

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Saprotrofní růst a patogenní vlastnosti rodu *Lecanicillium*
(Sordaryomycetes; Clavicipitaceae)**

Diplomová práce

Bc. Barbora Zdvihalová

Školitelka: Ing. Miloslava Kavková, PhD.

České Budějovice 2014

Zdvihalová, B., 2014: Saprotrofní růst a patogenní vlastnosti rodu *Lecanicillium* (Sordaryomycetes; Clavicipitaceae). [Saprotrophic growth and pathogenic properties in the genus *Lecanicillium* (Sordaryomycetes; Clavicipitaceae). Mgr. Thesis, in Czech.] – 52 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Genus *Lecanicillium* (Sordaryomycetes; Clavicipitaceae) comprises the complex of well-known enthomopathogenic and mycoparasitic fungi. The quality and characteristics of isolates of *Lecanicillium* spp. can vary on the basis of the origin of fungal isolates and ecological factors. This study compares and evaluates five isolates of *Lecanicillium* spp. according to its morphological and pathogenic properties.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 25. 4. 2014

Barbora Zdvihalová

Poděkování:

Mílo, má fakultní matko, děkuji Ti, že ses mě ujala a žes mi poskytla téma, které mě bavilo a při kterém jsem se mnohému naučila. Děkuji Ti za ochotu, všířičnost, vytrvalost a cenné rady při psaní mé diplomové práce, a především v jejím finále.

Velké DÍKY posílám na Zemědělskou fakultu Andree a paní Olince, za laboratorní zázemí a příjemnou společnost a za to, že mi pomáhaly, když jsem byla v koncích. A taky za skvělou kávu.

Za pomoc ve statistických otázkách musím poděkovat Franzovi.

A za četné konzultace a celkovou podporu Maovi.

Děkuji všem svým přátelům, kamarádům a sestře. Sestro, dík.

Ale největší „Ď“ patří mým rodičům, kterým tímto vzkazuji „A je to!“ :)

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. <i>Lecanicillium sp.</i> : systematické zařazení	2
1.2. <i>Lecanicillium sp.</i> : fyziologické a morfologické vlastnosti.....	5
1.3. Hostitelská specifita rodu <i>Lecanicillium</i> (Hypocreales: Ascomycota)	5
1.4. Biologická a integrovaná ochrana rostlin (= Biokontrola).....	6
1.5. Testování izolátů mikromycet	10
2. Cíle práce	13
3. Metody a materiál	14
3.1. Původ a determinace jednotlivých izolátů.....	14
3.1.1. Izolace DNA.....	14
3.1.2. Polymerázová řetězová reakce a sekvenace	15
3.2. Testy hostitelské specifity pěti izolátů rodu <i>Lecanicillium</i>	16
3.2.1. <i>In vitro</i> testy hodnotící saprotrofní vlastnosti pěti izolátů rodu <i>Lecanicillium</i>	16
3.2.2. <i>In vitro</i> test hodnotící mykoparazitické vlastnosti na myceliích ektomykorhizních hub..	16
3.2.3. <i>In vivo</i> test hodnotící mykoparazitický efekt na rostlinného mykopatogena	18
3.2.4. <i>In vivo</i> test hodnotící entomopatogenní vlastnosti	19
3.2.5. Statistické zpracování dat.....	19
4. Výsledky	21
4.1. Morfologické parametry.....	21
4.2. Molekulární a fylogenetické analýzy	24
4.3. <i>In vitro</i> testy: saprotrofní růst.....	26
4.4. <i>In vitro</i> testy: mykoparazitický růst	26
4.5. <i>In vivo</i> testy: mykoparazitický efekt	28
4.6. <i>In vivo</i> testy: Entomopatogenní efekt.....	33
4.7. PCA analýza.....	35
5. Diskuze.....	37
5.1. Taxonomie.....	37
5.2. Morfologické a saprotrofní vlastnosti	38
5.3. Mykoparazitismus a entomopatogenní efekt.....	39
5.4. Závěr	43
6. Literatura	44

1. Úvod

Houby *sensu stricto* představují diverzifikovanou skupinu organismů, které mají díky své všudypřítomnosti v přírodě nezaměnitelnou roli. Pokrývají oba póly soužití dvou organismů – podílí se na vztazích od symbiotických až po ty parazitické. Jsou to nejvýznamnější rozkladači organického materiálu ve škále kyselého pH. Houbové organismy, jako heterotrofní a absorbtivní organismy, jsou významnou součástí koloběhu živin v přírodě. V dnešní době se odhaduje, že se na světě vyskytuje od 1,5–5 milionů hub, z nichž bylo dosud popsáno 100 tisíc druhů. Z toho vyplývá, že je známo něco kolem 5–7% celkové biodiverzity hub (Hawksworth 2004, Mueller a Schmit 2007, Schmit a Mueller 2007).

Houbové organismy mohou být lidem na základě svých ekologických vlastností prospěšné nebo naopak. Jednou z významných taxonomických skupin, do níž se řadí saprotrofové, parazité i saproparazité, patří čeleď Clavicipitaceae (Hypocreales: Ascomycota). Jako příklad lze uvést historicky dobře známou paličkovici nachovou (*Claviceps purpurea*), která endofyticky prorůstá rostlinami čeledi *Poaceae* a přetváří jejich semeníky nejprve v oranžová stromata, která se postupně mění v černá sklerocia. Sklerocia obsahují alkaloidy (ergotaminy a ergotoxiny), které mají silné účinky na nervovou soustavu lidí a v minulosti, především s nástupem pěstování obilovin, si vyžádaly tisíce obětí (Callan a Carris 2004). Také mnohé další druhy, respektive jejich anamorfní stádia, jsou známé produkcí sekundárních metabolitů. V té samé čeledi se ale také vyskytují houby s výraznou entomopatogenní a mykoparazitickou aktivitou, tj. schopností infikovat hmyz a houbové organismy. Jsou to druhy vykazující významnou chitinolytickou aktivitu. Mezi takové houby patří mikromycety rodu *Cordyceps*, *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Paecilomyces*, *Isaria* a *Simplicillum* (Seifert a kol. 2011).

Schopnosti hub parazitovat hmyz začali lidé využívat ve svůj prospěch v rámci tzv. biologické a integrované ochrany rostlin na začátku 60. let 20. století (De Faria a Wraight 2007, Cock a kol. 2010). Zásadou biologické ochrany, na rozdíl od chemické, není totální eliminace škůdce, ale snížení jeho populace na ekonomicky únosnou (tolerovatelnou) úroveň (Brodeur 2012). V dnešní době je stále větší tlak na vývoj biopřípravků, které představují mnohem šetrnější metodu ochrany ekosystémů ohrožených kalamitami škůdců, než chemické postřiky. Chemické postřiky často ovlivňují prostředí, v němž byly aplikovány

nebo dokonce nepříznivě postihují celé potravní pyramidy (Wermelinger 2004, Heydari a Pessaraki 2010). Proto se testují agens, které specificky inhibují populace škůdce. Příkladem je například houba *Beauveria bassiana*, která se testuje ve švýcarských národních parcích, kde má v dlouhodobém horizontu v lesních ekosystémech zabraňovat kůrovcovým kalamitám (Wermelinger 2004).

Výzkumná praxe ukázala, že entomopatogenní a mykoparazitické houby vykazují i v rámci jednoho druhu rozdílné vlastnosti. Jejich chování vůči potenciálnímu hostiteli je nejen řízené řadou faktorů prostředí, ale také tím, jakého je daný izolát původu, tj. je-li získán z půdy, anebo přímo z hmyzího či houbového hostitele (Safavi a kol. 2007, Brodeur 2012).

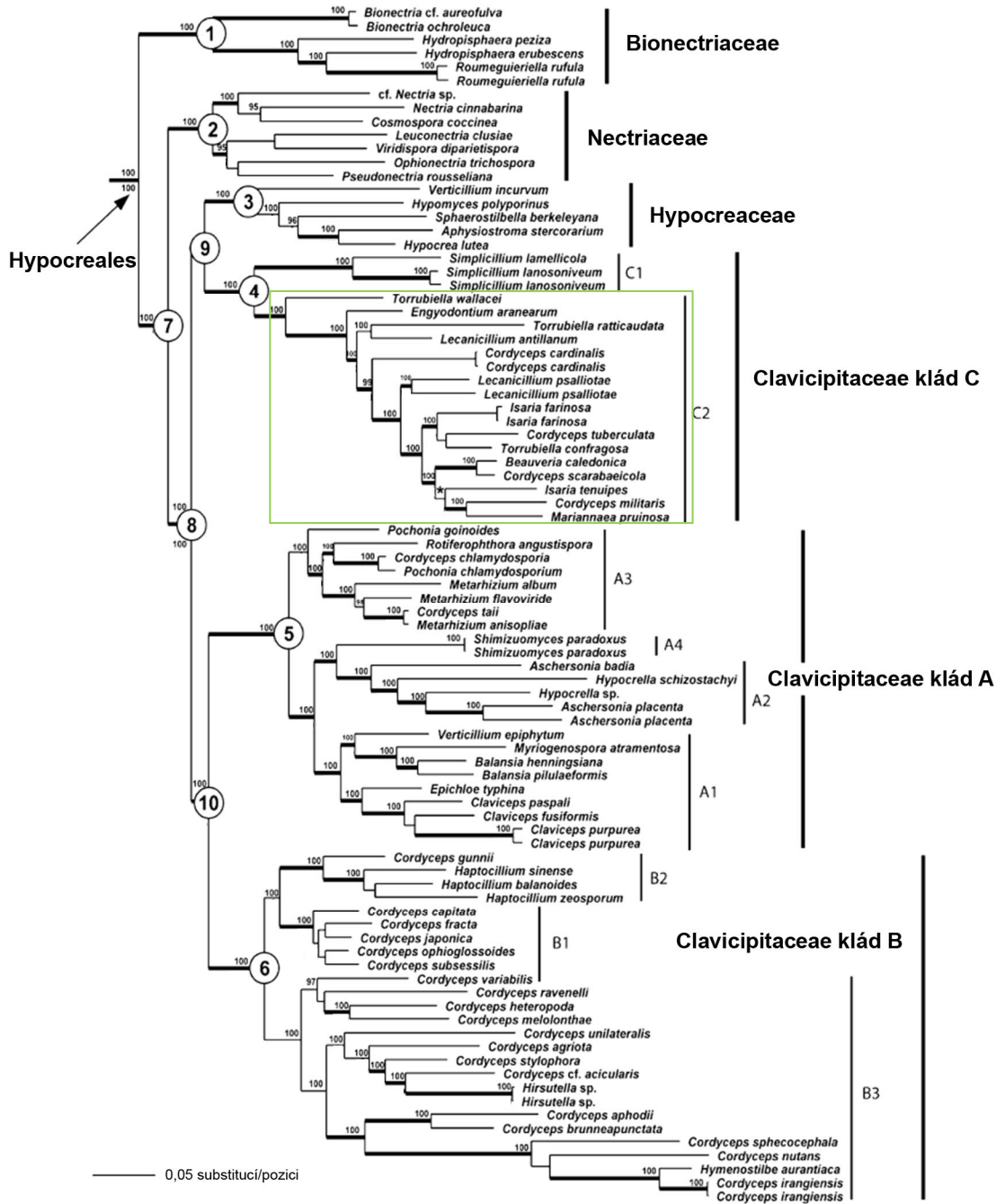
Tato práce se zabývá entomopatogenními a mykoparazitickými vlastnostmi pěti izolátů rodu *Lecanicillium spp.* různého původu a snaží se zjistit, zda má původ izolátů vliv na jejich schopnost kolonizovat jiné organismy.

1.1. *Lecanicillium sp.*: systematické zařazení

Rod *Lecanicillium* zahrnuje houby řazené do oddělení Ascomycota, pododdělení Pezizomycotina, třídy Sordaryomycetes, řádu Hypocreales a čeledi Clavicipitaceae. Dle nejnovější fylogenetické studie je tato čeleď parafyletická. Sung a kol. (2007b) řadí klád Hypocreaceae jako sesterskou skupinu ke Clavicipitaceae C (Obrázek 1). Rod *Lecanicillium* je nejvíce zastoupen v kládu Clavicipitaceae C2 (tj. klád rodu *Cordyceps*), kam spadají kromě samotného rodu *Cordyceps* také asexuální rody hub jako právě *Lecanicillium* a *Beauveria*, *Microhilum*, *Verticillium* či *Isaria* (Sung a kol. 2007a, b). Z fylogenetického pohledu je čeleď Clavicipitaceae velmi problematická. Naštěstí moderní molekulární metody pomalu odhalují vztahy mezi jednotlivými skupinami hub, u nichž se v minulosti předpokládalo, že jsou si blízce příbuznými (Sung a kol. 2007a). Samotný rod *Lecanicillium* byl definován až v posledních letech díky rozvoji fylogenetických metod (Gams a Zare 2001, Sung a kol. 2001). Původně byl na základě makroskopických i mikroskopických podobností zařazen spolu s rodem *Simplicillium* do rodu *Verticillium* sekce *Prostrata* (Gams 1971). Dvojice autorů Zare a Gams léta soustředili svou práci právě na skupinu hub v okruhu *Verticillium* sekce *Prostrata*, o níž zjistili, že má parafyletické uspořádání (Zare a Gams, 2001). Ze všech dříve uznávaných zástupců jsou tak dnes do rodu *Verticillium s. str.* řazeny pouze čtyři druhy (Gams a Zare 2001, Sung a kol. 2001, Sung a kol. 2007a). Samotný rod *Lecanicillium* byl zaveden až v roce 2001 a je synonymní druhu *Verticillium lecanii*, z něhož

byly vyčleněny druhy *L. attenuatum*, *L. lecanii*, *L. longisporum*, *L. muscarium* a *L. nodulosuma*. Dnes má rod *Lecanicillium* 24 druhů. (Gams a Zare 2001, Aiuchi a kol. 2008, Goettel a kol. 2008). Druh *Verticillium lecanii* byl prvotně popsán roku 1898 Zimmermannem jako druh *Cephalosporium lecanii* a do rodu *Verticillium* byl přesunut až v roce 1939 (Gams a Zare 2001).

Jako *Lecanicillium* spp. se často označují také anamorfní (tj. nepohlavní) stádia druhů *Cordyceps* spp. či *Torubiella* spp. (Petch 1932, Sung a kol. 2007b), například anamorfa od druhu *Torubiella alba* je *Lecanicillium araneorum* (Sung a kol. 2007b). Morfologické znaky rodů *Lecanicillium*, *Simplicillium*, *Verticillium* a *Isaria* jsou velice podobné. Kolonie většiny druhů jsou v tónech od bělavých přes žlutavé ke krémovým a také mikroznaky – např. fialidy vyrůstající v přeslenech nebo jednotlivě – patří mezi ty, které se v rámci všech čtyř rodů překrývají. Proto se nezdá stane, že jsou tyto rody zaměněny (Sugimoto a kol. 2003, Sung a kol. 2007b, Goettel a kol. 2008). Z těchto důvodů je nutné problematické druhy/ rody ověřovat přesnějšími metodami. V současnosti jsou jednotlivé taxony vymezovány na základě molekulárních znaků. Na druhové úrovni se uplatňuje tzv. "barcoding", což je vlastně pomyslný čárový kód vymezující jednotlivé druhy standardizovanou sekvencí DNA o délce 500-800 bp. Podobně jako u živočichů je i k identifikaci některých hub využívána sekvence mitochondriální cytochrom oxidázy 1 (*COI*). Vzhledem k technickým potížím s její amplifikací, rozdílným v délce způsobené intronovými sekvencemi a identitě sekvencí získaných z různých druhů však *COI* není pro houby vhodným univerzálním markerem. Schoch a kol. (2012) proto navrhl jako primární DNA "barcode" pro houby sekvenci vnitřních přepisovaných mezerníků (ITS) transkripční jednotky genů pro hlavní ribosomální RNA (18S, 5.8S a 28S RNA). Vyšší taxony jsou určovány na základě fylogenetických analýz postavených na větším počtu kódujících sekvencí (Sung a kol 2007a, Nilsson a kol. 2008). Ty ukazují, že je rod *Lecanicillium* stále parafyletický (Sung a kol. 2007b) a dá se předpokládat, že bude dále revidován.

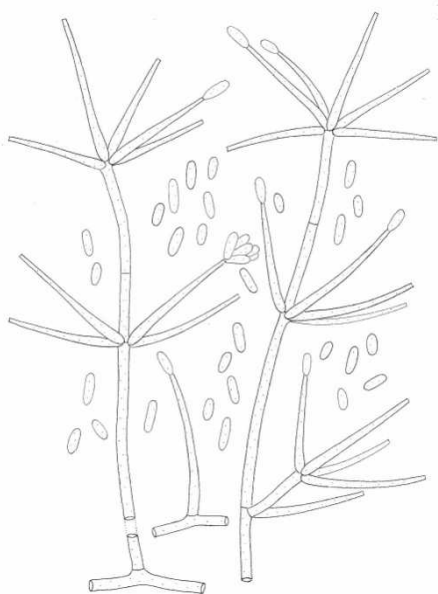


Obrázek 1: Fylogenetické vztahy 91 taxonů čeledi Clavicipitaceae a ostatních čeledí řádu Hypocreales. Upravený fylogram převzatý z práce Sung a kol. (2007b) je 50% majoritním konsensem 90 000 stromů pocházejících z Bayesiánské analýzy 6 genů. Posteriorní pravděpodobnosti $\geq 0,95$ jsou uvedeny v procentech nad příslušnými větvemi (pro další podrobnosti viz Sung a kol. 2007b). Zeleně je vyznačena skupina Clavicipitaceae C2, do níž je řazen rod *Lecanicillium* spp.

1.2. *Lecanicillium* sp.: fyziologické a morfologické vlastnosti

Rod *Lecanicillium* zahrnuje mikromycety charakteristické tvorbou útlých lahvicovitých nebo jehlicovitých 20-35 μ m dlouhých fialid, které rostou buď v přeslenech, nebo jednotlivě ze vzdušných nebo poléhavých hyf. Jednobuněčné hyalinní konidie jsou produkovány na koncích fialid ve větším množství a drží se v kulovitých nebo řetízkovitých shlucích díky povrchu pokrytým mucigenní hmotou. Konidie nejsou prašné, mají elipsoidní tvar, povrch bez struktur a víceméně uniformní rozměry – jsou 6.1 ± 0.9 μ m dlouhé, a $2.2 \pm$

0.3 široké. Chlamydostry nejsou nikdy přítomny (Landa 1994, Seifert a kol. 2011). Obrázek 2 zachycuje výše zmíněné důležité morfologické znaky druhu *Lecanicillium muscarium*, které se na rodu *Lecanicillium* vyskytují.



Obr. 2: *Lecanicillium muscarium* (Seifert a kol. 2011)

Kolonie rostoucí na mediu PDA (Potato Dextrose Agar, bramborový agar) přirůstají rychlostí 15-40mm za 10 dní (Gams a Zare 2001, Feng a kol. 2002, Sung a kol. 2007b). Rod *Lecanicillium* je charakteristický potřebou vysoké relativní vlhkosti především v počátcích nákazy k optimálnímu průběhu infekce. 97% relativní vlhkosti (Relative Humidity, dále jen RH) představuje optimum pro vyklíčení spor, pro další růst potom houba vyžaduje vlhkost 85-90% RH a kultivaci při 20-25°C (Samson a Rombach 1985).

1.3. Hostitelská specifita rodu *Lecanicillium* (Hypocreales: Ascomycota)

Rod *Lecanicillium* je charakteristický tím, že je schopný žít a přežívat v přírodě díky širokému spektru ekologických strategií. Schopnost saprofytického růstu, entomopatogenní a mykoparazitické vlastnosti podmíněné enzymatickou činností tohoto organismu z něj činí unikátní houbový organismus s možností praktického využití v rámci biologické ochrany. Je totiž schopný úspěšně kolonizovat a zabít například polokřídle, brouky, motýly, mšice, roztoče a dokonce i hlístice a háďátka (Feng a kol. 2002, De Faria a Wraight 2007). Druhy *Lecanicillium* spp. dále dokážou žít coby endofyty rostlin a saprotrofové v jejich fylosféře i rhizosféře (Vega a kol. 2009, Ownley a kol. 2010). Dále se vyskytují coby mykoparazité rzi

(Jackson a kol. 2012), padlí (Kim a kol. 2007) či plodnic hub (Berendsen a kol. 2010, Piasecka a kol. 2011). Řada izolátů (tj. čistých kultur) byla také získávána z půd, kde se může tento rod vyskytovat jako saprofyt či parazit hmyzu, půdních hub či háďátek (De Faria a Wraight 2007). I když mykoparazitické schopnosti rodu *Lecanicillium* byly popsány a zdokumentovány, dosud nebylo pozorováno, že by parazitovaly také ektomykorhizní mycelium, ať už v „*in vivo*“ či „*in vitro*“ podmínkách. Rod *Lecanicillium* roste dobře saprotrofně na mykologických živných mediích (PDA; SDA - Sabouraud Dextrose Agar, Sabouraudův dextransový agar; MEA - Malt Extract Agar, maltózový agar; Czapek-Dox agar atd.), ale také třeba MMN mediu (Modified Melin-Norkrans medium), které se používá právě pro *in vitro* pěstování ektomykorhizních hub.

Ne všechny izoláty rodu *Lecanicillium* vykazují stejně širokou ekologickou valenci. Izoláty různého původu (tj. izoláty získané z různých substrátů - přírodních epizoocií, půdy, hub - i z různých geografických oblastí) se liší ve schopnosti saprotrofně růst nebo parazitovat hmyz či jiné houbové organismy. Hostitelská specifita je pozoruhodná vlastnost izolátů rodu *Lecanicium* a její pozadí není zcela známo (Safavi a kol. 2007, Brodeur 2012).

Jednotlivé izoláty se mohou rovněž chovat odlišně v *in vitro* podmínkách a to nejen v závislosti na použitém mediu. Jednotlivé izoláty se projevují odlišnostmi v rychlosti růstu kultury, v intenzitě sporulace, klíčivosti a životnosti konidií (Safavi a kol. 2007, Brodeur 2012). Rychlost růstu a výtěžnost mycelia je závislá na množství živin v mediu, přičemž *Lecanicillium* vždy roste rychleji než ektomykorhizní houby.

1.4. Biologická a integrovaná ochrana rostlin (= Biokontrola)

Pod pojmem biologická a integrovaná ochrana rostlin si lze představit použití patogenů, parazitů, parazitoidů, predátorů či herbivorů v boji proti hmyzím škůdcům, plevelu a houbovým a jiným infekcím zemědělských plodin. Slouží ke snížení hustoty populace jiného organismu a brání tak tomu, aby se v dané lokalitě přemnožil. Tato ochrana je jedna z nejekonomičtějších a nejšetrnějších metod boje proti škůdci v zemědělských, městských či vodohospodářských prostředích. Pomáhá vyřešit problém s kalamitami škůdců, nemocemi či houbovými infekcemi v jiných než přirozených ekosystémech (Cock a kol. 2010).

Biologická a integrovaná ochrana rostlin se provádí buď pomocí klasických, nebo augmentativních metod. Klasické biologické metody jsou ty, kdy se do oblasti s výskytem

invazivního organismu introdukuje malé množství jeho přirozeného parazita, predátora nebo patogenního organismu, pocházejícího z jeho původního areálu výskytu. Ten snižuje populace škodlivého organismu na únosnou ekonomickou hodnotu a dále s ním v oblasti přežívá. Jde o ochranu působící v dlouhodobém časovém horizontu. Druhou možností je augmentativní přístup integrované ochrany rostlin. V tomto případě se do oblasti se škodlivým organismem záměrně vysadí velké množství kontrolní agens, která zlikviduje celou jeho populaci a sama také nepřežije do další sezóny (Cock a kol. 2010).

První praktické použití biokontrolního agens proti hmyzímu škůdci se událo v roce 1888 v Rusku, kdy byla houba, dnes známá pod jménem *Metarhizium anisopliae*, ve velkých množstvích pěstována na rmutu a posléze byla aplikována na úrodu zamořenou broukem rýhonoscem řepným (*Cleonus punctiventris*) (De Faria a Wraight 2007). Od konce 19. století lidstvo reguluje populace zemědělsky významných 170 problematických organismů. Během této doby se testovalo více než 7000 biologických agens, z nichž bylo 2700 schváleno a 170 se vyrábí komerčně a prodává po celém světě k ochraně úrody před více než 100 druhy škůdců. Nutno podotknout, že s největšími problémy s kalamitami škůdců zemědělských plodin se potýkají tropické země (Cock a kol. 2010).

De Faria a Wraight (2007) ve své práci srovnávají druhy (nebo poddruhy) hub používané v komerčně vyráběných mykopesticidích, jejich uplatnění a způsob aplikace na napadenou úrodu. Ze 171 entomopatogenních přípravků uvedených komerčními společnostmi na trh od 60. let 20. století (43% z nich v Jižní Americe) bylo 14 produktů založených na entopatogenních účincích rodu *Lecanicillium*. Mezi nejvíce používané druhy však patří druhy *Entomophthora anisopliae* a *Beauveria bassiana* (De Faria a Wraight 2007). V některých případech sice tyto druhy potlačují populaci invazního organismu, ale zároveň zabíjejí i ostatní hmyz včetně přirozených predátorů škůdce. Takové izoláty nevyhovují požadavkům komerčních producentů, kteří testují a hledají biokontrolní agens s úzkou druhovou specifitou, které specificky zabíjejí jen konkrétní druhy škůdců (Cock a kol. 2010).

Lecanicillium je příkladem rodu, který má schopnost parazitovat jak bezobratlé, tak i houby. Díky tomu jsou jeho izoláty potenciálním zdrojem biologických agens proti širokému spektru škůdců (Milner 1997, Verhaar a kol. 1999, Kim a kol. 2007, Ansari a kol. 2011, Jackson a kol. 2012), čehož někteří výrobci mykopesticidů využili. Nejčastěji se používá ke

snížení populací bezobratlých blíže nespecifikovaný druh *Lecanicillium* sp., v několika málo produktech pak *L. muscarium* nebo *L. longisporum* (De Faria a Wraight 2007).

V Evropě se výrobou biologických agens založených na entomopatogenních účincích rodu *Lecanicillium* zabývalo několik společností. Kromě společnosti Koppert Biological Systems z Holandska (dříve šlo o britskou společnost s názvem Tate and Lyle) tu v minulosti také působila společnost Biodron z Ruska, Trichodex S. A. ze Španělska a Omya AG ze Švýcarska. Na entomopatogenních účincích rodu *Lecanicillium* byl založen také český přípravek testovaný v Čechách v 80. a 90. letech (Landa 1994). Jeho výzkum však skončil po pádu železné opony, kdy se do Čech dostaly zahraniční průmyslově vyráběné bioprostředky. Registrační známky pro použití přípravků obsahujících izoláty rodu *Lecanicillium* v ochraně zemědělských plodin proti rozličným bezobratlým škůdcům (mšicím, molicím, roztočům, třásnokřídleému či dvoukřídleému hmyzu) má dnes řada zemí. Patří mezi ně Finsko, Dánsko, Velká Británie, Holandsko, Francie, Švýcarsko, Itálie a Turecko. Přehled všech ochranných bioproduktů s účinnou houbou *Lecanicillium* historicky používaných v boji s bezobratlými živočichy je ukázán v tabulce 1 (De Faria a Wraight 2007). Většina z nich se však již neprodává, protože jejich producenti buď zanikli, nebo byly přípravky staženy z prodeje.

Tabulka 1: Přehled produktů založených na rodu *Lecanicillium* používaných v různých zemích k ochraně zemědělských plodin před různými škůdci. Převzato a upraveno dle práce De Faria a Wraight 2007. Podtrhané produkty jsou na trhu dosud dostupné (aktuální k r. 2014).

Druh	Jméno výrobku	Cílový organismus	Výrobce	Země s registrační známkou
<i>L. longisporum</i>	Vertalec	Mšice	Koppert Biological Systems, Netherland	Finsko, Švýcarsko, UK, Japonsko
	Vertirril WP 1300	Molice, toulice	Itaforte Industrial de BioProdutos Agro-Florestais Ltda., Brasil	Brazílie
<i>L. muscarium</i>	Verticillin	Mšice, molice, roztoči	Biodron, Russia	Rusko
	<u>Mycotal</u>	Molice, třásněnky	Koppert Biological Systems, Netherlands (previously: Tate and Lyle, UK)	Holandsko, Dánsko, Finsko, Francie, Itálie, Švýcarsko, UK, Turecko, Japonsko
<i>Lecanicillium</i> sp.	Trichovert	Nespecifikováno	Trichodex S. A., Spain	Španělsko
	MicroGermi n Plus	Mšice, molice, třásněnky, roztoči	Omya (Schweiz) AG, Switzerland	Švýcarsko
	<u>Bio-Catch</u>	Mšice, molice	T.Stanes & Company Limited, India	Indie
	<u>Biovert Rich</u>	Hmyz, hlístice	Plantrich Chemicals & Biofertilizers Ltd, India	Indie
	Mealikil	Mšice a další	Agri Life, India	Indie
	Verti-Sin	Mšice, třásněnky	Agrobiologicos del Noroeste S. A. de C. V. (Agrobionsa), Mexico	Mexiko
	Verzam	Mšice, molice, třásněnky, roztoči	Escuela Agrícola Panamericana, Honduras	Honduras, Salvátor, Guatemala, Jamajka, Nicaragua
	No trade name	Mšice	Turfal Ind. Com. Prod. Biol., Brasil	Brazílie
	Vertinat	Molice, toulice	Natural Rural, Brasil	Brazílie
	Ago Biocontrol Vericillium 50***	Dvoukřídlí, polokřídlí	Ago Biocontrol, Colombia	Kolumbie
Vertisol 50 WP	Molice	Laverlam S. A., Colombia	Kolumbie, Peru, Kostarika, Honduras	

1.5. Testování izolátů mikromycet

Entomopatogenní a mykoparazitické houby jsou v přírodě velice běžné a často regulují populace hmyzu, roztočů či biotrofních hub. Mycelia myko i entomopatogenních hub jsou schopná penetrovat chitinovou buněčnou stěnu houby. Do hmyzu vnikají hyfy hub díky kombinaci fyzického tlaku a lytických enzymů. K úspěšné kolonizaci hmyzu (a jiných živočichů) musí být houba schopna tzv. dimorfismu, tj. schopnost na pevném materiálu tvořit mycelium a v tekutém prostředí žít ve formě blastokonidií – kulovitých jednobuněčných kvasinkovitých tělísek, které se množí dělením. Tato životní fáze se uplatňuje právě například v hemolymfě hmyzu. Vzdušné mycelium produkující konidie porůstá až mrtvé tělo hmyzu. Organismus umírá na nedostatek živin, destrukci orgánů a/nebo působením houbových toxinů (Askary a kol. 1997, Butt a Goettel 2000, Butt a kol. 2001, Lopez-Llorca a Jansson 2007). Mykoparazitická aktivita řádu Hypocreales je testována poměrně dlouho a některé z hub se také staly komerčním biokontrolním agens používaným proti fytopatogenním houbám (Papavizas 1985, Carsolio a kol. 1999, Ownley a kol. 2008, Ward 2011).

V rámci biologické ochrany jsou využívány houbové organismy vykazující především entomopatogenní vlastnosti. Podrobný seznam entomopatogenních druhů hub vytvořil Roberts (1989). Houby s nejlepší kombinací výše zmíněných vlastností mají potenciál se stát komerčně využívaným agens. Cesta od jednotlivých izolátů ke komerčním přípravkům je dlouhá a křivolaká. Prvním krokem je izolace entomopatogenní houby z přirozeného prostředí. Následuje její kultivace, determinace a testování jejích vlastností pomocí *in vitro* a *in vivo* testů. Hodnotí se následující faktory: (i) hostitelská specifita, (ii) virulence, (iii) chování izolátu *in vivo*, (iv) podmínky, které ovlivňují epizoozii a (v) faktory zabráňující infekci. Izolát musí mít skvělé saprotrofní vlastnosti, aby ho bylo možné kultivovat ve velkých objemech, a zároveň by měl v přirozených podmínkách infikovat specifického hostitele. (Butt a Goettel 2000, De Faria a Wraight 2007).

In vitro testy saprotrofního růstu mikromycet slouží k charakterizaci jejich vlastností a odlišení jednotlivých druhů nebo izolátů hub. Mezi základní *in vitro* metody patří test radiálního růstu na středových kulturách pěstovaných na médiu s vyváženým poměrem živin, například PDA nebo SDA. Vzhledem k rovnoměrné distribuci živin v médiu způsob a rychlost růstu na médiu odpovídá tomu, jak daná houba v ideálních podmínkách kolonizuje prostředí. Cílem testu je nejen určení morfologických rozdílů jednotlivých izolátů, ale také

zaznamenání a charakterizace průběhu růstu mycelia středových kultur kultivovaných na PDA/ SDA médiu po dobu 7, 14 a 21 dnů při konstantní teplotě (Reiss a kol. 2012). Test výtěžnosti konidií mikromycet stanovuje množství vyprodukovaných konidií při kultivaci hub na umělém živném médiu PDA/ SDA. Tento test má určit maximální rozmnožovací schopnosti houby v ideálních podmínkách (Reiss a kol. 2012, Skalický a kol. 2013). CFU test (Colony Forming Units) je dalším *in vitro* testem standardně používaným v mikrobiologii pro bakterie a plísň. V případě anamorfních stádií hub se na Petriho misku s médiem, rozetře sterilní kličkou definovaná (objem a koncentrace spor) konidiální suspenze. Po kultivaci v definovaných podmínkách se po 6, 12, 24 a 48 hodinách odečítají narostlé kolonie. Test tedy vypovídá o životnosti a klíčivosti houbového izolátu (Samson a kol. 2010)

Hodnocení virulence a patogenních vlastností izolátu entomopatogenního druhu houby se provádí pomocí *in vivo* testů. Jednou ze základních metod je stanovení tzv. indexu vývoje a růstu houby (FDGI; Fungus Development and Growth Index) standardizovaného Landou (1994). Principem biotestu je expozice pupáří molic suspenzi entomopatogenní houby v podmínkách sterilní vlhké komůrky a následné hodnocení průběhu vývoje patogena pomocí indexové stupnice. Na sterilní sklíčko se nanese kapky suspenze o koncentraci 1×10^7 konidií / ml (10 kapek ve 3 řadách) a do každé kapky se vloží jedno pupárium. Sklíčko je inkubováno v konstantní teplotě a kontrolováno pod mikroskopem každých 24 hodin. Infekce je vyhodnocována dle stupnice od 0– 3 (0 – konidie beze změny; 0,5 – tvorba primárního klíčku; 1 – sekundární větvení; 1,5 – počátek růstu mycelia na tělech larev; 2 – plný růst mycelia; 2,5 – počátek sporulace; 3 - plná sporulace; konec vývojového cyklu).

Virulenci parazita je možné vyhodnotit také přímo v rámci tritrofického systému hostitel – škůdce – parazit, kdy se pracuje buď pouze s jednotlivými infikovanými listy inkubovanými ve vlhké komůrce, nebo s celými infikovanými rostlinami. Molicemi infikovaný list nebo celá rostlina je smočena v suspenzi entomopatogenní houby o známé koncentraci konidií a soustava je inkubována v konstantní teplotě. Při vyhodnocování se zaznamenává počet živých, infikovaných, či prokazatelně mrtvých pupáří (přičemž nevykazují přítomnost patogena) (Landa 1994, Cuthberthson a Walters 2005).

Testy mykoparazitismu probíhají buď v *in vitro*, nebo *in vivo* podmínkách. V *in vitro* testech se testuje, jak na sebe dva houbové organismy reaguji – jestli se mezi koloniemi tvoří zóny inkompatibility, zda jeden z izolátů inhibuje růst druhého, nebo ho dokonce kolonizuje,

případně jak rychle (Reiss a kol. 2012). Testy fytopatogenů se provádějí zásadně v *in vitro* podmínkách, protože fytopatogeni jsou většinou organismy biotrofní a obligátně vázané na svého hostitele. Tyto testy probíhají v rámci tritrofického systému hostitelská rostlina – fytopatogen – mykoparazit, přičemž hostitelská rostlina může být zastoupena pouze listem inkubovaným v Petriho misce (Quinn a Powell 1982) nebo celou živou rostlinou (Kim a kol. 2007). Quinn a Powell vyhodnocovali testy coby procentuální pokryvnost infekce fytopatogena na listu, která se snižovala po aplikaci fytopatogena na listy. Kim a kol. 2007 porovnávali počet konidií rodu *Sphaerotheca fuliginea* v jednotlivých dnech po aplikaci mykopatogena.

Testování vlastností izolátů hub s mykoparazitickými a entomopatogenními vlastnostmi je složitý proces, náročný na čas i práci. Nicméně výsledky neodhalují pouze stupeň patogenity izolátu konkrétního druhu vůči cílovému organismu, ale také napovídají o ekologiii a životních strategiích těchto mikromycet obecně.

2. Cíle práce

Tato studie se zabývá rozdílnými vlastnostmi pěti izolátů rodu *Lecanicilium* získaných z různých hostitelů. Jejím cílem bylo zjistit, zda izoláty různého původu mají odlišné vlastnosti a zda přednostně parazitují hmyzí nebo houbové hostitele. Pro tento účel byly zkoumány a porovnávány následující vlastnosti:

- Morfologická variabilita izolátů
- Saprotrofní vlastnosti
- Mykoparazitická a entomopatgenní aktivita

Bylo testováno, zda má izolát získaný z ektomykorhizní houby lepší mykoparazitické schopnosti v porovnání se zbývajícími izoláty vyizolovanými z hmyzu, a naopak, jak se chovají izoláty z hmyzu vůči houbovým hostitelům, včetně nabídnuté ektomykorhizní kultury.

3. Metody a materiál

3.1. Původ a determinace jednotlivých izolátů

Tato studie se zabývá porovnáním pěti různých izolátů rodu *Lecanicillium spp.*. Původ izolátů je uveden v tabulce 2. Jednotlivé izoláty byly získány odběrem a kultivací příslušného původního vzorku v *in vitro* podmínkách standardními metodami používanými v mikrobiologii a mykologii (Goettel a Inglis 1997, Bills a Foster 2004). Všechny izoláty byly kultivovány *in vitro* na Petriho miskách na mediu PDA. Uloženy jsou ve formě alginátových pelet v -20°C na ZF JU, Katedra rostlinné výroby a agroekologie a PřF JU, Katedra Botaniky. Pro aktivaci hub byly pelety umístěny do sterilního flow boxu s temperovanou teplotou na 25°C a poté přeneseny na PDA medium. Složení PDA média a dalších medií použitých v této práci je uveden tabulce 4.

Morfologické struktury byly mikroskopovány světelným mikroskopem Olympus BX 51 a dokumentovány kamerou Olympus DP-7. Získané obrázky rozmnožovacích struktur byly dále upravovány pomocí softwaru QuickPHOTO MICRO 3.0 (PROMICRA). Morfologické znaky anamorfních stádií *Lecanicillium spp.* byly porovnávány s určovacím klíčem Seiferta a kol. (2011). Rozměry konidií byly proměřeny pomocí programu ImageJ.

Tabulka 2: Původ jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium*.

Izolát (kód ve sbírce)	Hostitel	Místo původu, rok izolace
VL02	puklice	Florida, USA, 2011
NL02	puklice	Holandsko, 2008
I9	<i>Ips typhografus</i>	Šumava, Česká republika, 1999
Lat	<i>Laccaria laccata</i>	Novohradsko, Česká republika, 2012
Mycotal	neznámý	Komerční produkt; Holandsko

3.1.1. Izolace DNA

Druhová identifikace izolátů byla provedena pomocí molekulárních metod. Jako barcode, tj. DNA markery byly použity vnitřní přepisované mezerníky včetně genu pro 5.8S RNA (ITS1-5.8S-ITS2) (Sung a kol. 2007b, Kouvelis a kol. 2008, Nazemi a kol. 2014).

Z kultury byla vyizolovaná genomová DNA pomocí NaOH extrakce založené na lyzi buněk v alkalickém prostředí (upraveno dle Werner a kol. 2002). Z čisté kultury izolátu rodu

Lecanicillium bylo do mikrozkušavky odebráno několik miligramů mycelia, k němuž bylo přidáno 30 μ l 0,5M NaOH. Směs byla dokonale zhomogenizována sterilními plastovými homogenizátory. Následně byly vzorky centrifugovány 2 minuty na 13800rpm. Dva mikrolitry supernatantu byly přidány ke 20 μ l 0,1M TRISu (pufr tris-hydroxymethylaminomethan) (tj. ředění 1:10).

3.1.2. Polymerázová řetězová reakce a sekvenace

Vyizolovaná DNA byla použita jako templát v polymerázové řetězové reakci (PCR; Polymerase Chain Reaction). K amplifikaci ITS1-5.8S-ITS2 byly použity univerzální primery pro říši Fungi (tabulka 3). Velikost amplifikovaných fragmentů se pohybuje okolo 600-800 párů bazí. PCR reakce obsahovala příslušné primery, PPP Master mix (Top-Bio), sterilní vodu (Top-Bio) a 1-3 μ l DNA dle instrukcí výrobce. K amplifikaci vzorků byl použit následující teplotní profil: denaturace 95°C/2 min; nasedání primerů 54°C/15 s; elongace 72°C/1 min ve 40 cyklech následovaných závěrečnou elongací 72°C/5min.

PCR produkty byly pro kontrolu elektroforeticky separovány na 1,5% agarózovém gelu (UltraPure™) v TAE pufru se 2 μ l interkalační barvy GelRed™. Gel byl zdokumentován v UV transiluminátoru (UltraLum™) programem ScioVisiCapture.

Vzorky byly osekvenovány Sangerovou metodou na přístroji ABI Prism 3130XL v Laboratoři genomiky BC AVČR. Sekvenační data byla upravena pomocí programu Geneious R6 verze 6.1.2. Editované sekvence byly pomocí nástroje Blastn porovnány se sekvencemi v databázi GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Získané sekvence byly použity také pro fylogenetickou analýzu. Pro tento účel bylo 5 sekvencí ITS1-5.8S-ITS2 získaných z izolátů rodu *Lecanicillium spp.* doplněno o 31 sekvencí z databáze GenBank. Výsledný dataset byl analyzován metodou Bayesiánské inference v programu „Mr. Bayes“ verze 3.1.2. se substitučním modelem GTR+I+G. Strom byl zakořeněn sekvencemi zástupců čeledi Nectriaceae a Hypocreaceae.

Tabulka 3: Primery použité k amplifikaci ITS1-5.8S-ITS2. ITS1F dle Gardes a Bruns (1993), ITS4 dle White a kol. (1990). Všechny primery byly syntetizovány firmou Integrated DNA Technologies

Použitý primer	Sekvence
ITS1F	5' - CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC

3. 2. Testy hostitelské specifity pěti izolátů rodu *Lecanicillium*

3.2.1. *In vitro* testy hodnotící saprotrofní vlastnosti pěti izolátů rodu *Lecanicillium*.

U jednotlivých izolátů entomopatogenních hub byla hodnocena rychlost radiálního růstu. Z každého izolátu byla připravena suspenze konidií o standardní koncentraci 1×10^7 v 1 ml destilované vody s 0,05% TWEEN 80 následovně: do Neubauerovy komůrky byla nanesena kapka suspenze a pomocí mikroskopu byl určen počet konidií. Podle standartizovaného vzorce byla určena jejich koncentrace pomocí na koncentraci konidií v suspenzi a adjustován na požadovanou koncentraci 1×10^7 konidií v 1 ml vody. Pracovalo se podle návodu uvedeného na <http://celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>. 1 μ l suspenze byl v sedmi opakováních nanesena ve formě kapky do středu Petriho misky o průměru 90mm s živným médiem PDA. Kultury byly inkubovány v termostatu při konstantní teplotě 25°C a rychlosti radiálního růstu byly analyzovány 21. den po inokulaci media. Z každé kultury byly měřeny dva na sebe kolmé průměry. Následně byla vypočítána plocha kultury ($P = \pi d^2 / 4$).

Dalším *in vitro* testem, který ověřoval saprotrofní růst rodu *Lecanicillium*, byl test výtěžnosti konidií. Po tom, co byla ve výše zmíněných kulturách vypočítána jejich plocha, byly vždy dvě vysporulované kultury od jedné varianty převedeny do 200 ml směsi vody s detergentem 0,05% TWEEN 80 a homogenizovány. Ve vzniklé suspenzi byla mikroskopicky pomocí Neubauerovy komůrky stanovena koncentrace konidií, která byla následně přepočtena na množství konidií na 1 mm^2 .

3.2.2. *In vitro* test hodnotící mykoparazitické vlastnosti na myceliích ektomykorhizních hub.

3.2.2.1. Původ a izolace ektomykorhizních hub

Kultury ektomykorhizních hub muchomůrka červená (*Amanita muscaria*) a čechratka podvinutá (*Paxillus involutus*) byly izolovány z mladých plodnic hub nalezených ve smíšených lesích na Prachaticku. Z pilothecia hub byly sterilně vyříznuty tři bločky o

velikosti cca 0,5x0,5x0,2cm a ty byly umístěny do středů tří Petriho misek s MMN médiem s přídatkem antibiotika. Misky byly inkubovány při konstantní teplotě 25°C. Opakovanou inokulací byly získány čisté kultury, jejichž identita byla ověřena pomocí amplifikace a sekvenace ITS1-5.8S-ITS2 dle protokolu popsaného v kapitole 4.1.3. s výjimkou použitého programu sestávajícího ze 40 cyklů denaturace – 94°C/1 min, nasedání primerů – 50°C/1 min; elongace produktu – 72°C/1:30 min následovaných finální elongací 72°C/7 min. Kultury jsou součástí sbírky PřF JU a jsou udržovány na mediu BAF při teplotě 20-21°C. Kultury jsou přeočkovávány každý třetí měsíc (Repáč 2011).

Tabulka 4: Seznam použitých medií, jejich zkratky a složení.

Médium; název	PDA (HIMEDIA RM 666-500G); Potato Dextrose Agar; bramborový agar	MMN; Modified Melin-Norkrans medium
Složení	PDA / 39g H ₂ O / 1l	H ₂ O/ 1l Agar Type 1 / 15g Glukóza /5g Maltózový extrakt / 3g KH ₂ PO ₄ / 1g (NH ₄) ₂ HPO ₄ / 0,175g NaCl ₂ / 0,05g FeCl ₃ / 0,0012 g ZnSO ₄ x7H ₂ O / 0,0057g CuSO ₄ x5H ₂ O / 0,0013g

3.2.2.2. Design experimentu

Ze tří čistých kultur obou variant byly nařezány bločky o rozměru 0,5x0,5x0,2 cm a každý bloček byl ve čtyřech replikacích sterilně přenesen do středu nové Petriho misky s MMN médiem. Po měsíci (v případě čechraty) nebo dvou (v případě muchomůrky) byla z jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium* připravena suspenze o koncentraci 1×10^7 konidií na 1 ml vody, která byla po 30 μ l nanesena ve třech místech cca. 15 mm od okraje misky. Po měsíci byl z kolonií ektomykorhizních hub vyříznut terčík korkovrtem o průměru 1cm, který byl přenesen do 10 ml vody, a byla zjištěna koncentrace konidií v suspenzi.

3.2.3. *In vivo* test hodnotící mykoparazitický efekt na rostlinného mykopatogena

3.2.3.1. *Původ živné rostliny a jejího mykopatogena.*

Padlí okurkové (*Sphaerotheca fuliginea*) bylo odebráno v srpnu 2013 v zahrádkářské kolonii v Českých Budějovicích, kde parazitovalo listy okurek setých. Padlí bylo přeneseno do laboratoře, kde bylo otiskem nanášeno na listy pěti napěstovaných rostlin okurek setých (*Cucumis sativus*; Magnoliophyta: Rosopsida: Cucurbitales), kultivar Stella F1. Toto osivo poskytla Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

3.2.3.2. *Design experimentu – 1. preventivní a 2. kurativní efekt*

Rod *Lecanicillium* má mykoparazitický účinek. Pro zjištění dopadu jednotlivých izolátů *Lecanicillium* spp. na padlí okurkové (*Sphaerotheca fuliginea*) byly provedeny dva experimenty. V prvním byl testován kurativní a ve druhém preventivní efekt jednotlivých izolátů tohoto mykotrofa vůči fytopatogenovi.

3.2.3.2.1. Preventivní efekt

Bylo napěstováno 60 rostlin okurky seté do fáze dvou listů. Experiment probíhal v laboratorních podmínkách ve fytotronu při fotoperiodě 16h světlo: 8h tma a teplotě 25°C. Na padesát z nich byla rozprašovačem nanášena suspenze o známé koncentraci konidií izolátů *Lecanicillium* spp. Tato suspenze byla připravena z týdenních kultur izolátů *Lecanicillium* spp. rozpuštěných v destilované vodě s 0,05% TWEEN 80 a přefiltrována přes gázu, aby se oddělilo mycelium a agar od konidií. Koncentrace konidií byla spočtena pomocí Neubauerovy sčítací komůrky a naředěna vodou na konečnou koncentraci 1×10^7 konidií na 1 ml. Každým izolátem *Lecanicillium* spp. bylo ošetřeno deset rostlin a jako kontrola posloužilo deset rostlin ošetřených vodou. Aby se zabránilo kontaminaci mezi jednotlivými izoláty a pro zajištění optimální vlhkosti, byly rostliny okurek umístěny po jedné do průsvitných plastových sáčků s vystřiženým větracím otvorem. Okurky byly ve fytotronu rozmístěny náhodně. Po jednom týdnu byly na listy okurek nanášeny otiskem spory *Sphaerotheca fuliginea*. Za 14 dní se na listech okurek objevily bílé kolonie epifytického mycelia *S. fuliginea*, které mělo být dle našich předpokladů parazitováno *Lecanicillium* spp. Z každé rostliny byl z jednoho listu napadeného padlím korkovrtem vyříznut terčík o průměru 1cm. Tyto terčíky byly vloženy do zkumavky s 10ml vody s 0,05% TWEEN 80. Vzorky byly dobře promíchány s pomocí vortexu, aby se od sebe a od mycelia oddělily

konidie v lepidých řetězcích. Konidie obou druhů hub byly spočteny s pomocí Neubauerovy počítací komůrky pod světelným mikroskopem.

3.2.3.2.2. Kurativní efekt

Druhý experiment probíhal obdobně s tím rozdílem, že byly listy okurek nejdříve infikovány *Sphaerotheca fuliginea*. Po 14 dnech, kdy se na listech objevil bílý povlak (mycelium a konidie) *Sphaerotheca fuliginea*, byla na rostliny aplikována suspenze *Lecanicillium* spp. o koncentraci 1×10^7 konidií na 1 ml vody. Každým izolátem bylo ošetřeno vždy 10 rostlin. Kontrola byla ošetřena vodou. Koncentrace obou druhů konidií byly spočteny z terčíku o průměru 1 cm 2., 4. a 6. den po ošetření rodem *Lecanicillium*.

3.2.4. *In vivo* test hodnotící entomopatogenní vlastnosti

3.2.4.1. Původ živné rostliny a jejího škůdce

Použité synchronizované populace molice bavlníkové (*Bemisia tabaci*) pocházejí z chovů Katedry rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Molice bavlníková je zde chována na rostlinách okurek setých (opět kultivar Stella F1).

3.2.4.2. Design pokusu

Na rostliny napěstované do fáze dvou listů byly nasazeny samice molice bavlníkové, které zde nakladly vajíčka. Po 48 h byli dospělci odstraněni a rostliny byly v plastových sáčcích umístěny do fytotronu s konstantní teplotou nastavenou na 25°C, dokud mladé molice nedosáhly 2. a 3. instaru. Poté byly rostliny ošetřeny suspenzí *Lecanicillium* spp. o koncentraci 1×10^7 konidií v 1 ml vody s 0,05% TWEEN 80. Posléze byly rostliny opět vloženy do plastových sáčků a umístěny do fytotronu. Hodnocení stavu populace bylo provedeno po 7 dnech kultivace. V populaci se hodnotily pupária do kategorií „živé“, mrtvé“ (bez známek infekce) a „infikované“ (mrtvé se známkou infekce), přičemž sečtením kategorií „mrtvých“ a „infikovaných“ dostaneme „kumulativní mortalitu“ molic po aplikaci jednotlivých izolátů.

3.2.5. Statistické zpracování dat

Pro test vlivu jednotlivých kmenů na saprotrofní i patogenní vlastnosti byla použita analýza variance (ANOVA) v programu Statistica verze 12 (StatSoft 2013). V rámci saprotrofního růstu se testovalo, zda se u jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium* liší rychlosti radiálního růstu kultur a výtěžnosti konidií na 1 mm^2 kultury, u patogenních

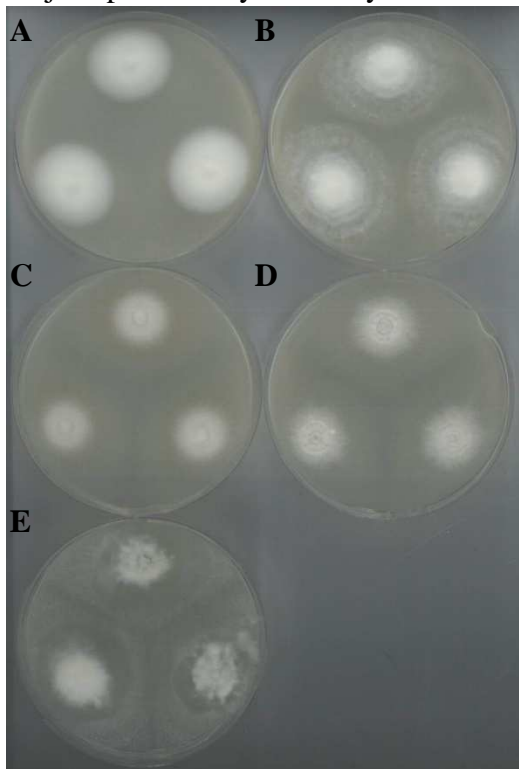
vlastností mykoparazitický efekt na ektomykorhizní houbu. Dále se testoval vliv kurativního a preventivního ošetření rostlin okurek na nákazu *Sphaerotheca fuliginea*. V rámci preventivní aplikace izolátů *Lecanicillium* spp. byl počet napadených listů padlím okurkovým na rostlině okurky byl brán jako kovariát. Kurativní efekt byl sledován v časové posloupnosti studován 2. 4. a 6. den po aplikaci izolátů *Lecanicillium* a testovalo se, zda má na výsledek vliv druh izolátu či čas. Jako poslední se testoval vliv jednotlivých izolátů na mortalitu molic. K testování signifikantních rozdílů mezi jednotlivými kmeny byl pro každou analýzu použit Tukeyho HSD post-hoc test. Koncentrace konidií, jak *Lecanicillium* spp., tak *S. fuliginea* v jednotlivých testech byla transformována přirozeným logaritmem. Počty živých, mrtvých a infikovaných molic byla převedena na procenta, protože na každé rostlině byl jiný počet pupáří.

Ke shrnutí výsledků a k určení oblastí, kde jsou jednotlivé kmeny nejefektivnější, byla použita analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis - dále jen PCA) v programu CANOCO 5 (Ter Braak a Šmilauer 2012). PCA je mnohorozměrná analýza vhodná pro data s lineárním gradientem. Jako druhové proměnné byly použity testované vlastnosti jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium* spp. (radiální růst, výtěžnost konidií vztažená na 1mm² kolonie; dále výtěžnost konidií izolátu porůstajícího ektomykorhizní houbu, výtěžnost konidií izolátu porůstající mycelium *Sphaerotheca fuliginea* a kumulativní mortalita molic). Data pro tuto analýzu byla získána pomocí post-hoc testů v předchozích analýzách. Na základě těchto post-hoc testů bylo určeno pořadí efektivity jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium* spp. pro testované ekologické funkce a dle tohoto pořadí dostaly jednotlivé izoláty pro danou ekologickou funkci hodnotu 1-5 (kde 5 je nevíce, 1 je nejméně). Pokud se dva a více izoláty od sebe statisticky nelišily, tak dostaly stejnou hodnotu. Pokud se izolát statisticky nelišil od kontroly (padlí, molice), byla mu přiřazena nula.

4. Výsledky

4.1. Morfologické parametry

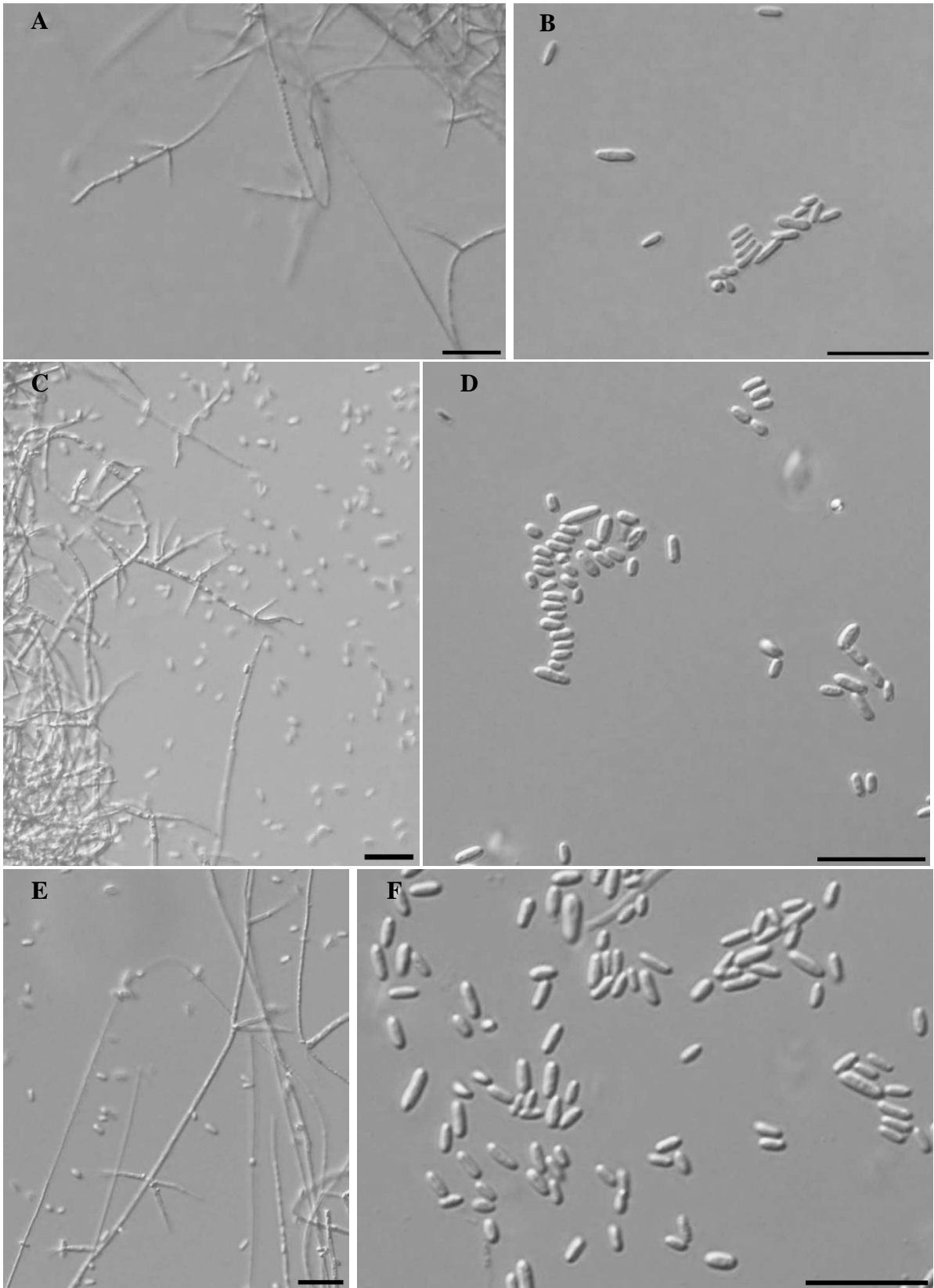
Morfologie růstu kolonií *in vitro* u jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium* je odlišná. Jak je patrné z obrázku 3, skeny jednotlivých izolátů mají odlišný charakter tvorby kolonie u jednotlivých izolátů. Zatímco izolát Lat dělá rozsáhlé vzdušné mycelium, mycelia ostatních jsou spíše poléhavá. Kolonie I9, Mycotal a VL02 tvoří radiální zóny. Izoláty I9 a Mycotal mají šupinkatá mycelia. Mycelia všech izolátů jsou bílé nebo bělavé barvy, v periferních

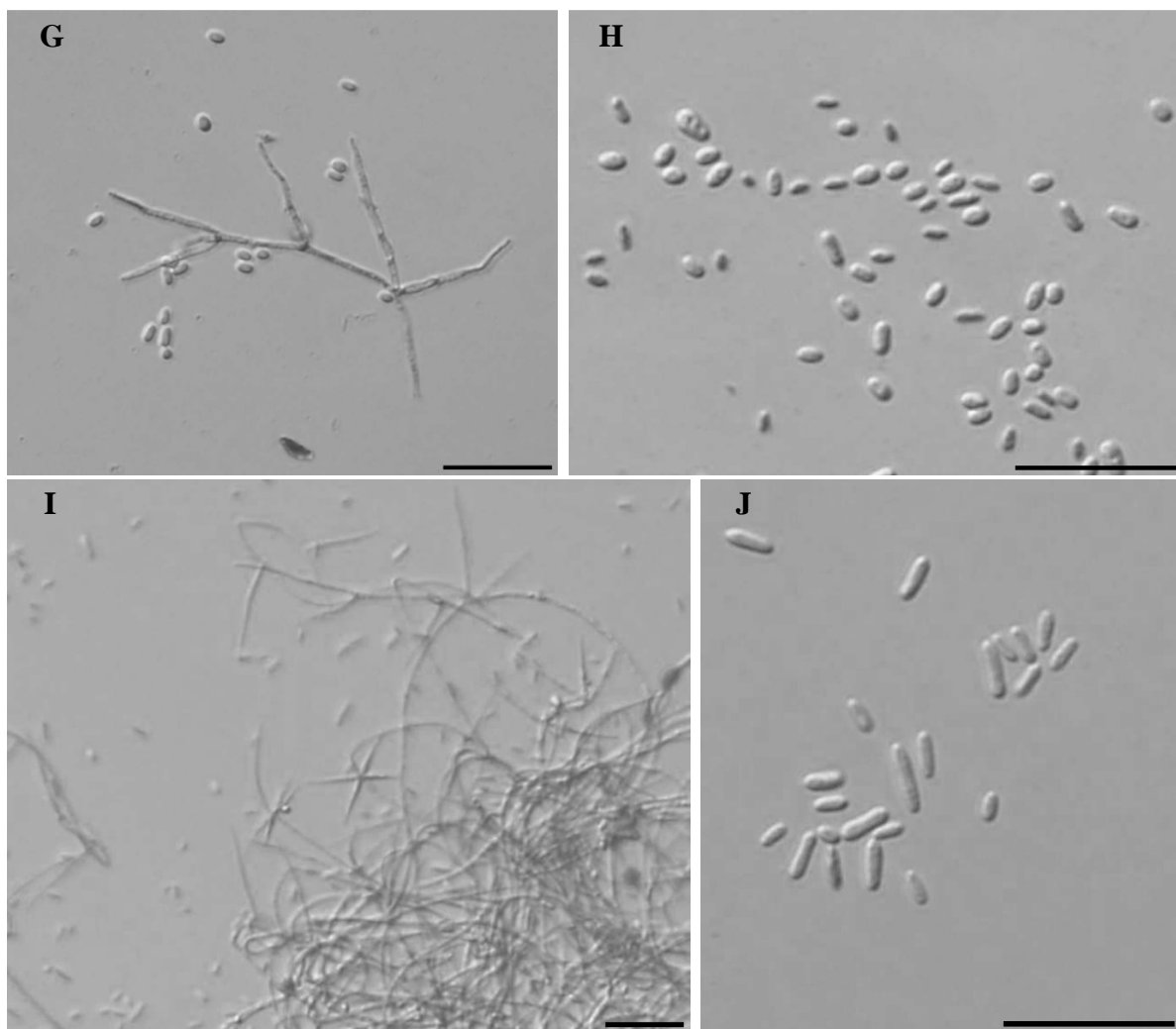


Obrázek 3: Kolonie jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium*. A – Lat, B - I9, C - NL02, D - VL02, E - Mycotal

částech s nádechem do krémové. Mycelia byla podrobena testu radiálního růstu jednotlivých izolátů (viz níže). Nejpodobnější jsou si z hlediska makroskopických morfologických znaků izoláty NL02 a VL02, které byly izolovány z puklic.

Odlišnosti v morfologických vlastnostech byly zaznamenány také na úrovni mikroskopických znaků (tabulka 5). Obrázek 4 zachycuje mikroskopické struktury anamorfního stádia tj. konidiofory a konidie jednotlivých izolátů. Nejmenší konidie mají izoláty VL02 a Mycotal, u nichž také byla zaznamenána nejmenší variabilita ve velikosti konidií. Kulatě elyptoidní konidie, navíc v obou rozměrech největší, má izolát NL02. Izoláty Lat a I9 mají velice variabilní konidie.





Obrázek 4: Fotografie jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium*. A: Lat – mycelium s přesleny; B: Lat - konidie; C: I9 – konidiofor s přesleny; D: I9 - konidie; E: NL02 - konidiofor s přesleny fialidických buněk; F: NL02 - konidie; G: VL02 – konidiofor s přesleny; H: VL02 - konidie; I: Mycotal – konidiofor s přesleny fialidických buněk; J: Mycotal - konidie. Měřítka - 20 μ m.

Tabulka 5: Naměřené hodnoty délky a šířky konidií jednotlivých izolátů. Horní index označuje signifikantní rozdíly v délkách konidií [μ m] i jejich šířkách [μ m] dosažené v Tukeyho HSD post hoc testu. Hodnoty označené stejným indexem se statisticky neliší. „a“ označuje nejvyšší hodnotu. Hodnoty představují průměry z délek a šířek jednotlivých izolátů \pm střední chyba průměru, $p \leq 0,05$.

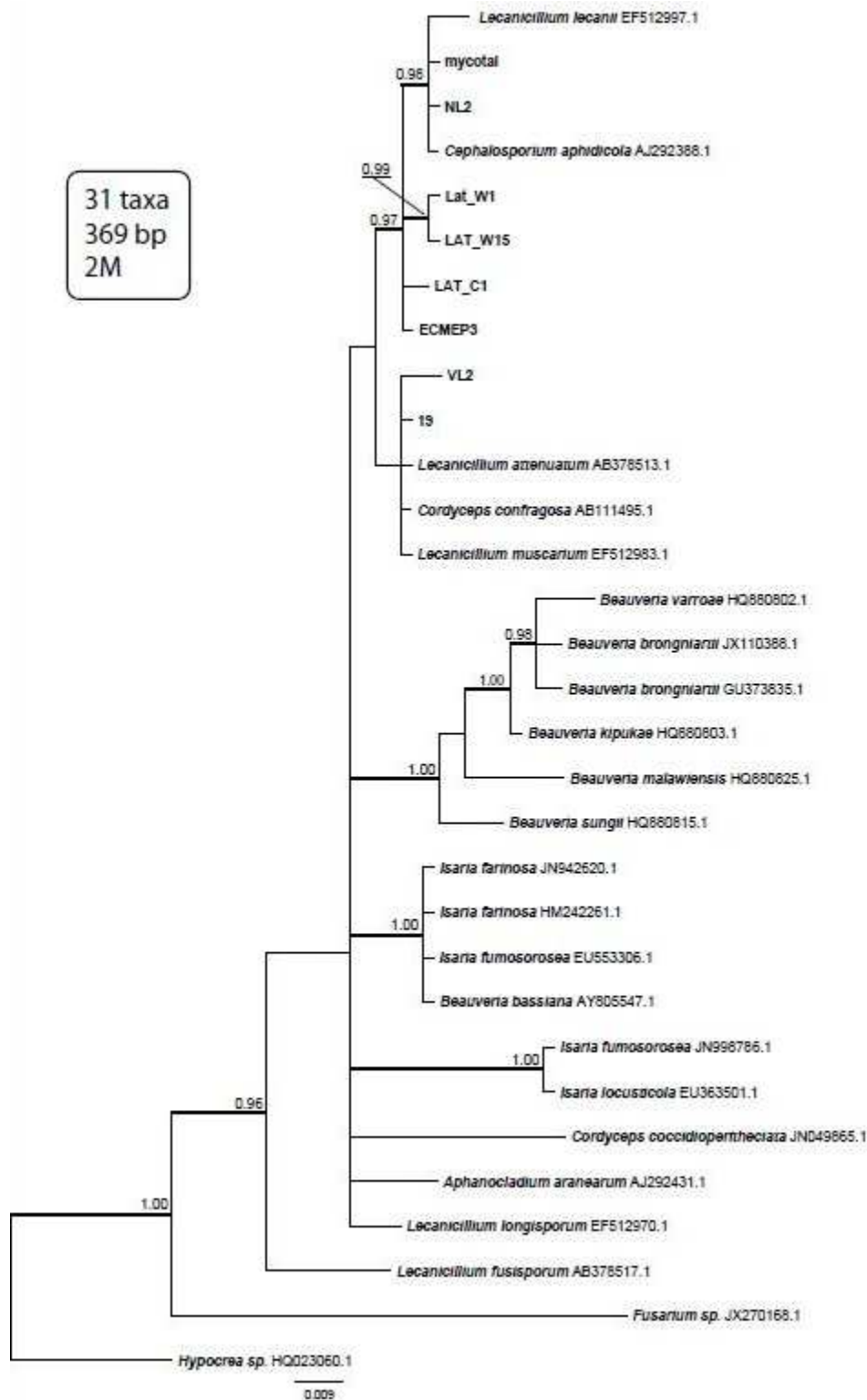
Izolát	Délka konidie (průměr \pm SEM) [μ m]	Šířka konidie (průměr \pm SEM) [μ m]
Lat	4,03 \pm 0,12 ^b	1,60 \pm 0,03 ^c
I9	4,33 \pm 0,11 ^b	1,81 \pm 0,03 ^b
NL02	4,90 \pm 0,10 ^a	2,03 \pm 2,03 ^a
VL02	3,37 \pm 0,05 ^c	1,73 \pm 1,73 ^b
Mycotal	3,24 \pm 0,06 ^c	1,47 \pm 1,46 ^d
ANOVA	$F_{(4; 514)}=52,6; p<0,001$	$F_{(4; 514)}=50,97; p<0,001$

4.2. Molekulární a fylogenetické analýzy

Sekvence získané z Laboratoře genomiky BC AVČR byly zadány do genomové databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a čekají na přidělení identifikačních čísel. Pro identifikaci izolátů byly sekvence použity k prohledání databáze GenBank nástrojem Blastn. Z výsledků hledání byly vybrány nejpodobnější publikované sekvence. Na základě těchto kritérií mohli být tři izoláty rodu *Lecanicillium* zařazeny do druhů *L. cf. lecanii* (Lat) a *L. cf. attenuatum* (I9, VL02). NL02 a Mycotal však vykazovali shodu se sekvencemi anotovanými jako *L. cf. lecanii* a *L. cf. muscarium* (tabulka 6). Proto byl s pomocí dalších 26 ITS sekvencí vybraných z databáze GenBank na základě věrohodnosti zdroje a dosažené identity vytvořen fylogenetický strom, ze kterého je vidět, že našich pět izolátů náleží do rodu *Lecanicillium*. Pro jednoznačné určení jednotlivých druhů a vytvoření dobře podpořené fylogenetické hypotézy by bylo nutné použít více genů, například velkou a malou ribozomální podjednotky 18S a 28S rDNA. Analýza nicméně jednoznačně přiřadila izoláty NL02 a Mycotal do druhu *L. cf. lecanii* (obrázek 5).

Tabulka 6. Výsledky identifikace izolátů dle sekvence ITS.

Izolát	Druh	GenBank ID	Identita	E-hodnota	Citace
NL02	<i>L. lecanii</i>	EF513000	100%	3e-176	Kouvelis a kol. 2008
	<i>L. muscarium</i>	NR_111096	100%	3e-176	Zare a kol. 2000
Mycotal	<i>L. lecanii</i>	EF513000	100%	1e-175	Kouvelis a kol. 2008
	<i>L. muscarium</i>	NR_111096	100%	1e-175	Zare a kol. 2000
Lat	<i>L. lecanii</i>	FJ515771	99%	0,0	Diaz a kol. 2009
I9	<i>L. attenuatum</i>	AB378513	100%	0,0	Sukarno a kol. 2009
VL02	<i>L. attenuatum</i>	AB378513	96%	0,0	Sukarno a kol. 2009



Obrázek. 5: Fylogenetická analýza 26 ITS sekvencí z databáze GenBank, k nimž bylo přiřazeno 5 sekvencí izolátů rodu *Lecanicillium* spp. Fylogenetický strom s 50% většinovým konsenzem pro ITS rDNA byl vytvořen metodou bayesiánské interference v programu Mr Bayes verze 3.1.2. se substitučním modelem GTR+I+G při 2 milionech opakováních. Jako „outgroups“ byly použity sekvence čeledí Nectriaceae a Hypocreaceae. *Vysvětlivky: mycotal=Mycoatal, NL2=NL02, LAT_C1=Lat, VL2=VL02, 19=I9.*

4.3. *In vitro* testy: saprotrófní růst

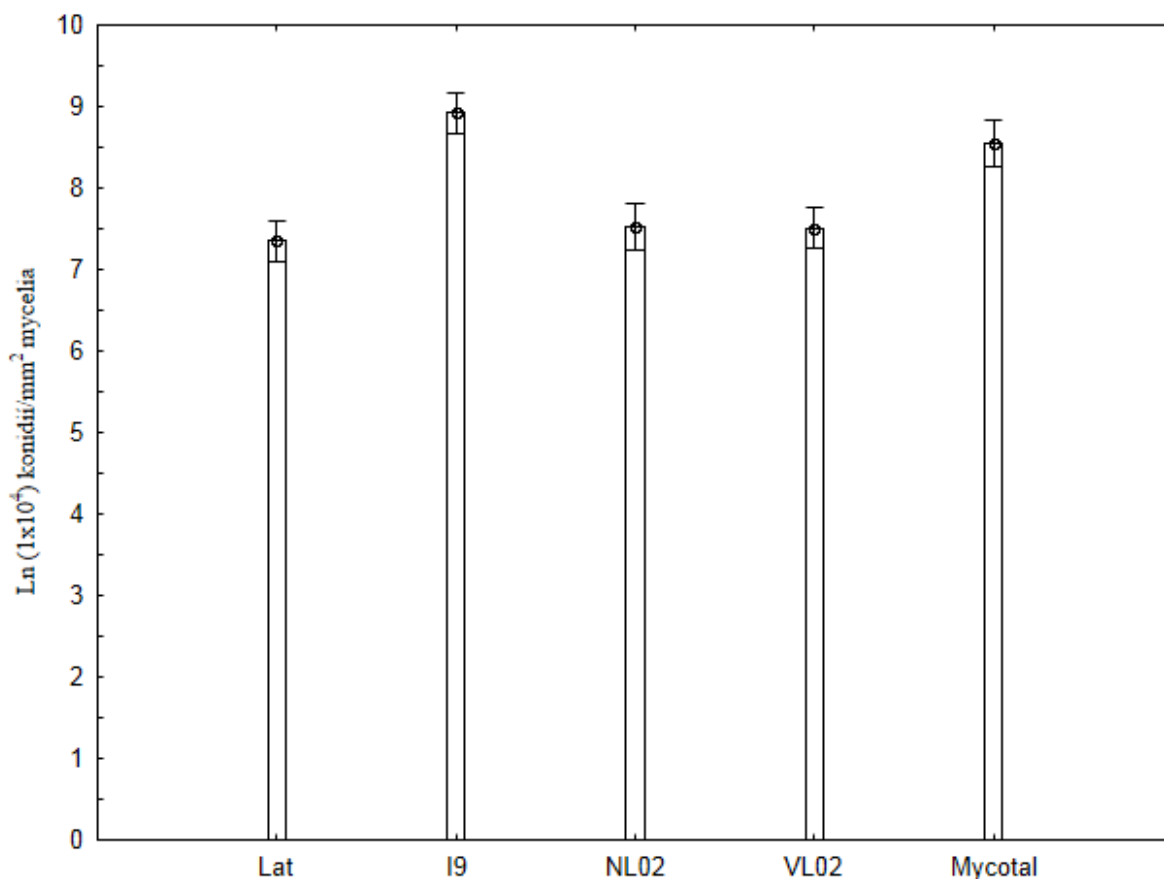
Pomocí dvou *in vitro* testů byl charakterizován saprofytický růst a schopnost tvorby konidií v optimálních podmínkách pěti izolátů rodu *Lecanicillium*. V testu radiálního růstu byl prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi jednotlivými izoláty, vzájemně se nelišily jen izoláty NL02 a VL02. V testu produkce konidií, kdy se koncentrace konidií přepočítaly na milimetr čtvereční kultury, se hodnoty statisticky lišily ve všech případech. Konkrétní výsledky se nacházejí v tabulce 7.

Tabulka 7: Hodnoty radiálního růstu [mm^2] a koncentrace konidií na PDA mediu. Horní index značí signifikantní rozdíly mezi testovanými izoláty. Uvedené hodnoty představují průměry \pm střední chybu průměru.

Kód ve sbírce	Koncentrace konidií/ $\text{mm}^2 \times 10^5$ (\pm SEM)	Radiální růst [mm^2] (\pm SEM)
Lat	6,2 (\pm 0,3) ^c	3616,9 (\pm 22,0) ^a
I9	17,7 (\pm 0,6) ^a	2868,7 (\pm 25,9) ^b
NL02	4,34 (\pm 0,1) ^d	2388,4 (\pm 12,4) ^d
VL02	1,9 (\pm 0,0) ^e	2419,4 (\pm 12,1) ^d
Mycotal	10,3 (\pm 0,4) ^b	2734,9 (\pm 27,3) ^c
ANOVA	$F_{(4,15)}=615,4; p<0,001$	$F_{(4, 65)}=519,9; p<0,001$

4.4. *In vitro* testy: mykoparazitický růst

Mykoparazitický růst byl testován v *in vitro* podmínkách na dvou mykorhizních houbách - muchomůrce červené (*Amanita muscaria*) a čechratce podvinuté (*Paxillus involutus*). Předpokládalo se, že rod *Lecanicillium* kolonizuje mycelium obou ektomykorhizních hub a vysporuluje na něm. V případě čechratky ale ani jeden z izolátů nebyl schopný růstu na jejím myceliu. V případě muchomůrky porostlo *Lecanicillium* ve všech případech kolonie jejího mycelia a docházelo k masivní sporulaci. Z grafu na obrázku 6 je patrné, že nejméně úspěšným izolátem byl I9. Mycotal nebyl signifikantně odlišný od I9, ale ani od izolátu NL02 a VL02. Nejhuře dopadl paradoxně izolát Lat, vyzolovaný z mykorhizní houby *Laccaria laccata*. V tabulce 8 jsou zaznamenány průměry, jejich střední chyba a signifikantní rozdíly mezi testovanými izoláty *Lecanicillium* spp.



Obrázek 6: Parazitická interakce izolátů *Lecanicillium* spp. s myceliem *A. muscaria*. Hodnoty na ose Y představují koncentrace konidií vztaheny na jednotku plochy. Data byla transformována přirozeným logaritmem.

Tabulka 8: Koncentrace konidií vyprodukovaných jednotlivými izoláty rodu *Lecanicillium* na myceliu *A. muscaria*. Data prošla transformací přirozeného logaritmu. Indexové hodnoty označují signifikantní rozdíly mezi hodnotami jednotlivých izolátů, přičemž písmeno „a“ značí izolát s nejvyšší dosaženou koncentrací konidií. ($p < 0,05$).

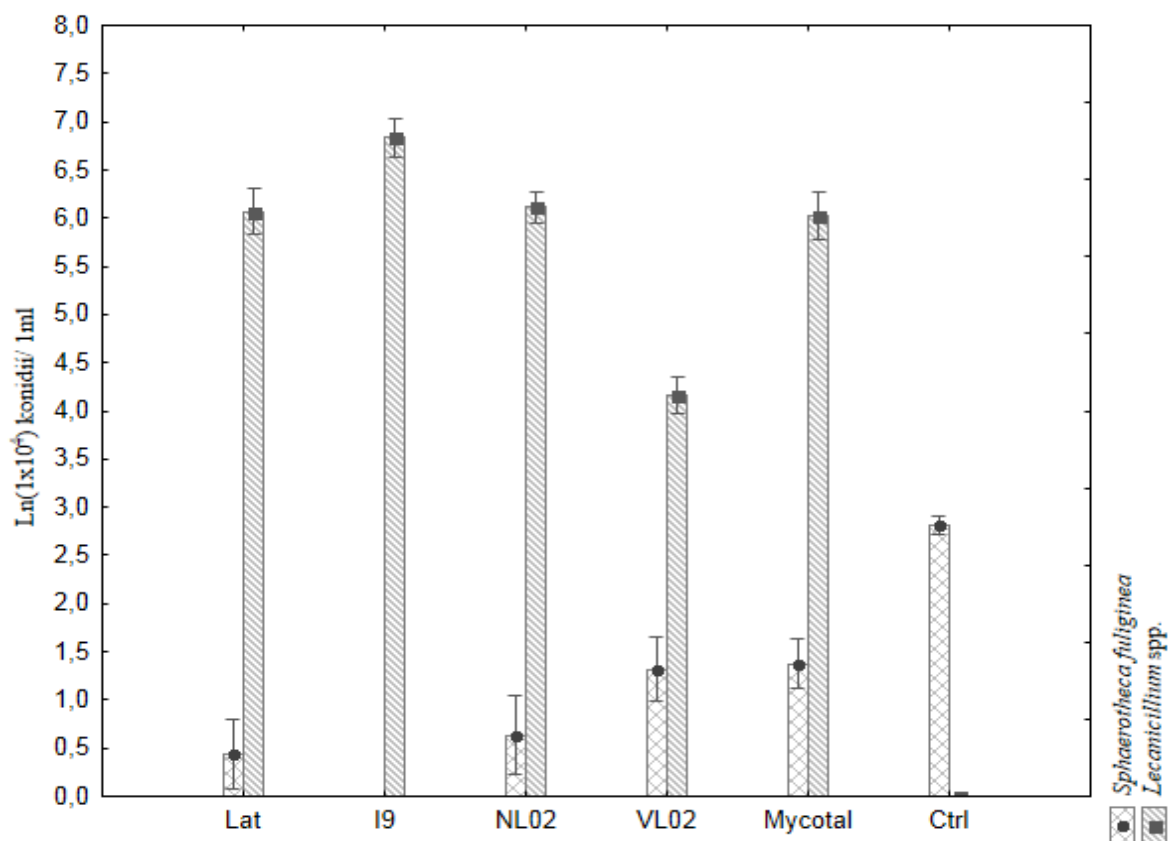
Izolát	Ln (koncentrace konidií/ mm ² x10 ⁴ (±SEM))
Lat	7,4 (±0,3) ^c
I9	8,9 (±0,1) ^a
NL02	7,5 (±0,2) ^{bc}
VL02	7,5 (±0,3) ^{bc}
Mycotal	8,5 (±0,3) ^{abc}
ANOVA	$F_{(4, 41)}=7,5; p<0,001$

4. 5. *In vivo* testy: mykoparazitický efekt

V rámci testů mykoparazitického růstu byly také provedeny *in vivo* experimenty, které probíhaly v tritrofitickém systému okurka setá - padlí okurkové – *Lecanicillium*. Hlavním hodnotícím kritériem byla produkce konidií izolátů *Lecanicillium* spp. a zároveň padlí okurkového (*Sphaerotheca fuliginea*) vyjádřená jejich koncentrací. Protože jsou konidie padlí okurkového téměř 10x větší než konidie produkované rodem *Lecanicillium* spp., jednotlivé izoláty *Lecanicillium* spp. se významně odlišovaly v produkci konidií ve srovnání s negativní kontrolou ($F_{(5, 83)}=98,38$, $p<0,001$). Izolát I9 potlačil produkci konidií padlí okurkového nejvíce a významně se lišil také od efektu přípravku Mycotol. V grafech na obrázcích 7 a 8 jsou zaznamenány koncentrace konidií jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium* a *S. fuliginea* při preventivním a kurativním ošetření rostlin okurek setých.

V případě aplikace *Lecanicillium* spp. před padlím okurkovým, tedy preventivně ve smyslu biologické ochrany, vyprodukoval izolát VL02 signifikantně méně konidií ($F_{(5,84)}=15,22$; $p<0,001$). Naopak izolát I9 sporuloval nejlépe a zároveň téměř potlačil tvorbu konidií rostlinného patogena *S. fuliginea*. Nejvyšší koncentrace konidií *S. fuliginea* byly přirozeně naměřeny v kontrole (Ctrl). Výsledky jsou shrnuté v tabulce 9.

Šíření biotrofního patogena *S. fuliginea* na rostlině vypovídá o životaschopnosti jeho rozmnožovacích partikulí, tj. v tomto případě konidií. Počet listů okurek infikovaných padlím se významně lišil v závislosti na použitém izolátu *Lecanicillium* spp. Celkově mohly být infikovány maximálně 4 listy. První list byl infikován uměle. Na zbylé tři listy se padlí šířilo samostatně. K potlačení šíření infekce došlo pouze v případě izolátu I9, který zřejmě efektivně omezil životnost konidií padlí okurkového. Maximální počet přirozeně infikovaných listů se objevil pouze v případě kontrolní varianty. V případě izolátu Lat, byl infikován maximálně další jeden list a v případě VL02 a NL02 další dva listy.

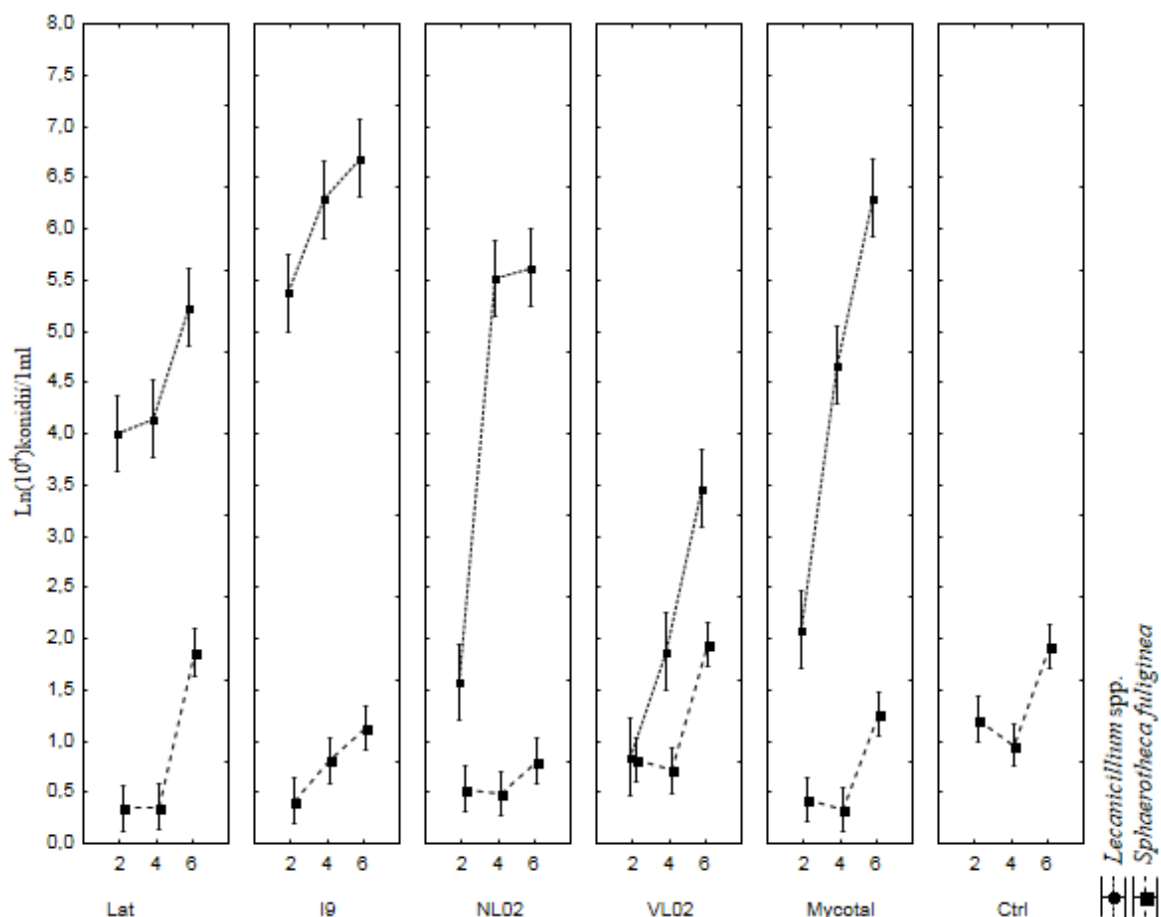


Obrázek 7: Preventivní efekt. Změny v produkci konidií jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium* spp. a *S. fuliginea* 15. den po aplikaci *S. fuliginea*. Hodnoty představují průměr a střední chybu průměru (SEM).

Tabulka 9: Vliv preventivního ošetření izoláty *Lecanicillium* spp. na koncentraci konidií padlí okurkového (*Sphaerotheca fuliginea*) a koncentrace konidií izolátů *Lecanicillium* spp. v ložiscích padlí okurkového. Data byla transformována přirozeným logaritmem. Hodnoty představují průměr a střední chybu průměru (SEM). Horní index označuje signifikantní rozdíly mezi testovanými izoláty. ($p \leq 0,05$).

Izoláty	Koncentrace konidií 1×10^4 v 1 ml suspenze <i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Koncentrace konidií 1×10^4 v 1 ml suspenze <i>Lecanicillium</i> spp.
	Lat	$0,44 \pm 0,02^b$
I9	$0,05 \pm 0,02^b$	$6,83 \pm 0,19^a$
NL	$0,63 \pm 0,02^b$	$6,11 \pm 0,19^{ab}$
VL	$1,31 \pm 0,04^b$	$4,16 \pm 0,19^c$
Mycotal	$1,38 \pm 0,04^b$	$6,02 \pm 0,19^b$
kontrola	$2,82 \pm 0,19^a$	$0,00 \pm 0,19^d$
ANOVA	$F_{(5,83)}=12,31; p<0,001$	$F_{(5,83)}=98,38; p<0,001$

Kurativní efekt izolátů *Lecanicillium* spp. ve smyslu biologické ochrany na rozvoj a šíření padlí okurkového na rostlinách okurek byl hodnocen po 2, 4 a 6 dnech po aplikaci konidiální suspenze jednotlivých izolátů *Lecanicillium* spp. formou postřiku. V případě tohoto způsobu ošetření okurek se tedy také hodnotil průběh infekce *Lecanicillium* spp. Ve všech případech byly naměřené hodnoty koncentrací konidií rodu *Lecanicillium* nejnižší v prvním a nejvyšší v posledním dni měření. Z grafu na obrázku 8 je patrné, že kromě koncentrace konidií izolátů rodu *Lecanicillium* rostly i koncentrace *S. fuliginea*. Izolátem s nejvyšším mykoparazitickým efektem byl I9, který produkoval nejvíce vlastních konidií a také nejlépe potlačoval sporulaci *S. fuliginea*. Vůbec nejnižší produkce konidií *S. fuliginea* byla zaznamenána po aplikaci izolátu NL02. Izolát VL02 naopak vykazoval nejnižší produkci svých konidií a konidií *S. fuliginea* naopak bylo v jeho přítomnosti dokonce více než v kontrole. Lze tedy usuzovat, že mykoparazitický efekt izolátu NL02 je minimální. Výsledky jsou shrnuté v tabulce 11, přičemž výsledky statistických hodnot analýzy variance pro sledované faktory (čas, izolát *Lecanicillium* spp.) jsou uvedeny v tabulce 10. Tyto faktory signifikantně ovlivnily produkci konidií u obou houbových organismů.



Obrázek 8: Změny koncentrací konidií izolátů *Lecanicillium* spp. a *Sphaerotheca fuliginea* v čase při kurativní aplikaci *Lecanicillium* spp. Změny v produkci konidií jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium* ($F_{(5,261)}=70,18$; $p<0,001$) a *Sphaerotheca fuliginea* v průběhu šesti dnů ($F_{(2, 261)}=37,1$; $p<0,001$) po aplikaci jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium* na infikované rostliny okurky seté *S. fuliginea*. Hodnoty na ose Y představují koncentraci konidií v 1ml vody. Data prošla logaritmickou transformací.

Kontrola koncentrací konidií v suspenzi druhý den po aplikaci izolátů *Lecanicillium* spp. ukázala, že izoláty I9 a Lat ve srovnání s NL02, VL02 a přípravkem Mycotal velmi rychle a intenzivně sporulují. Čtvrtý den se sporulace izolátů *Lecanicillium* spp. vyrovnala, ale kmen I9 přesto sporuloval nejintenzivněji. Překvapivě, izolát NL02 sporulaci čtvrtý den významně navýšil, obdobně jako přípravek Mycotal. Vyhodnocení koncentrací spor šestý den experimentu potvrdilo intenzivní sporulaci u jednotlivých izolátů s výjimkou VL02, u kterého byla koncentrace konidií v suspenzi významně nižší ve srovnání s ostatními izoláty. Paralelně s koncentrací konidií izolátů *Lecanicillium* spp. byla ve stejném vzorku hodnocena koncentrace konidií *Sphaerotheca fuliginea*. Koncentrace konidií sice šestý den významně stoupla, což by mohlo naznačovat,

že mykoparazitický efekt izolátů *Lecanicillium* spp. není tak významný, je však nutné vzít v potaz, že (i) intenzivní kolonizací (která s časem vzrůstá) myceliem *Lecanicillium* spp. se konidie padlí intenzivně odlamují a (ii) nedokážeme určit, zda jde o životaschopné konidie z původní kolonie padlí, jejich stáří ani klíčivost. Statistické zhodnocení sledovaných faktorů čas, izolát a izolát vs. čas jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10. Statistické hodnoty pro sledované faktory (čas, izolát *Lecanicillium* spp.) hodnocené v experimentu, kde izoláty *Lecanicillium* spp. byly aplikované na rostliny okurek infikovaných padlím okurkovým. ($p \leq 0,05$)

Faktory	F	p
Čas	$F_{(4, 10)}=51,7$	$p<0,001$
Izolát	$F_{(10, 500)}=38,6$	$p<0,001$
Čas vs. izolát	$F_{(20, 500)}=4,5$	$p<0,001$

Tabulka 11. Rozdíly v koncentraci konidií padlí okurkového a *Lecanicillium* spp. v 1×10^4 v 1 ml suspenze během sledovaného období tj. 2., 4. a 6., den po aplikaci izolátů *Lecanicillium* spp. Data prošla logaritmickou transformací. Horní indexy označují signifikanci dosaženou na základě Tukeyho HSD post hoc testu, přičemž „a“ je nejvyšší hodnota. ($p \leq 0,05$)

Odběr vzorku	Izolát	Koncentrace konidií 1×10^4 v 1 ml suspenze	
		<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	<i>Lecanicillium</i> spp.
2. den	Lat	0,10 ($\pm 0,04$) ^b	17,2 ($\pm 3,6$) ^{ab}
	I9	0,15 ($\pm 0,03$) ^b	33,4 ($\pm 13,0$) ^a
	NL02	0,19 ($\pm 0,04$) ^b	3,9 ($\pm 1,6$) ^b
	VL02	0,27 ($\pm 0,04$) ^b	0,4 ($\pm 0,1$) ^b
	Mycotal	0,19 ($\pm 0,05$) ^b	17,4 ($\pm 6,6$) ^{ab}
	Ctrl	4,46 ($\pm 0,79$) ^a	0 ^b
ANOVA		$F_{(5,84)}=4,5$; $p < 0,001$	$F_{(5,84)}=29,6$; $p < 0,001$
4. den	Lat	0,15 ($\pm 0,07$) ^a	9,9 ($\pm 3,8$) ^c
	I9	0,26 ($\pm 0,07$) ^a	64,0 ($\pm 4,9$) ^a
	NL02	0,16 ($\pm 0,08$) ^a	32,8 ($\pm 6,4$) ^b
	VL02	0,20 ($\pm 0,02$) ^a	3,1 ($\pm 1,0$) ^c
	Mycotal	0,35 ($\pm 0,33$) ^a	32,7 ($\pm 5,1$) ^b
	kontrola	0,30 ($\pm 0,04$) ^a	0 ^c
ANOVA		$F_{(5,84)}=0,26$; $p=0,93$	$F_{(5,84)}=33,6$; $p < 0,001$
6. den	Lat	0,71 ($\pm 0,09$) ^{ab}	33,6 ($\pm 9,6$) ^c
	I9	0,77 ($\pm 0,28$) ^{ab}	110,0 ($\pm 9,6$) ^a
	NL02	0,27 ($\pm 0,07$) ^b	34,2 ($\pm 7,3$) ^c
	VL02	1,30 ($\pm 0,37$) ^a	5,6 ($\pm 0,9$) ^{cd}
	Mycotal	0,53 ($\pm 0,13$) ^{ab}	67,8 ($\pm 10,6$) ^b
	kontrola	1,05 ($\pm 0,19$) ^{ab}	0 ^d
ANOVA		$F_{(5,84)}=2,81$; $p=0,02$	$F_{(5,84)}=29,0$; $p < 0,001$

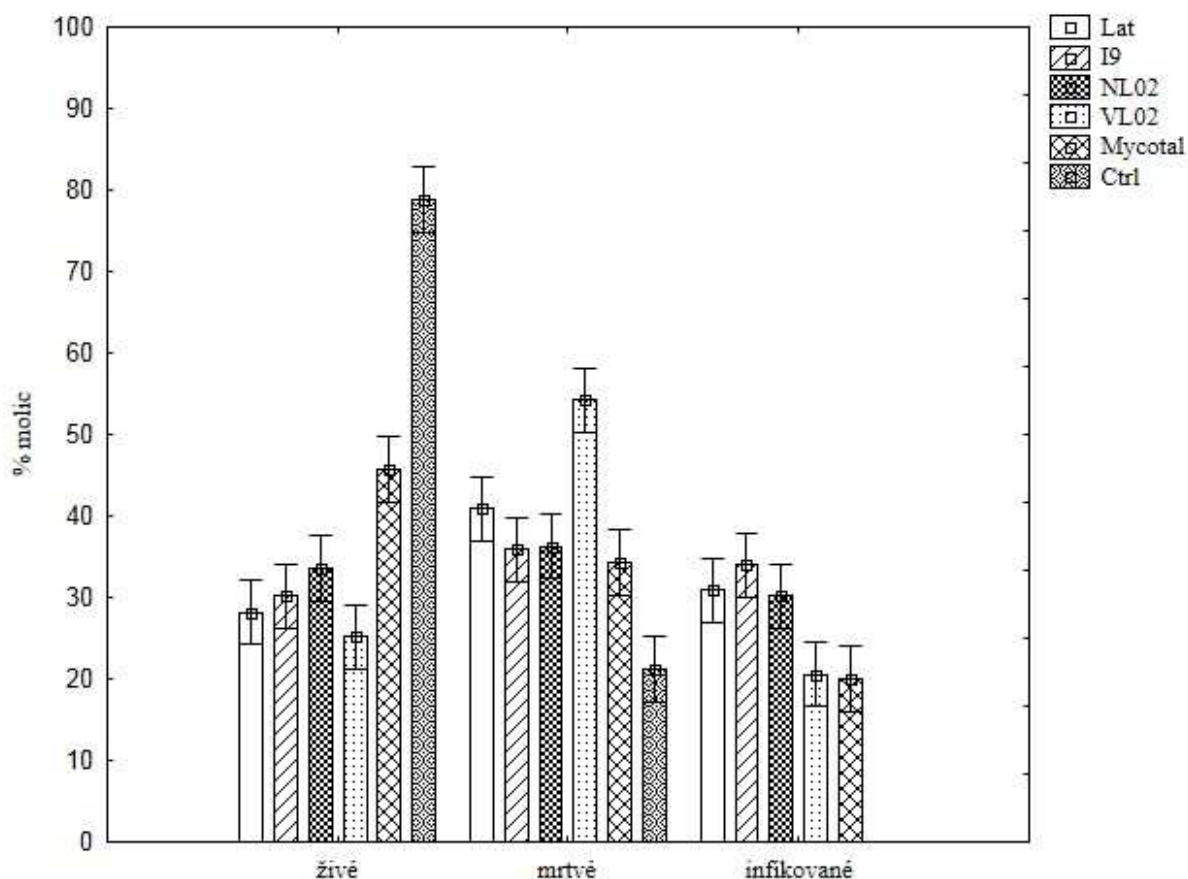
4. 6. *In vivo* testy: Entomopatogenní efekt.

Posledním *in vivo* testem byl test entomopatogenního efektu *Lecanicillium* spp. na molice druhu *Bemisia tabaci*. V tabulce 12 jsou shrnuty základní popisné statistiky jednotlivých izolátů spolu se signifikantními rozdíly mezi efekty jednotlivých izolátů na kumulativní mortalitu molic. Z tabulky vyplývá, že izoláty Lat, I9 a NL02 nemají v rámci kumulativní mortality na molice významně odlišný efekt. Mycotal je signifikantně horší

entomopatogen, než zmíněná trojice a VL02 má naopak lepší entomopatogenní vlastnosti než ostatní izoláty. V grafu na obrázku 9 jsou znázorněny procenta výskytu živých, mrtvých a infikovaných molic. Kategorie „mrtvé“ znamená, že byly molice mrtvé bez známek infekce, to ale neznamená, že nebyly infikované. Kategorie „infikované“ zahrnovala jedince mrtvé nebo živé, ale vždy s jasnou houbovou infekcí na těle. Jen infikované molice jsou zdrojem seknudárních infekcí neparazitovaných molic. Kumulativní mortalita je nejvyšší u izolátu VL02. V kategorii infikovaných nejsou mezi izoláty signifikantní rozdíly.

Tabulka 12: Účinnost jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium* na synchronizovanou populaci *Bemisia tabaci*. Hodnoty jsou průměry z procent živých, mrtvých a infikovaných molic a střední chyba průměru.

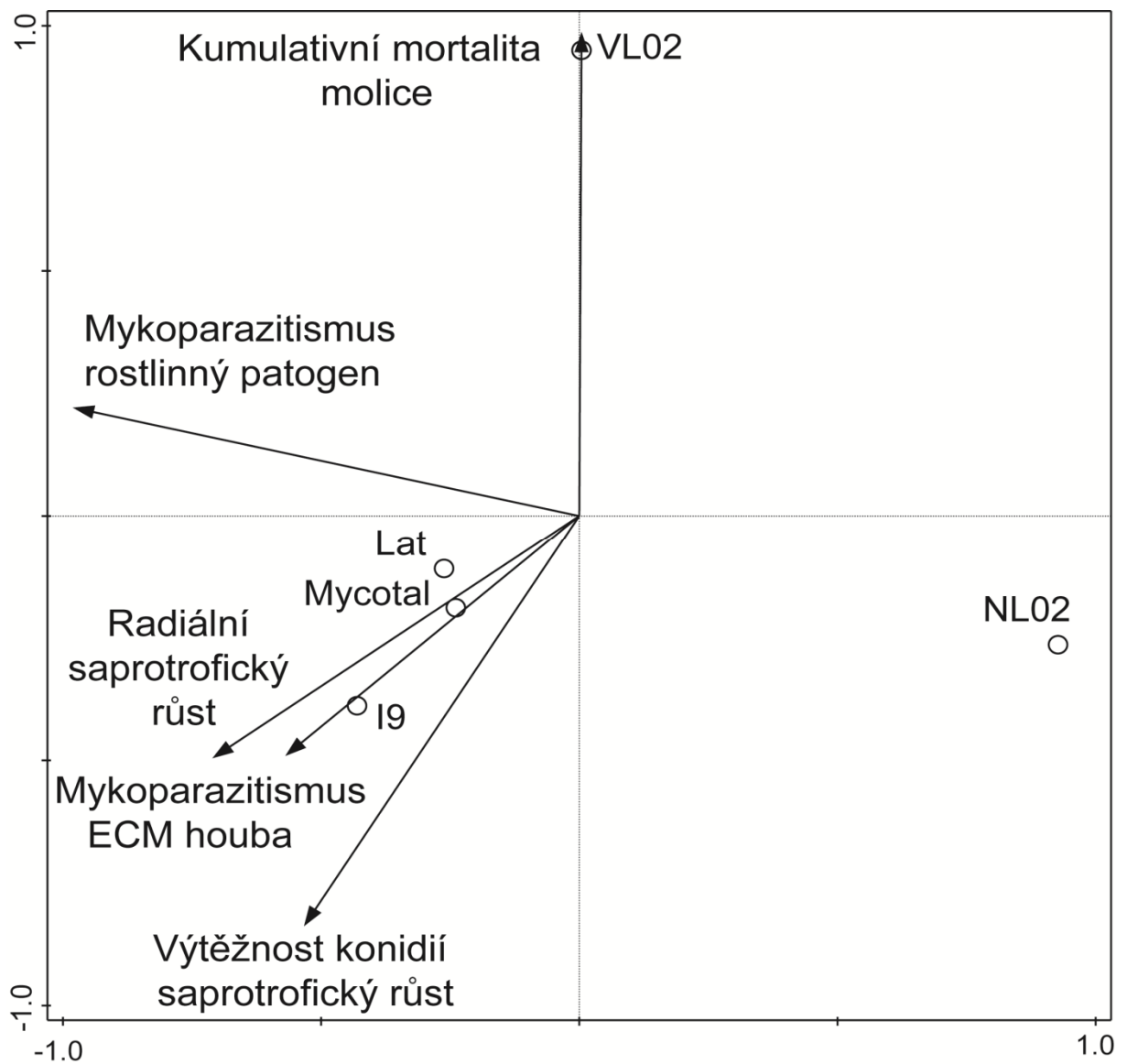
Izolát	Mrtvé (Průměr ±SE)	Infikované (Průměr ± SE)	Kumulativní mortalita % Průměr ± SE
LAT	30,92 (±1,8) ^{ab}	40,92 (±5,3) ^a	71,84(±5,8) ^{ab}
I9	35,86 (±3,56) ^{ab}	34,01 (±3,44) ^a	69,87 (±3,32) ^{ab}
NL02	36,26 (±4,00) ^{ab}	30,14 (±4,63) ^a	66,40 (±2,63) ^{ab}
VL02	54,23 (±7,59) ^a	20,59 (±3,94) ^a	74,81 (±4,07) ^a
Mycotal	34,29 (±3,32) ^{ab}	20,01 (±0,70) ^a	54,30 (±3,93) ^b
Ctrl	21,18 (±3,21) ^b	0,00 ^b	21,18 (±3,21) ^c
ANOVA	F _(5,12) = 5,06 p=0,01	F _(5,12) =17,72 p<0,001	F _(5,12) = 26,17 p<0,001



Obrázek 9: Účinnost jednotlivých entomopatogenních hub rodu *Lecanicillium* na synchronizovanou populaci *Bemisia tabaci*. Na ose Y jsou vyobrazena procentuální zastoupení jednotlivých kategorií molic. Mezi izoláty byly signifikantní rozdíly ($F_{(5,12)} = 23.204$; $p < 0.001$), ($p \leq 0.05$).

4.7. PCA analýza

Ke shrnutí výsledků a určení oblastí, ve kterých jsou jednotlivé kmeny nejefektivnější, byl vytvořen graf PCA (Obrázek 10). Z grafu je patrné, že jsou spolu proměnné „výťažnost konidií“, „mykoparazitismus na ektomykorhizní (ECM) houbě“ a „saprotrofní růst“ pozitivně korelovány. „Kumulativní mortalita molic“ je od těchto tří proměnných korelována negativně. Dále z něj také vyplývá, že izoláty Lat, I9 a Mycotal mají skvělé vlastnosti radiálního růstu a I9 a Mycotal nejlépe kolonizují mycelium ektomykorhizní houby. VL02 byl nejefektivnější, co se týče kumulativní mortality molic. NL02 je izolát, který byl v porovnání s ostatními nejméně efektivní, a v některých případech se jeho účinky nelišily od kontroly.



Obrázek 10. Analýza PCA s vyobrazením pěti izolátů rodu *Lecanicillium* a jejich vztahů k pěti ekologickým funkcím, na něž byly testovány. 1. osa vysvětluje 73,82 % variability, 1.a 2. osa vysvětlují dohromady 95,98 % variability.

5. Diskuze

Tato práce porovnává příbuznost, morfologickou variabilitu a saprotrofní a patogenní vlastnosti pěti izolátů rodu *Lecanicillium* spp. Izoláty VL02 a NL02 byly získány z puklic a I9 z lýkožrouta smrkového. Mycotal je holandský komerční preparát používaný k hubení molice a třásněnek. Lat je izolát rodu *Lecanicillium*, který byl vůbec poprvé nalezen na myceliu ektomykorhozní houby, konkrétně lakovky lakové (*Laccaria laccata*: Agaricales: Basidiomycota). Zatímco VL02 pochází z Floridy, všechny ostatní izoláty jsou evropského původu. Mnozí autoři ukázali, že se izoláty stejného druhu/ rodu izolované z různých organismů chovají jinak (Brodeur 2012, Rojas a kol. 2013, Xiang a kol. 2013). Cílem této práce bylo zjistit, zda je tomu tak též v případě rodu *Lecanicillium* a zda původ izolátu souvisí s jeho morfologickými a fyziologickými vlastnostmi.

5.1. Taxonomie

Jedním z cílů práce byla identifikace všech izolátů (Lat, I9, NL02, VL02 a Mycotal) pomocí tzv. "barcodingu" (viz kapitola 1.1.) Za tímto účelem byly použity vnitřní prepisované mezerníky (ITS; Internal Transcribed Spacer) včetně genu pro 5.8S ribozomální RNA (ITS-1, 5.8S rDNA a ITS-2) (White a kol. 1990). Jde o sekvenci, která vykazuje vysokou variabilitu, a tak velice dobře odhaluje druhovou biodiverzitu. Na základě prohledání databáze GenBank a fylogenetické analýzy provedené v rámci této studie (Obrázek 5) bylo možné izoláty přiřadit k druhům *L. cf. lecanii* a *L. cf. attenuatum*, a to včetně izolátu Mycotal, o němž holandská společnost Koppert Biological Systems (2012) uvádí, že jde o druh *L. muscarium*. Tento údaj přebírá většina prací (Cuthbertson a Walters 2005, Goettel 2008). Fargues a kol. (2003) však na základě osobní komunikace s R. A. Hallem uvádějí, že Mycotal je anglický izolát *L. lecanii* (kmen KV01) izolovaný z molice skleníkové, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae).

Příklad Mycotalu tak představuje typický problém s určováním mitosporických hub, které jsou si často podobné jak morfologicky, tak i fyziologicky, což značně komplikuje jejich správné taxonomické zařazení (Sugimoto a kol. 2003, Sung a kol. 2007b, Goettel a kol. 2008). Až nástup přesnějších molekulárních metod umožnil jasnější vymezení jednotlivých druhů. Jak bylo výše zmíněno, pro determinaci hub se stále častěji využívá tzv. barcoding. I tato metoda má však mnoho omezení. Prvním takovým je nutnost srovnání sekvencí s databázemi. Kupříkladu veřejná databáze GenBank – jedna z největších a nejpoužívanějších databází – může obsahovat chyby vzniklé například špatnou determinací

druhů hub či záměnou vzorků a má stále značně omezené taxonomické pokrytí, jelikož obsahuje necelé jedno procento z celkové biodiverzity hub (které je 1,6 - 5 milionů hub; Hawksworth 2004). Velkým problémem je také vnitrodruhová variabilita, která se liší u různých skupin hub (Nilsson a kol. 2008). Oborník a kol. (2000) ukázali na příkladu rodu *Paecilomyces* a *Aschersonia*, že genetická variabilita roste od specialistů ke generalistům. Rod *Paecilomyces* má kosmopolitní rozšíření, širokou škálu hostitelů (Insecta a Acari) a velkou produkci prašných konidií, na rozdíl od rodu *Aschersonia*, který má areál omezen pouze na tropy a subtropy, je více hostitelsky specifický (Aleyrodidae nebo Coccidae) a jeho disperzním mechanismem je speciální případ zoochorie, kdy nakažený jedinec porostlý myceliem s pyknidami obsahujícími mucigenní konidie kontaktem infikuje zdravé jedince.

5.2. Morfologické a saprotrofní vlastnosti

Morfologické vlastnosti jsou jedním z poznávacích znaků jednotlivých druhů. Mnohé studie ukazují na skutečnost, že se různé izoláty jednotlivých druhů/ rodů hub z řádu Hypocreales liší ve svých makro- i mikroskopických morfologických znacích (Kryukow a kol. 2010, Ward 2011), což tato studie potvrzuje. Rehner a Buckley (2005) ukázali na izolátech druhu *Beauveria bassiana*, že se morfologie jejich konidií liší podle geografického areálu jednotlivých izolátů. Ukázali také, že jsou si jednotlivé izoláty fylogeneticky příbuznější v rámci geografického areálu než podle svého hostitele. V případě zde studovaných izolátů rodu *Lecanicillium* je tomu, zdá se, naopak. Na základě makroskopických morfologických vlastností jsou si nejpodobnější izoláty VL02 a NL02, které sice dle ITS sekvencí patří do jiných druhů (Obrázek 5), ale mají společný hostitelský organismus (tabulka 2). Na základě velikosti a tvaru konidií můžeme pak izoláty rozdělit do tří skupin: (i) VL02 a Mycotal, které mají malé válcovité konidie (~3,30 μ m), (ii) Lat a I9 se středně velkými válcovitými extrémně variabilními konidiemi (~4,15 μ m) a (iii) NL02, který má největší elipsoidně kulaté konidie (~4,90 μ m). V tomto ohledu nejsou mezi morfologickými izoláty žádné vztahy.

Schopnosti růstu a produkce mycelia testované *in vitro* na umělém mediu vypovídají o saprotrofních vlastnostech tohoto organismu a ukazují, jak patogenní houba přežívá v definovaném prostředí (např. v půdě). Vlastnosti izolátů jako je produkce konidií, tvorba mycelia, popřípadě klíčivost konidií může být ukazatelem virulence jednotlivých izolátů (Rivas a kol. 2014). Fyzikální vlastnosti prostředí, v němž se houby vyskytují

(teplota či vlhkost) ovlivňují jejich fyziologické vlastnosti (Wraight a kol. 2000). V rámci řádu Hypocreales, skupiny Clavicipitaceae C byly studované saprotrofní a patogenní vlastnosti rodů *Lecanicillium*, *Isaria*, *Beauveria* a *Simplicillium* (Fargues a kol. 1997, Aiuchi a kol. 2008, Kim a kol. 2010, Kryukow a kol. 2010, Terrefa a Pringle 2003, Ward 2011, Cabanillas a Jones 2013). V testech saprotrofních vlastností se ve většině případů sledovalo, jak jednotlivé izoláty reagují na různé teploty. Aiuchi a kol. (2008) se zabývali saprotrofními vlastnostmi druhu *Verticillium lecanii* (syn. *Lecanicillium* spp. dle Zare a Gams 2001). Sledovali, jak izoláty druhu *V. lecanii* reagují svým radiálním růstem na teploty 5-35°C. Ukázalo se, že teplotní optimum pro izoláty *V. lecanii* bylo 20°-25°C a teploty 5 a 30°C pro ně představují mezní hodnoty. Barbosa a kol. (2002) studovali, jak se liší radiální růst a výtěžnost konidií druhu *V. lecanii* na několika nejznámějších živných médiích, přičemž zjistili, že tento druh roste nejlépe na živné půdě PDA. V této studii jsme tedy izoláty rodu *Lecanicillium* ke studiu radiálního růstu a výtěžnosti konidií kultury pěstovali v optimálních podmínkách – tj. na PDA a v 25°C. Naše výsledky ukazují, že testované izoláty *Lecanicillium* se na živné půdě chovají odlišně. Zajímavé je, že se od sebe v hodnotách radiálního růstu nelišily pouze dva izoláty, a to NL02 a VL02 získané z puklic (tabulka 7). Tyto dva izoláty měly zároveň i nejnižší, byť signifikantně odlišné, výtěžnosti konidií. Právě produkce konidií má podle mnohých autorů korelovat s virulencí izolátu (Rivas a kol. 2014, Wraight a kol. 2000). Ostatní izoláty se od sebe ve schopnosti růstu kolonie a výtěžnosti signifikantně lišily, přičemž nejlépe tvořil mycelium izolát Lat vyzolovaný z ektomykorhizní houby a nejvíce konidií produkoval I9 izolovaný z lýkožrouta.

5.3. Mykoparazitismus a entomopatogenní efekt

Rod *Lecanicillium* je známý svými mykoparazitickými vlastnostmi. Dokáže kolonizovat rzi (Jackson a kol. 2012), padlí (Kim a kol. 2007), mitosporické houby z čeledi Eurotiales (Benhamou a Brodeur 2000), ektomykorhizní špičky kořenů rostlin (Tedersoo a kol. 2009) či plodnice saprotrofních hub (Berendsen a kol. 2010, Piasecka a kol. 2011). Mnoho odborných prací se zabývá patogenitou *Lecanicillium* spp. vůči padlí okurkovému *Sphaerotheca fuliginea* (Verhaar a kol. 1999, Kim a kol. 2007, Goettel a kol. 2008). V této práci bylo padlí okurkové použito k vyhodnocení mykoparazitických vlastností studovaných izolátů, které byly použity k preventivnímu i kurativnímu ošetření rostlin. Byl hodnocen jak počet konidií izolátů rodu *Lecanicillium*, tak i počet konidií *S. fuliginea*. Verhaar a kol. 1997 v *in vivo* testech jediného izolátu probíhajících na listech v Petriho miskách ukázali, že rod

Lecanicillium dokáže růst saprotrofně a žít se pouze exudáty vyloučenými rostlinou. Dále také prezentovali výsledky preventivního a kurativního ošetření rostlin, kdy počítal procentuální pokrytí listu infekcí *S. fuliginea*. Z jeho výsledků je zřejmé, že aplikace *Lecanicillium* jako mykoparazita je vhodnější pro preventivní ošetření rostlin. Kim a kol. 2007 se zabývali kurativním efektem šesti izolátů rodu *Lecanicillium* na infekci *S. fuliginea* při ošetření rostlin 8., 11. a 15. den po aplikaci *S. fuliginea*. Jejich výsledky ukazují, že počty konidií *S. fuliginea* klesají s přibývajícím dnem po aplikaci izolátů rodu *Lecanicillium*. V našem experimentu při kurativní metodě ošetření však počty konidií padlí okurkového rostou. Není však možné určit životaschopnost a klíčivost těchto konidií. Proto jsme tedy „vyšší mykopatogenity“ stanovili jako počet konidií vyprodukovaných jednotlivými izoláty vztahenými na plochu listu. Jako nejvhodnější izolát k parazitaci *Sphaerotheca fuliginea* byl touto metodou vyhodnocen izolát I9 z kůrovce při preventivním použití. Má nejen nejvyšší výtěžnost konidií na plochu listu infikovaného padlím okurkovým, ale také nejlépe potlačuje sporulaci *S. fuliginea*.

V této práci se díky izolátu Lat také poprvé testovalo, jak úspěšně jednotlivé izoláty kolonizují mycelium ektomykorhizní houby. Rod *Lecanicillium* patří mezi nejhojnější houby spojované s prostředím kořenových špiček v půdě a jejich parazitací (Tedersoo a kol. 2009). V prvním testu byly ke kultuře muchomůrky červené *Amanita muscaria* a čechratky podvinuté *Paxillus involutus* přidány tři kapky jednoho izolátu. V tomto testu nebyly izoláty schopné kolonizovat mycelium *P. involutus*. V předešlých studiích se zjistilo, že tato ektomykorhizní houba z řádu Boletales, produkuje antimykotické sloučeniny (oxalovou kyselinu společně s fenolickými látkami), díky nimž chrání svou symbiotickou rostlinu před mykopatogeny, jakými je například druh *Fusarium oxysporum* (Duchesne a kol. 1989) a *Rhizoctonia solani* (Yamaji a kol. 2005). Zároveň byl antimykotický efekt potvrzen i v *in vitro* experimentech na MMN agaru. Dosud nebyla publikovaná práce o antimykotických účincích rodu *Paxillus* vůči mykoparazitickým houbám rodu *Lecanicillium* ani jiným zástupcům řádu Hypocreales. Přestože bylo dokázáno, že i rod *Amanita* dokáže syntetizovat antimykotické látky, jako například hydroxypyrrolidon v případě *A. muscaria* (Michelot a Melendez - Howell 2003) nebo cyklopropylalanin u *A. virginoides* (Ohta a kol. 1986), všechny izoláty rodu *Lecanicillium* spp. byly schopné kolonizovat mycelium *A. muscaria*.

Analýza hlavních komponent ukazuje pozitivní korelaci (Obrázek 10) mezi radiálním růstem, výtežností konidií a mykoparazitismem na ektomykorhizní houbě. Je zde vytvořena posloupnost od vlastností saprotrofního a mykoparazitického růstu k entomopatogenním vlastnostem. Z grafu je také zřetelné, že izoláty I9, Lat a Mycotal jsou víceméně úspěšnými izoláty, co se týče mykoparazitismu a saprotrofních vlastností. Otázkou zůstává, proč je s těmito vlastnostmi negativně korelovaná mortalita mšic. Jedním z vysvětlení by mohlo být to, že úspěšné entomopatogenní houby musí mít dobře vyvinutá obě stádia dimorfismu, tj. vláknitou i kvasinkovou formu života tohoto organismu. Tyto předpoklady by mohl splňovat vysoce entomopatogenní izolát VL02. Mykoparazitické houby umí také řízeně růst k hyfám svého hostitele. Na základě našich výsledků se zdá, že nejrychlejší řízený růst mají izoláty produkující velké množství konidií (jak v experimentu s *S. fuliginea*, tak s *A. muscaria* produkoval nejvíce konidií izolát I9). Dalším důvodem může být mechanismus, jakým hyfy napadají svého hostitele. V případě parazitace hub rod *Lecanicillium* omotává jejich mycelia a konidie svými hyfami. U entomopatogenního účinku však musí proniknout přes integumenty do hemolymfy hmyzu, kde se chovají jako kvasinkovitá tělíška, množí se dělením a kolonizují vnitřní orgány hmyzu. Až po jeho smrti z fáze parazitické přepínají na fázi saprofytickou, kdy porůstají mrtvé hmyzí tělo vláknitým vzdušným myceliem produkujícím konidie.

Lecanicillium je houba, které se ideálně daří v prostředí s ohniskovým výskytem svého hostitele. Mnozí autoři se proto zabývají jeho kolonizací žampionu *Agaricus bisporus* (Agaricales: Agaricaceae) v komerčních pěstírnách, kde je tato houba velkým problémem (Berendsen a kol. 2010). Na druhé straně je tato jeho vlastnost vyzdvihována jinými odborníky, kteří v ní vidí potenciální biokontrolní agens (Verhaar a kol. 1997, Kim a kol. 2007). Protože se rod *Lecanicillium* spp. komerčně využívá coby dostupné biokontrolní agens proti bezobratlým škůdcům (tabulka 1), někteří autoři uvažují, že by tento rod mohl chránit jednu plodinu před dvěma škodlivými organismy zároveň, tj. proti hmyzím škůdcům a biotrofním houbovým organismům (Kim a kol. 2007, Goettel a kol. 2008).

Rod *Lecanicillium* není jediným rodem v čeledi Clavicipitaceae, u něhož byla zjištěna mykoparazitická aktivita současně s entomopatogenní (tzv. duální efekt). Dalšími rody jsou např. *Beauveria* a *Peecilomyces* (Ownley a kol. 2004, Kavková a Čurn 2005, Kim a kol. 2007, Ownley a kol. 2008). *B. bassiana* je houba pověstná svojí širokou hostitelskou specifitou a svými chitinolytickými vlastnostmi. V přírodě snižuje populace hmyzu, ale také

houbových organismů. Díky svým entomopatogenním vlastnostem je součástí mnohých biopřípravků hubících škůdce, především hmyz, ale také roztoče (De Faria a Wraight 2007). Z hub byla vykultivovaná nejen z fytopatogenních makromycet – například běžně kolonizuje václavku *Armillaria mellea*, ale také mikromycety *Botrytis cinerea*, *Septoria nodorum* nebo dokonce zástupce vlastního řádu Hypocreales, *Fusarium oxysporum*. Veselý a Koubová (1994) prokázali, že inhibuje myceliární růst fakultativních rostlinných patogenů jako je *Rhizoctonia solani* a stramenopilní oomyceta *Phytophthora solani*.

Testy, jež definují entomopatogenní vlastnosti byly prováděny na pupáriích molice *Bemisia tabaci* vystaveným působení jednotlivých izolátů. Stav pupárií se po aplikaci izolátů kategorizoval do skupin živé, infikované a mrtvé, přičemž součet infikovaných a mrtvých vypovídá o tzv. kumulativní mortalitě. Protože i v kontrole (ošetřené pouze vodou) dochází k přirozené mortalitě molic, ukázalo se, že se v testu kumulativní mortality izolát NL02 izolovaný z puklic překvapivě průkazně neliší od kontroly. Nejvyšší kumulativní mortalitu vyvolával izolát VL02, který byl také izolovaný z puklic. Při vyhodnocování entomopatogenních vlastností je důležité se zaměřit na samotnou složku infikovaných, protože jen infikovaná pupária jsou zdrojem sekundární infekce. Počty infikovaných pupárií se u jednotlivých izolátů statisticky nelišily. Cuthbertson a Walters (2005) testovali izolát Mycotal na molici *Bemisia tabaci*, použili tedy stejný izolát rodu *Lecanicillium* i stejného hostitele. V jejich experimentech po sedmi dnech od ošetření okurek napadených molicemi suspenzí Mycotalu dosahuje mortalita molic na živné rostlině 81%. V našem experimentu však Mycotal usmrtil pouze 54% molic, což je vůbec nejhorší výsledek ze všech studovaných izolátů. Rozdíly ve výsledcích mohou souviset s tím, že dle posledních studií patří *Bemisia tabaci* do agregátu minimálně 28 morfologicky nerozlišených druhů (Shu-Sheng a kol. 2012). Kim a kol. (2007) ukázali, že v testech entomopatogenních vlastností záleží na zvolených druzích, proti kterým jsou jednotlivé izoláty testovány. Zmínění autoři testovali tři izoláty rodu *Lecanicillium* na třech druzích mšic a ukázali, že ačkoliv jsou si hostitelé blízce příbuzní, virulence jednotlivých patogenních hub se v rámci testů u jednotlivých druhů mšic liší.

5.4. Závěr

Testování komplexních vlastností izolátů hub používaných v biologické ochraně rostlin spojuje několi vědních oborů a vyžaduje interdisciplinární přístup. Testování izolátů *in vitro* odhaluje jejich variabilní vlastnosti v definovaných podmínkách, ale jejich chování v přirozených ekosystémech je pravděpodobně odlišné a nedá se nijak nasimulovat. Tritrofické testy, rostlina – hmyz - aplikovaný izolát, nebo rostlina – houba - aplikovaný izolát se blíží přirozeným podmínkám, ale stále jde o modifikované systémy. Nicméně tím, že se důsledně propojí *in vitro* a *in vivo* testy, lze získat komplexní výsledky, které v jiných studiích chybí (Kim a kol. 2007) a které vypovídají o specifičnosti jednotlivých izolátů rodu *Lecanicillium*.

V této studii byly izoláty dosaženy následující výsledky:

- Izoláty Lat, NL02 a Mycotal dle ITS sekvencí náležejí do *Lecanicillium cf. lecanii*, VL02 a I9 do okruhu druhu *L. cf. attenuatum*.
- Velikost konidií se u jednotlivých izolátů liší, stejně tak intenzita jejich produkce (na plochu nebo v 1 ml suspenze): Nejvyšší produkce byla naměřena u I9, nejnižší u NL02, přičemž největší konidie má VL02 a nejmenší Mycotal.
- Nejeфекtivněji kolonizoval biotrofního houbového patogena (*Sphaerotheca fuliginea*) kmen I9 a následně LAT, nejhorší byl VL02.
- Na myceliu ektomykorhizního druhu *Amanita muscaria in vitro* intenzivně parazitoval kmen I9, na druhu *Paxillus involutus* žádný. Tyto poznatky jsou nové a originální, protože doposavad nebyly mykoparazitické vlastnosti hub testovány na myceliích ECM hub.
- V rámci entomopatogenních vlastností - kumulativní mortality - byl vyhodnocen nejlepším izolátem VL02. V kategorii „infikované“ se od sebe však jednotlivé izoláty nelišily.
- Vlastnosti izolátů, jako saprofytický růst *in vitro*, výtěžnost konidií a parazitismus na ECM druhu houby „*in vitro*“ jsou spolu pozitivně korelované. Ve všech sledovaných vlastnostech byl nejlepší izolát I9 vyizolovaný z *Ips typhographus*. Vyjímkou byla proměnná „radiální růst *in vitro*“, který byl nejrychlejší u izolátu Lat – vyizolovaný z ektomykorhizní houby.

6. Literatura

- Aiuchi A, Baba J, Inami K, Shinya R, Tani M, Koike M (2008): Variation in growth at different temperatures and production and size of conidia in hybrid strains of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Applied Entomology and Zoology*. 43: 427-436.
- Ansari MA, Pope EC, Carpenter S, Scholte E-J, Butt TM (2011): Entomopathogenic fungus as a biological control for an important vector of livestock disease: The culicoides biting midge. *PLoS ONE*. 6: e16108.
- Askary H, Benhamou N, Brodeur J (1997): Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Biochemistry and Cell Biology*. 87: 359-368.
- Barbosa CC, Monteiro AC, Correia ADB, Pereira GT (2002): Growth and sporulation of *Verticillium lecanii* isolates under different nutritional conditions. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 37: 821-829.
- Benhamou, N., Brodeur, J. (2000): Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold. *Phytopathology*. 90, 932–943.
- Berendsen RL, Baars JJP, Kalkhove SIC, Lugones LG, Wosten HAB, Bakker PAHM (2010): *Lecanicillium fungicola*: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. *Molecular Plant Pathology*. 11: 585-595.
- Brodeur J. (2012): Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evolutionary Applications*. 5: 470–480.
- Butt TM, Goettel MS (2000): Bioassays of entomogenous fungi. In: Navon A, Ascher KRS (Eds): Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes, *CABI Publishing*. Oxon, UK. pp 141-195.
- Butt TM, Jackson C, Magan N (2001): Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. *CABI Publishing*. Oxon, UK. pp 390.
- Cabanillas HE, Jones WA (2013): Pathogenicity of *Isaria poprawskii* (Ascomycota: Hypocreales: Cordycipitaceae) against the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca*

vitripennis (Hemiptera: Cicadellidae), under laboratory conditions. *Crop Protection*. 50: 46 – 52.

- Callan BE, Carris LM (2004): Fungi on living in plant substrata, including fruits. *In*: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (Eds): Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods. *Elsevier Academic Press*. Burlington, USA. pp 105-126.
- Carsolio C, Banhamou N, Haran S, Cortés C, Gutiérrez A, Chet I, Estrella AH (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* Endochitinase Gene, *ech42*, in Mycoparasitism. *Applied Environmental Microbiology*. 65:929-935.
- Cock MJW, van Lenteren JC, Brodeur J, Barratt BIP, Bigler F, Bolckmans K, Consoli FL, Haas F, Mason PG, Parra JRP (2010): Do new access and benefit sharing procedures under the convention on biological diversity threaten the future of biological control? *BioControl*. 55:199–218.
- Cuthbertson AGS, Walters KFA (2005): Pathogenicity of the entomopathogenic fungus, *Lecanicillium muscarium*, against the sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* under laboratory and glasshouse conditions. *Mycopathologia*. 160: 315-319.
- De Faria MR, Wraight SP (2007): Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43: 237–256.
- Diaz BM, Oggerin M, Lopez Lastra CC, Rubio V, Fereres A (2009): Characterization and virulence of *Lecanicillium lecanii* against different aphid species. *BioControl*. 54: 825-835.
- Duchesne LC, Peterson RL, Ellis BE (1989): The time-course of disease suppression and antibiosis by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist*. 111: 693–698.
- Fargues J, Goettel MS, Smits N, Ouedraogo A, Rougier M (1997): Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*. 89: 383 - 392.
- Fargues J, Vidal C, Smits N, Rougier M, Boulard T, Mermier M, Nicot P, Reich P, Jeannequin B, Ridray G, Lagier J (2003): Climatic factors on entomopathogenic

- hyphomycetes infection of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) in Mediterranean glasshouse tomato. *Biological Control*. 28: 320–331.
- Feng K-C, Lui B-L, Tzeng Y-M (2002): Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18: 217–224.
- Gams, W (1971): *Cephalosporium-artige* Schimmelpilze (Hyphomycetes). G. Fischer Verlag. Stuttgart, DE. pp 262.
- Gams W, Zare R (2001): A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. *Nova Hedwigia*. 72: 329-337.
- Gardes M, Bruns TD (1993): ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-- application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*. 2:113-8.
- Goettel MS, Inglis GD (1997): Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey LA (Ed). Manual of Techniques in Insect Pathology. Elsevier Academic Press, Burlington, USA. pp. 213–249.
- Goettel MS, Koike M, Kim JJ, Aiuchi D, Shinya R, Brodeur J (2008): Potential of *Lecanicillium spp.* for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98: 256–261.
- Hawksworth DL (2004): Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology*. 50: 9–18.
- Heydari A, Pessarakli M (2010): A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences*. 10: 273-290.
- Jackson D, Skillman J, Vandermeer J (2012): Indirect biological control of the coffee leaf rust, *Hemileia vastatrix*, by the entomogenous fungus *Lecanicillium lecanii* in a complex coffee agroecosystem. *Biological Control*. 61: 89–97.
- Kavková M, Čurn V (2005): *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). *Mycopathologia*. 159: 53–63.
- Kim JJ, Goettel MS, Gillepsie DR (2007): Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biological Control*. 40: 327-332.

- Kim JJ, Goettel MS, Gillespie DR (2010): Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec®, against the cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea* in a greenhouse environment. *Crop Protection*. 29: 540–544.
- Kouvelis VN, Silalkouma A, Typas MA (2008): Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species. *Mycological Research*. 112: 829-844.
- Koppert Biological Systems (2012): Mycotal: Material safety data sheet. Version 4.2. .
www.koppert.com
- Kryukov VY, Yaroslavtseva ON, Levchenko MV, Lednyov GR, Glupov VV (2010): Phenotypic variability of environmental isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*. 79: 265-269.
- Landa Z. (1994): Entomopatogení houby v biologické ochraně rostlin. [habilitační práce]. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice, CZ .
- Lopez-Llorca LV, Jansson HB (2007): Fungal parasites of invertebrates: multimodal biocontrol agents? In. Robson GD, van West P, Gadd GM (Eds). Exploitation of Fungi. *Cambridge University Press*. Cambridge, UK. pp: 310-335.
- Michelot D, Melendez-Howell LM (2003): *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycological Research*. 107: 131–146.
- Milner RJ (1997): Prospects for biopesticides for aphid control. *Entomophaga*. 42: 227-239.
- Mueller GM, Bills GF, Foster MS (2004): Biodiversity of Fungi. London. *Elsevier Academic Press*. pp. 777.
- Mueller GM, Schmit JP (2007) Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity Conservation*. 16:1–5.
- Nazemi AH, Moravvej G, Karimi J, Hassanlouei RT (2014): Pathogenicity of *Lecanicillium longisporum* (Ascomycota: Hypocreomycetidae) on the aphid *Cinara pini* (Hemiptera: Lachnidae) in laboratory conditions. *Journal of Crop Protection*. 3: 159-171
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H (2008): Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence

- databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 4: 193–201.
- Oborník M, Klíč M, Žižka L (2000): Genetic variability and phylogeny inferred from random amplified polymorphic DNA data reflect life strategy of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*. 78: 1150-1155.
- Ohta T, Nakajima S, Sato Z, Aoki T, Hatanaka S, Nozoe S (1986): Cyclopropylalanine, an antifungal amino acid of the mushroom *Amanita virgineoides* Bas. *Chemistry Letters*. 1986: 511-512.
- Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Multon JK, Pereira RM (2008): *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98: 267–270.
- Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE (2010): Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*. 55: 113-128.
- Ownley BH, Pereira RM, Klingeman WE, Quigley NB, Leckie BM (2004): *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens. In: Lartey RT, Caesar AJ (Eds). *Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost*. Trivandrum, India. pp. 255–269.
- Papavizas G. C. (1985): *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and the potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*. 23:23–54.
- Petch T (1932): Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 16: 209–245.
- Piasecka J, Kavanagh K, Grogan H (2011): Detection of sources of *Lecanicillium (Verticillium) fungicola* on mushroom farms. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*.
- Quinn JA, Powell CC Jr. (1982): Effects of temperature, light and relative humidity on powdery mildew on begonia. *Phytopathology*. 72: 480-484.
- Rivas F; Nuñez P, Jackson T; Altier N (2014): Effect of temperature and water activity on mycelia radial growth, conidial production and germination of *Lecanicillium* spp. isolates and their virulence against *Trialeurodes vaporariorum* on tomato plants. *BioControl*. 59: 99-109.

- Reiss E, Shadomy HJ, Lyon GM (2012): *Fundamental Medical Mycology*. John Wiley & Sons, Hoboken, USA. pp. 656.
- Rehner SA, Buckley E (2005): A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycology*. 97: 84-98.
- Repáč I (2011): Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques. (Eds.) Rai M, Varma A. Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae. *Springer*. London, UK. pp. 43-63.
- Roberts DW (1989): World picture of biological-control of insects by fungi. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 84: 89-100.
- Rojas ES; Dixon PM; Batzer JC; Gleason ML (2013): Genetic and virulence variability among *Erwinia tracheiphila* strains recovered from different cucurbit hosts. *Phytopathology*. 103: 900-905.
- Safavi SA, Shas FA, Pakdel AK, Rasouljan GR, Bandani AR, Butt TM (2007): Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*. 270: 116-123.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC, Andersen B (2010): Food and Indoor Fungi.. *CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre*. Utrecht, NL. pp. 390.
- Samson RA; Rombach MC (1985): Biology of the fungi *Verticillium* and *Aschersonia*. In: Hussey NW; Scopes NEA (Eds). Biological pest control – the glasshouse experience. *Cornell University Press*, Ithaca, New York. pp. 34-42.
- Schmit JP, Mueller GM (2007) An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity Conservation*. 16:99–111.
- Schoch C, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium (2012): Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 106: 6241–6246.
- Seifert K, Morgan-Jones G, Gams W, Kendrick B (2011): The Genera of Hyphomycetes. *CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre*. Utrecht, NL. pp. 997.

- Shu-Sheng L, Colvin J, De Barro PJ (2012): Species concepts as applied to the whitefly *Bemisia tabaci*. Systematics: How many species are there? *Journal of Integrative Agriculture*. 11: 176–186.
- Skalický A, Bohatá A, Simková J, Osborne LS, Landa Z (2013): Selection of indigenous isolates of entomopathogenic soil fungus *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Folia Microbiologica*. In press.
- StatSoft. (2013): STATISTICA (data analysis software system), version 12. StatSoft Inc. URL: [www.statsoft.com.]
- Sugimoto M, Koike M, Hiyama N, Nagao H (2003): Genetic, morphological, and virulence characterization of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 82: 176–187.
- Sukarno N, Kurihara Y, Ilyas M, Mangunwardoyo W, Yuniarti E, Sjamsuridzal W, Park JY, Saraswati R, Inaba S, Widyastuti Y, Ando K, Harayama S (2009): *Lecanicillium* and *Verticillium* species from Indonesia and Japan including three new species. *Mycoscience*. 50: 369-379.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW (2007a): Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*. 57: 5–59.
- Sung GH, Spatafora JW, Zare R, Hodge KT, Gams W (2001): A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the Clavicipitaceae. *Nova Hedwigia*. 72: 311 -328.
- Sung GH, Sung JM, Hywel-Jones NJ, Spatafora JW (2007b): A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44: 1204-1223.
- Tedersoo L, Pärtel K, Jairus T, Gates G, Pöldmaa K, Tamm H (2009): Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotialesemi. *Environmental Microbiology*. 11: 3166–3178.
- Ter Braak CJF, Šmilauer P (2012): Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer Power, Ithaca, USA, pp. 496.

- Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzon A, Ownley BH, Pell JK, Rangel DEN, Roy HE (2009): Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*. 2:149–159.
- Verhaar MA, Hijwegen T, Zadoks JC (1999): Improvement of the efficacy of *Verticillium lecanii* used in biocontrol of *Sphaerotheca fuliginea* by addition of oil formulations. *BioControl*. 44: 73–87.
- Verhaar MA, Ostergaard KK, Hijwegen T, Zadoks JC (1997): Preventative and curative applications of *Verticillium lecanii* for biological control of cucumber powdery mildew. *Biocontrol Science And Technology*. 7: 543-551.
- Veselý D, Koubová D (1994): *In vitro* effect of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. and *B. brongniartii* (Sacc.) Petch on phytopathogenic fungi. *Ochrana Rostlin*. 30: 113–120.
- Ward NA (2011): *Simplicillium lanosoniveum*, a mycoparasite of *Phakopsora pachyrhizi* and its use as a biological control agent. [Ph. D. Thesis] Louisiana State University & Agricultural and Mechanical College. Baton Rouge, Louisiana. pp. 138.
- Wermelinger B (2004): Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* - a review of recent research. *Forest Ecology and Management*. 202: 67–82.
- Werner O, Ros R M, Guerra J (2002): Direct amplification and NaOH extraction: Two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Bryology*. 24: 127–131.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York. pp. 315-322.
- Wraight SP, Carruthers RI, Jaronski ST, Bradley CA, Garza CJ, Galaini-Wraight S (2000): Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*. 17: 203-217.
- Yamaji K, Ishimoto H, Usui N, Mori S (2005): Organic acids and water-soluble phenolics produced by *Paxillus* sp. 60/92 together show antifungal activity against *Pythium vexans* under acidic culture conditions. *Mycorrhiza*. 15:17-23.

- Xiang T, Hambleton EA, DeNofrio JC, Pringle JR, Rossman A (2013): Isolation of clonal axenic strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium* and their growth and host specificity. *Journal of Phycology*. 49: 447–458.
- Zare R, Gams W (2001): A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia* 73: 1–50.
- Zare R, Gams W, Culham A (2000): A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. I. Phylogenetic studies using ITS sequences. *Nova Hedwigia*. 71: 465-480.
- Zimmermann A. (1898): Over eene schimmelepidemie der groene Luizen. *Korte Berichten Uit's Lands Plantentuin*. 240-243.