformacije ili groznicu (Zimmerman, 2007.).

1) Infekcija domaćina većine entomopatogenih mikrogljiva uključujući *B. bassiana*, sastoji se od konidijalnog pričvršćenja na kutikulu iako može ući i kroz dišni sustav, nakon čega slijedi klijanje i infekcija kukca (Mwamburi, 2020.). Pričvršćivanje spora posljedica je hidrofobnosti konidija kao i površine kutikule. Kod *B. bassiana*, konidije sadrže protein hidrofobin na svojoj vanjskoj površini. Nakon početnog pričvršćivanja konidija luči adhezivnu sluz za bolje prijanjanje. Mikrogljive reda *Hypocreales* općenito zahtijevaju visok prag broja konidija potrebnih za izazivanje infekcije koji, mjeren u smislu koncentracije konidija u tekućoj suspenziji primijenjenoj na domaćina, iznosi od 10^2 do 10^9 mL⁻¹ (Chandler, 2017.).

2) Klijanje i uspješna infekcija ovise o nizu čimbenika, npr. osjetljivost domaćina i stadij domaćina i određenim okolišnim čimbenicima, kao što su optimalna temperatura i vlaga. Na klijavost dodatno utječu određeni kutikularni lipidi, kao što su kratko-lančane masne kiseline, aldehidi, esteri voska, ketoni i alkoholi koji mogu imati antimikrobno djelovanje. Međutim, kutikula također može biti prekrivena s tvarima koje su važne za prepoznavanje mikrogljivama, poput slobodnih aminokiselina ili peptida i može potaknuti pričvršćivanje i klijanje. Općenito, klijanje konidija *B. bassiana* počinje nakon otprilike 10 h i uglavnom se završava nakon 20 h pri temperaturi od 20 – 25 °C. (Zimmerman, 2007.). Okolišni čimbenici kao što su relativna vlažnost, temperatura i sunčevo zračenje imaju značajan utjecaj na klijanje i rast hifa. Klijanje spora zahtijeva prisutnost vode i kisika i karakterizirano je brzim bubrenjem kao posljedica hidratacije. Upijanje vode u konidije osmozom povećava njen unutarnji hidrostatski tlak nakon čega slijedi formacija klične cijevi tankih stijenki. Za klijanje je potreban minimalni ekvilibrij relativne vlažnosti (ERH) od 93% na mjestu infekcije. Konidije *B. bassiana* su male i imaju ograničene rezerve hranjivih tvari, a iako se upijanje vode događa bez prisutnosti egzogenog hranjiva, klijanje klične cijevi dogoditi će se jedino u prisutnosti odgovarajućeg izvora ugljika

(Chandler, 2017.). Razvijajuće hife mikrogljive koriste epikutikularne lipide i voskove za razvoj, istraživanja s *B. bassiana* identificirala su najmanje 16 gljivičnih enzima uključenih u oksidativnu degradaciju i asimilaciju epikutikularnih lipida. Međutim, neki kutikularni lipidi posjeduju protugljivična svojstva, a njihova sinteza na kutikuli vjerojatno je nastala kao obrambeni mehanizam za sprječavanje prijanjanja konidija odnosno klijanja dok kod nekih vrsta kukaca žlijezde luče sekrete koji sadrže razne kemijske tvari antifungalnog djelovanja. Takvi aktivno sintetizirani obrambeni mehanizmi, skupa s činjenicom da je površina kutikule relativno siromašna dostupnim hranjivima, mogu znatno produžiti srednje vrijeme klijanja na oko 30 h (Chandler, 2017.).

3) Infekcijska strategija odnosno prodor hifa kroz kutikulu kukca uključuje kombinaciju mehaničkog pritiska i degradacije kutikule pomoću enzima kao što su proteaze, lipaze, esteraze i hitinaze, proteinskih toksina uključujući beauvericin, bassianin i oosporein (Mwamburi, 2020.). Mikrogljiva prodire kroz tanja, nesklerotizirana područja kutikule, npr. zglobova, između segmenata ili usnih dijelova. Prije penetracije, klične cijevi mogu proizvoditi takozvane apresorije i infekcijske klinove (Zimmerman, 2007.). Prokutikula je glavna fizička prepreka infekciji i mora biti probijena prije nego što se mikrogljiva može umnožiti unutra domaćina. Prijelaz od lateralne ekstenzije hifa preko površine epikutikule do stvaranja penetracijskih struktura je tigmotropni proces: zahtijeva određenu količinu fizičkog kontakta između mikrogljive i kutikule kako bi se potaknulo stvaranje gljivičnih penetracijskih struktura (Chandler, 2017.).

4) Penetraciju slojeva kutikule i početak invazije kukca prate nekoliko reakcijskih odgovora tijela domaćina kao što je produkcija fenoloksidaze i određenih hemocita te melanizacija. Interakcije između penetrirajuće mikrogljive i imunološkog sustava kukca su kompleksne i sastoje se od brojnih staničnih i molekularnih reakcija. Tijekom procesa infekcije, *Beauveria* spp. proizvodi proteolitičke enzime i toksine, dok kukci domaćini odgovaraju sa staničnim i humoralnim obrambenim reakcijama. Te se reakcije sastoje od proizvodnje antifungalnih spojeva, inducibilnih inhibitora proteaza i proteina koji detoksificiraju fungalne toksine u kukcima (Zimmerman, 2007.). Razvijajuće gljivične hife rastu unutar međuprostora kutikule sve dok ne prođu u hemocel, koji zatim pokreće dvije međusobno povezane i brze imunološke reakcije: inkapsulacija napadajućih gljivičnih stanica i melanizacija gljivičnog tkiva i okolinog područja. Hemociti kukca važni su za ove reakcije i sastoje se od tri funkcionalne skupine: (1) plazmatociti, koji čine većinu hemocitnih stanica koje cirkuliraju u kukcu i koji djeluju kao fagociti bakterija i drugih malih mikrobnih stanica; (2) kristalne stanice, koje su uključene u reakciju melanizacije i proizvode profenoloksidaze; i (3) lamelociti, koji su uključeni u enkapsulaciju velikih infektivnih objekata koji su preveliki za fagocite. Detekcija invazivnog tijela rezultira velikim povećanjem sinteze lamelocita iz prekursora, koji potom formiraju kapsulu koja okružuje strano tijelo unutar koje se odvija melanizacija. Melanizacija se također odvija u kutikuli te u hemolimfi gdje se javlja kao slobodna reakcija gotovo istog trenutka nakon prodora hifa. Invazija hemocela također inicira

sistemske/humoralni imunološki odgovor, koji rezultira sintezom niza antifungalnih imunoloških efektora domaćina. Za pokretanje sustavnog imunološkog odgovora potrebno je više vremena nego za pokretanje staničnog odgovora, pri čemu sinteza efektora doseže vrhunac 6-24 h nakon infekcije kod vrste *Drosophila melanogaster* (Chandler, 2017.). Tijekom infekcije mikrogljiva luči i sekundarne metabolite koji onesposobljavaju imunološki sustav domaćina, izmjenjuju ponašanje domaćina i čuvaju resurse domaćina od konkurentskih entomopatogena i saprofita (Mwamburi, 2020.). Neki od tih metabolita su beauvericin, bassianin, bassianolid, beuverolidi, beauveriolidi, tenelin, oosporein, oksalna kiselina i bassiakridin te posjeduju antibiotska, citotoksična i insekticidalna sredstva (Zimmerman, 2007.).

5) *B. bassiana* i ostale entomopatogene mikrogljive reda Hypocreales razvile su strategije koje im omogućavaju da izbjegnu i nadvladaju antifungalni stanični obrambeni sustav domaćina, uključujući vlastite morfološke promijene koje se događaju nakon prodora u hemocel. Mikrogljiva prestaje s rastom hifa i počinje stvarati mala hifalna tijela tankih stijenki nalik kvascu (blastospore). Takva tijela omogućavaju brzo širenje hemolimfom kukca i izbjegavanje detekcije od strane molekula za prepoznavanje patogena iako su podložna fagocitozi od strane plazmocita (Chandler, 2017.). Nakon uspješnog prodiranja mikrogljiva progresivno napada hemocel kukca kroz oštećenu kutikulu kroz koju primarno raste kao hife i stvara kraća hifalna tijela tj. stanice (stanje rasta slično kvascima) koje se pasivno šire hemolimfom. Jednom kada prodru unutar tijela kukca, entomopatogene mikrogljive iskorištavaju hranjive tvari hemolimfe i masno tkivo kukca domaćina za daljnju proliferaciju i proizvodnju toksina koji na kraju ubijaju kukce. Zbog iscrpljivanja hemocelnih hranjivih tvari, hife prorastaju na površinu tijela uginulog kukca gdje sporuliraju tvoreći konidije, što rezultira prepoznatljivom mumifikacijom domaćina (Imoulan, 2017.; Zimmerman, 2007.). Kod uspješnih infekcija meko tkivo kukca u potpunosti je prekriveno micelijem mikrogljive (Chandler, 2017.).

6) Smrt domaćina nastaje kao posljedica fizičkog oštećenja i gubitka normalnih tjelesnih funkcija nakon gljivične kolonizacije tkiva i organa, djelovanja gljivičnih metabolita, gubitka vode i gladovanja. Vrijeme do smrti domaćina, koje varira od 3-20 dana nakon inokulacije, ovisi o nizu čimbenika: vrsti domaćina, fiziološkom stanju domaćina (gladovanje, vrsta hrane kojom se hranio kao i unos biljnih sekundarnih metabolita, prenapućenost, i drugi oblici stresa koji mogu utjecati na osjetljivost domaćina do infekcije), primljena doza spora, vrsta i soj mikrogljive i okolišnim uvjetima (Chandler, 2017.). Nakon smrti domaćina, mikrogljiva prorasta kroz kutikulu kako bi proizvela nove spore. Kod kukaca s tvrdim egzoskeletom probijanje hifa na površinu obično se događa na dijelovima tijela kukca gdje je kutikula najtanja, kao što prijelazi između segmenata tijela, dok kod kukaca s mekšim egzoskeletom mikrogljiva se probija kroz kutikulu na svim dijelovima tijela. Vanjski porast mikrogljive i sporulacija zahtijevaju povoljne uvjete temperature i vlage (Chandler, 2017.). Nakon smrti domaćina i pod vlažnim uvjetima, mikrogljiva počinje svoj razvoj u saprofitsku fazu izlaskom

iz tijela domaćina i stvaranjem zračnih konidija na vanjskoj površini tijela uginulog kukca. U vrlo suhim uvjetima mikroglijive također mogu postojati u stadiju hife unutar tijela ili kao kod skakavaca u Africi stvarati svoje konidije unutar tijela uginulog domaćina. Prosječno vrijeme sporulacije iznosi 4 – 6 dana nakon početne infekcije (Zimmerman, 2007.; Mwambari, 2020.). Konidije se ispuštaju pasivno tijekom kratkog razdoblja, najčešće tijekom nekoliko dana te se mogu nakupiti u tlu u velikim količinama. Podložni domaćini mogu se zaraziti konidijama izravno dolazeći u kontakt s uginulim mumificiranim kukcem ili neizravno dolaskom u kontakt s konidijama u tlu ili lišću. Zbog toga što su izrazito sitne, konidije se mogu širiti i kapljicama vode ili vjetrom te pomoću organizama koji nisu podložni infekciji kao što su skokunci (Collembola) koji prenose konidije na svojoj kutikuli (Chandler, 2017.).

3.5. Sekundarni metaboliti

Mikroorganizmi, a naročito mikrogljive, proizvode široku paletu spojeva ili metabolita, većinom unutar njihovog sekundarnog metabolizma, koji općenito imaju različite aktivnosti i funkcije (Zimmerman, 2007.). Nakon što je klična cijev penetrirala u kutikulu kukaca, blastospore oslobađaju neke toksine koji pridonose smrti kukca modulirajući i stanični i humoralni imunološki odgovor i smanjujući količinu hranjivih tvari i mikroba kukaca. Pigmenti koje proizvodi *B. bassiana*, uglavnom crvene i žute boje, bitni su u procesu patogeneze kukca i imaju antivirusna, citotoksična kao i antimikrobna svojstva protiv bakterija kliničkog interesa i fitopatogenih gljiva (Avila-Hernandez i sur., 2020.).

Beauvericin je prirodni bioaktivni spoj, dvostruke prirode. S jedne strane, posebne karakteristike ove molekule daju mu zanimljiva svojstva, kao što su antibakterijska, antivirusna, antifungalna, antiparazitska, insekticidna i antikarcinogena aktivnost. S druge strane, prirodni je kontaminant hrane i hrane za životinje i mikotoksin, te nedostaju toksikološke procjena rizika dugoročnog izlaganja (Caloni i sur., 2020.). Beauvericin je najvažniji spoj koji je prvi put zabilježen iz izolata *B. bassiana*. Beauvericin je toksični ciklički heksadepsipeptid i sadrži ciklički ponavljajući niz od tri molekule N-metil fenilalanina koji se izmjenjuju s tri molekule 2-hidroksi izovalerijanske kiseline. Ne proizvode svi izolati *B. bassiana* beauvericin u *in vitro* uvjetima. Beauvericin je također izoliran iz drugih gljiva kao što su *Paecilomyces* spp. i *Fusarium* spp. zbog čega je česta njegova pojava na žitaricama. Istraživanja beauvericina pokazala su da ovaj metabolit djeluje insekticidno, antibiotski, citotoksično te posjeduje i ionoforna svojstva. Zabilježena su i antimikobakterijska i antiplazmodijska svojstva beauvericina. Beauvericin je specifični inhibitor kolesterol aciltransferaze i toksičan je za ličinke *Artemia salina* (vrsta vodenih račića), kukce te mišje i ljudske stanične linije. Može potaknuti programiranu staničnu smrt sličnu apoptozi i uzrokuje citolizu (Zimmerman, 2007.).

Bassianin i tenelin dva su žuto-obojena ne-peptidna sekundarna metabolita koji inhibiraju ATP-aze eritrocitnih membrana. Bassianolid je ciklički oktadepsipeptid kojeg proizvodi *B. bassiana* te posjeduje ionoforska i antibiotska svojstva slična beauvericinu. Bassiakridin je toksični protein izoliran iz soja *B. bassiana* koji je inficirao skakavce te je pokazao izraženu insekticidnu aktivnost protiv skakavaca, struktura mu je donekle slična proteinima kod kvasaca koji se vežu za hitin (Zimmerman, 2007.; Avila-Hernandez i sur., 2020.).

Beauveriolidi i beauverolidi su peptidi slične strukture kao beauvericin i bassianolid. Beauveriolidi imaju potencijal za korištenje u humanoj medicini. Beauveriolidi I i III pokazali su snažnu inhibicijsku aktivnost nakupljanja lipidnih kapljica u primarnim peritonealnim makrofagima miševa. Oni su prvi mikrobnici ciklopepsipeptidi s dokazanim antiaterosklerotskim učincima *in vivo* i obećavajući su kao potencijalni spojevi antiaterosklerotskih agensa (Zimmerman, 2007.; Avila-Hernandez i sur., 2020.).

Oosporein je identificiran prije više od 70 godina kao pigment u askomiceti *Oospora colorans* te je zabilježen kod brojnih vrsta mikrogljiva uključujući *Beauveria* spp. Pripisuju mu se brojna svojstva, uključujući antimikrobno, antiviralno, antiproliferativno i citotoksično

djelovanje. Rezultati istraživanja pokazuju da je mala vjerojatnost da oosporein funkcionira kao toksin kukaca ili da je uključen u rane ili srednje procese infekcije, uključujući penetraciju i izbjegavanje imunološkog sustava. Umjesto toga, oosporein najvjerojatnije funkcionira nakon smrti domaćina kako bi spriječio kompeticiju bakterija na uginulom domaćinu, omogućavajući mikrogljivi da maksimalno iskoristi hranjive tvari domaćina i završi svoj životni ciklus (Fan i sur., 2017.). Oosporein je važan sekundarni metabolit kojeg proizvode mnogi izolati *B. bassiana*. Metabolit je crveno pigmentirani dibenzokvinon kemijske formule $C_{14}H_{10}O_8$, izoliran je iz mnogih mikrogljiva tla. Oosporein je antiviralni spoj te posjeduje i antibiotska svojstva protiv gram-pozitivnih bakterija, no nema znatan utjecaj na gram-negativne bakterije. Također ne pokazuje antifungalna i fitotoksična svojstva. Zabilježeno je toksično djelovanje oosporeina na ptice i sisavce. LD₅₀ kod miševa i hrčaka iznosi 0,5 mg/kg tjelesne težine (Zimmerman, 2007.).

3.6. Primjena *Beauveria bassiana* u biološkom suzbijanju

Mikrogljive su dominantni patogeni u prirodnim populacijama kukaca. Pojave epizooza često su zabilježene među populacijama kukaca, ukazujući na značajan potencijal ovih mikroorganizama da reguliraju populacije štetnih kukaca. Entomopatogene mikrogljive inficiraju svoje domaćine kroz kutikulu te su patogene i za kukce s tvrdim i mekim egzoskeletom kao i za druge člankonošce kao što su krpelji i grinje (Acari). Infekcija kroz kutikulu omogućava im da inficiraju i kukce koji se hrane sisanjem. Stoga su mikrogljive naširoko razmatrane kao sredstvo za suzbijanje štetnih člankonožaca u poljoprivredi (uključujući šumarstvo i stočarstvo) i hortikulturi. Mikrogljive imaju mnoge poželjne osobine koje pogoduju njihovom razvoju kao sredstava biološkog suzbijanja. One predstavljaju minimalni rizik za neciljane korisne organizme, poput pčela, glista i skokunaca, koji imaju ključne uloge u ekosustavu, te prirodne neprijatelje člankonožaca poput parazitskih osa i predatorskih kukaca. (Lacey i sur., 2015.).

Jaronski i Mascarin (2017.) navode da se korištenje i proizvodnja mikoinsekticida znatno se povećalo tijekom zadnjih 20 godina. Faria i Wright (2007.) zabilježili su 110 komercijalnih proizvoda baziranih na entomopatogenim mikrogljivama od kojih je 40% bilo bazirano na *B. bassiana*. Velik broj infektivnih propagula, bilo zračnih konidija ili blastospora, često je potreban kada se ove mikrogljive tipično koriste kao inundativna metoda tretmana, posebno kada se primjenjuje na lisnu površinu. Količine spora reda veličine 2×10^{12} do 5×10^{13} po hektaru potrebne su za tipičan, akutan, insekticidni način djelovanja na otvorenim poljoprivrednim površinama (Jaronski i Mascarin, 2017.).

Proces razvoja mikoinsekticida može biti vrlo složen. Seleksijski proces mora procijeniti ne samo virulenciju kao mjeru potencijalne učinkovitosti, već i potencijal izolata gljive da formira stabilan propagul koji se može ekonomski masovno proizvoditi: onaj koji ima dobru dugoročnu stabilnost, koji je prikladan za dostupne tehnologije primjene, ima prihvatljive okolišne i toksikološke profile, te je sposoban za dosljednu učinkovitost u okolišnim i ekološkim uvjetima tipičnim za ciljanog štetnika za kojeg se primjenjuje (Jaronski i Mascarin, 2017.). Za komercijalne svrhe, *B. bassiana* obično se formulira koristeći konidije s različitim stabilizirajućim sredstvima. Različite vrste formulacije uključuju mamce/čvrste formulacije, kapsuliranje i emulzije. Neke poželjne karakteristike, kao što su lakoća pripreme i primjene, stabilnost, niska cijena i obilje živih propagula, traže se kako bi se dobila odgovarajuća formulacija za biološku kontrolu štetnika (García-Estrada i sur., 2016.).

Formulacija mamaca sastoji se od konidija *B. bassiana* kao aktivne tvari, pomiješane s hranom ili drugom tvari privlačnoj kukcima. Najčešće korištena tvar za ovu formulaciju je otpadni čaj. To pruža ekonomski održivu opciju s jednostavnom metodologijom pripreme, a tehnologija se može lako reproducirati na razini krajnjeg korisnika. Unatoč svim prednostima u pogledu niske cijene, jednostavne metodologije i lakoće prijevoza (što olakšava masovnu primjenu), primjena i rok trajanja formulacija mamaca imaju nekoliko nedostataka. Neki od tih nedostataka su nejednaka distribucija prilikom primjene i kratak vijek trajanja koji je ograničen na 2 – 3 mjeseca. Neke složenije čvrste formulacije, poput formulacije na bazi

nosača u prahu, koja uključuje prah, glicerol i gumu, također su testirane na održivost i učinkovitost te su pokazale slične vrijednosti u usporedbi s prirodno stabilnim tekućim formulacijama (García-Estrada i sur., 2016.).

Enkapsulirane formulacije *B. bassiana* štite konidije od nepovoljnih uvjeta okoline i obično povećavaju rok trajanja i bioučinkovitost. Uporaba aditiva (prah obranog mlijeka, polivinilpirolidon K-90 i glukoza) poboljšava rukovanje formulacijom i omogućuje bolju distribuciju konidija *B. bassiana*, iako tehnika kapsuliranja ima negativan učinak na održivost konidija (García-Estrada i sur., 2016.).

Emulzijska formulacija entomopatogenih mikrogljiva s biljnim uljem čini se vrlo prikladnom opcijom. Emulzije se lako nanose i štite konidije od UV zračenja, čime se povećava njihova učinkovitost i patogenost protiv štetnika poticanjem adhezije konidija na kutikulu kukca. Emulzijske formulacije obično se pripremaju s biljnim uljima, najčešće sojinim, uljem repice, suncokretovim, maslinovim, tikvinim i lanenim, ali i bademovim, sezamovim, kokosovim, ricinusovim i uljem eukaliptusa i gorušice (García-Estrada i sur., 2016.). Kaiser i sur. (2020.) istraživali su učinkovitost primjene blastospora *B. bassiana* formuliranih u ulju uljane repice za suzbijanje repičina sjajnika. Zabilježili su sinergistički utjecaj *B. bassiana* i ulja uljane repice te je zabilježene znatno povećana smrtnost repičina sjajnika u usporedbi s primjenom *B. bassiane* bez ulja ili ulja bez *B. bassiana*.

Prema FIS-u (2024.) u Republici Hrvatskoj trenutno je registrirano jedno sredstvo za zaštitu bilja na bazi mikrogljive *B. bassiana*. Komercijalni naziv sredstva je VELIFER proizvođača BASF. Sredstvo ima dozvolu za primjenu u povrćarstvu, uzgoju jagode i ukrasnog bilja u zaštićenim prostorima. Formulacija sredstva je uljni koncentrat za suspenziju s koncentracijom od 80 g/l *B. bassiane* soja PPRI 5339. Dozvoljena je primjena ovog sredstva 73 puta u sezoni te nema karence. Prema BASF (2024.) VELIFER sadrži 8×10^9 viabilnih spora *B. bassiana* po mililitru sredstva i učinkovito je protiv štitastih moljaca, tripsa, grinja, štitastih uši i lisnih uši te nije štetan za oprašivače i druge korisne kukce.

Sinno i sur. (2021.) istraživali su mogućnost korištenja *B. bassiana* kao dvostrukog sredstva za biološko suzbijanje. Koristeći endofitsku sposobnost *B. bassiana* da kolonizira biljna tkiva istražen je učinak 10 različitih sojeva *B. bassiana* na biljne patogene *Alternaria alternata* i *Botrytis cinerea* te na lisnu uš *Macrosiphum euphorbiae*. Svih 10 izolata uspješno inficirati i uspostaviti se unutar biljki rajčice u korijenu. Listovima i stabljici nakon tretiranja tla konidijama. Od 10 izolata četiri su uspješno suzbila lisne uši i biljne patogene *A. alternata* i *B. Cinerea*, a dva su izolata djelovala stimulirajuće na rast biljaka rajčice u usporedbi s kontrolom (Sinno i sur., 2021.).

4. Materijali i metode

Podrijetlo izolata *Beauveria bassiana*

U svrhu provedbe pokusa korištena je entomopatogena mikroglijiva *B. bassiana* koja je izolirana iz uginule odrasle jedinke krumpirove zlatice (*Leptinotarsa decemlineata* Say 1824). Mikroglijiva je morfološki i molekularno identificirana konvencionalnom PCR metodom te sekvencirana do razine vrste u tvrtki MacroGen Europe (Amsterdam, Nizozemska) (K. Martinko – osobna komunikacija). Izolat se čuva u zbirci Zavoda za fitopatologiju na Sveučilištu u Zagrebu, Agronomskom fakultetu.

Uzgoj gljive *Beauveria bassiana* i priprema suspenzije spora

U svrhu provedbe pokusa, mikroglijiva *B. bassiana* inokulirana je na PDA podlozi i inkubirana u termostatu na 23°C, u mraku. Nakon 14 dana inkubacije, razvijene kolonije *B. bassiana*, potopljene su s 10 ml sterilne destilirane vode i sufraktanta (0,01 %, Tween) u svrhu uklanjanja vodene površinske napetosti. Kolonije su sastrugane gumenim kistom, a koncentracija dobivene suspenzija spora je izmjerena korištenjem hemocitometra i razrijeđena do 1×10^8 spora/ml. Viabilnost je kvalitativno određena inokulacijom spora iz suspenzije na mikroskopsko stakalce s PDA suspratom. Suspenzija je ostavljena 12 sati prije aplikacije na temperaturi od 23 °C kako bi se ubrzalo i sinkroniziralo klijanje konidija (prema Zemek i sur., 2021). Smatralo se da su spore proklijale ako je klična cijev spore bila duža od njenog promjera. U istraživanju je korištena suspenzija spora s konidijama koje su proklijale više od 90 %.

Test izravne izloženosti *Beauveria bassiana* na repičinog sjajnika

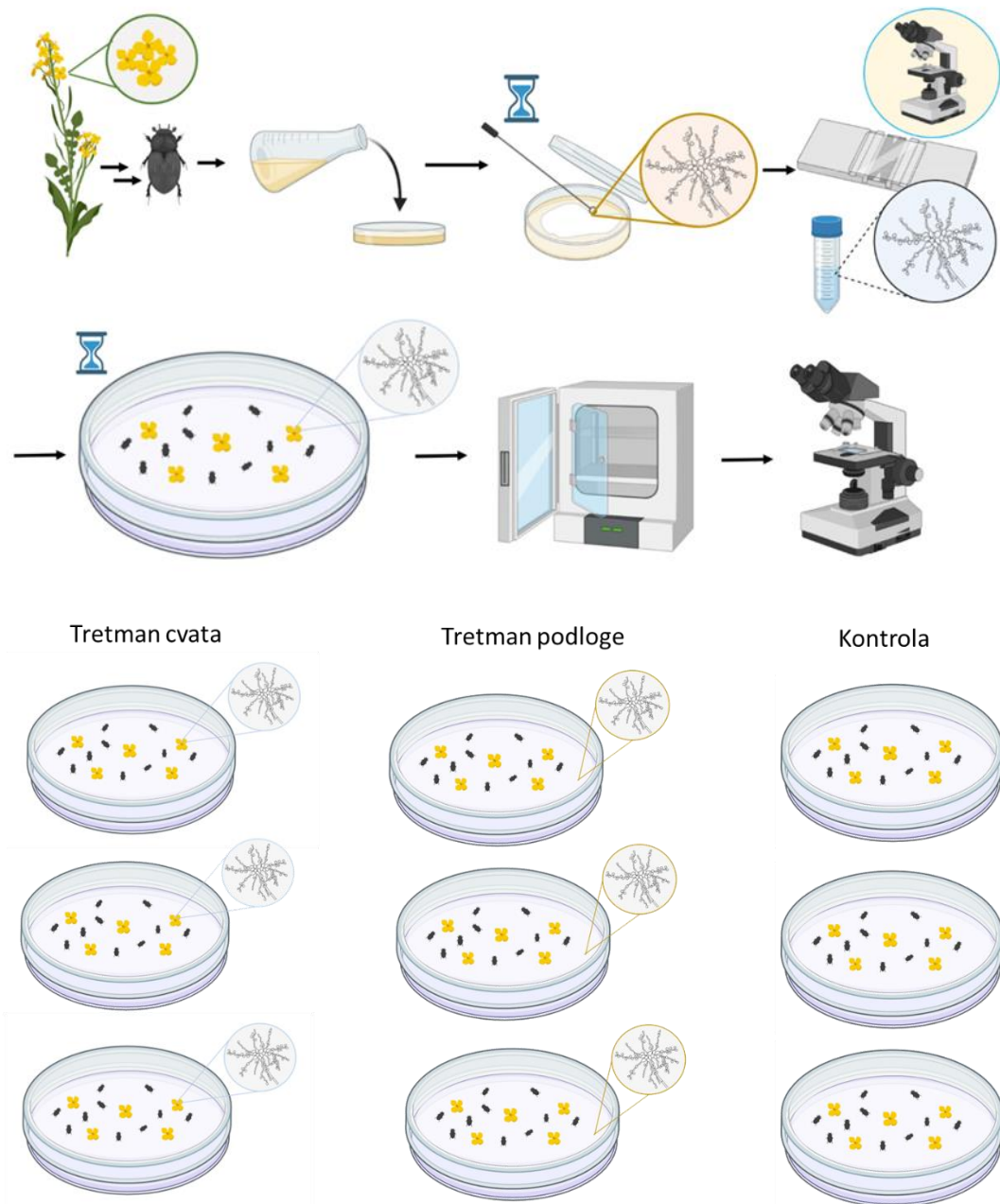
Kako bi se istražio entomopatogeni učinak *B. bassiana* na repičinog sjajnika, iz netretiranog usjeva uljane repice (Kloštar Ivanić, Hrvatska) u ožujku 2024. godine, nasumično su prikupljeni odrasli oblici kornjaša *B. aeneus*, zajedno sa terminalnim cvatovima uljane repice u svrhu ishrane. Za provedbu pokusa prikupljeno je 120 jedinki repičinog sjajnika, koji su prije postavljanja pokusa, postavljeni u hladnjak na temperaturu od 4 °C kako bi se usporilo njihovo kretanje (prema Rayl i Wratten, 2016). Pokus je proveden u laboratorijskim uvjetima prema Zemek i sur. (2021.) i postavljen u 3 varijante i 4 repeticije.

Prva test varijanta sadržavala je staklene petrijevke (promjer 12 cm) u čije dno je postavljen filter papir navlažen sterilnom destiliranom vodom u svrhu održavanja vlažnosti petrijevke. U svaku petrijevku su postavljene po 4 terminalna cvata koje su prethodno uronjene u suspenziju spora *B. bassiana*.

Druga test varijanta sadržavala je petrijevke (promjer 12 cm) s filter papirom na koji je aplicirano 1 ml suspenzije spora *B. bassiana*. U svaku petrijevku su postavljene po 4 netretirana terminalna cvata u svrhu ishrane kornjaša.

Kontrolna varijanta sastojala se od petrijevki (promjer 12 cm) s navlaženim filter papirom i terminalnim cvatovima, bez prethodnog tretmana suspenzijom spora *B. bassiana*, tretiranim otopinom sterilne destilirane vode i s 0,01% Tween 80 (sufraktanta).

U testne i kontrolne petrijevke, pomoću aspiratora ubačeno je po 10 odraslih jedinki repičinog sjajnika u svaku petrijevku. Cvjetovi uljane repice skupljani su s polja i svakodnevno dodavani u testne i kontrolne petrijevke. Petrijevke s kornjašima inkubirane su na konstantne uvjete (23°C i 16 sati svjetlosti: 8 sati mraka) u klima komori. Na slici 4.1. prikazana je shema provedbe pokusa.



Slika 4.1. Shematski prikaz pokusa

Mortalitet je bilježen u intervalima od 24 sata tijekom deset dana nakon tretmana, počevši s 3. danom od postavljanja pokusa. Kukac je kategoriziran kao uginuli ako nisu primijećeni pokreti nogu i ticala. Uginule jedinke uklanjane su svakodnevno i postavljanje u nove plastične petrijevke s filter papirom navlaženim destiliranom vodom (1 ml) i inkubirani na 24 °C do 7 dana u svrhu stimulacije rasta micelija gljive. Kukci su kategorizirani kao zaraženi s *B. bassiana* kada je micelij mikrogljive postao vidljiv na površini uginule jedinke.

Re-izolacija gljive *Beauveria bassiana* i mikroskopska analiza

Kukci su svakodnevno praćeni kroz 14 dana. Nakon uginuća kukaca, isti su površinski sterilizirani (70 % etanol) i inkubirani u vlažnu komoru u svrhu potvrde da je zabilježena smrtnost kukaca bila posljedica parazitacije od strane *B. bassiana*. Samo za one kukce na kojima se pojavio micelij vrste *B. bassiana*, smatralo se da su uginuli zbog gljivične infekcije, što je potvrđeno provedbom mikroskopske analize morfoloških struktura gljive. Radi lakše detekcije preparati su obojani laktofenolom blue (Husberg i Hokkanen, 2001.).

Očitanje pokusa

Očitanje pokusa provedeno je 14. dan nakon postavljanja pokusa, na način da su izbrojane uginule jedinke kornjaša. Na temelju srednjih vrijednosti broja uginulih jedinki u svakoj varijanti pokusa, za podatke normalne distribucije, provedena je statistička analiza podataka (One Way ANOVA, Tukey test) korištenjem SPSS programa.

5. Rezultati i rasprava

Mortalitet jedinki repičinog sjajnika u sve tri varijante prikazan je tablicom 5.1. Prva pojava uginuća jedinki zabilježena je trećeg dana provedbe pokusa. Srednje vrijednosti kumulativnog mortaliteta jedinki značajno su više 4. dana od postavljanja pokusa u test varijantama, u odnosu na kontrolnu skupinu prema Tukey testu. Devetog dana zabilježen je potpuni mortalitet jedinki u svim varijantama pokusa.

Tablica 5.1. Mortalitet jedinki repičinog sjajnika

Tretman	Mortalitet jedinki ($\bar{x} \pm SD$)						
	3. dan	4. dan	5. dan	6. dan	7. dan	8. dan	9. dan
Cvat + 10^8 spora/ml	$0,3^a \pm 0,5$	$2^b \pm 1,1$	$3,3^b \pm 0,5$	$6^b \pm 0,8$	$6,8^b \pm 0,8$	$9,5^b \pm 0,5$	$10^b \pm 0$
Podloga + 10^8 spora/ml	$0,8^a \pm 0,5$	$2,3^b \pm 0,9$	$3,5^b \pm 0,5$	$6,5^b \pm 0,5$	$7,3^b \pm 0,5$	$10^b \pm 0$	$10^b \pm 0$
Kontrola	$0^a \pm 0$	$0^a \pm 0$	$1,3^a \pm 0,9$	$1,75^a \pm 0,5$	$3,5^a \pm 0,6$	$6,3^a \pm 1,3$	$9^a \pm 0,8$

*različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti unutar varijanti (Tukey test, $P < 0,05$).

SD- standardna devijacija

Tablica 5.2. Pojava micelija na jedinkama repičinog sjajnika

Tretman	Pojava micelija/jedinki ($\bar{x} \pm SD$)						
	3. dan	4. dan	5. dan	6. dan	7. dan	8. dan	9. dan
Cvat + 10^8 spora/ml	$0^a \pm 0$	$0^a \pm 0$	$0,8^b \pm 0,5$	$1,5^b \pm 0,6$	$3,5^b \pm 0,8$	$5,3^b \pm 0,5$	$7,5^b \pm 1$
Podloga + 10^8 spora/ml	$0^a \pm 0$	$0^a \pm 0$	$0,3^b \pm 0,5$	$1^b \pm 0,5$	$2,5^b \pm 1$	$6,8^b \pm 0$	$8,3^b \pm 0,9$
Kontrola	$0^a \pm 0$	$0^a \pm 0$	$0^a \pm 0$	$0^a \pm 0$	$0^a \pm 0$	$0^a \pm 0$	$0^a \pm 0$

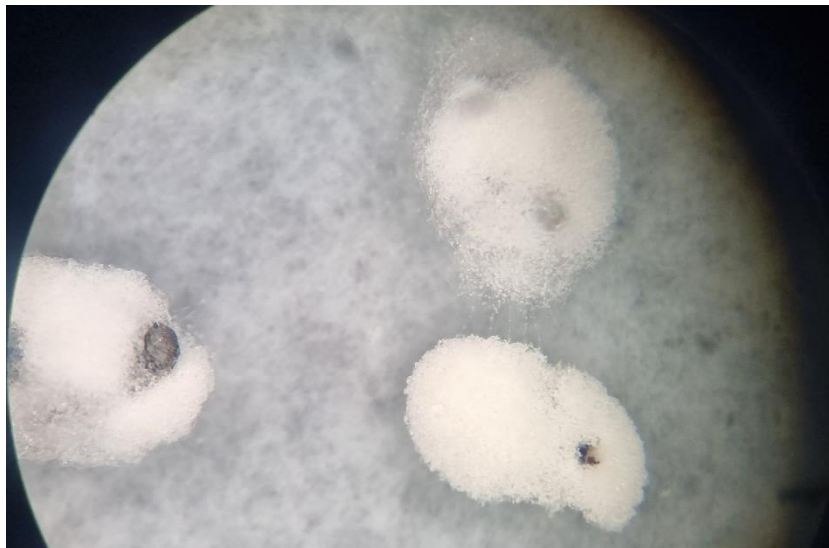
*različita slova označavaju statistički značajnu razliku između srednjih vrijednosti unutar varijanti (Tukey test, $P < 0,05$).

SD- standardna devijacija

Pojava micelija na jedinkama repičinog sjajnika prikazana je tablicom 5.2. Pojava micelija na uginulim jedinkama (slike 5.1. i 5.2.) uočena je 5. dan od postavljanja pokusa.

Devetog dana od tretmana odraslih oblika, i nakon zabilježenog potpunog mortaliteta jedinki u test varijantama, pojava micelija mikrogljive *B. bassiana*, u varijanti s tretmanom cvatova iznosi 75 %, a u varijanti s tretmanom podloge 83 %. U kontrolnoj skupini nije zabilježena pojava micelija, što isključuje mogućnost kontaminacije i potvrđuje da je *B. bassiana* jedini izvor infekcije. Pojava micelija na uginulim jedinkama kod test varijanti ukazuje na uspješnu zarazu i proliferaciju mikrogljive *B. bassiana* unutar tijela sjajnika.

Brza pojava mortaliteta i značajno povećanje kumulativnog mortaliteta u tretiranim skupinama ukazuju na visoku učinkovitost ove mikrogljive te je ovim istraživanjem potvrđen entomopatogeni potencijal mikrogljive *B. bassiana* u suzbijanju odraslih jedinki repičina sjajnika u laboratorijskim uvjetima. Rezultati pokusa sugeriraju da je tretman podloge s konidijama mikrogljive *B. bassiana* pokazao za 8 % bolji entomopatogeni učinak na odrasle jedinke sjajnika, u odnosu na tretman cvata. Veći postotak zaraze kod tretmana podloge u odnosu na tretman cvatova može biti rezultat boljeg kontakta između spora i sjajnika te svojstva filter papira da upija vlagu stvarajući povoljnije uvjete za klijanje. Tijekom provedbe pokusa uočena je pojava promjene ponašanja jedinki test varijanti u vidu smanjene aktivnosti i ishrane te pokušaja čišćenja glave pomoću prednjeg para nogu.



Slika 5.1. Pojava micelija na repičinom sjajniku



Slika 5.2. Pojava micelija na repičinom sjajniku

Kaiser i sur. (2020.) proveli su istraživanje u kojem su ispitivali učinkovitost tretiranja odraslih jedinki repičinog sjajnika blastosporama *B. bassiana*, emulzijom ulja uljane repice i kombinacijom spora i ulja. Kukci su tretirani direktno prskanjem. Nakon 20 dana mortalitet jedinki repičina sjajnika iznosio je $20.8 \pm 8.5\%$ kod tretmana s *B. bassiana*, $27.4 \pm 9.2\%$ kod tretmana s uljem uljane repice te $70.8 \pm 5.0\%$ kod kombiniranog tretmana uljem i *B. bassiana*. Teoretski aditivni mortalitet *B. bassiana* i ulja repice iznosio bi 42,5% dvadesetog dana. Mortalitet kod kombiniranog tretmana bio je za 28,3% veći od teoretskog aditivnog mortaliteta, te su autori zaključili da je to povećanje rezultat sinergističkog djelovanja ulja uljane repice i spora *B. bassiana*. Pojava micelija na uginulim jedinkama također je pratila povećanje mortaliteta. Mehanizmi koji bi objasnili sinergistički učinak su bolje prijanjanje spora na kutikulu kukca te povoljniji uvjeti za klijanje spora. U istraživanju Kaiser i sur. (2020.) kod tretmana sa sporama *B. bassiana* i vodom zabilježen je znatno manji mortalitet sjajnika u usporedbi s vlastitim istraživanjem. Mogući razlozi za manji mortalitet su korištenje blastospora za infekciju dok su se u vlastitom istraživanju koristile konidije, također je broj sjajnika po posudi iznosio 15 jedinki te su posude bile većeg volumena, a spore su primijenjene direktnim prskanjem na kukce.

Alford (2003.) navodi da je u laboratorijskim uvjetima *B. bassiana* lako ubijala jedinke repičinog sjajnika; međutim, u polju je demonstrirana samo neizravna smrtnost putem smanjenog prezimljavanja. Potencijalni utjecaj tretmana s *B. bassiana* na prezimljavanje odraslih jedinki repičinog sjajnika u Finskoj, na najsjevernijem rubu distribucije štetnika, uzrokovao je dodatni 'stres' na kukcima, te se smatrao vjerojatnim za izazivanje dramatičnog učinka na njihovo preživljavanje. Prema Hokkanen (1993.) tretman tla s *B. bassiana* nije imao direktan učinak na smrtnost kukaca putem patogeneze, no tretman je uzrokovao smanjenje broja prezimjelih jedinki za 50 % u odnosu na kontrolu. Ključan čimbenik koji određuje preživljavanje prezimljenja kukaca jest tjelesna težina odnosno zalihe masti. Hipoteza koja bi mogla objasniti ovo opažanje jest da je repičin sjajnik razvio dobre mehanizme obrane protiv

patogena iz tla i obično preživi napad, ali unatoč tome mora posvetiti dio energije obrani, ako je napadnut. Stoga je manje energije dostupno za prezimljavanje ili druge funkcije.

Budući da su istraživanja pokazala da poljoprivredna tla diljem Europe gotovo uopće ne sadrže prirodne populacije entomopatogenih mikrogljiva, dok su iste prisutne u znatnim količinama u obližnjim prirodnim staništima, istraživanja bi se trebala fokusirati na reintrodukciju i održavanje populacije patogena u poljoprivrednim ekosustavima. Drugi mogući način aktivnog korištenja entomopatogenih mikrogljiva unutar usjeva uljane repice može uključivati inicijaciju epizootija (izvora zaraze) ranije tijekom sezone, kada se očekuje da će utjecaj na populacije štetnika biti veći. To se može postići korištenjem specifičnih zamki u koje se privlače štetnici i u kojima se spore mikrogljiva prenose na zdrave domaćine sa zaraženih uginulih jedinki (Alford, 2003.).

Ostale moguće metode infekcije repičina sjajnika u polju uključuju širenje infekcije posredstvom pčela, ovom metodom uspješno je prenesena infekcija mikrogljivom *Metarhizium anisopliae* na repičinog sjajnika, te je infekcija *B. bassiana* uspješno prenesena istom metodom na štetnike zaštićenih prostora (Butt i sur., 2001., Kapongo i sur., 2008.). Muola i sur. (2023.) dokazali su da je moguće postići endofitsku kolonizaciju biljaka uljane repice mikrogljivom *B. bassiana* tretiranjem sjemena te prirodnim putem odnosno vertikalnom migracijom mikrogljive u polu-poljskim uvjetima. Autori navode da inokulacija nije utjecala na postotak klijanja sjemena niti na razvoj biljaka te da je potaknula proizvodnju većih količina flavonoida kod tretiranih biljaka. Međutim, autori navode da je uloga *B. bassiana* kao endofita u svrhu zaštite uljane repice od štetnika još uvijek nejasna.

Iako je učinkovitost *B. bassiana* u suzbijanju repičinog sjajnika potvrđena u laboratorijskim uvjetima, postoji nedostatak istraživanja koja dokazuju učinkovitost ove mikrogljive u poljskim uvjetima. Buduća istraživanja trebala bi ispitati učinkovitost i mogućnost primjene *B. bassiana* nekom od navedenih metoda, te njihovu kombinaciju s lovnim biljkama i 'push – pull' strategijom u sustavu integrirane zaštite bilja.

6. Zaključci

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

-Ovo istraživanje potvrđuje entomopatogeni potencijal mikrogljive *B. bassiana* protiv odraslih oblika repičinog sjajnika u laboratorijskim uvjetima, mikrogljiva *B. bassiana* pokazala se kao učinkovita u suzbijanju odraslih oblika repičinog sjajnika, s učinkovitošću od 75-83% ovisno o vrsti tretmana.

-Ovi rezultati sugeriraju da bi *B. bassiana* mogla biti djelotvorna alternativa kemijskim insekticidima, posebno u kontekstu rastuće rezistentnosti repičinog sjajnika na piretroide i neonikotinoide.

-Biološka kontrola pomoću entomopatogenih mikrogljiva poput *B. bassiana* nudi održivo rješenje koje smanjuje ekološki otisak i negativne učinke na neciljane organizme.

-Endofitska aktivnost *B. bassiana* također otvara mogućnost primjene ove mikrogljive tretiranjem sjemena ili tla neposredno prije sjetve.

-Buduća istraživanja trebala bi se fokusirati na učinkovitost *B. bassiana* u poljskim uvjetima, kao i na optimizaciju doziranja, metode i rokove primjene i dugoročnu učinkovitost *B. bassiana* u različitim agroekološkim uvjetima.

-Važna je i evaluacija sinergističkih učinaka kombinacije *B. bassiana* s drugim biološkim kontrolnim agensima ili minimalnim dozama kemijskih insekticida kako bi se poboljšala kontrola štetnika i smanjila pojava rezistentnosti.

7. Literatura

1. Alford D.V. (2003). Biocontrol of oilseed rape pests. Blackwell science
2. Avila-Hernandez J.G., Carrillo-Inungaray M.G., De la Cruz-Quiroz R., Wong-Paz J.E., Muñiz-Márquez D.B., Parra R., Aguilar C.N., Aguilar-Zárate P. (2020). *Beauveria bassiana* secondary metabolites: a review inside their production systems, biosynthesis, and bioactivities. Mexican Journal of Biotechnology 2020, 5(4):1-33
3. BASF (2024). (online) <https://www.betterplants.basf.us/products/velifer.html> pristup 2.5.2024.
4. CABI (2024). (online) <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompndium.33259> pristup 2.4.2024.
5. Caloni, F., Fossati, P., Anadón, A., & Bertero, A. (2020). Beauvericin: The beauty and the beast. Environmental Toxicology and Pharmacology, 75.
6. Chandler D. (2017). Basic and applied research on entomopathogenic fungi. U: Microbial control of insect and mite pests. Poglavlje 5. str. 69-89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00005-6>
7. Državni zavod za statistiku (2024). (online) <https://podaci.dzs.hr/2023/hr/58457> pristup 3.4.2024.
8. EPPO (2024). (online) <https://gd.eppo.int/taxon/MELIAE> pristup 2.7.2024.
9. Fan Y., Liu X., Keyhani N.O., Tang G., Pei Y., Zhang W., Tong S. (2017). Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death. Agricultural sciences vol. 114 (9) <https://doi.org/10.1073/pnas.1616543114>
10. Faria M.R., Wraight S.P., (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol. Control 43, 237–256.
11. FIS (2024). Fitosanitarni informacijski sustav. (online) <https://fis.mps.hr/fis/javna-trazilica-szb/> pristup 14.4.2024.
12. Free J.B., Williams I.H. (1978). The responses of the pollen beetle, *Meligethes aeneus* and the seed weevil *Ceuthorrhynchus assimilis* to oil-seed rape *Brassica napus*, and other plants. Journal of Applied Ecology. 15: 761–774.
13. García-Estrada C., Cat E., Santamarta I. (2016). *Beauveria bassiana* Formulation and Commercialization as Biocontrol Agent: for Pest Management. U: Agriculturally Important Microorganisms. Poglavlje 5. str. 81-96
14. GBIF (2024). Global Biodiversity Information Facility. *Brassicogethes aeneus* (Fabricius, 1775). (online) <https://www.gbif.org/species/4452928> pristup 2.4.2024.
15. Goettel M. S., Inglis G. D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. U: Lacey R.A. (Ur.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. 213-249.
16. Goltermann, S. (1994). Das Auftreten von Laufkäfern (Col., Carabidae) auf Winterrapsfeldern und deren Einfluß auf den Massenwechsel von *Meligethes aeneus* F. (Col., Nitidulidae). Doktorski rad, University of Rostock, Germany
17. Gotlin Čuljak T., Ančić M., Pernar R., Žokalj A., Rapajić D. (2015). Rezistentnost repičina sjajnika (*Brassicogethes aeneus* (Fabricius 1775)) na piretroide u Hrvatskoj. Glasilo biljne zaštite Vol.15, Br. 6, str: 411-418
18. Gotlin Čuljak T., Juran I., Bertić D., Dušak I., Bažok R., Lemić D. Čačija M., Kadoić Balaško M. (2019). Osjetljivost repičina sjajnika na insekticide. Monitoring rezistentnosti štetnih organizama na sredstva za zaštitu bilja u Republici Hrvatskoj (2018.-2020.). Projekt

[szb.hr/images/uploads/Letak_repicin_sjajnik_TGC_final_2019.pdf](https://rezistentnost-szb.hr/images/uploads/Letak_repicin_sjajnik_TGC_final_2019.pdf)

19. Gotlin Čuljak T., Juran I., Grubišić D., Uglješić I., Šinjur H. (2017). Razvoj rezistentnosti repičina sjajnika na piretroide u Europskim zemljama. Glasilo biljne zaštite Vol.17, Br. 5, str: 446-454
20. Gotlin Čuljak, T., Jelovčan, S., Grubišić, D., Juran, I., Ilić Buljan, M. (2013). Pojava rezistentnosti repičinog sjajnika (*Meligethes* spp.) na piretroide u usjevima uljane repice (*Brassica napus* L.) u Hrvatskoj. Glasilo biljne zaštite, 13 (5): 379 – 383
21. Hansen L.M. (2008). Insecticide-resistant pollen beetles (*Meligethes aeneus* F) found in Danish oilseed rape (*Brassica napus* L) fields. Pest Management Science vol. 59. str:1057–1059
22. Hokkanen H.M.T. (1993). Overwintering survival and spring emergence in *Meligethes aeneus*: effects of body weight, crowding, and soil treatment with *Beauveria bassiana*. Entomol. exp. appl. 67: 241-246
23. Hokkanen, H., Husberg, G.-B. & Söderblom, M. (1988). Natural enemy conservation for the integrated control of the rape blossom beetle *Meligethes aeneus* F. Annales Agriculturae Fenniae 27, 281–93.
24. Husberg, G.B., Hokkanen, H.M. (2001). Effects of *Metarhizium anisopliae* on the pollen beetle *Meligethes aeneus* and its parasitoids *Phradis morionellus* and *Diospilus capito*. BioControl 46: 261–273. <https://doi.org/10.1023/A:1011479616787>
25. Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P., El Meziane, A., Yao, Y. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. Journal of Asia-Pacific Entomology 20(4): 1204-1212.
26. IRAC (2018). Pollen Beetle Resistance Monitoring 2018. IRAC Coleoptera Working Group. (online) <https://irac-online.org/documents/pollen-beetle-monitoring-poster-2018/?ext=pdf> pristup 15.4.2024.
27. IRAC (2024). Insecticide Resistance Action Committee . (online) <https://irac-online.org/pests/meligethes-aeneus/> pristup 15.4.2024.
28. Jaronski S.T., Mascarin G.M. (2017). Mass production of fungal entomopathogens. Microbial Control of Insect and Mite Pests. Poglavlje 9. str. 141-155
29. Kaiser D., Handschin S., Rohr R.P., Bacher S., Grabenweger G.(2020). Co-formulation of *Beauveria bassiana* with natural substances to control pollen beetles - synergy between fungal spores and colza oil, Biological Control 140 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104106>
30. Kapongo J.P., Shipp L., Kevan P., Broadbent B. (2008). Optimal concentration of *Beauveria bassiana* vectored by bumble bees in relation to pest and bee mortality in greenhouse tomato and sweet pepper. BioControl 53:797–812
31. 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 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
32. Lehrman A. (2007). Oilseed rape transformed with a pea lectin gene. Target and Non-target Insects, Plant Competition, and Farmer Attitudes. Doktorski rad. https://www.researchgate.net/publication/30072985_Oilseed_rape_transformed_with_a_pea_lectin_gene
33. Maceljki M. (2002). Poljoprivredna entomologija. Zrinski Čakovec
34. Mauchline A.L., Hervé M.R., Cook S.M. (2017). Semiochemical-based alternatives to synthetic toxicant insecticides for pollen beetle management. Arthropod-Plant Interactions 12, 835–847.

35. Meyling N.V., Eilenberg J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control* 43. str. 145–155.
36. Müller A., Heimbach U., Thieme T. (2008). Pyrethroid sensitivity monitoring in Germany of oilseed rape pest insects other than pollen beetle. *EPPO Bulletin* 38, str:85-90
37. Muola A., Birge T., Helander M., Mathew S., Harazinova V., Saikkonen K., Fuchs B. (2023). Endophytic *Beauveria bassiana* induces biosynthesis of flavonoids in oilseed rape following both seed inoculation and natural colonization. *Pest Management Science*
38. Mwamburi L.A. (2020). *Beauveria*. U: Beneficial microbes in agro-ecology. *Poglavlje* 37. str.727-748. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00037-X>
39. Philippou D., Field L.M., Wegorek P., Zamojska J., Andrews M.C., Slater R., Moores G.D. (2010). Characterising metabolic resistance in pyrethroid-insensitive pollen beetle (*Meligethes aeneus* F.) from Poland and Switzerland. *Pest management science* 67: 239–243
40. Rayl, R.J., Wratten, D.A.S. (2016). Comparison of anesthesia techniques for entomological experimentation: longevity of the leaf-mining fly pest *Scaptomyza flava* Fallén (Drosophilidae). *PeerJ PrePrints*, 1 (5), 2874-2903. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.2874v1>
41. Rehner S.A., Buckley E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97(1). 84–98.
42. Rehner S.A., Minnis A.M., Sung G., Luangsa-ard J.J., Devotto L., Humber R.A. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055–1073.
43. Scherney, F. (1958). Über die Wirkung verschiedener Insekticide auf Laufkäfer (Col., Carabidae). *Pflanzenschutz* 10, 87–92.
44. Sinno M., Ranesi M., Di Lelio I., Iacomino G., Becchimanzi A., Barra E., Molisso D., Pennacchio F., Digilio M.C., Vitale S.(2021). Selection of Endophytic *Beauveria bassiana* as a Dual Biocontrol Agent of Tomato Pathogens and Pests. *Pathogens* 2021, 10, 1242. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101242>
45. Sui L., Lu Y., Zhu H., Wan T., Li Q., Zhang Z. (2022). Endophytic blastospores of *Beauveria bassiana* provide high resistance against plant disease caused by *Botrytis cinerea*. *Fungal biology* 126(8). str. 528 – 523
46. Tiiliakanen T.M., Hokkanen H.M.T. (2008). Pyrethroid resistance in Finnish pollen beetle (*Meligethes aeneus*) populations – is it around the corner?. *EPPO Bulletin* 38, str: 99-103
47. Ubler B. (2017). Identity of parasitoids and their potential for biocontrol of oilseed rape pests in Europe. *EPPO Workshop on integrated management of insect pests in oilseed rape*, Berlin
48. UKBeetles (2024). (online) <https://www.ukbeetles.co.uk/meligethes-aeneus> pristup 10.4.2024.
49. Vega F.E., Kaya H.K. (2012). *Insect pathology*. 2nd ed. San Diego, Academic Press: 508
50. Wikipedia (2024). *Beauveria bassiana* (online). https://en.wikipedia.org/wiki/Beauveria_bassiana -pristup 25.4.2024.
51. Williams I.H. (2010). *The Major Insect Pests of Oilseed Rape in Europe and Their Management: An Overview*. U: *Biocontrol-based integrated management of oilseed rape pests*. Springer science

52. Zemek, R., Konopická, J., Jozová, E., Skoková Habuřtová, O. (2021). Virulence of *Beauveria bassiana* Strains Isolated from Cadavers of Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insects* 12: 1-13. <https://doi.org/10.3390/insects12121077>
53. Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology* 17(6): 553-596.

Životopis

Vedran Grozdanić rođen je u Zadru 31.7.1998. Godine 2013. upisuje prirodoslovno-matematičku gimnaziju Jurja Barakovića koju završava 2017. godine. Godine 2018. upisuje preddiplomski studij fitomedicine na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te isti završava 2021. godine kada upisuje diplomski studij. Koristi engleski jezik C1 razinu te talijanski A2 razinu u govoru, razumijevanju i pisanju. Posjeduje vještine rada na računalu uključujući MS office i pretraživanje internetskih baza podataka. U slobodno vrijeme bavi se sportskim penjanjem.