

Izvorni znanstveni članak
Original scientific paper

Prispjelo - Received: 8. 5. 2012.
Prihvaćeno - Accepted: 9. 7. 2012.

Nikola Lacković ✉¹, **Milan Pernek**¹

MOGUĆNOST PRIMJENE ENTOMOPATOGENE GLJIVE *BEAUVERIA BASSIANA* ZA SUZBIJANJE JASENOVE PIPE (*STEREONYCHUS FRAXINI*)

*POSSIBILITY OF USING ENTOMOPATHOGENIC FUNGI
BEAUVERIA BASSIANA FOR CONTROLLING THE ASH
WEEVIL (STEREONYCHUS FRAXINI)*

SAŽETAK

Jasenova pipa spada među najopasnije štetnike jasena, a štete čini i na drugim vrstama. Dosadašnje suzbijanje svodi se na primjenu kemijskih pesticida u stadiju ličinke. Kako se primjena kemijskih pesticida ograničava, prednost se daje pripravcima na biološkoj bazi. Entomopatogena gljiva *Beauveria bassiana* u znatnoj mjeri napada prezimljujuća imaga jasenove pipe, a pozitivni rezultati ispitivanja na drugim vrstama iz porodice pipa (Curculionidae) opravdavaju istraživanja mogućnosti primjene ove gljive za suzbijanje jasenove pipe.

Ovim istraživanjem htjelo se utvrditi potencijal *B. bassiana* kao biološkog sredstva za suzbijanje jasenove pipe. S tim u svezi uspoređena je efikasnost eksperimentalnog soja BB1 iz Mađarske i autohtonog soja dobivenog iz uginulih zaraženih imaga iz Lipovljana. Pokus s eksperimentalnim sojem BB1 iz Mađarske nije pokazao utjecaj na mortalitet imaga, dok je pokus kontaminacije sporama s uginulih zaraženih imaga iz Lipovljana pokazao ugibanje 83 % imaga jasenove pipe od mikoze koju je uzrokovala *B. bassiana*. Ujedno je ojačana pretpostavka o koevolucijski razvijenom soju gljive patogenom za lokalne populacije kukca te utvrđen potencijal gljive *B. bassiana* kao biološkog sredstva za suzbijanje jasenove pipe.

Daljnja istraživanja treba usmjeriti prema masovnoj proizvodnji spora i terenskom ispitivanju u šumi.

Ključne riječi: *Beauveria bassiana*, *Stereonychus fraxini*, *Fraxinus* spp.,
biološka kontrola

✉ Dopisni autor/Corresponding author: Tel. +385 1 6273 023, e-mail: nikolal@sumins.hr

¹ Hrvatski šumarski institut, Cvjetno naselje 41, HR-10450 Jastrebarsko, Croatia

UVOD

INTRODUCTION

Jasenova pipa, *Stereonychus fraxini* Deg. (Coleoptera, Curculionidae), spada među najopasnije štetnike jasena (*Fraxinus* spp.), velike štete može činiti na maslini (*Olea europea* L.), a zabilježena je i na još nekoliko vrsta drveća (Mikloš 1954, 1977, 1987, Kovačević 1956, Schwenke 1974). Rasprostranjena je u gotovo čitavoj Europi i sjevernoj Africi (Mikloš 1977), a ozbiljnijim štetnikom smatra se u nizinskim šumama Hrvatske (Kovačević 1956, Mikloš 1954) te u jasenovim šumama zemalja jugoistočne Europe (Glavendekić 2010, Markova 1992a, Mihajlović 2008, Rashev 1986, 1988, Schwenke 1974, Tsankov i dr. 1990). Na području nekadašnjeg SSSR-a razmatrana je i kao potencijalno karantenska vrsta (Orlinski i dr. 1991).

Imaga jasenove pipe u travnju izlaze iz zimskih skrovišta, kopuliraju i obavljaju regeneracijsko žderanje na pupovima i mladom lišću. Štete koje nastaju od tih žderanja mogu prouzročiti izostanak listanja. Novonastale ličinke prvo skeletiraju, a u konačnici mogu potpuno obrstiti lišće (golobrst). Tijekom svibnja ličinke silaze u mahovinu gdje se kukulje. Imaga druge generacije tijekom lipnja izlaze iz kukuljica, obavljaju dopunsko žderanje na listu, a već u srpnju i kolovozu odlaze u mahovinu uz glavu korijena i stelju te tu prezimljuju (Kovačević 1956, Mikloš 1954, 1977, 1987). Prema Foggo i dr. (1994) napadi ovoga kukca mogu biti jači nakon stresa od suše ili oštećenja korjenova sustava.

Suzbijanje jasenove pipe predstavlja problem zbog sve strožih kriterija za primjenu pesticida u šumarstvu. Tomiczek i dr. (2008) navode kako se suzbijanje teško provodi i da je moguć tretman insekticidima u doba razvojnog stadija ličinke (svibanj). Nekada se suzbijanje provodilo tretiranjem kukaca u stadiju ličinki raznim kemijskim pesticidima, čime se nije spriječila glavna šteta nastala regeneracijskim žderanjem imaga u rano proljeće (Kovačević 1956, Mihajlović 2008, Mikloš 1977, Tsankov i dr. 1990). Europska direktiva 91/414/EEC s aneksima, čije smjernice vrijede i u Hrvatskoj, Zakon o sredstvima za zaštitu bilja (NN 70/05, 124/10) te pravilnici i liste proizišle iz istih, ograničavaju i zabranjuju promet i primjenu kemijskih sredstava do sada korištenih u suzbijanju jasenove pipe. Time razvoj selektivnih pripravaka na biološkoj bazi za suzbijanje svih vrsta štetnih organizama, pa tako i jasenove pipe, dobiva veću vrijednost. Važnu ulogu bi u tom smislu mogli imati prirodni neprijatelji jasenove pipe.

Poznavanje utjecaja prirodnih neprijatelja jasenove pipe svodi se uglavnom na parazitoide (Blando i Mineo 2003, 2005, Kostjukov i Tuzlukova 2000, Markova 1998, Mikloš 1983, Schwenke 1974) i na entomopatogenu gljivu *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Hypocreales, Cordycipitaceae). Mogućnost primjene parazitoida u suzbijanju jasenove pipe još nije istraživana. Poznato je da *B. bassiana* znatno reducira prezimljujuća imaga (Markova 1992b, Pernek i Lacković 2011), a potencijal za primjenu u biološkom suzbijanju općenito je dokazivan više puta (npr.

Bathon 1991, Kreutz i dr. 2004, Wegensteiner 1992). Najveći problem priprava na bazi *B. bassiana* jest izrazita neselektivnost (npr. Kreutz i dr. 2000, Pernek 2007, Vaupel i Zimmermann 1996). *Beauveria bassiana* anamorfn je stadij gljive, čiji je telemorfn stadij *Cordyceps bassiana* definiran tek 2001. godine. Raširena je po cijeloj Zemlji, prirodno živi u tlu i djeluje kao parazit na raznim člankonošcima, a od kukaca je najpoznatija u redovima Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Hemiptera i Orthoptera (Zhengzi i dr. 2001). Pozitivni rezultati laboratorijskih i terenskih tretiranja kukaca iz porodice Curculionidae (Sabbahi i dr. 2009, Steinwender i dr. 2010, Trudel i dr. 2007, Willoughby i dr. 1998) upućuju na potrebu istraživanja mogućnosti primjene entomopatogene gljive *B. bassiana* za suzbijanje jasenove pipe.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi potencijal gljive *B. bassiana* kao biološkog sredstva za suzbijanje jasenove pipe u laboratorijskim pokusima ispitivanjem učinkovitosti eksperimentalnog soja BB1 (ustupio Bioved 2005 Ltd. iz Mađarske) te još nedefiniranog soja dobivenog sa zaraženih uginulih imaga iz Lipovljana.

MATERIJALI I METODE

MATERIALS AND METHODS

Pokusi su provedeni tijekom zime 2009./2010. godine. Imaga su izdvojena rastresanjem i floatacijom (potapanje slojeva mahovine u vodu sobne temperature u trajanju pola sata pri čemu živa imaga izlaze na nepotopljene dijelove) iz ukupno 3,2 m² mahovine skupljene u Šumariji Lipovljani, odjeli 96a (45,3789 °N, 16,7955 °E) i 191 (45,3647 °N, 16,8793 °E). Kukci su do postavljanja pokusa čuvani u Petrijevim posudama u hladnjaku na 4 °C. Za provedbu tretiranja imaga su raspoređena pojedinačno u Petrijeve posude s komadićem celulozne vate za održavanje vlažnosti i tako stavljena u klimatizacijsku komoru (Snijders scientific – Economic delux) na kontrolirane uvjete svjetla (L : D = 18 : 6) i temperature (16 ± 2 °C i 22 ± 2 °C). Provedena su 3 pokusa (Tablica 1.): i) inokulacija pipetiranjem 2%-tne otopine eksperimentalnog soja BB1 iz Mađarske (deklarirana koncentracija 5 x 10⁸ konidija/g praha) u dozama 1, 5 i 10 µL izravno na živa imaga, ii) inokulacija uranjanjem živih imaga u 2 i 10%-tnu otopinu eksperimentalnog soja BB1 iz Mađarske, iii) kontaminacija sporama s uginulih imaga iz Lipovljana zaraženih gljivom *B. bassiana*. Trajanje pokusa bilo je ograničeno na 15 dana po principu testa akutne toksičnosti (Duffus i dr. 2007).

Tijekom pokusa obavljeno je vlaženje ukapavanjem staklenom kapaljkom po dvije kapi destilirane vode dnevno na staničevinu u svaku Petrijevu posudu. Svakodnevno je praćeno stanje imaga, a nakon uginuća obavljena je mikroskopska provjera uzroka uginuća.

Statistička obrada podataka provedena je u programu Microsoft Excell 2007 pomoću dodatka StatistiXL (Roberts i Withers 2007).

Tablica 1. Opis načina tretiranja u pojedinim pokusima.
Table 1. Description of the treatment in individual trials.

Pokus <i>Trial</i>	Temperatura <i>Temperature</i>	Sredstvo <i>Agent</i>	Tretman <i>Treatment</i>	Doza/ koncentracija <i>Dose / Concentration</i>	N° imaga tretirano <i>N° imagoes treated</i>
1	16 °C	Eksperimentalni soj BB1 iz Mađarske <i>Experimental strain BB1 from Hungary</i>	Pipetiranje 2%-tne otopine u različitim dozama izravno na živa imaga <i>Pipetting of 2% solution in vari- ous doses directly on living imagoes</i>	1 µL	30
				5 µL	30
				10 µL	30
				kontrola <i>control</i>	30
2	22 °C	Eksperimentalni soj BB1 iz Mađarske <i>Experimental strain BB1 from Hungary</i>	Uranjanje živih imaga u otopine različite koncentracije <i>Dipping of living imagoes into solutions of various concentrations</i>	2 %	30
				10 %	30
				kontrola <i>control</i>	30
3	22 °C	Uginula imaga iz Lipovljana zaražena gljivom <i>Dead imagoes from Lipovljani infected with fungi</i>	Uz živa imaga postavljene su po tri ljuštore imaga prekrivene micelijem <i>B. bassiana</i> <i>Setting of three shells covered with of B. bassiana mycelia near living imagoes</i>	tretirani <i>treated</i>	23*
				kontrola <i>control</i>	23*

* korišten je manji broj zbog nedostatka živih imaga (*smaller number was used due to lack of living adults*)

REZULTATI I RASPRAVA

RESULTS AND DISCUSSION

i) Pokus inokulacije pipetiranjem različitih doza 2%-tne otopine eksperimentalnog soja BB1 iz Mađarske rezultirao je niskim mortalitetom, a neparametarska (Kruskal-Wallis) analiza vremena ugibanja pokazuje da nema statistički velikih razlika među grupama (Tablica 2.).

ii) Pokus inokulacije uranjanjem u otopine različite koncentracije eksperimentalnog soja BB1 iz Mađarske također je rezultirao niskim mortalitetom, a statistički test Kruskal-Wallis pokazao je da nema velikih razlika u vremenu ugibanja među grupama (Tablica 2.). Udio *B. bassiana* u oba je pokusa izostao jer nije bilo simptoma zaraze.

Tablica 2. Rezultati pokusa inokulacije pipetiranjem različitih doza i inokulacije uranjanjem u otopine različite koncentracije eksperimentalnog soja BB1 iz Mađarske. Trajanje svakog pokusa 15 dana prema principu testa akutne toksičnosti (Duffus i dr. 2007).

Table 2. Results of experiment of inoculation by pipetting different doses and inoculation by submerging into solutions of different concentrations of the experimental strain BB1 from Hungary. Duration 15 days respectively based on the principle of acute based toxicity (Duffus et al. 2007).

Doza/ koncentracija Dose / Concentration	Temperatura Temperature	Mortalitet Mortality		Vremena ugibanja Time until death			Kruskal-Wallis			
		n	%	\bar{x}	$\Delta \bar{x}$	SD	χ^2	p	F	p
1 μ L	16 °C	9	30	2,7	1,5	4,6	3,842	0,279	1,340	0,293
5 μ L		4	13	5,3	2,8	5,7				
10 μ L		5	17	8,0	2,9	6,6				
Kontrola Control		5	17	7,0	1,7	3,8				
2 %	22 °C	1	3	4,0	-	-	0,505	0,777	0,237	0,791
10 %		12	40	3,5	1,1	3,8				
Kontrola Control		13	43	3,0	0,6	2,2				

Oba pokusa s eksperimentalnim sojem BB1 iz Mađarske nisu rezultirala potvrdom infekcije, stoga ne možemo govoriti o rezultatima akutne toksičnosti i letalne doze. Uzroke takvih rezultata ne možemo sa sigurnošću odrediti, ali možemo pretpostaviti mogući razlog. Filogenetska istraživanja metodama molekularne biologije pokazuju da se rod *Beauveria*, a unutar njega i *B. bassiana*, sastoji od mnogo različitih linija (eng. *lineage*) koje bi trebale biti prepoznate čak i kao različite vrste, na što morfološka taksonomska obilježja ne upućuju (Rehner i Buckley 2005, Rehner i dr. 2011). Pokusni soj BB1 razvijen je za ciljni organizam potkornjaka *Ips typographus* L., kukca također iz porodice pipa (Curculionidae), što dodatno učvršćuje ovu hipotezu.

iii) Pokus kontaminacije sporama s uginulih imaga iz Lipovljana zaraženih gljivom *B. bassiana* rezultirao je uginućem ukupno 91 % imaga nakon 15 dana, a na 83 % tretiranih imaga potvrđena je infekcija gljivom *B. bassiana* (Tablica 3.).

Tablica 3. Rezultati pokusa kontaminacijom s uginulih autohtonih imaga. Trajanje pokusa 15 dana prema principu testa akutne toksičnosti (Duffus i dr. 2007).

Table 3. Results of experiment of contamination from dead native adults. Duration 15 days, based on the principle of acute toxicity (Duffus et al. 2007).

Uzorak Sample	Temperatura Temperature	Mortalitet / Mortality %		Vremena ugibanja Time until death			Mann-Whitney	
		Ó	B. b.	\bar{x}	$\Delta \bar{x}$	SD	U	p (t < k)*
Tretirani Treated	22 °C	91	83	9,4	0,6	2,8	169,5	0,017
Kontrola Control		48	17	11,5	1,2	4,1		

* t – tretirani (*treated*); k – kontrola (*control*); B. b. – *Beauveria bassiana*

Postotak ugibanja pipa od mikoze koju je uzrokovala *B. bassiana* može se izračunati prema Abbottovoj formuli (Abbott 1925):

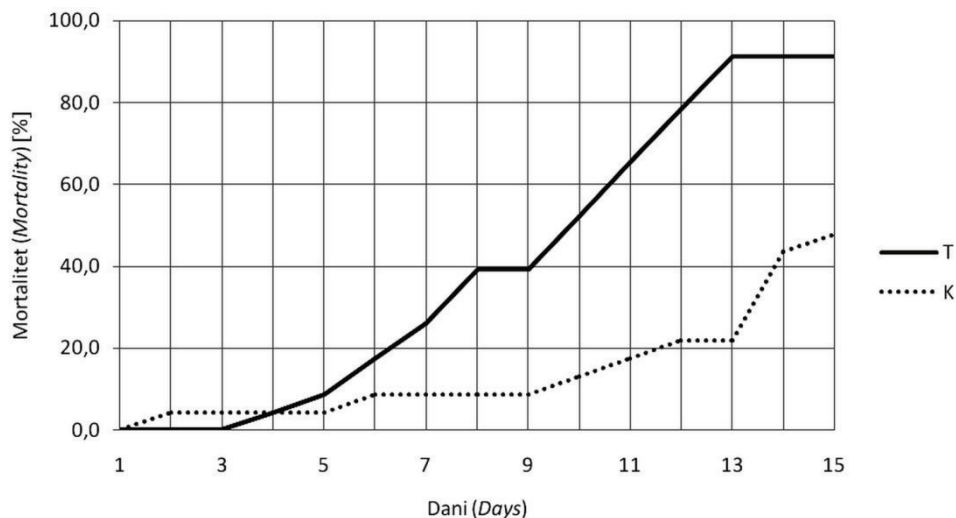
$$P = ((K - T) / K) \times 100 = ((52 - 9) / 52) \times 100 = 83 \%$$

gdje je P – postotak ugibanja pipa od entomopatogene *B. bassiana*, K – postotak preživjelih imaga u kontroli, T – postotak preživjelih imaga u tretiranju.

Ugibanje 83 % imaga jasenove pipe od posljedica infekcije gljivom *B. bassiana* s uginulih imaga iz Lipovljana potvrdilo je visoku efikasnost ovog entomopatogena u laboratorijskim uvjetima.

Mortalitet u kontrolnoj grupi nakon 15 dana iznosio je 48 %, uz infekciju gljivom *B. bassiana* od 17 %, što je slično rezultatu iz drugog pokusa, gdje je pri istoj temperaturi (22 °C) mortalitet u kontrolnoj grupi iznosio 43 % (Tablica 2.). Dodatno, u ovome je pokusu mortalitet u kontrolnoj grupi nakon 13 dana iznosio tek 21 %, dok je u istom trenutku u tretiranoj grupi iznosio 91 % (Slika 1.).

Što se brzine ugibanja imaga tiče, ono je u tretiranoj grupi bilo vidno brže od kontrolne grupe (Slika 1.). To pokazuje i neparametarski statistički test (Mann-Whitney) kojim se dokazuje da su vremena ugibanja tretirane grupe znatno manja od kontrolne (p = 0,017) (Tablica 3.). Već nakon 5 dana vidljiva je razlika u ugibanju imaga tretirane i kontrolne grupe, a već nakon 8 dana razlika tretirane i kontrolne grupe iznosi 35 % (Slika 1.). Simptomi mikoze kao bijeli micelij gljive pojavljuju se već nekoliko dana poslije smrti kao što to opisuju Goettel i Inglis (1997).



Slika 1. Kumulativni mortalitet u pokusu kontaminacije sporama s uginulih imaga iz Lipovljana zaraženih gljivom *B. bassiana* (T – tretirani; K – kontrola).

Figure 1. Cumulative mortality in the experiment of contamination by spores from dead imago from Lipovljani infected with fungus *B. bassiana* (T - treated; K - control).

Utjecaj temperature na razvoj infekcije nije moguće potpuno objasniti, ali postoji indikacija utjecaja temperature na opće fiziološko stanje kukaca, što se vidi iz vremena ugibanja jedinki u kontrolnim grupama. U prvom pokusu, postavljenom na 16 °C, mortalitet nakon 15 dana bio je 17 %, dok je u drugom i trećem pokusu, postavljenim na 22 °C, mortalitet nakon 15 dana bio 43 % odnosno 47 %. Možemo zaključiti da je temperatura od 16 °C povoljnija za fiziološko stanje imaga. U prilog tome idu i činjenice da period rojenja kukca u prirodnim uvjetima traje dva mjeseca (travanj – lipanj) te da dugogodišnji prosjek temperatura za područje na kojem je skupljana mahovina za navedene mjesece iznosi 11 - 19,5 °C (prosječno 16 °C) (DHMZ 2012). Zbog toga se za buduće laboratorijske pokuse predlaže temperatura od 16 °C.

Znatan utjecaj na prezimljujuća imaga jasenove pipe iz prethodnih istraživanja (Markova 1992b, Pernek i Lacković 2011) te 83 % imaga uginulih od posljedica mikoze u ovom pokusu čine gljivu *B. bassiana* vrlo perspektivnim biološkim sredstvom suzbijanja. Dodatno, specifična biologija gljive (živi u tlu) daje joj potencijal za sprječavanje glavne štete tretiranjem imaga u mahovini, pripremom na bazi *B. bassiana*, prije izlaska na regeneracijsko žderanje.

Ovi rezultati, kao i rezultati filogenetskih istraživanja (Rehner i Buckley 2005, Rehner i dr. 2011), jačaju pretpostavku o postojanju koevolucijski razvijenog soja gljive *B. bassiana*, patogenog za lokalne populacije jasenove pipe i upućuju na potrebu izolacije tog soja s autohtonih uginulih imaga, identifikaciju soja i dodatna

laboratorijska istraživanja. Također je potrebno provesti i terenska ispitivanja kako bi se utvrdila učinkovitost tretiranja na terenu i donijela odluka o uspostavi metodologije tretiranja. Prilikom planiranja terenskog pokusa i metodologije tretiranja uopće, treba uzeti u obzir da nije potvrđen utjecaj gljive na kukca u razvojnom stadiju ličinke te da postoji veća osjetljivost prezimjelih od svježih izleglih imaga (Markova 1992b).

ZAHVALE

ACKNOWLEDGMENTS

Ovaj pokus financirale su Hrvatske šume d. o. o. kroz projekt „Mogućnost primjene biotehničkih i bioloških metoda u suzbijanju štetnih kukaca u šumarstvu”. Zahvaljujemo Blaženki Ercegovac iz Hrvatskoga šumarskog instituta na tehničkoj pomoći te Željki Kušan i Dinku Hace (Hrvatske šume d. o. o.), na susretljivosti i pomoći pri skupljanju uzoraka u Lipovljanima.

LITERATURA

REFERENCES

- Abbott, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Bathon, H. 1991. Möglichkeiten der biologischen Schädlingsbekämpfung von Borkenkäfern. U: A. Wulf, R. Kehr (ur.), Borkenkäfergefahren nach Sturmschäden. Mitt. aus der Biol. Bundesanst. für Land- und Forstw. 267: 111-117.
- Blando, S., Mineo, G. 2003. On the phenology of postembryonal stages of *Stereonychus fraxini* (De Geer, 1775) (Coleoptera: Curculionidae) and on its parasitoids in Sicily. Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura 35(3): 257-277.
- Blando, S., Mineo, G. 2005. Further data on bioethology of *Stereonychus fraxini* (De Geer) (Coleoptera Curculionidae) and on its parasitoids on *Olea europea* L. orchards. Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura 37(1): 57-67.
- Državni hidrometeorološki zavod. 2012. Srednje mjesečne vrijednosti klimatoloških elemenata. URL: <http://klima.hr/klima.php?id=mjes¶m=04> (11.01.2012)
- Duffus, J. H., Nordberg, M., Templeton, D. M. 2007. Glossary of terms used in toxicology, 2nd Edition (IUPAC recommendations 2007). Pure. Appl. Chem. 79(7): 1153-1344.
- Foggo, A., Speight, M. R., Grégoire, J. C. 1994. Root disturbance of common ash, *Fraxinus excelsior* (Oleaceae), leads to reduced foliar toughness and increased feeding by a folivorous weevil, *Stereonychus fraxini* (Coleoptera, Curculionidae). Ecol. Entomol. 19(4): 344-348.
- Glavendekić, M., 2010. Current insects on ornamental plants in Serbia and their economic and ecological importance. Biljni Lekar (Plant Doctor) 38(2): 122-133.
- Goettel, M. S., Inglis G. D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. U: L. Lacey (ur.), Manual Techniques in Insect Pathology. Academia Press Inc., San Diego, str. 213-249.

- Kostjukov, V. V., Tuzlukova, A. V. 2000. A new species of the genus *Tetrastichus* Haliday, 1844 (Hymenoptera: Eulophidae) from Republic Moldova. Russian Entomological Journal 9(2): 155-156.
- Kovačević, Ž. 1956. Primijenjena entomologija. 3. knjiga, Šumski štetnici. Zagreb: Poljoprivredni nakladni zavod.
- Kreutz, J., Zimmermann, G., Marohn, H., Vaupel, O., Mosbacher, G. 2000. Preliminary investigations on the use of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and other control methods against the bark beetle, *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae) in the field. IOBC-WPRS Bulletin 23: 167-173.
- Kreutz, J., Vaupel, O., Zimmermann, G. 2004. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions. J. Appl. Entomol. 128(6): 384-389.
- Markova, G. 1992a. Damage caused by ash weevil *Stereonychus fraxini* in floodplain forest. Nauka za Gorata 29(4): 74-83.
- Markova, G. 1992b. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin as pathogen of ash weevil, *Stereonychus fraxini* Deg. (Col., Curculionidae), in Bulgaria. J. Appl. Entomol. 114(3): 275-279.
- Markova, G. 1998. Biotic factors affecting *Stereonychus fraxini* populations in the Longoza forest, Bulgaria. U: M. L. McManus, A. M. Liebhold (ur.), Proceedings: population dynamics, impacts, and integrated management of forest defoliating insects. USDA Forest Service General Technical Report NE-247, str. 345.
- Mihajlović, Lj. 2008. Šumarska entomologija. Beograd: Šumarski fakultet.
- Mikloš, I. 1954. Jasenova pipa (*Stereonychus fraxini* Deg.). Šumar. list 78(1): 11-21.
- Mikloš, I. 1977. Jasenova pipa ili jasenov surlaš *Stereonychus fraxini* Degeer (Curculionidae, Coleoptera). Rad. -Šumar. inst. Jastrebar. 31: 13-19.
- Mikloš, I. 1983. On the parasites of the ash weevil *Stereonychus fraxini* Degeer. Acta Entomologica Jugoslavica 19(1/2): 91-96.
- Mikloš, I. 1987. Some defoliators of ash and the effects of defoliation. Glas. šum. pokuse, posebno izdanje 3: 277-286.
- Orlinskiĭ, A. D., Shakhramanov, I. K., Mukhanov, S. Yu., Maslyankov, V. Yu. 1991. Potential quarantine forest pests in the USSR. Zashchita Rastenii 11: 37-41.
- Pernek, M. 2007. Utjecaj entomopatogene gljive *Beauveria bassiana* na mortalitet jelovih potkornjaka *Pityokteines spinidens* i *Pityokteines curvidens*. Rad. -Šumar. inst. Jastrebar. 42(2): 143-153.
- Pernek, M., Lacković, N. 2011. *Beauveria bassiana* on overwintering adults of *Stereonychus fraxini* in Croatia. U: R.-U. Ehlers, N. Crickmore, i dr. (ur.), Insect pathogens and entomopathogenic nematodes. IOBC-WPRS Bulletin 66: 205-207.
- Rashev, S. 1986. A dangerous pest of *Fraxinus oxycarpa*. Gorsko Stopanstvo Gorska Promishlenost 42(4): 38-39.
- Rashev, S. 1988. Dangerous pests of buds and leaves of *Fraxinus oxycarpa*. Gorsko Stopanstvo 44(7): 11-12.
- Rehner, S. A., Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* telemorphs. Mycologia 97(1): 84-98.

- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., Humber, R. A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103(5): 1055-1073.
- Roberts, A., Withers Ph. 2007. StatistixXL 1.8 Trial. URL: <http://www.statistixl.com/> (31.12.2007)
- Sabbahi, R., Merzouki, A., Guertin, C. 2009. Potential effect of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) on *Anthonomus signatus* (Coleoptera: Curculionidae) in strawberries. *Biocontrol Sci. Technol.* 19(7): 729-741.
- Schwenke, W. 1974. Die Forstschädlinge Europas. Band 2, Käfer. Hamburg – Berlin: Paul Parey.
- Steinwender, B. M., Krenn, H. W., Wegensteiner, R. 2010. Different effects of the insectpathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Deuteromycota) on the bark beetle *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae) and on its predator *Thanasimus formicarius* (Coleoptera: Cleridae). *J. Plant. Dis. Protect.* 117(1): 33–38.
- Tomiczek, C., Diminić, D., Cech, T., Hrašovec, B., Krehan, H., Pernek, M., Perny, B. 2008. Štetnici i bolesti urbanog drveća. Zagreb: Šumarski institut, Jastrebarsko i Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Trudel, R., Lavallée, R., Guertin, C., Côté, C., Todorova, S. I., Alfaro, R., Kope, H. 2007. Potential of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) for controlling the white pine weevil, *Pissodes strobi* (Col.: Curculionidae). *J. Appl. Entomol.* 131(2): 90-97.
- Tsankov, G., Mirchev, P., Rashev, S. 1990. Studies on the biology and ecology of the ash weevil *Stereonychus fraxini* and measures for controlling it. *Nauka za Gorata* 27(3): 77-81.
- Vaupel, O., Zimmermann, G. 1996. Orientierende Versuche zur Kombination von Pheromonfallen mit insektenpathogenen Pilz *B. bassiana* (Bals.) Vuill. gegen die Borkenkäferart *Ips typographus* L. (Col., Scolytidae). *Anz. Schädlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz.* 69: 175-179.
- Wegensteiner, R. 1992. Untersuchungen zur Wirkung von *Beauveria bassiana* Arten auf *Ips typographus* (Col., Scolytidae). *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewante Entomologie* 8: 104-106.
- Willoughby, B. E., Glare, T. R., Kettlewell, F. J., Nelson, T. L. 1998. *Beauveria bassiana* as a potential biocontrol agent against the clover root weevil, *Sitona lepidus*. *Proceedings of the 51st New Zealand Plant Protection Conference*, str. 9-15.
- Zengzhi, L., Chunru, L., Bo, H., Meizhen, F. 2001. Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. *Chinese Sci. Bull.* 46(9): 751–753.

*POSSIBILITY OF USING ENTOMOPATHOGENIC FUNGI
BEAUVERIA BASSIANA FOR CONTROLLING THE ASH
WEEVIL (STEREONYCHUS FRAXINI)*

Summary

*Ash weevil (*Stereonychus fraxini*) is one of the most dangerous pests of ash, it also damages olives, and some other tree species. So far, suppression has been conducted by mainly using chemical pesticides during the developmental stages of larvae, which has not prevented major damage resulting from beetles (regeneration devouring?). Because of environmental concerns, the use of chemical pesticides is restricted and development of selective biological pesticides is proposed. A significant effect of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* on overwintering adults of ash weevil, together with the positive results of tests on other species of the weevil family (*Curculionidae*), suggest that the possibility of applications of the fungus to control ash weevil should be studied.*

*This study was carried out in order to determine the potential of *B. bassiana* as a biological agent for the control of ash weevil, and to compare the efficacy of an experimental strain BB1 from Hungary and native, yet undefined, strain from fungus-infected dead beetles from Lipovljani. Trial with the experimental strain BB1 from Hungary showed no effect on mortality of adults, while contamination by spores from dead infected beetles from Lipovljani showed a significant effect on mortality caused by the entomopathogenic fungi (83%). This strengthened the assumption of the coevolutionary developed strain of fungi, pathogenic for the local population of insects and strengthened the potential of *B. bassiana* as a biological control agent to control ash weevil.*

Key words:* *Beauveria bassiana, Stereonychus fraxini, ash weevil, Fraxinus spp., biological control