

PRVI NALAZ ENTOMOPATOGENE GLJIVE *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu & R.S. Soper NA GUBARU U BOSNI I HERCEGOVINI

FIRST RECORD OF GYPSY MOTH ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu & R.S. Soper IN BOSNIA AND HERZEGOVINA

Marno MILOTIĆ¹, Osman MUJEZINOVIĆ², Mirza DAUTBAŠIĆ², Tarik TREŠTIĆ², Daniela PILARSKA^{3,4},
Danko DIMINIĆ¹

Sažetak

Nedavna otkrića gljivičnog patogena *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu & R.S. Soper u susjednim istočnim i sjevernim zemljama Europe, posebice u Hrvatskoj, te pojavnost progradacija populacija gubara (*Lymantria dispar* L.) u pojedinim područjima Bosne i Hercegovine, privukla su pozornost istraživača na mogućnost prisutnosti ovog patogena u lokalnim populacijama gubara. Interes istraživača usmjerio se na lokacije zabilježenih mjesta progradacije gubara koja se nalaze u sjevernim dijelovima Bosne i Hercegovine. S obzirom na malu zračnu udaljenost tih lokacija s lokacijama masovne pojavnosti patogena *E. maimaiga* u Republici Hrvatskoj i Srbiji, hipoteza je bila provjeriti mogućnost prelaska patogena duž graničnog područja rijeke Save i Drine te ulazak u Bosnu i Hercegovinu.

Istraživanje je obavljeno početkom srpnja 2013. godine. Odabrano je pet lokacija u kojima je zabilježeno stanje progradacije populacije gubara, te uočen značajni mortalitet larvi gubara od nepoznatog uzročnika. Uzorci larvalnih kadavera sakupljeni su sa stabala na visini od 0,5–1,5 m iznad razine tla. Sakupljeni su samo stariji larvalni stadiji (L₄ – L₆) zbog kasnijeg vremenskog razdoblja uzorkovanja, te analizirani u Laboratoriju za patologiju drveća Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Kod svih pet uzoraka tkiva uginulih larvi s pet različitih lokacija, pronađene su azigospore ili konidije (konidiospore) i azigospore vrste *E. maimaiga*. Tip spora koji će se formirati nakon smrti domaćina ovisi o patogenu i načinu infekcije, faktorima vezanim za domaćina i okolišnim uvjetima. Makroskopski simptomi napada gljive *E. maimaiga* bili su jasno vidljivi na terenu, zajedno s nekim znacima larvalnog mortaliteta od strane poliedrije (LdMNPV), međutim u znatno manjem obujmu. Prisutno je bilo vrlo malo znakova parazitoidnog mortaliteta, ali sa značajnom prisutnošću tipičnih predatora gubara kao što je *Calosoma sycophanta* L., koji je bio prisutan u stadiju ličinke i imaga.

KLJUČNE RIJEČI: *Entomophaga maimaiga*, *Lymantria dispar*, biološka kontrola, gljivični patogen, prostorno širenje, mortalitet, prirodni neprijatelji, defolijatori.

¹ Marno Milotić, mag. ing. silv., mmilotic@gmail.com; Prof. dr. sc. Danko Diminić, diminic@sumfak.hr, Faculty of Forestry University of Zagreb, Svetosimunska 25, Zagreb, Croatia

² Doc. dr. Osman Mujezinović, osmansfs@yahoo.com; Prof. dr. sc. Mirza Dautbašić, mirzad@bih.net.ba; Prof. dr. sc. Tarik Trešić, trestict@yahoo.com, Faculty of Forestry University of Sarajevo, Zagrebacka 20, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

³ Prof. dr. Daniela Pilarska, dpilarska@yahoo.com, Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences, 2 Gagarin Street, Sofia, Bulgaria

⁴ Prof. dr. Daniela Pilarska, dpilarska@yahoo.com, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences, Kamýcka 1176, Prague, Czech Republic

UVOD INTRODUCTION

Kukac općenito poznat kao gubar, *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Erebididae), jedan je od najvažnijih autohtonih defolijatora listopadnih vrsta drveća u Europi. Svoje ogromno ekološko i ekonomsko značenje na ovim prostorima zadržao je desetljećima do danas. Sredinom 19. stoljeća introducirani je i proširen duž čitave Sjeverne Amerike, te stekao status velikog alohtonog šumskog štetnika, uzrokujući defolijacije velikih šumskih područja duž istočnog dijela SAD-a, izazivajući pritom velike poremećaje u ekosustavu (Davidson et al. 2001; McManus i Csóka 2007). Periodički, populacije gubara ulaze u srednje ili visoke gradacije i izazivaju velike štete u nekim državama Europe (Hrašovec 2001; Ciornei et al. 2006; McManus i Csóka 2007; Hrašovec et al. 2008; Mihajlović 2008; Pernek et al. 2008; Csóka i Hirka 2009; Tabaković-Tošić et al. 2013). Bosna i Hercegovina kao jugoistočna zemlja Europe, također trpi posljedice gradacija gubara (Milević 1959; Todorović 1966; Topalović 1969; Fitze 1976; Zita i Jarebica 1975; Maksimović 1997).

Prva dokumentirana progradacija populacija gubara u Bosni i Hercegovini zabilježena je odmah poslije Drugog svjetskog rata 1945. godine, kulminirajući 1948. s katastrofalnim štetama u šumskim kompleksima na velikim površinama,

te je u fazu retrogradacije ušla 1950. godine (Todorović 1966). Sljedeći val gradacije populacija gubara navodi se za razdoblje od 1952–1957. godine (Milević 1959). Treći veliki val, najveći po površini i intenzitetu, bio je 1961. godine početkom gradacije u Hrvatskoj (Kovačević 1965). Todorović (1966) navodi tu istu godinu kao godinu početka gradacije u Srbiji, dok je Fitze (1976) godinu dana kasnije ustanovio početak gradacije u Bosni i Hercegovini. Kulminacija gradacije, prema Maksimović (1997), dogodila se 1964. i 1965. godine, kada je zahvaćena površina bivše SFR Jugoslavije od 2.309.395 ha šuma i 198.500 ha voćnjaka (Todorović 1966). Na oko 50 % površina provodilo se suzbijanje insekticidima. Suzbijanje je počelo 1963., a 1965. godine je gubar započeo djelomični ulazak u retrogradaciju, što je utvrđeno pregledima sastojina i stanjima populacija gubara, te su prekinute akcije kemijske supresije. Ako kronološki poredamo date podatke iz literature, može se zaključiti da su površine zahvaćene gubarom na ovim prostorima od prve velike gradacije progresivno rasle u svakoj sljedećoj gradaciji. Period latence traje do 1971. godine s pojavom progradacija na pojedinim lokalitetima u Bosni i progradacijom od 1972–1975. godine u Hercegovini (Fitze 1976). Sljedeće dokumentirane gradacije gubara na području Bosne i Hercegovine odvijale su se od 2004–2006. godine, te posljednja od 2012–2013. godine u kojoj su bila najugroženija područja: Bosanska Gradiška, Dobo, Kotor Varoš i Sre-

Tablica 1. Geografska karakterizacija pet prostornih lokaliteta u Bosni i Hercegovini gdje su sakupljeni uzorci gubara i testirani na prisutnost gljivičnog patogena *E. maimaiga* (prva kolona korespondira s lokacijama u slici 1).

Table 1 Geographical characterization of five spatially spread localities in Bosnia and Herzegovina where gypsy moth larvae were sampled and tested for the presence of the fungal pathogen *E. maimaiga* (first column correspond with those in Figure 1).

Lokalitet Locality	Uprava Šuma podružnica Forestry administration unit	Šumarija Forestry office	Gospodarska jedinica Management unit	Odjel Department	Nadmorska visina (n.m.v.) Altitude (m a.s.l.)	Geografska širina Latitude	Geografska dužina Longitude	Datum uzorkovanja Sampling date	Btk tretiranje Btk treated	<i>E. maimaiga</i> potvrđena <i>E. maimaiga</i> confirmed
1 ●	Šume Tuzlanskog kantona <i>Forests of Tuzla Canton</i>	Srebrenik	Maoča	27	568	44°41'37.05"N	18°37'49.08"E	10.7.2013.	DA	DA
2 ●	Šume Tuzlanskog kantona <i>Forests of Tuzla Canton</i>	Srebrenik	Maoča	26	570	44°41'34.13"N	18°37'50.40"E	10.7.2013.	DA	DA
3 ●	Šume Tuzlanskog kantona <i>Forests of Tuzla Canton</i>	Srebrenik	Maoča	28	553	44°41'43.99"N	18°37'55.06"E	10.7.2013.	DA	DA
4 ●	Šume Tuzlanskog kantona <i>Forests of Tuzla Canton</i>	Srebrenik	Maoča	42	550	44°41'47.37"N	18°37'57.82"E	10.7.2013.	DA	DA
5 ●	Šume Tuzlanskog kantona <i>Forests of Tuzla Canton</i>	Srebrenik	Maoča	43	546	44°41'49.31"N	18°37'59.20"E	10.7.2013.	DA	DA

brenica. Tijekom 2004–2005. godine suzbijanje gubara obavljalo se mehanički, a tijekom gradacije 2012–2013. uz mehaničke mjere, provodila se i mjera supresije populacije aviotretiranjem, te je u tu svrhu korišten biološki insekticid, pripravak Foray 48B (Valent BioSciences), čiju aktivnu tvar čine kristali i spore bakterije *Bacillus thuringiensis kurstaki* (Btk).

Monitoring proveden u jesen 2014. godine ukazuje da su populacije gubara u Bosni i Hercegovini u latenci (Podaci iz poduzeća šumarstva JP Šume Republike Srpske d.d.). Analizom podataka iz dostupne literature može se iščitati da su se gradacije gubara u Bosni i Hercegovini javljale povremeno, bez cikličkih pravilnosti u njihovom nastajanju i završetku. Monitoring populacije u svrhu procjene gustoće, zajedno s raznovrsnim metodama suzbijanja, razvijene su u samim počecima organiziranog šumarstva na ovim prostorima (Kovačević 1965; Milević 1959; Hrašovec i Harapin 1999). Biološki insekticidni preparat baziran na kristalima i sporama bakterije *Bacillus thuringiensis kurstaki* ne polučuje uvijek željene rezultate (McGaughey et al. 1998; Broderick et al. 2000). U novije doba traže se selektivniji i manje okolišno štetni načini suzbijanja, kako bi se smanjile eventualne negativne ekološke posljedice klasične kemijske kontrole gubara, ali i smanjenje ekonomskih izdataka tretiranja. Stoga je logično da struka i znanost zajedno pokušavaju pronaći način kako razviti funkcionalan sustav nove biološke, selektivne, ekološke i ekonomski prihvatljivije metode zaštite.

Entomophaga maimaiga Humber, Shimazu & R.S. Soper (Entomophthorales: Entomophthoraceae) prvi puta je opisana kao specifični patogen gubara (*Lymantria dispar* L.) u Japanu, gdje je uzrokovao epizootije (Soper et al. 1988). Radi se o vrlo virulentnom gljivičnom patogenu koji uzrokuje odumiranje larvalnih stadija s vrlo specifičnom simptomatologijom. *E. maimaiga* može izazvati visoke stope mortaliteta larvi gubara i pri niskim gustoćama populacija, te je sposobna zadržavati populacije ispod praga štetnosti, što ga čini savršenim kandidatom s velikim potencijalom za biološku kontrolu pod konzervacijskom ili inokulacijskom strategijom (Hajek et al. 2004). U sjevernom dijelu SAD-a 1989. godine uzrokovao je epizootije u nekoliko država (Andreadis i Weseloh 1990). Otkriće u SAD-u uslijedilo je nakon dva neuspjela pokušaja umjetne introdukcije, prvi 1910–1911, a drugi 1985–1986. godine (Andreadis i Weseloh 1990; Hajek 1999; Hajek 2007; Solter i Hajek 2009). Širenje patogena *E. maimaiga* u SAD-u odvijalo se na dva načina: prirodnim širenjem, te ciljanom introdukcijom u populacije gubara (Shimazu i Soper 1986; Hajek et al. 1990; Hajek et al. 2007). Introdukcija u Europu započela je 1999–2000. godine kada je uspješno introducirana u dvije populacije gubara u Bugarskoj s izolatima inokuluma iz SAD-a (Pilarska et al. 2000). Ovo je prvi poznati dokumentirani slučaj introdukcije na europski kontinent. *E. maimaiga* je

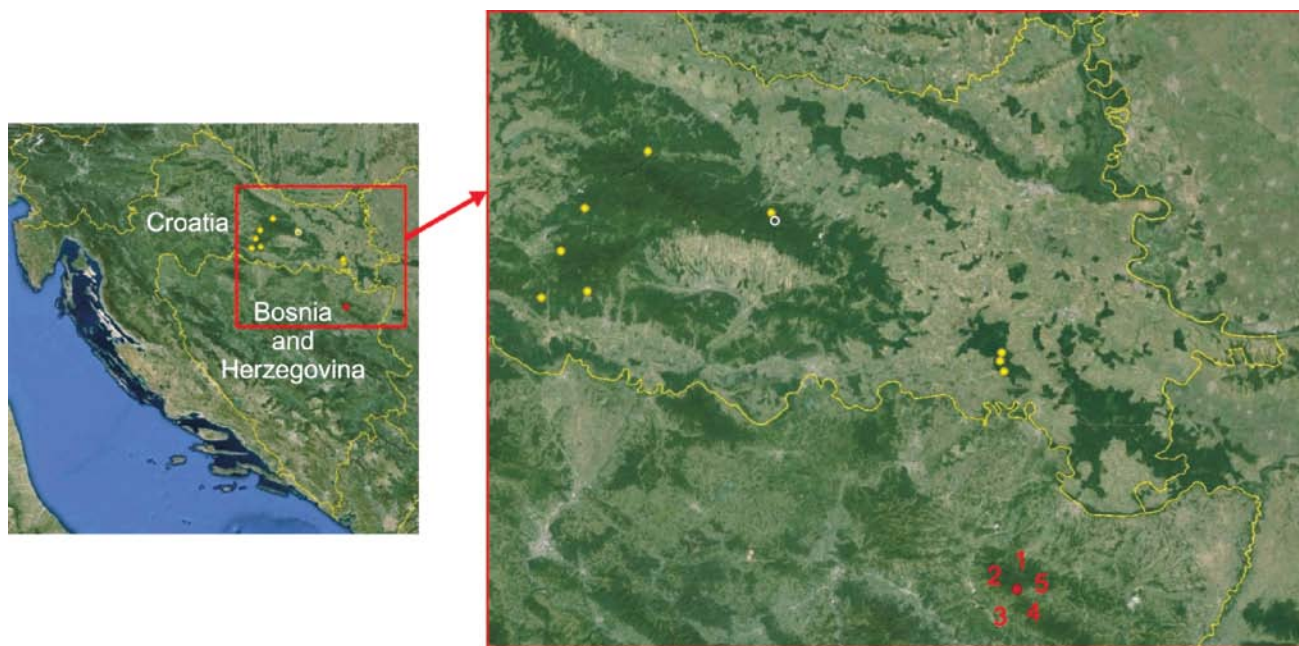
postupno proširila svoj areal (prirodno i putem introdukcije), te je sada, nakon razdoblja od 10–12 godina, prisutna na cijelom prostoru Bugarske (Georgiev et al. 2011). Nakon uspješne uspostave u Bugarskoj, uslijedilo je pojavljivanje na područjima susjednih zemalja. Tako je 2005. godine *E. maimaiga* zabilježena na području Gruzije, te je to prvi dokumentirani zapis prisutnosti patogena istočno od Crnog mora (Kereselidze et al. 2011). U 2011. pronađena je i u Europskom dijelu Turske (Georgiev et al. 2011), ali i u području središnje Srbije (Tabaković-Tošić et al. 2012). Godinu dana poslije *E. maimaiga* je zabilježena u Grčkoj i u Makedoniji (Georgieva et al. 2013). U 2013. godini otkrivena je u Mađarskoj, Hrvatskoj i Slovačkoj (Csóka et al. 2013; Hrašovec et al. 2013; Zubrik et al. 2014).

Nedavna otkrića gljivičnog patogena *E. maimaiga* u susjednim istočnim i sjevernim zemljama, posebice u Hrvatskoj (Hrašovec et al. 2013), te pojavnost progradacije populacija gubara u pojedinim područjima Bosne i Hercegovine, privukla su pozornost istraživača na mogućnost prisutnosti u lokalnim populacijama gubara. Najinteresantnije su se pokazale lokacije zabilježenih mjesta progradacije gubara koja se nalaze u sjevernim dijelovima Bosne i Hercegovine. S obzirom na malu zračnu udaljenost tih lokacija s lokacijama masovne pojavnosti patogena *E. maimaiga* u Republici Hrvatskoj (Hrašovec et al. 2013) i Srbiji (Tabaković-Tošić 2014), razvila se hipoteza provjere mogućnosti prelaska duž graničnog područja rijeke Save i Drine, te ulazak u prostor Bosne i Hercegovine. Tijekom terenskih pregleda sastojina usmjerili smo se na slučajeve s visokom stopom larvalnog mortaliteta gubara i već poznatom simptomatologijom *E. maimaiga* (Andreadis i Weseloh 1990), te sakupili ugebajuće ili već uginule larve za daljnju patološku laboratorijsku analizu. Rezultati analize prikazani su u ovome radu.

MATERIJALI I METODE MATERIAL AND METHODS

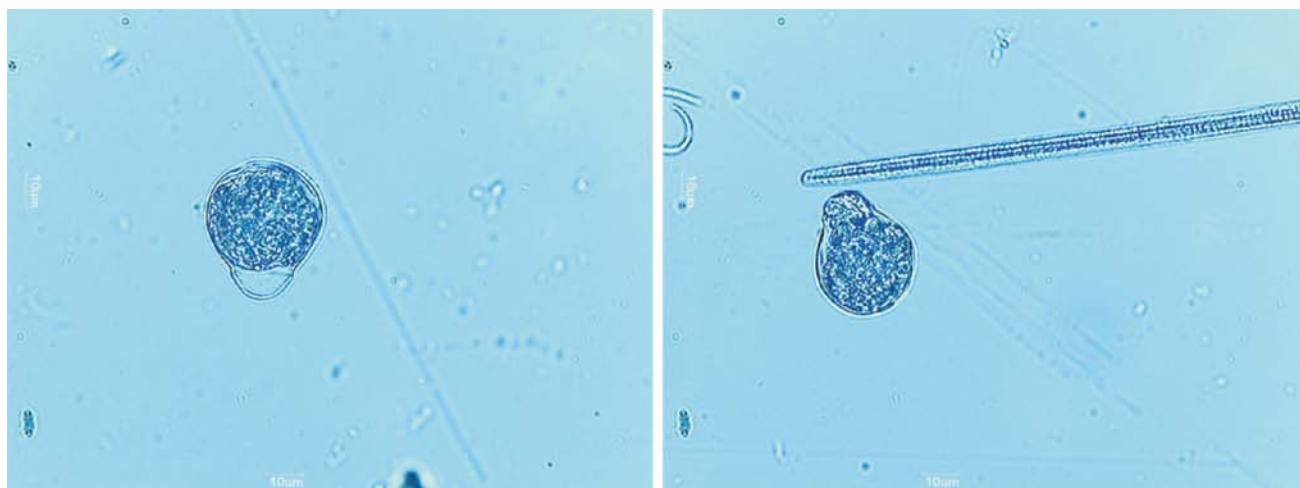
Terensko uzorkovanje

Dominirajuće visoke sekundarne šume bukve u pojasu šuma bukve i jele s primjesom plemenitih i ostalih listača u ovom brežuljkastom dijelu Bosne i Hercegovine, karakteriziraju vrste *Fagus sylvatica* L. (91–100 %) i *Quercus cerris* L. (2–8 %), te druge plemenite listače (<2 %). Ukupna površina pregledanih sastojina iznosi 220,60 ha, sa stupnjem pokrovnosti 69–87 %. Ciljano sakupljanje larvi *L. dispar* u srpnju 2013. godine obavljeno je na područjima progradacije populacija gubara, te su samo lokacije s visokom stopom mortaliteta kasnijih larvalnih stadija odabrane za uzorkovanje u svrhu povećanja šanse za pronalazak patogena *E. maimaiga*. Tijekom srpnja 2013. godine, prema prethodno navedenim kriterijima, odabrano je pet lokacija za ispitivanje prisutnosti patogena *E. maimaiga*. Larve obješene glavom prema dolje viseći na deblima stabala, saku-



Slika 1. Geografska distribucija lokaliteta uzorkovanja i pojavnosti patogena *E. maimaiga* 2013. godine u istočnoj Hrvatskoj (Hrašovec et al. 2013) (žute točke – pozitivne; bijela točka – negativna), te Bosni i Hercegovini (crvene točke).

Figure 1 Geographical distribution of sampling locations and occurrence of the *E. maimaiga* in 2013 in eastern Croatia (Hrašovec et al. 2013) (yellow dots – positive; white dot – negative) and Bosnia and Herzegovina (red dots)



Slika 2. Konidije patogena *E. maimaiga* izolirane iz kadavera larvi gubara u sjeveroistočnoj Bosni i Hercegovini

Figure 2 Conidia of *E. maimaiga* isolated from cadavers of gypsy moth larvae from north-east Bosnia and Herzegovina

pljane su s visine od 0,5–1,5 m iznad tla. Nedavno uginuli, ili već stisnuti i potpuno do parcijalno isušeni stariji L₄–L₆ kadaveri, sakupljeni u plastične bočice ili papirnate vrećice, odmah su prebačeni u laboratorijski hladnjak Šumarskog fakulteta u Zagrebu, gdje su čuvani na temperaturi od +4 °C.

Laboratorijska analiza

Prije mikroskopske analize, kadaveri larvi postavljeni su u staklene petrijeve zdjelice na vlažan filter papir, nakon čega su ostavljeni u hladnjaku na +4 °C sljedeća 48–72 h. Kadaveri su pregledani i uzeti su uzorci tkiva pod stereo mikro-

skopom (LEICA Leitz MZ8) i svjetlosnim stereo mikroskopom (Motic SMZ – 168 TLED). Proces je digitalno dokumentiran s Olympus SP – 500 UZ digitalnom kamerom, opremljenom s Olympus QuickPHOTO CAMERA 2.3 softverom za digitalnu obradu mikroskopskih snimaka. Za detaljniju analizu uzorkovanog tkiva, koje je bilo potrebno zbog izrade kvantifikacije veličine, oblika i strukturalnih karakteristika gljivičnog patogena, upotrebljavan je svjetlosni mikroskop (Olympus BX53) opremljen s digitalnom kamerom Motic MoticamPro 252A. Digitalni snimci su obrađeni i analizirani softverom za obradu digitalnih

mikroskopskih snimaka Motic Images Plus 2.0 i Motic Images Advanced 3.2. S obzirom na veličinu, oblik i ostale mikroskopske strukturne karakteristike promatranih gljivičnih uzoraka (azigospore, konidije i micelij), identificirana je vrsta patogena prisutna u spomenutim uzorcima mrtvog tkiva.

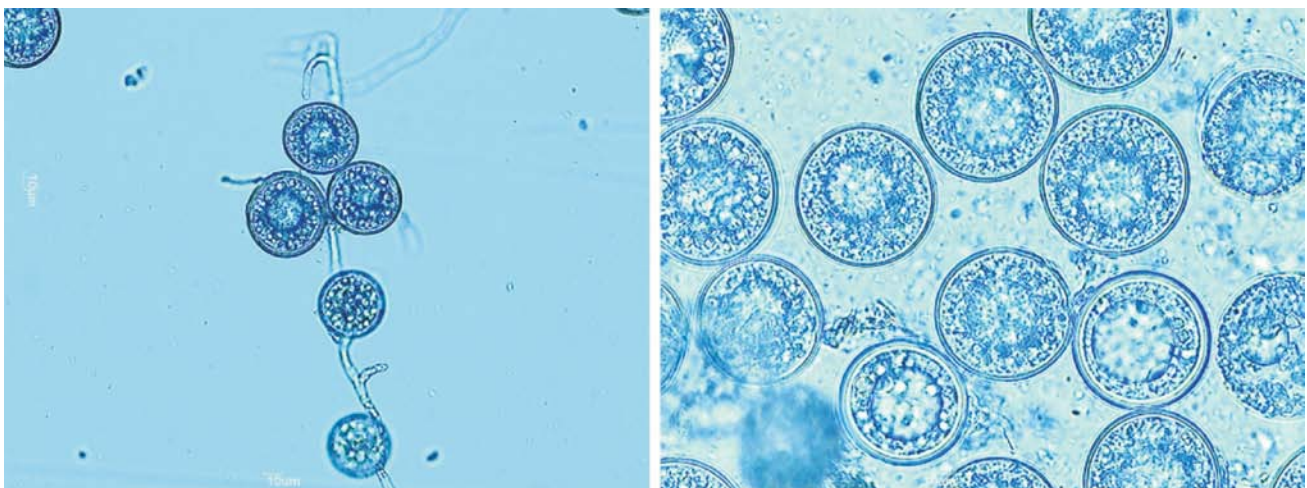
REZULTATI RESULTS

Na pet odabranih lokaliteta na kojima su uzeti uzorci mrtvih larvi gubara, pronađene su azigospore ili konidije (konidiospore) patogena *E. maimaiga* (slika 1, tablica 1). Ovisno o datumu sakupljanja, mikroskopska analiza je potvrdila samo azigospore ili azigospore i konidije u uzorcima tkiva. Prvi slučaj tipično se pokazao kao dominantan kada su sakupljeni uzorci kadavera bili starijih larvalnih stadija. Tip spora koji će se formirati nakon smrti domaćina ovisi o patogenu i načinu infekcije, faktorima vezanim za domaćina i okolišnim uvjetima (Hajek 1999). Dimenzije spora bile su sljedeće: kruškolike konidije (25,7–35,1 μm širine i 34,6–43,7 μm dužine); azigospore (32,2–47,9 μm promjera) (slika 2, slika 3). Na terenu su već bili jasno vidljivi tipični simptomi uzrokovanog mortaliteta patogenom *E. maimaiga*. To su mrtve larve koje vise s debala stabala glavom prema dolje, te su njihove panoge raširene bočno pod kutom od 90 stupnjeva (Hajek i Roberts 1994) (slika 4). Od simptomatologije drugih patogena viđeni su i simptomi poliedrije (*Lymantria dispar* multicapsid nuclear polyhedrosis virus – LdMNPV) (slika 4), u znatno manjem obujmu, kao uzročnika odumiranja pojedinih larvi. Bilo je prisutno vrlo malo znakova parazitskog mortaliteta, ali sa značajnom prisutnošću tipičnih predatora gubara poput *Calosoma sycophanta* (Linnaeus, 1758) koji je bio prisutan u stadijima ličinke i imaga (slika 5). Larvalni mortalitet koji se može

pripisati patogenu *E. maimaiga* bio je po obujmu simptomatologije najviše zastupljen. U razdoblju uzorkovanja tisuće larvi visile su glavom prema dolje na deblima stabala, te nije bilo vidljive prisutnosti živih larvi ili kukuljica na tom području. Budući da su kadaveri sakupljeni dosta kasno u sezoni, smatra se da je najveća žestina napada patogena već prošla u tom razdoblju, te je dio kadavera već otpao s debala.

RASPRAVA I ZAKLJUČCI DISCUSSION AND CONCLUSIONS

S obzirom na veličinu, oblik i ostale mikroskopske strukturne karakteristike promatranih gljivičnih uzoraka (azigospore, konidije i micelij), te već dobro opisanu i poznatu usku selektivnost domaćina od strane patogena (Hajek et al. 2004), može se zaključiti da je *E. maimaiga* prisutna u sjeveroistočnoj populaciji gubara u Bosni i Hercegovini. Visoki mortalitet kasnijih larvalnih stadija gubara, s jasnim i istaknutim znakovima napada patogena *E. maimaiga*, nije prikriven učinkom široke primjene pripravka Foray 48B (Valent BioSciences) na tom prostoru. Svi terenski zabilježeni slučajevi ekstremnih mortaliteta s tipičnim simptomima *E. maimaiga* pojavili su se kasnije u sezoni (srpanj), dok su tretmani s Btk završeni sredinom svibnja. Intenzitet mortaliteta kasnijih larvalnih stadija uzrokovan patogenom *E. maimaiga* izrazito je velik na uzorkovanom području, te s obzirom na ciljeve ovog istraživanja, dovoljno jasno pokazuje da je patogen *E. maimaiga* prisutan na teritoriju Bosne i Hercegovine. S obzirom na prethodna iskustva u susjednim zemljama, postoji značajna vjerojatnost da će ovaj patogen na ovom području ostati aktivno prisutan, širiti svoju distribuciju i ispoljavati svoju funkciju kao jedan od izuzetno važnih čimbenika u biološkoj kontroli populacije gubara. Jedan čimbenik, koji je identičan ranijim istraživa-



Slika 3. Azigospore patogena *E. maimaiga* izolirane iz kadavera larvi gubara u sjeveroistočnoj Bosni i Hercegovini
Figure 3 Azygospores of *E. maimaiga* isolated from cadavers of gypsy moth larvae from north-east Bosnia and Herzegovina



Slika 4. Lijevo: Kadaver gubara, uzrok mortaliteta virus poliedrije (LdMNPV); Desno: Kadaver gubara, uzrok mortaliteta *E. maimaiga*.

Figure 4 Left: Cadaver of gypsy moth larva killed by the *Lymantria dispar* multicapsid nuclear polyhedrosis virus (LdMNPV); Right: Cadaver of gypsy moth larva killed by the *E. maimaiga*.



Slika 5. *Calosoma sycophanta* tipični predator gubara (lijevo: u fazi ličinke; desno: u fazi imaga)

Figure 5 *Calosoma sycophanta* typical predator of gypsy moth (left: in the larval stage; right: imago)

njima (Hajek 1997), ali i uvjetima širenja patogena na hrvatskom teritoriju (Hrašovec et al. 2013), je utjecaj srednje umjerene količine oborina tijekom svibnja i lipnja 2013. godine, koji je zahvatio dio područja gradacije gubara, te vjerojatno doprinio velikim infekcijskim stopama na naj-

istočnijim dijelovima Hrvatske, ali i sjeveroistočnom dijelu Bosne i Hercegovine. U idućim godinama daljnja praćenja distribucije na lokalnoj razini trebala bi pokazati smjer i stopu širenja vrste *E. maimaiga*. Ovaj patogen je 2013. godine pokazao vrlo rapidno širenje na ovim prostorima, te

će biti vrlo zahtjevan posao objasniti ovu gotovo simultanu pojavu u tako širokoj distribucijskoj zoni (Csóka et al. 2013; Hrašovec et al. 2013; Zubrik et al. 2014). Zanimljiva je činjenica da su, iako relativno regionalno blizu, lokaliteti prilično različiti. Za razliku od hrvatskih lokaliteta, uzorkovanja na kojima nije bilo vidljivih znakova prisutnosti predatora kao što je *Calosoma sycophanta*, na bosanskohercegovačkim lokalitetima bilo je obilje predatora, što bi moglo ukazivati na činjenicu da se patogen *E. maimaiga* pojavio kasnije na tim lokalitetima, već u fazi retrogradacije populacije gubara. Mogućnost izravnog ili neizravnog utjecaja patogena *E. maimaiga* na neciljane i korisne organizme u okolišu postoji (Tabaković-Tošić et al. 2014), iako se za sada smatra da je *E. maimaiga* izrazito selektivan u svom odabiru domaćina, redukcija populacije defolijatora gubara mogla bi potencijalno dovesti do povećanja populacija drugih grupa defolijatorskih vrsta kukaca kao što su vrste iz porodica *Tortricidae*, *Geometridae* i vrste roda *Symphyla*.

ZAHVALA ACKNOWLEDGEMENTS

Laboratorijska istraživanja obavljena su zahvaljujući potpori Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske, projektom 068-0681966-2775 „Biotski čimbenici propadanja šumskog drveća na kršu Hrvatske“.

LITERATURA REFERENCES

- Andreadis, T.G., R. Weseloh, 1990: Discovery of *Entomophaga maimaiga* in North American gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2461–2465
- Broderick, N.A., R.M. Goodman, K.F. Raffa, J. Handelsman, 2000: Synergy Between Zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Against Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environmental entomology* 29 (1): 101–107.
- Ciornei, C., C. Netoiu, I. Taur, S. Vals, M. Barca, D. Vladescu, 2006: The use of viral preparations in biological control of defoliators *Lymantria dispar* (L.) and *Euproctis chrysorrhoea* (L.) in Romanian deciduous forests. *IUFRO Working Party 7.03.10 Proceedings of the workshop on „Methodology of Forest Insect and Disease Survey in Central Europe“ Sept. 11–14, 2006: 284–291*
- Csóka, G., A. Hirka, 2009: Gyapjaslepke (*Lymantria dispar* L.) legutóbbi tömegszaporodása Magyarországon [Recent outbreak of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) in Hungary]. *Növényvédelem* 45(4): 196–201
- Csóka, G.Y., A. Hirka, L. Szócs, A.E. Hajek, 2013: A rovarpatogén *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu and Soper (Entomophthorales: Entomophthoraceae) gomba első megjelenés Magyarországi gyapjaslepke (*Lymantria dispar*) populációkban. [First occurrence of the entomopathogenic fungus, *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu and Soper (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in Hungarian gypsy moth (*Lymantria dispar*) populations]. *Növényvédelem* 49 (in press)
- Davidson, C.B., K.W. Gottschalk, J.E. Johnson, 2001: European Gypsy Moth (*Lymantria dispar* L.) Outbreaks: A Review of the Literature. Gen. Tech. Rep. NE-278. Newtown Square, PA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Research Station: 15 pp
- Fitze, K., 1976: Značaj problema gubara kao štetočine u šumama Bosne i Hercegovine. Šipad IRC. Ins. Za šumarstvo, Sarajevo: Stručno naučno savjetovanje 21–22, 10.1976, Banja Luka.
- Georgieva, M., G. Georgiev, D. Pilarska, P. Pilarski, P. Mirchev, I. Papazova-Anakieva, S. Naceski, P. Vafeidis, M. Matova, 2013: First record of *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in *Lymantria dispar* populations in Greece and the Former Yugoslavian Republic of Macedonia. *Šumarski list* 5–6: 307–311
- Georgiev, G., P. Mirchev, M. Georgieva, B. Rossnev, P. Petkov, M. Matova, S. Kitanova, 2012: First Record of Entomopathogenic Fungus *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu and Soper (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in *Lymantria dispar* (Linnaeus) (Lepidoptera: Lymantriidae) in Turkey. *Acta zoologica bulgarica* 64 (2): 123–127
- Georgiev, G., P. Mirchev, B. Rossnev, P. Petkov, M. Georgieva, M. Matova, S. Kitanova, D. Pilarska, P. Pilarski, V. Golemansky, M. Todorov, Z. Hubenov, D. Takov, 2011: Introduction of *Entomophaga maimaiga* and control of *Lymantria dispar* calamities in Bulgaria. In: Kitanova S (ed), Proc. of Sci. Conf. Sustainable Management of Oak Forests in Bulgaria: 72–79
- Hajek, A.E., 1997: Fungal and Viral Epizootics in Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Populations in Central New York. *Biological Control* 10(1): 58–68
- Hajek, A.E., 1999: Pathology and Epizootiology of *Entomophaga maimaiga* Infections in Forest Lepidoptera. *Microbiology and molecular biology reviews* 63(4): 814–835
- Hajek, A.E., 2007: Classical Biological Control of Gypsy Moth: Introduction of the Entomopathogenic Fungus *Entomophaga maimaiga* into North America. In: Vincent C, Goettel M S, Lazarovits G (eds) *Biological Control: A Global Perspective*, p 53–62.
- Hajek, A.E., R.A. Humber, J.S. Elkinton, B. May, S.R.A. Walsh, J.C. Silver, 1990: Allozyme and RFLP Analyses Confirm *Entomophaga maimaiga* Responsible for 1989 Epizootics in North American Gypsy Moth Populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 87: 6979–6982.
- Hajek, A.E., M. McManus, I.J.R. Delalibera, 2007: A review of introductions of pathogens and nematodes for classical biological control of insects and mites. *Biological Control* 41: 1–13
- HAJEK, A.E., J. Strazanac, M. Wheeler, F. Vermeylen, L. Butler, 2004: Persistence of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* and its impact on native Lymantriidae. *Biological Control* 30(2): 466–473.
- Hrašovec, B., 2001: The Gypsy moth in Croatia. In: Fosbroke S L C; Gottschalk K W (eds.) *Proceedings, U.S. Department of Agriculture interagency research forum on gypsy moth and other invasive species*, p 77.
- Hrašovec, B., M. Harapin, 1999: Dijagnozno – prognozno metode i gradacije značajnijih štetnih kukaca u šumama Hrvatske [Survey methodology and most important insect pest outbreaks in Croatian forests]. *Šumarski list* 123(5–6): 183–193.
- Hrašovec, B., M. Pernek, I. Lukić, M. Milotić, D. Diminić, M. Franjević, A. Hajek, A. Linde, D. Pilarska, 2013: First record of the pathogenic fungus *Entomophaga maimaiga* Humber, Shi-

- mazu, and Soper (Entomophthorales: Entomophthoraceae) within an outbreak populations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae) in Croatia. *Periodicum biologorum* 115(3): 379–384.
- Hrašovec, B., M. Pernek, D. Matošević, 2008: Spruce, Fir and Pine Bark Beetle Outbreak Development and Gypsy Moth Situation in Croatia in 2007. *Forstschutz Aktuell* 44: 12–13.
 - Kereselidze, M., D. Pilarska, A.E. Hajek, A.B. Jensen, A. Linde, 2011: First record of *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in Georgia. *Biocontrol Science and Technology* 21(11): 1375–1380.
 - Kovačević, Ž., 1965: Rezultati suzbijanja gubara sniženim dozama insekticida u šumi Brezovica u okolini Siska u 1964. godini. Posl. udr. šum. priv. org., Zagreb.
 - Maksimović, M., 1997: Preventivna zaštita od gubara. *Šumarstvo* 50(3): 5–66. Beograd.
 - McLaughley, W.H., F. Gould, W. Gelernter, 1998: Bt resistance management. *Nat. Biotech.* 16: 144–6.
 - McManus, M., G. Csóka, 2007: History and Impact of Gypsy Moth in North America and Comparison to Recent Outbreaks in Europe. *Acta Silvatica et Lignaria Hungarica* 3: 47–64.
 - Mihajlović, L.J., 2008: Gubar (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera, Lymantridae) u Srbiji [The gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) (Lepidoptera, Lymantridae) in Serbia]. *Šumarstvo* 60(1–2): 1–26.
 - Milević, K., 1959: Osvrt na suzbijanje gubara u NR Srbiji u gradaciji 1952–1957. godine. *Z. bilja* 52/53: 121–144.
 - Pernek, M., I. Pilaš, B. Vrbek, M. Benko, B. Hrašovec, J. Milković, 2008: Forecasting the impact of the Gypsy moth on lowland hardwood forests by analyzing the cyclical pattern of population and climate data series. *Forest ecology and management* 255 (5–6): 1740–1748.
 - Pilarska, D., M. McManus, A.E. Hajek, F. Herard, F. Vega, P. Pilarski, G. Markova, 2000: Introduction of the entomopathogenic fungus *Entomophaga maimaiga* Hum., Shim. & Sop. (Zygomycetes: Entomophthorales) to a *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantridae) population in Bulgaria. *Journal of Pest Science* 73: 125–126.
 - Shimazu, M., R.S. Soper, 1986: Pathogenicity and sporulation of *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu, Soper and Hajek (Entomophthorales: Entomophthoraceae) on larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantridae). *Applied Entomology and Zoology* 21: 589–596.
 - Soper, R.S., M. Shimazu, R.A. Humber, M.E. Ramos, A.E. Hajek, 1988: Isolation and characterization of *Entomophaga maimaiga* sp. nov., a fungal pathogen of gypsy moth, *Lymantria dispar*, from Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 51: 229–241.
 - Solter, L.F., A.E. Hajek, 2009: Control of gypsy moth, *Lymantria dispar*, in North America since 1878. In: Hajek A E, O'Callaghan M, Glare T (eds) Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods, 2009: 181–212.
 - Tabaković-Tošić, M., 2014: Distribution of *Entomophaga maimaiga* in central part of Serbia in the period 2011–2013. *Silva Balcanica*, 15(1): 110–115.
 - Tabaković-Tošić, M., G. Georgiev, P. Mirchev, D. Tošić, V. Golubović-Čurguz, 2012: *Entomophaga maimaiga* – new entomopathogenic fungus in the Republic of Serbia. *African Journal of Biotechnology* 11: 8571–8577.
 - Tabaković-Tošić, M., G. Georgiev, P. Mirchev, D. Tošić, V. Golubović-Čurguz, 2013: Gypsy Moth in Central Serbia Over the Previous Fifty Years. *Acta Zoologica Bulgarica* 65(2): 165–171.
 - Tabaković-Tošić, M., M. Georgieva, Z. Hubenov, G. Georgiev, 2014: Impact of Tachinid parasitoids of Gypsy moth (*Lymantria dispar*) after the natural spreading and introduction of fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* in Serbia. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2 (5): 134–137
 - Todorović, S., 1966: Rad na gubaru u posleratnom periodu. *Biljni lekar* 8: 20–34. Beograd.
 - Topalović, M., 1969: Stanje gubara u jesen 1968. godine. *Biljni lekar* 10: 9–11. Beograd.
 - Zita, V., Jarebica, M., 1975: Osmatranje i registrovanje štetočina na području SR Bosne i Hercegovine u 1975. godini. *Institut za šumarstvo, Obavijest* 18, Sarajevo.
 - Zúbrik, M., M. Barta, D. Pilarska, D. Goertz, M. Úradník, Juraj Galko, J. Vakula, A. Gubka, S. Rell, A. Kunca, 2014: First record of *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) in Slovakia, *Biocontrol Science and Technology*, 24(6): 710–714.

Summary

The fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu & R.S. Soper (Entomophthorales: Entomophthoraceae) was found in the north-east Bosnia and Herzegovina populations of *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Erebidae) in summer 2013 at 5 localities (Figure 1, Table 1). Since the first introduction of this pathogen in Bulgaria in 1999 several southeastern European countries confirmed its presence in subsequent years. Recent findings of this pathogen in the neighbouring countries, especially in Croatia and Serbia, and also regarding to the progradation of *L. dispar* populations in some parts of Bosnia and Herzegovina, attracted the attention of the researchers on the possibility of finding this highly selective fungal pathogen. The sampling localities were selected based on pre-collected data of reported *L. dispar* population progradation, but also to the relative geographical vicinity regarding the new Croatian positive sites with *E. maimaiga* fungal pathogen. Large areas were aerially sprayed with a *Bacillus thuringiensis kurstaki* – based bacterial insecticide and larval development was closely inspected in the field. In the last 70 years, from the first reported outbreak of *L. dispar* in Bosnia and Herzegovina, many outbreaks have been reported, causing the substantial economical and ecological damage in forestry but also in agriculture production. Biological insecticide based on the

Bacillus thuringiensis kurstaki, commonly used for the suppression of the local populations of *L. dispar*, does not always produce the desired impact. Consequently, the highly selective, host specific, fungal pathogen that could be put in use as a biological control agent of the *L. dispar* populations is found to be very interesting for both science and professional application thus deminishing the economical and ecological negative feedback of this indigenous defoliator. The research was carried out during July 2013 throughout the north-east part of Bosnia and Herzegovina where gypsy moth populations continued an ongoing outbreak. From five selected localities, where excessive mortality was observed, larval cadavers were sampled from tree trunks 0,5 – 1,5 m above the ground. Only older larval stages (L_4 – L_6) were sampled due to the late sampling period. Cadavers were inspected, and larval tissue samples were prepared under the stereo microscope (LEICA Leitz MZ8) and light stereo microscope (Motic SMZ – 168 TLED). Process was digitally documented with Olympus SP – 500UZ digital camera equipped with the Olympus QuickPHOTO CAMERA 2.3 digital imaging software. Larval tissue samples were inspected under light microscope (Olympus BX53) and images were recorded by digital camera Motic MoticamPro 252A. Measurements of azygospores and conidia (conidiospores) were made via digital imaging software Motic Images Plus 2.0 and Motic Images Advanced 3.2. associated with a compound microscope. Microscopic analysis of the dead tissue larvae, in all five locations, confirmed both conidia and azygospores or azygospores only, of the *E. maimaiga* species. Spore dimensions were as follows: pear-shaped conidia crosswise 25,7–35,1 μm and 34,6–43,7 μm lengthwise; azygospores 32,2–47,9 μm in diameter (Figure 2, Figure 3). The type of spores (conidia or azygospores or both) that will form after host death is determined by the pathogen and the type of host infection, host-related factors and environmental conditions. Macroscopic symptoms of *E. maimaiga* attack were easily recognizable on the tree trunks along with some signs of larval mortality caused by *Lymantria dispar* multicapsid nuclear polyhedrosis virus (LdMNPV) (Figure 4). There were very few signs of parasitoid mortality, but unlike in the Croatian sites (Hrašovec et al. 2013), with a great abundant presence of gypsy moth predators like *Calosoma sycophanta* L. (Figure 5), which could be an indicator that the pathogen has emerged when the *L. dispar* population was already starting its descent into a retrogradation phase. Just like in the Croatian localities where the sampling took place (Hrašovec et al. 2013), dead larvae were hanging from the tree trunks head down all through the sites and no living larva or viable pupa could be found in the area. Based on the field collections and microscopic analysis, entomopathogenic fungus *E. maimaiga*, a pathogen of *L. dispar* introduced on the European continent, has been confirmed in Bosnia and Herzegovina. Extensive monitoring of the fungal pathogen in the following years will give us the information on pathogen spatial spread, its speed and the possibility for establishing its permanent position among the other local indigenous species. Nevertheless, there are some concerns whether *E. maimaiga* may show some direct and indirect impacts on non-targeted and beneficial organisms in the future, or change the basic community structure of folivore insect guilds on oaks, maybe resulting in increasing populations of other defoliating insect groups such as tortricids, geometrids and sawflies. These concerns will demand more scientific attention in the future.

KEY WORDS: *Entomophaga maimaiga*, *Lymantria dispar*, biological control agent, fungal pathogen, spatial spread, mortality, impact, natural enemies, beneficial organisms, defoliators