

## Potencijal entomopatogenih gljiva *Metarhizium* spp. u suzbijanju štetnih kukaca

### Sažetak

Radi otpornosti kukaca prema pojedinim kemijskim pesticidima, i sa svrhom proizvodnje hrane bez ostataka pesticida biološka zaštita biljaka od štetnih kukaca sve više je od značaja. Biološke metode se zasnivaju na primjeni prirodnih sredstava kao što su patogeni, paraziti i grabežljivci štetnih kukaca. Cilj ovog rada je prikazati prednosti i nedostatke pri upotrebi mikoinspekticida na bazi *Metarhizium* spp., uzimajući u obzir biologiju ovih gljiva, njihovu interakciju s biljkom, okolišem, drugim organizmima i agrokemikalijama, te dostupnost mikoinspekticida na tržištu. Opisani su uspješni primjeri primjene ovih entomopatogenih gljiva u suzbijanju žičnjaka (*Elateridae*) i maslinove muhe (*Bactrocera oleae*), običnog crvenog pauka (*Tetranychus urticae*) i kruškine buhe (*Cacopsylla pyri*). Učinkovitost *Metarhizium* spp. u suzbijanju nekih vrsta kukaca je usporediva s metodom primjene kemijskih insekticida. Osim kao biopesticid, smatraju se i biostimulatorima, odnosno biofertilizatorima jer su endofiti. Dostupnost, visoka cijena mikoinspekticida te mali broj istraživanja u polju razlozi su slabe primjene u praksi.

**Gljučne riječi:** biološka kontrola, biopesticid, interakcija, učinkovitost, kompatibilnost

### Uvod

Podrijetlo kukaca seže unatrag 500 i više milijuna godina, otkada su poznati fosili kukaca. Uz nematode, najbrojniji i najraznovrsniji su organizmi u carstvu životinja. Iako se mali broj svih vrsta kukaca ubraja u štetnike poljoprivrednih kultura, u Hrvatskoj svake godine kukci čine gospodarski značajne štete. Tristotinjak vrsta uzrokuje štete značajne u cijeloj državi, a ostale vrste čine značajne štete u lokalnim razmjerima (Maceljski, 2002.). S obzirom na visoke štete koje štetni organizmi nanose u poljoprivrednoj proizvodnji, posebice štetni kukci, potrebno je njihovo dobro poznavanje da bi se štete mogle smanjiti, a proizvodnja održati isplativom i ekološki prihvatljivom. Godišnje oko 40% ukupne poljoprivredne proizvodnje je oštećeno ili potpuno uništeno u prisutnosti štetnih kukaca, biljnih patogena i korova (Messing i Brodeur, 2018.). Provođenje mjera integrirane zaštite biljaka (eng. *Integrated Pest Management (IPM)*) od štetnih kukaca u poljoprivrednoj proizvodnji daje prednost korištenju nepesticidnih mjera zaštite. IPM se temelji na poznavanju biologije i ekologije štetnika kao i poljoprivredne kulture. Princip IPM-a je primijeniti kemijske pesticide kao posljednju mogućnost, nakon što se iscrpe sve ostale mjere zaštite biljaka. Metode biološke kontrole zauzimaju sve veći značaj u poljoprivredi zbog pojave otpornosti kukaca prema kemijskim pesticidima, te radi proizvodnje toksiološki sigurne hrane bez ostataka pesticida. Biološka kontrola štetnih kukaca sastoji se od uvođenja patogenih, korisnih grabežljivih ili parazitnih organizama u sustave uzgoja poljoprivrednih kultura. To su najčešće korisni kukci, nematode, bakterije, gljive i virusi. Vrste unutar roda *Metarhizium* su entomopatogene gljive koje imaju širok raspon domaćina, npr. uspješno suzbijaju pipe, grčice listorožaca, žičnjake, krumpirove zlatice, sovice, lisne buhe i dr. (Gao i

<sup>1</sup> Nikolina Forić, stručna prvostupnica inženjerka poljoprivrede i studentica diplomskog studija Zaštita bilja, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Hrvatska

<sup>2</sup> doc.dr.sc. Ankica Sarajlić, prof.dr.sc. Karolina Vrandečić, izv.prof.dr.sc. Ivana Majić, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Zavod za zaštitu bilja, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Hrvatska tel. + 385 31 554 905  
Autor za korespondenciju: e-mail: imajic@pfos.hr

sur., 2011.). U Australiji i Aziji se koriste u suzbijanju skakavaca, termita i komaraca (Hunter i sur., 2001.; Lacey, 2017.). Ove entomopatogene gljive su organizmi s kojima je započeta era moderne primjene metoda augmentativne biološke kontrole štetnih kukaca oko 1880. godine (Lenteren i sur., 2018.). Od tada do danas se koriste u svim proizvodnim sustavima i kod većine poljoprivrednih kultura. Rod *Metarhizium* pripada razredu Sordariomycetes, redu Hypocreales i porodici Clavicipitaceae. Prva poznata vrsta roda *Metarhizium* izolirana je iz žitnog pivca (*Anisoplia austriaca*) u Ukrajini, krajem 1870-ih godina. Izvorno ime *Entomophthora anisopliae* temeljeno je na domaćinu s kojeg je izolirana. Gljiva je sljedeće godine preimenovana u *Isaria destructor*, no Sorokin je predložio *Metarhizium*, a izvorni specifičan naziv vrste "*anisopliae*" je zadržan. *Metarhizium* uzrokuje tzv. „zelene mikoze“ (engl. *Muscardin*) jer mumificiraju kukca i prekriven je zelenim konidijima (Roberts i Leger, 2004.). S obzirom na patogenost, postoji znatna razlika unutar roda *Metarhizium*. Neke vrste (*M. acridum*) imaju uži raspon domaćina, dok druge vrste (*M. robertsii*) imaju širok raspon domaćina. Potencijal roda *Metarhizium* u kontroli poljoprivrednih štetnika poznat je od početka 20. stoljeća, a od tada je veliki broj formulacija registriran za uporabu u zaštiti bilja (Barelli i sur., 2015.). Vrste unutar ovog roda se teško identificiraju prema morfološkim karakteristikama. Vrsta koja se najviše koristi u biološkoj kontroli štetnih kukaca je *M. anisopliae*. Molekularnim metodama je utvrđeno da četiri vrste, koje uključuju *M. pingshaense*, *M. anisopliae*, *M. robertsii* i *M. brunneum* čine kompleks grupe nazvane *M. anisopliae* (Kepler i sur., 2015.). Pri različitim okolišnim uvjetima, *Metarhizium* pokazuje svoju genotipsku plastičnost, pa može preživjeti kao saprofit, endofit (kolonizator biljaka) ili kao patogen kukaca. Genetske analize ukazuju da je *Metarhizium* evoluirao od fitopatogenih gljiva iz rodova *Claviceps* i *Epichloë* prije približno 88-114 milijuna godina, te je patogenost prema kukcima stečena prilagodba u skorijoj prošlosti (Barelli i sur., 2015.). Osim u poljoprivrednoj proizvodnji, neki spojevi (pr. swainsonin) i metaboliti (pr. ovalicin) ovih gljiva imaju antitumorsko djelovanje te se koriste u medicinskim istraživanjima u liječenju raka (Kuboki i sur., 1999.). Cilj je pregledom literature prikazati prednosti i nedostatke mikroinsekticida na bazi *Metarhizium* spp., uzimajući u obzir biologiju gljive, interakciju s biljkom, okolišem, drugim organizmima i agrokemikalijama, te dostupnost sredstva na tržištu.

### Način infekcije kukca

*Metarhizium* spp. su patogeni kukaca, a patogenezu ostvaruju kroz vrlo kompleksne ekološke interakcije koje su se razvile kroz fascinantnu evolucijsku povijest ovih gljiva. Većina vrsta inficira domaćina prodiranjem kroz kutikulu, te ne mora nužno biti unesena u organizam kukca kao kod nekih drugih entomopatogena. S ovakvim načinom infekcije, *Metarhizium* spp. mogu suzbijati sve kukce neovisno o njihovom usnom ustroju (Barelli i sur., 2015.). Patogeni odnos gljive i domaćina nastaje zbog adhezije i klijanja konidija na površini kukca, nakon čega slijedi prodiranje hife kroz kutikulu. Kombinacijom mehaničkog prodiranja hife i fiziološki, razgradnjom kutikule nakon djelovanja enzima kao što su proteaze, esteraze, N-acetilglukozaminidaze, kitinaze i lipaze započinje kolonizacija domaćina. Svi stadiji kukca su podložni napadu entomopatogenih gljiva, no najosjetljiviji je stadij jaja i ličinke zbog manjeg sadržaja hitina u odnosu na ostale stadije. *Metarhizium* ubija domaćina u roku od 3 do 7 dana nakon infekcije, proizvodnjom toksina i apsorpcijom hranjivih tvari (Barelli i sur., 2015.). Nakon smrti domaćina, hife i dalje rastu te napadaju sve unutarnje organe, a kasnije izlaze iz tijela kukca i na njima se formiraju konidije koje se šire i mogu zaraziti druge kukce. Spore se pasivno raspršuju, uglavnom djelovanjem vremenskih čimbenika poput vjetra i kiše. Broj oslobođenih spora po domaćinu ovisi o vrsti gljive, te vrsti i veličini domaćina. Zaraženi domaćini, svojom migracijom omogućuju gljivi daljnje razmnožavanje i širenje jer do zaraze dolazi na jednom mjestu, a do smrti na drugom mjestu (Meyling i Eilenberg, 2007.).

## Utjecaj *Metarhizium* spp. na produktivnost biljke

*Metarhizium* spp. su široko rasprostranjene entomopatogene gljive te imaju važnu ulogu kao promotori rasta biljaka, jer su potencijalni spremnik sekundarnih metabolita. Neke vrste ovih entomopatogenih gljiva su endofiti biljaka. Kod odsutnosti domaćina kukaca i pri nepovoljnim okolišnim uvjetima, sposobnost ovih gljiva da koloniziraju korijen biljaka omogućuje im dodatan način preživljavanja u tlu. Enzimi proteaze kao i kod infekcije kukaca, također imaju ulogu u komunikaciji s biljkama, prodiranju hifa u korijen te kolonizaciji biljaka.

U većini ekosustava hranjive tvari u tlu su ograničene, pa je konkurencija među biljkama za hranjivim tvarima velika. Većina biljnih vrsta može ostvariti simbiotski odnos s bakterijama u tlu, mikoriznim gljivama i gljivičnim endofitima. Navedeni organizmi biljci osiguravaju dodatni izvor hranjivih tvari, često minerala koji su inače u tlu nedostupni za biljku. Dvostruki životni ciklus ovih gljiva, odnosno patogeneza kukaca i kolonizacija korijena biljke se izmjenjuju. Na taj način biljke, koje koloniziraju endofitni entomopatogeni imaju pristup specijaliziranom spremištu dušika koji je prisutan u ekosustavu tla, a koji je organski vezan u kukcima (Barelli i sur., 2015.). U zamjenu za dušik, *Metarhizium* spp. ima pristup i koristi jednostavne ugljikohidrate iz biljaka.

Osim što opskrbljuju biljku dušikom, endofitne entomopatogene gljive pospješuju rast i produktivnost biljaka. Prema Barelli i sur. (2015.), biljke koje su kolonizirale gljive iz roda *Metarhizium* imaju znatno veći broj lateralnog korijenja i korijenovih dlačica u odnosu na biljke koje nisu ostvarile simbiozu s ovim gljivama. Liao i sur. (2014.) su zabilježili veću biomasu lista kukuruza, a time i fotosintetsku sposobnost ako je sjeme tretirano s kompleksom vrsta *Metarhizium*. Nadalje, najveći prinosi kukuruza su ostvareni kada su primjenjeni tretmani kombinacije *Metarhizium* i kemijskih pesticida (Kabaluk i Ericsson, 2007.). Značaj endofitnih entomopatogenih gljiva u integriranoj zaštiti biljaka je složen i višestruk. Osim što *Metarhizium* spp. pospješuju rast biljke, mogu povećati prinose, pružaju zaštitu od kukaca, također štite biljku i od drugih patogena, kao što su biljno parazitske nematode (Sun i sur., 2006.) te gljivični patogeni (Ravindrani i sur., 2014.). To se ostvaruje jer gljive u biljkama potiču mehanizam otpornosti, prije svega antibiozu. *Metarhizium* spp. ograničavaju razvoj drugih patogena unutar biljke jer se natječu za isti životni prostor (Bakker sur., 2013).

## Uspješni primjeri primjene *Metarhizium* spp.

Brandl i sur. (2016.) proveli su istraživanje o učinkovitosti *M. brunneum* u suzbijanju žičnjaka. Žičnjaci pričinjavaju štete na korijenu biljaka, a mogu prouzročiti i potpuno propadanje usjeva. Ubrajaju se u najznačajnije poljoprivredne štetnike. Prevencija i suzbijanje žičnjaka je iznimno kompleksna. Prije svega zbog ukidanja dozvole za primjenu toksikološki opasnih, ali najučinkovitijih kemijskih insekticida. Nadalje, zbog sposobnosti ličinki da migriraju do 1 m dubine tla čime postaju nedostupne za mehaničke i fizičke mjere suzbijanja. Do sada je poznato 39 vrsta žičnjaka koji napadaju krumpir. Na jednom lokalitetu često je prisutno nekoliko različitih vrsta što dodatno otežava zaštitu poljoprivrednih usjeva jer se vrste žičnjaka razlikuju s obzirom na osjetljivost prema mjerama suzbijanja. Primjenom inoviranih granula te metode „privuci i ubij“ (*Attract-and-Kill*), dobiveni su rezultati poboljšanog djelovanja *M. brunneum* u suzbijanju žičnjaka. Sredstvo koje se koristilo kao atraktant za žičnjake je komercijalno dostupan pekarski kvasac (*Saccharomyces cerevisiae*) i uporabljen je kao izvor CO<sub>2</sub>. Pekarski kvasac i kukuruzni škrob kapsulirani su u vlažne sferične granule kalcij alginata (tzv. privlačne ili atraktivne granule). Laboratorijskim pokusima je utvrđeno da se žičnjaci hrane privlačnim granulama. Aerobne konidije *M. brunneum* su inkapsulirane u vlažne sferične granule (tzv. ubojite ili insekticidne granule) istom metodom kao i privlačne granule. Granule su primijenjene pri sjetvi kao spot aplikacija između i ispod sjemenskog krumpira, kao i aplikacija u traku također ispod sjemenskog krumpira. Žičnjaci s mikozama su pronađeni u svim pokusnim parcelama tretiranim s *M.*

*brunneum*. Rana spot aplikacija „privucij i ubij“ granulama ispod sjemenskog krumpira bila je najučinkovitija u suzbijanju žičnjaka (38-75%) te su u pojedinim parcelama rezultati bili usporedivi s mjerama suzbijanja kemijskim insekticidima. Uz poštivanje preventivnih mjera zaštite poput plodoređa, izbjegavanja sadnje osjetljivih kultivara odmah nakon kultura koje preferiraju žičnjaci, ponavljanjem kultivacije tla i primjenom metode „privuci i ubij“ s entomopatogenim gljivama štete od žičnjaka mogu se održati ispod razine ekonomski značajnih šteta, što je temeljna zadaća integrirane zaštite bilja.

Uspješan primjer primjene *M. brunneum* je i istraživanje Yousefa i sur. (2016.) u španjolskim maslinicima, a koje je provedeno u svrhu suzbijanja maslinove muhe (*Bactrocera oleae*). Ovom pokusu prethodilo je laboratorijsko istraživanje čiji su rezultati pokazali da je *M. brunneum* visoko virulentna prema imagu i kukuljici maslinove muhe. Postotak smrtnosti imaga bio je od 24,4 do 95,2% u usporedbi s prirodnom smrtnošću od 1,1%, a raspon smrtnosti kukuljice kretao se od 31,6 do 68,3% u usporedbi s prirodnom smrtnošću od 8,3%. U maslinicima je tretirano tlo ispod stabla sa suspenzijom konidija *M. brunneum*. Aplikacije su provedene dva puta godišnje, jednom u jesen (listopad – studeni) i jednom u proljeće (travanj – svibanj). U svim proizvodnim godinama *M. brunneum* se održala u tlu do druge primjene te je zarazila većinu kukuljica maslinove muhe u tlu. Ovo istraživanje je bilo usmjereno na ličinke i kukuljice maslinove muhe te je rezultiralo smanjenjem populacije štetnika od 50 do 70% u usporedbi s kontrolom. Biopesticidi na bazi *M. brunneum* potvrđuju da su jedan od učinkovitih alata za proizvođače masline u ekološkim i integriranim sustavima.

Polifagni štetnik, obični crveni pauk (*Tetranychus urticae*) napada više od 1000 biljnih vrsta u zaštićenim prostorima i na otvorenom uzrokujući klorozu, nekrozu, te deformaciju i usporan rast biljaka. Zbog brzog razvoja otpornosti na akaricide Dogan i sur. (2016.) su ispitivali učinkovitost dva soja *M. brunneum* (V275 i 4556) i *M. flavoviride* na različite razvojne stadije običnog crvenog pauka. U laboratorijskom istraživanju zaraženi su listovi graha s mješovitom populacijom (jaje, ličinka, nimfa, odrasli oblik) običnog crvenog pauka i tretirani su sa suspenzijom *M. brunneum* i *M. flavoviride* u koncentraciji konidija  $1 \times 10^7$  konidija  $\text{ml}^{-1}$  pomoću ručne prskalice. Istraživanje je pokazalo da su odrasli oblici najosjetljiviji i njihova smrtnost kretala se između 67,3 i 86,3%, a u usporedbi s prirodnom smrtnošću od 2,0%. Nimfe su manje osjetljive sa smrtnošću oko 70,0% u usporedbi s prirodnom smrtnošću od 4,0%. Smrtnost ličinki prosječno je iznosila oko 60,0% u usporedbi s prirodnom smrtnošću od 3,5%. Najmanju osjetljivost na entomopatogene gljive pokazao je stadij jaja sa smrtnošću od prosječno 13,5% u odnosu na prirodnu smrtnost od 2,0%. *M. brunneum* pokazala je veću učinkovitost od *M. flavoviride* u suzbijanju običnog crvenog pauka, posebice kod kontrole odraslih oblika.

Kruškina buha (*Cacopsylla pyri*) jedna je od najvažnijih štetnika kruške, a njena kontrola zahtjeva korištenje različitih mjera suzbijanja jer brzo postaju rezistentne na insekticide. Uzrokuju štete sisanjem sokova što dovodi do sušenja lišća. Kruškina buha je i vektor fitoplazme *Candidatus Phytoplasma pyri* uzročnika propadanja kruške. U istraživanju koje je provedeno u turskim voćnjacima dobiveni su značajni rezultati koji mogu pružiti novu tehnologiju suzbijanja ovog štetnika. Visoko zaraženi voćnjaci kruškinom buhom, starosti između 20 i 22 godine tretirani su s emulzijom *M. brunneum* u koncentraciji od  $5.5 \times 10^9$  konidija  $\text{ml}^{-1}$  od kraja ožujka do kraja travnja u razdoblju od dvije godine. Visoka virulentnost utvrđena je prema 1. i 2. stadiju ličinki sa smrtnošću većom od 80% u obje godine istraživanja. Slabija učinkovitost je kod posljednja tri stadija ličinki sa smrtnošću od 51% što upozorava na važnost praćenja biologije štetnika i pravovremene primjene biopesticida (Erler i sur., 2014.).

Primjena entomopatogenih gljiva sporo zauzima svoje mjesto u poljoprivrednoj proizvodnji. Razlog tomu je nedovoljan broj istraživanja u poljskim uvjetima radi predvidljive i preciznije primjene, ali i slaba učinkovitost kod tretiranja kukaca koji imaju visoku sposobnost migracije, kao što su lisne uši (*Aphis* spp.). Zaraza tih kukaca zahtjeva brže klijanje spora od normalnog

procesa klijanja i zbog toga infekcija kontaktom, inače prednost postaje nedostatak ovog mikroinsekticida za veću komercijalnu upotrebu. Osim toga, perzistentnost u polju nakon primjene ovisi o uvjetima okoline (temperatura, UV zračenje, relativna vlaga zraka, tip tla i sl.) Često je razlog slabijeg interesa proizvođača za primjenu entomopatogenih gljiva i visoka cijena, koja rezultira slabom distribucijom i dostupnosti mikroinsekticida na tržištu (Jaronski i sur., 2017.). Pri izračunu koristi od primjene entomopatogenih gljiva također treba uzeti u obzir da su toksikološki sigurne, što može povećati cijenu poljoprivrednog proizvoda i osigurati ekonomski isplativu proizvodnju bez kemijskih insekticida.

### Mogućnost miješanja *Metarhizium* spp. sa sredstvima za zaštitu bilja

Kombinirana uporaba entomopatogenih gljiva s kemijskim insekticidima ili drugim biološkim agentima može povećati učinkovitost u suzbijanju štetnih kukaca, a ekonomski uštedjeti na manjem broju potrebnih tretmana. Utvrđeno je da se kombiniranom primjenom *M. anisopliae* i metomila postiže visoka učinkovitost u suzbijanju ličinki i odraslih stadija tripsa (*Frankliniella occidentalis*) u zaštićenim prostorima (Maniania i sur., 2002.). Nadalje, spinosad djeluje u sinergiji s *M. anisopliae*, jer miješanjem dovode do veće smrtnosti dvije vrste žičnjaka (*Agriotes lineatus* i *A. obscurus*) (Kabaluk i sur., 2007.). Kod ispitivanja kompatibilnosti entomopatogenih gljiva s kemijskim pesticidima utvrđuje se sporulacija, vegetativni rast i konidijalna klijavost gljive na temelju mjerenja vegetativnog rasta i sporulacije. Upotreba nekompatibilnih pesticida može dovesti do inhibicije razvoja i reprodukcije entomopatogena, te ograničiti njihovu primjenu u sustavu integrirane zaštite bilja (Rashid i sur., 2010.). U Tablici 1 prikazana je mogućnost miješanja *M. anisopliae* s kemijskim sredstvima za zaštitu bilja. Djelatne tvari koje su nekompatibilne s entomopatogenima inhibiraju njihov rast, kompatibilne su one kod kojih nije utvrđeno smanjenje vegetativnog rasta i sporulacije gljiva, te na umjereno toksične djelatne tvari kod kojih je zabilježen minimalni inhibitorski učinak na gljive.

**Tablica 1.** Kompatibilnost *M. anisopliae* s djelatnim tvarima sredstava za zaštitu bilja

**Table 1.** Compatibility of *M. anisopliae* with active ingredients of plant protection products

Kompatibilni/ Compatible	Umjereno toksični/ Moderately toxic	Nekompatibilni/toksični/ Incompatible / toxic
INSEKTICIDI/ INSECTICIDES		
deltametrin, imidakloprid, tiametoksam, acetamiprid spinosad, piriproksifen, lambda-chalotrin, <b>metomil</b> *	abamektin metoksifenzid	klorpirifos cipermetrin tiakloprid
deltamethrin, imidacloprid, thiamethoxam, acetamiprid spinosad, pyriproxyfen, lambda-cyhalothrin, <b>methomyl</b> *	abamectin methoxyfenozide	chlorpyrifos cypermethrin thiacloprid
FUNGICIDI/ FUNGICIDES		
	azoksistrobin, <b>etridiazol</b> , propamokard, <b>mafanoksam</b>	mankozeb, difenkonazol, propikonazol, azoksistrobin piraklostrobin, trifloksistrobin, kaptan, <b>triflumizole</b> , tiofanat metil, dimetomorf, fosetil AI, <b>kvintozen</b> , fludioksonil, <b>fluidioks-mefanoks</b> , iprodion
	azoxystrobin, <b>etridiazole</b> , propamokard, <b>mafanoxam</b>	mancozeb, dibenconazole, propiconazole, azoxystrobin pyraclostrobin, trifloxystrobin, kaptan, <b>triflumizole</b> , thiophanes methyl, dimethomorph, fosethyl AI, <b>quintozene</b> , fludioxonil, <b>fluidioxanphanox</b> , iprodione
HERBICIDI/ HERBICIDES		
glifosat, bentazon glyphosate, bentazone		2,4 - diklor fenoksi octena kiselina 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid

\*Djelatne tvari sa zadebljanim slovima nisu dozvoljene za primjenu u RH

\*Chemicals marked in bold are not allowed in RH

Izvor/Source: Neves i sur., 2001., Bruck, 2009.; Ramzan i sur., 2010., Rashid i sur., 2010., Alaves da Silva i sur., 2013., Faraji i sur., 2016.

Za djelatne tvari koje nisu kompatibilne s gljivama razrađene su dvije strategije, a koje ipak mogu omogućiti primjenu oba sredstva; prva je planiranje aplikacije entomopatogenom od 2 do 4 dana prije tretiranja kemijskim pripravcima, jer time gljiva dobiva dovoljno vremena da inficira domaćina, a druga se odnosi na ublažavanje negativnog učinka kemikalije na entomopatogena korištenjem formulacije konidija u ulju (Alaves da Silva i sur., 2013.). Formulacija osjetljivih konidija u emulziji ulja sprječava fizičko oštećenje gljivičnih propagula tijekom pripreme suspenzija na bazi vode (Xavier-Santos i sur., 2011.).

Kombinirana primjena *M. anisopliae* s drugim bioagentom, entomopatogenim nematodama, učinkovitija je nego pojedinačna primjena svakog sredstva u suzbijanju značajnog štetnika travnjaka i ukrasnog bilja listorošca *Hoplia philanthus* (Ansari i sur., 2004.). No, Ansari i sur. (2004.; 2008.), Grewal i sur. (2005.), te Tarasco i sur. (2011.) navode da kombiniranje entomopatogenih nematoda i gljiva može djelovati sinergijom, kada uzrokuju veću smrtnost štetnika, antagonistički kada jedan biološki agent inhibira rast i razvoj drugog, svaki djeluje individualno, odnosno ne ostvaruju nikakav međusobni odnos. Važno je napomenuti da simbiotske bakterije entomopatogenih nematoda proizvode toksine koji mogu imati antibiotsko i fungicidno djelovanje, stoga se trebaju odvojeno primjenjivati osim ako je istraživanjima potvrđeno drugačije. Istraživanjima je potvrđeno da neke vrste *Metarhizium* imaju sinergijsko djelovanje s drugom entomopatogenom gljivom *Beauveria bassiana* u suzbijanju kupusnog moljca *Plutella xylostella* (Correa-Cuadros i sur., 2016.). Utvrđeni su različiti utjecaji kombinacije *Metarhizium* s uljem i pogačom od *neem* sjemenki. Sinergijski učinak je utvrđen u suzbijanju crne lozine pipe (*Otiorynchus sulcatus*) (Shah i sur., 2008.), a u drugom istraživanju utvrđeno je da *neem* značajno inhibira rast i razvoj *M. anisopliae* (Hirose i sur., 2001.). Nije dovoljno istražen učinak kombinacije različitih bioagenata i ostalih agrokemikalija, te pri odluci o miješanju bioagenata treba proučiti recentnu literaturu.

Primjena entomopatogenih gljiva predstavlja minimalan rizik za ljude, biljni i životinjski svijet, unatoč svojoj fakultativnoj prirodi i relativno širokom rasponu domaćina (Strasser i sur., 2000.; Vestergaard i sur., 2003.). Butt i sur. (1998.) proveli su istraživanje, u kojem su koristili pčele kao vektore *M. anisopliae* u suzbijanju repičinog sjajnika (*Meligethes aeneus*) na uljanoj repici. Na ulazu u košnicu postavili su dispensere s entomopatogenim gljivama, a pčele su na nogama prenosile konidije gljive do cvijeta uljane repice. Utvrđena je visoka smrtnost tog značajnog štetnika, a kolonije pčela su ostale bez promjena.

### Dostupnost mikoinsekticida na bazi *Metarhizium* spp. na tržištu

Jedan od ograničavajućih čimbenika u široj primjeni *Metarhizium* spp. je dostupnost mikoinsekticida na tržištu. Posljednjih dvadeset godina intenzivno se provode istraživanja s ciljem razvoja učinkovitih mikoinsekticida. Do danas je registrirano više od 110 komercijalnih proizvoda na bazi entomopatogenih gljiva, od kojih je 40% na bazi *M. anisopliae* (Faria i Wraight, 2007.). No, većina dosad registriranih mikopesticida nisu više dostupni na tržištu. Nekoliko najvećih međunarodnih kemijskih kompanija kao što su Bayer, BASF, Monsanto, DuPont i Arysta pokrenule su proizvodnju mikrobioloških pesticida te razvijaju nove proizvode bazirane na entomopatogenim gljivama (Ravensberg, 2015.).

**Tablica 2.** Primjer dostupnog sredstva na bazi *Metarhizium anisopliae* u Europi  
**Table 2.** An example of available product based on *Metarhizium anisopliae* in Europe

Trgovački naziv/ Commercial name	Kompanija/ Company	Ciljani organizmi/ Target organisms	Primjena i skladištenje/ Application and storage
Bio 1020 F 52	Bayer Cropscience, Njemačka/Germany	Kukci/ Insect (Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hemiptera, Isoptera)  Grinje i krpelji (Acarina)	Od 20 do 100 kg ha <sup>-1</sup> micelija u granulama (veličine 0,5 – 1,0 mm) se unosi u tlo; spore su aktivne do 8 mjeseci u tlu  Skladištiti 6 mjeseci na 4°C, prije upotrebe potrebno držati na sobnoj temperaturi oko 5 dana  From 20 to 100 kg ha <sup>-1</sup> mycelium in granules (size 0.5 - 1.0 mm) is introduced into the soil; Spores are active for up to 8 months in the soil  Store for 6 months at 4°C before using it at room temperature for about 5 days

Izvor: www.agro.bayer.nl; Mulqueen, 1998.

U tablici 2 je prikazan mikoinsekticid na bazi *M. anisopliae* koji se proizvodi u Europi. U SAD-u je registriran mikoinsekticid Met 52 (Novozymes). Slični mikoinsekticidi (Biogreen, Bio-Cane, GranMet) su dostupni za kupovinu preko internetskih stranica najčešće nekoliko azijskih te brazilskih instituta i tvrtki. Entomopatogene gljive u Hrvatskoj se mogu kupiti kod ovlaštenih distributera inozemnih proizvođača.

## Zaključak

Entomopatogene gljive iz roda *Metarhizium* postižu učinkovite rezultate u suzbijanju ekonomski važnih vrsta štetnih kukaca. Učinkovitost je usporediva s rezultatima primjene kemijskih insekticida. Osim kao biopesticid, *Metarhizium* spp. su biostimulatori, odnosno biofertilizatori. S obzirom na otpornost prema nekim djelatnim tvarima, vrste ovih entomopatogena moguće je miješati s kemijskim insekticidima te na taj način pospješiti učinkovitost i smanjiti broj tretmana. Primjena entomopatogenih gljiva kao bioloških agenata, doprinosi održivoj poljoprivredi jer ne dolazi do razvijanja otpornosti štetnika i onečišćenja okoliša. Relativno mali broj istraživanja u poljskim uvjetima, dostupnost i visoka cijena proizvoda razlog je slaboj primjeni u praksi.

## Literatura

- Alves da Silva, R., Dias Quintela, E., Moura Mascarin, G., Freitas Barrigossi, J. A., Moraes Lião, L. (2013). Compatibility of conventional agrochemicals used in rice crops with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Scientia agricola*, 70(3).  
doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162013000300003>
- Ansari, M. A., Shah, F. A., Butt, T. M. (2008). Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiiorhynchus sulcatus*, control. *Entomologia experimentalis et applicata*. The Netherlands entomological society, 129(3): 340-347.  
doi: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2008.00783.x>
- Ansari, M. A., Tirry, L., Moens, M. (2004). Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. *Biological control*, 31(2): 172-180. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.04.002>
- Bakker, P. A. H. M., Doornbos, R. F., Zamioudis, C., Berendsen, R. L. Pieterse, C. M. J. (2013). Induced systemic resistance and the rhizosphere microbiome. *Plant pathology journal*. 29(2): 136 - 143.
- Barelli, L., Moonjely, S., Behie, W. S., Bidochka, J. M. (2015). Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect

- pathogenic fungi. *Plant molecular biology*, 90(6): 657-664. doi: <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0413-z>
- Brandl, M. A., Schumann, M., Przyklenk M., Patel A., Vidal S. (2016). Wireworm damage reduction in potatoes with an attract-and-kill strategy using *Metarhizium brunneum*. *Journal of pest science*, 90(2): 479-493. doi: <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0824-x>
- Bruck, D. J. (2009). Impact of fungicides on *Metarhizium anisopliae* in the rhizosphere, bulk soil and in vitro. *Journal of the international organization for biological control*, 54(4): 597-606. doi: <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9213-1>
- Butt, T. M., Carreck, N. L., Ibrahim, L., Williams, I. H. (1998). Honey-bee-mediated infection of pollen beetle (*Meligethes aeneus* Fab.) by the insect-pathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol science and technology*, 8(4), 533-538. doi: <https://doi.org/10.1080/09583159830045>
- Correa-Cuadros, J. P., Sáenz-Aponte, A., Rodríguez-Bocanegra, M. X. (2016). In vitro interaction of *Metarhizium anisopliae* Ma9236 and *Beauveria bassiana* Bb9205 with *Heterorhabditis bacteriophora* HNI0100 for the control of *Plutella xylostella*. *SpringerPlus*, 5:2068. doi: <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3745-5>
- Dogan, Y., Hazir, S., Yildiz, A., Butt, T. M., Cakmak, I. (2016). Evaluation of entomopathogenic fungi for the control of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and the effect of *Metarhizium brunneum* on the predatory mites (Acari: Phytoseiidae). *Biological control*, 111(8): 6-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.05.001>
- Erler, F., Pradier, T., Acilloglu, B. (2014). Field evaluation of an entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum* strain F52, against pear psylla, *Cacopsylla pyri*. *Pest management science*, 70(3). doi: <https://doi.org/10.1002/ps.3603>
- Faraji, S., D. Shadmehri, A., Mehrvar, A. (2016). Compatibility of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with some pesticides. *Journal of entomological society of Iran*, 36(2): 137-146.
- Faria, M. R., Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological control*, 43(3): 237-256. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Gao, Q., Jin, K., Ying, S. H., Zhang, Y., Xiao, G., Shang, Y., Duan, Z., Hu, X., Xie, X. Q. Zhou, G. (2011). Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *Plos genetics*, 7(1): e1001264. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001264>
- Grewal, P. S., Koppenhöfer, A. M., Choo, H. Y. (2005). Lawn, turfgrass and pasture applications. Eds: Grewal, P. S., Ehlers, R. F., Shapiro-Ilan, D. I. *Nematodes an biocontrol agents*. United Kingdom, Cabi Publishing, 115-141.
- Hirose, E., Neves, P. M. O. Zequi, J. A. C., Martins, L. H., Peralta, C. H., Moino Jr., A. (2001). Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. And *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Brazilian archives of biology and technology*, 44(4). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132001000400013>
- Hu, G., Leger, R. St. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied and environmental microbiology*. American society for microbiology, 68: 6383-6387.
- Hunter, D. M., R. J. Milner, P. A. Spurgin. (2001). Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortiocetes terminifera* (Orthoptera: Acrididae), with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in Australia. *Bulletin of entomological research*, 91: 93-99. doi: <https://doi.org/10.1079/BER200080>
- Jaronski, S. T., Mascarin, G. M. (2017). Mass production of fungal entomopathogens. Ed: Lacey, L. A. *Microbial control of insect and mite pests: from theory to practice*. United Kingdom, Academic press. 137-151.
- Kabaluk, J. T., Ericsson, J. D. (2007). *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. *Agronomy journal abstract - notes & unique phenomena*. American society of agronomy, 99(5): 1377-1381. doi: <https://doi.org/10.2134/agronj2007.0017N>
- Kepler, R. M., Uguine, T. A., Maul, J. E., Cavigelli, M. A., Rehner, S. A. (2015). Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environmental microbiology*, 17(8): 2791-2804. doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12778>
- Kuboki, H., Tsuchida, T., Wakazono, K., Isshiki, K., Kumagai, H., and Yoshioka, T. (1999.). Mer-f3, 12-hydroxy-ovalicin, produced by *Metarrhizium* sp. f3. *The Journal of antibiotics*. Japan antibiotics research association, 52(6):590-593. doi: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.590>
- Lacey, L. A. (2017). Entomopathogens used as microbial control agents. Ed: Lacey, L. A. *Microbial control of insect and mite pests: from theory to practice*. Entomopathogens used as microbial control agents. United Kingdom, Academic press, 3-12.
- Liao, X., O'Brien, T. R., Fang, W., Leger, R. J. St. (2014). The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(16): 7089-7096. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5788-2>
- Maceljski, M. (2002.). *Poljoprivredna entomologija*, Čakovec, Zrinski d.d., 17-18.
- Maniania, N. K., Ekesi, S., Löhr, B., Mwangi, F. (2002). Prospects for biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, on chrysanthemum. *Mycopathologia*, 155(4): 229-235. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1021177626246>
- Messing, R., Brodeur, J. (2018). Current challenges to the implementation of classical biological control. *BioControl*, 63(1): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9862-4>
- 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(2): 145-155. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>
- Mulqueen, P. J. (1998). Recent developments on safer formulations of agrochemicals. Ed: Knowles, D. A. In *chemistry and technology of agrochemical formulations*. Dordrecht, Netherlands. Springer, 121-157.
- Neves, P. M. O. J., Hirose, E., Tchujo, P. T., Moino, JR. A. (2001). Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical entomology*, 30(2). doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000200009>
- Ramzan Asi, M., Bashir, M. H., Afzal, M., Ashfaq, M., Sahi, S. T. (2010). Compatibility of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Paeclomyces fumosoroseus* with selective insecticides. *Pakistan journal of botany*, 42(6):4207-4214.



- Rashid, M., Baghdadi, A., Sheikhi, A., Pourian, H. R., Gazavi, M. (2010). Compatibility of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) with several insecticides. Journal of plant protection research, 50(1). doi: <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0004-6>
- Ravensberg, W. J. (2015.). Commercialisation of microbes: present situation and future prospects. Ed: Lugtenberg, E. Principles of plant-microbe interactions. Cham, Germany. Springer, 309-317. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3\\_32](https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_32)
- Ravindran, K., Chitra, S., Wilson, A., Sivaramkrishnan, S. (2014). Evaluation of antifungal activity of *Metarhizium anisopliae* against plant phytopathogenic fungi. Eds: Kharwar, R. N., Upadhyay, R. S., Dubey, N. K., Raghuwanshi, R. Microbial diversity and biotechnology in food security. New Delhi, India. Springer, 251-255 doi: [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2\\_22](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_22)
- Roberts, D.W., J. ST. Leger, R. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. Eds: Laskin, A., Bennett, J., Gadd, G. Advances in applied microbiology. English. Academic Press, V54: 1-51.
- Shah, F. A., Gaffney, M., Ansari, M. A., Prasad, M., Butt, T. M. (2008.). Neem seed cake enhances the efficacy of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for the control of black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae). Biological control, 44(1), 111-115. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.09.009>
- Strasser, H., Vey, A., Butt, T. M. (2000). Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? Biocontrol science and technology. 10(6):717-735. doi: <https://doi.org/10.1080/09583150020011690>
- Sun, M. H., Gao, L., Shi, Y. X., Li, B. J., Liu, X. Z. (2006). Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. Journal of invertebrate pathology, 93(1): 22-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.006>
- Tarasco, E., Alvarez, C. S., Triggiani, O., Moraga, E. Q. (2011). Laboratory studies on the competition for insect haemocoel between *Beauveria bassiana* and *Steinernema ichnusae* recovered in the same ecological niche. Biocontrol science and technology, 21(6): 693-704. doi: <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.570428>
- van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., Urbaneja, A. (2018). Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. BioControl, 63(1): 39-59.
- Vestergaard S., Cherry A., Keller S., Goettel, M. (2003). Safety of hyphomycete fungi as microbial control agents. environmental. Eds: Hokkanen, H. M. T., Hajek, A. E. Environmental impacts of microbial insecticides. Dordrecht, Netherlands. Springer, 35-62. doi: [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1441-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1441-9_3)
- Xavier-Santos, S., Lopes, R. B., Faria, M. (2011). Emulsifiable oils protect *Metarhizium robertsii* and *Metarhizium pingshaense* conidia from imbibitional damage. Biological control, 59(2): 261-267. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.08.00340>
- Yousef, M., Garrido-Jurado, I., Ruiz-Torres, M., Quesada-Moraga, E. (2016). Reduction of adult olive fruit fly populations by targeting preimaginals in the soil with the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*. Journal of pest science, 90(1): 345-354. doi: <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0779-y>

Prispjelo/Received: 22.4.2018

Prihvaćeno/Accepted: 2.7.2018.

Review paper

## Potential of entomopathogenic fungi *Metarhizium* spp. in control of insects pest

### Abstract

Biological control of insect pests has increasing importance due to a insect resistance to certain chemical pesticides, and for the purpose of producing toxicologically safe food. Biological control methods are based on the application of natural agents such as pathogens, parasites and predators of insects pests. The aim of this paper is to reveal the advantages and disadvantages of *Metarhizium* based mycoinsecticides. We discussed the biology of these entomopathogenic fungi, their interaction with the plant, the environment, other organisms and agrochemicals, and their availability on the market. Successful examples of *Metarhizium* spp. in the control of wireworms (Elateridae), olive fruit fly (*Bactrocera oleae*), two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) and pear psylla (*Cacopsylla pyri*) are described. The efficiency of *Metarhizium* spp. in control of important pests provided results that are comparable to the chemical pesticides. Besides their properties as biopesticides, *Metarhizium* spp. are also considered as biostimulators or biofertilizers. Availability, high price of mycoinsecticides, and a small number of researches done in the fields are major causes of poor utilization of this bioagent.

**Keywords:** biocontrol, biopesticide, interaction, efficiency, compatibility