



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Dizertační práce

Možnosti využití vybraných druhů entomopatogenních hub
v biologické ochraně rostlin proti modelovým druhům škůdců
hospodářských plodin

Ing. Jana Konopická

České Budějovice
2022

Školitel: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií

Školitel specialista: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra rostlinné výroby

Školitel specialista: Ing. Rostislav Zemek, CSc.
Biologické centrum AV ČR, v. v. i. v Českých Budějovicích
Entomologický ústav
Laboratoř aplikované entomologie

Práce vznikla za podpory projektů:

GAJU 018/2018/Z
GAJU 027/2019/Z
TAČR TP01010022
TAČR TG02010034
NAZV QK1910270
Institucionální podpora RVO:60077344
MMT 8G15006

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D., za cenné rady a připomínky během mého studia. Dále bych chtěla poděkovat školitelům specialistům paní Ing. Andree Bohaté, Ph.D., a panu Ing. Rostislavu Zemkovi, CSc., kteří mě během celého studia formovali a podporovali. Jejich cenné rady, postřehy, vstřícnost a trpělivost vedly ke vniku této práce. Poděkování patří také paní Olze Divišové za technickou asistenci a pomoc při vyhodnocování pokusů. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě vždy podporovala po celou dobu mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační 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

.....
Ing. Jana Konopická

Souhrn

Dizertační práce je zaměřena na problematiku entomopatogenních hub, které se mohou využívat v biologické ochraně rostlin. Dizertační práce je sestavena ze dvou hlavních částí: 1) podrobné literární rešerše a 2) pěti podkapitol experimentální části a výsledků, které obsahují originální publikace s výsledky vlastní výzkumné práce.

První studie byla zaměřena na izolaci a identifikaci nových kmenů entomopatogenních hub z půdních vzorků z České republiky a Izraele a zkoumala se také účinnost proti roztoči *Rhizoglyphus robini*. Celkem bylo z půdních vzorků z obou zemí vyizolováno 5 rodů entomopatogenních hub (*Metarhizium* sp., *Beauveria* sp., *Isaria* sp., *Lecanicilium* sp. a *Purpureocillium* sp.). Nejfrekventovanější byl rod *Metarhizium* sp. a to zejména na lokalitách v České republice. Nejvyšší účinnost proti roztoči *Rhizoglyphus robini* byla zjištěna u kmenů *Metarhizium anisopliae* izolovaných z půdních vzorků z České republiky a u kmene *Metarhizium indigoticum* z Izraele. Mortalita po 4. dnech biotestu byla téměř 100 %.

Druhá studie se zabývala účinností entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 proti zavíječi zimostrázovému (*Cydalima perspectalis*). Houbová infekce byla pozorována většinou u kukel. Nicméně mortalita nepřesáhla 60 %, což naznačuje velmi nízkou citlivost zavíječe zimostrázového k houbě *Isaria fumosorosea* CCM 8367.

Ve třetí podkapitole se řešila problematika závažného škůdce brambor mandelinky bramborové. Nejprve byly provedeny laboratorní experimenty, kde se vybral virulentní kmen *Beauveria bassiana* BBA 08 proti tomuto škůdci, který byl následně použit v dalších experimentech. Tento kmen byl testován proti dospělcům mandelinky bramborové v květináčových pokusech a polních podmínkách. Houba byla aplikována samostatně a v kombinaci s entomopatogenními hlísticemi. Ve všech experimentech houba snížila počty dospělců mandelinky bramborové, v terénní aplikaci až o 30 % v porovnání s kontrolou.

Čtvrtá studie se věnovala záměrnému obohacení půdního výsevního substrátu entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* CCM 8367 pro zvýšení supresivity. Výsledky ukázaly, že při 20 °C houba úspěšně kolonizovala půdní substrát a přetrvávala v něm více jak 6 měsíců i když se průměrná koncentrace mírně snížila z $5,89 \times 10^4$ na $2,76 \times 10^4$ spor na mililitr substrátu během experimentu.

Poslední studie testovala efektivitu přenosu entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 pomocí entomopatogenních hlístic druhu *Steinernema feltiae* a *Heterorhabditis bacteriophora*. Výsledky naší studie poprvé ukázaly, že šíření konidií i blastospor *Isaria fumosorosea* je významně posíleno přítomností entomopatogenních hlístic.

Klíčová slova: entomopatogenní houby, biologická ochrana, *Rhizoglyphus robini*, *Metarhizium*, *Isaria*, *Beauveria*, virulence, půdní substrát, hlístice

Summary

Ph.D. thesis is focused on the entomopathogenic fungi that can be used in biological control. Ph.D. thesis consists of two main parts: 1) a detailed background research, and 2) five subchapters of the experimental part and results, which contain original publications describing results of my own studies.

The first study focused on the isolation and identification of new strains of entomopathogenic fungi from soil samples collected in garlic and onion fields in the Czech Republic and Israel. Furthermore, the efficacy of selected fungal strains against the bulb mite *Rhizoglyphus robini* was tested. A total of 5 genera of entomopathogenic fungi (*Metarhizium* sp., *Beauveria* sp., *Isaria* sp., *Lecanicillium* sp. and *Purpureocillium* sp.) were identified among the soil isolates from both countries. The most frequent was the genus *Metarhizium* sp. especially in sampling sites of the Czech Republic. The highest efficacy against *Rhizoglyphus robini* mites was found in *Metarhizium anisopliae* strains isolated from soil samples collected in the Czech Republic and in *Metarhizium indigoticum* strain from Israel. Mortality after 4 days of the bioassay was almost 100%.

The second study investigated the efficacy of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 against box tree moth (*Cydalima perspectalis*). Fungal infection was mostly observed in pupae. However, mortality did not exceed 60%, indicating a very low susceptibility of box tree moth to *Isaria fumosorosea* CCM 8367.

In the third subchapter, various strains of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* were tested against the Colorado potato beetle, a serious pest of potato. First, laboratory experiments were performed and the most virulent strain BBA 08 against this pest was selected and used subsequently in further experiments. The strain efficacy against *L. decemlineata* adults was evaluated in pot experiments and under field conditions. The fungus was applied alone and in combination with entomopathogenic nematodes. In all experiments, the fungus reduced the number of Colorado potato beetle adults by about 30% compared to the control.

The fourth study described enrichment of soil substrate with entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 for increasing its suppressivity. The results showed that the fungus successfully colonized the soil substrate and remained in it for more than 6 months at 20 °C, although the average concentration decreased slightly from 5.89×10^4 to 2.76×10^4 spores per milliliter of substrate during the experiment.

The last study described dissemination of *Isaria fumosorosea* CCM 8367 spores by nematodes of *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. The results of our study revealed for the first time that the spread of conidia and blastospores of *Isaria fumosorosea* in soil environment is significantly enhanced by the presence of entomopathogenic nematodes.

Key words: entomopathogenic fungi, biological control, *Rhizoglyphus robini*, *Metarhizium*, *Isaria*, *Beauveria*, virulence, soil substrate, nematodes

Obsah

1	Úvod	9
2	Literární přehled	10
2.1	Integrovaná ochrana rostlin	10
2.1.1	Definice integrované ochrany rostlin.....	10
2.2	Biologická ochrana rostlin.....	11
2.2.1	Strategie biologické ochrany rostlin	12
2.2.2	Přirození nepřátelé.....	13
2.3	Charakteristika entomopatogenních hub	20
2.3.1	Taxonomické zařazení a klasifikace	21
2.3.2	Charakteristika významných řádu Hypocreales a Entomophthorales ..	21
2.3.3	Výskyt a rozšíření.....	23
2.3.4	Vývojový cyklus.....	23
2.4	Faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub	24
2.4.1	Biotické faktory: Interakce houba-hostitel.....	25
2.4.2	Abiotické faktory.....	26
2.5	Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub	28
2.5.1	<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo-Crivelli) Vuillemin	28
2.5.2	<i>Isaria fumosorosea</i> (Wize) Brown & Smith	29
2.5.3	<i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimmermann) Zare & W. Gams.....	29
2.5.4	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin	30
2.6	Entomopatogenní houby jako biopesticidy	31
2.7	Vliv entomopatogenních hub na necílové organismy	32
3	Hypotézy a cíle práce	33
4	Experimentální část a výsledky	34
4.1	Účinnost entomopatogenních hub vyizolovaných z České republiky a Izraele proti roztoči <i>Rhizoglyphus robini</i> (Acari: Acaridae) a jejich výskyt ...	34
4.2	Účinnost entomopatogenní houby <i>Isaria fumosorosea</i> CCM 8367 proti zavíječi zimostřázovému (<i>Cydalima perspectalis</i>)	35
4.3	Účinnost entomopatogenní houby <i>Beauveria bassiana</i> proti mandelince bramborové (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>).....	35
4.4	Obohacení půdního substrátu entomopatogenní houbou <i>Isaria fumosorosea</i> CCM 8367 pro zvýšení jeho supresivity	36
4.5	Šíření spor entomopatogenní houby <i>Isaria fumosorosea</i> CCM 8367 hlísticemi.....	37

5	Přílohy	38
5.1	Survey of entomopathogenic and mycoparasitic fungi in the soil of onion and garlic fields in the Czech Republic and Israel.....	39
5.2	Efficacy of soil isolates of entomopathogenic fungi against the bulb mite, <i>Rhizoglyphus robini</i> (Acari: Acaridae)	50
5.3	Low Efficacy of <i>Isaria fumosorosea</i> against Box Tree Moth <i>Cydalima perspectalis</i> : Are Host Plant Phytochemicals Involved in Herbivore Defence against Fungal Pathogens?.....	69
5.4	Virulence of <i>Beauveria bassiana</i> strains isolated from cadavers of Colorado potato beetle, <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	79
5.5	Efficacy of the applied natural enemies on the survival of Colorado Potato Beetle adults	92
5.6	Užitný vzor č. 32259: Insekticidní a akaricidní aditivum do nosného substrátu pro pěstování rostlin	105
5.7	Užitný vzor č. 31982: Pěstební substrát s insekticidními a akaricidními vlastnostmi.....	113
5.8	Inoculation of Sphagnum-Based Soil Substrate with Entomopathogenic Fungus <i>Isaria fumosorosea</i> (Hypocreales: Cordycipitaceae)	119
5.9	Dissemination of <i>Isaria fumosorosea</i> Spores by <i>Steinernema feltiae</i> and <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	125
6	Závěr	139
7	Seznam použité literatury.....	141
8	Seznam vlastních publikovaných prací.....	152

1 Úvod

V současné době je mnoho škůdců významných zemědělských plodin odolných vůči pesticidům. Rezistence populací škůdců se mnohdy neuváženou aplikací pesticidů neustále zvyšuje, proto je snaha využívat alternativní metody v rámci programů integrované ochrany rostlin. Mezi takové metody patří např. biologická ochrana rostlin. Vhodnou ekologickou alternativou k širokospektrálním chemickým pesticidům je využívání přirozených nepřátel, jako jsou predátoři, parazitoidi a mikroorganismy mezi které spadají také entomopatogenní houby.

Značný počet mikrobiálních biopesticidů na bázi entomopatogenních hub se na celém světě vyvíjí již od 60. let 20. století. Entomopatogenní houby jsou běžnou součástí půdy a infikují škůdce ze všech řádů hmyzu, díky čemuž jsou považovány za významné biologické agens regulující populace škůdců. Jejich velká výhoda spočívá v tom, že nemusí být přijímány potravou, protože jsou schopny proniknout přes kutikulu do hostitele a biopreparáty na bázi entomopatogenních hub lze snadno vyrobit. Mezi nejběžnější používané druhy entomopatogenních hub v komerčně vyráběných mykopesticidech patří: *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith a *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch.

Kromě přímé biologické ochrany proti škůdcům se tyto houby mohou využívat také v preventivních aplikačních programech, zejména u okrasných nebo školkařských výpěstků, aby poskytly lepší ochranu proti škůdcům. Další výhodou při použití těchto mikroorganismů je i absence reziduí v ošetřených kulturách, takže v případě použití přípravku na bázi entomopatogenních hub není potřeba dodržovat ochrannou lhůtu. To skýtá vysokou přidanou hodnotu zejména v systémech produkce ovoce a zeleniny. Nevýhodou použití entomopatogenních hub i ostatních bioagens je jejich závislost na podmínkách prostředí (zejména teplota, relativní vzdušná vlhkost a UV záření). Tím se použitelnost omezuje pouze na určité klimaticky příznivé areály a prostory jako jsou např. skleníky.

Dizertační práce se věnuje problematice entomopatogenních hub, které se mohou využívat v biologické ochraně rostlin. Mezi cíle této dizertační práce patří izolace a identifikace nových kmenů entomopatogenních hub z půdních vzorků z České republiky a Izraele a následně jejich testování proti roztoči *Rhizoglyphus robini*. Dále byly v této práci testovány vybrané kmeny entomopatogenních hub na významných škůdcích zavíječi zimostrázovém a mandelince bramborové. Dalším významným cílem práce bylo záměrně inokulovat půdní substrát entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* CCM 8367 a tím zvýšit jeho supresivitu. A posledním cílem této práce bylo otestovat, zdali se může entomopatogenní houba *Isaria fumosorosea* CCM 8367 šířit v prostředí efektivněji za pomoci entomopatogenních hlístic.

2 Literární přehled

2.1 Integrovaná ochrana rostlin

Integrovaná ochrana rostlin (IOR) je systém hospodaření, který upřednostňuje přirozenější alternativy ochrany rostlin a zároveň snižuje závislost na pesticidech. Jde o přechod mezi konvenčním a ekologickým systémem hospodaření. IOR zahrnuje prevenci, monitoring a intervenci (Procházka 2019; Bailey *et al.* 2010). Termín IOR jako první definovali kalifornští entomologové Stern, van Der Bosch, Hagen a Smith v roce 1959 jako přístup k potlačování škodlivých organismů (Stern *et al.* 1959).

2.1.1 Definice integrované ochrany rostlin

Klasickou a jednu z nejvíce používaných definic charakterizovala organizace spojených národů, Food and Agricultural Organization (FAO). Tato definice popisuje IOR jako systém regulace četnosti populací škodlivých činitelů, který využívá všech metod regulace četnosti populací škodlivých činitelů s ohledem na ekologické, ekonomické, toxikologické a hygienické požadavky, se záměrem udržet populace škodlivých činitelů na tolerovatelné úrovni, při preferování a vědomém využívání přirozených metod regulace populační hustoty škodlivých činitelů. IOR se zaměřuje na růst zdravé plodiny s co nejmenším narušením agroekosystémů a podporuje přirozené mechanismy kontroly škůdců.

Agentura pro ochranu životního prostředí (U.S. Environmental Protection Agency zkráceně EPA či USEPA) charakterizuje IOR jako účinný a ekologicky citlivý přístup v regulaci četnosti populací škodlivých činitelů, který se zaměřuje na kombinaci postupů zdravého rozumu. Programy IOR využívají aktuální a komplexní informace o životních cyklech škůdců a jejich interakci s prostředím. Tyto informace se v kombinaci s dostupnými metodami ochrany před škůdci používají k řízení škod škůdců nejúspěšnějším způsobem a s co nejmenším možným rizikem pro lidské zdraví, necílové organismy a životní prostředí.

V roce 2009 byla přijata členy Evropské Unie směrnice 2009/128/ES, která je součástí národní legislativy rostlinolékařského zákona č. 199/2012 Sb. § 5. Podle směrnice 2009/128/ES se IOR rozumí „pečlivé zvažování veškerých dostupných metod ochrany rostlin a následná integrace vhodných opatření, která potlačují rozvoj populací škodlivých organismů a udržují používání přípravků na ochranu rostlin a jiných forem zásahu na úrovních, které lze z hospodářského a ekologického hlediska odůvodnit a které snižují či minimalizují rizika pro lidské zdraví nebo životní prostředí. IOR klade důraz na růst zdravých plodin při co nejmenším narušení zemědělských ekosystémů a podporuje přirozené mechanismy ochrany před škodlivými organismy“. Součástí rostlinolékařského zákona je platná vyhláška č. 205/2012 o obecných zásadách IOR. Dodržování obecných zásad IOR je povinné pro každého zemědělce Evropské Unie od 01. 01. 2014. Kontrolu dodržování obecných zásad IOR v České republice provádí Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) na základě tzv. kontrolního bodového systému (Hnízdil 2014b).

Obecné zásady IOR (upraveno podle vyhlášky č. 205/2012 Sb.)

1. Opatření k zamezení výskytu škodlivých organismů jako střídání plodin, používání odolných odrůd, vyvážené hnojení, dodržování hygienických opatření a podpora užitečných organismů
2. Sledování škodlivých organismů dostupnými postupy a nástroji
3. Rozhodování o provedení opatření na základě vědecky podložených prahových hodnot, vztažené vždy na konkrétní oblast, plodinu, termín a podmínky
4. Upřednostňování metod udržitelných biologických, fyzikálních a nechemických metod, před chemickými, zajistí-li uspokojivou ochranu
5. Při nasazení pesticidů používání co nejvíce specifických k danému škodlivému organismu s co nejmenšími vedlejšími účinky na lidské zdraví, necílové organismy i životní prostředí
6. Používání pesticidů jen v nezbytném rozsahu
7. Uplatňování antirezistentních strategií a střídání účinných látek s odlišnými mechanismy účinku
8. Pravidelné vyhodnocování úspěšnosti prováděných opatření

Hlavním rysem IOR by měla být především komplexnost přístupu při výběru způsobu ochrany konkrétního porostu a zejména zvážení a realizování možnosti zapojit do systému potlačování škodlivých organismů dostupné přirozené prostředky (Hnízdil 2014a). Jedním z přirozených prostředků na doplnění klasické ochrany a v některých případech i přímá náhrada chemických přípravků v ochraně rostlin, které často vykazují toxický vliv na necílové organismy, vyšší živočichy a člověka, mohou být i entomopatogenní houby (Bidochka 2001), které jsou z hlediska environmentální zátěže mnohem přijatelnější, než syntetické pesticidy (St. Leger *et al.* 1996).

2.2 Biologická ochrana rostlin

Populace všech živých organismů v přírodě se snižují pomocí predátorů, parazitů, parazitoidů a různých mikroorganismů. Tento proces se nazývá přírodní ochrana. Jsou-li škůdci kontrolováni, jedná se o biologickou ochranu (Hajek 2004). Biologická ochrana rostlin (BOR) může být definována jako úmyslné využívání přirozených nepřátel škodlivých organismů pro jejich potlačení a obvykle zahrnuje aktivní lidskou roli (Bale *et al.* 2007). Biologickou ochranou se rozumí nejen záměrné využívání a cílená podpora přirozených nepřátel, ale i záměrné využívání a podpora systémů v interakcích „živý proti živému“ (Landa 2002). Mezi přirozené nepřátele hmyzích škůdců a roztočů patří parazité, parazitoidi a predátoři. Biologická ochrana plevelů zahrnuje hmyz (herbivoři) a patogeny. V regulaci patogenů rostlin se uplatňují tzv. antagonisté nebo mykoparazité (Hajek, Eilenberg 2018). Eilenberg *et al.* (2001) rozlišuje několik způsobů biologické ochrany rostlin: klasickou biologickou metodu, augmentační metodu (která může být dále dělena na inundativní a inokulativní) a konzervační metodu.

2.2.1 Strategie biologické ochrany rostlin

Klasická biologická metoda

Klasická biologická metoda je záměrnou introdukcí exotického biologického agens, s cílem zajistit jeho trvalé usídlení v biotopu a tím dlouhotrvající kontrolu cílového škůdce (Eilenberg *et al.* 2001). Tato metoda se používá hlavně proti „exotickým“ škůdcům, kteří se usadili v nových zemích nebo regionech světa. Poměrně malý počet určitého druhu přirozeného nepřitele (obvykle méně než 1 000) je shromažďován ze země nebo oblasti původu škodlivého organismu a následně inokulován do nového prostředí, kde umožňuje vybudovat úroveň biologické ochrany, která může být udržena po velmi dlouhou dobu (Roy *et al.* 2010; Bale *et al.* 2007). První případ cílené biologické ochrany tohoto typu je doložen z ostrova Mauricius, kam byl v roce 1762 introdukován druh Majna obecná (*Acridotheres tistis*) za účelem regulace sarančat *Nomadacris septemfasciata* (Shah, Pell 2003). Tento typ biologické ochrany je nejúspěšnější u trvalých plodin (ovocné plantáže, lesy), kde dlouhodobá povaha ekosystému umožňuje, aby se interakce mezi škůdci a přirozenými nepříteli plně etablovala v určitém časovém období. Příkladem úspěšné introdukce byl dovoz a vypuštění dravého sluněčka *Rodolia cardinalis* za účelem regulace zavlečeného citrusového škůdce červce *Icerya buyi* ve středomořské Evropě kolem roku 1900 (Bale *et al.* 2007). Dále vypuštění parazitoida *Aphelinus mali* ve 30. letech 20. století za účelem regulace zavlečené mšice vlnatky krvavé (*Eriosoma lanigerum*) v jablonoňových sadech po celé Evropě (Greathead 1976). Pokud jde o entomopatogenní houby, je známa introdukce izraelského kmene obligátního parazita *Zoophthora radicans* proti mšicím *Therioaphis trifolii* f. *maculata* škodící na leguminózách v Austrálii. Tato entomoparazitická houba přispěla k odvrácení významných hospodářských škod (Shah, Pell 2003).

Inundativní metoda

Inundativní metoda je záměrné vnesení živého organismu do prostředí, ve kterém je předpoklad pro úspěšnou kontrolu početnosti populace škůdce po určitý časový úsek. Po vyhubení škůdce přirození nepřítelé hynou (Eilenberg *et al.* 2001). Jde o masové vypuštění přirozeného nepřitele škodlivého organismu s cílem okamžitě potlačit četnost škodlivého organismu. Strategie je určena proti jednogenečním škůdcům způsobujících škody na polních plodinách. Inundativní metoda je obvykle přechodná a je nutné ji opakovat, někdy více než jednou ročně (Bale *et al.* 2007). Příkladem je vypouštění parazitické vosičky *Trichogramma evanescens* do populace zavíječe kukuřičného (Landa 2002). Tato forma BOR se také označuje jako „aplikace biopesticidů“, protože většina těchto látek se používá za použití upraveného konvenčního zařízení pro aplikaci pesticidů. Mikrobiální patogeny jsou aplikovány tímto způsobem. Často jsou produkovány fermentačními procesy, protože je zapotřebí obrovské množství inokula k potlačení nežádoucích organismů (Helyer *et al.* 2014). V případě využití entomopatogenních hub se pro tuto metodu používá pojem mykopesticid, popř. mykoinsekticid. Příkladem může být použití biopreparátů na bázi entomopatogenních hub např. BotaniGard (*Beauveria bassiana*) proti širokému spektru hostitelů využívané v Severní Americe, PFR 97 (*Isaria fumosorosea*) proti mšicím, molicím a svilušce chmelové a komerčně dostupný produkt Met 52 (*Metarhizium anisopliae*) (Shah, Pell 2003).

Inokulační metoda

Inokulační metoda je forma BOR, při níž je vneseno velké množství přirozených nepřátel, k překrytí populací škodlivých činitelů v řízených podmínkách, tj. skleníků a v interiérech spíše než u polních plodin (Helyer *et al.* 2014). Tato metoda je využívána často po období pěstitelského cyklu proti škůdcům, kteří mají více generací do roka a vnesení přirozeného nepřitele může být i opakované (Landa 2002). Cílem augmentativní strategie je dosáhnout okamžitého ochranného efektu (Bale *et al.* 2007). Příkladem je periodická (týdenní nebo čtrnáctidenní) aplikace parasitoidních vosiček *Encarsia formosa* do rostlin citlivých na molice. Tato aplikace se provádí za účelem ochrany mnoha skleníkových plodin (Helyer *et al.* 2014). Dále se v rámci této metody využívají např. dravý roztoč *Phytoseiulus persimilis*, entomopatogenní bakterie *Bacillus thuringiensis*, entomopatogenní houba *Beauveria bassiana* a spousta dalších jiných makroorganismů nebo mikroorganismů (Driesche, Heinz 2004; Landa 2002).

Konzervace a podpora přirozených nepřátel

Konzervační biologická ochrana spočívá v cílené ochraně a podpoře přirozeně se vyskytujících druhů nepřátel hmyzích škůdců. Jedná se o podporu populací, které se v daném prostředí již vyskytují, a to tak, aby jejich působením následně došlo k udržení populací škůdců na tolerovatelné úrovni (Pell *et al.* 2010). To může zahrnovat rozvoj oblastí, které fungují jako útočiště pro prospěšné organismy, poskytování vhodných rostlin a míst pro přezimování, časnou produkci pylu a omezení širokospektrálních pesticidů (Helyer *et al.* 2014). V případě entomopatogenních hub a jejich podpory je vhodné zvyšovat např. pomocí zavlažování vlhkost, omezit použití pesticidů či zajistit dostatek vhodných hostitelů v neobdělávaných biokoridorech, kteří mohou dopomoci k bezproblémovému přezimování (Shah, Pell 2003).

2.2.2 Přirození nepřátelé

Přirozené nepřátele lze definovat jako živé organismy, které se běžně vyskytují v přírodě a jsou schopny usmrctvat nebo oslabovat populace jiných organismů nebo snižovat jejich reprodukční potenciál (Landa 2002). Přirození nepřátelé se v biologické ochraně rostlin dělí na dvě skupiny. Do první skupiny přirozených nepřátel spadají makroorganismy (parazit, parazitoidi, predátoři) a druhá skupina zahrnuje mikroorganismy (bakterie, viry, hlístice, houby, prvoci) (Hajek, Eilenberg 2018). Většina přirozených nepřátel je vysoce specializovaná a napadá pouze jeden nebo několik příbuzných druhů škůdce. Přirození nepřátelé se aplikují s cílem regulovat populace škůdců pod ekonomickým prahem škodlivosti, zpomalovat a oddalovat vznik jejich rezistence vůči pesticidům a snižovat kontaminace životního prostředí (Honěk *et al.* 2008). Nejúčinnější regulace škodlivých organismů je dosažena, pokud má přirozený nepřítel úzký hostitelský okruh, synchronní životní cyklus s životním cyklem škůdce a více generací do roka. Tyto vlastnosti zajistí vyšší účinnost proti škodlivému organismu (Dreistadt 2007). Všechny metody biologické ochrany popsané výše umožňují využít přirozené nepřátele proti škodlivým činitelům (Hajek, Eilenberg 2018).

Makroorganismy – 1. skupina přirozených nepřátel

Skupina makroorganismů neboli bioagens je obvykle členěna na základě vztahu k dané skupině škůdců, kterou jsou schopni regulovat, na parazity a predátory. Často je v rámci této skupiny samostatně vyčleňována kategorie parazitoidů (Hajek 2004; Kabíček 2004). Důležitou podmínkou úspěšného uchycení přirozených nepřátel je včasná aplikace bioagens na základě pečlivého monitorování výskytu škodlivých organismů v porostu. Nejsou-li v ochraně proti škodlivým organizmům využívány výhradně jen bioagens, je nutné též zajistit jejich kompatibilitu s jinými metodami ochrany rostlin a zejména pak s přípravky chemické ochrany proti škůdcům a patogenům. Použití nevhodných pesticidů v systému ochrany dané plodiny či kultury může výrazně omezit nebo zcela zničit probíhající regulaci populací škůdců pomocí přirozených nepřátel (Kabíček 2004).

Širokospektrální pesticidy často zabíjejí vyšší podíl predátorů a parazitoidů než škůdce, na něž se vztahují. Kromě okamžitého zabíjení přirozených nepřátel, kteří jsou přítomni (kontaktní toxicita), je mnoho perzistentních pesticidů, které zanechávají rezidua v půdě. Zbytková rezidua jsou často pro přirozené nepřátele toxická dlouho poté, co již nejsou ovlivňováni škůdci. I nízká hladina reziduí pesticidů může narušit reprodukci přirozených nepřátel a jejich schopnost lokalizovat a zabít škůdce (Dreistadt 2007). V případě použití pesticidů nebo mechanického poškození rostlin může přirozeného nepřítele na určitou dobu odehnat od populace hostitele nebo jej zahubit (Osborne *et al.* 2004). Distributoři bioagens obvykle spotřebitele informují, které přípravky chemické ochrany lze nebo nelze použít při použití konkrétního druhu bioagens, aby nedošlo k radikálnímu snížení nebo úplnému vyhubení jeho populace (Kabíček 2004).

Paraziti

Paraziti jsou organismy, které vytvářejí vzájemné vztahy mezi organismy různých druhů. Výhoda parazita je, že žije na úkor druhého organismu nazývaného hostitel (Helyer *et al.* 2014). Paraziti jsou částečně nebo po většinu svého vývoje závislí na svém hostiteli a rozdělují se na parazity žijící na povrchu těla, kdy oslabují hostitele zvenčí (ektoparazité) nebo je oslabují zevnitř (endoparazité) (Honěk *et al.* 2008). Existují různé typy parazitických vztahů. Obligátní parazité nemohou přežít bez svých hostitelů, zatímco fakultativní parazité ano. Paraziti svého hostitele mohou oslabovat, nemusí ho vždy usmrtit (Helyer *et al.* 2014; Landa 2002). A z tohoto důvodu nejsou paraziti v biologické ochraně tak významní (Navrátilová 2015a).

Parazitoidi

Tato skupina makroorganismů patří převážně do řádů blanokřídlí (Hymenoptera) a dvoukřídlí (Diptera). Parazitoidi jsou menší než jejich hostitel a jsou na svého hostitele vázání nejen potravně, ale i vývojově (Dreistadt 2007, Landa 2002). Znamená to, že celý vývojový cyklus parazitoida nebo jeho část je vázán na vývojový cyklus organismu, který je jím regulován (Kabíček 2004). Parazitoidi jsou úzce specializovaní na jeden druh nebo rod škodlivého organismu a mohou napadat všechna vývojová stádia nebo se úzce specializují na konkrétní stádium. Larvy se živí tkáněmi a tělními tekutinami hostitele (Honěk *et al.* 2008). Vždy nastane smrt

hostitele, což je velkým přínosem z hlediska BOR. Parazitoidy lze dále klasifikovat na ektoparazitoidy, kteří se vyvíjejí na hostiteli a endoparazitoidy, kteří se vyvíjejí z vajíčka uloženého v hostitelském organismu (Helyer *et al.* 2014). Na hostiteli se často živí pouze nedospělé stádium parazitoida a zabije pouze jednoho hostitele, dospělci žijí volně a většinou se živí sáním nektaru (Dreistadt 2007). Lokalizace hostitele parazitoidy probíhá pomocí chemických podnětů, které produkují sami hostitelé nebo napadené rostliny. Pokud parazitoid lokalizuje hostitele, začíná s ohledáním a v krátkém časovém úseku buď samička naklade vajíčko do hostitele, nebo se jím začne živit (van Lenteren, Woets 1988). Biologické prostředky na bázi parazitoidů obsahují převážně kukly.

Jako klasické příklady používaných parazitoidů lze uvést parazitoidy larev molice mšicovníka *Eretmocerus eremicus* a vosičku *Encarsia formosa*. Dospělci mnoha parazitoidních vosiček se mohou živit také jako predátoři, kdy zabíjejí jeden nebo více druhů škůdců a výrazně přispívají k jejich regulaci (Helyer *et al.* 2014). Mezi další významné parazitoidy zařazujeme mšicomary *Aphidius colemani* a *A. ervi* proti mšicím, parazitoidy vrtalek lumčíka *Dacnusa sibirica* a Lesknatku *Diglyphus isae* (Hajek 2004; Tichá 2001). V polních podmínkách se využívají drobněnky rodu *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), které svým vzrůstem patří mezi nejmenší hmyz na světě. Druhy tohoto rodu jsou známy jako parazitoidi vajíček celé řady zástupců řádu motýli (Lepidoptera). V České republice jsou pro použití v ochraně rostlin registrovány druhy *T. brassicae*, *T. pintoi* a *T. evanescens*. Ve Švýcarsku byl od roku 1975 masově chován druh *T. evanescens* a od roku 1978 využíván v kukuřici proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*) (van Lenteren 2012).

Predátoři

Predátoři patří také k významným přirozeným nepřítelům členovců a jsou zastoupeni v mnoha řádech třídy hmyzu a v některých čeledích roztočů (Acarina). Tyto makroorganismy jsou na svou oběť vázány pouze potravně, to je odlišuje od parazitů a parazitoidů (Hoffmann, Frodsham 1993). Jejich životní strategie se od strategie parazitoidů a parazitů liší i specializací, kdy některé druhy parazitoidů jsou převážně specializované na úzkou skupinu hostitelů, kdežto predátoři mají široký okruh hostitelů, kterými se živí (Osborne *et al.* 2004). Spotřeba potravy je oproti parazitoidům vysoká (Hoffmann, Frodsham 1993). Někteří predátoři mohou být polyfágní, kdy napadají široký okruh hostitelů, ale zpravidla preferují potravně určitý druh (Navrátilová 2015a). Napadení obvykle probíhá propíchnutím kutikuly hostitelského organismu, kdy se poškodí jeho vnitřní orgány a následuje buď vysání tělní tekutiny nebo konzumace celého těla hostitele predátorem. U mnoha predátorů se kořistí (hostitelem) živí pouze larvální stádium a dospělci přežívají na rostlinné potravě jako je rostlinný nektar, pyl nebo medovice hmyzu. U predátorů jako jsou např. slunéčka se však larvální i dospělé stádium živí výhradně hostitelem (Helyer *et al.* 2014). Biologické prostředky na bázi predátorů jsou k dostání ve formě dospělců.

Mezi významné predátory využívané v BOR zařazujeme např. bejlmorku *Aphidoletes aphidimyza*, která je predátorem všech běžných druhů mšic, slunéčko *Cryptolaemus montrouzieri*, které se využívá kosmopolitně proti červcům, dravou ploščici Klopoušku *Macrolophus caliginosus* a hladěnku *Orius laevigatus* predátory molice, trásněnek, mšic a svilušek (van Lenteren 2012; Moayeri *et al.* 2006; Helyer *et al.* 2003). Mezi biologické prostředky na bázi dravých roztočů patří např. *Amblyseius cucumeris* napadající trásněnky, *Phytoseiulus persimilis*, který

je hlavním prostředkem biologické ochrany proti svilušce chmelové, dravý roztoč *Typhlodromus pyri* predátor řady škodlivých roztočů (svilušky, hálčivci) (Hajek 2004) a *Hypoaspis aculeifer* roztoč živící se larvami smutnic, muchnic, trásněnek a jiného hmyzu a také chvostoskoky a roztoči (Helyer *et al.* 2003; Zhang 2003).

Mikroorganismy – 2. skupina přirozených nepřátel

Jako mikroorganismy jsou označovány organismy, které jsou dobře viditelné pouze pod mikroskopem. Některé druhy mikroorganismů jsou schopny vyvolat hromadné nákazy škůdců doprovázené zhroucením jejich populací (Tichá 2001). Mikroorganismy druhé skupiny přirozených nepřátel se nazývají patogeny. Jedná se o mikroorganismy, které způsobují onemocnění škodlivých organismů s jejich následným usmrcením. Patogeny parazitují buď přímo na hostiteli nebo uvnitř hostitele, kdy dojde v důsledku působení toxinů patogenů k destrukci vnitřních orgánů hostitele. Téměř ve všech případech je hostitelský organismus zabit (Helyer *et al.* 2014). Do této skupiny zařazujeme bakterie, houby, viry, hlístice a prvoky. Mikroorganismy jsou velmi důležité v BOR proti mnoha druhům škodlivých organismů včetně škodlivého hmyzu, hlístic, roztočů, plevle a jiných škůdců (Flint *et al.* 1998). Kromě přirozeně se vyskytujících mikroorganismů jsou v současnosti některé prospěšné patogeny komerčně vyráběny ve formě biopreparátů (Tab. č.1) (Gani *et al.* 2019; Dara 2018; Nafiu *et al.* 2014). Biopreparáty na bázi mikroorganismů reprezentují velmi rozmanitou skupinu. V současné době jsou na trhu biopreparáty na bázi entomopatogenních virů, bakterií, hub a hlístic (Landa 2002).

Použití mikroorganismů poskytuje výrazné výhody oproti mnoha jiným metodám ochrany rostlin. Hlavní výhodou využití mikroorganismů je jejich bezpečnost vůči životnímu prostředí především kvůli hostitelské specifitě těchto patogenů. Dále mají mikroorganismy přirozenou schopnost způsobovat epizoozie v populacích škůdců, kdy dochází k jejich úplnému zhoroucení (Koul 2011). Mnoho patogenů hmyzu je kompatibilních s jinými metodami ochrany rostlin, včetně chemických insekticidů. Náklady na vývoj a registraci mikrobiálních insekticidů jsou mnohem nižší než náklady na chemické insekticidy. Ve většině případů je populace škůdců dlouhodobě regulována. Kultura a aplikace ve velkém měřítku je relativně snadná a levná (Kachhawa 2017).

Entomopatogenní bakterie

Nejvýznamnější čeledí v BOR je čeleď Bacillaceae, zejména rody *Clostridium* a *Bacillus*. Doposud bylo izolováno více než 90 druhů bakterií, které vykazují patogenitu k hmyzu (Landa 2002). Nejvýznamnější bakterií, která je využívána v BOR proti škůdcům z řádu Coleoptera, Lepidoptera a Diptera patří *Bacillus thuringiensis* (Bt). *B. thuringiensis* je půdní tyčinkovitá bakterie, která tvoří při sporulaci v buňce krystal speciální bílkoviny, která se nazývá Cry-protein. Tato bílkovina je toxická pro hmyz a nese název δ -endotoxin, tyto toxiny jsou kódovány plazmidy *B. thuringiensis* (Ibrahim *et al.* 2010). δ -endotoxiny, jsou součástí tzv. krystalu (proteinové inkluze), který představuje klíčový prvek toxicity a selektivity biopreparátů na bázi tohoto mikroorganismu (Landa 2002). Infekce začíná po pozření potravy larvou hmyzu a toxické bílkovinné proteiny se ve střevě hostitele aktivují a způsobují rozklad střevní stěny, v jehož důsledku nakažený hmyz hyne na bakteriální

sepsi (Hajek 2004). Díky této vlastnosti se používá buněk *B. thuringiensis* jako specifického insekticidu. Účinnost *B. thuringiensis* je dostatečná za teplotních podmínek, kdy probíhá aktivní žír housenek. V extrémně horkých dnech se však efekt zásahu snižuje (Falta 2018). Biopreparáty na bázi bakterie *B. thuringiensis* jsou pro člověka a užitečné organismy bezpečné a celosvětově jsou to nejrozšířenější biopesticidy kompatibilní s životním prostředím (Ibrahim *et al.* 2010).

Využíváno je několik poddruhů bakterie *B. thuringiensis* s odlišným spektrem citlivých skupin hmyzu. Poddruhy *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* a *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* účinkují proti housenkám motýlů, *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* nachází uplatnění proti některým broukům (např. květopasu jabloňovému) a *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* má potenciální využití proti dvoukřídlému hmyzu. V ovocnářství se využívají především *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* a *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* v ochraně proti housenkám a obalečům (Falta 2018). Insekticidní Bt geny byly začleněny do genomu významných plodin, což je činí odolnými vůči škůdcům (Ibrahim *et al.* 2010). Do rodu *Bacillus* sp. patří i další entomopatogenní druhy, např. *B. larvae*, *B. cereus*, *B. laterosporus* a *B. popilliae* (Omkar, Kumar 2016).

Entomopatogenní hlístice

Entomopatogenní hlístice jsou půdní organismy, které žijí přirozeně v půdě a jsou patogenní k mnoha druhům škodlivých organismů. Svého hostitele lokalizují v reakci na oxid uhličitý, vibrace a jiné chemické podněty (Kaya *et al.* 1993). Pro biologickou ochranu jsou nejdůležitější entomopatogenní hlístice z čeledi Steinernematidae rod *Steinernema* a Heterorhabditidae rod *Heterorhabditis*. Oba rody jsou asociovány s bakteriemi rodu *Photorhabdus* a *Xenorhabdus* (Ferreira, Malan 2014). Rody *Steinernema* a *Heterorhabditis* patří mezi vysoce virulentní obligátní parazity hmyzu (Landa 2002). Infekční juvenilní (3. stádium) entomopatogenní hlístice aktivně vyhledávají své hostitele a vstupují do nich přes přirozené otvory, jako jsou ústa, průduchy, konečník nebo intersegmentální membrána (Dara 2018). Po kolonizaci hostitele do jeho těla uvolňují z jícnu symbiotické bakterie, které způsobí septikémii larev hmyzu. Symbiotické bakterie následně slouží jako potrava pro hlístice, které uvnitř těla prodělávají svůj vývojový cyklus. Klíčovým mechanismem tohoto parazitizmu je symbiotická asociace entomopatogenních hlístic se specifickými bakteriemi, které by jinak nebyly schopné hostitele parazitovat (Lacey, Georgis 2012; Bailey *et al.* 2010). Napadené larvy jsou obvykle usmrcovány již během dvou dnů (Navrátilová 2015b). Účinnost je závislá na vlhkosti půdy a její teplotě (nad 12 °C). Těžiště využití přípravků je v ošetření substrátů pro sadbu (Falta 2018).

Entomopatogenní houby

Entomopatogenní houby jsou organismy, které jsou běžnou součástí ekosystémů a vyskytují se jak v půdním prostředí, tak i na nadzemních částech rostlin, kde způsobují přirozené epizootie v populacích hmyzu (Butt, Goettel 2000). Mají široké hostitelské spektrum, proto jsou často využívány v biologické ochraně rostlin. Podrobnější charakteristika entomopatogenních hub je popsána níže v samostatné kapitole.

Entomopatogenní mikrosporidie

Entomopatogenní mikrosporidie jsou extrémně různorodou skupinou organismů, které zahrnují kolem 1000 druhů napadajících bezobratlé živočichy včetně hmyzu (Brooks *et al.* 1988). Dříve byly mikrosporidie řazeny mezi prvoky, ale na základě porovnávání určitých molekulárních znaků se postupně dospělo k názoru, že budou mikrosporidie řazeny mezi houby. Obvykle jsou mikrosporidie specifické ke svému hostiteli a vyvolávají pomalé a chronické infekce s obecným oslabením hostitele. Hostitel musí mikrosporidie přijmout potravou, aby došlo k infekci. Vývoj začíná jednoduchou mikroskopickou buňkou sporoplazmou vpravenou do cytoplazmy buňky hostitele dutým vláknem vystřeleným ze spory během explozivního klíčení. Sporoplazma roste a mění se ve stadium zvané meront, které dále roste, dělí se a postupně dceřinými buňkami zaplňuje hostitelskou buňku, což způsobuje infekci hostitele (Vávra 2017). Infekce má za následek snížení vitality, životnosti hostitele, plodnosti a je snížen příjem potravy hostitelem (Solter *et al.* 2000). V biologické ochraně se využívá druh *Paranosema locustae*, který parazituje sarančata. Tato mikrosporidie je uměle množena a v USA se její spory používají v návnadových prostředcích (Semaspore Bait, Nolo Bait) ke snižování počtu sarančat na pastvinách. Kromě jiného nákaza také omezuje u sarančat produkci agregačního feromonu, který vede k jejich masovým migracím. Jde o velmi účinný způsob biologických metod ochrany, protože mikrosporidie na ošetřené pastvině dlouhodobě přetrvávají a jsou vysoce hostitelsky specifické, takže návnada nezasáhne jiné organismy. I řada dalších hmyzích mikrosporidií pomáhá regulovat populace škodlivého hmyzu, jako např. *Nosema pyrausta*, efektivně omezující výskyt zavíječe kukuřičného (Vávra 2017; Solter *et al.* 2000).

Entomopatogenní viry

V ochraně sadů jsou úspěšně využívány dva druhy entomopatogenních virů z čeledi Baculoviridae, a to virus granulózy obaleče jablečného (CpGV) a virus granulózy obaleče zimolezového (AoGV). Vznik těchto přípravků můžeme považovat za jeden z největších úspěchů vývoje metod biologické ochrany ovoce (Falta 2018).

Entomopatogenní viry čeledi Baculoviridae jsou velké tyčinkovité DNA viry, kdy jejich virion je buď samostatně (Granulovirus), nebo ve skupinách (viry jaderné polyedrie, Nuclear Polyhedrosis Viruses) obalen bílkovinnou membránou, která je zapouzdřena v sekundární proteinové matici (Omkar, Kumar 2016). Infekce začíná po pozření potravy, která obsahuje virové částice. Virus infikuje buňky střeva, a poté se šíří do celého těla, kdy je porušena integrita tkání hostitele. Finálním stádiem virového onemocnění je úplné ztekucení tělního obsahu hostitele, praskání kutikuly a kapénková kontaminace (Bailey *et al.* 2010). Před smrtí infikované larvy stoupají do vyšších pater rostlin, což napomáhá šíření virových částic z mrtvých hostitelů do spodních částí rostlin, kde se nacházejí zdraví jedinci. Toto chování napomáhá šíření viru a způsobuje infekci u zdravých larev (Dara 2018). Viry jsou pro hostitele velmi specifické, vyvolávají onemocnění pouze u jediného druhu hostitele (Omkar, Kumar 2016), ale i tak mohou způsobit významné snížení hostitelské populace. Během 2-4 dnů virus zasáhne většinu orgánů hostitele a larva přestane přijímat potravu. Po úhynu organismu dojde k uvolnění milionů nových virů do prostředí a k infikování dalších larev (Falta 2018). Částice viru se mohou šířit také deštěm a jinými organismy (Bailey *et al.* 2010).

Laboratorní testy prokazují, že 1-2 přijaté virové částice na 1 larvu vedou k 50% mortalitě v populaci. Účinnost lze proto srovnat s běžnými insekticidy, nutná je však přesná signalizace ošetření, kterou směřujeme na počátek líhnutí housenek (Falta 2018). Viry z této skupiny způsobují infekce jen u hmyzu a jsou biochemicky i geneticky velmi odlišné od virů, které napadají obratlovce, díky čemuž jsou považovány za bezpečné pro člověka, jsou také zcela selektivní k necílovým organizmům včetně přirozených nepřátel a opylovačů (Bailey *et al.* 2010).

Tab. č. 1: Biopreparáty na bázi různých entomopatogenních mikroorganismů
(upraveno podle Bamisile *et al.* 2021; Gani *et al.* 2019; Dara 2018)

Mikroorganismus	Biologický přípravek	Hostitel
Bakterie <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>aizawai</i> <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> <i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>tenebrionis</i> <i>Poenibacillus popilliae</i>	Agree WG, XenTari DF Mosquito Beater WSP CoStar, DiPel ES, Monterey B.t., Thuricide Lepinox® Plus Novodor FC, Milky Spore Powder	Motýli Dvoukřídlí Motýli Brouci <i>Popillia japonica</i>
Hlístice <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> <i>Steinernema carpocapsae</i> <i>S. feltiae</i> <i>H. bacteriophora</i> a <i>S. carpocapsae</i>	Nemasys, Terranem, Nematop, Dianem Ecomask, NemAttack Entonem, Fungus Gnat & Rootknot Exterminator, Scanmask, Nemaplus Double-Death	Půdní škůdci
Houby <i>Beauveria bassiana</i> <i>Hirsutella thompsonii</i> <i>Isaria fumosorosea</i> <i>Lecanicillium lecani/muscarium</i> <i>L. longisporum</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>M. brunneum</i>	BotaniGard ES, Mycotrol-ESO, Myco-Jaal, Naturalis-L ABTEC Hirsutella NoFly WP, Pfr-97 WDG Phule Bugicide, Mycotal Vertalec BioCane, Metarril, Ory-X Met52 EC	Roztoči, Brouci, Dvoukřídlí, Stejnokřídlí, Blanokřídlí, Motýli, Rovnokřídlí, Třásnokřídlí
<i>Paecilomyces lilacinus</i> <i>Pochonia chlamydosporia</i>	MeloCon WG Pochar	Fytopatogenní hlístice
Viry Granulovirus (GV) <i>Cydia pomonella</i> GV Nucelopolyhedrovirus (NPV) <i>Helicoverpa zea</i> NPV <i>Spodoptera exigua</i> <i>Lymantria dispar</i> NPV	CYD-X, MADEX HP Gemstar LC Spod-X LC Gypchek	Motýli

2.3 Charakteristika entomopatogenních hub

V současné době vzrůstá zájem o redukci škodlivých činitelů pomocí biologických metod ochrany rostlin. Veliká pozornost je směřována i na entomopatogenní houby, které představují jednu z nejvýznamnějších skupin přirozených nepřátel prakticky všech druhů škodlivého hmyzu (Landa *et al.* 2008; Roy, Cottrell 2008). Houby žijící s hmyzem v jakémkoli typu vztahu se obecně nazývají entomogenní. Mnohé z nich se po dlouhou dobu vyvíjely zároveň se svými hostiteli a vznikli tak komenzálové nebo mutualisti, z jiných naopak obligátní nebo fakultativní patogeny, jež nejčastěji označujeme jako entomopatogenní houby (Kubátová 2017). Entomopatogenní houby jsou nejčastějšími původci onemocnění hmyzu (Obr. 1) (Sutanto *et al.* 2021; Lovett, Leger 2017), ale mohou vykazovat také akaropatogenní efekt, kdy se podílejí na přirozené regulaci početnosti řady druhů roztočů (Pell *et al.* 2010).

Entomopatogenní houby jsou jedinečné v tom, že na rozdíl od ostatních mikroorganismů, které jsou také schopni vyvolávat onemocnění u hmyzu, nevyžadují přímé vstřebání, ale jsou schopny aktivně pronikat skrz epikutikulu hmyzu (Pedriny *et al.* 2007). A ačkoliv tyto houby napadají hmyz prakticky ze všech hlavních řádů (Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera, Orthoptera, Hymenoptera) a mohou též napadat všechna vývojová stádia (Bailey *et al.* 2010), jednotlivé druhy jsou často vůči hostiteli velmi specifické a existuje zde tak jen velmi malé riziko vzhledem k necílovým organismům (Roberts, Humber 1981).



Obr. 1: Ukázka napadení entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* CCM 8367 na kukle zavíječe zimostrázovéhého (vlevo) a na dospělci mandelinky bramborové (vpravo)

Z hlediska využití entomopatogenních hub, jakožto součásti biologické ochrany rostlin, poskytuje velkou výhodu fakt, že entomopatogenní houby jsou naprosto přirozenou součástí půdního prostředí. Půda jako taková jim poskytuje ideální podmínky, kde jsou chráněny před extrémními teplotami a slunečním zářením a je také přirozenou lokalitou výskytu potenciálních hmyzích hostitelů (Humber 2008). Entomopatogenními houbami lze také půdu (substrát) obohatit. Houby aplikované do půdy (substrátu) ji kolonizují a jsou schopny přežít na alternativním materiálu jako je organická hmota nebo mohou saprofytický růst v rhizosféře (Wang *et al.* 2005). Substráty obohacené entomopatogenními houbami se mohou použít v zahradnictví

nebo ve skleníkových kulturách. Výsevni substráty obohacené entomopatogenními houbami již i u nás existují a jsou snadno dostupné pro běžné spotřebitele.

Entomopatogenní houby jsou tak neodmyslitelnou součástí biologické ochrany rostlin proti škůdcům. Jako mykoinsekticidy se mohou využívat v zahradnictví, lesnictví a zemědělství (Gul *et al.* 2014).

2.3.1 Taxonomické zařazení a klasifikace

Entomopatogenní houby jsou fylogeneticky rozmanitou skupinou, heterotrofních, eukaryotických, jednobuněčných nebo mnohobuněčných (vláknitých) mikroorganismů, které se rozmnožují buď pohlavně (teleomorfní stádium) nebo nepohlavně (anamorfní stádium). Některé druhy těchto hub mají teleomorfní i anamorfní stádium (Mora *et al.* 2017). U některých zástupců entomopatogenních hub není stále známá teleomorfa. Právě nalezení teleomorfních stádií jednotlivých hub a jejich fylogenetické zařazení včetně historie jejich vývoje nám může dopomoci k pochopení ekologických rolí entomopatogenních hub v přírodě (Kaczmarek, Boguś 2021; Shahid *et al.* 2012). V posledních letech dochází k zásadním revizím v oblasti taxonomického zařazení jednotlivých druhů na základě testování pomocí molekulárně-biologických metod. Nejzásadnější změny klasifikace proběhly u hub spadající do řádu Hypocreales oddělení Ascomycota u anamorfních stádií jejich zástupců (Tiago *et al.* 2014; Humber *et al.* 2009). Klasifikace entomopatogenních hub v jednotlivých odděleních říše Fungi je podrobněji popsána v Tab. č. 2.

Pokroky v molekulární biologii vedly k vývoji různých metod detekce genetického polymorfismu na úrovni DNA a pomohly nám porozumět genetické rozmanitosti a populačním strukturám populací hub (Hibbett *et al.* 2007).

2.3.2 Charakteristika významných řádu Hypocreales a Entomophthorales

Řád Hypocreales sdružuje fakultativní parazity, které je možné kultivovat na umělých živných půdách a substrátech, a proto se v současnosti hojně využívají ve formě standardních biopreparátů. Lze je také snadno vyizolovat z půdy nebo infikovaných hostitelů (Sharma *et al.* 2021). Do tohoto řádu patří houby s širokým hostitelským spektrem, a zařazují se sem významné rody entomopatogenních hub jako jsou *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Isaria* a *Lecanicillium* (Shah, Pell 2003). Tyto houby jsou pravděpodobně za normálních okolností saprotrofní organismy využívající ke své výživě mrtvou organickou hmotu a pouze za vhodných environmentálních podmínek jsou schopny využívat jako zdroj surovin i exoskelet žijícího hmyzu. Z toho vyplývá, že entomopatogenní houby jsou schopny realizovat jak parazitický (v případě přítomnosti vhodného hostitele), tak i neparazitický, saprotrofní cyklus (Landa *et al.* 2008; Shah, Pell 2003). De Faria a Wraight (2007) identifikovali 171 produktů na bázi hub, které se používají jako biopreparáty od šedesátých let, většina z nich na bázi *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* a *Isaria fumosorosea*.

Řád Entomophthorales zahrnuje houby patřící do rodů *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Neozygites* a další. Jsou to obligátní parazité,

kteří jsou striktně vázáni na jeden konkrétní druh živého hostitele, a většinou nejsou schopny saprofytismu (Shah, Pell 2003). Jejich vztah s hostiteli se projevuje i ve strategii šíření, zatímco fakultativně parazitických zástupců Hypocreales nevyvinuly žádné speciální strategie šíření. Usmrcení hostitelé zástupci řádu Entomophthorales zůstávají zpravidla přichyceni pomocí rhizoidů produkovaných houbou na povrchu listu či stébla a spory houby jsou aktivně, na základě rozdílného tlaku mezi konidii a konidioforem vymršťovány do prostředí, kde je vyšší šance styku s novým potenciálním hostitelem (Kubátová 2017; Bailey *et al.* 2010; Shah, Pell 2003). V případě nevyhovujících podmínek prostředí, popřípadě absence vhodného hostitele jsou zástupci Entomophthorales schopni produkovat trvalé zygospory či azygospory, které v prostředí dokáží přežít delší období (Shah, Pell 2003). Jelikož jsou zástupci řádu Entomophthorales obligátní parazité je velmi komplikované vyvinout biopreparáty ne jejich bázi (Bailey *et al.* 2010).

Tab. č. 2: Klasifikace entomopatogenních hub v jednotlivých odděleních říše Fungi (Upraveno podle Naranjo-Ortiz, Gabaldón 2019; Kubátová 2017)

Oddělení	Rody entomopatogenních hub (příklady)
Microsporidiomycota (Microsporidia)	<i>Amblyospora, Bacillidium, Campanulospora, Culicosporella, Episeptum, Flabelliforma, Geusia, Hazardia, Heterovesicula, Microsporidium, Nosema, Orthosomella, Perezia, Pilosporella, Pulsispora, Resiomera, Spherospora, Striatospora, Tardivesicula, Toxoglugea, Vairimorpha, Vavraia, Weiseria</i>
Ascomycota	<i>Ascospaera, Cordyceps</i> (anamorfy: <i>Beauveria, Isaria, Lecanicillium, Simplicillium</i>), <i>Culicinomyces, Elaphocordyceps</i> (anamorfa: <i>Tolypocladium</i>), <i>Hypocrella</i> (anamorfa: <i>Aschersonia</i>), <i>Metacordyceps</i> (anamorfy: <i>Pochonia, Metarhizium</i>), <i>Moelleriella, Nectria, Ophiocordyceps</i> (anamorfy: <i>Hirsutella, Hymenostilbe</i>), <i>Samuelsia, Torubiella</i>
Entomophthoromycota	<i>Basidiobolus, Conidiobolus, Entomophthora, Entomophaga, Massospora, Neozygites, Pandora</i>
Chytridiomycota	<i>Myiophagus, Myrmicinosporidium</i>
Neocallimastigomycota	<i>Rozella</i>
Blastocladiomycota	<i>Coelomyces, Coelomycidium</i>
Kickxellomycotina	<i>Smittium</i>
Mucoromycotina	<i>Sporodiniella</i>
Zoopagomycotina	<i>Zoophagus</i>
Glomeromycota	<i>Rhizophagus</i>
Basidiomycota	<i>Septobasidium, Uredinella</i>

*Modře jsou označeny nejvýznamnější skupiny entomopatogenních hub. Anamorfy byly v některých případech nejdříve popsány jako samostatný taxon.

2.3.3 Výskyt a rozšíření

Entomopatogenní houby jsou všudypřítomné organismy tam, kde jim podmínky prostředí umožňují jejich přežití (Jaronski *et al.* 2007). Tyto houby se přirozeně vyskytují v přírodních i zemědělských akroekosystémech, vodním prostředí nebo v podzemních nikách (Lovett, Leger 2017; Pell 2007). Také se vyskytují druhy hub, které žijí nejen na hmyzu, ale i na mrtvém substrátu organických zbytků semen, listů a kůry, další mohou mít vedle parazitického vztahu s hostitelem i vztah symbiotický (Weiser 1966).

2.3.4 Vývojový cyklus

Houbové patogeny hmyzu využívají různé mechanismy k infikování hostitele. K nákaze dochází nejčastěji prostřednictvím houbových spor, které se v prostředí šíří různými způsoby jako např. vodou, vzduchem nebo na tělech drobných živočichů (Kubátová 2017).

Životní cyklus entomopatogenních hub se skládá z parazitické fáze (infekce hostitele a následná smrt) následované fází saprofytickou (po smrti hostitele). Na rozdíl od jiných entomopatogenních organismů (bakterie, viry), které obvykle vstupují do těla hostitele pasivně s potravou, jsou entomopatogenní houby schopny infikovat svého hostitele nejčastěji přímou penetrací přes jeho exoskelet a kutikulu (Augustyniuk-Kram, Kram 2012). K této funkci jsou vybaveny enzymatickým aparátem, tvořeným lipázami, proteázami a chitinázami. Tyto enzymy považujeme za indikátory virulence (de Carolina Sánchez-Pérez *et al.* 2014).

Fáze infekčního cyklu (upraveno podle Zimmermanna 2007a)

1. Přichycení spor na kutikulu hostitele
2. Klíčení spor
3. Produkce apresoria a penetrace do kutikuly
4. Překonání imunity hostitele
5. Kolonizace hostitele (tvorba blastospor)
6. Prorůstání na povrch hostitele, sporulace (tvorba konidií)

První fází infekčního cyklu je přichycení spor na povrchu hostitele (Da Silva *et al.* 2010; Pedriny *et al.* 2007). Ulpění konidií na povrchu hostitele je jednou z nejdůležitějších fází pro úspěšný rozvoj patogena a následně infekce (Shahid *et al.* 2012; Song, Feng 2010). Z tohoto důvodu obsahují konidie některých druhů např. adhezivní substance (*Lecanicillium lecanii*, *Aschersonia aleyrodii*, *Hirsutella thompsonii*) (Boucias *et al.* 1991; Boucias *et al.* 1988). Jiné druhy mohou obsahovat hydrofobní konidie se strukturovaným povrchem (*Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea*), kdy je přichycení na kutikulu zajištěno přímou interakcí mezi dvěma hydrofobními povrchy nebo na základě elektrostatických sil (Landa *et al.* 2008). Morfologie spor, povrchové vlastnosti spor a počátky infekce jsou považovány za naprosto zásadní faktory v procesu infekce hmyzího hostitele (Hussain *et al.* 2010).

Po přichycení konidií na povrch těla hostitele dochází při vhodných podmínkách k nabobtnání konidie, kdy se začne tvořit primární klíček (Landa 2002). Pro klíčení konidií entomopatogenních hub je spora energeticky dostatečně vybavena,

ale od určité fáze naklíčení je nezbytná přítomnost externího zdroje uhlíku (Smith *et al.* 1981). Entomopatogenní houby jsou v prvních fázích vývoje schopny využívat chitin a některé mastné kyseliny z povrchových struktur kutikuly hostitele, což je naprosto zásadní schopnost pro úspěšný vývoj houby (Feron 1978). Po naklíčení produkují konidie infekční strukturu nazývanou apresorium. Apresorium s vytvořeným penetračním hrotem vytváří mechanický tlak a kutikulu degradující enzymy, přičemž hlavní roli mají enzymy lipázy, proteázy a chitinázy (Lovett, St. Leger 2015). Proniknutí do těla hostitele se děje buď přímou penetrací do kutikuly nebo prostřednictvím přirozených tělních otvorů, jakými jsou dýchací otvory, řitní nebo ústní otvor, vzácně i přes různá poranění (Gillespie *et al.* 1998).

Samotná infekce hmyzího hostitele je komplexní proces, kterého se bezprostředně účastní látky, které jsou produkovány houbou. Tyto látky usnadňují penetraci do hostitelského organismu (Pedriny *et al.* 2007). Mezi látky produkované houbami patří různé toxiny a enzymy, které redukuje obranné mechanismy hostitele nebo napomáhají houbě se s těmito obrannými mechanismy hmyzu vyrovnat (Inglis *et al.* 2001). Pro překonání voděodolné svrchní vrstvy, epikutikuly, houba využívá lipázy (enzymy ze skupiny hydroláz rozkládající tuky na glycerol a absorbovatelné mastné kyseliny). Poté jsou produkovány proteázy, rozkládající bílkovinné látky, a chitinázy, degradující chitinový exoskelet (Kubátová 2017). Hussain *et al.* (2010) dávají přímou spojitost virulence konkrétního kmene entomopatogenní houby nejen s množstvím spor a rychlostí klíčení, ale zejména kutikulou degradujícími enzymy, z nichž za nejvýznamnější považuje enzym Pr1, což je alkalická serinová proteáza se zbytkem histidinu v aktivním místě. Tento enzym uvolňuje peptidy, které sami o sobě indukují jeho další výrobu.

Po proniknutí patogena do těla hostitele dochází k rychlé kolonizaci jednotlivých tělních tkání a orgánů. Pro tuto fázi vývojového cyklu je typický přechod vláknitých forem hub na rychle se dělicí a pomnožující tělíska tzv. blastospor. Blastospor se v hostitelském organismu rychle množí a roznesou se hemolymfou po celém organismu (Landa *et al.* 2008). Infikovaný hmyz jeví různé symptomy napadení, pohybuje se nekoordinovaně, přestává přijímat potravu, a nakonec dochází k paralýze a úhynu. Po invazi je hmyz usmrcen v důsledku růstu blastospor, produkce toxinů, popř. kombinací obojího (Kubátová 2017).

Po smrti hostitele hyfy entomopatogenní houby kolonizují mrtvé tělo a během 2 až 3 dnů prorostou na povrch mrtvého těla hostitele, kde se vytvoří vzdušné konidiofory, které začnou sporulovat, a cyklus je ukončen. Houba přechází do saprofytické fáze svého vývoje (Lovett, St. Leger 2015; Clarkson, Charnley 1996). Sporulace probíhá běžně na mrtvém hmyzu, ale může se vyskytovat i u živého hmyzu. Rozptyl spor může být aktivním nebo pasivním procesem a závisí na vlastnostech spor (Tanada, Kaya 1993). Spory se dále šíří do okolí větrem a vodou, a pokud hned nepřilnou na nového hostitele, mohou v prostředí přežít na mrtvých mumifikovaných hostitelích nebo v půdě (Augustyniuk-Kram, Kram 2012).

2.4 Faktory ovlivňující účinnost entomopatogenních hub

I přes dlouhodobé studium entomopatogenních hub je jejich komerční využití a všeobecné přijetí širokou zemědělskou praxí stále limitováno určitými překážkami, a to zejména vlhkostními podmínkami v polních podmínkách, slunečním zářením, teplotou nebo efektivní formulací do finálního komerčního přípravku (Vega 2008).

V souvislosti se zmiňovanými limity je třeba dodat, že rozsah znalostí o ekologii a epizootii entomopatogenních hub je stále nedostatečný (Pell *et al.* 2010). Účinnost entomopatogenních hub je přímo ovlivněna působením abiotických a biotických faktorů (Jaronski 2007). Proto je velmi důležité najít způsob, jak vliv těchto faktorů eliminovat, omezit nebo alespoň předpovědět vhodné aplikační okno pro využití preparátů na bázi entomopatogenních hub (Vidal, Fargues 2007).

2.4.1 Biotické faktory: Interakce houba-hostitel

Interakce mezi houbou a hostitelem jsou vždy oboustranné. Houbový patogen vyvíjí nové, účinnější látky a cesty k infekci hostitele, hostitel stejně intenzivně vyvíjí a zdokonaluje své obranné reakce (Jarrold *et al.* 2007).

Patogen

Základní vlastností patogena musí být schopnost vyvolat onemocnění. Tato schopnost se nazývá patogenita. Patogenita je závislá na fyziologii hostitele, fyziologii a virulenci houby a životním prostředí (Inglis *et al.* 2001).

Velmi důležitá je tzv. specifita k hostiteli, která je jedním z hlavních hodnocených parametrů organismů nebo biopreparátů používaných v rámci biologické ochrany rostlin (Santi *et al.* 2010). Selektivita některých entomopatogenních hub je pravděpodobně dána povrchovými strukturami na těle hostitele a jejím chemickým složením (Pedriny *et al.* 2007). Některé sloučeniny jsou při počátečních fázích infekce vyžadovány, protože působí jako stimulatory klíčení konidií (Jarrold *et al.* 2007). Proto mají některé druhy entomopatogenních hub široký okruh hostitelů včetně jejich různých vývojových stádií (např. *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* a *Isaria fumosorosea*) nebo mají naopak úzký hostitelský okruh, kdy je patogenita omezená jen na úroveň řádů (např. *Nomuraea rileyi* parazituje pouze na larvách motýlů nebo *Aschersonia aleyrodis*, která je úzce specializovaná jen na molice) (Landa *et al.* 2008).

Hostitel

Náchylnost hmyzu k entomopatogenním houbám ovlivňují fyziologické a morfologické faktory (hustota populace, chování, věk, výživa, genetika, zranění, imunita hostitele). Už v první fázi přichycení a klíčení konidií entomopatogenních hub na povrchu hostitele jsou známy složky, které dokážou inhibovat jejich klíčení (např. kyselina kaprylová) (Jarrold *et al.* 2007). Bylo dokonce pozorováno, že někteří členovci dokáží v případě infekce změnit své termoregulační chování. Jedná se především o proteiny tepelného šoku, které se vytvoří v hostiteli po napadení houbou, v důsledku čehož infikovaný hmyz zvýší svoji tělesnou teplotu nad normální hranici (Lovett, St. Leger 2015; Inglis *et al.* 2001). Ouedraogo *et al.* (2003) publikovali studii, kde prokázali že sarančata stěhovavá (*Locusta moratoria*), která byla infikovaná houbou *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* byla schopna změnit svou termoregulaci. Tam, kde byla změnou prostředí sarančatům umožněna i změna vlastní termoregulace, dokázali jedinci úspěšně infekci houbou vzdorovat, zatímco sarančata umístěná do stabilního prostředí bez možnosti zvýšit za pomoci externích vlivů svoji teplotu, infekci záhy podléhala. To může být způsobeno jak dosažením teploty

nevhodné pro růst patogena (Arthurs, Thomas 2001a), tak indukovaným vyvoláním imunitní odpovědi hostitele (Ouedraogo *et al.* 2003). Dalším důležitým faktorem je vývojové stádium hmyzu. Všechny etapy životního cyklu hmyzu nejsou stejně náchylné k infekci. V některých situacích jsou nedospělá stádia hmyzu náchylnější k infekci než dospělá stádia a naopak (Feng *et al.* 1994).

2.4.2 Abiotické faktory

Bylo prokázáno, že na účinnost entomopatogenních hub se významně podílí faktory prostředí jako je teplota, vlhkost a sluneční záření (Inglis *et al.* 2001). Abiotické faktory ovlivňují zejména šíření a klíčení konidií, penetraci invazní hyfy kutikulou a sporulaci patogena na mrtvém hostiteli (Tanada, Kaya 1993).

Sluneční záření

O rozdílech v toleranci ke slunečnímu záření u jednotlivých kmenů hub nemáme dostatek informací (Vidal, Fargues 2007). V přírodních podmínkách je spektrum slunečního záření označované jako UV-B (280-320 nm). Je to další limitující faktor, který působí na účinnost entomopatogenních hub. Sluneční záření může mít negativní vliv na všechny mikroorganismy (Inglis *et al.* 1995), a to již po krátké expozici (Braga *et al.* 2001a). Studie ukazují, že významným parametrem může být i kolísání úrovně záření během denní i roční periody (Braga *et al.* 2001c).

O negativním vlivu UV-B záření existuje mnoho studií např. studie zabývající se životností konidií *B. bassiana* aplikovaných ve vodní suspenzi na krycí sklíčko a vystavené UV-B záření. Již po patnácti minutách byla klíčivost redukována o více než 95 % (Inglis *et al.* 1995). V případě houby *M. anisopliae*, popsali Braga *et al.* (2001b) poměrně širokou variabilitu tolerance k vystavení UV-B záření napříč testovanými kmeny (redukce životnosti ale byla ve všech případech vysoká). Např. testovaný kmen *M. anisopliae* ARSEF 23 vystavený ozařování 1 hodinu vykázal po dvanácti hodinách klíčivost pouze 15 % v porovnání s neozářenou kontrolou, zatímco po 48 hodinách již dosahoval 95 % (Braga *et al.* 2001a).

Proti negativnímu vlivu slunečního záření jsou v biopreparátech často využívány UV protektanty. Některé nosiče, jako např. nosiče na olejové nebo jílové bázi, zajišťují ochranu před škodlivými účinky UV záření a dokáží vitalitu a přežívání konidií v polních podmínkách alespoň prodloužit (Thompson *et al.* 2006). Např. využití olejové formulace dokáže v laboratorních podmínkách na krycím sklíčku omezit mortalitu konidií na 74 % po vystavení UV záření po dobu 60 minut. V případě aplikace na list se za stejných podmínek zvyšuje mortalita až na 97 %, což může být vysvětleno absorbováním oleje listovými tkáněmi (Inglis *et al.* 1995). Za zvláštní typ UV protektantu může být považována i závlaha ihned po aplikaci konidií, protože ta pomůže sporám uniknout z přímého vystavení se UV záření do vrchních vrstev půdy (Thompson *et al.* 2006).

Vlhkost

Vlhkost je považována za klíčový faktor prostředí ovlivňující úspěšnost klíčení, rychlost infekce a letální efekt na hmyzí hostitele (Santos *et al.* 2009;

Landa *et al.* 2008). Za kritickou mez pro klíčení konidií je považována dolní hranice mezi 90 až 95 % relativní vzdušné vlhkosti (Vidal, Fargues 2007). Při poklesu relativní vzdušnosti pod dolní hranici se klíčivost konidií snižuje a úspěšnost infekce klesá. Např. klíčivost konidií *M. anisopliae* se při poklesu vlhkosti pod 90,2 % rapidně snižuje (Liu *et al.* 1989). Je mnoho studií, které dokládají důležitost relativní vzdušné vlhkosti, např. Arthurs, Thomas (2001b) stanovili optimální vlhkost při testování houby *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* na 96 %. Kope *et al.* (2007) upozorňuje na potřebu testovaných kmenů *Lecanicillium* na minimální 90% vlhkost.

Vlhkost půdy nebo substrátu v přirozených podmínkách ovlivňují také dešťové srážky nebo zavlažování. Zavlažování má pozitivní vliv na životnost aplikovaných konidií, kdy pomáhá dopravit konidie do hloubky, kde půda zajišťuje dostatečnou ochranu proti UV záření, které vitalitu konidií snižuje (Thompson *et al.* 2006).

Ohledně požadavků na vodní aktivitu nebyly pozorovány významně odlišné nároky na dostupnost vody pro růst mezi jednotlivými druhy *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* a *Paecilomyces farinosus*. Optimální hodnoty se při 25 °C pohybovaly v rozmezí vodní aktivity 0,99-0,97 a_w (Hallsworth, Magan 1999).

Teplota

Teplotní tolerance entomopatogenních hub je relativně vysoká (Landa *et al.* 2008). Ale tento faktor velmi výrazně ovlivňuje klíčení konidií, růst a reprodukci v těle hostitele a sporulaci (Vidal, Fargues 2007). Teplota tedy úměrně ovlivňuje délku vývojového cyklu (Landa *et al.* 2008) a je jedním z kritických faktorů účinnosti entomopatogenních hub (Jaronski 2007). Obecně jsou optimální teploty pro klíčení a růst v rozmezí 20-30 °C (Landa *et al.* 2007).

Bugeme *et al.* (2008) testovali různé kmeny *B. bassiana* a *M. anisopliae* a dospěli k závěrům, že neoptimálnější teplota pro klíčení spor je v rozmezí mezi 25 a 30 °C a pro nejproduktivnější radiální růst poté při teplotě 30 °C. Výsledky experimentů publikované Cabanillas, Jones (2009) s houbou *Isaria* spp., ukázaly na lineární průběh radiálního růstu až do teploty 30 °C, kdy bylo dosaženo optima. Při vyšších teplotách (35-40 °C) nebyl pozorován žádný myceliální růst. Podobné výzkumy provedl i Kope *et al.* (2007) s několika izoláty *Lecanicillium*. Prokazatelný růst byl pozorován v rozmezí od 5 do 30 °C s optimem ve 25 °C. Velmi podobné výsledky publikoval i Hallsworth, Magan (1999), kteří došli k závěru, že pro *M. anisopliae*, *B. bassiana* a *I. farinosa* jsou optimální teploty pro růst v rozmezí 20-30 °C.

Obecné rozpětí teplot není univerzální, protože kmeny získané z určitých geografických oblastí se často v podmínkách nápadně odlišují. Existují totiž druhy, které se nacházejí v oblastech s velmi nízkou teplotou, např. v Sub-Antarktidě, kde se vyskytují kmeny, které jsou adaptovány na nízké teploty a jsou schopni infikovat hmyz i při 5 °C (Lovett, St. Leger 2015), jakož i v oblastech s vysokou teplotou, např. v tropických pásmech, ve kterých je houba *M. anisopliae* schopna vyklíčit, růst a množit se i při teplotách nad 35 °C (Zimmerman 2007b).

Krátkodobě jsou entomopatogenní houby schopny přežít i teploty 40-45 °C (Landa *et al.* 2008). Varela, Morales (1995) dodávají, že vystavení konidií teplotám v rozmezí 45-50 °C po dobu 10 minut významně snižuje klíčivost a stejně dlouhé vystavení teplotě při 55 °C je již pro konidie letální. Vysokou termotoleranci potvrzují také Cabanillas, Jones (2009), kteří uvádí rozmezí od 0 do 40 °C, ale dodávají, že rozmezí teplot pro infekci, myceliální růst a sporulaci bývá často mnohem užší.

Je patrné, že teplota prostředí hraje velkou roli pro úspěšnou realizaci entomopatogenních hub. Pro redukci populací škodlivých činitelů je nezbytná nejen virulence konkrétního kmene, ale také jeho teplotní nároky ve vztahu k prostředí výskytu daného škůdce (Cabanillas, Jones 2009; Fernandes *et al.* 2007; Kope *et al.* 2007).

Podstatnou složkou biopreparátů na bázi entomopatogenních hub, která ovlivňuje termostabilitu, klíčivost a účinnost, je podle výzkumů Alvese *et al.* (2017) nejen vhodně zvolený kmen, ale i jeho konečná formulace. Tento výzkumný tým na pokusech s komerčními produkty Metarril® SP Organic and Metarril® WP prokázal, že zatímco konidie v olejové formulaci, vystavené pětidennímu cyklu při střídání teplot 40 °C po dobu 4 hodin následovaném 19 hodinami při teplotě 25 °C vykazovaly jen velmi mírný pokles v klíčivosti z 92,8 % první den na 87,2 % po 5 dnech. Naopak konidie připravené ve vodní formulaci zaznamenaly výrazný pokles klíčivosti ze 79,3 % po prvním dnu na 39,1 % po 5 dnech.

2.5 Nejvýznamnější druhy entomopatogenních hub

2.5.1 *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin

Rod *Beauveria* byl pojmenován francouzským doktorem Jeanem Paulem Vuilleminem v roce 1912, jako pocta francouzskému vědci Jeanu Beauveriovi (Vega 2007). Tento druh byl, ale objeven dříve, a to vědcem Agostino Bassi di Lodi, který jako poprvé popsal infekci na bourci morušovém (*Bombyx mori*) a nazval ji „bílou muskardinou“ (infikovaný jedinec porůstá bílým myceliem). Následně byl tento druh podroben testováním Giuseppe Gabriel Balsamo-Crivelli, který ho po objeviteli Bassim nazval *Botrytis bassiana* (Zimmermann 2007a). V současnosti taxonomicky náleží *B. bassiana* do řádu Hypocreales, čeledi Cordycipitaceae (Sung *et al.* 2007).

B. bassiana patří, stejně jako *M. anisopliae*, mezi nejprozkoumanější a nejběžnější se vyskytující zástupce entomopatogenních hub (Feng *et al.* 1994). Tato houba se vyskytuje celosvětově s výjimkou Antarktidy (Landa *et al.* 2007). Pro její výskyt je přirozené půdní prostředí (Thompson *et al.* 2006), a to zejména povrchové vrstvy (Landa *et al.* 2007). Byl prokázán i její endofytní výskyt v rostlinách (Vega 2008). Např. po kolonizaci sazenic bavlníků byla indukována rezistence vůči škodlivým organismům. V laboratorních podmínkách „*in vitro*“ byl naopak prokázán vliv řady metabolitů *B. bassiana* na omezení růstu rostlinných patogenů (Ownley *et al.* 2010). Houby rodu *Beauveria* jsou polyfágní druhy, které napadají více jak 700 druhů hostitelů, největší zastoupení hostitelů je v řádech *Lepidoptera* a *Coleoptera* (Landa *et al.* 2007).

Konidiogenní buňky *B. bassiana* mají kulatou nebo lahvicovitou bazální část. Konidie jsou jednobuněčné (Rehner *et al.* 2011), hyalinní, globoidního tvaru (Landa *et al.* 2008) až široce elipsoidní, o velikosti obvykle 2-3 x 2-2,5 μm, uspořádané ve shlucích a připomínající sněhové koule či chomáče bavlny. Na konidioforu jsou umístěny v tzv. „cik-cak“ postavení (Zimmermann 2007a).

V zahraničí je registrována řada biopreparátů formulovaných na bázi konidií nebo blastospor *B. bassiana*. V České republice je registrován biopreparát na bázi této houby pod názvem Botanigard WP. Biopreparáty na bázi *Beauveria bassiana* jsou využívány v ochraně proti různým škůdcům polních plodin, v ochraně rychlené

zeleniny a okrasných květin i v ochraně lesních porostů proti některým druhům škůdců, včetně lýkožrouta smrkového (Landa 2007).

2.5.2 *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith

Tento druh entomopatogenní houby byl dříve nazýván *Paecilomyces fumosoroseus*. Rod *Paecilomyces* byl popsán francouzským vědcem Georgem Bainierem. Později však bylo zjištěno, že některé druhy tohoto rodu jsou polyfyletické a byly převedeny do samostatného rodu *Isaria* (Vega 2007). Podle nejnovějších fylogenetických studií je rod *Isaria* řazen do řádu Hypocreales, čeledi Cordycipitaceae, a to na rozdíl od druhů, které jsou stále řazeny jako rod *Paecilomyces* spadající do čeledi Clavicipitaceae (Sung *et al.* 2007).

Rod *Isaria* reprezentuje široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub, které způsobují nákazy zástupců mnoha řádů hmyzu, roztočů a hlístic (Landa *et al.* 2008). *I. fumosorosea* je druh s celosvětovým výskytem a relativně širokým spektrem potenciálních hostitelů, přičemž v biologické ochraně je využíván zejména proti molícím (Zimmermann 2008).

Houba *I. fumosorosea* vytváří na hostiteli nejprve bílé vatovité mycelium, které se později zbarvuje do odstínů narůžovělé, nafialovělé až šedofialové barvy. Starší, plně sporulující kultury mají až šedofialové zbarvení a vatovitý charakter kolonie se mění v prašný (Landa 1994; Samson 1974). Konidie tohoto druhu jsou oválné, hydrofobní a na konci fialid (konidiogenní buňky, kterých je 3-6 na konidioforu) se oddělují postupně. Nejmladší konidie je vždy v kontaktu s fialidou a odtlačuje starší konidie dál do tvořícího se řetízku (Landa *et al.* 2008).

I. fumosorosea může vykazovat za určitých okolností také status mykoparazita. Patogen se jako ektoparazit může vyvíjet na rzích (*Uromyces dianthi*) a na různých druzích padlí, např. na konidiích padlí okurkového (*Sphaerotheca fuliginea*) (Zimmermann 2008; Landa 2002).

Existují studie, které prokázaly, že blastospory v porovnání s konidii *I. fumosorosea* začínají klíčit rychleji na kutikule hostitelů. Blastospory lze snadno produkovat v kapalných kulturách za méně než 4 dny, což je výrazně kratší než použití tradičních povrchových kultivací pro výrobu konidií. Pro vývoj biopreparátu je proto výhodnější použít blastospory než konidie této houby (Kim *et al.* 2013).

Entomopatogenní houba *I. fumosorosea* není považována za patogenní pro člověka. Při laboratorních pokusech nebyla shledána toxickou pro krysy, ptáky, včely medonosné, čmeláky nebo širokou škálu necílových členovců (Zimmermann 2008).

2.5.3 *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare & W. Gams

Houba *Lecanicillium lecanii* byla poprvé popsána v roce 1861 po izolaci z červce *Coccus viridis* (Tichá 2001). Vlastní název rodu *Lecanicillium* vznikl složením částí slov z původního názvu *Verticillium lecanii*, tj. „lecani“ a „cillium“ (Vega 2007). Zare a Gams (2001) provedli celkovou revizi rodu *Verticillium* a tento rod následně rozdělili do dvou rodů, na rod *Verticillium* a *Lecanicillium*. Do rodu *Lecanicillium* vyčlenili druhy vykazující entomopatogenní status. Houba *L. lecanii* taxonomicky spadá pod čeleď Cordycipitaceae (rod *Verticillium* je zařazen do čeledi Clavicipitaceae) (Sung *et al.* 2007).

Přirozeně je možné *L. lecani* izolovat z populací různých druhů brouků, motýlů a dvoukřídlého hmyzu, některé kmeny mohou parazitovat také fytofágní roztoče, hlístice nebo působit jako příležitostný mykoparazit na některých druzích rzí a padlí (Ownley *et al.* 2010; Landa *et al.* 2008). Tato houba je široce polyfágní, ale v praktické ochraně je využívána zejména při ochraně proti savým polyfágním škůdcům zeleniny a okrasných květin pěstovaných ve sklenících (Landa *et al.* 2008).

Houby rodu *Lecanicillium* vytváří bílé nebo krémové mycelium. Konidiofory jsou formovány v přeslenech a vyrůstají protilehle. Konidie jsou elipsoidní, tvoří se postupně a nová vždy odtlačuje dříve vytvořenou, čímž tvoří shluky podobné kuličkám. Konidie jsou drženy pospolu pomocí mucilagenní hmoty, která udržuje kompaktní tvar finálního útvaru (Landa *et al.* 2008; Hall 1976).

U houby *L. lecani* můžeme produkovat konidie i blastosporu za použití běžně dostupných komerčních médií nebo substrátů. Pro produkci konidií se jako růstové médium používá čirok a rýže. Zatímco pro produkci blastospor submerzní kultivací se používá melasa (Shinde *et al.* 2010). Druh *L. lecani* (= *L. muscarium*) je komerčně využíván a je součástí biopreparátu Mycotal, který je určen proti molicím. Produkt vyrábí holandská firma Koppert. Účinnost biopreparátu může být zvýšena, pokud je aplikován společně s emulgovaným rostlinným olejem, který slouží jako adjuvans (Koppert 2021).

2.5.4 *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin

Rod *Metarhizium* poprvé popsal v roce 1883 Nikolay Vasilevich Sorokin, profesor botaniky na Kazaňské univerzitě, na základě druhů klasifikovaných Metchnikoffem (*Entomophthora anisopliae*) (Vega 2007). Houba byla izolována na území dnešní Ukrajiny v 70. letech 19. století z listokaze *Anisoplia austriaca* (Roberts, St. Leger 2004). Samotný název je složen z řeckého „meta“, což znamená „změna“ a „rhiza“, což je „kořen“. Toto pojmenování bylo z toho důvodu, že Sorokin považoval mycelium za kořen houby (Vega 2007). První testování bezpečnosti a účinnosti této houby proti savcům provedl v roce 1968 Schaerffenberg. Entomopatogenní houba *M. anisopliae* patří mezi nejprozkoumanější a zároveň nejvyužívanější entomopatogenní houby (Tiago *et al.* 2014). Nákazy tímto druhem bývají často označovány jako „zelené muskardiny“, protože infikovaný jedinec následně porůstá hustým, tmavě zeleným myceliem (Landa *et al.* 2008; Roberts, St. Leger 2004).

Dlouhou dobu byla houba *M. anisopliae* považována za asexuální (anamorfní). Později byla popsána i pohlavní (teleomorfní) forma *Cordyceps taii*, která vývojově souvisí s nedávno objevenou anamorfní fází *Metarhizium taii*. V současnosti taxonomicky náleží *M. anisopliae* do řádu Hypocreales, čeledi Clavicipitaceae (Bischoff *et al.* 2009; Sung *et al.* 2007).

Houba *M. anisopliae* se vyskytuje téměř na celém světě s výjimkou Antarktidy (Roberts, St. Leger 2004). Výskyt této houby je obvykle spojován s půdou, ale některé jeho izoláty byly získány i z rybníků, nebo umělých nádrží (Santos *et al.* 2009; Zimmermann 2007b). Z hlediska druhového spektra hostitelů se jedná o široce polyfágní houby, které jsou vázány převážně na půdní hmyz (Landa *et al.* 2008), nicméně kmeny *M. anisopliae* vykazují značnou metabolickou a ekologickou všestrannost, kdy bylo pozorováno kolonizování rhizosféry a přilnutí k povrchům kořenů rostlin (Hu, St. Leger 2002). Ekologická role *M. anisopliae* doposud nebyla jednoznačně objasněna a je možné, že tato houba má několik funkcí, pokud

jde o ochranu rostlin, a to redukci populací půdních škůdců, antagonistické účinky proti fytopatogenním houbám nebo vzájemnou symbiózu s rostlinou, kdy je přenášen dusík získaný z hmyzu do kořenů rostlin, pravděpodobně výměnou za rostlinné cukry (Behie *et al.* 2013; Meyling, Eilenberg 2007).

Pro výrobu biopreparátů se využívají konidie houby. Konidie *M. anisopliae* jsou hydrofobní (Shahid *et al.* 2012), hranolovité, na obou koncích zaoblené (velikost 5-8 x 2,5-3,5 μm), a tvoří řetízky. Jsou zelenošedé až olivově zelené (Landa *et al.* 2008). Produkce konidií se odehrává v *in vitro* systémech povrchových kultur na umělých živných půdách nebo na přirozených substrátech (Landa 2002). Nedávné výzkumy ukázaly, že je možné produkovat *M. anisopliae* také v tekutých médiích, kde se vytvářejí tzv. mikrosklerocia, což jsou kompaktní shluky hyf, umožňující přečkávat nepříznivá období (Jaronski, Jackson 2008). Většina mykoinsekticidů je založená na bázi této houby. Ze 171 mykoinsekticidů a mykoakaricidů je 61 výrobků na bázi *M. anisopliae* (de Faria, Wraight 2007).

2.6 Entomopatogenní houby jako biopesticidy

Biopesticidy jsou perspektivním nástrojem pro ošetření plodin v systémech integrované ochrany rostlin (Chandler *et al.* 2011). Poptávka široké veřejnosti po produktech, které byly ošetřovány šetrnými metodami k přírodě roste. To vše vede k vývoji nových metod, prostředků a přípravků založených na principech biologické ochrany, a to zejména tam, kde není požadována totální eradikace škůdce, ale je tolerován jeho určitý výskyt, který je z hlediska míry poškození rostlin přijatelný (Shahid *et al.* 2012).

Aby bylo možné ekonomicky vyrábět komerční biopreparáty na bázi entomopatogenních hub, nepoužívají se k masové produkci přirození hostitelé, ale umělá živná média (Mohammadbeigi 2013). Výroba hub na umělých médiích může někdy vést až ke ztrátě virulence, kdy se houby opakovaně subkultivují přes jeden typ živné půdy a dochází k degeneraci (Hussain *et al.* 2010). Je tedy nutné provést důkladné testování vlivu produkce na živných médiích na virulenci hub ještě před tím, než budou konkrétní kmeny použity pro komerční výrobu (Mohammadbeigi 2013). Tomuto negativnímu vlivu firmy předchází tím, že si vyprodukují větší množství tzv. matečných kultur, které uchovávají v nízkých teplotách. Pro každý cyklus produkce používají vždy novou matečnou kulturu (Ravensberg 2010).

Dnes se ve světě na trhu objevují biopreparáty na bázi hub náležejících do rodu *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* a *Lecanicillium*. V roce 2007 byla publikována studie o nabídce komerčních preparátů na bázi entomopatogenních hub. Největší zastoupení ze 171 produktů měly přípravky na bázi *Beauveria bassiana* (33,9 %), *Metarhizium anisopliae* (33,9 %) a *Isaria fumosorosea* (5,8 %) (de Faria, Wraight 2007). Ačkoliv je známo více jak 750 druhů entomopatogenních hub (Landa *et al.* 2008), celé 2/3 komerčně dostupných preparátů je založeno pouze na dvou z nich.

Mezi negativní vlastnosti biopreparátů na bázi entomopatogenních hub patří delší časová perioda od aplikace po úspěšnou eradikaci v porovnání s aplikací chemických přípravků, které působí v rámci hodin (St. Leger *et al.* 1996). Biologické prostředky všeobecně působí pomaleji a jejich účinek je ještě závislý na biotických a abiotických podmínkách prostředí (Věchet 2014). Na druhou stranu tyto preparáty umožňují provádět aktivní, přímou a cílenou ochranu rostlin, aniž by negativně

zasahovaly do daného ekosystému a zároveň mohou mít dlouhodobý efekt (Tiago *et al.* 2014). Další nevýhodou jsou i vysoké náklady na produkci, nehledě na nutnost úspěšného schválení každého kmene, formulace i způsobu použití od příslušných regulačních úřadů (Cook *et al.* 1996). Vlastní srovnání s chemickými přípravky se velmi často děje na úrovni účinnosti a ceny, ale je třeba vnímat i určitou přidanou hodnotu, která se ukrývá např. v minimalizaci zdravotních rizik pro člověka i ostatní necílové organismy (Shahid *et al.* 2012; Shah, Pell 2003). A velmi pozitivní je z hlediska dlouhodobého působení entomopatogenních hub, že existuje jen velmi malá pravděpodobnost vzniku rezistence cílových škůdců (Bamisile *et al.* 2021; Ondráčková *et al.* 2017).

2.7 Vliv entomopatogenních hub na necílové organismy

V počátcích biologické ochrany rostlin nebyl kladen důraz na hodnocení bezpečnosti mikrobiálních prostředků pro člověka a necílové organismy (Shahid *et al.* 2012). Nejucelenější informace o bezpečnosti nejběžnějších a nejvíce využívaných entomopatogenních hub *B. bassiana*, *B. brongniarti*, *M. anisopliae* a *I. fumosorosea* poskytl ve svých review až Zimmerman (2008, 2007a, 2007b). Ve svých review konstatoval, že na základě současných poznatků se tyto druhy hub zdají bezpečnými a s minimálními riziky k člověku, dalším obratlovcům, i k životnímu prostředí. K současným informacím o bezpečnosti entomopatogenních hub přispívá i jedna z novějších studií věnující se případnému vlivu na savce, kterou publikovali Brunner-Mendoza *et al.* (2017). Vědci testovali dermální reakci králíků po aplikaci 2 g *I. fumosorosea* na kůži králíků, a při následném pozorování nebyly zaznamenány jakékoliv známky podráždění či jiných reakcí.

Ve svých pokusech např. Hu, St. Leger (2002) neprokázali přenos či infekci aplikovaného kmene *M. anisopliae* ARSEF 1080 v polních podmínkách na necílové škůdce, stejně jako Parker *et al.* (1997) neprokázali negativní vliv půdního ošetření *B. bassiana* a *Mariannaea* spp. na necílové lesní členovce.

Na druhou stranu je třeba zmínit, že infekce se nemusí projevovat jen na škůdcích polních či zahradních plodin, např. houba *Gibellula* infikuje pavouky a některé druhy hub rodu *Cordyceps* a *Erynia* jsou schopné vyvolávat infekci u mravenců (Shah, Pell 2003). Dále Dogan *et al.* (2017) v rámci laboratorní testů s *Metarhizium brunneum* V275, prokázali jeho významný patogenní účinek i na dravé roztoče *Phytoseiulus persimilis* a *Neoseiulus californicus*. Citlivost byla ve srovnání s citlivostí svlušky chmelové *Tetranychus urticae* ale podstatně nižší.

Při kombinaci různých způsobů biologické ochrany je vždy třeba důkladně zvážit aplikovanou dávku a načasování, aby byly jednotlivé komponenty biologické ochrany vzájemně co nejméně negativně ovlivněny. Stejně tak je žádoucí nalézt kmeny entomopatogenních hub, které budou účinné proti škůdcům, ale prospěšné organismy budou k houbám co nejméně citlivé (Dogan *et al.* 2017; Ondráčková *et al.* 2017).

Srovnávání chemických metod ochrany rostlin s metodami biologickými je velice obtížné, a právě bezpečnost pro člověka (jak při aplikaci, tak u výsledného produktu), jakož i k necílovým organismům a životnímu prostředí by měla být brána jako významný benefit náhrady chemických metod těmi biologickými (Shah, Pell 2003). Dalším pozitivem je, že při použití preparátů na bázi entomopatogenních hub není z důvodu jejich bezpečnosti třeba dodržovat žádné ochranné lhůty a mohou být použity např. pro ochranu konzumní zeleniny proti chemicky obtížněji hubitelným škůdcům (Ondráčková *et al.* 2017).

3 Hypotézy a cíle práce

Výzkumné hypotézy

Pro dosažení cílů byly stanoveny následující výzkumné hypotézy:

1. Diverzita kmenů hub je natolik vysoká, že je možné vyizolovat z půdy nový (virulentní) kmen entomopatogenní houby s novými vlastnostmi.
2. Entomopatogenní houby redukuje populace škodlivých činitelů.
3. Pomocí záměrné inokulace kmene entomopatogenní houby lze zvýšit supresivitu půdy.
4. Hlístice mohou šířit spory entomopatogenních hub v životním prostředí.

Cíle práce

Tato práce byla zaměřena na tři hlavní cíle:

1) Najít virulentní kmeny entomopatogenních hub (EPH) proti vybraným cílovým hostitelům

Dílčí cíle:

- Izolace kmenů EPH z půdních vzorků/infikovaných hostitelů pomocí selektivního média na bázi dodine
- Identifikace EPH pomocí morfologických a mikroskopických vlastností a pomocí genetické analýzy
- Účinnost vybraných kmenů jednotlivých EPH na mortalitu cílových hostitelů (rozoč *Rhizoglyphus robini*, zavíječ zimostrázový, mandelinka bramborová)

2) Obohatit půdní výsevni substrát o entomopatogenní houbu *Isaria fumosorosea* CCM 8367

Dílčí cíle:

- Vývoj laboratorního zařízení pro aplikaci suspenze spor houby *I. fumosorosea*
- Optimalizace submerzní kultivace této houby
- Testování přítomnosti houby v substrátu v čase

3) Zjistit, zdali se může entomopatogenní houbu *Isaria fumosorosea* CCM 8367 šířit v prostředí efektivněji za pomoci entomopatogenních hlístic

Dílčí cíle:

- Zhodnotit šíření hub hlísticemi v různých pokusných arénách
- Otestovat šíření dvou typů spor houby, a to konidií a blastospor

4 Experimentální část a výsledky

4.1 Účinnost entomopatogenních hub vyizolovaných z České republiky a Izraele proti roztoči *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae) a jejich výskyt

Roztoč *Rhizoglyphus robini* patří mezi závažné škůdce česneku a cibule, přičemž jeho regulace je obtížná kvůli jeho schopnosti vyvinout si rezistenci vůči akaricidům. Dalším nebezpečím je interakce roztočů s houbovými patogeny, jako je např. *Fusarium* spp. Cílem naší práce bylo posoudit možnost biologické ochrany pomocí přirozených patogenů, konkrétně entomopatogenních hub (EPH).

V první části studie byly realizovány terénní sbírky půdních vzorků na cibulových a česnekových polích v České republice a v Izraeli. Z těchto vzorků byly provedeny výluhy a kultivace pomocí selektivního média. Celkem bylo z půdních vzorků z obou zemí vyizolováno 5 rodů EPH (*Metarhizium* sp., *Beauveria* sp., *Isaria* sp., *Lecanicilium* sp. a *Purpureocillium* sp.). Nejfrekventovanější byl rod *Metarhizium* sp. a to zejména na lokalitách v České republice. Naopak nejméně byl zastoupen v obou zemích rod *Beauveria* sp. Půdní vzorky z České republiky obsahovaly výrazně vyšší koncentraci EPH oproti Izraeli. Vybrané kmeny EPH byly stanoveny do druhu pomocí makroskopických, mikroskopických a molekulárních markerů.

Vybrané kmeny hub byly následně testovány proti samicím roztoče *R. robini* v laboratorních podmínkách. V biotestech bylo testováno celkem 20 kmenů EPH (17 izolovaných a 3 referenční kmeny). Výsledky odhalily vysokou variabilitu mezi druhy a kmeny. Nejvyšší účinnost proti *R. robini* byla zjištěna u kmenů *Metarhizium anisopliae* izolovaných z půdních vzorků z České republiky a u kmene *Metarhizium indigoticum* z Izraele. Mortalita po 4. dnech biotestu byla 99,3 %, respektive 98,3 %. Nejnižší virulence byla pozorována u hub rodu *Beauveria* spp. U třech nejúčinnějších kmenů byla vypočítána také letální doba (LT50) a koncentrace (LC50), kdy uhynulo 50 % populace roztoče. LT50 se pohybovala mezi 2 a 4 dny a LC50 mezi $1,01 \times 10^4$ a $2,36 \times 10^5$ spor/ml. Tyto parametry ukázaly, že nejvirulentnější byla houba *M. indigoticum* z Izraele.

Tato studie prokázala, že některé kmeny EPH, zejména rodu *Metarhizium*, mají vysoký potenciál regulovat populace roztočů *R. robini* a využití těchto hub představuje významnou alternativu vůči ochraně chemické.

Okrajově byly v této práci studovány také mykoparazitické houby rodu *Trichoderma* sp., vyizolované z půdních vzorků z obou zemí.

Publikační výstupy:

Konopická J., Bohatá A., Palevsky E., Nermut' J., Půža V., Zemek R. (2021) Survey of entomopathogenic and mycoparasitic fungi in the soil of onion and garlic fields in the Czech Republic and Israel. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Early View. DOI: 10.1007/s41348-021-00557-5

Konopická J., Bohatá A., Nermut' J., Jozová E., Mráček Z., Palevsky E., Zemek R. (2021) Efficacy of soil isolates of entomopathogenic fungi against the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae). *Systematic and Applied Acarology* 26: 1149–1167. DOI: 10.11158/saa.26.6.11

4.2 Účinnost entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 proti zavíječi zimostrázovému (*Cydalima perspectalis*)

Zimostráz (*Buxus sempervirens*) je významnou okrasnou dřevinou, která je vážně ohrožená invazivním škůdcem zavíječem zimostrázovým (*Cydalima perspectalis*). Larvy tohoto škůdce jsou schopné kompletně stromy odlistit a způsobit jejich smrt. Vývoj nových biopesticidů zaměřených na tohoto škůdce by mohl pomoci výsadby těchto okrasných dřevin ochránit.

V této studii byly provedeny laboratorní experimenty za účelem posouzení účinnosti entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* kmene CCM 8367 proti škůdci *C. perspectalis*. Larvy posledního instaru byly ošetřeny suspenzí konidií houby v rozmezí koncentrací od 1×10^4 do 1×10^8 spor na 1 ml. Houbová infekce byla pozorována většinou u kukel. Nicméně mortalita nepřesáhla 60 %, což naznačuje velmi nízkou citlivost *C. perspectalis* k houbě *I. fumosorosea*. Dále bylo za pomoci nízkoteplotní rastrovací elektronové mikroskopie zjištěno na larvální kutikule škůdců velké množství neklíčivých spor houby. V další fázi studie se ukázalo, že inhibici klíčení spor houby způsobuje hydroalkoholický extrakt z listů *Buxus sempervirens*.

Bohužel se prokázalo, že kmen CCM 8367 *I. fumosorosea* není pro potlačení populace *C. perspectalis* vhodný. Nízká virulence houby mohla být způsobena akumulací fytochemikálií hostitelské rostliny s antimikrobiální aktivitou do larvální kutikuly škůdce.

Publikační výstupy:

Zemek R., Konopická J., Ul Abdin Z. (2020) Low efficacy of *Isaria fumosorosea* against box tree moth *Cydalima perspectalis*: Are host plant phytochemicals involved in herbivore defence against fungal pathogens? *Journal of Fungi* 6: 342. DOI: 10.3390/jof6040342

4.3 Účinnost entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*)

Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) patří mezi závažné a široce rozšířené škůdce brambor a jiných plodin. Tento škůdce je schopen defoliovat hostitelskou rostlinu a způsobit vysoké ztráty na výnosu. Navíc se mandelinka bramborová stává rezistentní vůči mnoha chemickým pesticidům. Proto je zapotřebí vývoje nových biopesticidů zaměřených na tohoto škůdce.

Cílem této studie bylo získat nové kmene entomopatogenní houby *B. bassiana* a posoudit jejich účinnost proti dospělcům *L. decemlineata* v laboratorních podmínkách. Dvanáct kmenů bylo izolováno z mrtvých dospělců mandelinky bramborové sesbíraných na bramborových polích v České republice.

V samotném biotestu byli dospělci mandelinky bramborové ošetřeni suspenzí konidií každého kmene houby *B. bassiana* v koncentraci 1×10^7 spor na mililitr a jejich přežívání bylo denně zaznamenáváno po dobu tří týdnů. Výsledky biologických testů odhalily, že všechny nové nativní kmene byly pro dospělé patogenní a způsobily mortalitu až 100 % na konci zkušebního období s LT_{50} přibližně 7 dní. Tyto kmene byly virulentnější než referenční kmen GHA a některé z nich lze doporučit pro vývoj nového mykoinsekticidu proti *L. decemlineata*.

V další fázi studie se testoval virulentní kmen *B. bassiana* (kmen BBA 08) v květináčovém a polním experimentu. Tento kmen byl testován samostatně a také

v kombinaci s entomopatogenními hlísticemi, kde byl hodnocen vliv bioagens na počet objevujících se dospělců mandelinky bramborové. V květináčových experimentech půdní aplikace hlístic (*Steinernema carpocapsae* 1343 a *S. feltiae* Jakub) a houby (BBA 08) významně snížila počty vzcházejících dospělců *L. decemlineata*, zatímco po aplikaci na listy bylo účinné pouze ošetření houbou *B. bassiana*.

Terénní aplikace houby *B. bassiana* významně snížila počet objevujících se dospělců mandelinky bramborové ve srovnání s kontrolní variantou o cca 30 %, zatímco účinek hlístic a kombinace hlístice-houba nebyl statisticky významný.

Naše zjištění také zdůrazňují důležitost hledání perspektivních kmenů entomopatogenních hub mezi přirozeně infikovanými hostiteli. Entomopatogenní houby i hlístice mají potenciál účinně snižovat výskyt dospělců mandelinky bramborové, ale ke zlepšení účinnosti v této oblasti je zapotřebí další výzkum.

Publikační výstupy:

Zemek R., **Konopická J.**, Jozová E., Skoková Habušťová O. (2021) Virulence of *Beauveria bassiana* strains isolated from cadavers of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insects* 12: 1077. DOI: 10.3390/insects12121077

Půža V., Nermuť J., **Konopická J.**, Skoková Habušťová O. (2021) Efficacy of the applied natural enemies on the survival of Colorado Potato Beetle adults. *Insects* 12: 1030. DOI: 10.3390/insects12111030

4.4 Obohacení půdního substrátu entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* CCM 8367 pro zvýšení jeho supresivity

Cílem této studie bylo prozkoumat potenciál kolonizace půdního výsevniho substrátu entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* CCM 8367. U tohoto kmene houby byla dříve zjištěna vysoká virulence proti několika druhům škůdců.

V první fázi studie bylo vyvinuto jednoduché laboratorní zařízení pro aplikaci suspenze spor hub do substrátu. Suspenze byla připravena z blastospor houby, které byly získány submerzní kultivací v tekutém médiu za pomoci orbitální třepačky. Nainokulovaný substrát houbou byl umístěn do plastových sáčků a uchováván při konstantní teplotě 20 °C po dobu šesti měsíců. Každý měsíc byly vzorky analyzovány a byla zjišťována koncentrace houby ve formě parametru Colony forming units – jednotky tvořící kolonie (CFU). Výsledky ukázaly, že při 20 °C houba úspěšně kolonizovala půdní substrát a přetrvávala i když se průměrná koncentrace mírně snížila z $5,89 \times 10^4$ na $2,76 \times 10^4$ spor na mililitr substrátu během experimentu.

Substrát kolonizovaný houbou *I. fumosorosea* může být vhodný pro preventivní a trvalou ochranu různých rostlin před škůdci žijícími v půdě.

Publikační výstupy:

Zemek R., **Konopická J.**, Bohatá A., Horňák P., Jináček M. (2017) Výsevni substrát s entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* kmene CCM 8367. Funkční vzorek 1- 7. (podléhá autorským právům)

Zemek R., Nermuť J., **Konopická J.**, Bohatá A. (2018) Půdní přípravek na bázi *Isaria fumosorosea* a *Steinernema feltiae*. Funkční vzorek TG02010034_2021_Duoefekt_Zemek: 1-8. (podléhá autorským právům)

Zemek R., Nermut J., **Konopická J.**, Bohatá A. (2018) Insekticidní a akaricidní aditivum do nosného substrátu pro pěstování rostlin. Užitný vzor č. 32259. Úřad průmyslového vlastnictví, reg. č. 2018-35411.

Zemek R., **Konopická J.**, Bohatá A. (2018) Pěstební substrát s insekticidními a akaricidními vlastnostmi. Užitný vzor č. 31982. Úřad průmyslového vlastnictví, reg. č. 2018-35195.

Zemek R., **Konopická J.**, Bohatá A. (2018) Inoculation of sphagnum-based soil substrate with entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae). AIP Conference Proceedings 1954: 030009- 1– 030009-5. DOI: 10.1063/1.5033389

Konopická J., Bohatá A., Zemek R. (2019) Technologie výroby blastospor entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* kmene CCM 8367 submerzní kultivací. Ověřená technologie OT-ENTU-01 (podléhá autorským právům)

4.5 Šíření spor entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 hlísticemi

Entomopatogenní houby a hlístice jsou celosvětově rozšířené půdní mikroorganismy, které se často používají v biologické ochraně rostlin. Mnoho studií prokázalo, že kombinace bioagens může zvýšit jejich účinnost proti cílovým hostitelům.

Tato studie se zaměřuje na potenciální přínos synergie dvou druhů hlístic, *Steinernema feltiae* a *Heterorhabditis bacteriophora*, a houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367.

V první fázi studie bylo testováno šíření hub hlísticemi v různých pokusných arénách. Šíření hub hlísticemi bylo testováno na Petriho miskách s agarovým médiem Potato Dextrose Agar, dále na Petriho miskách, kde byl přidán písek jako bariéra a v poslední fázi studie byl přenos hub hlísticemi testován ve skleněných trubičkách naplněných zeminou.

Výsledky naší studie poprvé ukázaly, že šíření konidií i blastospor *I. fumosorosea* je významně posíleno přítomností entomopatogenních hlístic, ale účinnost šíření je negativně ovlivněna heterogenitou testovací arény.

Dalším zjištěním bylo, že hlístice *H. bacteriophora* šíří houby efektivněji než *S. feltiae*. Tento jev lze vysvětlit v rozdílech přítomnosti kutikuly druhého stupně nebo odlišným chováním při hledání potravy hlístic.

Bylo také zjištěno, že blastospory houby se šíří účinněji než konidie, což může být způsobeno různou adherencí těchto spor (konidie jsou hydrofobní, zatímco blastospory jsou hydrofilní). Tato studie zkoumala nový, alternativní způsob šíření entomopatogenních hub v oblasti životního prostředí. Získané výsledky ukázaly, že entomopatogenní hlístice mohou zvýšit účinnost šíření hub.

Publikační výstupy:

Nermut J., **Konopická J.**, Zemek R., Kopačka M., Bohatá A., Půža V. (2020) Dissemination of *Isaria fumosorosea* spores by *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. Journal of Fungi 6: 359. DOI: 10.3390/jof6040359

5 Přílohy

Podkapitola experimentální části a výsledků 4.1 Účinnost entomopatogenních hub vyizolovaných z České republiky a Izraele proti roztoči *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae) a jejich výskyt zahrnuje výsledky a data, která byla publikována ve dvou odborných impaktovaných časopisech. Názvy publikací jsou následující:

- Survey of entomopathogenic and mycoparasitic fungi in the soil of onion and garlic fields in the Czech Republic and Israel.
- Efficacy of soil isolates of entomopathogenic fungi against the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae).

Podkapitola 4.2 Účinnost entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 proti zavíječi zimostrázovému (*Cydalima perspectalis*) zahrnuje výsledky, které byly publikované v impaktovaném časopise (název publikace viz níže).

- Low Efficacy of *Isaria fumosorosea* against Box Tree Moth *Cydalima perspectalis*: Are Host Plant Phytochemicals Involved in Herbivore Defence against Fungal Pathogens?

Podkapitola 4.3 Účinnost entomopatogenní houby *Beauveria bassiana* proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) obsahuje cenná data, která byla publikována v impaktovaném časopise *Insects*. Z této studie vznikly dvě publikace jejichž názvy jsou níže.

- Virulence of *Beauveria bassiana* strains isolated from cadavers of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*.
- Efficacy of the applied natural enemies on the survival of Colorado Potato Beetle adults.

Do podkapitoly 4.4 Obohacení půdního substrátu entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* CCM 8367 pro zvýšení jeho supresivity spadají výsledky, které byly využity pro přípravu funkčních vzorků, užitečných vzorů a ověřené technologie. Ze získaných dat byla vytvořena také publikace. Příložené jsou užité vzory a publikace, jejichž názvy jsou níže:

- Užitečný vzor č. 32259: Insekticidní a akaricidní aditivum do nosného substrátu pro pěstování rostlin.
- Užitečný vzor č. 31982: Pěstební substrát s insekticidními a akaricidními vlastnostmi.
- Inoculation of Sphagnum-Based Soil Substrate with Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae).

Do poslední podkapitoly 4.5. Šíření spor entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 hlísticemi patří výsledky, které byly publikované v impaktovaném časopise, název publikace je následující:

- Dissemination of *Isaria fumosorosea* Spores by *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*.



Survey of entomopathogenic and mycoparasitic fungi in the soil of onion and garlic fields in the Czech Republic and Israel

Jana Konopická^{1,2}  · Andrea Bohatá³ · Eric Palevsky⁴ · Jiří Nermut¹ · Vladimír Půža¹ · Rostislav Zemek¹

Received: 26 August 2021 / Accepted: 24 November 2021

© Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft 2021

Abstract

Bulb crops are attacked by various soil-dwelling pests and pathogens. Entomopathogenic (EPFs) and mycoparasitic fungi (MPFs) which are distributed in natural and agricultural soils worldwide can play an important role as natural enemies of bulb pests. The species richness and density of these fungi in onion and garlic fields have not been investigated. The aim of this study was to determine the occurrence of EPFs and MPFs in soils where these crops were grown and compared the data from sites of the Czech Republic and Israel. Methods of fungi isolation and quantification were based on elution of soil samples by water and cultivation using selective media with dodine for EPFs and cultivation using potato dextrose agar with chloramphenicol for MPFs. Entomopathogenic fungi *Beauveria* spp., *Isaria* spp., *Lecanicillium* spp., *Metarhizium* spp., *Purpureocillium* spp. and mycoparasitic fungi *Trichoderma* spp. were isolated from soil samples in both countries. The highest density was observed in the genus *Metarhizium* in both countries. *Metarhizium* spp. were most abundant in the site Mlýn Podhora in the Czech Republic. The average density of colony-forming units (CFU) per 1 mL of soil sample was 1.47×10^4 . The lowest density was observed in the genus *Beauveria* in both countries, up to 5.93×10^2 CFU per 1 mL of soil sample. Soils in the Czech Republic contained about ten times higher number of EPFs compared to Israel. Rather higher prevalence of MPFs was also found in the Czech Republic. Possible reasons for within and between countries variability in EPFs and MPFs occurrence are discussed.

Keywords Alliaceae · Soil microorganisms · Hypocreales · Diversity · *Metarhizium* · *Trichoderma*

Abbreviations

EPFs Entomopathogenic fungi

MPFs Mycoparasitic fungi

Background

Onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) are cultivated throughout the world for food, therapeutic and medicinal properties (Sharifi-Rad et al. 2016; Lawande et al. 2009). According to the statistics of the FAO, the total world production for onion was 93,226,400 tons, and for garlic, it was 26,639,081 tons produced in 2019 (FAO 2021). Onion and garlic crops are attacked by many pathogens and pests at different crop growth stages which cause considerable losses in yield (McDonald et al. 2004; Lawande et al. 2009). Onion and garlic are subject to a number of diseases (e.g., *Fusarium* basal rot, onion smut, downy mildew, pink root, neck rot, *Botrytis* leaf blight, etc.) and pests (e.g., *Rhizoglyphus robini* Claparède, onion maggot, *Thrips tabaci* Lindeman, etc.) (Ofek et al. 2014; Lebiush-Mordechai et al. 2014; Mishra et al. 2014). The control of these pests and diseases are still based almost entirely on pesticides, some of which, especially for the control of mites and insects being hazardous. Due to resistance and toxicity to the environment, efforts are currently being made to reduce the use of pesticides and

✉ Jana Konopická
jkonopicka@seznam.cz

¹ Institute of Entomology, Biology Centre, Czech Academy of Sciences, Ceske Budejovice, Czech Republic

² Department of Genetics and Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic

³ Department of Crop Production, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic

⁴ Neve-Ya'ar Research Center, Agricultural Research Organization, Ramat Yishay, Israel

replace them with eco-friendly methods of plant protection (Díaz et al. 2000; Mishra et al. 2014; Hossain et al. 2017). Thus, alternative, environmentally safe control strategies, e.g., biological control, need to be developed and implemented. Entomopathogenic fungi (EPFs) and mycoparasitic fungi (MPFs) represent such promising biocontrol agents.

The soil environment constitutes an important reservoir for a diversity of EPFs, which can contribute significantly to the regulation of insect populations (Keller and Zimmermann 1989). EPFs can interact with arthropod hosts as parasites or saprotrophs (Bidochka et al. 1998; Charnley and Collins 2007). Hypocrealean EPFs, belonging to the genera *Beauveria*, *Isaria* and *Metarhizium*, occur worldwide in the soil, including natural and agricultural areas and have the greatest potential for biological control (Bidochka et al. 1998; Meyling and Eilenberg 2006; McGuire and Northfield 2020; Bueno-Pallero et al. 2020). These kinds of fungi are unique organisms that are capable of infecting their hosts directly through the exoskeleton, while other entomopathogens (viruses and bacteria) must be ingested with food to infect the host (Augustyniuk-Kram and Kram 2012). These fungi can cause massive epizootics after infection and manifestation of disease symptoms in the pest population (Augustyniuk-Kram and Kram 2012; Tkaczuk et al. 2014). Therefore, knowledge of the occurrence and species composition of EPFs in the soil environment is very important, especially the native EPFs population. Most studies of the occurrence and biodiversity of EPFs in soils have focused on differences in species composition between areas defined by habitat types (Vänninen 1996; Steenberg 1997; Bidochka et al. 1998; Klingen et al. 2002; Keller et al. 2003; Meyling and Eilenberg 2006, 2007; Prenerová et al. 2009; Bueno-Pallero et al. 2020; Sharma et al. 2020). Several methods to isolate EPFs from the soil have been used. The traditional insect bait method uses *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) or *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) as a host (Zimmermann 1986; Meyling and Eilenberg 2007; Sharma et al. 2018). Another method used to isolate EPFs is soil dilution and cultivation on selective media (Meyling and Eilenberg 2007) or methods of molecular biology (Canfora et al. 2016).

MPFs of genera *Trichoderma* and *Gliocladium* are cosmopolitan in the soil, on decaying wood and on vegetable matter and some species are frequently dominant in widely varying habitats (Harman and Kubicek 2002). Some species of the genus *Trichoderma* can be utilized in biological control because of their mycoparasitism and other properties. Strains which are effectively able to suppress plant pathogens in a sufficiently wide spectrum of environmental conditions are rhizosphere-competent and have a positive effect on growth and development of plants (Brožová 2010). MPFs used in biological control have a higher ability to spread in soil and rhizosphere compared

to soil antagonistic bacteria, due to the active growth of hyphae. There is a number of species of fungi that have been studied in the biological control, but among them the fungi of the genus *Trichoderma* clearly dominate. *Trichoderma* spp. grow easily and have a wide range of hosts (Whipps and Lumsden 2001). The most widely used methods for MPFs isolation include, e.g., pre-colonized plate method, use of selective nutrient media, dilution plate method (Rabeendran et al. 1998) and sclerotia bait technique using *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary as a selective bait of sclerotia (Ribeiro and Butler 1992).

This research aims to investigate the species composition and within and between-country variability of co-inhabiting EPFs and MPFs from soil samples collected in onion and garlic fields of the Czech Republic and Israel. Although EPFs and MPFs have been surveyed in these two countries in the soil of various cultivated and uncultivated habitats (Kenneth et al. 1979; Landa et al. 2002; Paz et al. 2007a, 2007b, 2011; Gerson et al. 2008; Prenerová et al. 2009; Brožová 2010; Šimáčková et al. 2014; Degani and Dor 2021), no previous study focused on garlic and onion crops. In the present study, EPFs and MPFs were surveyed together, with the aim of determining whether the MPFs can have a negative impact on the EPFs. Data obtained thus provide new information and knowledge useful for the biological control of pests and pathogens attacking onion and garlic in two countries with different climates and soil type.

Methods

Soil sampling

The occurrence of EPFs and MPFs was surveyed in soil samples collected in onion and garlic fields in the Czech Republic and Israel in 2017. Sampling was carried out before the harvest, i.e., in July and August in the Czech Republic and at the end of April in Israel. In total, nine sites (farms) in which both crops are traditionally grown were sampled, five in the Czech Republic and four in Israel. The sites were located in Pilsen and South Bohemian regions and in the Beit She'an Valley, Jezreel Valley and Lower Galilee, respectively (Table 1). Five soil samples were collected from each site: four samples at field corners and one from the center of field. Soil samples were taken with a shovel from a depth of 10–20 cm adjacent to crop plants and individually placed in a 40-mL polyethylene vials with minimum air (compacted), i.e., 200 mL of compacted soil was collected per each sampling site in total. The vials with soil were sealed with the cap and stored in a refrigerator at 6 °C until isolation of fungi (maximum 1 week).

Table 1 Soil sampling sites in the Czech Republic and Israel

Country	Site		Crop	Farming system	Soil type	Field area (ha)
	Name	GPS				
Czech Republic	Doňov	49.215789 N, 14.773615E	garlic	Sustainable ^a	Cambisol	3.6
	Radomyšl	49.316988 N, 13.946182E	onion	Conventional ^b	Luvisol	3.9
	Meziříčí	48.699942 N, 14.589516E	onion	Organic ^c	Luvisol	7.4
	Kolence	49.096081 N, 14.786852E	onion	Conventional	Podzol	8.8
	Mlýn Podhora	49.420356 N, 13.371508E	onion	Sustainable	Cambisol	11.2
Israel	Harduf	32.776000 N, 35.169791E	onion	Organic	Leptosol	3.5
	Gazit	32.631341 N, 35.444345E	onion	Organic	Chromoxerert	3.5
	Sdehu Nachum	32.530280 N, 35.476934E	onion	Organic	Chromoxerert	4.0
	Sde Eliyahu	32.435397 N, 35.513981E	garlic	Organic	Cambic Gypsiorthid	3.5

^aTransient system between conventional and organic system

^bSystem in which pesticides and fertilizers are applied

^cCertified organic farming system

Isolation, identification and density estimation of entomopathogenic fungi

EPFs were isolated with water elution of soil samples and cultivation using selective medium with dodine (0.05 g/L) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) (Chase et al. 1986). For analysis, 13.5 mL of soil was used from each sample. This volume of soil was transferred to a 250-mL Erlenmeyer flask and then mixed with 50 mL of a 0.05% TweenTM 80 solution (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). The samples were mixed for 20 min on an orbital shaker (200 rpm). Subsequently, the samples were diluted once (1-mL sample with 9 mL water with 0.05% Tween 80). Subsample of 0.5 mL was taken from the 10⁻¹ diluted sample and transferred to the Petri dish (vented, inner diameter 90 mm, height 15 mm, GosselinTM, Borre, France) with selective medium with dodine and spread over the entire medium using a sterile spatula. Three replicates were established for all samples from each site. After 14 days of incubation at 25 ± 1 °C and 16L/8D photoperiod, the grown EPFs colonies were counted and identified on the basis of macroscopic and microscopic characteristics to the genus level because without molecular methods it is almost impossible to correctly identify the taxa at the species level. Identification of fungal isolates was made by the determination of conidial size and shape, conidiogenous cell and colony morphology (Rehner and Buckley 2005; Rehner et al. 2011; Inglis et al. 2012; Humber 2012) using an Olympus CH20 light microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan), bright field, 400× magnification. The number of EPFs colonies were expressed as colony-forming units (CFU) of each EPFs per 1 mL of soil sample.

Isolation, identification and prevalence of mycoparasitic fungi

Modified dilution plate method (Rabeendran et al. 1998) was used for the isolation of MPFs. A dilution series was made up to 10⁻³ and three replicates were performed from each dilution series. The soil extract and each aliquots of samples was pipetted in the same volume (0.5 mL) as for the EPFs isolation on Petri dishes with PDA (potato dextrose agar) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) supplemented with the antibiotic chloramphenicol (0.05 g/L) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Samples were spread with a sterile spatula over the entire area of the medium. Fungi of the genus *Trichoderma* were isolated and identified on the basis of macroscopic and microscopic characteristics (Gams and Bissett 2002) after 7 days of incubation at 25 ± 1 °C and 16L:8D photoperiod. The occurrence of *Trichoderma* spp. was assessed by the presence or absence in soil samples.

Statistical analysis

The obtained data on EPFs density in soils collected at sites in the Czech Republic and Israel were statistically evaluated using Multivariate analysis of variance (MANOVA) after log(*x*+1) transformation. When the analysis was significant, univariate ANOVAs for the individual genera and Tukey tests for multiple comparisons were conducted. Computations were done by means of Statistica v. 13.5 software (TIBCO Software Inc., Tulsa, OK, USA). The prevalence of *Trichoderma* spp. was expressed as mean percentage ± standard error of the mean of positive sample. A generalized linear model with a binomial distribution and logit link was used to analyze data. Treatment and replication were set as

fixed effects. The analysis was performed in SAS® Studio for Linux (SAS Institute Inc. 2018) using the GLM procedure (PROC GENMOD) of SAS/STAT module (SAS Institute Inc. 2017). Means were separated by the least-square means (LSMEANS) statement of SAS with Tukey–Kramer adjustment for multiple comparisons. We also conducted a Spearman correlation analysis (Siegel and Castellan 2003) to test if there is any association between *Trichoderma* prevalence and overall mean density of entomopathogenic fungi. The computation was done using the PROC CORR function in SAS/STAT. *P* values < 0.05 were considered statistically significant in all tests.

Results

Density estimation of entomopathogenic fungi

Five genera of entomopathogenic fungi were found in soil samples from the Czech Republic and Israel: *Lecanicillium* spp., *Purpureocillium* spp., *Metarhizium* spp., *Isaria* spp. and *Beauveria* spp. (Fig. 1). The density of EPFs CFU was dependent on site. Soil in Israeli fields contained obviously lower number of EPFs compared to Czech fields (Fig. 2). The overall average of CFU/mL of soil was 1.21×10^2 and 2.63×10^3 in Israel and the Czech Republic, respectively. The effect of sampling site was statistically highly significant (Wilk's $\lambda = 0.0277$; $F(35,137.0416) = 5.2768$; $P < 0.0001$).

The highest total number of CFU of EPFs was found in samples from the Czech Republic Dominant genus was

Metarhizium in both countries. The genus *Metarhizium* most represented in soil samples from the sites Mlýn Podhora (1.47×10^4 CFU/1 mL), Kolence (9.82×10^3 CFU/1 mL) and Doňov (7.38×10^3 CFU/1 mL) from the Czech Republic and on the farms of Gazit and Sde Nahum from Israel. Gazit site contained 7.11×10^2 CFU (79% of all isolated infectious units of fungi) of *Metarhizium* spp. per 1-mL soil sample and Sde Nahum site contained 7.85×10^2 CFU/1 mL (88%). On other sites, the concentration of the genus *Metarhizium* was lower. The site had a highly significant effect on the density of the genus *Metarhizium* ($F = 5.6914$; $df = 7,36$; $P < 0.0001$). Genus *Lecanicillium* was isolated from all locations in the Czech Republic, but it occurred at a very low frequency. The same phenomenon was observed for samples from Israel except of the Sde Eliyahu site (Fig. 1), where its occurrence was not recorded and the density of infectious units was not statistically significant ($F = 1.8619$; $df = 7,36$; $P = 0.1052$). The lowest density of infectious units was recorded in the genus *Beauveria*. Genus *Beauveria* occurred only in two localities in the Czech Republic (Meziříč, Mlýn Podhora) and in one site in Israel (Sde Eliyahu). CFU of this genus were very low in all sites. The amount of CFU fungus per mL of soil ranged from 1.04×10^2 to 5.93×10^2 per mL. The effect of sampling site on CFU of the genus *Beauveria* was not significant ($F = 1.3379$; $df = 7,36$; $P = 0.2614$). The most frequent genera in samples from Harduf was *Purpureocillium* at 3.41×10^2 CFU per mL of soil. *Purpureocillium* spp. was found in all samples from the Czech Republic; the highest concentration was in Kolence (4.92×10^3 CFU/1 mL). Differences in density of CFU of

Fig. 1 Density of EPFs in soils in the Czech Republic and Israel. Sites: Doňov (a), Radomyšl (b), Meziříč (c), Kolence (d), Mlýn Podhora (e), Harduf (f), Gazit (g), Sde Nahum (h), Sde Eliyahu (i). Different letters indicate significant differences between columns (Tukey test, $P < 0.05$)

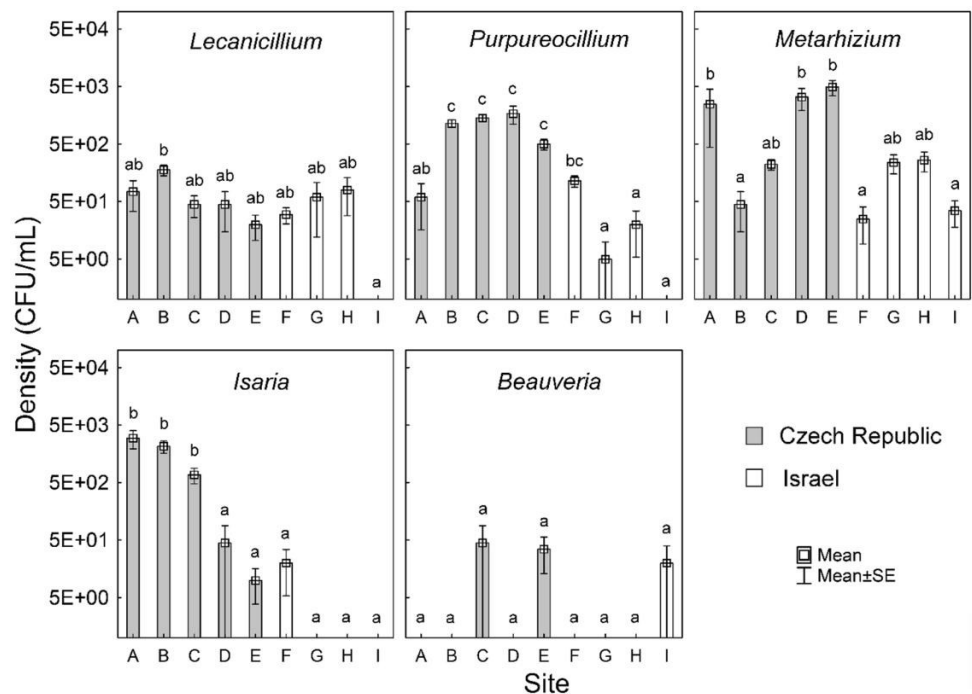
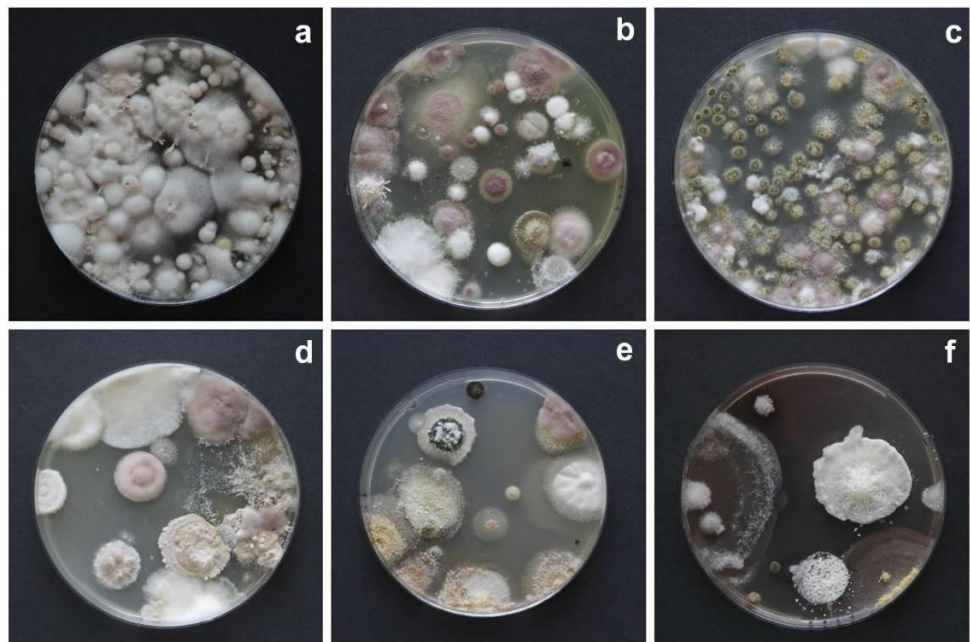


Fig. 2 Photos: demonstrating differences in densities of colony-forming units of entomopathogenic fungi in soils between the Czech Republic and Israel. Sites: **a** Doňov; **b** Meziříčí; **c** Kolence; **d** Harduf; **e** Gazit; **f** Sde Eliyahu



the genus *Purpureocillium* among the sampling sites were highly significant ($F=13.9898$; $df=7,36$; $P<0.0001$). The Harduf site was the only site in Israel to contain the *Isaria* genus, represented 11% of the total number of colonies. Soil samples from Doňov and Radomyšl contained very high EPFs concentrations of *Isaria* spp.; Doňov contained 53% and Radomyšl contained 61% of this genus of the total number of isolated infectious units of fungi. The effect of sampling site on infectious units of *Isaria* spp. was highly significant ($F=9.2598$; $df=7,36$; $P<0.0001$).

Prevalence of mycoparasitic fungi

All soil samples from both countries contained fungi of the genus *Trichoderma* (Fig. 3). A lower occurrence of *Trichoderma* spp. was recorded in soil samples from Israel in comparison with samples from the Czech Republic on average by 10%. At the Sde Eliyahu site, MPFs only occurred in two of the five soil samples (13.32%). In contrast, at the Sde Nahum site, the occurrence of *Trichoderma* spp. was recorded in all samples. On the farms of Gazit and Harduf, the average incidence rates of MPFs were 79.98, respectively, 59.98%. At localities in the Czech Republic, the average percentage of MPFs ranged from 39.96 to 86.66%. The lowest occurrence of fungi of the genus *Trichoderma* was recorded at the Meziříčí site in only 39.96% of soil samples. At the remaining sites, the presence of the fungus *Trichoderma* spp. was almost indistinguishable. The effect of site on prevalence of MPFs was highly significant ($\chi^2=47.27$, $df=8$, $P<0.001$). No significant differences were found among replications ($\chi^2=6.97$, $df=4$, $P=0.1375$). A Spearman correlation analysis showed that prevalence of MPFs

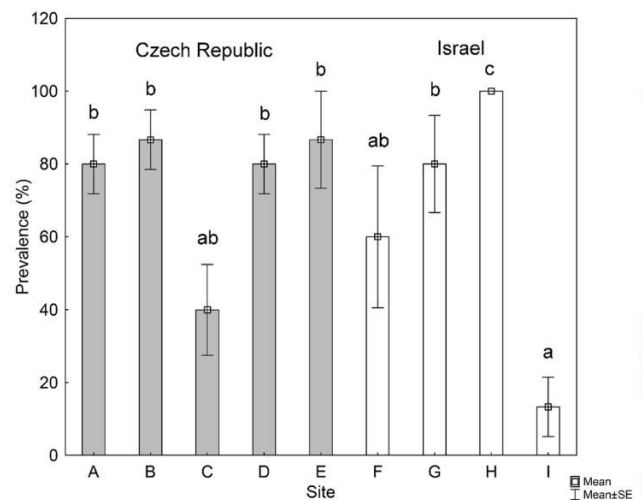


Fig. 3 Prevalence of mycoparasitic fungi in soils in the Czech Republic and Israel. Sites: Doňov (a), Radomyšl (b), Meziříčí (c), Kolence (d), Mlýn Podhora (e), Harduf (f), Gazit (g), Sde Nahum (h), Sde Eliyahu (i). A generalized linear model was fitted and pairwise between site differences was tested using the least-square means. Different letters indicate significant differences between columns ($P<0.05$)

and overall means of EPFs were not significantly correlated ($r_s=0.3515$, $n=9$, $P=0.3537$).

Discussion

The most used methods for isolation of EPFs from soil are selective media and the 'Galleria or Tenebrio bait method' (Zimmermann 1986; Scheepmaker and Butt 2010).

Currently, methods of molecular biology for the isolation and quantification of fungi in the soil can be used, too. For example, qPCR (quantitative polymerase chain reaction) is a molecular technique based on PCR (Canfora et al. 2016). However, before using molecular biological methods, it is necessary to take into account the possible shortcomings of the technique, such as sensitivity, accuracy, robustness, frequency of testing and cost. In addition, these methods do not tell us anything about the virulence of fungal strains (Canfora et al. 2016; Tsui et al. 2011). In the current study, we used a selective media based method. EPFs were isolated with water elution of soil samples and cultivated on a selective medium with dodine. Selective media can be used for quantitative studies and for isolation of the fungus from soil or plant material (Zimmermann 2007a). There are different groups of EPFs in different habitats. Different insect pathogenic mycobiota could be found in the soil and different in the aboveground environment (Augustyniuk-Kram and Kram 2012). We identified EPFs belonging to the genera *Lecanicillium*, *Purpureocillium*, *Metarhizium*, *Isaria* and *Beauveria*. In our recent study on the efficacy of soil isolates of EPFs against *Rhizoglyphus robini*, we identified 17 selected strains of EPFs at species level using molecular methods as: *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Metarhizium indigoticum* (Kobayasi & Shimizu) Kepler, S.A. Rehner & Humber, *Isaria fumosorosea* (Wize), *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. and *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (Konopická et al. 2021). EPFs of the genus *Beauveria*, *Metarhizium* and *Isaria* are dominant fungi found in soil environments as evidenced by many studies (e.g., Samson et al. 1988; Keller and Zimmermann 1989; Prenerová et al. 2009; Augustyniuk-Kram and Kram 2012; Majchrowska-Safaryan and Tkaczuk 2021). The highest natural density was observed in the genus *Metarhizium* spp. in both countries. *Metarhizium anisopliae* is an entomopathogenic fungus that is present in soils throughout the world (Zimmermann 2007a; Augustyniuk-Kram and Kram 2012). Our laboratory study revealed that particularly *Metarhizium* strains have potential to control the bulb mite *R. robini* (Konopická et al. 2021). Fungi of the genus *Beauveria* exhibited the lowest natural density in soil samples from both countries. Some studies suggest that *B. bassiana* seems to be very sensitive to the disturbance effects of cultivation and thus is restricted to natural habitats (Vänninen 1996; Quesada-Moraga et al. 2007; Medo and Cagáň 2011). Šimáčková et al. (2014) surveyed EPFs, including *Beauveria* spp. in the Czech Republic and came also to conclusion that uncultivated soils showed a higher richness EPFs than cultivated ones. Fungus *B. bassiana* is more frequent in forests in comparison with *M. anisopliae* which can persist in cultivated soils (Rath et al. 1992; Vänninen 1996; Quesada-Moraga et al. 2007; Sánchez-Peña et al. 2011). According to Vänninen (1996), an insect host is needed for *B. bassiana*

because this species requires frequent serial passage through insects to survive. Heavily cultivated fields and the absence of hosts are limiting factors for the survival of *B. bassiana*. In contrast, *M. anisopliae* conidia are able to persist in the absence of arthropod hosts and have a higher survival in the soil than *B. bassiana* (Latch and Falloon 1976; Vänninen et al. 2000; Medo and Cagáň 2011). Landa et al. (2002) isolated *M. anisopliae* in almost 50% of fungus-positive samples from arable soils.

Genus *Lecanicillium* was found in almost all sites in both countries except Sde Eliyahu from Israel, but at a lower concentration. This is due to the fact, *Lecanicillium* is not a typical soil fungus but is found primarily in the phylophlan. Representatives of this genus most often cause spontaneous epizooties in Sternorrhyncha (Hemiptera order) insect populations, particularly populations of different aphid and whitefly species (Hall 1976; Goettel et al. 2008). Spores of *Lecanicillium* probably got into the soil by rain, washing the environment of the phylophlan. *Lecanicillium* can be also endophytic and epiphytic (Ownley et al. 2010).

The presence of *Isaria* spp. varied significantly in both countries. In Israel, the *Isaria* spp. was isolated from only one site, while in the Czech Republic, it was present in all sites. Because species like *I. fumosorosea* can easily survive in soils in the absence of insect hosts (Zemek et al. 2018), it is possible that abiotic environmental factors affected the natural density and abundance of EPFs of this genera.

The last genus isolated from the soil was *Purpureocillium* spp. This genus has a nematophagous effect rather than an entomopathogenic. But depending on the availability of nutrients in the surrounding microenvironments, it may be nematophagous, mycoparasitic, saprotrophic and entomopathogenic (Gupta et al. 1993; Marti et al. 2006; Rombach et al. 1986).

In general, localities from Israel contained a significantly lower EPFs concentration than localities in the Czech Republic. As a possible explanation, Israel's sites are very arid areas and may not provide EPFs with appropriate moisture conditions needed for survival and reproduction. The most important abiotic environmental constraints for fungi are temperature, humidity or moisture and solar radiation (Inglis et al. 2001; Zimmermann 2007a), e.g., at the localities sampled in the Czech Republic, the average year-round temperature is 8.3 °C (18.2 °C in summer), whereas at Sde Eliyahu and Sde Nahum in Israel (localities sampled with the most arid conditions), the average year-round temperature is 22.2 °C (29.6 °C in summer). Other environmental data for localities in the Czech Republic are 70% R.H., 649 mm of annual precipitation and 1500–1600 h of sunshine (Czech Republic Meteorological Services 2021), while in the arid localities of Israel, averaged relative air humidity is 61%, annual precipitation is 306 mm and an annual solar radiation is about 3300 h Israel Meteorological Services 2021).

There are numerous studies and compilations on the impact of environmental factors on efficacy and viability of EPFs, (e.g., Keller and Zimmermann 1989; Fuxa 1995; Inglis et al. 2001; Zimmermann 2007a, b, 2008). Another possible reason for the lower incidence of fungi in Israel is that moisture content is dependent on the cropping cycle. While crops are growing, for example for onion and garlic (October–March), soil moisture is maintained by irrigation (if rains are not adequate), but toward harvest (May the beginning of the dry season) irrigation is stopped and soil desiccates creating an unfavorable environment for fungi until the next cropping cycle.

Besides EPFs, the present study also surveyed the occurrence of MPFs. The modified dilution plate method was used to isolate MPFs (Rabeendran et al. 1998). The soil dilution method is commonly used for the isolation of both MPFs and EPFs (Goettel and Inglis 1997). It is a qualitative method that focuses only on the occurrence of MPFs because quantitative estimation of *Trichoderma* spp. in soil is often difficult due to their rapid growth (Elad et al. 1981).

There are a wide range of MPFs, but they are dominated by representatives of the genus *Trichoderma* and *Clonostachys*. These are worldwide soilborne anamorphic fungi. *Trichoderma* spp. as well as *Clonostachys* spp. are facultative parasites of a wide spectrum of phytopathogenic fungi including *Alternaria* spp., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem, *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium culmorum* W.G. Smith, *Fusarium graminearum* Schwabe and *Sclerotinia sclerotiorum* (Jensen et al. 2000, 2002, 2004; Whipps and Lumsden 2001; Hue et al. 2009; Rodríguez et al. 2011; Nygren et al. 2018) but they can also live as saprotrophs. Some strains/species of *Trichoderma* and *Clonostachys* are, however, known to be also entomopathogenic (Ghosh and Pal 2016; Anwar et al. 2018; Podder and Ghosh 2019; Mohammed et al. 2021). The manifestation of their antagonism includes competition, parasitism and antibiosis (Brožová 2010). In particular, fungi of the genus *Fusarium* sp. play a very important role not only in the infection of bulb crops but also in the enhancement of *R. robini* populations on infected onion bulbs (Okabe and Amano 1991; Ofek et al. 2014). Thus, the application of MPFs can decrease the infestation of the bulb mite, too. The roots of onion seedlings dipped into the suspension of fungi *Trichoderma viride* Pers. and *Trichoderma harzianum* Rifai before planting reduced the *Fusarium* basal rot disease caused by *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, by 61.8% and 53.7%, respectively (El-Mougy and Abdel-Kader 2019). In the greenhouse experiment, the symptoms of *Fusarium* basal rot in the onion inoculated with *F. oxysporum* f. sp. *cepae* were also significantly reduced by *Trichoderma atroviride* Karsten and *T. harzianum* inoculated into the soil (Bunbury-Blanchette and Walker 2019).

Results of the present study showed that all soil samples from both countries contained fungi of the genus

Trichoderma. Lower prevalence of *Trichoderma* spp. was recorded in soil samples from Israel in comparison with samples from the Czech Republic. Lower occurrence of *Trichoderma* spp. in Israel may be, similarly to EPFs, due to environmental conditions, e.g., environmental and soil temperature, humidity, UV radiation (Domsch et al. 1980; Inglis et al. 2001; Zimmermann 2007a) or the absence of irrigation during some periods of the year.

The correlation analysis did not reveal any association between MPFs and EPFs indicating that there is no significant effect of mycoparasites on the occurrence of entomopathogens in soil. There are many studies that have examined the interactions between entomopathogens and mycoparasites. A study by Krauss et al. (2004) investigated the interaction between the entomopathogens, *B. bassiana*, *M. anisopliae* and *I. fumosorosea* and the mycoparasites *Clonostachys* spp., *T. harzianum* and *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams. The authors concluded that tested entomopathogens and mycoparasites were compatible and could be used in integrated pest management. On the contrary, other studies have observed an antagonistic effect of mycoparasites and entomopathogens (Moino Jr. and Alves 1999; Wen et al. 2020).

Since it is often necessary for agricultural producers to address arthropod pests and plant pathogens simultaneously (Keyser et al. 2016), the use of MPFs in combination with EPFs can improve biocontrol efficacy. However, their compatibility must be verified before using the entomopathogen and mycoparasite combination.

Conclusions

The abundance of EPFs differed significantly between localities; CFU density of EPFs was higher in the Czech Republic compared to Israel. The likely reason is that crops in Israel need to be irrigated, while during transient periods, when fields are empty and not irrigated, top soils desiccate and do not provide a sustainable environment for fungi. Additional reasons can be different types of soil and different climatic conditions between the two countries. Dominant genera among EPFs were *Metarhizium*; the only MPFs found were *Trichoderma* spp. The abundance and distribution of these fungi provide new information, understanding and insight for further studies on the biological control of soil pests.

Acknowledgements The authors thank the farmers for allowing access to their fields for the collection of soil samples. Mrs. Olga Divišová is thanked for her technical help.

Authors' contributions Conceptualization was done by JK and RZ. Methodology was carried out by JK and AB. Soil sampling was done by RZ, EP and JN. Experiments and data collection were carried out by JK. Data analysis was done by JK and RZ. Validation was done by

RZ and JN. Writing—original draft preparation were carried out by JK. Writing—review and editing were carried out by JK, RZ and EP. Visualization was done by VP. Supervision was done by RZ and AB. Funding acquisition was done by EP and RZ. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding This research was funded by institutional support RVO: 60077344 and co-financed by Grant Agency of the University of South Bohemia (project No. 018/2018/Z). It was also an integral part of a joint Czech Republic and Israeli project titled ‘New biorational methods applied to control selected pests as an alternative to chemical pesticides to prevent contamination of soil and water resource’, supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project No. 8G15006) and the Ministry of Science, Technology and Space, State Israel (project No. 3-13035). Publication of this study was funded by the Technology Agency of the Czech Republic (project No. TP01010022).

Data availability The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Consent for publication The corresponding author declares that any person named as co-author is aware of this fact.

References

- Anwar W, Ali S, Nawaz K, Iftikhar S, Javed MA, Hashem A, Alqarawi AA, Abd Allah EF, Akhter A (2018) Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*). *Biocontrol Sci Technol* 28:750–760. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1487030>
- Augustyniuk-Kram A, Kram KJ (2012) Entomopathogenic Fungi as an important natural regulator of insect outbreaks in forests (review). In: Blanco JA (ed) *Forest ecosystems—more than just trees*. InTech, pp 265–294
- Bidochka MJ, Kasperski JE, Wild GA (1998) Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Can J Bot* 76:1198–1204. <https://doi.org/10.1139/b98-115>
- Brožová J (2010) Mycoparasitic fungi *Trichoderma* spp. in plant protection—review. *Plant Protect Sci* 40:63–74. <https://doi.org/10.17221/459-PPS>
- Bueno-Pallero FÁ, Blanco-Pérez R, Vicente-Díez I, Rodríguez Martín JA, Dionísio L, Campos-Herrera R (2020) Patterns of occurrence and activity of entomopathogenic fungi in the Algarve (Portugal) using different isolation methods. *Insects* 11:352. <https://doi.org/10.3390/insects11060352>
- Bunbury-Blanchette AL, Walker AK (2019) *Trichoderma* species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against *Fusarium* basal rot of onion. *Biol Control* 130:127–135. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.11.007>
- Canfora L, Malusà E, Tkaczuk C, Tartanus M, Łabanowska BH, Pinzari F (2016) Development of a method for detection and quantification of *B. brongniartii* and *B. bassiana* in soil. *Sci Rep* 6:22933. <https://doi.org/10.1038/srep22933>
- Charnley AK, Collins SA (2007) Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek CP, Druzhinina IS (eds) *Environmental and microbial relationships*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 159–187
- Chase AR, Osborne LS, Ferguson VM (1986) Selective Isolation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an Artificial Potting Medium. *Fla Entomol* 69:285. <https://doi.org/10.2307/3494930>
- Czech Meteorological Services (2021) Environmental data. <https://www.chmi.cz>. Accessed 10 November 2021
- Degani O, Dor S (2021) *Trichoderma* biological control to protect sensitive maize hybrids against late wilt disease in the field. *JoF* 7:315. <https://doi.org/10.3390/jof7040315>
- Díaz A, Okabe K, Eckenrode CJ, Villani MG, Oconnor BM (2000) Biology, ecology, and management of the bulb mites of the genus *Rhizoglyphus* (Acari: Acaridae). *Exp Appl Acarol* 24:85–113. <https://doi.org/10.1023/A:1006304300657>
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH (1980) *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London, New York
- Elad Y, Chet I, Henis Y (1981) A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica* 9:59–67. <https://doi.org/10.1007/BF03158330>
- El-Mougy NS, Abdel-Kader MM (2019) Biocontrol measures against onion basal rot incidence under natural field conditions. *J Plant Pathol* 101:579–586. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-00237-8>
- FAO Crops FAOSTAT (2021) Countries—select all; regions—world + (total); elements—production quantity; items—garlic and onion; years—2019. <https://www.fao.org/home/en/>. Accessed 11 May 2021
- Fuxa JR (1995) *Biorational Pest control agents: formulation and delivery*. American Chemical Society, Washington, DC
- Gams W, Bissett J (2002) *Trichoderma and Gliocladium*. Volume 1: basic biology, taxonomy and genetics. CRC Press
- Gerson U, Gafni A, Paz Z, Szejnberg A (2008) A tale of three acaropathogenic fungi in Israel: *Hirsutella*, *Meira* and *Acaromyces*. *Exp Appl Acarol* 46:183–194. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9202-6>
- Ghosh SK, Pal S (2016) Entomopathogenic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and its comparative evaluation with malathion against the insect pest *Leucinodes orbonalis*. *Environ Monit Assess* 188:37. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-5053-x>
- Goettel MS, Inglis GD (1997) *Manual of techniques in insect pathology*. Press, San Diego, Calif, Acad
- 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. *J Invertebr Pathol* 98:256–261. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.009>
- Gupta SC, Leathers TD, Wicklow DT (1993) Hydrolytic enzymes secreted by *Paecilomyces lilacinus* cultured on sclerotia of *Aspergillus flavus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:99–103. <https://doi.org/10.1007/BF00166856>
- Hall RA (1976) A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* conidiospores on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *J Invertebr Pathol* 27:41–48. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(76\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0022-2011(76)90026-4)
- Harman GE, Kubicek CP (eds) (2002) *Trichoderma and Gliocladium*. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. CRC Press
- Hossain L, Rahman R, Khan MS (2017) Alternatives of Pesticides. In: Khan MS, Rahman MS (eds) *Pesticide residue in foods*. Springer International Publishing, Cham, pp 147–165
- Hue AG, Voldeng HD, Savard ME, Fedak G, Tian X, Hsiang T (2009) Biological control of *Fusarium* head blight of wheat with *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Can J Plant Pathol* 31:169–179. <https://doi.org/10.1080/07060660909507590>

- Humber RA (2012) Identification of entomopathogenic fungi. In: Lacey LA (ed) Manual of techniques in invertebrate pathology. Academic Press, London, UK, pp 151–157
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM, Strasser H (2001) Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI, Wallingford, pp 23–69
- Inglis GD, Enkerli J, Goettel MS (2012) Manual of techniques in invertebrate pathology, 2nd edn. Academic Press imprint of Elsevier Science, Oxford, New York
- Israel Meteorological Services (2021) Environmental data. <https://ims.gov.il/en/SurfaceObservations>. Accessed 14 November 2021
- Jensen B, Knudsen IMB, Jensen DF (2000) Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: Biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. Eur J Plant Pathol 106:233–242. <https://doi.org/10.1023/A:1008794626600>
- Jensen B, Knudsen IMB, Jensen DF (2002) Survival of conidia of *Clonostachys rosea* on stored barley seeds and their biocontrol efficacy against seed-borne *Bipolaris sorokiniana*. Biocontrol Sci Technol 12:427–441. <https://doi.org/10.1080/09583150220146013>
- Jensen B, Knudsen IMB, Madsen M, Jensen DF (2004) Biopriming of infected carrot seed with an antagonist, *Clonostachys rosea*, selected for control of Seedborne *Alternaria* spp. Phytopathology 94:551–560. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.6.551>
- Keller S, Zimmermann G (1989) Mycopathogens of soil insects. Elsevier
- Keller S, Kessler P, Schweizer C (2003) Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol 48:307–319. <https://doi.org/10.1023/A:1023646207455>
- Kenneth R, Muttath TI, Gerson U (1979) *Hirsutella thompsonii*, a fungal pathogen of mites. I. Biology of the fungus in vitro. Ann Appl Biol 91:21–28
- Keyser CA, Jensen B, Meyling NV (2016) Dual effects of *Metarhizium* spp. and *Clonostachys rosea* against an insect and a seed-borne pathogen in wheat: dual effects of *Metarhizium* spp. and *Clonostachys rosea*. Pest Manag Sci 72:517–526. <https://doi.org/10.1002/ps.4015>
- Klingen I, Eilenberg J, Meadow R (2002) Effects of farming system, field margins and bait insect on the occurrence of insect pathogenic fungi in soils. Agric Ecosyst Environ 91:191–198. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(01\)00227-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(01)00227-4)
- Konopická J, Bohatá A, Nermuť J, Jozová E, Mráček Z, Palevsky E, Zemek R (2021) Efficacy of soil isolates of entomopathogenic fungi against the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae). Syst Appl Acarol 1149–1167. <https://doi.org/10.11158/saa.26.6.11>
- Krauss U, Hidalgo E, Arroyo C, Piper SR (2004) Interaction Between the Entomopathogens *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* and the Mycoparasites *Clonostachys* spp., *Trichoderma harzianum* and *Lecanicillium lecanii*. Biocontrol Sci Technol 14:331–346. <https://doi.org/10.1080/09583150410001665196>
- Landa Z, Horňák P, Charvátová H, Osborne LS (2002) Distribution, Occurrence and potential use of entomopathogenic fungi in arable soils in Czech Republic. In: Proceedings of international conference ISTRO “Current trends in the research of soil environment.” pp 195–201
- Latch GCM, Falloon RE (1976) Studies on the use of *Metarhizium anisopliae* to control *Oryctes rhinoceros*. Entomophaga 21:39–48. <https://doi.org/10.1007/BF02372014>
- Lawande KE, Khar, A, Mahajan V, Srinivas PS, Sankar V, Singh RP (2009) Onion and garlic research in India. J Hort Sci 91–119
- Lebiush-Mordechai S, Erlich O, Maymon M, Freeman S, Ben-David T, Ofek T, Palevsky E, Tsrur Lahkin L (2014) Bulb and Root Rot in Lily (*Lilium longiflorum*) and Onion (*Allium cepa*) in Israel. J Phytopathol 162:466–471. <https://doi.org/10.1111/jph.12214>
- Majchrowska-Safaryan A, Tkaczuk C (2021) Abundance of entomopathogenic fungi in leaf litter and soil layers in forested habitats in Poland. Insects 12:134. <https://doi.org/10.3390/insects12020134>
- Marti GA, Lastra CCL, Pelizza SA, García JJ (2006) Isolation of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (Ascomycota: Hypocreales) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* Klug (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area in Argentina. Mycopathologia 162:369–372. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0072-3>
- McDonald MR, de los Angeles Jaime M, Hoviy MHY (2004) Management of diseases of onions and garlic. In: Naqvi SAMH (ed) Diseases of fruits and vegetables: vol II. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 149–200
- McGuire AV, Northfield TD (2020) Tropical occurrence and agricultural importance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Front Sustain Food Syst 4:6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00006>
- Medo J, Cagaň L (2011) Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. Biol Control 59:200–208. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.07.020>
- Meyling NV, Eilenberg J (2006) Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. Agric Ecosyst Environ 113:336–341. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.10.011>
- Meyling NV, Eilenberg J (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. Biol Control 43:145–155. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.07.007>
- Mishra RK, Jaiswal KR, Kumar D, Saabale PR, Singh A (2014) Management of major diseases and insect pests of onion and garlic: a comprehensive review. J Plant Breed Crop Sci 6:160–170. <https://doi.org/10.5897/JPBSCS2014.0467>
- Mohammed AA, Younus AS, Ali AN (2021) Efficacy of *Clonostachys rosea*, as a promising entomopathogenic fungus, against coleopteran stored product insect pests under laboratory conditions. Egypt J Biol Pest Control 31:55. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00405-6>
- Moino A Jr, Alves SB (1999) EFEITO ANTAGÔNICO DE *Trichoderma* sp. NO DESENVOLVIMENTO DE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Sci Agric (piracicaba, Braz) 56:217–224. <https://doi.org/10.1590/S0103-90161999000100029>
- Nygren K, Dubey M, Zapparata A, Iqbal M, Tzelepis GD, Durling MB, Jensen DF, Karlsson M (2018) The mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* responds with both common and specific gene expression during interspecific interactions with fungal prey. Evol Appl 11:931–949. <https://doi.org/10.1111/eva.12609>
- Ofek T, Gal S, Inbar M, Lebiush-Mordechai S, Tsrur L, Palevsky E (2014) The role of onion-associated fungi in bulb mite infestation and damage to onion seedlings. Exp Appl Acarol 62:437–448. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9750-2>
- Okabe K, Amano H (1991) Penetration and Population Growth of the Robine Bulb Mite, *Rhizoglyphus robini* CLAPAREDE (Acari:Acaridae), on healthy and *Fusarium*-Infected Rakkyo Bulbs. Appl Entomol Zool 26:129–136. <https://doi.org/10.1303/aez.26.129>
- Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE (2010) Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. Biocontrol 55:113–128. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9241-x>

- Paz Z, Burdman S, Gerson U, Szejnberg A (2007a) Antagonistic effects of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*: fungal antagonism of rust mite. *J Appl Microbiol* 103:2570–2579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03512.x>
- Paz Z, Gerson U, Szejnberg A (2007b) Assaying three new fungi against citrus mites in the laboratory, and a field trial. *Biocontrol* 52:855–862. <https://doi.org/10.1007/s10526-006-9060-2>
- Paz Z, Bilkis I, Gerson U, Kerem Z, Szejnberg A (2011) Argovin, a novel natural product secreted by the fungus *Meira argovae*, is antagonistic to mites: a novel mycotoxin affecting the citrus rust mite. *Entomol Exp Appl* 140:247–253. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01155.x>
- Podder D, Ghosh SKr, (2019) A new application of *Trichoderma asperellum* as an anopheline larvicide for ecofriendly management in medical science. *Sci Rep* 9:1108. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37108-2>
- Prerarová E, Zemek R, Weyda F, Volter L (2009) Entomopathogenic fungi isolated from soil in the vicinity of *Cameraria ohridella* infested horse chestnut trees. In: Ehlers RU, Crickmore N, Enkerli J, Glazer I, Lopez-Ferber M, Tkaczuk C (eds) IOBC/WPRS Bulletin, pp 321–324
- Quesada-Moraga E, Navas-Cortés JA, Maranhao EAA, Ortiz-Urquiza A, Santiago-Álvarez C (2007) Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol Res* 111:947–966. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.06.006>
- Rabeendran N, Jones EE, Stewart A (1998) Isolation and *in vitro* screening of soil fungi for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*. *pnzppc* 51:102–106. <https://doi.org/10.30843/nzpp.1998.51.11666>
- Rath AC, Koen TB, Yip HY (1992) The influence of abiotic factors on the distribution and abundance of *Metarhizium anisopliae* in Tasmanian pasture soils. *Mycol Res* 96:378–384. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80956-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80956-8)
- Rehner SA, Buckley E (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97:84–98. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.84>
- Rehner SA, Minnis AM, Sung G-H, Luangsa-ard JJ, Devotto L, Humber RA (2011) Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103:1055–1073. <https://doi.org/10.3852/10-302>
- Ribeiro WRC, Butler EE (1992) Isolation of mycoparasitic species of *Pythium* with spiny oogonia from soil in California. *Mycol Res* 96:857–862. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81031-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81031-9)
- Rodríguez MA, Cabrera G, Gozzo FC, Eberlin MN, Godeas A (2011) *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent: *Clonostachys rosea* as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist. *J Appl Microbiol* 110:1177–1186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04970.x>
- Rombach MC, Humber RA, Roberts DW (1986) *Metarhizium flavoviride* var. minus, var. nov., a pathogen of plant- and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon* 1986:87–92
- Samson RA, Evans HC, Latgé J-P (1988) Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Sánchez-Peña SR, Lara JS-J, Medina RF (2011) Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. *J Insect Sci* 11:1–10. <https://doi.org/10.1673/031.011.0101>
- Scheepmaker JWA, Butt TM (2010) Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations. *Biocontrol Sci Technol* 20:503–552. <https://doi.org/10.1080/09583150903545035>
- Sharifi-Rad J, Mnayer D, Tabanelli G, Stojanović-Radić ZZ, Sharifi-Rad M, Yousaf Z, Vallone L, Setzer WN, Iriti M (2016) Plants of the genus *Allium* as antibacterial agents: from tradition to pharmacy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 62:57–68
- Sharma L, Bohra N, Rajput VD, Quiroz-Figueroa FR, Singh RK, Marques G (2020) Advances in entomopathogen Isolation: a case of bacteria and fungi. *Microorganisms* 9:16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010016>
- Sharma L, Oliveira I, Torres L, Marques G (2018) Entomopathogenic fungi in Portuguese vineyards soils: suggesting a ‘*Galleria-Tenebrio*-bait method’ as bait-insects *Galleria* and *Tenebrio* significantly underestimate the respective recoveries of *Metarhizium (robertsii)* and *Beauveria (bassiana)*. *MC* 38:1–23. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.38.26790>
- Siegel S, Castellan NJ (2003) Nonparametric statistics for the behavioral sciences, 2nd edn. [reprinted]. McGraw-Hill, Boston, Mass
- Šimáčková K, Kročáková J, Bohatá A, Herrero N (2014) Diversity and distribution of entomopathogenic fungi in Czech Republic soils. In: 47th Annual meeting of the society for invertebrate pathology and international congress on invertebrate pathology and microbial control. Mainz, p 103
- Stenberg T (1997) Natural occurrence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with focus on infectivity to Sitona species and other insects in lucerne. Dissertation, The Royal Veterinary and Agricultural University
- Tkaczuk C, Król A, Majchrowska-Safaryan A, Niecewicz Ł (2014) The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. *J Ecol Eng* 2014:137–144. <https://doi.org/10.12911/22998993.1125468>
- Tsui CKM, Woodhall J, Chen W, Lévesque CA, Lau A, Schoen CD, Baschien C, Najafzadeh MJ, de Hoog S (2011) Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus* 2011:177–89. <https://doi.org/10.5598/ima fungus.2011.02.02.09>
- Vänninen I (1996) Distribution and occurrence of four entomopathogenic fungi in Finland: effect of geographical location, habitat type and soil type. *Mycol Res* 100:93–101. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80106-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80106-7)
- Vänninen I, Tyni-Juslin J, Hokkanen H (2000) Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. *Biocontrol* 45:201–222. <https://doi.org/10.1023/A:1009998919531>
- Wen C, Xiong H, Wen J, Wen X, Wang C (2020) *Trichoderma* species attract *Coptotermes formosanus* and antagonize termite pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Front Microbiol* 11:653. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00653>
- Whipps JM, Lumsden RD (2001) Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: Butt TM, Jackson C, Magan N (eds) Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CABI, Wallingford, pp 9–22
- Zemek R, Konopická J, Bohatá A (2018) Inoculation of sphagnum-based soil substrate with entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae). *AIP Conf Proc* 1954:030009. <https://doi.org/10.1063/1.5033389>
- Zimmermann G (1986) The ‘*Galleria bait method*’ for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J Appl Entomol* 102:213–215. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1986.tb00912.x>
- Zimmermann G (2007a) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Technol* 17:879–920. <https://doi.org/10.1080/09583150701593963>
- Zimmermann G (2007b) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Technol* 17:553–596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>

Zimmermann G (2008) The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Sci Technol* 18:865–901. <https://doi.org/10.1080/09583150802471812>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Article

Efficacy of soil isolates of entomopathogenic fungi against the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae)

JANA KONOPICKÁ^{1,2}, ANDREA BOHATÁ², JIŘÍ NERMUŤ¹, EVA JOZOVÁ², ZDENĚK MRÁČEK¹, ERIC PALEVSKÝ³ & ROSTISLAV ZEMEK^{1*}

¹ Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Institute of Entomology, České Budějovice, Czech Republic

² University of South Bohemia, Faculty of Agriculture, Department of Plant Production, České Budějovice, Czech Republic

³ Newe-Ya'ar Research Center, Agricultural Research Organization, Department of Entomology, Ramat Yishay, Israel

*corresponding author: rosta@entu.cas.cz

Abstract

The bulb mite, *Rhizoglyphus robini*, is a serious pest of garlic, onion and other crops. The mite is usually found in association with dangerous fungal pathogens such as *Fusarium* spp. Control of this pest has relied upon the use of synthetic acaricides but chemical control of the bulb mite is difficult because it is able to develop resistance quickly. Thus, alternative control methods, e.g. biological control, need to be developed and implemented. The aim of this study was to assess efficacy of selected strains of entomopathogenic fungi (EPF) against adult females of *R. robini* under laboratory conditions. New EPF strains were isolated from soil samples collected in onion and garlic fields in the Czech Republic and Israel using soil elution and cultivation on selective media. Fungal species were determined using macroscopic, microscopic and molecular markers. The efficacy against *R. robini* females was tested in 17 isolated and 3 reference strains of EPF. Results revealed high variability among species and strains. The highest efficacy against *R. robini* mites was found in strains of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples collected in the Czech Republic which caused mortality up to 99.3%, and a *Metarhizium indigoticum* strain from Israel causing 98.3% mortality after four days of bioassay. *Isaria fumosorosea* strains did not caused mortality higher than 40%. The lowest virulence was found in *Beauveria* spp. strains causing mortality of mites between 5 and 25%. Median lethal time (LT₅₀) and median lethal concentration (LC₅₀) in the three most virulent strains ranged between 2 and 4 days and between 1.01×10⁴ and 2.36×10⁵ spores/ml, respectively. The concentration-response models indicated that the *M. indigoticum* strain is more lethal than *M. anisopliae* strains. The present study showed that some strains of entomopathogenic fungi, especially from the genus *Metarhizium*, could be perspective biocontrol agents against *R. robini*.

Key words: Alliaceae, soil mites, *Metarhizium*, *Isaria*, *Beauveria*, biological pest control, mycoacaricides, virulence

Introduction

Bulb mites of the genus *Rhizoglyphus* are economically important pests of plants with bulbs, corns, and tubers. Their main hosts are species in the family Liliaceae but they often attack other important crops such as potatoes (*Solanum* sp.) and carrots (*Daucus carota*) (Díaz *et al.* 2000). Fan and Zhang (2004) published a revision of the Australasia and Oceania species of *Rhizoglyphus* and more recently Barbosa and Moraes (2020) reported on the species in Brazil.

Rhizoglyphus robini (Claparède) (Acari: Acaridae) is considered one of the most serious pests of onion, garlic and ornamentals such as lily, tulips and hyacinths in storage, greenhouse and in the field around the world (Díaz *et al.* 2000; Fan & Zhang 2004). This species has a very high reproductive rate. When offered peanuts as a sole food source, the mean total fecundity was 690 eggs

and the intrinsic rate of population increase (r_m) was estimated to be 0.285 (Gerson *et al.* 1983). Besides causing direct feeding damage, this pest also disseminates phytopathogenic bacteria and fungi, e.g. *Fusarium oxysporum*, which infect bulbs, facilitating the pathogens entry into host plants (Poe *et al.* 1979; Okabe & Amano 1991; Díaz *et al.* 2000; Hanuny *et al.* 2008; Zindel *et al.* 2013; Ofek *et al.* 2014).

With the exceptions of solarization of soil (Gerson *et al.* 1981) or hot-water treatment of bulbs (Conijn 1992), the control of this pest is still based almost entirely on broad-spectrum pesticides, even though it has been known for many years that bulb mites quickly develop resistance to pesticides (Poe *et al.* 1979; Kuwahara 1988; Díaz *et al.* 2000). Furthermore the application of these chemicals to soil negatively impacts non-target organisms, e.g. earthworms and soil microorganisms, leaves residues in food crops and contaminates groundwater. For these reasons broad-spectrum pesticides have been targeted by the European community for deregistration (EC 2009). Thus, alternative, environmentally safe control strategies, e.g. biological control, need to be developed and implemented. Efforts to develop biocontrol techniques for bulb mites have been undertaken in many countries and mostly involved the use of soil-dwelling predatory mites, e.g. *Gaeolaelaps aculeifer* (Canestrini) (Acari: Laelapidae) (Lesna *et al.* 1995, 1996). A recent study by Nermut' *et al.* (2019) showed that some, especially small, entomopathogenic nematodes (EPN) are able to invade and kill adult females of *R. robini*. The most promising species were *Steinernema huense* (Nematoda: Steinernematidae), *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. amazonensis* (Nematoda: Heterorhabditidae) causing mortality in *R. robini* up to 30%. Mortality of mites treated by culture supernatants of the nematode symbiotic bacteria of the genus *Xenorhabdus* was generally lower but some bacterial strains showed repellent effect to mites. Due to their relatively low efficacy, EPNs and the metabolites of their symbiotic bacteria do not seem to represent a viable option for bulb mite biocontrol as a standalone approach (Nermut' *et al.* 2019).

Entomopathogenic fungi (EPFs) represent another promising group of biocontrol agents. Their advantages are that they do not need to be ingested as they are able to penetrate the host cuticle and can be relatively easily produced (Shahid *et al.* 2012). Many EPFs species attack Acari and can be used for biological control of mite pests. Besides Acari-specific pathogens such as *Hirsutella thompsonii* (Fisher) and *Neozygites* spp. (Entomophthorales), 'nonspecialist' mitosporic fungi (Hyphomycetes) like *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Isaria fumosorosea* (Wize), *I. farinosa* (Holmsk.), and *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams have potential to control some mite species (Chandler *et al.* 2000). Most studies on efficacy of EPFs against mites have targeted ticks (Kaaya *et al.* 1996; Kaaya & Hassan 2000; Fernandes & Bittencourt 2008), spider mites (Chandler *et al.* 2005; Wekesa *et al.* 2005; Shi & Feng 2009; Ullah & Lim 2017; Shang *et al.* 2018; Khoury *et al.* 2020) and eriophyoid mites (Latge *et al.* 1988; McCoy 1996; Van der Geest *et al.* 2000). To our knowledge, only three EPFs species have been tested against *R. robini* under laboratory or greenhouse conditions: *Hirsutella kirchneri* (Rostrup) Minter, Brady and Hall (Sztejnberg *et al.* 1997), *I. fumosorosea* (Zemek *et al.* 2018) and *Metarhizium brunneum* Petch (Ment *et al.* 2020). While the first two species were not able to control *R. robini*, *M. brunneum* was found to be a promising biocontrol agent against this pest.

The aim of our study was to assess the possibility of fungal biocontrol of *R. robini* by new EPF strains isolated from soil samples collected in onion and garlic fields in the Czech Republic and Israel. The efficacy of these strains was compared with *I. fumosorosea* strain CCM 8367 and two commercially used strains, *B. bassiana* strain GHA and *M. brunneum* Petch strain F52.

Material and methods

Rhizoglyphus robini

The laboratory culture of *R. robini* was established from mites originating from rotting onion plants collected in Israel. The mites were maintained in large Petri dishes lined with wet filter paper using crushed raw peanuts as a food source. The dishes with mites were kept in darkness at 20 °C.

Entomopathogenic fungi

In total, 17 EPF strains were isolated from soil of several, mostly pesticide free onion and garlic fields in Pilsen and South Bohemian regions in the Czech Republic and in the Beit She'an Valley, Jezreel Valley and Lower Galilee in Israel. Soil sampling was performed during vegetation season in 2017. EPF isolates were obtained by water elution of soil samples and cultivation using selective medium containing dodine (Chase *et al.* 1986). Strains of EPF were identified on the basis of macroscopic, microscopic and genetic characteristics.

DNA for genetic analysis was extracted from fresh mycelium grown at 25±1 °C for 7 days on Petri dishes with PDA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) medium. Each mycelium was collected to a sterile 1.5 mL microtube. The extraction method used was based on CTAB-PVP (Doyle 1991) with modification for fungi. Genomic DNA was amplified by PCR with universal primers NL1 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' (forward) and NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' (reverse) (O'Donnell 1992; 1993). PCR reactions were carried out in a volume 25 µL containing in 1X reaction buffer (75 mM Tris-HCl, pH=8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween® 20 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs), 1.25 U Taq Purple DNA polymerase (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ), 10 pmol of both forward and reverse primer and 50 ng template DNA. Microtubes were placed in a thermal cycler (TProfessional Basic Gradient, Biometra) with the following program: 1 cycle of 94 °C for 5 min, 25 cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and 15 s, and final elongation at 72 °C for 5 min. The part of amplified PCR products was visualized on 2% agarose gel. The PCR products were sequenced by SEQme (Czech Republic). The sequences obtained were edited, compiled and aligned using Geneious (New Zealand) software. Sequence similarity searches were performed using NCBI GenBank BLASTn.

Cultures have been deposited at the Biology Centre CAS, České Budějovice. GenBank accession numbers for all 17 strains are listed in Table 1. In addition, three reference strains were used in efficacy bioassays. Two reference strains were re-isolated from commercial mycopesticides: *B. bassiana* strain GHA (BotaniGard® WP, Certis USA, Llc., Butte, MT, USA) and *M. brunneum* strain F52 (Met52® EC, Novozymes Biological, Franklinton, NC, USA). The species *M. brunneum* was previously classified as *M. anisopliae* (Bischoff *et al.* 2009). The third strain was CCM 8367 strain of *I. fumosorosea*, which originates from the horse chestnut leaf miner, *Cameraria ohridella*, Deschka & Dimić (Lepidoptera: Gracillariidae) collected in the Czech Republic (Zemek *et al.* 2007). The strain is patented (Prenerová *et al.* 2013, 2015) and deposited in the Czech Collection of Microorganisms in Brno.

All strains were cultivated on PDA medium at 25±1 °C and 16L:8D photoperiod. After 10 days of incubation, the spore suspensions were prepared from each strain by scraping off conidiospores into a sterile solution of 0.05% (v/v) Tween® 80 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Suspensions were filtered through sterile gauze to separate the mycelium and clusters of spores. In uniform suspension, the number of spores was counted with a Neubauer improved counting chamber (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and subsequently the suspension was adjusted to the required concentration. The suspension was left for approximately 12 hours at temperature 23±1 °C to accelerate and synchronize germination of conidia (Dillon & Charnley 1985, 1990) before its

application. Viability of spores was verified using a standard germination test (Skalický *et al.* 2014). Ten drops from suspension were applied using a 1 µl inoculation loop on the surface of 2% water agar, which was poured in a thin layer onto the surface of a sterile slide. After the drops had dried, the slides were moved into a wet chamber and incubated at 25±1 °C for 24 h. Percentage of germinating spores was determined using an Olympus CH20 light microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan); bright field, 400× magnification. The spore germination of all strains was >95%.

Bioassays

Efficacy of EPF strains was assessed in single-dose bioassays using 24-well polystyrene tissue culture plates (Orange Scientific, Braine-L'Alleud, Belgium). Plate dimensions were 128×86 mm and bottom area of single well was 193 mm². Filter paper discs of 14 mm in diameter were placed into each well and moistened with 100 µL of sterile distilled water. Water did not only provided moisture, but also created a surface tension that prevented the mites from escaping from the experimental arena (Chen 1990). Four *R. robini* females were placed into each well and the plate was sprayed with 2 mL of fungus suspension with concentration 1×10⁷ spores per 1 mL using a Potter spray tower (inner diameter of cylinder 29 cm, spray pressure 50 kPa). Density of conidia was thus approx. 3×10⁴ spores per cm², i.e. 5.8×10⁴ spores per a single plate well. Control variant was treated with a sterile solution of 0.05% Tween 80®. After treatment, plates were covered with lids and incubated at 25±1°C and constant darkness for four days. After this period mortality of mites was recorded using a dissection microscope Technival 2 (Carl Zeiss, Jena, Germany) at a magnification 25× and 40×. Mycosis on cadavers was documented by Olympus SZX12 equipped with an Olympus E-3 digital camera (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) at 50× magnification. Each strain bioassay was conducted in 3 replicates, i.e. 3 times one plate with 96 mites tested.

Dose-response of *R. robini* to EPFs was assessed in three selected strains of *Metarhizium* spp. which showed high efficacy in previous single-dose experiments. The mean and the median time to death (LT₅₀, the number of days until 50% of mites were dead) and lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) of conidia were estimated from cumulative mortality of mites at five concentrations ranging from 1×10³ to 1×10⁷ spores/ml of suspension. The bioassays were performed as described above except that mortality was checked daily. The control was treated with 0.05% Tween 80® solution. Each concentration test was repeated twice; 96 mites were used per replication.

Scanning electron microscopy of pathogenesis

Pathogenesis was studied in two selected EPF strains, BEA 02 and MET 08. Samples of *R. robini* females treated by either strain were collected at 24, 48, 72 and 96 hours after the application of fungal suspension. Mites were fixed and dehydrated in vapors from crystals of osmium tetroxide in Petri dishes properly sealed with Parafilm® at -20 °C in a freezer. After three weeks the Petri dishes with mites were placed in the fume hood and kept open for 24 hours to evaporate remaining osmium tetroxide. The following day the mites were mounted on aluminium stubs using a double-sided carbon tape and coated with gold using a Sputter Coater (Baltec-SCD 050). The mites were examined in the scanning electron microscope JEOL 7401-FE (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at an accelerating voltage of 4 kV.

Statistical analysis

Mortality in *R. robini* females was expressed as mean percentage ± standard error of the mean. A generalized linear model with a binomial distribution and logit link was used to analyse data. Treatment and replication were set as fixed effects. The analysis was performed in SAS® Studio for Linux (SAS Institute Inc. 2018) using the GLM procedure (PROC GENMOD) of SAS/STAT

module (SAS Institute Inc. 2017). Means were separated by the least-square means (LSMEANS) statement of SAS with Tukey-Kramer adjustment for multiple comparisons. Dose-response experiment data were first subjected to survival analysis. The Kaplan–Meier product limit estimate calculated in the LIFETEST procedure in SAS/STAT module was used to determine both the mean and the median time to death (LT₅₀) for each selected strain. Wilcoxon and log-rank test statistics (PROC LIFETEST) were used to test the global hypothesis that mortality (time to death) differed between strains. Data were further analysed using Probit analysis (PROC PROBIT) to estimate lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀). In all tests P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

In total, 17 strains of EPFs were isolated and identified as species *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch, *I. fumosorosea*, *M. anisopliae* and *Metarhizium indigoticum* (Kobayasi & Shimizu) Kepler, S.A. Rehner & Humber (Table 1). The results of bioassays revealed that while in the control treatment mortality of *R. robini* females was only 2.8% without any evidence of fungal infection, some strains belonging to genus *Metarhizium* were able to kill almost all treated mites within four days (Fig. 1). Mycosis on the cadavers followed by sporulation was observed in few mites treated by *Beauveria* spp. strains (Fig. 2 A) and almost on all cadavers of mites treated by *Metarhizium* spp. strains (Fig. 2 B, C). No obvious symptoms of mycosis were found four days after the treatment by strains of other EPF species. Observation of pathogenesis revealed that conidia germinated in 24 hours and in 48 hours were able to form appressoria (Fig. 3 A1-2). Strains of *Metarhizium* genera were the fastest in development of conidiophores and sporulation was observed as early as 72 hours after fungus application (Fig. 3 B3).

TABLE 1. Strains of entomopathogenic fungi isolated within this study and used in bioassays.

Species	Strain	Country of origin	Genbank accession number
<i>Beauveria bassiana</i>	BEA 01	Israel	MN960362
	BEA 02	Israel	MN960361
	BEA 03	Czech Republic	MN960359
	BEA 04	Czech Republic	MN960363
<i>Beauveria brongniartii</i>	BEA 05	Czech Republic	MN960372
<i>Isaria fumosorosea</i>	ISA 01	Israel	MN960358
	ISA 02	Czech Republic	MN960357
<i>Metarhizium indigoticum</i>	MET 01	Israel	MN960355
<i>Metarhizium anisopliae</i>	MET 02	Israel	MN960371
	MET 03	Israel	MN960367
	MET 04	Israel	MN960373
	MET 05	Czech Republic	MN960356
	MET 06	Czech Republic	MN960369
	MET 07	Czech Republic	MN960366
	MET 08	Czech Republic	MN960370
	MET 09	Czech Republic	MN960374
	MET 10	Czech Republic	MN960365

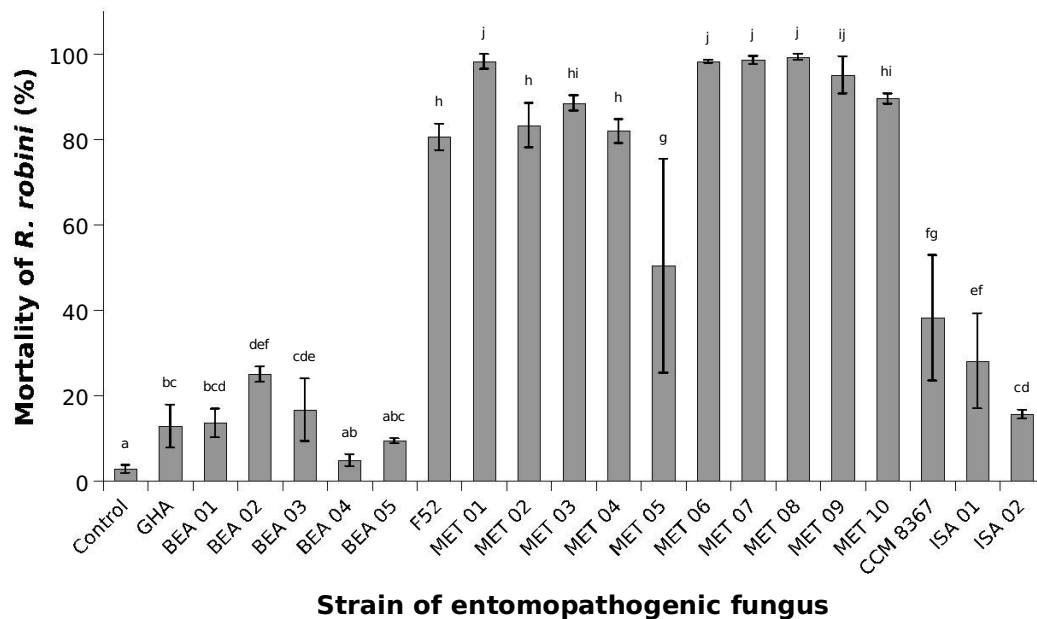


FIGURE 1. Mortality of *Rhizoglyphus robini* adult females treated with various strains of entomopathogenic fungi. See Table 1 for the key to EPF strains. Data presented are means (\pm SE), with three replicates of 96 mites for each strain. A generalized linear model was fitted and pairwise between treatment differences were tested using the least-square means. Different letters indicate significant differences between columns ($P < 0.05$).

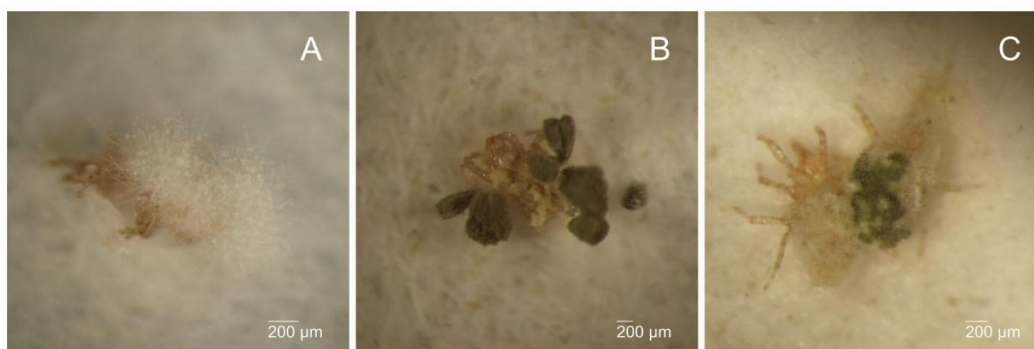


FIGURE 2. Photographs (dissection microscope, 50 \times) of sporulated entomopathogenic fungi on *Rhizoglyphus robini* cadavers. A: *Beauveria bassiana* strain BEA 02, B: *Metarhizium indigoticum* strain MET 01, C: *Metarhizium anisopliae* strain MET 08.

The most virulent were particularly *M. anisopliae* strains MET 08 and MET 07 from the Czech Republic and *M. indigoticum* strain MET 01 from Israel causing mean mortality 99.3, 98.6 and 98.3%, respectively. The strain F52 caused also high mortality of *R. robini* females (80.6%). Other species of EPF turned out to be much less virulent against *R. robini*. The reference strain of *I. fumosorosea* CCM 8367 caused mortality less than 40%. Strains of the genus *Beauveria* showed very low acaropathogenic effect against *R. robini* females. Mortality ranged from 4.9% (BEA 04) to 25.0% (BEA 02). The effect of strain on virulence against *R. robini* was highly significant ($\chi^2=4086.32$, $df=20$, $P < 0.001$). No significant differences were found among replications ($\chi^2=1.41$, $df=2$, $P=0.493$).

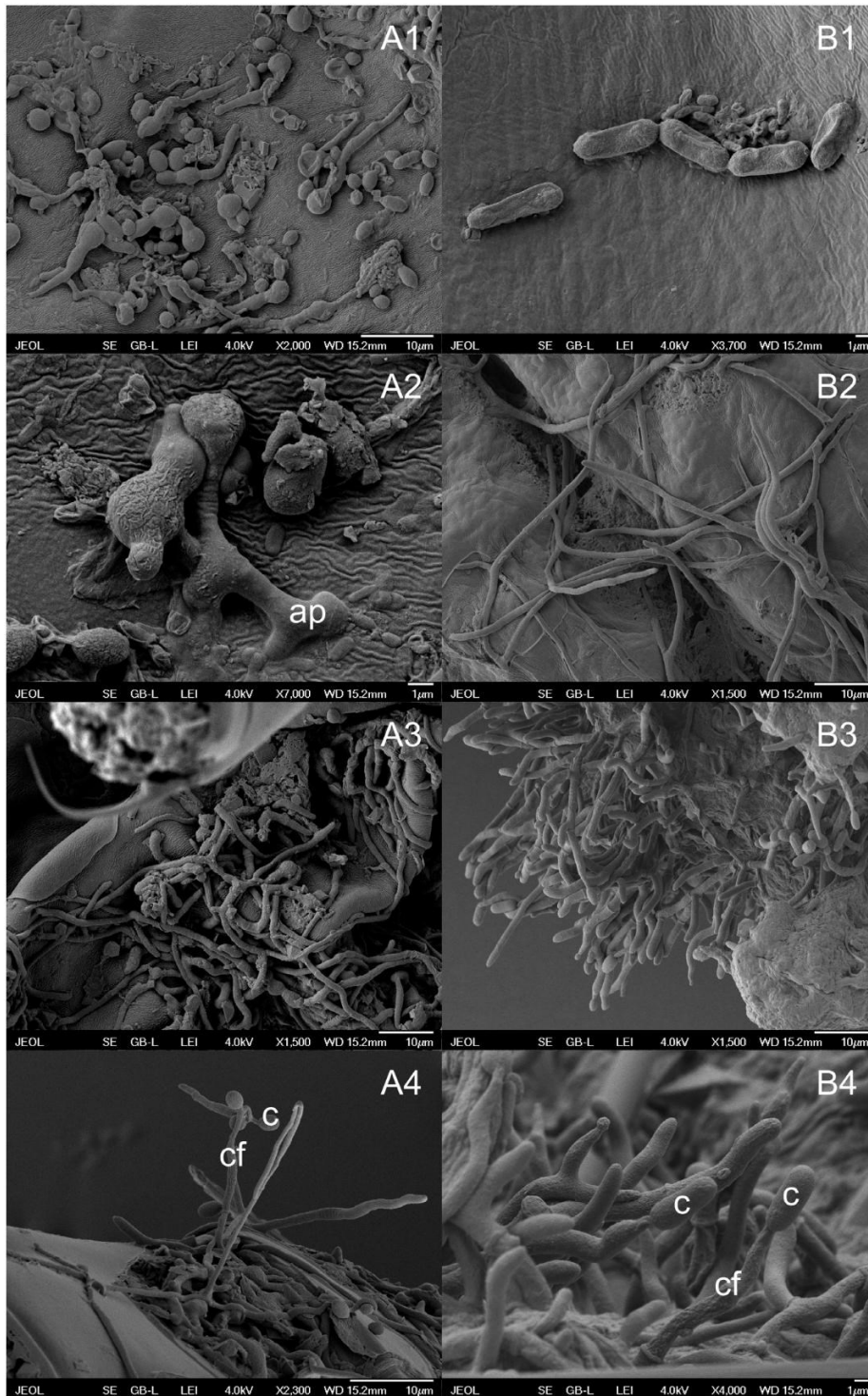


FIGURE 3. Scanning electron micrographs showing pathogenesis of *Beauveria bassiana* strain BEA 02 (A) and *Metarhizium anisopliae* strain MET 08 (B) on *Rhizoglyphus robini* females at 24 (1), 48 (2), 72 (3) and 96 (4) hours after fungus application. A1: germinating conidia; B1: attachment of conidia to mite cuticle; A2: appressorium (ap) formation; B2 and A3: mycelium on the edge of the anal opening; B3: the beginning of sporulation; A4 and B4: details of conidiophores (cf) with conidia (c).

Cumulative mortality at the end of dose-response experiments reached 97.9, 99.0 and 99.5% in mites treated with the highest concentration of MET 01, MET 07 and MET 08 strain, respectively (Fig. 4). First mycosis was observed on the 3rd day after fungus application at the highest concentration when 22.3%, 12.0% and 14.0% of cadavers had symptoms of mycosis in MET 01, MET 07 and MET 08 strain, respectively. Four days after the treatment, mycosed cadavers were found also at concentrations 1×10^5 and 1×10^6 spores/ml (Fig. 5). Survival analysis of obtained data revealed no statistically significant effect of strain at the lowest concentration, i.e. 1×10^3 spores/ml (Wilcoxon test, $\chi^2=1.705$, $P=0.426$; log-rank test, $\chi^2 = 1.654$, $P = 0.437$) but highly significant differences were found at all higher concentrations (Wilcoxon test and log-rank test, $P<0.001$). The shortest median survival time ($LT_{50}=2.0$ days) was estimated in strain MET 07 applied at concentration 1×10^7 spores/ml (Table 2). The log-probit regression lines describing relationship between concentration of MET01, MET07 and MET08 strains and mortality of *R. robini* (Fig. 6) have a form $y = -3.830 + 0.957x$, $y = -3.315 + 0.617x$ and $y = -3.324 + 0.711x$, respectively. The estimated values of LC_{50} and LC_{90} were lowest in strain MET 01 (Table 3).

TABLE 2. Corrected mortality, mean survival time (\pm SE) and median lethal time (LT_{50}) of *Rhizoglyphus robini* adult females treated by suspensions of selected strains of *Metarhizium* spp.

Species	Strain	Concentration(spores/ml)	Mortality ^a (%)	Survival time ^b (days)	LT_{50} (95% CI) (days)
<i>M. indigoticum</i>	MET 01	1×10^3	11.96	3.81 ± 0.04	NA
		1×10^4	40.76	3.64 ± 0.06	NA
		1×10^5	95.11	3.09 ± 0.07	3.0 (3.0–4.0)
		1×10^6	95.65	2.84 ± 0.07	3.0 (NA–NA)
		1×10^7	97.83	2.55 ± 0.07	3.0 (2.0–3.0)
<i>M. anisopliae</i>	MET 07	1×10^3	4.14	3.74 ± 0.05	NA
		1×10^4	10.06	3.72 ± 0.06	NA
		1×10^5	12.42	3.67 ± 0.06	NA
		1×10^6	48.52	3.45 ± 0.07	4.0 (4.0–NA)
		1×10^7	98.82	2.29 ± 0.07	2.0 (NA–NA)
	MET 08	1×10^3	7.78	3.69 ± 0.06	NA
		1×10^4	19.16	3.67 ± 0.06	NA
		1×10^5	31.14	3.54 ± 0.07	NA
		1×10^6	85.63	3.12 ± 0.07	3.0 (3.0–4.0)
		1×10^7	99.40	2.64 ± 0.06	3.0 (NA–NA)

^a Percent of dead individuals at the end of experiment corrected for mortality in control using the Abbott equation (Abbott 1925).

^b The mean survival time and its standard error were underestimated because the largest observation was censored and the estimation was restricted to the largest event time.

Discussion

Fungal insect pathogens are important natural control agents for many insect and other arthropod pests. These pathogens have a potential to significantly reduce host insect populations (Burgess 1981; Carruthers & Soper 1987; McCoy *et al.* 1988). Many EPF can be not only entomopathogenic but also acaropathogenic. The study by Chandler *et al.* (2000) describes many EPF species capable of attacking mites. In theory, Acari make good hosts for fungal pathogens because they are generally soft bodied and many inhabit environments with humid microclimates (Ferro & Southwick 1984) which favour infection and disease transmission (Hajek & St Leger 1994).

There are many studies that have focused on the use of the EPF *H. thompsonii* against mites. In laboratory experiments, Gerson *et al.* (1979) observed 94% mycosis of the carmine spider mite, *Tetranychus cinnabarinus* Boisduval (Acari: Tetranychidae), within four days of inoculation at a constant 100% relative humidity (RH), 68% mycosis at 100% RH for 18 h per day, and 23% mycosis at 100% RH for 6 h per day. *Hirsutella thompsonii* was also shown to be effective against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch in laboratory bioassays, causing 96.5% mortality with unformulated conidia and up to 99% mortality with the formulated Mycar® (Gardner *et al.* 1982). McCoy *et al.* (1971) applied the mycelia of *H. thompsonii* against the citrus rust mite, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) (Acari: Eriophyiidae) infestation on citrus trees, observing sporulation after about 48 h, followed by a decline in mite infestation, which only began to recover 10–14 weeks later. In contrast, Sztejnberg *et al.* (1997) reported a failure of an isolate of *H. kirchneri*, obtained from the cereal rust mite (original accession number CMI 257456) to infect *R. robini*. Another EPF that has an acaropathogenic effect is *Neozygites floridana* (Weiser & Muma) Remaud. & S. Keller. It was first described as the cause of population declines in the Texas citrus mite, *Eutetranychus banksi* (McGregor) in Florida (Weiser & Muma 1966). *Neozygites floridana* is highly effective against the two-spotted spider mite, *T. urticae* and the tobacco spider mite, *Tetranychus evansi* Baker and Pritchard in several major crops where it causes natural epizootics (Humber *et al.* 1981; Klubertanz *et al.* 1991; Nordengen & Klingen 2006; Duarte *et al.* 2009).

TABLE 3. Lethal concentrations of selected strains of *Metarhizium* spp. against *Rhizoglyphus robini* adult females.

Species	Strain	LC ₅₀	LC ₉₀	χ ²	P
<i>M. indigoticum</i>	MET 01	1.01×10 ⁴	2.20×10 ⁵	306.79	<0.001
<i>M. anisopliae</i>	MET 07	2.36×10 ⁵	2.81×10 ⁷	286.42	<0.001
	MET 08	4.74×10 ⁴	3.01×10 ⁶	319.56	<0.001

In the present study, new strains of “nonspecialist” mitosporic fungi *Beauveria* spp., *Isaria* sp. and *Metarhizium* spp. were tested against the bulb mite *R. robini* under laboratory conditions. The most effective strains were those belonging to the genus *Metarhizium*. This genus is one of the most widely used fungus in mycoinsecticides throughout the world, mainly as an inundative control agent (Zimmermann 2007). According to Goettel *et al.* (1990) the host range of *M. anisopliae* includes Symphyla, Orthoptera, Dermaptera, Isoptera, Homoptera, Heteroptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Siphonaptera, Lepidoptera and Acari, as well as some nontarget hosts, e.g. those belonging to Malacostrata (Amphipoda) and Ephemeroptera. A summary of the safety of *M. anisopliae* has been reviewed by Zimmermann (2007).

Metarhizium genus shows very high virulence to many mite species, as evidenced by several studies (Kaaya *et al.* 1996; Smith *et al.* 2000; Zimmermann 2007; Tomer *et al.* 2018). The results of the present study revealed that Czech strains of *M. anisopliae* MET 07 and MET 08 caused almost 100% mortality in *R. robini* females in four days of incubation. The highest virulence was found in *M. indigoticum* strain MET 01 from Israel in which the lowest median lethal concentration (LC₅₀=1.01×10⁴) was estimated compared to the above mentioned *M. anisopliae* strains. Their LC₅₀ values were still much lower (4.74×10⁴ and 2.36×10⁵) than that reported by Wekesa *et al.* (2005) for *M. anisopliae* strain in which the lowest LC₅₀ was 0.7×10⁷ conidia/ml 7 days after application on *T. evansi* under laboratory conditions. The differences in efficacy may be due to different EPF strain or host species or due to the fact that in the present study conidia in suspensions were activated for 12 hours prior to their application which is known to synchronize germination of spores (Dillon & Charnley 1985, 1990). Recent study by Ment *et al.* (2020) demonstrated high efficacy against *R.*

robini in *M. brunneum* isolate Mb7. Conidia of this fungus applied *in-vitro* at concentration 1×10^7 caused mortality of mites 43% and 100% at three and seven days post inoculation, respectively and the estimated LT_{50} value was 4.3 days. Drench application in potted onion experiments also significantly reduced bulb mite population compared to untreated control (Ment *et al.* 2020). Reference strain F52 of *M. brunneum*, the active ingredient of mycopesticide Met52[®] EC, is effective against many arthropod pests including the larvae of the black vine weevil *Otiorynchus sulcatus* (Moorhouse *et al.* 1993; Bruck & Donahue 2007; Ansari & Butt 2013), chilli thrips *Scirtothrips dorsalis* (Arthurs *et al.* 2013), Japanese beetle larvae *Popillia japonica* (Behle *et al.* 2015; Krueger *et al.* 1992), the Asian longhorned beetle *Anoplophora glabripennis* (Gardescu *et al.* 2017; Clifton *et al.* 2020) and the tick *Ixodes scapularis* (Bharadwaj & Stafford 2010; Stafford & Allan 2010). In the present study F52 strain also caused high mortality of *R. robini* (80%) but lower than other *Metarhizium* spp. strains tested.

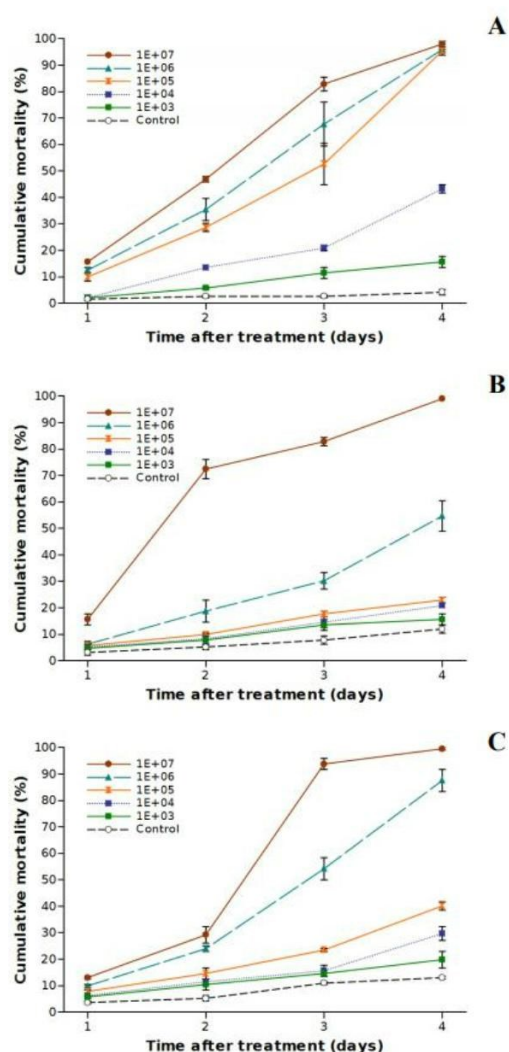


FIGURE 4. Cumulative mortality of *Rhizoglyphus robini* treated by *Metarhizium indigoticum* strain MET 01 (A) and *Metarhizium anisopliae* strains MET 07 (B) and MET 08 (C). Data presented are means (\pm SE), with two replicates of 96 mites for each strain and concentration.

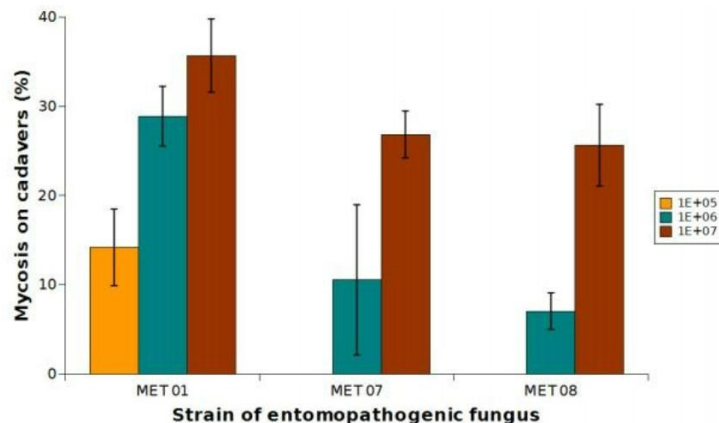


FIGURE 5. Percentage of mycosed cadavers of *Rhizoglyphus robini* adult females treated by *Metarhizium indigoticum* strain MET 01 and *Metarhizium anisopliae* strains MET 07 and MET 08. Data presented are means (\pm SE), with two replicates of 96 mites for each strain and concentration.

The strains of other EPF species, *Isaria* sp. and *Beauveria* spp. tested in the present study showed much lower efficacy against *R. robini* than strains of *Metarhizium* spp. Reference strain CCM 8367 of *I. fumosorosea* caused 40% mortality which was slightly higher compared to the two other *I. fumosorosea* strains tested. This strain was reported to be a promising biocontrol agent against several insect pests (Hussein *et al.* 2013, 2016; Prenerová *et al.* 2013) although recent findings demonstrated that some pests might be resistant to infection (Zemek *et al.* 2020). The strain also turned out to be virulent against *T. urticae* (Zemek *et al.* 2016). High virulence of *I. fumosorosea* against *T. urticae* was found earlier by Kim *et al.* (2008). This EPF species was found to be effective also against the broad mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Bank) (Acari: Tarsonemidae) (Pena *et al.* 1996), *T. cinnabarinus* (Shi & Feng 2004a,b), *Eutetranychus orientalis* (Klein) (El-Sharabasy 2015) and the European red mite, *Panonychus ulmi* (Koch) (Graeff *et al.* 2017) whereas it provided only moderate effect against *P. oleivora* compared to *B. bassiana* and *M. anisopliae* (Robles-Acosta *et al.* 2019). When *I. fumosorosea* is applied together with other biological control agents, its side effects against non-target species like predatory mites or parasitoids needs to be assessed (Zemek *et al.* 2017). For example, in a recent study by Chen *et al.* (2020), the fungal entomopathogen *I. fumosorosea* exhibited low toxicity to the predatory mite *Neoseiulus cucumeris* (Oudemans).

High efficacy of *B. bassiana* against mite pests has been documented by several authors. Khoury *et al.* (2020) compared the virulence of blastospores and aerial conidia of different strains of *B. bassiana* against different life stages of *T. urticae* under laboratory and greenhouse conditions with high mortality after exposure mainly to blastospores. Under laboratory conditions, the LT_{50} values of conidia of the Lebanese strain of *B. bassiana* (concentration 1×10^7) was estimated to be 5.6 and 7.5 days for adults and for motile juveniles, respectively. Shi *et al.* (2008) demonstrated that *B. bassiana* had a significant ovicidal effect on the two-spotted spider mite, with up to 87.5% egg mortality in laboratory bioassays while a significant negative effect on reproductive potential of *T. urticae* females was reported by Shi and Feng (2009). Chandler *et al.* (2005), in a greenhouse experiment, demonstrated up to 97% reduction in *T. urticae* abundance when the commercial biopreparate Naturalis-L based on *B. bassiana* was applied. Wekesa *et al.* (2005) studied the pathogenicity of *B. bassiana* against *T. evansi* and determined the LC_{50} of 1.1×10^7 conidia/ml. Studies with other mite species reported promising results for *B. bassiana* against *P. latus* in laboratory bioassays and greenhouse trials (Peña *et al.* 1996) and with various fungal isolates against

the false spider mite, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) under laboratory conditions (Rossi-Zalaf & Alves 2006). The strain GHA has been reported to be highly efficient in control of many insect pest species (Liu & Bauer 2008; Mukawa *et al.* 2011; Clavet *et al.* 2013; Parker *et al.* 2015) and was found to be virulent also against *T. urticae* (Ullah & Lim 2015). In the present study, however, the efficacies of all tested *Beauveria* spp. strains against *R. robini* were rather low confirming the fact that the virulence of infective propagules of *B. bassiana* may vary with respect to the arthropod host or their developmental stage (Khoury *et al.* 2020).

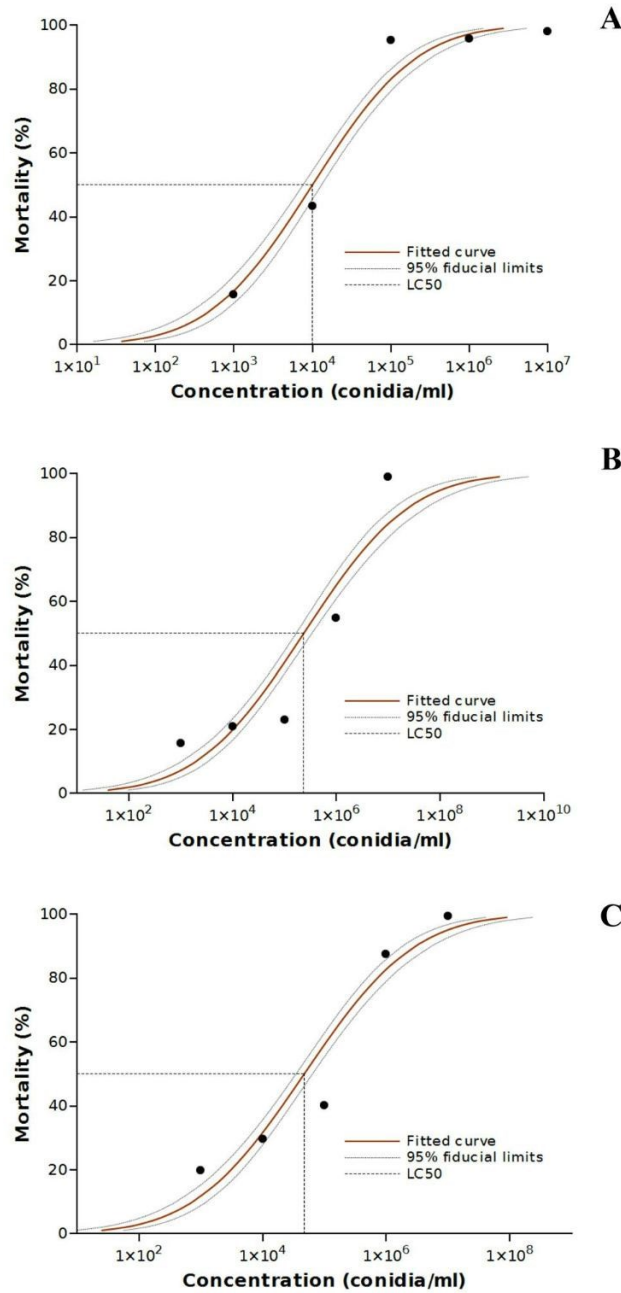


FIGURE 6. Log-probit regression lines of concentration-mortality response of *Rhizoglyphus robini* to *Metarhizium indigoticum* strain MET 01 (A) and *Metarhizium anisopliae* strains MET 07 (B) and MET 08 (C).

The above results indicate that *R. robini* is more resistant to some EPF species than to others. This might be linked to some compounds found in *R. robini* which have been shown to possess antifungal activity. Leal *et al.* (1990a) described hexyl rhizoglyphinate and showed that it inhibited mycelial growth of several species of fungi. Further studies are needed to elucidate if this inhibitory effect is species-specific, e.g. if it negatively affects *Beauveria* spp. or *Isaria* sp. more than *Metarhizium* spp. The role of other compounds, such as the monoterpenoids robinal (Leal *et al.* 1990b) and isorobinal (Sakata *et al.* 1996) in adaptation of bulb mites to live next to some acar/entomopathogenic fungi in soil environments also remains to be explored.

Conclusions

Acaropathogenic status was demonstrated in most strains of EPF isolated from soil of onion and garlic fields. The most virulent strains of *M. anisopliae* (MET 08) from the Czech Republic and *M. indigoticum* (MET 01) from Israel caused almost 100% mortality in *R. robini* females. Results of the present study thus indicate that particularly that species of EPF belonging to the genus *Metarhizium* can be promising new biocontrol agents against *R. robini*. Further research needs to be carried out to verify if application of EPF is viable as an alternative method to chemical control of bulb mites under greenhouse and field conditions.

Acknowledgements

This research was conducted with institutional support RVO:60077344 and co-financed by Grant Agency of the University of South Bohemia (project No. 018/2018/Z). It was also an integral part of a joint Czech and Israeli project titled 'New biorational methods applied to control selected pests as an alternative to chemical pesticides to prevent contamination of soil and water resource', supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project No. 8G15006) and the Ministry of Science, Technology and Space, State Israel (project No. 3-13035). We also acknowledge the Laboratory of Electron Microscopy facility at the Biology Centre CAS supported by the MEYS CR (LM2018129 Czech-BioImaging) and ERDF (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001775). The authors thank Dr. Jana Nebesářová and Ms. Martina Tesařová for their valuable advice on SEM imaging and Mrs. Olga Divišová and Mrs. Barbora Kozelková for their technical help.

References

- Abbott, W.S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economical Entomology*, 18, 265–267.
<https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- Ansari, M.A. & Butt, T.M. (2013) Influence of the application methods and doses on the susceptibility of black vine weevil larvae *Otiorynchus sulcatus* to *Metarhizium anisopliae* in field-grown strawberries. *Biological Control*, 58, 257–267.
<https://doi.org/10.1007/s10526-012-9491-x>
- Arthurs, S.P., Aristizabal, L.F. & Avery, P.B. (2013) Evaluation of entomopathogenic fungi against chilli thrips, *Scirtothrips dorsalis*. *Journal of Insect Science*, 13, 31.
<https://doi.org/10.1673/031.013.3101>
- Barbosa, M.F.C. & Moraes, G.J.D. (2020) *Rhizoglyphus* mites (Acari: Astigmata: Acaridae) from Brazil, with complementary description of *Rhizoglyphus vicantus* Manson. *Systematic & Applied Acarology*, 25, 360–

378.
<https://doi.org/10.11158/saa.25.2.12>
- Behle, R.W., Richmond, D.S., Jackson, M.A. & Dunlap, C.A. (2015) Evaluation of *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for control of Japanese beetle larvae in turfgrass. *Journal of Economic Entomology*, 108, 1587–1595.
<https://doi.org/10.1093/jee/tov176>
- Bharadwaj, A. & Stafford, K.C. (2010) Evaluation of *Metarhizium anisopliae* Strain F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 47, 862–867.
<https://doi.org/10.1093/jmedent/47.5.862>
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A. & Humber, R.A. (2009) A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101, 512–530.
<https://doi.org/10.3852/07-202>
- Burges, H.D. (1981) Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. In: Burges, H.D. (Ed.), *Microbial control of pests and plant diseases 1970–1980*. London, Academic Press, pp. 737–767.
- Bruck, D.J. & Donahue, K.M. (2007) Persistence of *Metarhizium anisopliae* incorporated into soilless potting media for control of the black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus* in container grown ornamentals. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95, 146–150.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.01.004>
- Carruthers, R.I. & Soper, R.S. (1987) Fungal diseases. In: Fuxa, J.R. & Tanada, Y. (Eds.), *Epizootiology of Insect Diseases*. New York, John Wiley and Sons, pp. 357–416.
- Chase, A., Osborne, L. & Ferguson, V. (1986) Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. *Florida Entomologist*, 69, 285–292.
<https://doi.org/10.2307/3494930>
- Chandler, D., Davidson, G., Pell, J.K., Ball, B.V.K. Shaw, V.K. & Sunderland, K.D. (2000) Fungal biocontrol of Acari. *Biocontrol Science and Technology*, 10, 357–384.
<https://doi.org/10.1080/09583150050114972>
- Chandler, D., Davidson, G. & Jacobson, R.J. (2005) Laboratory and glasshouse evaluation of entomopathogenic fungi against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), on tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Biocontrol Science and Technology*, 15, 37–54.
<https://doi.org/10.1080/09583150410001720617>
- Chen, J. (1990) An improved method for determining the susceptibility of *Rhizoglyphus robini* and *R. setosus* (Acarina: Acaridae) to pesticides. *Experimental and Applied Acarology*, 8, 175–178.
<https://doi.org/10.1007/BF01194178>
- Chen, X., Sun, L., Zhang, Y.X., Zhao, L.L. & Lin J.Z. (2020) Differing infection of *Isaria fumosorosea* (Wize) Brown & Smith in an aphid (*Myzus persicae* [Sulzer]) and predatory mite (*Neoseiulus cucumeris* [Oudemans]) under a scanning electron microscope. *Systematic & Applied Acarology*, 25, 2263–2272.
<https://doi.org/10.11158/saa.25.12.9>
- Clavet, C., Hampton, E., Requintina, M. & Alm, S.R. (2013) Laboratory assessment of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) strain GHA for control of *Listronotus maculicollis* (Coleoptera: Curculionidae) adults. *Journal of Economic Entomology*, 106, 2322–2326.
<https://doi.org/10.1603/EC12476>
- Clifton, E.H., Jaronski, S.T. & Hajek, A.E. (2020) Virulence of commercialized fungal entomopathogens against Asian longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae). *Journal of Insect Science*, 20(2), 1–6.
<https://doi.org/10.1093/jisesa/ieaa006>
- Conijn, C.G.M. (1992) Hot-water treatment and cold storage to control the bulb mite *Rhizoglyphus robini* on lili bulbs. *Acta Horti*, 325, 797–808.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.325.117>
- Diaz, A., Okabe, K., Eckenrode, C.J., Villani, M.G. & OConnor, B.M. (2000) Biology, ecology, and management of the bulb mites of the genus *Rhizoglyphus* (Acari: Acaridae). *Experimental and Applied Acarology*, 24, 85–113.
<https://doi.org/10.1023/A:1006304300657>
- Dillon, R.J. & Charnley, A.K. (1985) A technique for accelerating and synchronising germination of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology*, 142, 204–206.

- <https://doi.org/10.1007/BF00447069>
- Dillon, R.J. & Charnley, A.K. (1990) Initiation of germination in conidia of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 94, 299–304.
[https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80353-5](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80353-5)
- Doyle, J. (1991) DNA Protocols for Plants. In: Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B. & Young, J.P.W. (Eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin, Heidelberg, NATO ASI Series (Series H: Cell Biology), Springer, 57 pp.
- Duarte, V.S., Silva, R.A., Wekesa, V.W., Rizzato, F.B., Dias, C.T.S. & Delalibera, I.Jr. (2009) Impact of natural epizootics of the fungal pathogen *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) on population dynamics of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in tomato and nightshade. *Biological Control*, 51, 81–90.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.020>
- EC (2009) Directive 2009/128/EC of the European Parliament and the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides.
- El-Sharabasy, H.M. (2015) Laboratory evaluation of the effect of the entomopathogenic fungi, *Hirsutella thompsonii* and *Paecilomyces fumosoroseus*, against the citrus brown mite, *Eutetranychus orientalis* (Acari: Tetranychidae). *Plant Protection Science*, 51, 39–45.
<https://doi.org/10.17221/72/2014-PPS>
- Fan, Q.H. & Zhang, Z.Q. (2004) *Revision of Rhizoglyphus Claparède (Acari: Acaridae) of Australasia and Oceania*. London, Systematic & Applied Acarology Society, 374 pp.
- Fernandes, É.K.K. & Bittencourt, V.R.E.P. (2008) Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Experimental and Applied Acarology*, 46, 71–93.
<https://doi.org/10.1007/s10493-008-9161-y>
- Ferro, D.N. & Southwick, E.E. (1984) Microclimates of small arthropods: Estimating humidity within the leaf boundary layer. *Environmental Entomology*, 13, 926–929.
<https://doi.org/10.1093/ee/13.4.926>
- Gardescu, S., Hajek, A.E., Goble, T.A. & Jackson, M.A. (2017) *Metarhizium* microsclerotia and hydrogel versus hydromulch: Testing fungal formulations against Asian longhorned beetles. *Biocontrol and Science Technology*, 27, 918–930.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1362546>
- Gardner, W.A., Oetting, R.D. & Storey, G.K. (1982) Susceptibility of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, to the fungal pathogen *Hirsutella thompsonii* Fisher. *Florida Entomologist*, 65, 458–465.
<https://doi.org/10.2307/3494680>
- Gerson, U., Kenneth, R. & Muttath, T.I. (1979) *Hirsutella thompsonii*, a fungal pathogen of mites. II. Host-pathogen interaction. *Annals of Applied Biology*, 91, 29–40.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1979.tb07410.x>
- Gerson, U., Yathom, S. & Katan, J. (1981) A demonstration of bulb mite control by solar heating of the soil. *Phytoparasitica*, 9, 153–155.
<https://doi.org/10.1007/BF03158459>
- Gerson, U., Capua, S. & Thorens, D. (1983) Life history and life tables of *Rhizoglyphus robini* Claparède (Acari: Astigmata: Acaridae). *Acarologia*, 24, 439–448.
- Goettel, M.S., Poprawski, T.J., Vandenberg, J.D., Li, Z. & Roberts, D.W. (1990) Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird, M., Lacey, L.A. & Davidson, E.W. (Eds.), *Safety of Microbial Insecticides*. Boca Raton, C.A., CRC Press, pp. 209–232.
- Gräff, C.A., Johann, L., Volken de Souza, C.F. & Ferla, N.J. (2017) Pathogenicity of *Isaria fumosorosea* to European red mite in the laboratory. *Biotemas*, 30, 73–78.
<http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2017v30n1p73>
- Hajek, A.E. & St Leger, R.J. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*, 39, 293–322.
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453>
- Hanuny, T., Inbar, M., Tsrur, L. & Palevsky, E. (2008) Complex interactions between *Rhizoglyphus robini* and *Fusarium oxysporum*: Implications on onion pest management. *IOBC/WPRS Bulletin*, 32, 71–74.
- Humber, R.A., Moraes, G.J. & Dossantos, J.M. (1981) Natural infection of *Tetranychus evansi* [Acarina, Tetranychidae] by a *Triplosporium* sp. [Zygomycetes, Entomophthorales] in northeastern Brazil. *Entomophaga*, 26, 421–425.
<https://doi.org/10.1007/BF02374716>

- Hussein, H.M., Zemek, R., Skoková Habušťová, O., Prenerová, E. & Adel, M. (2013) Laboratory evaluation of a new strain CCM 8367 of *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46, 1307–1319.
<https://doi.org/10.1080/03235408.2013.765677>
- Hussein, H.M., Skoková Habušťová, O., Půža, V. & Zemek, R. (2016) Laboratory evaluation of *Isaria fumosorosea* CCM 8367 and *Steinernema feltiae* Ustinov against immature states of Colorado potato beetle. *PLoS ONE*, 11, e0152399.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152399>
- Kaaya, G.P., Mwangi, E.N. & Ouna, E.A. (1996) Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67, 15–20.
<https://doi.org/10.1006/jipa.1996.0003>
- Kaaya, G.P. & Hassan, S. (2000) Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 913–926.
<https://doi.org/10.1023/A:1010722914299>
- Khoury, C.A.L., Guillot, J. & Nemer, N. (2020) Susceptibility and development of resistance of the mite *Tetranychus urticae* to aerial conidia and blastospores of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Systematic & Applied Acarology*, 25, 429–443.
<https://doi.org/10.11158/saa.25.3.5>
- Kim, J.S., Roh, J.Y., Choi, J.Y., Shin, S.C., Jeon, M.J. & Je, Y.H. (2008) Insecticidal activity of *Paecilomyces fumosoroseus* SFP-198 as a multi targeting biological control agent against the greenhouse whitefly and the two spotted spider mite. *International Journal of Industrial Entomology*, 17, 181–187.
- Klubertanz, T.H., Pedigo, L.P. & Carlson, R.E. (1991) Impact of fungal epizootics on the biology and management of the twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae) in soybean. *Environmental Entomology*, 20, 731–735.
<https://doi.org/10.1093/ee/20.2.731>
- Krueger, S.R., Villani, M.G., Martins, A.S. & Roberts, D.W. (1992) Efficacy of soil applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin conidia, and standard and lyophilized mycelial particles against scarab grubs. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59, 54–60.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(92\)90111-G](https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90111-G)
- Kuwahara, M. (1988) Resistance of the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparède, to organophosphorus insecticides. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 22, 96–100.
- Latge, P., Cabrea-Cabera, R.L. & Prevost, M.C. (1988) Microcycle condition in *Hirsutella thompsonii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 625–630.
<https://doi.org/10.1139/m88-103>
- Leal, W.S., Kuwahara, Y. & Suzuki, T. (1990a) Hexyl 2-formyl-3-hydroxybenzoate, a fungitoxic cuticular constituent of the bulb mite *Rhizoglyphus robini*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54, 2593–2597.
<https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870344>
- Leal, W.S., Kuwahara, Y. & Suzuki, T. (1990b) Robinal, a highly conjugated monoterpenoid from the mite *Rhizoglyphus robini*. *Naturwissenschaften*, 77, 387–388.
<https://doi.org/10.1007/BF01135740>
- Lesna, I., Sabelis, M., Bolland, H.R. & Conijn, C.G.M. (1995) Candidate natural enemies for control of *Rhizoglyphus robini* Claparède (Acari: Astigmata) in lily bulbs: exploration in the field and pre-selection in the laboratory. *Experimental and Applied Acarology*, 19, 655–669.
<https://doi.org/10.1007/BF00145254>
- Lesna, I., Sabelis, M. & Conijn, C. (1996) Biological control of the bulb mite, *Rhizoglyphus robini*, by the predatory mite, *Hypoaspis aculeifer*, on lilies: predator-prey interactions at various spatial scales. *Journal of Applied Ecology*, 33, 369–376.
<https://doi.org/10.2307/2404758>
- Liu, H. & Bauer, L.S. (2008) Microbial control of emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) with *Beauveria bassiana* strain GHA: Greenhouse and field trials. *Biological Control*, 45, 124–132.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.12.008>
- McCoy, C.W., Sellhime, A.G., Kanavel, R.F. & Hill, A.J. (1971) Suppression of citrus rust mite populations with application of fragmented mycelia of *H. thompsonii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17, 270–276.
[https://doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90103-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90103-0)

- McCoy, C.W., Samson, R.A. & Boucias, D.G. (1988) Entomogenous fungi. In: Ignoffo, C. & Mandava, N.B. (Eds.), *CRC Handbook of Natural Pesticides, Vol. 5. Microbial Insecticides, Part A: Entomogenous Protozoa and Fungi*. Boca Raton, Florida, CRC Press, pp. 151–234.
- McCoy, C.W. (1996) Pathogens of eriophyoid mites. In: Lindquist, E.E., Sabelis, M.W. & Bruin, J. (Eds.), *Eriophyoid Mites – Their Biology, Natural Enemies and Control*. Amsterdam Elsevier Science Publishing, pp. 481–490.
- Ment, D., Raman, S., Gal, S., Ezra, D. & Palevsky, E. (2020) Interactions of *Metarhizium brunneum*-7 with phytophagous mites following different application strategies. *Insects*, 330, 1–15.
<https://doi.org/10.3390/insects11060330>
- Moorhouse, E.R., Gillespie, A.T. & Chamley, A.K. (1993) Application of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor. conidia to control *Otiiorhynchus sulcatus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae) larvae on glasshouse pot plants. *Annals of Applied Biology*, 122, 623–636.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04063.x>
- Mukawa, S., Tooyama, H. & Ikegami, T. (2011) Influence of humidity on the infection of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), by *Beauveria bassiana*. *Applied Entomology and Zoology*, 46, 255–264.
<https://doi.org/10.1007/s13355-011-0033-2>
- Nermuť, J., Zemek, R., Mráček, Z., Palevsky, E. & Půža, V. (2019) Entomopathogenic nematodes as natural enemies for control of *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae)? *Biological Control*, 128, 102–110.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.10.003>
- Nordengen, I. & Klingen, I. (2006) Comparison of methods for estimating the prevalence of *Neozygites floridana* in *Tetranychus urticae* populations infesting strawberries. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.01.005>
- O'Donnell, K. (1992) Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics*, 22, 213–220.
<https://doi.org/10.1007/BF00351728>
- O'Donnell, K. (1993) *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, R. & Taylor, J.W. (Eds.), *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. Wallingford, UK, CAB International, pp. 225–233.
- Ofek, T., Gal, S., Inbar, M., Lebiush-Mordechai, S., Tsrur, L. & Palevsky, E. (2014) The role of onion associated fungi in bulb mite infestation and damage to onion seedlings. *Experimental and Applied Acarology*, 62, 437–448.
<https://doi.org/10.1007/s10493-013-9750-2>
- Okabe, K. & Amano, H. (1991) Penetration and population growth of the robine bulb mite, *Rhizoglyphus robini* Claparede (Acari: Acaridae), on healthy and *Fusarium*-infected rakkyo bulbs. *Applied Entomology and Zoology*, 26, 129–136.
<https://doi.org/10.1303/aez.26.129>
- Parker, B.L., Skinner, M., Gouli, S., Gouli, V. & Kim, J.S. (2015) Virulence of BotaniGard® to second instar brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae). *Insects*, 6, 319–324.
<https://doi.org/10.3390/insects6020319>
- Peña, J.E., Osborne, L.S. & Duncan, R.E. (1996) Potential of fungi as biocontrol agents of *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae). *Entomophaga*, 41, 27.
<https://doi.org/10.1007/BF02893289>
- Poe, S.L., Noble, W.E. & Stall, E.E. (1979) Acquisition and retention of *Pseudomonas marginata* by *Anoetus feroniarum* and *Rhizoglyphus robini*. In: Rodriguez, J.G. (Ed.), *Recent Advances in Acarology*, 1, pp. 119–124.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-592201-2.50022-1>
- Prenerová, E., Zemek, R., Volter, L. & Weyda, F. (2013) Strain of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the method for controlling insect and mite pests. US Patent 08574566.
- Prenerová, E., Zemek, R., Weyda, F. & Volter, L. (2015) Strain of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the method for controlling insect and mite pests. EPO patent No. EP2313488.
- Robles-Acosta, I.N., Chacon-Hernandez, J.C., Torres-Acosta, R.I., Landeros-Flores, J., Vanoye-Eligio, V. &



- Arredondo-Valdes, R. (2019) Entomopathogenic fungi as biological control agents of *Phyllocoptruta oleivora* (Prostigmata: Eriophyidae) under greenhouse conditions. *Florida Entomologist*, 102, 303–308. <https://doi.org/10.1653/024.102.0203>
- Rossi-Zalaf, L.S. & Alves, S.B. (2006) Susceptibility of *Brevipalpus phoenicis* to entomopathogenic fungi. *Experimental and Applied Acarology*, 40, 37–47. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9024-3>
- Sakata, T., Kuwahara, Y. & Kurosa, K. (1996) 4-Isopropenyl-3-oxo-1-cyclohexene-1-carboxylaldehyde, isorobinal: A novel monoterpene from the mite *Rhizoglyphus* sp. (Astigmata: Rhizoglyphinae). *Naturwissenschaften*, 83, 427. <https://doi.org/10.1007/BF01142069>
- SAS Institute Inc. 2017. SAS/STAT®14.3 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SAS Institute Inc. 2018. SAS® Studio 3.8: User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Shahid, A.A., Rao, A.Q., Bakhsh, A. & Husnain T. (2012) Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 64, 21–42. <https://doi.org/10.2298/ABS1201021S>
- Shang, S.Q., Chen, Y.N. & Bai, Y.L. (2018) The pathogenicity of entomopathogenic fungus *Acremonium hansfordii* to two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* and predatory mite *Neoseiulus barkeri*. *Systematic & Applied Acarology*, 23, 2173–2183. <https://doi.org/10.11158/saa.23.11.10>
- Shi, W.B. & Feng, M.G. (2004a) Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biological Control*, 30, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.01.017>
- Shi, W.B. & Feng, M.G. (2004b) Ovicidal activity of two fungal pathogens (Hyphomycetes) against *Tetranychus cinnabarinus* (Acarina: Tetranychidae). *Chinese Science Bulletin*, 49, 263–267. <https://doi.org/10.1007/BF03182810>
- Shi, W.B., Feng, M.G. & Liu, S. (2008) Sprays of emulsifiable *Beauveria bassiana* formulation are ovicidal towards *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) at various regimes of temperature and humidity. *Experimental and Applied Acarology*, 46, 247–257. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9172-8>
- Shi, W.B. & Feng, M.G. (2009) Effect of fungal infection on reproductive potential and survival time of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*, 48, 229–237. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9238-2>
- Skalický, A., Bohatá, A., Šimková, J., Osborne, L.S. & Landa, Z. (2014) Selection of indigenous isolates of entomopathogenic soil fungus *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Folia Microbiologica*, 59, 269–276. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0293-z>
- Smith, K.E., Wall, R. & French, N.P. (2000) The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp. *Veterinary Parasitology*, 92, 97–105. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00277-6)
- Stafford, K.C. & Allan, S.A. (2010) Field applications of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for the control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 47, 1107–1115. <https://doi.org/10.1603/ME10019>
- Sztejnberg, A., Doron-Shloush, S. & Gerson, U. (1997) The biology of the acaropathogenic fungus *Hirsutella kirchneri*. *Biocontrol Science and Technology*, 7, 577–590. <https://doi.org/10.1080/09583159730631>
- Tomer, H., Blum, T., Arye, I., Faigenboim, A., Gottlieb, Y. & Ment, D. (2018) Activity of native and commercial strains of *Metarhizium* spp. against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* under different environmental conditions. *Veterinary Parasitology*, 15, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.09.010>
- Ullah, M.S. & Lim, U.T. (2015) Laboratory bioassay of *Beauveria bassiana* against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on leaf discs and potted bean plants. *Experimental and Applied Acarology*, 65, 307–318. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9871-2>
- Ullah, M.S. & Lim, U.T. (2017) Synergism of *Beauveria bassiana* and *Phytoseiulus persimilis* in control of

- Tetranychus urticae* on bean plants. *Systematic & Applied Acarology*, 22, 1924–1935.
<https://doi.org/10.11158/saa.22.11.11>
- Van der Geest, L.P.S., Elliot, S.L., Breeuwer, J.A.J. & Beerling, E.A.M. (2000) Disease of mites. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 497–560.
<https://doi.org/10.1023/A:1026518418163>
- Weiser, J. & Muma, M.H. (1966) *Entomophthora floridana* n. sp. (Phycomycetes: Entomophthoraceae), a parasite of the Texas citrus mite, *Eutetranychus banksi*. *Florida Entomologist*, 49, 155–159.
<https://doi.org/10.2307/3493437>
- Wekesa, V.W., Maniania, N.K., Knapp, M. & Boga, H.I. (2005) Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. *Experimental and Applied Acarology*, 36, 41–50.
<https://doi.org/10.1007/s10493-005-0508-3>
- Zemek, R., Prenerová, E. & Weyda, F. (2007) The first record of entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycota: Hyphomycetes) on the hibernating pupae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Entomological Research*, 37, A136.
- Zemek, R., Kopačka, M. & Šimáčková, K. (2016) Evaluation of *Isaria fumosorosea* efficacy for the control of spider mites. *IOBC-WPRS Bulletin*, 120, 93–97.
- Zemek, R., Prenerová, E., Volter, L., Awad, M.A.E.E., Weyda, F., Hussein, H.M., Skoková, O.H. & Půža, V. (2017) Non-target impacts of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) on natural enemies of arthropod pests. In: Mason, P.G., Gillespie, D.R. & Vincent, C. (Eds.), *Proceedings of the 5th International Symposium on Biological Control of Arthropods*, Langkawi, Malaysia, September 11–15, 2017, 294–297.
<https://doi.org/10.1079/9781786394118.0294>
- Zemek, R., Konopická, J. & Bohatá, A. (2018) Inoculation of sphagnum-based soil substrate with entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae). *AIP Conference Proceedings*, 1954, 030009–1–030009–5.
<https://doi.org/10.1063/1.5033389>
- Zemek, R., Konopická, J. & Ul Abdin, Z. (2020) Low efficacy of *Isaria fumosorosea* against box tree moth *Cydalima perspectalis*: Are host plant phytochemicals involved in herbivore defence against fungal pathogens? *Journal of Fungi*, 6, 342.
<https://doi.org/10.3390/jof6040342>
- Zimmermann, G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 879–920.
<https://doi.org/10.1080/09583150701593963>
- Zindel, R., Ofek, M., Minz, D., Palevsky, E., Zchori-Fein, E. & Aebi, A. (2013) The role of the bacterial community in the nutritional ecology of the bulb mite *Rhizoglyphus robini* (Acari: Astigmata: Acaridae). *The FASEB Journal*, 27, 1488–1497.
<https://doi.org/10.1096/fj.12-216242>

Submitted: 2 Jul. 2020; accepted by Zhi-Qiang Zhang: 26 Apr. 2021; published: 30 Jun. 2021

Communication

Low Efficacy of *Isaria fumosorosea* against Box Tree Moth *Cydalima perspectalis*: Are Host Plant Phytochemicals Involved in Herbivore Defence against Fungal Pathogens?

 Rostislav Zemek ^{1,2,3,*} , Jana Konopická ^{3,4}  and Zain Ul Abdin ^{1,2,5}

¹ Arthropod Ecology and Biological Control Research Group, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City 758307, Vietnam; zainulabdin@tdtu.edu.vn

² Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City 758307, Vietnam

³ Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Institute of Entomology, 370 05 České Budeřovice, Czech Republic; jkonopicka@seznam.cz

⁴ Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, 370 05 České Budeřovice, Czech Republic

⁵ Department of Entomology, University of Agriculture, Faisalabad 38000, Pakistan

* Correspondence: rostislav.zemek@tdtu.edu.vn

Received: 16 November 2020; Accepted: 3 December 2020; Published: 6 December 2020



Abstract: *Buxus* sp. is an important native and ornamental tree in Europe threatened by a serious invasive pest *Cydalima perspectalis*. The larvae of this moth are able to defoliate box trees and cause their death. The development of novel biopesticides targeting this pest might help protect *Buxus* trees grown wildly or in city parks. Laboratory experiments were conducted to assess the efficacy of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* strain CCM 8367 against *C. perspectalis*. The last-instar larvae of the box tree moth were treated by the suspension of fungus conidia at concentrations ranging from 1×10^4 to 1×10^8 spores per 1 mL. Fungus infection was observed mostly in pupae, but the maximum mortality did not exceed 60%, indicating a very low susceptibility of *C. perspectalis* to *I. fumosorosea*. Furthermore, a number of ungerminated fungal conidia were found on larval cuticles using a low-temperature scanning electron microscopy. Our data also reveal that the hydroalcoholic extract from *B. sempervirens* leaves significantly inhibits both the germination of *I. fumosorosea* conidia and fungus growth. It can be speculated that the strain CCM 8367 of *I. fumosorosea* is not a potent biocontrol agent against *C. perspectalis* and low virulence of the fungus might be due to the accumulation of host plant phytochemicals having antimicrobial activity in larval cuticle of the pest.

Keywords: *Buxus*; entomopathogenic fungi; invasive pests; virulence; alkaloids; antimicrobial activity

1. Introduction

Box trees, *Buxus* sp., are important evergreen shrubs occurring in natural *Buxus* forests [1] or grown as ornamental trees in city parks in Europe. They are now endangered by the box tree moth (BTM), *Cydalima perspectalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae), which is a serious invasive pest native to Asia that was first detected in Germany in 2007 and has since invaded a large area causing significant damage [2,3]. This pest overwinters at the larval stage [4,5] and can have two to four generations per year in Europe depending on abiotic conditions [6]. Natural enemies do not suppress the *C. perspectalis* population, which is probably because this exotic species does not seem to be a good host for native parasitoids [4,7,8]. Thus, the pest is able to destroy *Buxus* tree completely in one season [9]. Some synthetic chemical insecticides are effective in *C. perspectalis* control [10]. Still,

their application in natural habitats is problematic because of their adverse side effects on non-target species. Their frequent application possibly leads to the risk of resistance development in the pest.

The use of microbial biopesticides against BTM offers a unique alternate solution to broad-spectrum chemical insecticides. The best results have been obtained by using products based on *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) while entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Rhabditida: Steinernematidae) was less successful [11]. Entomopathogenic fungi (EPFs) represent other promising biocontrol agents. Their advantages are that they do not need to be ingested as they are able to penetrate the host cuticle and can be relatively easily produced [12]. A number of mycoinsecticides, most commonly based on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Cordycipitaceae), *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, (Hypocreales: Clavicipitaceae), *Isaria fumosorosea* (WIZE) Brown & Smith (Hypocreales: Cordycipitaceae), and *B. brongniartii* (Saccardo) (Hypocreales: Cordycipitaceae) have been developed in the world [13]. To our knowledge, only *B. bassiana* strain GY1-17 was tested against BTM in Korea, but larvae were not affected significantly [14].

The present study aimed to assess the possibility of fungal biocontrol of *C. perspectalis* by *I. fumosorosea*, which is known to be virulent to many insect species including a wide variety of butterflies and moths [15–17] and has received significant attention as a possible biological control agent for several economically important pests [18]. The obtained results showed low efficacy of the fungus against this pest. Therefore, additional experiments were conducted to test the hypothesis that the low effectiveness might be due to the antifungal activity of some host plant phytochemicals consumed by the moth larvae. Low-temperature scanning electron microscopy revealed that the number of *I. fumosorosea* conidia did not germinate. In vitro experiments confirmed that the hydroalcoholic extract of *Buxus* leaves suppressed spore germination and fungus growth.

2. Materials and Methods

2.1. Insects

Last-instar larvae of *C. perspectalis* were collected from unsprayed *Buxus sempervirens* trees located in a private garden in Staré Hodeřovice (South Bohemia, Czech Republic, 49° N) and maintained in net cages at a room temperature with 16L:8D photoperiod for a few days before they were used in bioassays. Young twigs of untreated box trees collected in the vicinity of the Biology Centre, České Budeřovice were provided as food and replaced with fresh ones when needed.

2.2. Entomopathogenic Fungus

Isaria fumosorosea strain CCM 8367 was used in this study. The strain was isolated from the pupa of the horse chestnut leaf miner, *Cameraria ohridella*, Deschka & Dimić (Lepidoptera: Gracillariidae) collected in the Czech Republic [19] and deposited in the Czech Collection of Microorganisms in Brno as a patent culture [20,21].

The fungus was grown on PDA medium (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) at 25 ± 1 °C and a 16L:8D photoperiod. After 10 days of incubation, the spore suspensions were prepared from each strain by scraping off conidia into the sterile solution of 0.05% (v/v) Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). The suspension was filtered through sterile gauze to separate the mycelium and clusters of spores. In uniform suspension, the spores were counted with a Neubauer improved counting chamber (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and subsequently, the suspension was adjusted to the required concentration.

The viability of spores was verified using a standard germination test [22]. Ten drops from suspension were applied using a 1 µL inoculation loop on the surface of 2% water agar, which was poured in a thin layer onto the surface of a sterile slide. After the drops had dried, the slides were moved into a wet chamber and incubated at temperature 25 ± 1 °C for 24 h. The percentage of germinating spores was determined using an Olympus CH20 light microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan); bright field, 400× magnification. The spore germination in all tests was 100%.

2.3. Bioassays

2.3.1. The Efficacy of *I. fumosorosea* against *C. perspectalis*

Five concentrations of *I. fumosorosea* ranging from 1×10^4 to 1×10^8 spores per 1 mL were used in this experiment. The last-instar larvae of BTM in treated groups were individually immersed in the suspension of conidiospores of the fungus for five seconds (dip-test). All specimens in a control group were immersed in sterile solution of 0.05% Tween[®] 80 only. Then, the larvae were placed into polystyrene Petri dishes (vented, inner diameter 90 mm, height 15 mm, Gosselin[™], Borre, France) lined with moist filter paper (KA 0, Papírna Perštein, Ltd., Perštein, Czech Republic) and kept under constant conditions (25 ± 1 °C and 16L:8D photoperiod). Larvae were fed with *B. sempervirens* leaves, which were replaced daily until larva developed into pupa or died. The filter paper was also daily moistened by distilled water to maintain optimal humidity inside the Petri dishes. The insects were monitored daily for a period of three weeks to record insect development, mortality, and the development of mycosis on cadavers until all individuals died or adults emerged.

All bioassays described above were repeated twice; each replication tested 15 insect individuals. Mycosis on cadavers and emerged adults were documented by digital cameras Olympus SP-510 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) and Nikon Coolpix 4500 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) mounted on a tripod and using macro mode.

2.3.2. Scanning Electron Microscopy of *I. fumosorosea* Conidia Germination on Cuticle of *C. perspectalis* Larvae

In vivo germination of fungal conidia on the insect cuticle was examined by low-temperature scanning electron microscopy (LT-SEM). BTM larvae were treated by immersing in suspension of *I. fumosorosea* conidia (concentration 5×10^7 spores mL⁻¹) and incubated for 0, 24, and 48 h at the temperature of 25 °C. The larvae were mounted on an aluminum stub using Tissue-Tek (C.C.T.D. Compound, The Netherlands). The samples were extremely fast ($<10^{-3}$ K/s) frozen in vapor of liquid nitrogen. After freezing, the samples were transferred into a GATAN ALTO-2500 high vacuum cryo-preparation chamber (Gatan Inc., Abingdon, UK). The surface of the sample was sublimated (freeze-etched) for 5 min at the temperature of -95 °C and at -130 °C. After sublimation, the samples were sputter-coated with gold at the temperature of -130 °C. Coated samples were inserted into the chamber of a JEOL JSM-7401F Field Emission Scanning Electron Microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Images were obtained by the secondary electron signal at an accelerating voltage of 4 kV and current 10 μ A using an Everhart–Thornley Detector (ETD).

2.3.3. The Effect of *B. sempervirens* Extract on *I. fumosorosea* Germination and Growth

Plant material was collected from untreated *B. sempervirens* trees grown in the Biology Centre garden. The extract used for the study was prepared at the concentration of 20% (w/v) by grinding 2 g of fresh leaves in 10 mL of solvent (water–ethanol 1:1 mixture). Analytic grade ethanol (Penta Ltd., Czech Republic) and distilled water were used. The mixture was filtered through filter paper (KA 0, Papírna Perštein, Ltd., Czech Republic) to remove particulate materials, and one milliliter of fresh extract was spread on the surface of 2% water agar in Petri dish and left to dry for 24 h. Then, a suspension of *I. fumosorosea* conidia was applied using an inoculation loop on the surface. Germination was evaluated in 100 spores after 24 h of incubation at 25 ± 1 °C as described above. The control plate was treated with solvent only. The experiment was conducted in three replicates. Spore germination was documented by NIS-Elements Imaging Software and a Nikon Eclipse E200 microscope equipped with Nikon DS-Fi3 color camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

The effect *B. sempervirens* extract on fungus growth was measured by a modified inhibition zone assay [23]. A half mL of conidia suspension in 0.05% Tween[®] 80 at a concentration 1×10^4 spores mL⁻¹ was spread evenly on potato dextrose agar (PDA) medium in a plastic Petri dish (diameter 90 mm). A hydroalcoholic extract of *B. sempervirens* leaves prepared as described above was applied on filter

paper discs (diameter 14 mm) in a dose 150 µL per disc. Control discs were treated with 150 µL of the pure solvent. The solvent was allowed to evaporate, and paper discs were placed carefully in the center of PDA plates. After 7 days incubation at 25 °C, the plates were photographed by a digital camera Olympus SP-510 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) mounted on a tripod to document differences in fungus growth. Then, the area of plate in the center not covered by *I. fumosorosea* mycelium was measured using ImageJ, a Java-based image analysis software [24]. The assay was conducted using 10 dishes (replications) for both treatment and control.

2.4. Data Analysis

To analyze the effect of treatment on developmental time of *C. perspectalis* larvae and pupae, we fitted generalized linear models (GLM) with a Poisson error distribution and log link function. Mortality as well as germination data were analyzed using GLM with a binomial distribution and logit link. Treatment and replication were set as fixed effects. The analyses were performed in SAS® Studio for Linux [25] using the GLM procedure (PROC GENMOD) of SAS/STAT® module [26]. Means were separated by the least-square means (LSMEANS) statement of SAS with Tukey–Kramer adjustment for multiple comparisons. *p*-values <0.05 were considered statistically significant. Lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) were estimated using Probit analysis (PROC PROBIT). Differences in area not covered by *I. fumosorosea* mycelium were compared by an exact Wilcoxon two-sample test (PROC NPAR1WAY) of the SAS/STAT® module.

3. Results and Discussion

Most BTM larvae successfully passed to pupa regardless of treatment (Table 1), and no statistically significant effect of treatment on the duration of the larval stage was observed ($\chi^2 = 10.08$, *df* = 5, *p* = 0.0730). Similarly, treatments had no significant effect on the duration of the pupal stage ($\chi^2 = 0.19$, *df* = 5, *p* = 0.9992), but higher mortality was observed in all treatments; the maximum mortality of 46.4% pupae was found with the highest concentration of fungal treatment.

Table 1. The effects of *Isaria fumosorosea* on the development of *Cydalima perspectalis*.

Treatment ¹	Last-Instar Larvae			Pupae			Malformed Adults
	Duration		Died/Mycosed	Duration		Died/Mycosed	
	Mean ± SE	<i>n</i>	%	Mean ± SE	<i>n</i>	%	
Control	4.24 ± 0.41	29	3.3/0	10.10 ± 0.15	21	27.6/0	0
1 × 10 ⁴	5.04 ± 0.58	28	6.7/0	10.33 ± 0.11	18	35.7/0	0
1 × 10 ⁵	5.53 ± 0.54	30	0/0	10.17 ± 0.13	24	20.0/0	0
1 × 10 ⁶	4.87 ± 0.43	30	0/0	10.46 ± 0.10	26	13.3/0	0
1 × 10 ⁷	5.00 ± 0.31	30	0/0	10.33 ± 0.11	21	30.0/10.0	0
1 × 10 ⁸	3.96 ± 0.32	28	6.7/3.3	10.27 ± 0.25	15	46.4/28.6	20.0

¹ Concentration of conidia per milliliter of suspension.

Mycosis was observed only in treatments of 1 × 10⁷ and 1 × 10⁸ conidia per 1 mL when 10% and 28.6% of pupae cadavers, respectively, were obviously infected by the fungus (Table 1). Infection by *I. fumosorosea* was later confirmed when fungus sporulated (Figure 1).

Interestingly, several adults that emerged from larvae treated by the highest conidia concentration were malformed (Table 1, Figure 2) and died in 1–2 days. A similar effect was observed when *I. fumosorosea* was applied to *Spodoptera littoralis* (Boisd.) [27].



Figure 1. (a) Early mycosis of *Isaria fumosorosea* on *Cydalima perspectalis* pupa; (b) Cadaver of *C. perspectalis* covered with sporulating fungus.



Figure 2. (a,b) Malformed adults of *Cydalima perspectalis* emerged in a group of larvae treated by *Isaria fumosorosea* at a concentration 1×10^8 conidia/mL.

The cumulative mean mortality, including mortality in malformed adults, varied among treatments and reached a maximum value of 60% when larvae were treated by a suspension of 1×10^8 conidia per 1 mL (Figure 3a). Thus, the highest mortality corrected for mortality in the control group [28] was only 42.9%. Although the effect of treatment on mortality was significant ($\chi^2 = 18.67$, $df = 5$, $p = 0.0022$) and no significant differences were found between replications ($\chi^2 = 0.45$, $df = 1$, $p = 0.5004$), the results indicate the very low susceptibility of *C. perspectalis* to *I. fumosorosea*.

The low efficacy is rather surprising, because the strain CCM 8367 of *I. fumosorosea* used in this study was previously found to be highly virulent against several pest species. For example, the mortality of pupae of *C. ohridella*, an invasive pest of *Aesculus hippocastanum* in Europe [29], treated by blastospores or conidia suspension of concentration 5×10^7 spores per 1 mL reached 100% over a few days [20]. Later, the high efficacy of this strain was confirmed against *Spodoptera littoralis* (Boisd.) in which an application of CCM 8367 blastospores at a concentration of 5×10^7 per 1 mL caused larval mortality >90% [27]. The high efficacy of CCM 8367 under laboratory conditions similar to that used in the present study was reported also against Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae [30]. This indicated that the strain could be a prospective biocontrol agent, although some side effects against non-target natural enemies were also reported [31].

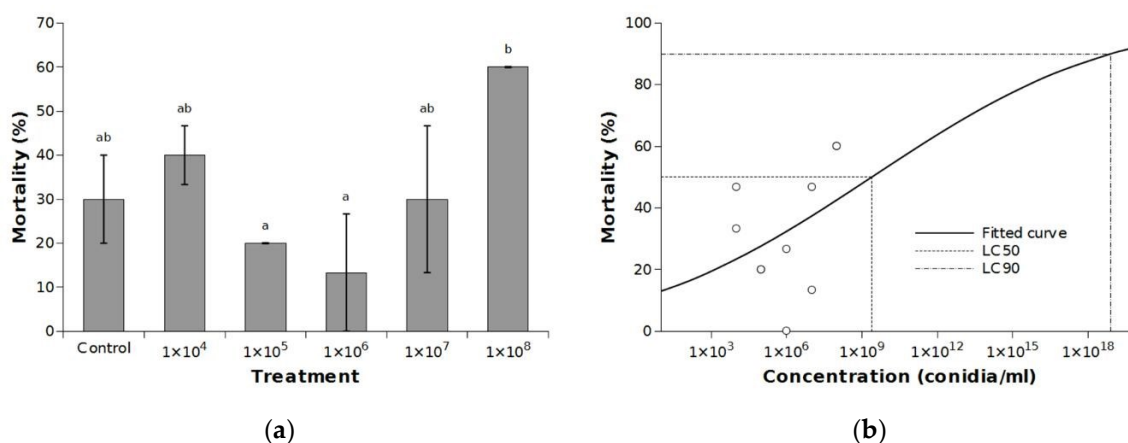


Figure 3. (a) Mean cumulative mortality (\pm SE) of *Cydalima perspectalis* (including mortality of malformed adults) treated with various concentrations of *Isaria fumosorosea* conidia. A generalized linear model was fitted and pairwise between treatment differences were tested using the least-square means. Different letters indicate significant differences between columns ($p < 0.05$); (b) Log-probit regression line of concentration-mortality response of *C. perspectalis* to *I. fumosorosea*.

The log-probit regression line describing the relationship between concentration and mortality has a form $y = -1.264 + 0.135x$ (Figure 3b), but the slope was not statistically significant ($\chi^2 = 3.27$, $df = 1$, $p = 0.071$). Thus, the extrapolated values of $LC_{50} = 2.42 \times 10^9$ and $LC_{90} = 7.88 \times 10^{18}$ were very high. For example, this contrasts with the LC_{50} and LC_{90} values of 1.03×10^6 and 8.67×10^7 , respectively, reported for *L. decemlineata* [30].

LT-SEM imaging of *I. fumosorosea* conidia on the cuticle of BTM larvae revealed a high number of spores immediately after treatment (Figure 4a,b), but after 24 and 48 h of incubation, the number of attached spores seemed to be much lower, as we found them only in some places of larvae, usually as small groups or individual conidia. This indicates low conidial attachment to the larvae cuticle. Examination further showed that the number of spores did not germinate (Figure 4d–f). This finding might explain the low virulence of the fungus against *C. perspectalis* because the successful germination of fungus conidia on the host cuticle has been considered to be necessary for infection [32,33]. Several studies documented that the cuticle of some arthropods repress the germination of EPF spores or further development of germlings and appressoria formation [34,35]. One of the reasons might be the presence of antifungal compounds on the cuticle [36,37], which might be also case of *C. perspectalis*.

Results of in vitro experiments using *B. sempervirens* hydro-alcoholic extract revealed that this extract has a negative effect on the germination of *I. fumosorosea* conidia (Figure 5). In the control treated by solvent, the mean germination was 100% (SE = 0, $n = 3$), while on extract-treated agar, the mean germination was only 92.67% (SE = 0.88, $n = 3$) in average. The difference was statistically highly significant ($\chi^2 = 31.36$, $df = 1$, $p < 0.0001$).

The inhibition zone assay showed the suppression of *I. fumosorosea* mycelium growth on filter paper discs treated by *B. sempervirens* extract. The mean area not covered by mycelium was $0.02 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ and $53.83 \pm 19.86 \text{ mm}^2$ in control and treated discs, respectively. The differences were statistically significant ($Z = -2.184$, $p = 0.028$).

Our findings indicate the presence of phytochemicals in box tree leaves having some activity against entomopathogenic fungi. Several secondary plant compounds were found to have a negative effect on the germination of *I. fumosorosea* blastospores, indicating that the presence of allelochemicals on a substrate (e.g., insect cuticle or leaf) may be an additional constraint to the survival of entomopathogenic fungi [38]. The *Buxus* trees contain a lot of alkaloids, some of which are sequestered by *C. perspectalis* larvae, while some are metabolized and/or excreted [39]. The antimicrobial activity of substances extracted from *B. sempervirens* by 65% ethanol were found earlier [40], and similar effects of box tree extracts were confirmed by other authors [41]. Thus, it is thus likely that BTM larvae use

phytochemicals obtained from the host plant for their own defense against the invasion of microbial pathogens. This might explain the low efficacy of two strains of entomopathogenic fungi, *I. fumosorosea* (present study), and *B. bassiana* [14] against BTM.

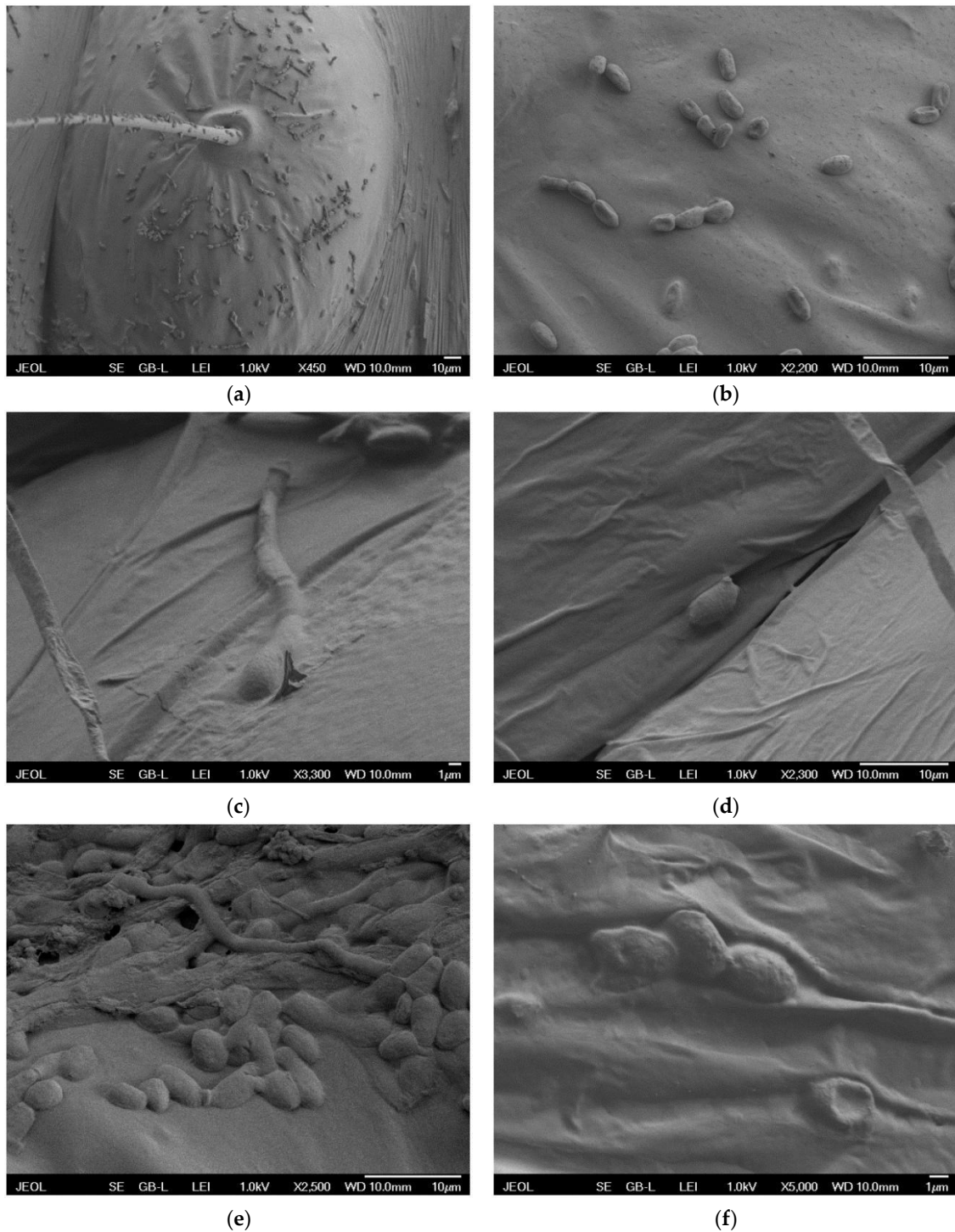


Figure 4. Low-temperature scanning electron microscope (LT-SEM) image of *Isaria fumosorosea* conidia on the cuticle of *Cydalima perspectalis* larva. (a,b) Conidia immediately after the fungus application; (c) Conidium with germ tube after 24-h incubation; (d) Ungerminated conidium after 24-h incubation; (e) Group of ungerminated conidia after 24-h incubation; (f) Ungerminated conidia after 48-h incubation.

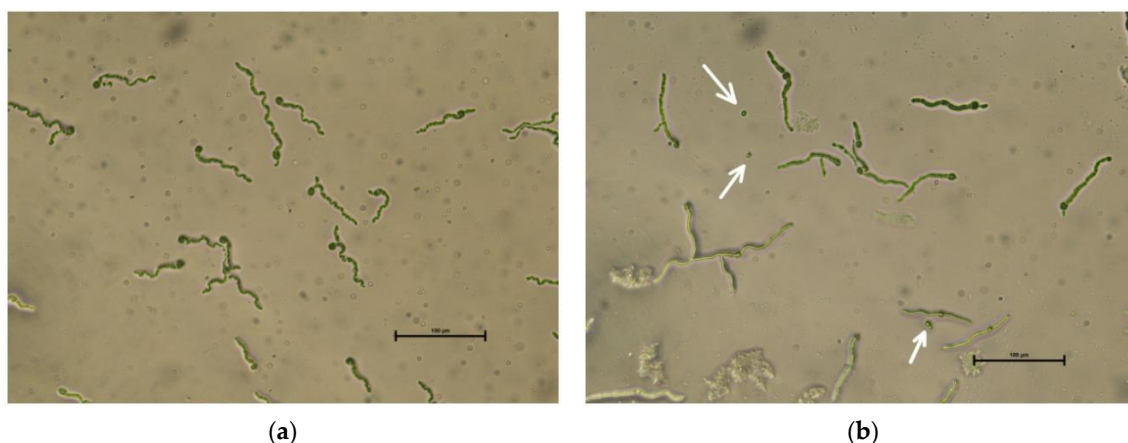


Figure 5. Germination of *Isaria fumosorosea* conidia on: (a) a control agar plate treated with solvent only; (b) agar plate treated with *Buxus sempervirens* extract. Arrows indicate spores with no or little germination peg. Traces of plant extract are visible on the agar surface.

It may be concluded that the strain CCM 8367 of *I. fumosorosea* is not a potent biocontrol agent against *C. perspectalis* and that the reason for the low efficacy of the fungus might be the accumulation of host plant phytochemicals with antimicrobial activity in the fifth-instar larvae cuticle of the pest.

Author Contributions: Conceptualization, R.Z.; methodology, R.Z. and J.K.; conducting experiments, R.Z. and J.K.; data analysis, R.Z.; writing—original draft preparation, R.Z.; writing—review and editing, R.Z., J.K. and Z.U.A.; supervision, R.Z.; project administration, Z.U.A.; funding acquisition, Z.U.A. and R.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research is funded by the Foundation for Science and Technology Development of Ton Duc Thang University (FOSTECT), website: <http://fostect.tdt.edu.vn>, under Grant FOSTECT.2018.12.

Acknowledgments: We acknowledge the core facility Laboratory of Electron Microscopy, Biology Centre CAS supported by the MEYS CR (LM2018129 Czech-BioImaging) and ERDF (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001775). The authors thank Jiří Vaneček and Martina Tesarová for their valuable help with SEM imaging.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Di Domenico, F.; Lucchese, F.; Magri, D. Buxus in Europe: Late Quaternary dynamics and modern vulnerability. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **2012**, *14*, 354–362. [[CrossRef](#)]
2. Mitchell, R.; Chitanava, S.; Dbar, R.; Kramarets, V.; Lehtijärvi, A.; Matchutadze, I.; Mamadashvili, G.; Matsiakh, I.; Nacambo, S.; Papazova-Anakieva, I.; et al. Identifying the ecological and societal consequences of a decline in Buxus forests in Europe and the Caucasus. *Biol. Invasions* **2018**, *20*, 3605–3620. [[CrossRef](#)]
3. Bras, A.; Avtzis, D.N.; Kenis, M.; Li, H.; Vétek, G.; Bernard, A.; Courtin, C.; Rousselet, J.; Roques, A.; Auger-Rozenberg, M.-A. A complex invasion story underlies the fast spread of the invasive box tree moth (*Cydalima perspectalis*) across Europe. *J. Pest Sci.* **2019**, *92*, 1187–1202. [[CrossRef](#)]
4. Wan, H.; Haye, T.; Kenis, M.; Nacambo, S.; Xu, H.; Zhang, F.; Li, H. Biology and natural enemies of *Cydalima perspectalis* in Asia: Is there biological control potential in Europe? *J. Appl. Entomol.* **2014**, *138*, 715–722. [[CrossRef](#)]
5. Nacambo, S.; Leuthardt, F.L.G.; Wan, H.; Li, H.; Haye, T.; Baur, B.; Weiss, R.M.; Kenis, M. Development characteristics of the box-tree moth *Cydalima perspectalis* and its potential distribution in Europe. *J. Appl. Entomol.* **2014**, *138*, 14–26. [[CrossRef](#)]
6. Suppo, C.; Bras, A.; Robinet, C. A temperature- and photoperiod-driven model reveals complex temporal population dynamics of the invasive box tree moth in Europe. *Ecol. Model.* **2020**, *432*, 109229. [[CrossRef](#)]

7. Göttig, S.; Herz, A. Are egg parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) promising biological control agents for regulating the invasive Box tree pyralid, *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae)? *Biocontrol Sci. Technol.* **2016**, *26*, 1471–1488. [\[CrossRef\]](#)
8. Martini, A.; Di Vitantonio, C.; Dindo, M.L. Acceptance and suitability of the box tree moth *Cydalima perspectalis* as host for the tachinid parasitoid *Exorista larvarum*. *Bull. Insectol.* **2019**, *72*, 150–160.
9. Alkan Akncı, H.; Kurdog˘lu, O. Damage level of *Cydalima perspectalis* (Lepidoptera: Crambidae) on naturally growing and ornamental box populations in Artvin, Turkey. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Derg.* **2019**. [\[CrossRef\]](#)
10. Fora, C.G.; Sasu, L.; Poșta, D.; Berac, C. Chemical possibilities of *Cydalima perspectalis* Walk. (Lepidoptera: Crambidae) control. *J. Hortic. For. Biotechnol.* **2016**, *20*, 31–34.
11. Göttig, S.; Herz, A. Susceptibility of the Box tree pyralid *Cydalima perspectalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) to potential biological control agents Neem (NeemAzal®-T/S) and entomopathogenic nematodes (Nemastar®) assessed in laboratory bioassays and field trials. *J. Plant Dis. Prot.* **2018**, *125*, 365–375. [\[CrossRef\]](#)
12. Shahid, A.; Rao, Q.; Bakhsh, A.; Husnain, T. Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Arch. Biol. Sci.* **2012**, *64*, 21–42. [\[CrossRef\]](#)
13. de Faria, M.R.; Wraight, S.P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* **2007**, *43*, 237–256. [\[CrossRef\]](#)
14. SangMyeong, L.; DongWoon, L.; HoYul, C.; JiWoong, P. Pathogenicities of *Beauveria bassiana* GY1-17 against some agro-forest insect pests. *Korean J. Appl. Entomol.* **1997**, *36*, 351–356.
15. Smith, P. Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News Inf.* **1993**, *14*, 71N–78N.
16. Dunlap, C.A.; Jackson, M.A.; Wright, M.S. A foam formulation of *Paecilomyces fumosoroseus*, an entomopathogenic biocontrol agent. *Biocontrol Sci. Technol.* **2007**, *17*, 513–523. [\[CrossRef\]](#)
17. Hoy, M.A.; Singh, R.; Rogers, M.E. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Fla. Entomol.* **2010**, *93*, 24–32. [\[CrossRef\]](#)
18. Kim, J.S.; Je, Y.H.; Roh, J.Y. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *37*, 419–423. [\[CrossRef\]](#)
19. Zemek, R.; Prenerova, E.; Weyda, F. The first record of entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycota: Hyphomycetes) on the hibernating pupae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Entomol. Res.* **2007**, *37*, A135–A136.
20. Prenerova, E.; Zemek, R.; Volter, L.; Weyda, F. Strain of Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the Method for Controlling Insect and Mite Pests. U.S. Patent No. US 08574566, 5 November 2013.
21. Prenerova, E.; Zemek, R.; Volter, L.; Weyda, F. Strain of Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the Method for Controlling Insect and Mite Pests. EPO Patent No. EP2313488, 29 April 2015.
22. Skalický, A.; Bohatá, A.; Šimková, J.; Osborne, L.S.; Landa, Z. Selection of indigenous isolates of entomopathogenic soil fungus *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Folia Microbiol.* **2014**, *59*, 269–276. [\[CrossRef\]](#)
23. Ruther, J.; Podsiadlowski, L.; Hilker, M. Quinones in cockchafer: Additional function of a sex attractant as an antimicrobial agent. *Chemoecology* **2001**, *11*, 225–229. [\[CrossRef\]](#)
24. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675. [\[CrossRef\]](#)
25. SAS Institute. *SAS Stat Studio 3.8: User's Guide*; SAS Institute: Cary, NC, USA, 2018.
26. SAS Institute. *SAS/STAT 14.3: User's Guide*; SAS Institute: Cary, NC, USA, 2017.
27. Hussein, H.M.; Zemek, R.; Habuštová, S.O.; Prenerová, E.; Adel, M.M. Laboratory evaluation of a new strain CCM 8367 of *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) on *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **2013**, *46*, 1307–1319. [\[CrossRef\]](#)
28. Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **1925**, *18*, 265–267. [\[CrossRef\]](#)
29. Šefrová, H.; Laštůvka, Z. Dispersal of the horse-chestnut leafminer, *Cameraria ohridella* Deschka & Dimic, 1986, in Europe: Its course, ways and causes (Lepidoptera: Gracillariidae). *Entomol. Zeitschrift* **2001**, *111*, 194–198.

30. Hussein, H.M.; Skoková Habušťová, O.; Pužza, V.; Zemek, R. Laboratory evaluation of *Isaria fumosorosea* CCM 8367 and *Steinernema feltiae* Ustinov against immature stages of the Colorado potato beetle. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Zemek, R.; Prenerová, E.; Volter, L.; Awad, M.; Weyda, F.; Hussein, H.M.; Skoková Habušťová, O.; Pužza, V. Non-target impacts of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) on natural enemies of arthropod pests. In Proceedings of the 5th International Symposium on Biological Control of Arthropods, Langkawi, Malaysia, 11–15 September 2017; Mason, P.G., Gillespie, D.R., Vincent, C., Eds.; CABI: Wallingford, UK, 2017; pp. 294–298, ISBN 978-1-78639-411-8.
32. Pekrul, S.; Grula, E.A. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *J. Invertebr. Pathol.* **1979**, *34*, 238–247. [[CrossRef](#)]
33. Hassan, A.E.M.; Dillon, R.J.; Charnley, A.K. Influence of accelerated germination of conidia on the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* **1989**, *54*, 277–279. [[CrossRef](#)]
34. Wang, C.; St. Leger, R.J. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryot. Cell* **2005**, *4*, 937–947. [[CrossRef](#)]
35. Ment, D.; Churchill, A.C.L.; Gindin, G.; Belausov, E.; Glazer, I.; Rehner, S.A.; Rot, A.; Donzelli, B.G.G.; Samish, M. Resistant ticks inhibit *Metarhizium* infection prior to haemocoel invasion by reducing fungal viability on the cuticle surface: *Metarhizium*-tick interactions and host resistance. *Environ. Microbiol.* **2012**, *14*, 1570–1583. [[CrossRef](#)]
36. Sawada, M.; Sano, T.; Hanakawa, K.; Sirasoonthorn, P.; Oi, T.; Miura, K. Benzoquinone synthesis-related genes of *Tribolium castaneum* confer the robust antifungal host defense to the adult beetles through the inhibition of conidial germination on the body surface. *J. Invertebr. Pathol.* **2020**, *169*, 107298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Grizanova, E.V.; Coates, C.J.; Dubovskiy, I.M.; Butt, T.M. *Metarhizium brunneum* infection dynamics differ at the cuticle interface of susceptible and tolerant morphs of *Galleria mellonella*. *Virulence* **2019**, *10*, 999–1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Vega, F.E.; Dowd, P.F.; McGuire, M.R.; Jackson, M.A.; Nelsen, T.C. In-vitro effects of secondary plant compounds on germination of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J. Invertebr. Pathol.* **1997**, *70*, 209–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Leuthardt, F.L.G.; Glauser, G.; Baur, B. Composition of alkaloids in different box tree varieties and their uptake by the box tree moth *Cydalima perspectalis*. *Chemoecology* **2013**, *23*, 203–212. [[CrossRef](#)]
40. Kiran, B.; Olgun, C.; Verep, D.; Gur, M.; Guney, K.; Altuner, E.M.; Ates, S. Determination of flavonoids and antimicrobial Behavior of non-wood forest product extracts. *Fresenius Environ. Bull.* **2018**, *27*, 2499–2504.
41. Zazharskyi, V.V.; Davydenko, P.O.; Kulishenko, O.M.; Borovik, I.V.; Brygadyrenko, V.V. Antimicrobial activity of 50 plant extracts. *Biosyst. Divers.* **2019**, *27*, 163–169. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Virulence of *Beauveria bassiana* Strains Isolated from Cadavers of Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*

Rostislav Zemek^{1,*} , Jana Konopická¹ , Eva Jozová²  and Oxana Skoková Habušťová¹ 

¹ Biology Centre CAS, Institute of Entomology, 370 05 České Budeřovice, Czech Republic; jkonopicka@seznam.cz (J.K.); habustova@entu.cas.cz (O.S.H.)

² Department of Genetics and Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, 370 05 České Budeřovice, Czech Republic; evondras@gmail.com

* Correspondence: rosta@entu.cas.cz

Simple Summary: The Colorado potato beetle is a serious insect pest, attacking mainly potato. This pest causes severe yield loss all over the world and it is difficult to control by chemical pesticides because it quickly develops resistance to them. In our study we investigated the potential of the fungus *Beauveria bassiana*, a natural pathogen of insects, to kill adults of the Colorado potato beetle. The novelty of this study is that strains of the fungus were isolated from naturally infected adults of the pest which were collected in potato fields in the Czech Republic. A suspension of *B. bassiana* spores was applied to test beetles and their survival was observed under constant conditions. Obtained results revealed that some strains of the fungus were able to kill almost all treated beetles in 21 days and can be therefore recommended for the development of a new biopesticide. The results of this study can thus be applied in effective biological control of the most serious pest of potato.

Abstract: The Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), is a serious, widely distributed pest of potato and other crops. This pest is able to defoliate the host plant and cause severe yield loss. Moreover, the pest quickly becomes resistant to many chemical pesticides. Therefore, the development of novel biopesticides targeting this pest is urgently needed. The purpose of this study was to obtain new strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and assess their efficacy against *L. decemlineata* adults under laboratory conditions. Twelve strains were isolated from cadavers of Colorado potato beetles collected in potato fields in the Czech Republic. Test beetles were treated by suspensions of conidia at the concentration of 1×10^7 spores per milliliter and their survival was recorded daily for three weeks. The results of the bioassays revealed that all new native strains were pathogenic to *L. decemlineata* adults and caused mortality up to 100% at the end of the trial period with an LT_{50} of about 7 days. These strains were more virulent than a reference strain GHA and some of them can be recommended for the development of a new mycoinsecticide against *L. decemlineata*. Our findings also highlight the importance of searching for perspective strains of entomopathogenic fungi among naturally infected hosts.

Keywords: potato; insect pest; entomopathogenic fungi; biological control; efficacy; mycoinsecticides



Citation: Zemek, R.; Konopická, J.; Jozová, E.; Skoková Habušťová, O. Virulence of *Beauveria bassiana* Strains Isolated from Cadavers of Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insects* **2021**, *12*, 1077. <https://doi.org/10.3390/insects12121077>

Academic Editor: Jørgen Eilenberg

Received: 19 October 2021

Accepted: 29 November 2021

Published: 30 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The Colorado potato beetle (CPB), *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), is a serious pest of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) in the USA and Europe as well as in Asia [1–3]. The biology and history of its spread have been reviewed in detail elsewhere [4,5]. Adults and larvae feed on leaves and can develop two complete generations in warm regions. Without control measures, the beetle can cause severe reductions in tuber yield or quality (tuber size) [5]. Chemical pesticides which have been used frequently for the last few decades to manage this pest are, however, often hazardous for human health as well as the ecosystem. In addition, CPB has evolved resistance to many registered

pesticides [6–11] and CPB thus becomes one of the most difficult insect pests to control. Resistance of CPB to chemical pesticides, concern about their harmful effects on the environment, and increasing public demand for reduction of pesticide residues in food call for alternative, safer, yet effective control agents [12–14].

In addition to arthropod natural enemies of CPB, such as carabid beetles [15], lacewings larvae [16] and lady beetles [17], and besides entomopathogenic nematodes [18,19] or *Bacillus thuringiensis* [20], biological control using mycoinsecticides can be a good, environmentally friendly alternative to broad-spectrum chemical insecticides [21]. Many biopesticides based on entomopathogenic fungi (EPF) such as *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Isaria fumosorosea* Wize (Hypocreales: Cordycipitaceae), or *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) have been developed worldwide since the 1960s [22]. Their advantages are that they can be relatively easily produced, are able to penetrate the host cuticle so they do not need to be ingested [23], and there is no risk of resistance development in target pests and none or few side effects on non-target organisms. Moreover, synergistic combinations of microbial control agents with other technologies are expected to occur in the future [24].

The efficacy of several EPF species against CPB has been investigated in many studies. For example, in various experiments, including field trials with *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fr. alone and in combination with other fungi, high efficacy of fungus treatment was reported in Poland [25,26], the Czech Republic [27], and in Austria [28]. Another species of entomopathogenic fungus successfully tested against CPB was *I. fumosorosea*. Strain CCM 8367 of this species isolated from *Cameraria ohridella*, Deschka and Dimic' (Lepidoptera: Gracillariidae) [29–31] caused high mortality against CPB larvae under laboratory conditions [19]. Field trials of another study revealed that potato plots treated with *I. fumosorosea* or *B. bassiana* had significantly higher tuber yield compared to an untreated control but still lower than the yield obtained from the plots protected with chemical pesticides [32]. Similar results were obtained in small field plot experiments in the USA [33]. A study on the effect of *B. bassiana* on foliage consumption by CPB larvae revealed that the treatment reduced leaf consumption by up to 76.2%, and increasing the fungus dose reduced the larval feeding period [34]. Wraight and Ramos reported significant reductions of CPB populations after *B. bassiana* foliar treatments [35,36]. The highest sensitivity of CPB to *B. bassiana* (strain NDBJJ-BFG) was reported in the youngest larval instars using when LC_{50} was only 10^5 – 10^6 while in adults LC_{50} values were 10^7 – 10^8 [37]. A recent laboratory study of 14 Turkish isolates of *B. bassiana* showed high variability in mortality among the strains and developmental stages of CPB. Some isolates caused the highest mortality between 96.7 and 100% in the 1st and 2nd instar larvae [38] when they were sprayed with a suspension of 1×10^7 conidia per mL.

The present study was aimed to assess the virulence of new strains of *B. bassiana* isolated against CPB adults. The novelty of the study is that strains were isolated from naturally infected *L. decemlineata* collected in the Czech Republic. The obtained results are intended to contribute to the development of safe and efficient biocontrol of the most serious pest of potato.

2. Materials and Methods

2.1. *Beauveria Bassiana* Strains

Twelve strains were isolated from naturally *B. bassiana*-infected adults of *L. decemlineata* found among hundreds of beetles collected in several commercial and experimental potato fields in South and West Bohemia, the Czech Republic, during the spring season in 2019. The beetles from different populations were kept isolated under greenhouse conditions for 1–2 weeks on potted potato plants (cv. Magda) grown from in vitro cultures in sterilized soil substrate. Dead individuals were placed on sterile wet filter paper in Petri dishes to stimulate the growth of fungi. EPF strains were isolated from CPB cadavers showing mycosis symptoms typical for *B. bassiana* infection. The strains were purified using a selective medium based on Potato Dextrose Agar (PDA) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany)

with a fungicide dodine (0.05 g/L) and antibiotics cycloheximide (0.25 g/L) and chloramphenicol (0.5 g/L) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) [39].

Species identification of the strains was verified on the basis of macroscopic, microscopic, and genetic characteristics. DNA for genetic analysis was extracted from fresh mycelium grown at 25 ± 1 °C for 7 days on Petri dishes with PDA medium. Each mycelium was collected in a sterile 1.5 mL microtube. The extraction method used was based on CTAB-PVP [40] with modification for fungi. Genomic DNA was amplified by PCR with universal primers NL1 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' (forward) and NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' (reverse) [41,42]. PCR reactions were carried out in a volume of 25 µL contained in 1× reaction buffer (75 mM Tris-HCl, pH = 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween® 20, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), 1.25 U Taq Purple DNA polymerase (PPP Master Mix, Top-Bio Ltd., Vestec, Czech Republic), 10 pmol of both forward and reverse primer, and 50 ng template DNA. Microtubes were placed in a thermal cycler TProfessional Basic Gradient (Biometra GmbH, Göttingen, Germany) with the following program: 1 cycle of 94 °C for 5 min, 25 cycles of 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and 15 s, and final elongation at 72 °C for 5 min. The part of amplified PCR products was visualized on 2% agarose gel. The PCR products were sequenced by SEQme Ltd. (Dobruška, Czech Republic). The sequences obtained were edited, compiled, and aligned using Geneious (Auckland, New Zealand) software. Sequence similarity searches were performed using NCBI GenBank BLASTn.

Cultures are deposited at the Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Institute of Entomology, České Budějovice. GenBank accession numbers for all 12 strains are listed in Table 1. In addition, *B. bassiana* strain GHA was re-isolated from commercial mycopesticide BotaniGard® WP (Certis USA, L.L.C., Butte, MT, USA) and used as a reference strain in efficacy bioassays.

Table 1. Strains of *Beauveria bassiana* isolated within this study and used in bioassays.

Strain	Sampling Site	GPS Coordinates	Genbank Accession Number
Bb1	České Budějovice	48.97417° N, 14.44867° E	MN560148.1
Bb2	České Budějovice	48.97601° N, 14.44720° E	MN749309
Bb3	České Budějovice	48.97417° N, 14.44867° E	MN749310
Bb4	Malonty ¹	48.69105° N, 14.58950° E	MN749311
Bb5	Malonty ¹	48.69105° N, 14.58950° E	MN749312
Bb6	Malonty ¹	48.69105° N, 14.58950° E	MN749313
Bb7	Beřčice	49.50702° N, 13.89545° E	MN749314
Bb8	Beřčice	49.50702° N, 13.89545° E	MN749315
Bb9	Oblajovice	49.44965° N, 14.88024° E	MN749316
Bb10	Bojanovice	49.29724° N, 13.62259° E	MN749317
Bb11	Bojanovice	49.29724° N, 13.62259° E	MN749318
Bb12	Bojanovice	49.29724° N, 13.62259° E	MN749319

¹ Organic farm.

2.2. Preparation of Fungal Suspension

Beauveria bassiana strains were grown on Petri dishes (ø 90 mm) containing PDA (Sigma-Aldrich, Munich, Germany, 39 g/L). The plates were incubated at 25 °C in the dark for 10–14 days. The aerial conidia were harvested by scraping them into a sterile solution of 0.05% (v/v) Tween 80® (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). The conidial suspension was filtered through sterile gauze to separate the mycelium and clusters of conidia. In the uniform suspension, the spores were counted with a Neubauer improved counting chamber (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and, subsequently, the suspension was adjusted to a concentration of 1×10^7 conidia per mL. The suspension was left for approximately 12 h at temperature 23 ± 1 °C to accelerate and synchronize germination of conidia [43,44] before its application. The viability of spores was verified using a standard germination test [45]. Ten drops from suspension were applied using a 1 µL inoculation loop on the surface of 2% water agar, which was poured in a thin layer onto the surface of a sterile slide. After the

drops had dried, the slides were moved into a wet chamber and incubated at 25 ± 1 °C for 24 h. The percentage of germinating spores was determined using an Olympus CH20 light microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan); bright field, 400× magnification. The spore germination of all strains was >98%.

2.3. Bioassays

The efficacy of individual *B. bassiana* strains was tested on CPB adults collected in an organic potato field in Malonty, South Bohemia, Czech Republic. The beetles were individually immersed in the suspension of conidiospores of the fungus (1×10^7 spores per mL) for 30 s (dip-test). All specimens in a control group were immersed in a sterile solution of 0.05% Tween® 80 only. The beetles were then placed into polystyrene Petri dishes (vented, inner diameter 90 mm, height 15 mm, Gosselin™, Borre, France) lined with moist filter paper KA 0 (Papírna Perštein Ltd., Pernštejn, Czech Republic) and kept under constant conditions (25 ± 1 °C and 16L:8D photoperiod). Fresh leaves from potted potato plants (cv. Magda) grown under greenhouse conditions were added daily to provide food for beetles. The filter paper was also daily moistened with distilled water to maintain optimal humidity inside the Petri dishes and replaced with a new one once a week. The insects were monitored daily for 21 days to record insect mortality and development of mycosis on cadavers. Only mycosis verified by microscopic examination of sporulating fungus as *B. bassiana* was considered. The bioassays were repeated twice; each replication tested 30 insect individuals.

2.4. Statistical Analysis

Cumulative mortality data were subjected to survival analysis. The Kaplan–Meier product limit estimate calculated in the LIFETEST procedure of SAS/STAT® (SAS Institute, Cary, NC, USA) module [46] was used to determine both the mean and the median time to death (LT_{50} , the number of days until 50% of insects were dead) for each strain. Log-rank test statistics (PROC LIFETEST) was used to test the global hypothesis that mortality (time to death) differed between strains and Šidák adjustment was used for multiple comparisons. CPB mortality and mycosis of cadavers at the end of the experiment were expressed as mean percentage \pm standard error of the mean. A generalized linear model with a binomial distribution and logit link was used to analyse data. Treatment and replication were set as fixed effects. The analysis was performed using the GLM procedure (PROC GENMOD) of SAS/STAT® module [46]. Means were separated by the least-square means (LSMEANS) statement of SAS with Tukey–Kramer adjustment for multiple comparisons. The analyses were performed in SAS® Studio for Linux (SAS Institute, Cary, NC, USA) [47]. p values <0.05 were considered statistically significant.

3. Results

The results of bioassays showed that *B. bassiana*-treated CPB beetles survived much less compared to beetles in control (Figure 1).

Survival analysis revealed a statistically highly significant effect of strain (log-rank test, $\chi^2 = 47.449$, $p < 0.0001$) and pairwise comparisons found differences between GHA strain and other strains (Table 2).

As shown in Figure 1, the survival curve of GHA-treated beetles shows an almost linear decline while in other strains most beetles died during a period between 5 and 10 days after treatment, and survival curves had thus a sigmoid shape. The shortest median survival time ($LT_{50} = 6.5$ days) was estimated in the Bb2 strain, the longest ($LT_{50} = 12.0$ days) in the GHA strain (Table 2).

Cumulative mortality of *L. decemlineata* adults on the 21st day after treatment reached 26.7% in the control, while many *B. bassiana* strains were able to kill almost all treated insects (Figure 2a).

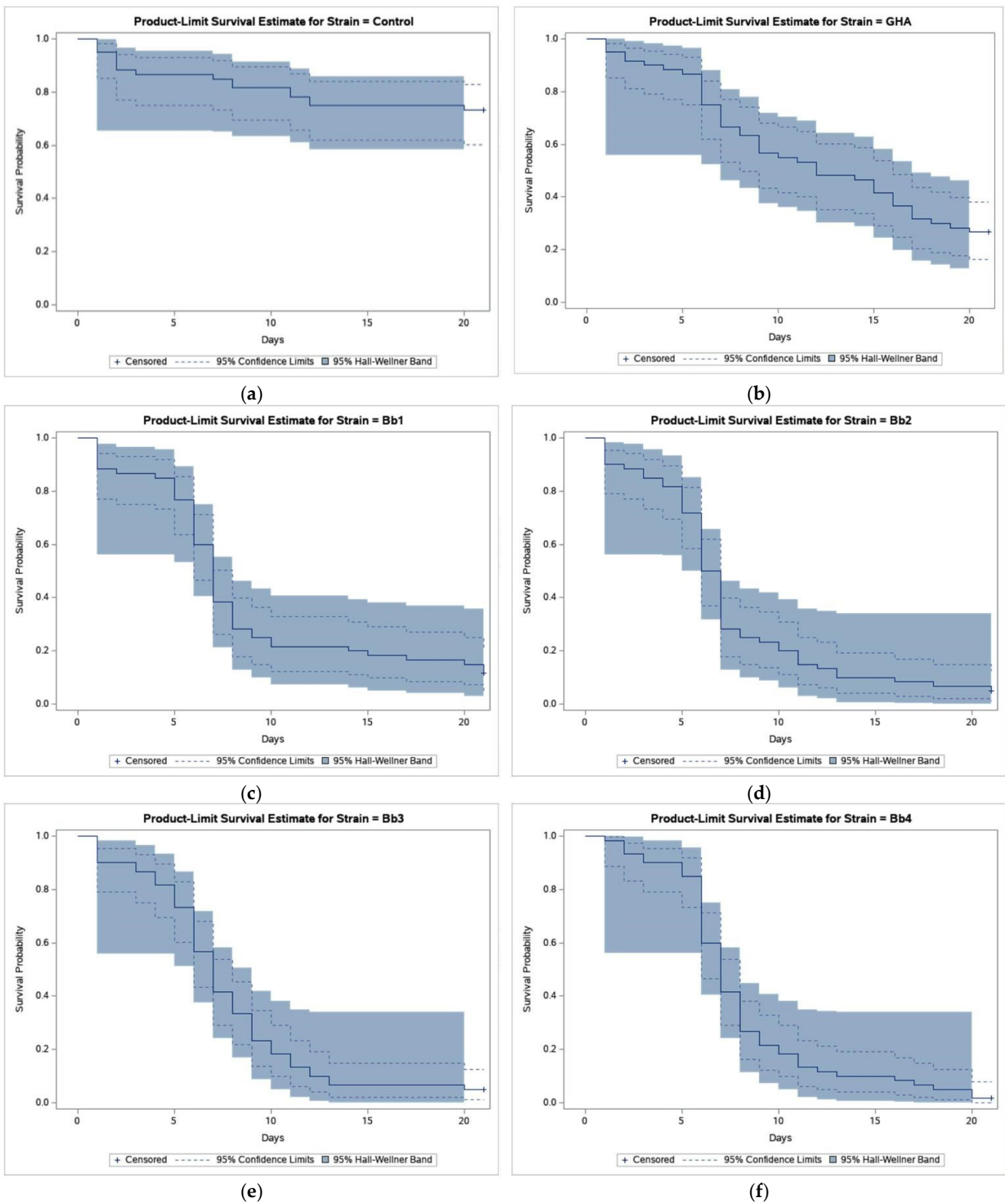


Figure 1. Cont.

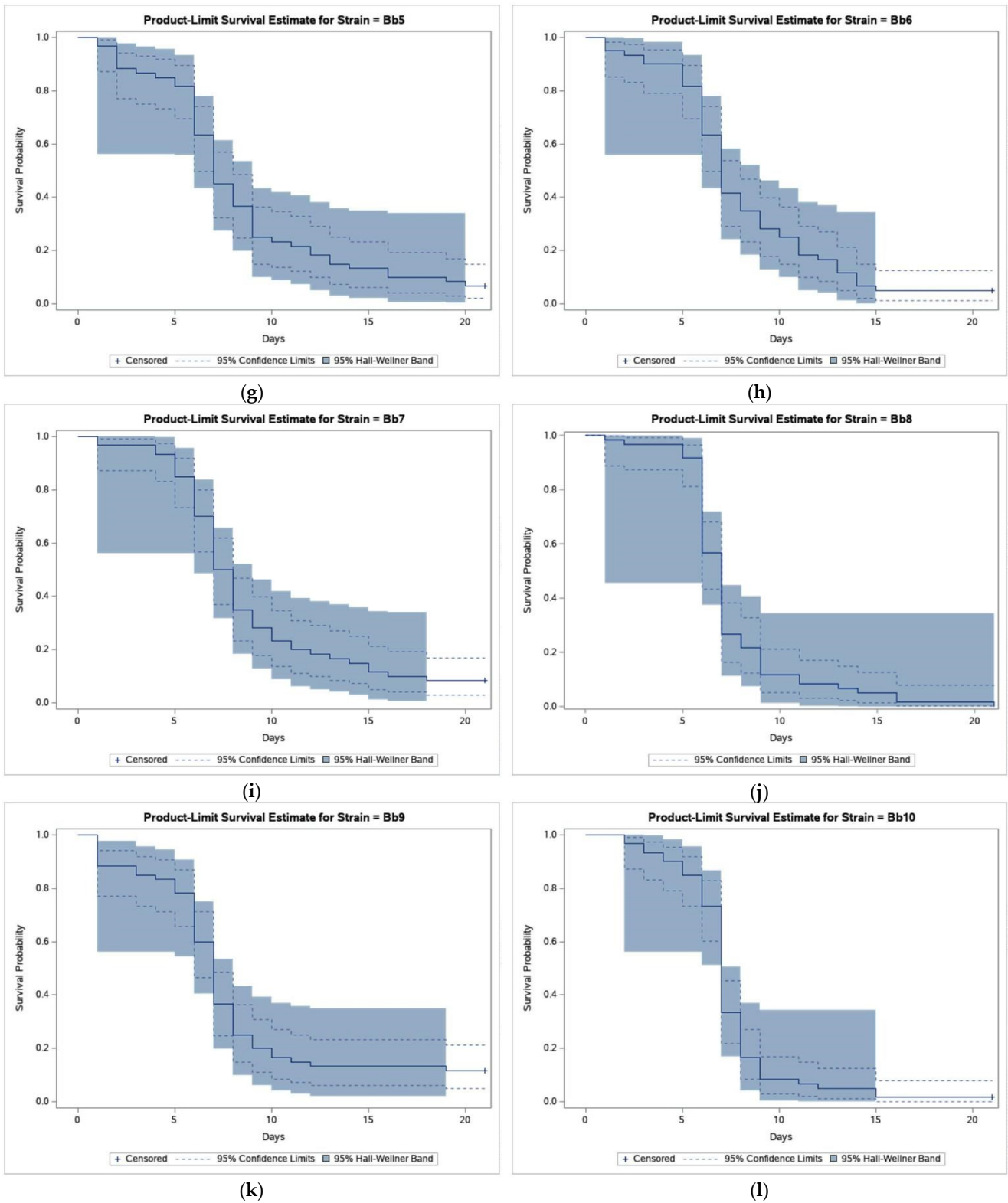


Figure 1. Cont.

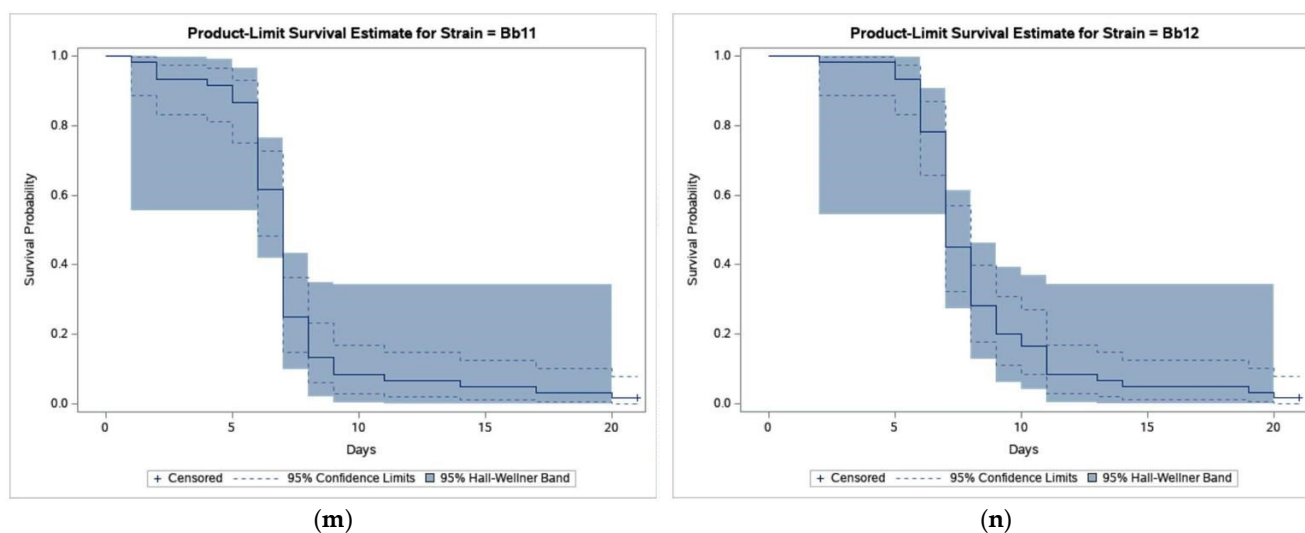


Figure 1. Product-limit survival estimates for *Leptinotarsa decemlineata* adults treated by *Beauveria bassiana* or distilled water with 95% confidence limits (dashed lines) and 95% Hall-Wellner bands. (a) Control; (b) Strain GHA; (c) Strain Bb1; (d) Strain Bb2; (e) Strain Bb3; (f) Strain Bb4; (g) Strain Bb5; (h) Strain Bb6; (i) Strain Bb7; (j) Strain Bb8; (k) Strain Bb9; (l) Strain Bb10; (m) Strain Bb11; and (n) Strain Bb12.

Table 2. Corrected mortality, mean survival time (\pm SE), and median lethal time (LT₅₀) of *Leptinotarsa decemlineata* adults treated by suspensions of native strains of *Beauveria bassiana*.

Strain	Mortality ¹ (%)	Survival Time ² (Days)	LT ₅₀ (95% CI) (Days)	Log-Rank Test ³
Bb1	84.09	8.83 \pm 0.81	7.0 (6.0–8.0)	A
Bb2	93.18	7.58 \pm 0.64	6.5 (6.0–7.0)	A
Bb3	93.18	7.65 \pm 0.58	7.0 (6.0–8.0)	A
Bb4	97.73	8.05 \pm 0.55	7.0 (6.0–8.0)	A
Bb5	90.91	8.52 \pm 0.65	7.0 (6.0–8.0)	A
Bb6	93.18	7.97 \pm 0.47	7.0 (6.0–8.0)	A
Bb7	88.64	8.77 \pm 0.55	7.5 (7.0–8.0)	A
Bb8	100.00	7.50 \pm 0.41	7.0 (6.0–7.0)	A
Bb9	84.09	7.90 \pm 0.65	7.0 (6.0–7.0)	A
Bb10	97.73	7.27 \pm 0.33	7.0 (NA-NA)	A
Bb11	97.73	7.25 \pm 0.43	7.0 (6.0–7.0)	A
Bb12	97.73	8.28 \pm 0.43	7.0 (7.0–8.0)	A
GHA	63.64	12.33 \pm 0.85	12.0 (8.0–16.0)	B

¹ Percent of dead individuals at the end of experiment corrected for mortality in control using Abbott equation [48]. ² The mean survival time and its standard error were underestimated because the largest observation was censored and the estimation was restricted to the largest event time. ³ Different letters indicate a statistically significant difference between lines (*p* values adjusted for multiple comparisons by Šidák).

Mean cumulative mortality at the end of experiments thus ranged between 73.3 and 100%. The most virulent were particularly the strains Bb4, Bb8, Bb10 and Bb11 causing mean mortality higher than 98%. The reference strain GHA showed the lowest efficacy against *L. decemlineata* when mortality was 73.3% at the end of the trial. The effect of treatment on virulence against CPB was highly significant ($\chi^2 = 169.98$, *df* = 13, *p* < 0.0001) but pairwise comparison showed differences only between control and *B. bassiana* strains (Figure 1a). Statistically significant were also differences between replications ($\chi^2 = 4.56$, *df* = 1, *p* = 0.0327).

The average percentage of mycosed cadavers at the end of experiments in the control group was 31.3%. This indicates that about 8.3% of adults in the field population used in bioassays were naturally infected by *B. bassiana*. Depending on the strain, mycosis ranged between 66.5 and 98.3% in GHA and Bb12 strains, respectively (Figure 1b). The effect of both the treatment and replication on mycosed cadavers were statistically highly significant

($\chi^2 = 70.44$, $df = 13$, $p < 0.0001$ and $\chi^2 = 54.61$, $df = 1$, $p < 0.0001$, respectively). Pairwise comparison showed some differences among *B. bassiana* strains (Figure 1b).

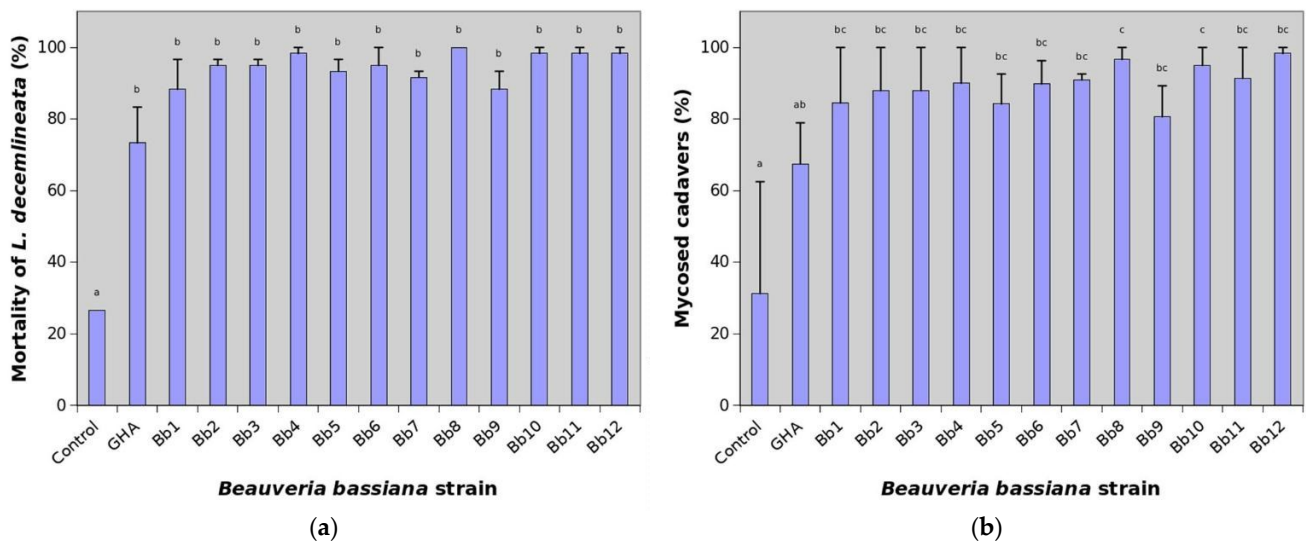


Figure 2. Percentage of mortality and mycosed cadavers of *Leptinotarsa decemlineata* adults treated with various strains of *Beauveria bassiana* 21 days after treatment. See Table 1 for the key to the strains. Data presented are means (\pm SE), with two replicates of 30 beetles for each strain. A generalized linear model was fitted and pairwise between treatment differences were tested using the least-square means. Different letters indicate significant differences between columns ($p < 0.05$). (a) Mortality; (b) Mycosed cadavers.

4. Discussion

Entomopathogenic fungi as biocontrol agents against *L. decemlineata* have been investigated in many laboratory and field studies. For example, high efficacy against last instar CPB larvae was reported for *I. fumosorosea*, with the highest mortality reaching 93% on the 7th day after treatment of insects by suspension of blastospores with a concentration of 5×10^7 spores/mL [19]. Another EPF species, *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Houbraeken, Hywel-Jones and Samson (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae), was found to be most effective also on the last larval instar of CPB but mortality was only 33.2% on the 10th day of treatment with a fungal concentration of 10^8 CFU/mL [49]. Results obtained in the present study revealed that *B. bassiana*-infected adults can be frequently found in field populations of CPB. In the population used in bioassays which originated from an organic farm in Malonty about 8.3% of beetles were naturally infected. Natural infection of CPB by entomopathogenic fungi was documented by Mietkiewski et al. [50] who found *B. bassiana* to be the dominant fungal pathogen infecting about 21% of diapausing beetles in Poland. Mortality of CPB adults caused by new native strains isolated within our study reached up to 100% when beetles were treated by conidia with a concentration of 1×10^7 spores/mL with an LT_{50} of about 7 days. Such efficacy is high for adult CPB beetles because it is known that different developmental stages of CPB have different susceptibility to entomopathogenic fungi, with eggs and adults being the most resistant [51–53]. While in the youngest larval instars the LC_{50} values for the NDBJJ-BFG strain of *B. bassiana* were 10^5 – 10^6 , in adults the LC_{50} values ranged between 10^7 and 10^8 spores/mL [37]. The highest sensitivity of the 1st and 2nd instar CPB larvae was confirmed by a recent study when some of 14 Turkish *B. bassiana* isolates applied at a concentration of 1×10^7 conidia per mL caused mortality between 96.7 and 100% while they caused lower mortality in eggs and adults [38]. Higher vulnerability of early instars towards *B. bassiana* is not unique for CPB as it has also been reported for some other insect pests [54,55].

Several field trials demonstrated a good potential of *B. bassiana* to control CPB [32–36,56]. Biocontrol agents are usually applied in the field as a spray, while we used dip test in our laboratory assays. Although spraying insects together with the host plant (potato leaves in

this case), e.g., using a Potter tower, seems to simulate field application better, a previous study [57] revealed lower efficacy when *B. bassiana* was applied to potato leaves, and the authors, therefore, recommend developing a formulation targeting the insect cuticle rather than a formulation ensuring spores' long attachment and survival time on the leaf surface. Moreover, several studies have documented that the persistence of EPF spores on plants is limited by many factors such as temperature, rainfall, low humidity, solar radiation, plant chemistry, host plant genotype, fungal strain, etc. [58–69].

Our results further showed little variability in efficacy against CPB adults among native *B. bassiana* strains. This could indicate that the strains are genetically similar and that the sampling site has a relatively low effect when strains are selected naturally via the same host species. Results of a recent study [38] demonstrated significant differences in virulence among *B. bassiana* isolates obtained from the soil by bait method; nevertheless, genetical analysis revealed that all tested isolates had 99% evolutionary homology with other *B. bassiana* isolates from the NCBI database.

The present study also showed that the efficacy of new native strains was significantly higher than that of the reference strain GHA which caused intermediate mortality of *L. decemlineata* adults. GHA strain, the active ingredient of mycopesticide BotaniGard® WP, has been reported to be highly efficient in the control of many arthropod pests [70–74]. This strain was originally isolated from a chrysomelid beetle *Diabrotica undecimpunctata* Mannerheim (Coleoptera: Chrysomelidae) and host specificity thus might be one of the reasons why it was less effective compared to native strains isolated from naturally infected CPB adults. Similar results were demonstrated by Li et al. [75] who found that the *B. bassiana* strains isolated from infected mulberry longicorn, *Apriona germari* (Hope) (Coleoptera: Cerambycidae), caused the highest cumulative mortality rate and the shortest LT₅₀ to the same pest species compared with other strains. The reason might be attributed to the fact that strains were isolated from their original host pest and showed a stronger ability to infect the original host compared with other strains isolated from different insects [76]. This proves that isolation of EPF from the target host might have an advantage of discovering highly virulent strains which can only germinate and expand when it infests its specific host, called host specificity [76–78]. The reason for host specificity is biological long-term co-evolution and mutual adaptation, which may have limited the choices of parasites for the host [77]. Genetical aspects of the host specificity were discussed, e.g., by Viaud et al. [79] and Maurer et al. [80]. In the recent study, Zhang et al. [81] sequenced and compared the genome of seventeen *B. bassiana* isolates obtained from different insect hosts including *L. decemlineata* and concluded that several mutated genes and positively selected genes may underpin the virulence of *B. bassiana* towards hosts during the infection process.

As indicated from the present study, highly virulent strains can be obtained by isolation of EPF from target pests. There are, however, other strain characteristics important for practical applications, such as spore production in mass cultures, low humidity, and UV tolerance or long shelf life of the formulated product, which need to be considered when a particular strain is selected for further steps of mycopesticide development [82,83].

5. Conclusions

Our findings demonstrate that most of the native *B. bassiana* strains isolated from naturally infested *L. decemlineata* adults showed high virulence against this pest and suggest that this entomopathogenic fungus could be an alternate solution to broad-spectrum chemical insecticides. Results revealed little variability among these strains collected at different sites. Their efficacy was significantly higher than reference strain GHA from BotaniGard®, indicating that host species from which the *B. bassiana* strain is isolated seems to be more important than the geographical origin of the strain. Further research, e.g., genetical analysis, trials under field conditions, development of effective formulations, and study on potential non-target effects, is therefore needed before some of the strains can be recommended for application as a biopesticide.

Author Contributions: Conceptualization, R.Z. and O.S.H.; methodology, J.K., E.J. and R.Z.; genetical analysis, E.J.; performing experiments, J.K. and R.Z.; data analysis and curation, R.Z.; writing—original draft preparation, R.Z.; writing—review and editing, R.Z., J.K., E.J. and O.S.H.; project administration, O.S.H.; funding acquisition, O.S.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Agency for Agricultural Research (NAZV) Project No. QK1910270. Additional support was obtained from the Czech Academy of Sciences (RVO:60077344). Plant material was provided by the Potato Research Institute Ltd. Havlíčkův Brod, Czech Republic, supported by the grant of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, E-97/01-3160-0200.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors thank Andrea Bohatá for valuable advices concerning entomopathogenic fungi and Barbora Kozelková and Radka Tanzer Fabiánová for their technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Jolivet, P. Le doryphore menace l'Asie *Leptinotarsa decemlineata* Say 1824 (Col. Chrysomelidae). *Entomologiste* **1991**, *47*, 29–48.
- Weber, D. Colorado Beetle: Pest on the Move. *Pestic. Outlook* **2003**, *14*, 256–259. [[CrossRef](#)]
- Hare, J.D. Ecology and Management of the Colorado Potato Beetle. *Annu. Rev. Entomol.* **1990**, *35*, 81–100. [[CrossRef](#)]
- Alyokhin, A. Colorado Potato Beetle Management on Potatoes: Current Challenges and Future Prospects. *Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol.* **2009**, *3*, 10–19.
- Alyokhin, A.; Vincent, C.; Giordanengo, P. (Eds.) *Insect Pests of Potato: Global Perspectives on Biology and Management*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; Academic Press: Boston, MA, USA, 2013; ISBN 978-0-12-386895-4.
- Mota-Sanchez, D.; Hollingworth, R.M.; Grafius, E.J.; Moyer, D.D. Resistance and Cross-Resistance to Neonicotinoid Insecticides and Spinosad in the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Manag. Sci.* **2006**, *62*, 30–37. [[CrossRef](#)]
- Alyokhin, A.; Dively, G.; Patterson, M.; Castaldo, C.; Rogers, D.; Mahoney, M.; Wollam, J. Resistance and Cross-Resistance to Imidacloprid and Thiamethoxam in the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Manag. Sci.* **2007**, *63*, 32–41. [[CrossRef](#)]
- Zichová, T.; Kocourek, F.; Salava, J.; Nad'ova, K.; Stará, J. Detection of Organophosphate and Pyrethroid Resistance Alleles in Czech *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) Populations by Molecular Methods. *Pest Manag. Sci.* **2010**, *66*, 853–860. [[CrossRef](#)]
- Szendrei, Z.; Grafius, E.; Byrne, A.; Ziegler, A. Resistance to Neonicotinoid Insecticides in Field Populations of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Manag. Sci.* **2012**, *68*, 941–946. [[CrossRef](#)]
- Alyokhin, A.; Baker, M.; Mota-Sanchez, D.; Dively, G.; Grafius, E. Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides. *Am. J. Potato Res.* **2008**, *85*, 395–413. [[CrossRef](#)]
- Stankovic, S.; Zabel, A.; Kostic, M.; Manojlovic, B.; Rajkovic, S. Colorado Potato Beetle [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)] Resistance to Organophosphates and Carbamates in Serbia. *J. Pest Sci.* **2004**, *77*, 11–15. [[CrossRef](#)]
- Alyokhin, A.; Mota-Sanchez, D.; Baker, M.; Snyder, W.E.; Menasha, S.; Whalon, M.; Dively, G.; Moarsi, W.F. The Red Queen in a Potato Field: Integrated Pest Management versus Chemical Dependency in Colorado Potato Beetle Control. *Pest Manag. Sci.* **2015**, *71*, 343–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Göldel, B.; Lemic, D.; Bažok, R. Alternatives to Synthetic Insecticides in the Control of the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) and Their Environmental Benefits. *Agriculture* **2020**, *10*, 611. [[CrossRef](#)]
- Kadoić Balaško, M.; Mikac, K.M.; Bažok, R.; Lemic, D. Modern Techniques in Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) Control and Resistance Management: History Review and Future Perspectives. *Insects* **2020**, *11*, 581. [[CrossRef](#)]
- Alvarez, J.M.; Srinivasan, R.; Cervantes, F.A. Occurrence of the Carabid Beetle, *Pterostichus melanarius* (Illiger), in Potato Ecosystems of Idaho and Its Predatory Potential on the Colorado Potato Beetle and Aphids. *Am. J. Potato Res.* **2013**, *90*, 83–92. [[CrossRef](#)]
- Sablon, L.; Haubruge, E.; Verheggen, F.J. Consumption of Immature Stages of Colorado Potato Beetle by *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) Larvae in the Laboratory. *Am. J. Potato Res.* **2013**, *90*, 51–57. [[CrossRef](#)]

17. Weber, D.C. Biological control of potato insect pests. In *Insect Pests of Potato*; Academic Press: Oxford, UK, 2013; pp. 399–437, ISBN 978-0-12-386895-4.
18. Wright, R.J.; Agudelo-Silva, F.; Georgis, R. Soil Applications of Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes for Control of Colorado Potato Beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *J. Nematol.* **1987**, *19*, 201–206. [[PubMed](#)]
19. Hussein, H.M.; Skoková Habušťová, O.; Pužza, V.; Zemek, R. Laboratory Evaluation of *Isaria fumosorosea* CCM 8367 and *Steinernema feltiae* Ustinov against Immature Stages of the Colorado Potato Beetle. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Domínguez-Arrizabalaga, M.; Villanueva, M.; Fernandez, A.B.; Caballero, P. A Strain of *Bacillus thuringiensis* Containing a Novel *Cry7Aa2* Gene That Is Toxic to *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insects* **2019**, *10*, 259. [[CrossRef](#)]
21. Islam, W.; Adnan, M.; Shabbir, A.; Naveed, H.; Abubakar, Y.S.; Qasim, M.; Tayyab, M.; Noman, A.; Nisar, M.S.; Khan, K.A.; et al. Insect-Fungal-Interactions: A Detailed Review on Entomopathogenic Fungi Pathogenicity to Combat Insect Pests. *Microb. Pathog.* **2021**, *159*, 105122. [[CrossRef](#)]
22. De Faria, M.R.; Wraight, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A Comprehensive List with Worldwide Coverage and International Classification of Formulation Types. *Biol. Control* **2007**, *43*, 237–256. [[CrossRef](#)]
23. Shahid, A.; Rao, Q.; Bakhsh, A.; Husnain, T. Entomopathogenic Fungi as Biological Controllers: New Insights into Their Virulence and Pathogenicity. *Arch. Biol. Sci.* **2012**, *64*, 21–42. [[CrossRef](#)]
24. Lacey, L.A.; Frutos, R.; Kaya, H.K.; Vail, P. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biol. Control* **2001**, *21*, 230–248. [[CrossRef](#)]
25. Bajan, C.; Kmitowa, K. The Effect of Entomogenous Fungi *Paecilomyces farinosus* Dicks. Brown et Smith and *Beauveria bassiana* Bals. Vuill. on the Oviposition by *Leptinotarsa decemlineata* Say Females, and on the Survival of Larvae. *Ekol. Pol.* **1972**, *20*, 423–432.
26. Bajan, C.; Fedorko, A.; Kmitowa, K.; Wojciechowska, M. Utilization of Parasitic Microorganisms to Decrease Colorado Beetle Quantity. *Bull. L'academie Pol. Sci. Ser. Sci. Biol.* **1978**, *26*, 715–717.
27. Samsinakova, A. Effects of Fungic Preparations on Larvae of Colorado Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Acta Entomol. Bohemoslov.* **1977**, *74*, 76–80.
28. Ramisch, I. *Paecilomyces farinosus* Dicks. Ex Fr. Als Parasit Des Kartoffelkafers *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Nova Hedwig.* **1976**, *271*, 199–214.
29. Zemek, R.; Prenerova, E.; Weyda, F. The First Record of Entomopathogenic Fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycota: Hyphomycetes) on the Hibernating Pupae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Entomol. Res.* **2007**, *37*, A135–A136.
30. Prenerová, E.; Zemek, R.; Volter, L.; Weyda, F. Strain of Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the Method for Controlling Insect and Mite Pests. U.S. Patent No. US 08574566, 5 November 2013.
31. Prenerová, E.; Zemek, R.; Volter, L.; Weyda, F. Strain of Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the Method for Controlling Insect and Mite Pests. EPO Patent No. EP2313488, 29 April 2015.
32. Ropek, D.; Kołodziejczyk, M. Efficacy of Selected Insecticides and Natural Preparations against *Leptinotarsa decemlineata*. *Potato Res.* **2019**, *62*, 85–95. [[CrossRef](#)]
33. Campbell, R.K.; Anderson, T.E.; Semel, M.; Roberts, D.W. Management of the Colorado Potato Beetle Using the Entomogenous Fungus *Beauveria bassiana*. *Am. Potato J.* **1985**, *62*, 29–37. [[CrossRef](#)]
34. Fargues, J.; Delmas, J.C.; Lebrun, R.A. Leaf Consumption by Larvae of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) Infected with the Entomopathogen, *Beauveria bassiana*. *J. Econ. Entomol.* **1994**, *87*, 67–71. [[CrossRef](#)]
35. Wraight, S.P.; Ramos, M.E. Application Parameters Affecting Field Efficacy of *Beauveria bassiana* Foliar Treatments against Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Biol. Control* **2002**, *23*, 164–178. [[CrossRef](#)]
36. Wraight, S.P.; Ramos, M.E. Delayed Efficacy of *Beauveria bassiana* Foliar Spray Applications against Colorado Potato Beetle: Impacts of Number and Timing of Applications on Larval and next-Generation Adult Populations. *Biol. Control* **2015**, *83*, 51–67. [[CrossRef](#)]
37. Yulin, D.; Hui, W.; Zhiyan, M.; Liu, Y.; Xiaodong, D.; Deying, M. Identification and Virulence of a Fungal Entomopathogen Strain NDBJJ-BFG to Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *J. Plant Prot.* **2018**, *45*, 751–758.
38. Baki, D.; Tosun, H.S.; Erler, F. Efficacy of Indigenous Isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Egypt. J. Biol. Pest Control* **2021**, *31*, 56. [[CrossRef](#)]
39. Chase, A.R.; Osborne, L.S.; Ferguson, V.M. Selective Isolation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an Artificial Potting Medium. *Fla. Entomol.* **1986**, *69*, 285. [[CrossRef](#)]
40. Doyle, J. DNA Protocols for Plants. In *Molecular Techniques in Taxonomy*; Hewitt, G.M., Johnston, A.W.B., Young, J.P.W., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1991; pp. 283–293. ISBN 978-3-642-83964-1.
41. O'Donnell, K. Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers Are Highly Divergent in the Phytopathogenic Ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Curr. Genet.* **1992**, *22*, 213–220. [[CrossRef](#)]
42. O'Donnell, K. *Fusarium* and its near relatives. In *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*; Reynolds, R., Taylor, J.W., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 1993; pp. 225–233.
43. Dillon, R.J.; Charnley, A.K. A Technique for Accelerating and Synchronising Germination of Conidia of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. *Arch. Microbiol.* **1985**, *142*, 204–206. [[CrossRef](#)]

44. Dillon, R.J.; Charnley, A.K. Initiation of Germination in Conidia of the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* **1990**, *94*, 299–304. [[CrossRef](#)]
45. Skalický, A.; Bohatá, A.; Šimková, J.; Osborne, L.S.; Landa, Z. Selection of Indigenous Isolates of Entomopathogenic Soil Fungus *Metarhizium anisopliae* under Laboratory Conditions. *Folia Microbiol.* **2014**, *59*, 269–276. [[CrossRef](#)]
46. SAS Institute. *SAS/STAT 14.3: User's Guide*; SAS Institute: Cary, NC, USA, 2017.
47. SAS Institute. *SAS Stat Studio 3.8: User's Guide*; SAS Institute: Cary, NC, USA, 2018.
48. Abbott, W.S. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *J. Econ. Entomol.* **1925**, *18*, 265–267. [[CrossRef](#)]
49. Kepenekci, I.; Oksal, E.; Saglam, H.; Atay, T.; Tulek, A.; Evlice, E. Identification of Turkish Isolate of the Entomopathogenic Fungi, *Purpureocillium lilacinum* (Syn: *Paecilomyces lilacinus*) and Its Effect on Potato Pests, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Egypt. J. Biol. Pest Control* **2015**, *25*, 121–127.
50. Mielkiewski, R.; Sapieha, A.; Tkaczuk, C. The Effect of Soil-Borne Entomogenous Fungi on the Mycoses of the Colorado Potato Beetle during Hibernation Period. *IOBC-WPRS Bull.* **1996**, *19*, 162–165.
51. Fargues, J.; Delmas, J.-C.; Augé, J.; Lebrun, R.A. Fecundity and Egg Fertility in the Adult Colorado Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) Surviving Larval Infection by the Fungus *Beauveria bassiana*. *Entomol. Exp. Appl.* **1991**, *61*, 45–51. [[CrossRef](#)]
52. Long, D.W.; Drummond, F.A.; Groden, E. Susceptibility of Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) Eggs to *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **1998**, *71*, 182–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Fargues, J. Étude des conditions d'infection des larves de doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* say, par *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. [Fungi imperfecti]. *Entomophaga* **1972**, *17*, 319–337. [[CrossRef](#)]
54. Hafez, M.; Zaki, F.N.; Moursy, A.; Sabbour, M. Biological Effects of the Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* on the Potato Tuber Moth *Phthorimaea operculella* (Seller). *Anz. Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* **1997**, *70*, 158–159. [[CrossRef](#)]
55. Tahir, M.; Wakil, W.; Ali, A.; Sahi, S.T. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Isolates against Larvae of the Polyphagous Pest *Helicoverpa armigera*. *Entomol. Gen.* **2019**, *38*, 225–242. [[CrossRef](#)]
56. Hajek, A.E.; Soper, R.S.; Roberts, D.W.; Anderson, T.E.; Biever, K.D.; Ferro, D.N.; LeBrun, R.A.; Storch, R.H. Foliar Applications of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for Control of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): An Overview of Pilot Test Results from the Northern United States. *Can. Entomol.* **1987**, *119*, 959–974. [[CrossRef](#)]
57. Wraight, S.P.; Ramos, M.E. Effects of Inoculation Method on Efficacy of Wettable Powder and Oil Dispersion Formulations of *Beauveria bassiana* against Colorado Potato Beetle Larvae under Low-Humidity Conditions. *Biocontrol Sci. Technol.* **2017**, *27*, 348–363. [[CrossRef](#)]
58. Zimmermann, G. Effect of High Temperatures and Artificial Sunlight on the Viability of Conidia of *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* **1982**, *40*, 36–40. [[CrossRef](#)]
59. Fargues, J.; Goettel, M.S.; Smits, N.; Ouedraogo, A.; Vidal, C.; Lacey, L.A.; Lomer, C.J.; Rougier, M. Variability in Susceptibility to Simulated Sunlight of Conidia among Isolates of Entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia* **1996**, *135*, 171–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Inyang, E.N.; McCartney, H.A.; Oyejola, B.; Ibrahim, L.; Pye, B.J.; Archer, S.A.; Butt, T.M. Effect of Formulation, Application and Rain on the Persistence of the Entomogenous Fungus *Metarhizium anisopliae* on Oilseed Rape. *Mycol. Res.* **2000**, *104*, 653–661. [[CrossRef](#)]
61. Klingen, I.; Hajek, A.; Meadow, R.; Renwick, J.A.A. Effect of Brassicaceous Plants on the Survival and Infectivity of Insect Pathogenic Fungi. *BioControl* **2002**, *47*, 411–425. [[CrossRef](#)]
62. Pilz, C.; Enkerli, J.; Wegensteiner, R.; Keller, S. Establishment and Persistence of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* in Maize Fields. *J. Appl. Entomol.* **2011**, *135*, 393–403. [[CrossRef](#)]
63. Zemek, R.; Konopická, J.; Ul Abdin, Z. Low Efficacy of *Isaria fumosorosea* against Box Tree Moth *Cydalima perspectalis*: Are Host Plant Phytochemicals Involved in Herbivore Defence against Fungal Pathogens? *J. Fungi* **2020**, *6*, 342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Inglis, G.D.; Goettel, M.S.; Butt, T.M.; Strasser, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*; Butt, T.M., Jackson, C., Magan, N., Eds.; CABI: Wallingford, UK, 2001; pp. 23–69, ISBN 978-0-85199-356-0.
65. Vandenberg, J.D.; Ramos, M.; Altre, J.A. Dose-Response and Age- and Temperature-Related Susceptibility of the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) to Two Isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). *Environ. Entomol.* **1998**, *27*, 1017–1021. [[CrossRef](#)]
66. Glare, T.R.; Milner, R.J. Ecology of entomopathogenic fungi. In *Handbook of Applied Mycology*; Arora, D.K., Ajello, L., Mukerji, K.G., Eds.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1991; Volume 2, pp. 547–612. ISBN 978-0-8247-8435-5.
67. Ferron, P.; Fargues, J.; Riba, D. Fungi as microbial insecticides against pests. In *Handbook of Applied Mycology*; Arora, D.K., Ajello, L., Mukerji, K.G., Eds.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1991; Volume 2, pp. 665–705. ISBN 978-0-8247-8435-5.
68. Tefera, T.; Vidal, S. Effect of Inoculation Method and Plant Growth Medium on Endophytic Colonization of Sorghum by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl* **2009**, *54*, 663–669. [[CrossRef](#)]
69. Raya-Diaz, S.; Sanchez-Rodriguez, A.R.; Segura-Fernandez, J.M.; del Campillo, M.C.; Quesada-Moraga, E. Entomopathogenic Fungi-Based Mechanisms for Improved Fe Nutrition in Sorghum Plants Grown on Calcareous Substrates. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0185903. [[CrossRef](#)]
70. Liu, H.; Bauer, L.S. Microbial Control of Emerald Ash Borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) with *Beauveria bassiana* Strain GHA: Greenhouse and Field Trials. *Biol. Control* **2008**, *45*, 124–132. [[CrossRef](#)]

71. Mukawa, S.; Tooyama, H.; Ikegami, T. Influence of Humidity on the Infection of Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), by *Beauveria bassiana*. *Appl. Entomol. Zool.* **2011**, *46*, 255–264. [[CrossRef](#)]
72. Clavet, C.; Hampton, E.; Requentina, M.; Alm, S.R. Laboratory Assessment of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) Strain GHA for Control of *Listronotus maculicollis* (Coleoptera: Curculionidae) Adults. *J. Econ. Entomol.* **2013**, *106*, 2322–2326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Parker, B.L.; Skinner, M.; Gouli, S.; Gouli, V.; Kim, J.S. Virulence of BotaniGard® to Second Instar Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae). *Insects* **2015**, *6*, 319–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Ullah, M.S.; Lim, U.T. Laboratory Bioassay of *Beauveria bassiana* against *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) on Leaf Discs and Potted Bean Plants. *Exp. Appl. Acarol.* **2015**, *65*, 307–318. [[CrossRef](#)]
75. Li, H.; Huang, D.; Wang, Z.; Yan, H.; Zheng, J. Screening Test of Highly Virulent Strains of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* against *Apriona germari* Larvae. *Sci. Silvae Sin.* **2007**, *43*, 66–71.
76. Wang, Y.-C.; Chi, D.-F. Screening of High-Virulent Entomopathogenic Fungal Strains to Infect *Xylotrechus rusticus* Larvae. *3Biotech* **2019**, *9*, 80. [[CrossRef](#)]
77. Guillebeau, L.P. Risk–Benefit Analysis of Pesticides: The U.S. Environmental Protection Agency Perspective. *Am. Entomol.* **1994**, *40*, 173–179. [[CrossRef](#)]
78. Wakil, W.; Kavallieratos, N.G.; Ghazanfar, M.U.; Usman, M.; Habib, A.; El-Shafie, H.A.F. Efficacy of Different Entomopathogenic Fungal Isolates against Four Key Stored-Grain Beetle Species. *J. Stored Prod. Res.* **2021**, *93*, 101845. [[CrossRef](#)]
79. Viaud, M.; Couteaudier, Y.; Levis, C.; Riba, G. Genome Organization in *Beauveria bassiana*: Electrophoretic Karyotype, Gene Mapping, and Telomeric Fingerprint. *Fungal Genet. Biol.* **1996**, *20*, 175–183. [[CrossRef](#)]
80. Maurer, P.; Couteaudier, Y.; Girard, P.A.; Bridge, P.D.; Riba, G. Genetic Diversity of *Beauveria bassiana* and Relatedness to Host Insect Range. *Mycol. Res.* **1997**, *101*, 159–164. [[CrossRef](#)]
81. Zhang, Z.; Lu, Y.; Xu, W.; Sui, L.; Du, Q.; Wang, Y.; Zhao, Y.; Li, Q. Influence of Genetic Diversity of Seventeen *Beauveria bassiana* Isolates from Different Hosts on Virulence by Comparative Genomics. *BMC Genom.* **2020**, *21*, 451. [[CrossRef](#)]
82. Feng, M.G.; Poprawski, T.J.; Khachatourians, G.G. Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. *Biocontrol Sci. Technol.* **1994**, *4*, 3–34. [[CrossRef](#)]
83. Jaronski, S.T. Mass Production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art. In *Mass Production of Beneficial Organisms*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 357–413. ISBN 978-0-12-391453-8.

Article

Efficacy of the Applied Natural Enemies on the Survival of Colorado Potato Beetle Adults

Vladimír Puža *, Jiří Nermut', Jana Konopická  and Oxana Skoková Habušová 

Biology Centre, Czech Academy of Sciences, Institute of Entomology, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; Jirka.Nermut@seznam.cz (J.N.); jkonopicka@seznam.cz (J.K.); habustova@entu.cas.cz (O.S.H.)

* Correspondence: vpuza@seznam.cz

Simple Summary: Colorado potato beetle (CPB) *Leptinotarsa decemlineata* is the potato plant's most destructive pest. Recently, resistance to the traditional insecticides has appeared, thus new environmentally friendly control agents are highly needed. In our study, we searched for the most effective entomopathogenic agents that could be used to decrease the emergence of CPB adults from the soil. We selected two entomopathogenic nematodes (*Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae*) and one strain of fungus (*Beauveria bassiana*). The suspension application was done on the leaves, plus by watering the pods and the field plots. All the treatments had an obvious effect, but in the field, only the fungal treatment showed a promising result. Further research is needed to develop the most effective application for field usage.

Abstract: Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* is among the most destructive pests of potatoes quickly developing resistance to traditional insecticides. In the present study, we tested the effect of various species and strains of entomopathogenic nematodes on CPB adults, and subsequently, the most effective nematodes were applied alone and in combination with entomopathogenic fungus *B. bassiana* in pots with potato plants and in the field and their effect on the number of emerging adults was evaluated. In the experimental infections, both the nematode invasion and pathogenicity were variable, and, in several strains, the mortality reached 100%. In pot experiments, soil application of nematodes *S. carpocapsae* 1343 and *S. feltiae* Jakub and fungus significantly decreased numbers of emerging CPB adults, while, after the application on leaves, only fungal treatment was effective. The field application of fungus *B. bassiana* significantly decreased the number of emerging CPB adults in comparison to control sites by ca. 30% while the effect of nematodes and the nematodes–fungus combination was not significant. In conclusion, we demonstrate the necessity of thorough bioassays to select the most effective nematode strains. Entomopathogenic nematodes have the potential to effectively decrease the emergence of CPB adults, but further research is needed to improve the effectiveness in the field.

Keywords: Colorado potato beetle; entomopathogenic nematodes; entomopathogenic fungi; *Steinernema*; *Beauveria*; field application



Citation: Puža, V.; Nermut', J.; Konopická, J.; Skoková Habušová, O. Efficacy of the Applied Natural Enemies on the Survival of Colorado Potato Beetle Adults. *Insects* **2021**, *12*, 1030. <https://doi.org/10.3390/insects12111030>

Academic Editor: Zhenying Wang

Received: 25 October 2021

Accepted: 14 November 2021

Published: 16 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Colorado potato beetle (CPB), *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae), is among the most destructive pests of potatoes (*Solanum tuberosum* L.). The adults and larvae feed on potato plants, significantly reducing the yield [1]. Since CPB is known to develop resistance to traditional insecticides [2–4], new environmentally safe control strategies are highly needed.

Entomopathogenic nematodes (EPNs) (Steinernematidae and Heterorhabditidae: Nematoda) are ubiquitous lethal insect parasites with global distribution and a wide host range [5]. Due to their ability to infect various insects [6], the possibility of mass production

by industrial techniques [7], and their safety to non-target organisms and the environment [8,9], EPNs represent an attractive agent for the biological control of many insect pests [10].

Entomopathogenic fungi (EPFs) represent other promising biocontrol agents. Their advantages are that they do not need to be ingested, as they are able to penetrate the host cuticle, and that they can be relatively easily produced [11]. The fungi are produced either in solid-state fermentation, where they produce aerial conidia, or in a submerged liquid-state fermentation, where they produce blastopores [12], and a number of mycoinsecticide, have been developed in the world [13].

In the last three decades, a considerable number of studies addressed the potential use of entomopathogenic nematodes for control of CPB, but with variable results. Under laboratory conditions, Cantelo and Nickle [14] tested three EPN species at different dosage levels and achieved 100% mortality of CPB prepupae at a dose of 164.6 nematodes/cm². Similarly, Trdan et al. [15] have shown that four EPN species caused the prompt death of all CPB stages at doses of 200, 1000, and 2000 infective juveniles per individual in Petri dish experiments. So far only several field studies were performed. Nematode *Heterorhabditis marelatus* applied twice during the season caused a 50% reduction in adult CPB populations and produced six times as many dead prepupae in nematode-treated soil samples as in the untreated samples [16]. Recently, Čac̣ija et al. [17] have demonstrated that *S. feltiae* and *S. carpocapsae* effectively decreased the number of overwintering CPB adults.

The effect of control agents can be increased by their combination [18,19]. The combined application of the nematode *S. feltiae* with entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* significantly increased the CPB mortality in comparison to single-agent treatment [20]. Özdemir et al. [21] observed a synergistic effect between several chemical insecticides and *S. feltiae* against CPB. On the other hand, the negative effect of the combination has been recorded in the interactions between the EPN *S. glaseri* and fungus *Metarhizium anisopliae* [22] and between *Steinernema ichnusae* and *B. bassiana* fungus [23]. Therefore, the compatibility of control agents should be thoroughly tested before large-scale applications.

Colorado potato beetle adults are generally less susceptible to nematodes [16]. However, the reduction of pupating adults is desirable as it could decrease the damage caused by second-generation CPB in field conditions, as well as adult emergence in the next spring. Therefore in the present study, we focused on adult CPB and we tested a large number of EPN species and strains for pathogenicity to CPB adults in Petri dish assays in order to select the most effective nematodes. The selected nematodes were tested alone and in combination with entomopathogenic fungus in pot and field experiments. The combined application allows the testing of the hypothesis that the combination of the nematodes with EPF could increase the effectivity against CPB.

2. Materials and Methods

2.1. Culture of Colorado Potato Beetle

The adults and larvae of Colorado potato beetle (CPB) were collected from the potato plants on an organic farm near the vicinity of Malonty village, Czech Republic (48.7083920 N; 14.5778508 E) in several consecutive series in July and August 2019–2021. Each developmental stage (larvae and adults) was collected separately inside a plastic box of size 34 × 22.5 × 15.7 cm with a perforated lid.

The collected culture of CPB was placed inside the fine mesh cage of size 100 × 50 × 50 cm. Potato plants of the variety Magda, grown in a pot with a diameter of 21 cm and a volume of 4 L, were provided for feeding. Culture was left in controlled greenhouse conditions (25 °C, 75% relative humidity and a long day photoperiod 16:8). Culture was checked daily and supplemented with fresh potato plants. Potato plants of the variety Magda were obtained in the form of tubers and tissue cultures (tiny plants) from the Potato Research Institute, Havlíčkův Brod. Plants were grown in a pot with a diameter of 21 cm and a volume of 4 L, watered daily, and left in the same conditions as a CPB culture. The Magda

variety is a dynamically growing plant with a big leaf and, therefore, is highly suitable for feeding.

2.2. Rearing of Nematodes

The nematodes used in this study either originated from the collection of the Laboratory of Entomopathogenic Nematodes, Biology Centre CAS, which contains both Czech and exotic EPN strains, or were obtained from the field sampling performed during this research (Table 1). In total, 32 EPN strains were used. Soil samples were collected in potato fields and field edges in 15 localities in Czech Republic in the years 2019 and 2020. At each sampling site, five samples of approximately 1 kg of soil were taken with a hand shovel to a depth of ca. 20 cm. Each sample consisted of 10 subsamples from a ca. 100 m² area. The modified Galleria baiting technique of Bedding and Akhurst [24] was used for EPN isolation. Four last-instar *G. mellonella* larvae were added to each sample. Samples were incubated for 5 days at 20 °C and at 55% relative humidity. Dead larvae were individually incubated in the White Traps (White, 1927). The infective juveniles (IJs) recovered from the traps were used both for molecular identification and the subsequent experiments. The nematode strains in the collection are maintained according to Kaya and Stock [25]. Before the experiments, all nematodes were propagated using *G. mellonella*, and 2–3-week-old IJs were used for the infections.

Table 1. Entomopathogenic nematodes used in different experiments. Marked strains (*) were isolated within this study, other strains originate in the laboratory collection.

Species	Strain	Locality	Habitat
<i>S. kraussei</i> , <i>Oscheius onirici</i>	1 *, 1b *	Dvorce, Lysá nad Labem	field edge
<i>S. affine</i>	4 *	Zubrů, Nové Meřto n. M.	field
<i>S. feltiae</i>	6 *	Zubrů, Nové Meřto n. M.	field
<i>S. feltiae</i>	7 *	Oupor, Obrůstvi	field edge
<i>S. affine</i>	8 *	Havl. Borová	field
<i>S. feltiae</i>	15 *	Oupor, Obrůstvi	field edge
<i>S. feltiae</i>	A2 *	Malý Bor, Klatovy	field
<i>S. affine</i>	A3 *	Drůvikov, Chrudim	field edge
<i>S. affine</i>	A6 *	Malý Bor, Klatovy	field edge
<i>S. feltiae</i>	A7 *	Supůkovice	field edge
<i>S. kraussei</i>	A8 *	Drůvikov, Chrudim	field edge
<i>Rhabditis terricola</i>	A9 *	Chlebovice, Frýdek-Můstek	field
<i>Diplogaster</i> sp.	A11 *	Brůzová, Opava	field edge
<i>Diplogaster</i> sp.	A12 *	Supůkovice	field edge
<i>S. affine</i>	A13 *	Supůkovice	field
<i>S. affine</i>	A14 *	Valecův	field edge
<i>S. feltiae</i>	Jakub *	Zbudov, Důvůice	field edge
<i>S. feltiae</i>	BM4 *	Bojanovice	field edge
<i>S. feltiae</i>	BEM *	Beľcůice	field edge
<i>S. feltiae</i>	BP6 *	Beľcůice	field
<i>S. feltiae</i>	L2 *	Horaždůovice	field edge
<i>S. feltiae</i>	MP5 *	Malonty	field
<i>S. feltiae</i>	MT2 *	Malonty	field
<i>S. feltiae</i>	MT6 *	Malonty	field
<i>H. bacteriophora</i>	HB221	Czech Republic	-
<i>S. arenarium</i>	SLOV	Slovakia	-
<i>S. carpocapsae</i>	1343	Czech Republic	-
<i>S. carpocapsae</i>	Egy4	Egypt	-
<i>S. carpocapsae</i>	MG604	Switzerland	-
<i>S. feltiae</i>	626	Czech Republic	-
<i>S. feltiae</i>	37Ca	Canada	-
<i>S. feltiae</i>	Bork	Czech Republic	-
<i>S. feltiae</i>	Jakutsk	Russia	-
<i>S. feltiae</i>	klen	Czech Republic	-
<i>S. feltiae</i>	NFUST	Russia	-
<i>S. feltiae</i>	Be1	Belarus	-
<i>S. kraussei</i>	VČ1	Czech Republic	-

Mass Rearing of Nematodes for Field Application

Nematodes for the field experiment were monoxenically mass produced in liquid medium by modified method according Stock and Goodrich-Blair [26] as follows. Gravid females of *Steinernema feltiae*, strain Jakub, were obtained by the dissection of *Galleria mellonella* larvae infected 4 days before dissection. Females (ca. 50 individuals) were placed in the 1.5 mL Eppendorf tubes with sterile tap water. Later, the water was removed, and females were gently crushed by a plastic microhomogenizer directly in the tube. Water was added (1 mL) to the homogenized females, and the tubes with females were centrifuged for 2 min. at 2000 rpm. After this step, eggs were concentrated in the form of a small but clearly visible pellet on the bottom of the tubes. The supernatant was removed by pipet, and cleaning with water was repeated once again. After that, 1 mL of sterilization solution (10 mL tap water, 1.5 mL 4 M NaOH, and 0.5 mL 12% NaOCl) was added. Eggs were incubated in this solution for 4 min., and after that, the tubes were centrifuged for 2 min. at 4000 rpm to concentrate the eggs into a pellet again. The sterilization solution was removed and replaced by 1 mL of YS medium (5 g yeast extract, 5 g NaCl, 0.5 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5 g K_2HPO_4 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 L distilled water), then centrifuged again for 2 min. at 4000 rpm. This wash with YS medium was repeated twice. After that, sterile YS in a volume of 1 mL was added and the solution of medium with eggs was transferred to sterile multiwell plates (24 wells per plate), with 300 μL of solution per one well. Plates were then sealed with parafilm and stored at 16 °C for 72 h in a climatic box. If the solution was without any turbidity after that time, eggs or the hatched first stage larvae were considered sterile and axenic.

Symbiotic bacteria for the mass production of nematodes were obtained from *Galleria mellonella* larvae 24 h after infection with an appropriate nematode strain. Firstly, the infected larvae were washed in 70% ethanol and dried, and then one leg was cut by sterile scissors. A drop of hemolymph was placed on NBTa agar (37 g standard nutrient agar I, 25 mg bromthymolblue, 4 mL 1% 2,3,5-triphenyl-tetracolumchloride) plate and dispersed on the surface of the plate; 90 mm Petri dishes with bacteria were sealed with parafilm and stored at room temperature, ca. 22 °C. One day later, a single colony of the growing bacteria was transferred to the sterile YS medium (20 mL of medium in a 50 mL Erlenmeyer flask) and cultivated with a shaker at 180 rpm for 2 days. One ml of two-day-old culture was then used as inoculum for sterile nematode culture medium (50 mL of medium in a 250 mL Erlenmeyer flask), composed according to Dunn et al. [27]: 15 g yeast extract, 20 g soy powder, 4 g NaCl, 0.35 g KCl, 0.15 g CaCl_2 , 0.1 g MgSO_4 , 36 mL olive oil, and 1 L distilled water.).

Nematode culture medium inoculated with bacteria was shaken at 180 rpm at 18 °C for 48 h, and after that time, axenic nematode larvae were added to the flask. By this method, the established monoxenic culture was cultivated for 14 days at 18 °C and 160 rpm. Within this time, the nematodes finished their life cycle and produced new IJs on a mass scale. These IJs were then used as inoculum for the subsequent mass production that was performed as described before. The nematode culture medium pre-inoculated with bacteria was settled with 1 mL of IJs obtained from the first cultivation. After 14 days, we collected nematodes for field applications and other experimental purposes. Nematodes were collected with the simple sedimentation method and by washing in tap water. All of the work regarding the cultivation of nematodes was done in strictly sterile conditions in a UV-sterilized flow box.

2.3. Rearing of Entomopathogenic Fungus

Beauveria bassiana strain BBA 08 was used in this study. The strain was isolated from the adult of the Colorado potato beetle (CPB), *Leptinotarsa decemlineata*, from the Beřice site in the Czech Republic (49.50702 N; 13.89545 E). The strain was identified on the basis of macroscopic, microscopic, and genetic characteristics and has been deposited at the Biology Centre CAS, České Budeřovice. The GenBank accession number of the LSU sequence is MN749315.

Blastospores of the fungus BBA 08 were used in the experiments. The fungus was cultured in Potato Dextrose Broth liquid medium (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) at 25 ± 1 °C. For cultivation, 95 mL of liquid media was put into a 250 mL Erlenmeyer flask and inoculated with 5 mL of conidial fungus suspension. Then the flask was placed on an orbital shaker with a speed of 200 rpm and temperature 25 ± 1 °C for four days. After four days, the suspension was filtered through sterile gauze to separate the mycelium. In uniform suspension, the spores were counted with a Neubauer improved counting chamber (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and subsequently, the suspension was adjusted to the required concentration.

The viability of spores was verified using a standard germination test [28]. Ten drops from suspension were applied using a 1 µL inoculation loop on the surface of 2% water agar, which was poured in a thin layer onto the surface of a sterile slide. After the drops had dried, the slides were moved into a wet chamber and incubated at a temperature of 25 ± 1 °C for 24 h. The percentage of germinating spores was determined using an Olympus CH20 light microscope (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan); bright field, 400× magnification. The spore germination in all tests was 100%.

2.4. Petri Dish Infections

In the experimental infections, the CPB adults were individually infected in Petri dishes (9 cm diameter) lined with moist filter paper and a potato leaf for feeding. Various collection and freshly isolated EPN strains (Table 1) were applied at three doses of 250, 500, and 1000 IJs per one dish in a total water volume of 450 µL, each dose being applied in ten replicates. Control dishes received 450 µL of water only, and there were ten control dishes for each nematode strain. The mortality of CPB was observed for 6 days and then both dead and live beetles were dissected in order to check for the presence of nematodes.

2.5. Pot Experiments

Pot experiments were designed to confirm the effectivity of the selected nematodes and the entomopathogenic fungus *B. bassiana* strain BBA 08 in outdoor conditions prior to the field application. Based on the Petri dish experiment, highly pathogenic strains *S. feltiae* strain Jakub and *S. carpocapsae* strain 1343 were selected. Some other strains displayed comparable, or even slightly higher pathogenicity, but we selected these Czech strains as they could be better adapted to local outdoor conditions.

The effects of both nematodes and fungus *B. bassiana* strain BBA 08 on pupating Colorado potato beetles in the soil and on CPB adults on plant leaves were tested in pots with potato plants (see above) in outdoor conditions, in České Budeřovice, Czech Republic (48.9764494 N; 14.4473356 E).

Each combination was tested in 8 plastic pots (diameter 21 cm, 15 cm of organic soil) with one potato plant per pot (25 cm high) that was populated with 5 IV. instar larvae or 5 adults of *L. decemlineata* prior to the application. Another four pots with either the IV. instar CPB larvae or adults were prepared as the control without bioagent application.

To assess the effect on pupating CPB, both nematodes and fungus were applied to the soil by automatic pipette in 5 mL of water at a dose of 21,000 IJs for the nematodes and 1×10^9 for the fungus with nematode dosage corresponding to the standard recommended doses (5×10^5 IJs per square meter) and fungal dose corresponding to the half of the highest recommended dose for a commercial product based on *B. bassiana* BOTANIGARD 22 WP ($5.37 \times 10^{10}/\text{m}^2$). In the experiment with adults on leaves, the nematodes and fungus in the same dosage were sprayed on plant leaves. Each pot was closed into an entomological isolator to prevent adult beetles and larvae from escaping and also to protect them from natural enemies from the surrounding area.

The effect of leaf application was observed every day and after one week the final evaluation was done when all dead and live adults were counted. To evaluate the effect of soil application, the larvae were allowed to leave the leaves and move to the soil to

pupate. Then the pots were observed daily and the numbers of emerging adult beetles were recorded.

2.6. Field Application

The field trial area was located near the village of Žabčice in the South Moravian Region (49.0219636 N; 16.6155681 E), in the corn production area, altitude 178 m, average air temperature (1991–2020) 10.3 °C, average total precipitation (1991–2020) 491.1 mm. The surface is dominated by fluvial gley, and the soil type is a clayey loam. The pre-crop was spring barley. Our field was prepared with standard agrotechnical methods.

The total experimental area was 302.4 m², which was divided into 12 experimental plots by using GPS navigation (Figure 1). One experimental plot (25.2 m²) contained 4 rows of potatoes, and the length of the row was 8.4 m; the number of tubers in a row was 28; the distance between tubers in a row was 30 cm, and the pitch was 0.75 cm. The planted variety of potatoes was Rosara. Entomopathogenic nematode *S. feltiae*, strain Jakub, was selected as the more effective nematode from the pot experiments. The application of nematodes, fungus *B. bassiana* strain BBA 08, their combination, and control was done shortly before the larvae of IV instar were ready to climb for pupation into the soil (larvae from the first generation of CPB adults). Each agent application was repeated in 3 repetitions.



Figure 1. Experimental field with experimental rows covered with non-woven fabric.

The bioagents were applied at doses of 12.5 million IJs of EPN/plot/40 L of water, 1.72×10^{11} spores of EPF/plot/40 L of water, and 12.5 million IJs of EPN + 1.72×10^{11} EPF/plot/40 L. The nematode dose was derived from the recommended dose (5×10^6 IJs per 10 m²) and the dose of EPF corresponded to ca. 12% of the highest recommended dose for the commercial product *B. bassiana* BOTANIGARD 22 WP (5.37×10^{10} /m²).

The control plots were watered by 40 L of water/plot. After application, two rows along the entire field trial were randomly selected, and treated plots were separately covered with non-woven fabric to prevent the leakage and mixing of CPBs (Figure 1). After 14 days, all second-generation CPB adults were counted. The occurrence was compared between treated plots with different bioagents and their combination to the control experiments.

2.7. Statistical Analyses

All statistical analyses were performed in Statistica version program 10, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA. Main effect ANOVA was used to analyze the data for invasion (numbers of invaded nematodes) and mortality in Petri dish experiments and for numbers of emerging beetles in the field experiment. One-way ANOVA was used to compare the numbers of emerging adults after soil application in the pot experiment and for the mortality data after leaf application and to compare invasion and mortality between endemic and non-endemic

nematode strains. Tukey test was used to detect differences among individual treatments in the pot experiments. Prior to the analyses, count data (nematode invasion, numbers of emerging CPB adults) were square root transformed, and arcsin transformation was used for mortality data. In the text, the data are presented in the form of mean ± SEM.

3. Results

3.1. Field Sampling

The sampling in the potato fields resulted in the isolation of 21 steinernematid strains (Table 1), out of which 13 strains belonged to *S. feltiae*, 6 strains were identified as *S. affine*, and 2 strains belonged to *S. kraussei*. The nematodes were present both on the field margins and within the fields.

3.2. Petri Dish Infections

During the dissections, we could observe that part of the nematodes were dead and encapsulated by CPB hemocytes. Nematodes were present also in the living insects, where dead nematodes prevailed. The proportion of dead nematodes also differed among nematode strains and the development to first-generation adults was observed only in some strains (data not shown). Mortality in control dishes was negligible.

In the experimental infections, both the nematode invasion and pathogenicity were quite variable (Figures 2 and 3), with strains with negligible invasion and negligible mortality (*S. affine* A14, *S. kraussei* 1) to strongly invasive and pathogenic strains (e.g., *S. carpocapsae* MG604). However, some strains with moderate invasion caused only a very low mortality (e.g., *S. feltiae* Jakutsk). Overall, there was no difference in invasion between endemic and non-endemic nematodes ($F = 0.404, p = 0.527, df = 1$) but non-endemic nematodes caused significantly higher mortality of CPB ($F = 6.396, p = 0.013, df = 1$).

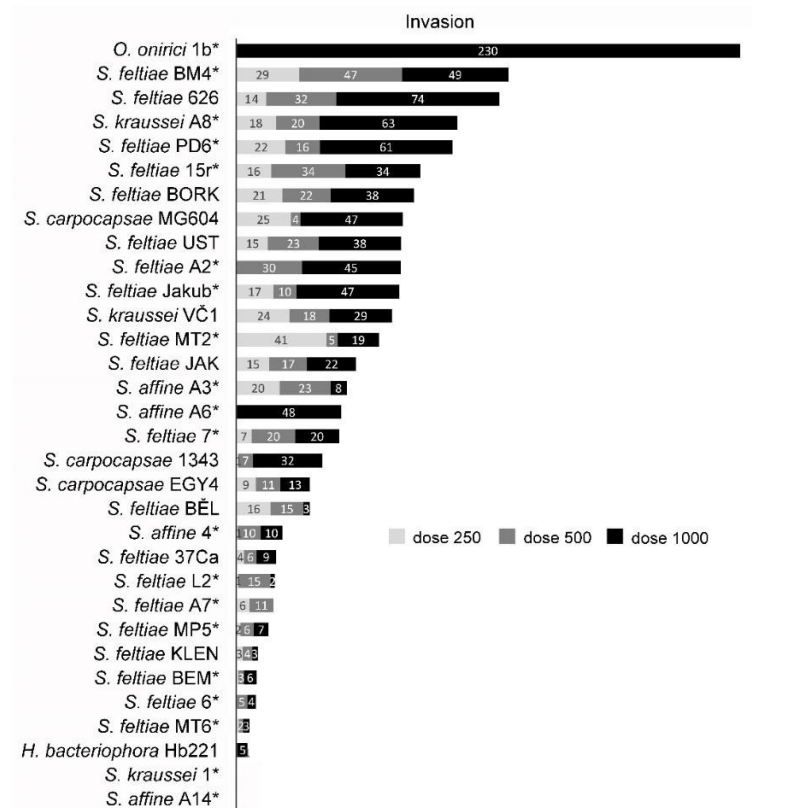


Figure 2. Mean numbers of nematodes of various EPN species and strains that invaded in adult Colorado potato beetles. The nematodes were applied at three doses of 250, 500, and 1000 IJs per host. Endemic strains isolated within this study are marked (*).

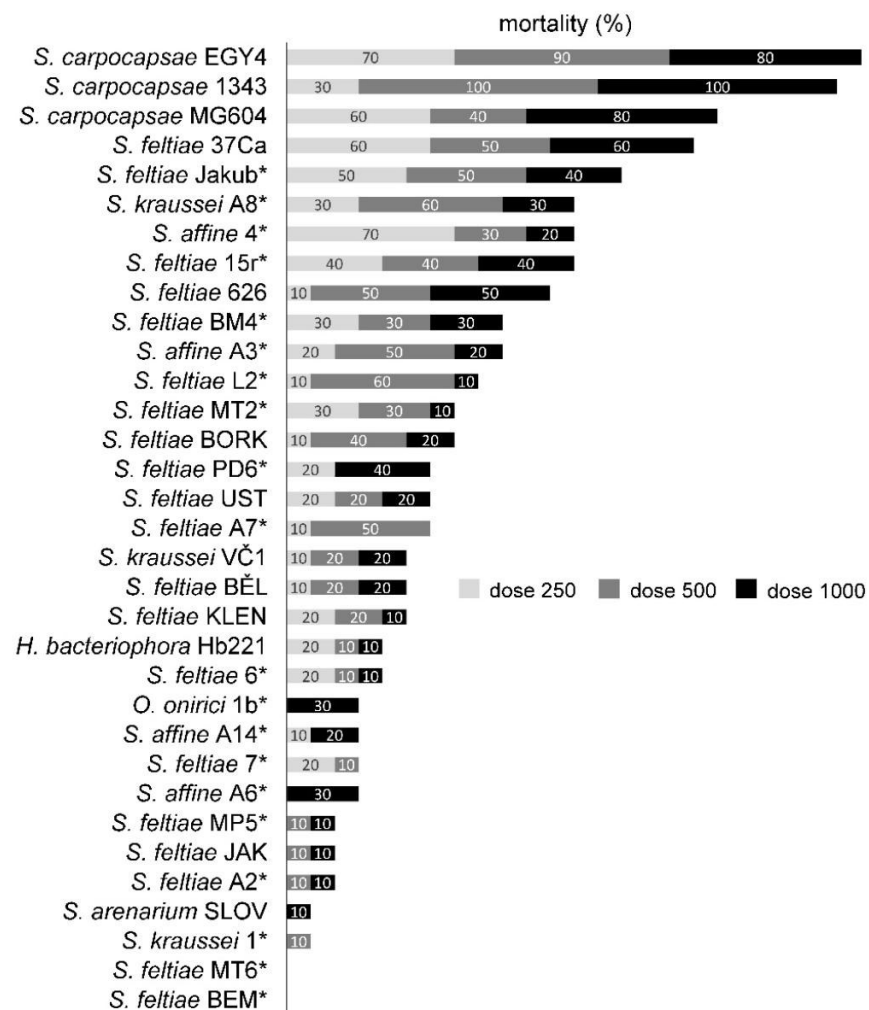


Figure 3. Percentage mortality of adult Colorado potato beetles caused by various EPN species and strains applied at three doses of 250, 500, and 1000 IJs per host. Endemic strains isolated within this study are marked (*).

In general, *S. carpocapsae* strains had consistently moderate to high invasion and caused the highest CPB mortality reaching 100% in higher doses of *S. carpocapsae* strain 1343. Performance of *S. feltiae* and *S. kraussei* strains was variable, and the highest mortality, reaching 50% in all doses, was observed in *S. feltiae* 37Ca and *S. feltiae* Jakub, with the latter showing a higher invasion. The invasiveness and pathogenicity of *S. affine* strains and the only heterorhabditid strain, *Heterorhabditis bacteriophora* Hb221, were lower. The facultatively parasitic nematode *Oscheius onirici* caused CPB mortality only at the highest dose, and its invasion was very high, but occurred only in the dead beetles.

Based on these results, two EPN strains, *S. carpocapsae* 1343 and *S. feltiae* Jakub, were selected for further experiments.

3.3. Pot Experiments

Soil application of both nematodes (*S. carpocapsae* 1343 and *S. feltiae* Jakub) and fungus resulted in a significant decrease in the number of emerging CPB adults in comparison to control (df = 3, 28, F = 31.9, $p < 0.001$). As visible in the graph (Figure 4a), both nematode strains and fungus caused significantly higher mortality than was observed in control ($p < 0.05$). *Beauveria bassiana* and *S. feltiae* Jakub have significantly ($p < 0.05$) higher mortality (more than 80%) than *S. carpocapsae* 1343 (less than 40%).

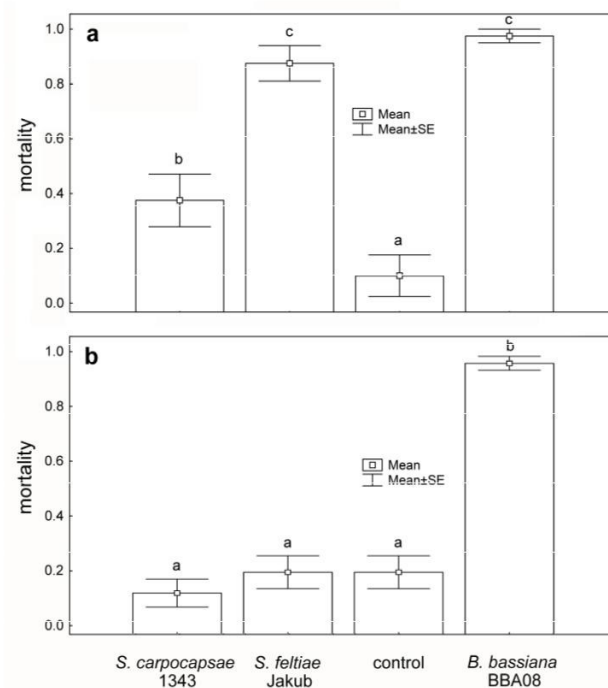


Figure 4. Mortality of pupating CPB in the soil (a) and adults on the potato leaves (b) after the application of entomopathogenic nematodes and fungus. Different letters above bars indicate statistically significant differences.

After the application of nematodes on the leaves against adults of *L. decemlineata*, the observed mortality was not significantly different from control and reached a maximum of around 20% or lower (Figure 4b). On the other hand, the leaf application of fungus (df = 3, 28, $F = 37.5$, $p < 0.001$) was very successful, reaching mortality higher than 90%.

3.4. Field Application

In the field experiment, statistical analyses revealed significant differences among treatments ($F = 3.15$, $p = 0.025$, df = 3), but only the application of fungus *B. bassiana* significantly decreased the number of emerging CPB adults in comparison to control sites, by ca. 30% ($p = 0.014$) with a mean number of CPB adults emerged per 1 potato plant of 25.9 ± 2.84 vs. 35.7 ± 3.43 in control plots. The number of emerging adults from the sites with the application of *S. feltiae* strain Jakub (29.6 ± 3.24) and its combination with fungus *B. bassiana* (29.6 ± 2.12) were around 20% lower in comparison to control (35.7 ± 3.43), though the difference was not statistically significant ($p = 0.014$).

4. Discussion

Endemic EPN strains can be more effective against target pests than exotic ones [29,30], and, therefore, we performed the sampling in the target localities. Interestingly, we recorded a massive presence and diversity of EPNs in Czech potato fields. Entomopathogenic nematodes are ubiquitous soil organisms; however, in general, their occurrence in the agroecosystems tends to be low [31]. In the light of this fact, our results are surprising, and it can be assumed that, in Czech fields, naturally occurring EPNs could contribute to the regulation of CPB populations.

The ubiquity of *S. feltiae* and to a lesser extent *S. affine* is not surprising, as the former species is the most common EPN in the Czech Republic and the latter is frequent in the agroecosystems [32]; on the other hand, the isolation of two strains of *S. kraussei* is surprising, as it represents the first finding of this species in arable areas of the Czech Republic [32]. The isolation of *Oscheius onirici* is the first finding of this nematode in the Czech Republic.

Our experimental infections with endemic and non-endemic strains did not support the superiority of endemic strains, but conversely, non-endemic EPN strains were generally more pathogenic. In accordance with our results, Berry et al. [33] observed exotic EPN strains being superior to endemic ones in CPB infections.

Overall, the experimental infections have shown considerable variability both in the invasion and pathogenicity of the nematodes tested. Inter and intraspecific differences in EPN infectivity towards different hosts are well known (e.g., [34]), and in this particular case, the differences could be related to host immune response. The Colorado potato beetle is known to possess an effective immunity response towards EPNs via encapsulation [35]. Accordingly, during dissections, we often observed dead IJs or even adults encapsulated by CPB hemocytes. Different insects have been shown to differ in their immune reaction towards different EPN species [36]; it can be hypothesized that the high effectivity of *S. carpocapsae* strains could be due to the lower immune response of the host. The high variability in the performance of nematode species and strains highlights the importance of thorough screening in the search for suitable biocontrol agents for CPB control.

With a majority of the tested strains killing only ca. 30% of CPB adults or less, even at the highest dose of 1000 IJs per beetle, the mortality is quite low in comparison with published data from infections of CPB prepupal stages [20,33], but CPB adults are known to be less susceptible than prepupal stages [16]. Trdan et al. [15] reported the lowest LC50 for adult CPB infections being 463 IJs/adult in *S. carpocapsae*, while in the present study, a mortality of well over 50% was achieved with *S. carpocapsae* strains even at the lowest dose of 250 IJs per one CPB adult.

Field applications of biocontrol agents tend to be less successful due to uncontrolled abiotic and biotic factors. The results of the field application of the nematodes, fungus, and their combination with only the fungus causing a significant decrease in comparison to untreated control are not surprising. The rate of infestation in the experimental field was very high, with more than 200 adult beetles emerging from under a canopy of a single plant, so possibly the standard doses of bioagents were too low to cause considerable effect. In comparison to similar studies, the 20% decrease of the CPB population in *S. feltiae*-treated sites in our study was lower than the 31% reduction of the late-season adults of the CPB treated with *S. carpocapsae* at a little higher dosage (7.6×10^5 per m^2 vs. 5×10^5 per m^2) [37]. Caged small plots with potatoes treated with *S. feltiae* and *H. heliothidis* (later synonymized with *H. bacteriophora*) decreased the emergence of CPB adults by 66–77% [38], but the dose of 90–150 IJs per cm^2 was two to three times higher than in the present study.

Interestingly, in our experiment, the combination of both bioagents had a worse result than fungus alone. Interactions between some bioagents can be antagonistic [39], and, similar to our result, Shapiro-Ilan et al. [40] observed that, when pairs of nematode and fungal pathogens attacked weevils of *Curculio caryae*, most pairings were less effective than a single highly effective entomopathogenic species. The negative effect of entomopathogenic fungi on EPNs has been described on several occasions. The development of *Steinernema feltiae* was negatively affected when the nematode was applied on Colorado potato beetle larvae 24 h or later after fungus *I. fumosorosea* [20]. A similar negative effect on nematode growth was observed in the interactions between the EPF *Metarhizium anisopliae* and EPNs *Steinernema glaseri* [22] and *H. bacteriophora* [41]. On the other hand, in our study, the combined application showed worse results in comparison to fungus alone, which would suggest a negative effect of the nematode on fungus performance. The secondary metabolites of the nematode bacterial symbionts of the genus *Xenorhabdus* produce many bioactive compounds, including fungistatic substances [42], and a negative effect of some of these metabolites on the growth of the fungus *B. bassiana* were observed [23]. Coinfections of CPB adults in the locality thus could reduce the reproduction of the fungus, leading to lower overall CPB mortality. Further research is needed to shed more light on the interactions of these particular biocontrol agents. Nevertheless, our present results do not allow us to recommend the combination of the nematodes and *B. bassiana* in the field.

Pupating summer generation CPB adults spend only several weeks in the soil, and thus the time that biocontrol agents have to localize and infect pupating insects is limited. Our further research will focus on overwintering CPB generation, where the nematodes and fungi can operate for a long period.

5. Conclusions

In conclusion, we demonstrate that, due to the high variability in nematode pathogenicity towards CPB adults, large-scale screening is necessary in order to select the effective nematode strains. The selected nematodes and fungus *B. bassiana* effectively decreased the emergence of second-generation CPB adults in pots, while the effect of the field application of both agents and their combination was low. Further research will focus on overwintering CPB generation.

Author Contributions: Conceptualization, V.P., J.N., J.K. and O.S.H.; methodology, V.P., J.N., J.K. and O.S.H.; software, V.P.; validation, V.P., J.K., J.N. and O.S.H.; formal analysis, V.P., J.K. and O.S.H.; investigation, V.P., J.N., J.K. and O.S.H.; resources, V.P. and J.K.; data curation, V.P.; writing—original draft preparation, V.P.; writing—review and editing, J.N., J.K., and O.S.H.; visualization, V.P.; supervision, V.P. and J.N.; project administration, O.S.H.; funding acquisition, O.S.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by National Agency for Agricultural Research (NAZV) Project No. QK1910270. Additional support was obtained from the Czech Academy of Sciences (RVO:60077344) and from the Operational Program Integrated Infrastructure (OPII) within the project sustainable smart farming systems taking into account the future challenges, Project No. (ITMS 313011W112), co-financed by the European Regional Development Fund.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to Daniela Hlávková and Radka Tanzer Fabiánová for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- James, C. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops, 2011*; ISAAA: Ithaca, NY, USA, 2011; Volume 44.
- Grafius, E. Economic Impact of Insecticide Resistance in the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on the Michigan Potato Industry. *J. Econ. Entomol.* **1997**, *90*, 1144–1151. [[CrossRef](#)]
- Cutler, G.C.; Tolman, J.H.; Scott-Dupree, C.D.; Harris, C.R. Resistance Potential of Colorado Potato Beetle (C4) to Novaluron. *J. Econ. Entomol.* **2005**, *98*, 1685–1693. [[CrossRef](#)]
- Alyokhin, A.; Baker, M.; Mota-Sanchez, D.; Dively, G.; Grafius, E. Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides. *Am. J. Potato Res.* **2008**, *85*, 395–413. [[CrossRef](#)]
- Poinar, G.O. *Nematodes for Biological Control of Insects*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018; ISBN 1-351-08340-6.
- Laumond, C.; Mauléon, H.; Kermarrec, A. Données Nouvelles Sur Le Spectre d'hôtes et Le Parasitisme Du Nématode Entomophage *Neoaplectana carpocapsae*. *Entomophaga* **1979**, *24*, 13–27. [[CrossRef](#)]
- Woodring, J.L.; Kaya, H.K. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. *South. Coop. Ser. Bull. (USA)* **1988**, *331*, 30.
- Bathon, H. Impact of Entomopathogenic Nematodes on Non-Target Hosts. *Biocontrol Sci. Technol.* **1996**, *6*, 421–434. [[CrossRef](#)]
- Ehlers, R.-U.; Hokkanen, H. Insect Biocontrol with Non-Endemic Entomopathogenic Nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.): Conclusions and Recommendations of a Combined OECD and COST Workshop on Scientific and Regulatory Policy Issues. *Biocontrol Sci. Technol.* **1996**, *6*, 295–302. [[CrossRef](#)]
- Pužá, V. Control of insect pests by entomopathogenic nematodes. In *Principles of Plant-Microbe Interactions*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; pp. 175–183.
- Inglis, D.M.; Goettel, M.S.; Butt, T.M.; Strasser, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In *Fungi as Biocontrol Agents: Progress Problems and Potential*; CABI: Wallingford, UK, 2001; p. 23.
- Jackson, M.A.; Dunlap, C.A.; Jaronski, S.T. Ecological Considerations in Producing and Formulating Fungal Entomopathogens for Use in Insect Biocontrol. *BioControl* **2010**, *55*, 129–145. [[CrossRef](#)]

13. de Faria, M.R.; Wraight, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A Comprehensive List with Worldwide Coverage and International Classification of Formulation Types. *Biol. Control* **2007**, *43*, 237–256. [[CrossRef](#)]
14. Cantelo, W.W.; Nickle, W.R. Susceptibility of Prepupae of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *J. Entomol. Sci.* **1992**, *27*, 37–43. [[CrossRef](#)]
15. Trdan, S.; Vidrih, M.; Andjus, L.; Laznik, Ž. Activity of Four Entomopathogenic Nematode Species against Different Developmental Stages of Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Helminthologia* **2009**, *46*, 14–20. [[CrossRef](#)]
16. Armer, C.A.; Berry, R.E.; Reed, G.L.; Jepsen, S.J. Colorado Potato Beetle Control by Application of the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis marelata* and Potato Plant Alkaloid Manipulation. *Entomol. Exp. Appl.* **2004**, *111*, 47–58. [[CrossRef](#)]
17. Čac̆ija, M.; Bažok, R.; Kolenc, M.; Bujas, T.; Drmic̆, Z.; Kadoic̆ Balaško, M. Field Efficacy of *Steinernema* sp. (Rhabditida: Steinernematidae) on the Colorado Potato Beetle Overwintering Generation. *Plants* **2021**, *10*, 1464. [[CrossRef](#)]
18. Guetsky, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y.; Dinooor, A. Combining Biocontrol Agents to Reduce the Variability of Biological Control. *Phytopathology* **2001**, *91*, 621–627. [[CrossRef](#)]
19. Otsuki, H.; Yano, S. Functionally Different Predators Break down Antipredator Defenses of Spider Mites. *Entomol. Exp. Appl.* **2014**, *151*, 27–33. [[CrossRef](#)]
20. Hussein, H.M.; Skoková Habuštová, O.; Puž̆a, V.; Zemek, R. Laboratory Evaluation of *Isaria fumosorosea* CCM8367 and *Steinernema feltiae* Ustinov against Immature Stages of the Colorado Potato Beetle. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152399. [[CrossRef](#)]
21. Özdemir, E.; İnak, E.; Evlice, E.; Yüksel, E.; Delialioğ̆lu, R.A.; Susurluk, I.A. Effects of Insecticides and Synergistic Chemicals on the Efficacy of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) against *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Crop Prot.* **2021**, *144*, 105605. [[CrossRef](#)]
22. Ansari, M.; Tirry, L.; Moens, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and Entomopathogenic Nematodes for the Control of *Hoplia philanthis*. *Biol. Control* **2004**, *31*, 172–180. [[CrossRef](#)]
23. Tarasco, E.; Santiago Alvarez, C.; Triggiani, O.; Quesada Moraga, E. Laboratory Studies on the Competition for Insect Haemocoel between *Beauveria bassiana* and *Steinernema ichnusae* Recovered in the Same Ecological Niche. *Biocontrol Sci. Technol.* **2011**, *21*, 693–704. [[CrossRef](#)]
24. Bedding, R.; Akhurst, R. A Simple Technique for the Detection of Insect Parasitic Rhabditid Nematodes in Soil. *Nematology* **1975**, *21*, 109–110. [[CrossRef](#)]
25. Kaya, H.K.; Stock, S.P. Techniques in insect nematology. In *Manual of Techniques in Insect Pathology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1997; pp. 281–324.
26. Stock, S.P.; Goodrich-Blair, H. Nematode Parasites, Pathogens and Associates of Insects and Invertebrates of Economic Importance. *Man. Tech. Invertebr. Pathol.* **2012**, *2*, 375–425.
27. Dunn, M.D.; Belur, P.D.; Malan, A.P. In Vitro Liquid Culture and Optimization of *Steinernema jeffreyense* Using Shake Flasks. *BioControl* **2020**, *65*, 223–233. [[CrossRef](#)]
28. Skalický, A.; Bohatá, A.; Šimková, J.; Osborne, L.S.; Landa, Z. Selection of Indigenous Isolates of Entomopathogenic Soil Fungus *Metarhizium Anisopliae* under Laboratory Conditions. *Folia Microbiol.* **2014**, *59*, 269–276. [[CrossRef](#)]
29. Mráč̆ek, Z.; Beč̆vár, S.; Kindlmann, P.; Webster, J. Infectivity and Specificity of Canadian and Czech Isolates of *Steinernema kraussei* (Steiner, 1923) to Some Insect Pests at Low Temperatures in the Laboratory. *Nematologica* **1998**, *44*, 437–448.
30. Matuska-Lyz̆wa, J. Ecological and Morphological Characteristics of *Steinernema kraussei* (Rhabditida: Steinernematidae): Comparison of Nematodes Isolated from the Natural Environments and Originated from the Commercial Pesticide. *Ecol. Quest.* **2014**, *19*, 51–55. [[CrossRef](#)]
31. Campos-Herrera, R.; Gomez-Ros, J.M.; Escuer, M.; Cuadra, L.; Barrios, L.; Gutiérrez, C. Diversity, Occurrence, and Life Characteristics of Natural Entomopathogenic Nematode Populations from La Rioja (Northern Spain) under Different Agricultural Management and Their Relationships with Soil Factors. *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 1474–1484. [[CrossRef](#)]
32. Puž̆a, V.; Nermuť, J. Entomopathogenic nematodes in the Czech Republic: Diversity, occurrence and habitat preferences. In *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; pp. 421–429.
33. Berry, R.; Liu, J.; Reed, G. Comparison of Endemic and Exotic Entomopathogenic Nematode Species for Control of Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* **1997**, *90*, 1528–1533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bedding, R.; Molyneux, A.; Akhurst, R. *Heterorhabditis* spp., *Neoaplectana* spp., and *Steinernema kraussei*: Interspecific and Intraspecific Differences in Infectivity for Insects. *Exp. Parasitol.* **1983**, *55*, 249–257. [[CrossRef](#)]
35. Thurston, G.S.; Yule, W.; Dunphy, G. Explanations for the Low Susceptibility of *Leptinotarsa decemlineata* to *Steinernema carpocapsae*. *Biol. Control* **1994**, *4*, 53–58. [[CrossRef](#)]
36. Li, X.-Y.; Cowles, R.; Cowles, E.; Gaugler, R.; Cox-Foster, D. Relationship between the Successful Infection by Entomopathogenic Nematodes and the Host Immune Response. *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37*, 365–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Stewart, J.G.; Boiteau, G.; Kimpinski, J. Management of Late-Season Adults of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) with Entomopathogenic Nematodes. *Can. Entomol.* **1998**, *130*, 509–514. [[CrossRef](#)]
38. Wright, R.J.; Agudelo-Silva, F.; Georgis, R. Soil Applications of Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes for Control of Colorado Potato Beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *J. Nematol.* **1987**, *19*, 201. [[PubMed](#)]

39. Hummadi, E.H.; Dearden, A.; Generalovic, T.; Clunie, B.; Harrott, A.; Cetin, Y.; Demirbek, M.; Khoja, S.; Eastwood, D.; Dudley, E. Volatile Organic Compounds of *Metarhizium brunneum* Influence the Efficacy of Entomopathogenic Nematodes in Insect Control. *Biol. Control* **2021**, *155*, 104527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Shapiro-Ilan, D.I.; Jackson, M.; Reilly, C.C.; Hotchkiss, M.W. Effects of Combining an Entomopathogenic Fungi or Bacterium with Entomopathogenic Nematodes on Mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biol. Control* **2004**, *30*, 119–126. [[CrossRef](#)]
41. Acevedo, J.P.M.; Samuels, R.I.; Machado, I.R.; Dolinski, C. Interactions between Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* and the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during Infection of the Sugar Cane Borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.* **2007**, *96*, 187–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Tobias, N.J.; Shi, Y.-M.; Bode, H.B. Refining the Natural Product Repertoire in Entomopathogenic Bacteria. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 833–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 259(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
A01N 25/02 (2006.01)
A01P 15/00 (2006.01)
C12R 1/79 (2006.01)

(19)
 ČESKÁ
 REPUBLIKA



ÚŘAD
 PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35411**
 (22) Přihlášeno: **27.09.2018**
 (47) Zapsáno: **29.10.2018**

- (73) Majitel:
 Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České
 Budějovice, České Budějovice 2, CZ
- (72) Původce:
 Ing. Rostislav Zemek, CSc., Staré Hodějovice, CZ
 Ing. Jiří Nermut, Ph.D., České Budějovice 2, CZ
 Ing. Jana Konopická, Veselí nad Lužnicí, Veselí
 nad Lužnicí I, CZ
 Ing. Andrea Bohatá, Ph.D., Plzeň, Skvrňany, CZ
- (74) Zástupce:
 PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Husova tř.
 1847/5, 370 01 České Budějovice, České
 Budějovice 3

- (54) Název užitného vzoru:
**Insekticidní a akaricidní aditivum do
 nosného substrátu pro pěstování rostlin**

CZ 32259 U1

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru
 splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

Insekticidní a akaricidní aditivum do nosného substrátu pro pěstování rostlin

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká insekticidního a akaricidního aditiva do půdního nosného substrátu.

Dosavadní stav techniky

10

Ochrana většiny kulturních plodin a ovocných a okrasných dřevin před živočišnými škůdci spočívá především v aplikaci pesticidů postřikem nadzemních částí rostlin. Životní cyklus řady hmyzích škůdců je však vázán na půdní prostředí, kde škodí na kořenech, jako jsou např. larvy smutnic, kovaříků či lalokonosců, nebo do půdy zalézají za účelem kuklení či přezimování, jako jsou např. třásněnky, mandelinka bramborová či makadlovka *Tuta absoluta*. Aplikace chemických insekticidů a akaricidů, tedy pesticidů určených k hubení hmyzu a roztočů, přímo do půdy není žádoucí z důvodů rizika kontaminace spodních vod a kumulace reziduí v půdě. Hmyzí škůdce vyskytující se v půdě však lze úspěšně potlačit pomocí jejich přirozených antagonistů, tj. entomopatogenních hub a entomopatogenních hlístic. Obě skupiny organismů se běžně vyskytují v přirozeném půdním prostředí, ne vždy jsou však dostatečně účinné, ať již z důvodu nízké patogenicity daného kmene, nebo nízké koncentraci infekčních částic v půdě. Většina komerčně vyráběných pěstebních substrátů tyto organismy běžně neobsahuje a nechrání tak pěstované rostliny před škůdci.

15

20

25

Technické řešení podle CZ 31982 popisuje pěstební substrát s insekticidními a akaricidními účinky obsahující entomopatogenní houbu z rodu *Isaria*. Nevýhodou uvedeného řešení je zejména skutečnost, že entomopatogenní houby nejsou dostatečně virulentní proti všem škůdcům vyskytujícím se v půdě a pěstebních substrátech, nepůsobí např. na zástupce řádu dvoukřídlí. Vysokou účinnost na larvy dvoukřídlého hmyzu i další hmyzí škůdce vykazují entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* a *Heterorhabditis*. Entomopatogenní hlístice jsou na trhu jako samostatné přípravky na ochranu rostlin určené pro aplikaci pomocí závlivky. Nevýhodou těchto přípravků je omezená doba jejich přežívání v půdách a substrátech bez vhodného hmyzího hostitele, a tudíž je nelze použít preventivně.

30

35

Úkolem technického řešení je proto vytvoření insekticidního a akaricidního aditiva do půdního nosného substrátu, které by odstraňovalo výše uvedené nedostatky, obohacovalo půdu, pěstební substrát či kompost o užitečné mikroorganismy a makroorganismy a zlepšovalo tak jejich biologickou aktivitu, redukovalo výskyt širokého spektra půdních škůdců a mělo pozitivní vliv na fyzikální vlastnosti půdy, jako je provzdušnění, a v konečném důsledku zlepšovalo výnosové parametry pěstovaných plodin a kvalitu produkce s minimálním dopadem na životní prostředí.

40

Podstata technického řešení

45

Vytčený úkol je vyřešen pomocí insekticidního a akaricidního aditiva do nosného půdního substrátu pro pěstování rostlin podle tohoto technického řešení. Podstata technického řešení spočívá v tom, že aditivum je tvořeno směsí alespoň jednoho kmene entomopatogenní houby rodu *Isaria* (synonymum *Paecilomyces*) v koncentraci v rozmezí 10^5 až 10^7 infekčních částic na 1 ml nosného substrátu a alespoň jednoho kmene entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* v rozmezí 10^2 až 10^4 infekčních částic na 1 ml nosného substrátu.

50

Infekční částice entomopatogenní houby jsou ve formě spor nebo ve formě fragmentů mycelia. Entomopatogenní hlístice je ve formě invazních larev. Ve výhodném provedení je kmen entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* (syn. *Paecilomyces fumosoroseus*) CCM 8367, kmen entomopatogenní hlístice je *Steinernema feltiae* NFUST a nosič je pěstební substrát, čistá

55

rašelina nebo písek. V dalším výhodném provedení jsou obě složky, tj. entomopatogenní houba a entomopatogenní hlístice odděleny a mísí se až před aplikací.

Výhody půdního insekticidního a akaricidního aditiva na bázi entomopatogenních hub a hlístic podle tohoto technického řešení spočívají zejména v tom, že obohacuje půdu nebo pěstební substrát o užitečné mikroorganismy a makroorganismy a využívá jejich synergického účinku. Kombinováním výše zmíněných dvou bioagens se dosahuje rozšíření účinnosti na více druhů hmyzích škůdců a škodlivých roztočů vyskytujících se v půdě. Výhodou entomopatogenní hlístice je její rychlé působení a schopnost najít škůdce i na vzdálenost několika centimetrů, přičemž během svého pohybu přispívají k lepšímu provzdušnění půdy a rozšíření spor druhého bioagens. Výhodou entomopatogenní houby je schopnost růst saprofyticky na organické hmotě, kolonizovat půdu či pěstební substrát a působit tak po delší období po aplikaci. Výše uvedené půdní insekticidní a akaricidní aditivum zlepšuje biologickou aktivitu půdy či substrátu a ve výsledku má pozitivní vliv na výnosové parametry pěstovaných plodin a kvalitu produkce s minimálním dopadem na životní prostředí.

Kmen českého původu CCM 8367 entomopatogenní houby *I. fumosorosea* je uložený ve Sbírce mikroorganismů v Brně jako patentová kultura. Insekticidní a akaricidní účinky tohoto kmene byly prokázány již dříve. Infektivní částice houby lze získat stacionární neboli povrchovou kultivací na pevném příp. tekutém médiu nebo submerzní kultivací.

Ve výhodném provedení je entomopatogenní houba kultivována ve fermentorech za použití vhodného tekutého média, např. na bázi glukózy, maltózy, škrobu a peptonu. Krátkodobě lze houbu skladovat v podobě zamrazených blastospor. Pro dlouhodobé uchování je vhodné použít konidiospory, které se nejprve lyofilizují a poté uloží v kapalném dusíku při -196 °C nebo v hlubokomrazícím boxu při -70 °C. K adjustaci do inertního nosného substrátu lze ve výhodném provedení použít techniku rozprašování suspenze infektivních částic entomopatogenní houby ve vhodném mísícím zařízení.

Kmen hlístice *Steinernema feltiae* NFUST pocházející z Izhevsk z Ruska, je uložen ve sbírce entomopatogenních hlístic Biologického centra AV ČR, v.v.i. v Českých Budějovicích. Druhá identita byla potvrzena morfologicky i sekvenováním ITS oblasti rDNA (Genbank přístupové číslo: KT809344). Invazní larvy entomopatogenní hlístice lze získat chovem hlístic na hmyzím hostiteli, kterým je poslední larvální instar housenky zavíječe voskového, *Galleria mellonella*, nebo průmyslově *in-vitro* kultivací ve fermentorech. Množení hlístic se provádí nákazou housenek zavíječe voskového na vlhkém filtračním papíru v Petriho misce v dávce cca 50 až 100 invazních larev na jednu housenku zavíječe. Po uhnutí housenek jsou tyto přemístěny na vodní pasti (White Trap), přibližně za 7 dní se z mrtvých hostitelů začnou uvolňovat nové invazní larvy, které zůstávají uvězněny v nízkém vodním sloupci, odkud jsou tyto slévány a čištěny opakovanou sedimentací ve vodě. Vyčištěné invazní larvy je pak možné použít pro přímou aplikaci nebo skladování. Celý proces množení se odehrává při pokojové teplotě cca 21 °C. Dlouhodobě lze entomopatogenní hlístice skladovat ve stádiu invazních larev při teplotě kolem 5 až 6 °C v nízkém vodním sloupci, vlhkém písku či vermikulitu nebo v molitanové drti.

45 Objasnění výkresů

Uvedené technické řešení bude blíže objasněno na následujících vyobrazeních, kde:

50 obr. 1 znázorňuje graf závislosti mortality škůdců na typu ošetření,

obr. 2 znázorňuje graf závislosti perzistence *Steinernema feltiae* na podmínkách a době skladování,

55 obr. 3 znázorňuje graf vlivu ošetření na líhnutí škůdců z pěstebního substrátu.

Příklad uskutečnění technického řešení

5 Příklad 1

Suspenze infekčních částic entomopatogenní houby *I. fumosorosea* CCM 8367 byla připravena z blastospor, které byly získány submerzní kultivací. Do 95 ml sterilního tekutého kultivačního média na bázi PDB v 250 ml Erlenmeyerově baňce bylo naočkováno 5 ml houbové suspenze. Inkubace probíhala na orbitální třepačce při rychlosti 200 otáček za minutu a teplotě 25 °C po dobu čtyř dnů. Po inkubaci byla konečná suspenze filtrována přes sterilní gázu, aby se oddělilo mycelium a shluky spor. Koncentrace blastospor v suspenzi byla počítána pomocí Neubauerovy komůrky a následně byla upravena na požadovanou koncentraci. Do suspenze bylo přidáno smáčecí činidlo Tween 80® v koncentraci 0,02 % (v/v). Test klíčivosti prokázal 100% klíčivost blastospor. Invazní larvy *S. feltiae* NFUST byly získány z infikovaných housenek zavíječe voskového pomocí tzv. vodních pastí. Koncentrace invazních larev ve vodní suspenzi byla ustavena na 2 000 invazních larev na 1 ml vody.

Připravenými suspenzemi obou bioagens byl ošetřen komerční pěstební substrát na bázi rašeliny nasycený do plastových kelímků v množství 180 ml substrátu na kelímek. Byla použita dávka 10^8 blastospor houby a 1 000 invazních larev hlístic na jeden kelímek. Paralelně byly založeny varianty, ve kterých byl substrát ošetřen pouze *I. fumosorosea*, *S. feltiae* nebo sterilní vodou se smáčedlem představující kontrolu. Do každého kelímku byla následně umístěna jedna larva posledního instaru mandelinky bramborové, *Leptinotarsa decemlineata*. Kelímky byly zakryty folií a umístěny do inkubátoru s konstantní teplotou 25 °C a následně denně kontrolovány pro stanovení počtu vylíhlých dospělců. Současná aplikace obou bioagens se ukázala jako nejúčinnější, jak je patrné z následující tabulky a obrázku 1. Po ukončení pokusu bylo z 50 larev v substrátu nalezeno 11 mumifikovaných s mykózou *I. fumosorosea*, 28 jedinců bylo rozloženo v důsledku parazitace *S. feltiae* a 3 jedinci byli mrtví bez symptomů mykózy či parazitace. Na obr. 1 je tedy znázorněno porovnání účinnosti ošetření nosného substrátu entomopatogenní houbou *I. fumosorosea* CCM 8367 v kombinaci s parazitickou hlísticí *S. feltiae* NFUST oproti variantě ošetřené pouze jedním bioagens či oproti kontrole, v níž byla aplikována pouze voda se smáčedlem Tween 80®. Chybové úsečky u sloupců znázorňují 95 % konfidenční limity.

Ošetření	Počet larev	Počet vylíhlých imág
kontrola	120	112
<i>Isaria fumosorosea</i>	80	45
<i>Steinernema feltiae</i>	40	22
<i>Isaria fumosorosea</i> + <i>Steinernema feltiae</i>	50	8

35

Příklad 2

Suspenze entomopatogenní houby a entomopatogenní hlístice podle příkladu 1 byly formulovány do inertních nosičů, kterým byla v případě *I. fumosorosea* rašelina a v případě *S. feltiae* písek frakce 0,8 mm. Dávkování bylo zvoleno tak, aby koncentrace houby byla 2×10^6 blastospor na 1 ml rašeliny a koncentrace hlístic byla 1 500 invazních larev na 1 ml suchého písku. Invazní larvy hlístic byly do písku přidány v objemu 1 ml vody a následně byl písek ještě zvlhčen dalšími 9 ml vody (celkem tedy 10 ml vody, 67 ml písku a 100 000 invazních larev hlístic). Takto připravené formulace obou bioagens tvoří dvě složky insekticidního a akaricidního aditiva do nosného substrátu pro pěstování rostlin. Bylo vyrobeno několik dávek, které byly samostatně zabaleny do uzavíratelných polyethylenových (PE) sáčků a umístěny do termostatu.

50 Ihned po aplikaci *I. fumosorosea* do rašeliny a poté po měsíci skladování v PE sáčcích o rozměrech 15×20 cm při 9 °C byly z každého sáčku odebrány tři vzorky o objemu 25 ml, tyto byly eluovány ve 100 ml sterilní vody s přidávkem smáčedla Tween 80® v 250 ml

Erlenmayerově baňce. Vzorke byly umístěny na orbitální třepačce po dobu 20 minut, 200 otáček za minutu a teplotě 25 °C. Jeden mililitr výluhu byl potom zředěn v 9 ml sterilní vody se smáčedlem Tween 80®, 0,5 ml suspenze bylo přeneseno pipetou a rovnoměrně rozetřeno po povrchu selektivního růstového média s látkou Dodine. Petriho misky byly následně inkubovány po dobu jednoho týdne při 25 °C. Po tomto období byl stanoven počet kolonií *I. fumosorosea* na misce. Následující tabulka ukazuje, že koncentrace infekčních částic (CFU) v rašelině ($\bar{x} = 1,98 \times 10^6/1 \text{ ml}$) odpovídala vypočtené koncentraci blastospor entomopatogenní houby při výrobě insekticidního a akaricidního aditiva. Z tabulky je dále patrné, že během skladování po dobu jednoho měsíce došlo k mírnému navýšení CFU ($\bar{x} = 2,52 \times 10^6/1 \text{ ml}$).

Čas od výroby	Průměrná koncentrace infekčních částic <i>Isaria fumosorosea</i> v 1 ml rašeliny				
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
0	$2,11 \times 10^6$	$1,91 \times 10^6$	$2,01 \times 10^6$	$1,91 \times 10^6$	$1,97 \times 10^6$
1 měsíc	$2,57 \times 10^6$	$2,48 \times 10^6$	$2,58 \times 10^6$	$2,05 \times 10^6$	$2,49 \times 10^6$

Písek s invazními larvami *S. feltiae* byl skladován při teplotách 5, 16 a 20 °C v uzavřených sáčcích (7×10 cm) a při stejných teplotách ve ventilovaných sáčcích (do stěny sáčku byly propíchnuty dva malé otvory pro volný přístup vzduchu) stejné velikosti. V intervalu 7 dní byl odebrán z každé teploty 1 sáček uzavřený a jeden ventilovaný a pomocí Baermannových nálevek byly invazní larvy extrahovány, aby mohl být stanoven jejich počet ve výluhu. Na sítko Baermanovy nálevky byla z prostorových důvodů umístěna vždy 1/10 důkladně promíchaného objemu sáčku. Počet entomopatogenních hlístic byl stanoven počítáním jedinců pod binokulární lupou. Tito jedinci byli zároveň mechanicky podrážděni, abychom ověřili, že se jedná o živé aktivní jedince. Z obrázku 2 je patrné, že entomopatogenní hlístice v daném nosném substrátu přežívají ve všech teplotách po dobu nejméně 5 týdnů, ačkoliv dochází k mírnému poklesu jejich koncentrace v závislosti na čase a teplotě skladování. Nižší počty jedinců, než by odpovídalo 1/10 objemu přípravku (tj. 10 000 larev) jsou pravděpodobně způsobeny (zvláště v prvních týdnech) přirozenými vlastnostmi entomopatogenních hlístic, jejichž cca 1/3 invazních larev zůstává neaktivní a nemůže tak být Baermanovou nálevkou zachycena. Tyto larvy jsou nicméně živé a v přítomnosti hostitelů schopné infekce. Z obrázku vyplývá, že tuto složku insekticidního a akaricidního aditiva je nejvhodnější skladovat v uzavřeném obalu při teplotě 5 nebo 16 °C, kde přežívá po 5 týdnech největší počet jedinců. Tyto výsledky zároveň jasně naznačují schopnost hlístic přetrvat za daných podmínek po dobu delší než testovanou.

Příklad 3

Insekticidní a akaricidní aditivum na bázi entomopatogenní houby *I. fumosorosea* a entomopatogenní hlístice *S. feltiae* podle příkladu 2 bylo aplikováno do směsi dvou komerčně dostupných pěstebních substrátů: bio substrátu s guanem bez rašeliny a substrátu pro rajčata, papriky a okurky, které byly smíchány v poměru 1:1. Oba substráty byly již zamořeny larvami smutnic. Touto směsí substrátů byly do 2/3 naplněny plastové kelímky o objemu 200 ml. Poté bylo u ošetřené varianty přidáno insekticidní a akaricidní aditivum v dávce 10 ml rašeliny inokulované entomopatogenní houbou a 3 g vlhkého písku s *S. feltiae* na jeden kelímek. Insekticidní a akaricidní aditivum bylo lehce zapraveno do nosného substrátu a zavlaženo 10 ml vody. Kontrolní varianta byla pouze zavlažena 10 ml vody.

Kelímky byly poté uzavřeny průhledným plastovým víčkem, jehož spodní strana byla natřena lepem na hmyz a kelímky byly umístěny do klimatizovaného boxu s teplotou 21 °C a fotoperiodou 16L:8D. Po třech, pěti a devíti týdnech od založení pokusu byli spočítáni vylíhlí dospělci smutnic. Z obrázku 3 je patrné, že ošetření pěstebního substrátu aditivem má dlouhodobý účinek. Zatímco v neošetřené kontrole se v průměru vylíhlo celkem 8,55 smutnic na jeden kelímek, v ošetřené variantě jich bylo pouze 2,00. V průběhu pokusu tak došlo k redukci

škůdce o 77 %.

Průmyslová využitelnost

5

Insekticidní a akaricidní aditivum do nosného substrátu pro pěstování rostlin podle tohoto technického řešení lze použít zejména při pěstování pokojových i venkovních květin a bylin pěstovaných v květináčích, truhlících či na záhonech, k ochraně skleníkových kultur, zejména zeleniny a ovocných a okrasných keřů a stromů a dalších plodin. Je určeno pro aplikaci do půdy, k obohacení pěstebních substrátů a kompostů a k moření osiva a sadby. Uplatnění najde zejména u drobných pěstitelů a v ekologickém a bio-dynamickém zemědělství.

10

NÁROKY NA OCHRANU

15

1. Insekticidní a akaricidní aditivum do nosného substrátu pro pěstování rostlin na bázi půdy, pěstebního substrátu nebo kompostu, **vyznačující se tím**, že je tvořeno směsí alespoň jednoho kmene entomopatogenní houby rodu *Isaria* v koncentraci v rozmezí 10^5 až 10^7 infekčních částic na 1 ml nosného substrátu a alespoň jednoho kmene entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* v rozmezí 10^2 až 10^4 infekčních částic na 1 ml nosného substrátu.

20

2. Insekticidní a akaricidní aditivum podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kmen entomopatogenní houby je *Isaria fumosorosea* CCM 8367.

25

3. Insekticidní a akaricidní aditivum podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kmen entomopatogenní hlístice je *Steinernema feltiae* NFUST.

4. Insekticidní a akaricidní aditivum podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že infekční částice kmene entomopatogenní houby jsou ve formě spor.

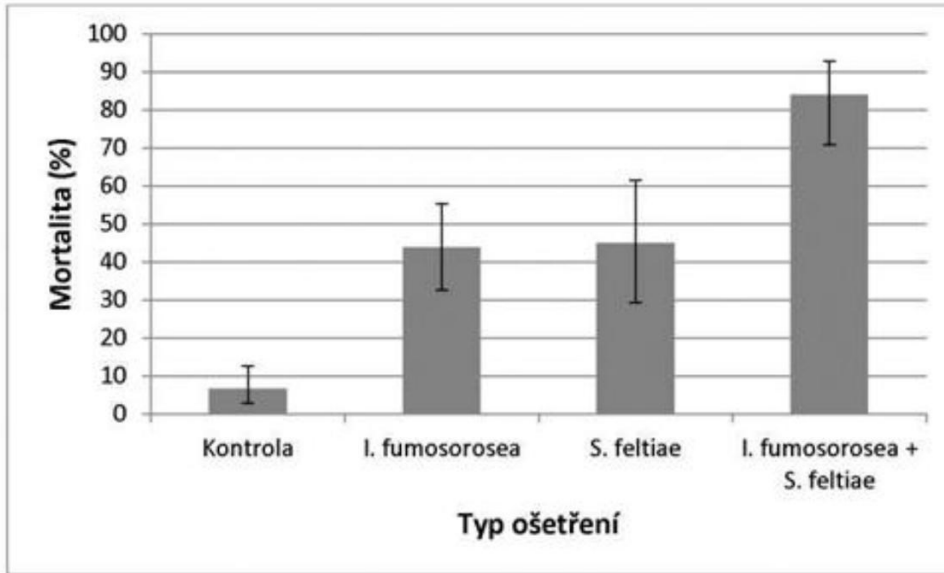
30

5. Insekticidní a akaricidní aditivum podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že infekční částice kmene entomopatogenní houby jsou ve formě fragmentů mycelia.

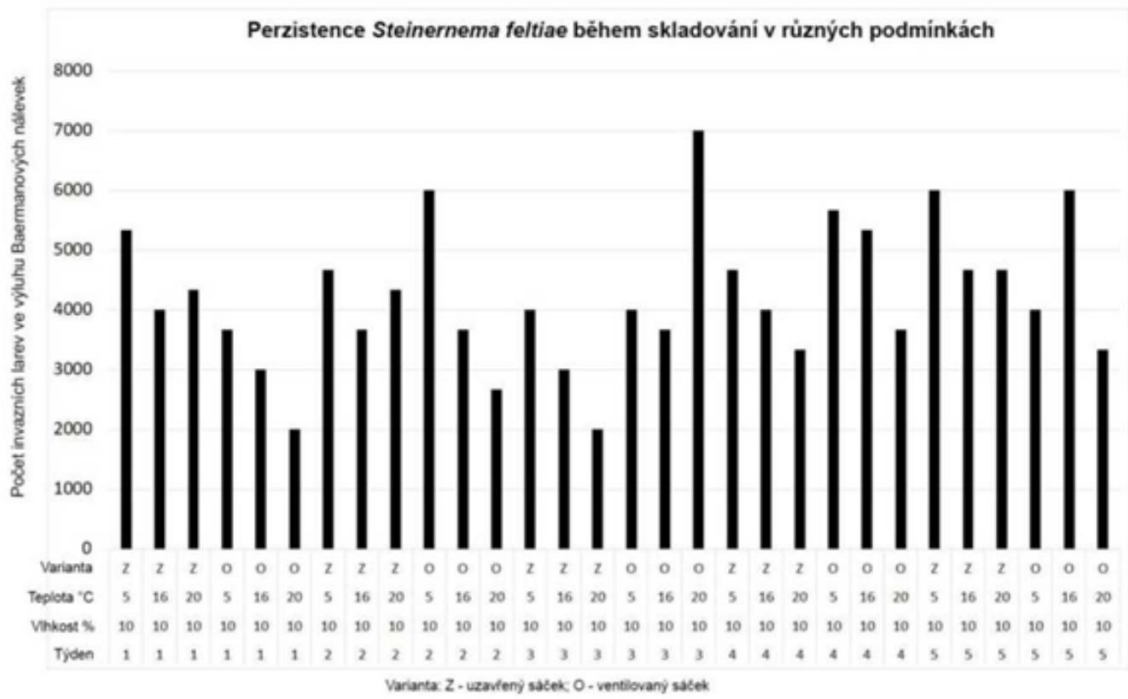
6. Insekticidní a akaricidní aditivum podle nároku 1 nebo 3, **vyznačující se tím**, že infekční částice kmene entomopatogenní hlístice jsou ve stádiu invazních larev.

35

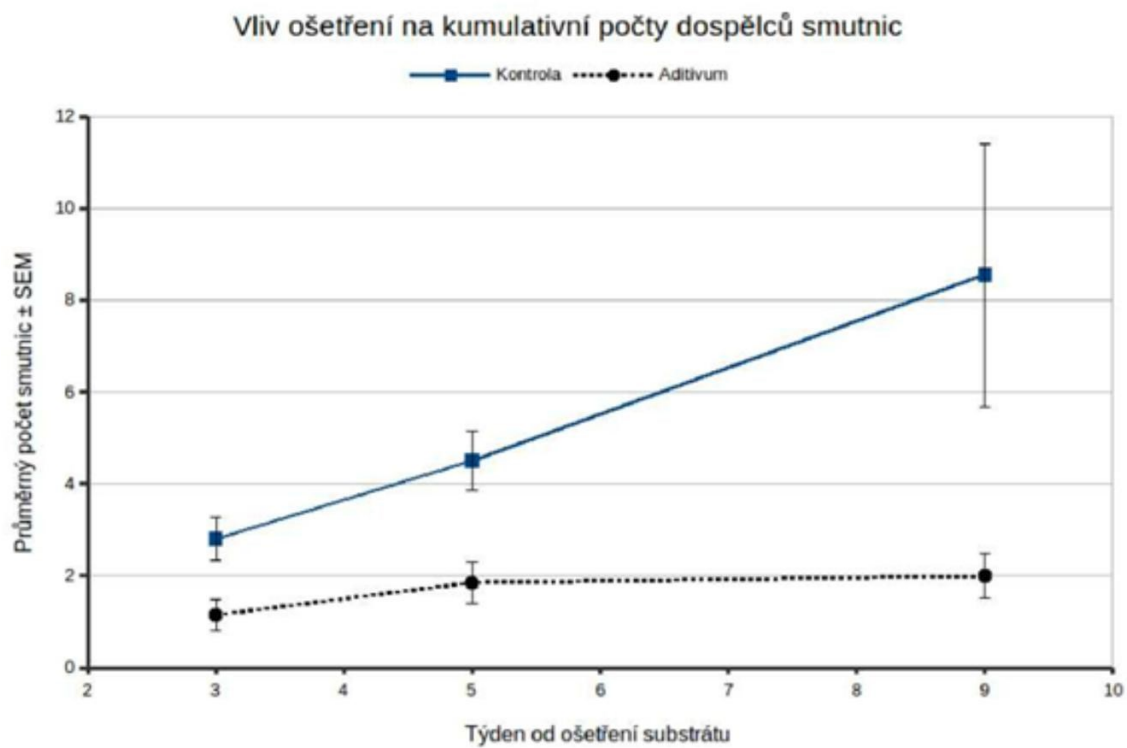
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

31 982

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A01N 63/04 (2006.01)*A01N 25/08* (2006.01)*A01P 15/00* (2006.01)(19)
ČESKÁ
REPUBLIKAÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-35195**
 (22) Přihlášeno: **23.07.2018**
 (47) Zapsáno: **14.08.2018**

- (73) Majitel:
Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České
Budějovice, České Budějovice 2, CZ
- (72) Původce:
Ing. Rostislav Zemek, CSc., Staré Hodějovice, CZ
Ing. Jana Konopická, Veselí nad Lužnicí, Veselí
nad Lužnicí I, CZ
Ing. Andrea Bohatá, Ph.D., Plzeň, Skvrňany, CZ
- (74) Zástupce:
PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Husova tř.
1847/5, 370 01 České Budějovice, České
Budějovice 3

- (54) Název užitého vzoru:
**Pěstební substrát s insekticidními a
akaricidními vlastnostmi**

CZ 31982 U1

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitého vzoru
splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

Pěstební substrát s insekticidními a akaricidními vlastnostmi

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká pěstebního substrátu s insekticidními a akaricidními vlastnostmi.

Dosavadní stav techniky

10

Produkce pěstebních substrátů v Evropě představuje odvětví s obratem ve výši 1,3 miliardy eur. Obecně se požadavky na vlastnosti pěstebních substrátů liší, nicméně lze říci, že jsou vyžadovány tyto vlastnosti, jako je ukotvení rostliny, tedy musí být schopen udržet rostlinu, dobře zabezpečit výživu rostliny, dobrá propustnost a nasákavost vodou, vhodné pH požadované druhem rostliny a pěstební substrát by neměl obsahovat toxické látky a škůdce.

15

Pěstební substráty jsou většinou založeny na organických složkách, které zahrnují rašelinu, kokosové vlákno, dřevěné vlákno, kůru či kompost. Kompost je organický prostředek pro zlepšení pěstebních substrátů obsahující stabilizované organické látky a rostlinné živiny získané řízeným biologickým rozkladem směsi sestávající zejména z rostlinných zbytků a mající deklarované kvalitativní znaky. Rašelina je nahromaděný, částečně rozložený rostlinný materiál, který obsahuje převážně organické látky a organické kyseliny. Pro dodání přijatelných živin při přípravě čistých rašelinových pěstebních substrátů se používají minerální živiny ve formě hnojiv obsahujících dusík, fosfor a draslík. Rašelina navíc představuje dominantní pěstební médium používané v Evropě. Důvody použití samotné rašeliny nebo jejího použití jako hlavní součást pěstebních médií lze nalézt v její dostupnosti v severní Evropě, relativně nízkých nákladech, vynikajících chemických, biologických a fyzikálních vlastnostech a nízké hmotnosti.

20

25

30

Kultivované rostliny jsou často napadány hmyzími škůdci, přičemž více než 90 % těchto škůdců tráví část svého životního cyklu v půdě, tedy v pěstebním substrátu. Substrát, ve kterém se rostliny pěstují, proto hraje důležitou roli při jejich ochraně vůči hmyzím škůdcům. V běžném půdním prostředí se vyskytují entomopatogenní houby zajišťující přirozenou regulaci škůdců. Entomopatogenní houby mohou napadat a parazitovat na všech vývojových stádiích hmyzu, nejčastěji se však vyskytují na larvách a kuklách, méně často jsou houbami infikováni dospělci a vajíčka hmyzu. Komerčně vyráběné pěstební substráty tyto houby běžně neobsahují a nemají tak insekticidní vlastnosti tedy nejsou určeny k hubení hmyzu v jeho různých vývojových stupních ani akaricidní vlastnosti tedy nejsou určeny k hubení roztočů. Ochranu rostlin je pak nutné zajišťovat dodatečně pomocí chemických insekticidů, které jsou však problematické kvůli vývoji rezistence škůdců a kvůli reziduím v životním prostředí s negativním vlivem na necílové organismy, zdraví lidí a zvířat a jejichž následné odstraňování je finančně i časově náročné.

35

40

Úkolem technického řešení je proto vytvoření pěstebního substrátu s insekticidními a akaricidními vlastnostmi, který by odstraňoval výše uvedené nedostatky, který by snižoval škody na rostlinách způsobené hmyzími škůdci a roztoči, dále zlepšoval vitalitu rostlin a jehož použití by vedlo ke snížení spotřeby chemických pesticidů a zvýšení kvality produkce rostlin s minimálním dopadem na životní prostředí.

45

Podstata technického řešení

50

Vytčený úkol je vyřešen pomocí pěstebního substrátu s insekticidními a akaricidními vlastnostmi podle tohoto technického řešení. Pěstební substrát obsahuje směs rašeliny, jílu a minerálních látek. Podstata technického řešení spočívá v tom, že dále obsahuje alespoň jeden kmen entomopatogenní houby z rodu *Isaria* (synonymum *Paecilomyces*) v koncentraci v rozmezí 10^2 až 10^7 infekčních částic na 1 ml pěstebního substrátu.

55

Ve výhodném provedení je kmen entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* (synonymum *Paecilomyces fumosoroseus*) CCM 8367.

- 5 Infektivní částice entomopatogenní houby jsou ve formě spor nebo ve formě fragmentů mycelia.

Výhody pěstebního substrátu s insekticidními a akaricidními vlastnostmi podle tohoto technického řešení spočívají zejména v tom, že snižuje škody na rostlinách způsobené hmyzími škůdci a roztoči, zlepšuje vitalitu rostlin a jeho použití vede ke snížení spotřeby chemických pesticidů a zvýšení kvality produkce rostlin s minimálním dopadem na životní prostředí.

Kmen českého původu CCM 8367 entomopatogenní houby *I. fumosorosea* je uložen ve Sbírce mikroorganismů v Brně jako patentová kultura. Insekticidní a akaricidní účinky tohoto kmene byly prokázány již dříve. Infektivní částice houby lze získat stacionární neboli povrchovou kultivací na pevném případně tekutém médiu nebo submerzní kultivací. Ve výhodném provedení je houba kultivována ve fermentorech za použití vhodného tekutého média, např. na bázi glukózy, maltózy, škrobu a peptonu. Aplikaci do substrátu lze ve výhodném provedení zajistit rozprašováním suspenze infektivních částic houby do substrátu ve vhodném mísicím zařízení.

20

Objasnění výkresů

Uvedené technické řešení bude blíže objasněno na následujících vyobrazeních, kde:

- 25 obr. 1 znázorňuje graf závislosti úmrtnosti škůdců na koncentraci infektivních částic entomopatogenní houby v substrátu,

obr. 2 znázorňuje graf vlivu koncentrace infektivních částic na procento infikovaných dospělců vylíhlých z houbou-inokulovaného pěstebního substrátu.

30

Příklad uskutečnění technického řešení

Příklad 1

35

Pěstební substrát byl připraven na bázi vytríděné světlé a tmavé rašeliny s přidavkem mletého jílu, obohacený hnojivem se základními živinami a inokulovaný entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* kmene CCM 8367. Suspenze infektivních částic houby použitá pro inokulaci substrátu byla připravena z blastospor, které byly získány submerzní kultivací. Do 95 ml sterilního tekutého kultivačního média na bázi PDB (Sigma-Aldrich, Německo) v 250 ml Erlenmeyerově baňce bylo naočkováno 5 ml houbové suspenze. Inkubace probíhala na orbitální třepačce při rychlosti 200 otáček za minutu a teplotě 25 °C po dobu čtyř dnů. Po inkubaci byla konečná suspenze filtrována přes sterilní gázu, aby se oddělilo mycelium a shluky spor. Koncentrace blastospor v suspenzi byla počítána pomocí Neubauerovy komůrky a následně byla upravena na koncentraci 1×10^7 spor/ml. Do suspenze bylo přidáno smáčecí činidlo Tween 80® (Sigma-Aldrich, Německo) v koncentraci 0,05% (v/v). Test klíčivosti prokázal 100% klíčivost blastospor.

45

Homogenita inokulace v substrátu byla zajištěna rozprašováním suspenze blastospor pomocí airbrush pistole za použití tlaku 0,5 baru do pěstebního substrátu promíchávaného v horizontálně umístěné skleněné míchací nádobě o objemu 3 l otáčející se rychlostí 18 ot./min, přičemž byla aplikována dávka 5 ml inokula na 0,5 l substrátu. Výsledný pěstební substrát měl tyto vlastnosti: pH 6,5 až 7, vlhkost 60 až 70 %, obsah spalitelných látek v sušině 70 %, obsah infektivních částic 1×10^5 na 1 ml substrátu.

55

Příklad 2

Pěstební substrát podle příkladu 1 připravený s počáteční koncentrací 4×10^4 blastospor/ml pěstební substrátu o objemu 0,5 l byl uložen do uzavíratelných PE sáčků o rozměrech 15×20 cm a umístěn do inkubátorů s konstantní teplotou. V měsíčních intervalech byly ze sáčků odebrány vzorky substrátu o objemu 25 ml, tento byl eluován 100 ml sterilní vody s přidavkem smáčedla Tween 80® v 250 ml Erlenmayerově baňce. Vzorky byly umístěny na orbitální třepače po dobu 20 minut, 200 otáček za minutu a teplotě 25 °C. Jeden mililitr eluátu byl potom zředěn v 9 ml sterilní vody se smáčedlem Tween 80®, 0,5 ml suspenze bylo přeneseno pipetou a rovnoměrně rozetřeno po povrchu selektivního růstového média s látkou Dodine. Petriho misky byly následně inkubovány po dobu jednoho týdne při 25 °C. Po tomto období byl stanoven počet kolonií *I. fumosorosea* na misce. Výsledky ukázaly, že houbou obohacený pěstební substrát lze skladovat při teplotách 15 až 25 °C po dobu několika měsíců při zachování životaschopnosti entomopatogenní houby v pěstebním substrátu, jak je patrné z tabulky znázorňující koncentraci infekčních částic v 1 ml substrátu v čase.

Teplota skladování	Doba skladování v měsících						
	2	3	4	5	6	7	8
15 °C	$4,27 \times 10^4$	$5,57 \times 10^4$	$5,71 \times 10^4$	$6,19 \times 10^4$	$4,11 \times 10^4$	$4,08 \times 10^4$	$3,09 \times 10^4$
20 °C	$3,44 \times 10^4$	$5,95 \times 10^4$	$5,36 \times 10^4$	$3,31 \times 10^4$	$1,87 \times 10^4$	$1,71 \times 10^4$	$2,27 \times 10^4$
25 °C	$4,00 \times 10^4$	$2,93 \times 10^4$	$2,59 \times 10^4$	$2,08 \times 10^4$	$8,80 \times 10^3$	$6,93 \times 10^3$	$3,73 \times 10^3$

Příklad 3

Pěstební substrát podle příkladu 1 připravený s počáteční koncentrací 7×10^3 až 7×10^6 blastospor/ml substrátu byl rozmístěn do plastových kelímků v množství 180 ml/kelímek. Do každého kelímku byla umístěna jedna larva posledního instaru mandelinky bramborové. Kelímky byly zakryty parafilmem a umístěny do inkubátoru s konstantní teplotou 25 °C a následně denně kontrolovány pro stanovení počtu vylíhlých dospělců. Výsledky ukázaly, že účinnost vyjádřená procentem škůdců uhynulých v substrátu vzrůstá s rostoucí koncentrací infekčních částic, jak je patrné z obrázku 1. Vylíhlí dospělí brouci mandelinky bramborové byly následně umístěny do Petriho misek s 2% agarem, pro zjištění přítomnosti infekce u dospělců. Na rozdíl od houbou neošetřeného substrátu (kontrola) dosahovalo procento infekce až 78 %, jak je patrné z obrázku 2.

Příklad 4

Pěstební substrát podle příkladu 1 připravený s počáteční koncentrací 1×10^5 blastospor/ml substrátu byl rozmístěn do 20 plastových květináčů o objemu 100 ml. Současně byla také připravena kontrola, tedy 20 květináčů substrátu bez entomopatogenní houby. Do substrátu bylo vyseto osivo okurky seté salátové a růst škůdců-prostých rostlin byl sledován ve fytotronu. Po dvou měsících byla vyhodnocena hmotnost sušiny kořenu a nadzemní části vyrostlých rostlin. Výsledky neukázaly statisticky významné rozdíly mezi biomasou rostlin pěstovaných v houbou obohaceném substrátu (průměr \pm SE: $1,97 \pm 0,36$ g) a kontrolním substrátu (průměr \pm SE: $2,10 \pm 0,29$ g) a potvrdily tak, že pěstební substrát nemá negativní vliv na rostliny v podmínkách bez výskytu škůdců. Současně byly náhodně odebrány vzorky substrátu, v nichž byla stanovena koncentrace infekčních částic postupem podle příkladu 2. V kontrole nebyla přítomnost houby *I. fumosorosea* prokázána, zatímco v obohaceném substrátu byla koncentrace v rozmezí $6,32E+03$ až $7,36E+03$ blastospor/ml substrátu, jak je patrné z následující tabulky.

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
Kontrola	0	0	0	0	0
Obohacený substrát	$6,80 \times 10^3$	$6,32 \times 10^3$	$6,88 \times 10^3$	$6,40 \times 10^3$	$7,36 \times 10^3$

5 Průmyslová využitelnost

Pěstební substrát s insekticidními a akaricidními vlastnostmi podle tohoto technického řešení lze použít zejména pro pěstování hospodářsky významných plodin, pro výsev, rozmnožování a pěstování zeleniny, např. paprik, rajčat, okurek atd., okrasných rostlin, např. pokojových květin a dalších plodin. Uplatnění najde zejména v alternativním, ekologickém zemědělství, skleníkovém pěstování plodin a u drobných pěstitelů.

NÁROKY NA OCHRANU

15

1. Pěstební substrát s insekticidními a akaricidními vlastnostmi obsahující směs rašeliny, jílu a minerálních látek, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jeden kmen entomopatogenní houby z rodu *Isaria* v koncentraci v rozmezí 10^2 až 10^7 infekčních částic na 1 ml pěstebního substrátu.

20

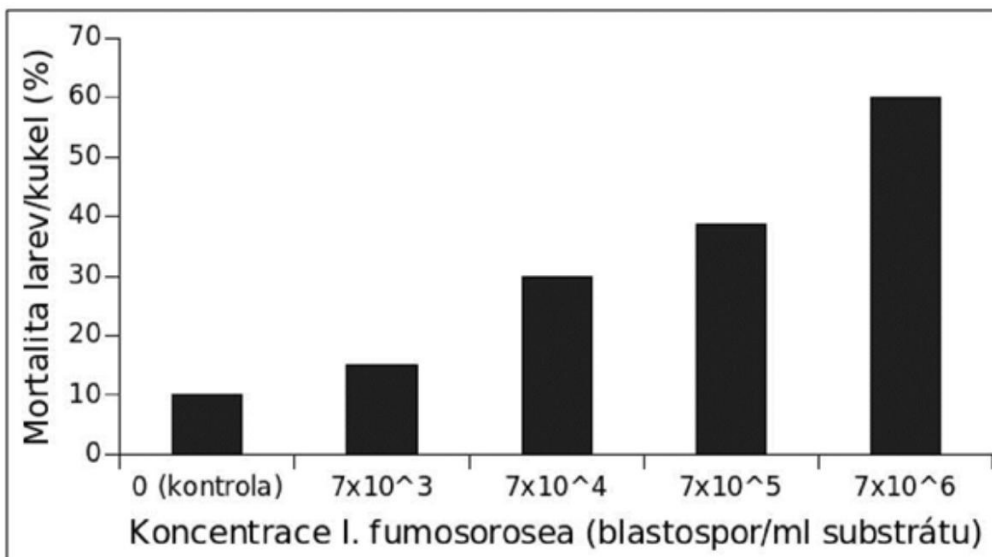
2. Pěstební substrát podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kmen entomopatogenní houby je *Isaria fumosorosea* CCM 8367.

25

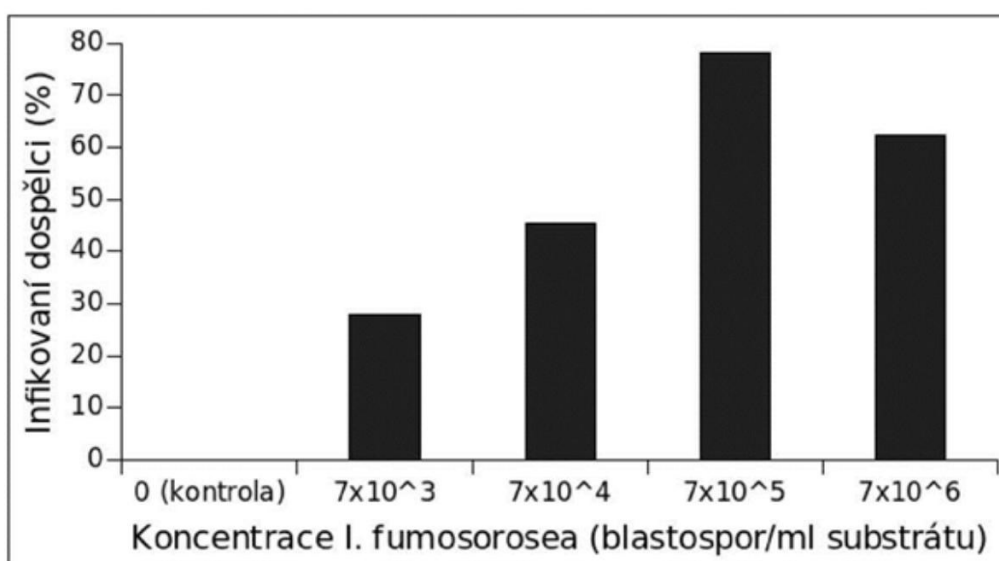
3. Pěstební substrát podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že infekční částice jsou ve formě spor.

4. Pěstební substrát podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že infekční částice jsou ve formě fragmentů mycelia.

1 výkres



Obr. 1



Obr. 2

Inoculation of sphagnum-based soil substrate with entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae)

Rostislav Zemek, Jana Konopická, and Andrea Bohatá

Citation: *AIP Conference Proceedings* **1954**, 030009 (2018); doi: 10.1063/1.5033389

View online: <https://doi.org/10.1063/1.5033389>

View Table of Contents: <http://aip.scitation.org/toc/apc/1954/1>

Published by the *American Institute of Physics*

Inoculation of Sphagnum-Based Soil Substrate with Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae)

Rostislav Zemek^{1,2,3,a)}, Jana Konopická^{3,4,b)} and Andrea Bohatá^{4,c)}

¹*Arthropod Ecology and Biological Control Research Group, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam.*

²*Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam.*

³*Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Institute of Entomology, České Budějovice, Czech Republic.*

⁴*Department of Plant Production, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.*

^{a)}Corresponding author: rostislav.zemek@tdt.edu.vn

^{b)}jkonopicka@seznam.cz

^{c)}abohata@centrum.cz

Abstract. Convenient ecological alternative to broad-spectrum chemical pesticides is the utilization of natural enemies, like predators, parasitoids and microorganisms. A substantial number of microbial biopesticides based on entomopathogenic fungi have been developed worldwide since 1960s. *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, *Isaria fumosorosea* (Wize), and *B. brongniartii* (Saccardo) Petch are the most common species used in commercially produced mycopesticides. Besides direct biological pest control, these fungi could be also used in preventive application programs, particularly in ornamental or nursery plants to provide better control against pests. The aim of the present study was to investigate potential of pre-colonization of sphagnum-based soil substrate with *I. fumosorosea* strain CCM 8367 which was found earlier to be highly virulent against several pest species. We developed simple laboratory apparatus for application of fungal spore suspension into the substrate. Suspension was prepared from blastospores obtained by submerged cultivation on potato dextrose broth (PDB) medium using an orbital shaker. Inoculated substrate was placed into plastic bags and stored at constant temperature for six months. Every month, samples were analyzed for concentration of colony forming units (CFU) by elution and selective medium technique. The results showed that at 20°C the fungus successfully colonized the soil substrate and persisted there although the mean concentration slightly decreased from 5.89×10^4 to 2.76×10^4 CFU per milliliter of substrate during the experiment. Temperature 30°C had negative effect on survival of the fungus and is not recommended for long-term storage of pre-inoculated substrate. We can conclude that *I. fumosorosea*-colonized substrate can be convenient for preventive and permanent protection of various plants against soil-dwelling pests.

INTRODUCTION

Production of growing media represents an industry with a €1.3 billion turnover accounting for 11,000 jobs across Europe and is essential to the horticulture industry [1]. Growing media or plant substrates are mostly based on organic constituents which includes peat, coir, wood fibers, bark and compost [2] with peat presenting dominant growing media used in Europe [3,4]. The reasons for using pure peat or as a main component of growing media are to be found in its availability in Northern Europe, relatively low cost, its excellent chemical, biological and physical properties and its light weight [2].

Cultivated plants are often attacked by insect pests and more than 90% of these pests spend part of their life cycle in the soil [5]. Therefore, a substrate in which plant is grown plays an important role in plant protection, too. Instead of using chemical insecticides which are problematic because of pest resistance and residue in environment,

development of biocontrol methods using natural pathogens might be solution for sustainable production. Many microbial biopesticides based on entomopathogenic fungi have been developed worldwide since 1960s. The most common mycopesticides are based on *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, *Isaria fumosorosea* (WIZE), and *B. brongniartii* (Saccardo) Petch [6]. Experiments with preventive application of these fungi to soil or substrate were already reported [7–10].

The aim of the present study was to develop simple laboratory device for inoculation of sphagnum-based soil substrate with entomopathogenic fungi and to assess the persistence of the fungus in pre-colonized substrate during six months. For this purpose, we selected *I. fumosorosea*, the species which has a worldwide distribution and its natural occurrence in soil samples was reported from many countries including the Czech Republic [11]. It is a species with a relatively wide host range across several insect orders with the ability to cause natural insect epizootic. Several commercial mycoinsecticides based on various strains of this fungus have been developed in America, Asia or Europe. There is a growing demand for their application in biocontrol programs [12, 13].

MATERIAL AND METHODS

Soil Substrate

A commercially available special horticultural sphagnum-based substrate for seeds and nursery plants (Forestina Ltd., Czech Republic) was used. This soil substrate contains black and white peat, fine-ground clay, and is enriched by fertilizer with essential and trace nutrients, also pH is adjusted

Entomopathogenic Fungus

Strain CCM 8367 of *I. fumosorosea* was used in this study. The strain originated from pupae of the horse chestnut leaf miner, *Cameraria ohridella* Decka and Dimic (Lepidoptera: Gracillariidae) collected in the Czech Republic [14]. The strain is deposited as a patent culture in the Czech Collection of Microorganisms in Brno [15, 16] and at our laboratory is commonly maintained on potato dextrose agar medium (PDA, Sigma-Aldrich, Germany). The CCM 8367 strain was found earlier to be highly virulent against several insect and mite pest species [17–23].

Spore suspension used for inoculation of substrate was prepared from blastospores which were obtained by submerged cultivation. For the cultivation, 95 mL of potato dextrose broth (PDB, Sigma-Aldrich, Germany) sterilized liquid medium in 250 mL Erlenmeyer flask was inoculated with 5 ml of fungus suspension. The flask was placed on an orbital shaker with speed of 200 rpm and temperature 25°C and it was incubated for four days [24]. After incubation, the final suspension was filtered through sterile gauze to separate the mycelium and spore clusters. The number of blastospores in suspension was counted with a Neubauer improved chamber and subsequently the suspension was adjusted to the concentration 1×10^7 spores per mL. For adjusting, soaking agent Tween 80® (Sigma-Aldrich, Germany) was added to the suspension at a concentration of 0.05% (v/v).

Inoculation Technique

A laboratory device for low-volume application of fungal suspension into substrate has been developed [25]. The device consists of a glass jar with volume 3 liters placed horizontally on metal frame equipped with four motorized rubber wheels and airbrush connected to an electric compressor. Substrate of 0.5 L was scattered into the jar which revolved at speed 18 rpm. Two milliliters of fungal suspension were sprayed into the revolving jar by airbrush using pressure of 0.5 bar. Thus, the expected initial concentration was 4×10^4 blastospores per milliliter of substrate. Inoculated substrate was then placed into a plastic ziplock bag of size 15×20 cm.

Evaluation of Fungus Persistence in Substrate

Bags with inoculated substrate were sealed and placed into climatized cabinet with constant temperature $20 \pm 1^\circ\text{C}$ for six months. Immediately after inoculation and subsequently every month five bags were analyzed for concentration of fungus in the substrate. For this purpose, substrate sample of 25 mL per bag was collected, eluted by 100 mL of sterile water with Tween 80® in 250 mL Erlenmayer flask. Samples were placed on orbital shaker for 20 minutes, 200 rpm and temperature 25°C. One milliliter of elution was then diluted in 9 mL of sterile water with

Tween 80®, 0.5 mL of the suspension was transferred by pipette and spread with inoculation spatula on surface of selective grow medium with dodine [26]. Petri dish plates were incubated for one week at 25°C. After this period, number of colonies of *I. fumosorosea* on the plate were counted. This was repeated three times per one bag sample giving totally 15 counts per sampling period. In addition, shorter experiments were carried out to test fungus persistence at 15, 25 and 30°C with only one bag sampled per temperature and sampling period.

Data Analysis

Fungus concentration in substrate was expressed as number of colony forming units (CFU) per milliliter of substrate. CFU data were $\log_{10}(x+1)$ transformed before the analysis. Consequently, data were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

RESULTS AND DISCUSSION

Conidia and blastospores are the main infective units used in biological control with entomopathogenic fungi. Although most formulations are based on aerial conidia obtained in solid-state fermentation using cheaper natural substrates such as rice, bran, hail or cereals [27] since these propagules are more resistant to abiotic factors found in open fields [6] there is no absolute advantage between both infective units [28]. We used blastospores because their cultivation was faster and provided sufficient yield [24].

Preparation of one sample of inoculated substrate took several minutes during which fungal spores were properly mixed with substrate. Advantages of the device used for inoculation are in particular that it allows a very precise dosing of the fungus suspension into the substrate and achieves a high homogeneity of mixing without significant increase in the liquid content of the final product. Other benefits include simple application, low cost, applicability under laboratory conditions, versatility of use and easy portability and maintenance.

Elution and selective medium technique revealed that the fungus successfully colonized the soil substrate and that concentration after inoculation of substrate ranged between 4.99×10^4 and 7.17×10^4 CFU/mL. This was slightly higher concentration than expected and might be caused either by the fact that concentration of blastospores in suspension used for inoculation was underestimated or because fungus multiplied during period between preparation of substrate and the start of incubation of eluted sample. The results of long-term storage experiment showed that at 20°C fungus persisted well for six months although the mean concentration decreased from 5.89×10^4 to 2.76×10^4 CFU per millilitre of substrate during the experiment (Fig. 1). This confirms that entomopathogenic fungi are able to survive in soil environment for long time [29] and, moreover, they are able to survive on the alternate substrate represented by organic matter or to grow saprophytically in the rhizosphere [30].

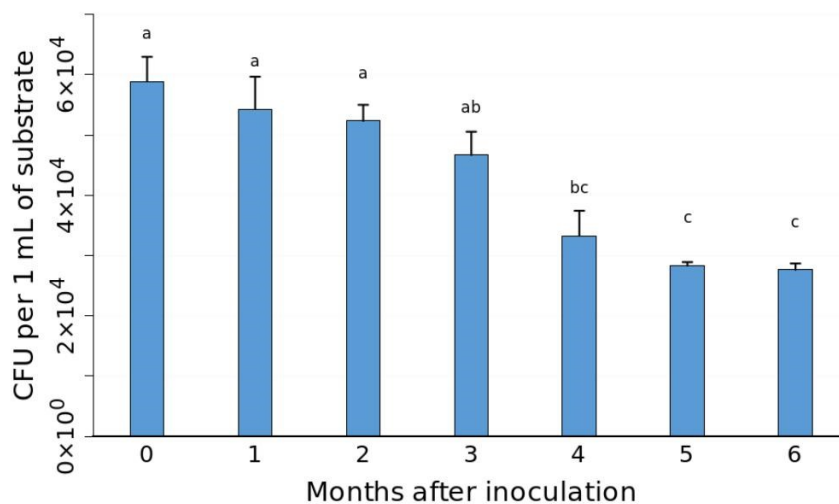


FIGURE 1. Changes of *Isaria fumosorosea* concentration (mean and SE) in fungus-colonized soil substrate in time. The same letters indicate no significant differences between columns (Tukey HSD test, $P > 0.05$)

Analysis of variance revealed highly significant effect of storage time on CFU concentration in substrate ($F_{6,28} = 15.10$, $P < 0.0001$). Persistence of fungus at 15°C was similar to that at 20°C. However, fungus concentration decreased at 25°C and temperature 30°C had strong negative effect on its survival (Table 1). Therefore, higher temperature is not recommended for long-term storage of pre-inoculated substrate.

TABLE 1. The effect of temperature on *Isaria fumosorosea* concentration (CFU/mL) in fungus-colonized substrate.

Storage length [months]	15°C	25°C	30°C
2	4.27×10^4	4.00×10^4	1.52×10^4
3	5.57×10^4	2.93×10^4	0
4	5.71×10^4	2.59×10^4	0

Soil trials reported earlier demonstrated high virulence of CCM 8637 strain against the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) [20] and the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) [21]. The strain is also efficient against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) [22]. However, the strain was not virulent against the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Claparède) (Acari: Acaridae) [31]. It seems, that bulb mites are well adapted to live next to acar/entomopathogenic fungi in soil environment. Indeed, some compounds like hexyl rhizoglyphinate isolated from *R. robini* have been shown to inhibit mycelial growth of several species of fungi [32]. Since *I. fumosorosea* might also have some negative effect on predators and parasitoids [33], it will be necessary to verify whether fungus-colonized substrate is harmless to beneficial soil-dwelling arthropods.

We can conclude that the proposed method of inoculation of sphagnum-based substrate using mixing device provides high homogeneity and that the fungus is able to survive saprophytically in the substrate for several months. Pre-colonized substrate can be convenient for preventive and permanent protection of various plants against many pests occurring in soil.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was conducted with institutional support RVO:60077344 and co-financed by Technology Agency of the Czech Republic (project No. TG02010034), Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project No. 8G15006) and Grant Agency of the University of South Bohemia in Ceske Budejovice (project No. GAJU 018/2018/Z). The authors would like to thank the company Forestina for providing commercial substrate, Mrs. Barbora Kozelková and Mrs. Olga Divišová for their technical assistance.



REFERENCES

1. Growing Media Europe, Retrieved from <http://www.growing-media.eu/news-1>
2. N. Gruda, *Acta Hortic.*, **960**, 37–44 (2012).
3. I. Myllylä, *Peatlands Internat.*, **1**, 11–14 (2005).
4. G. Schmilevski, *Acta Hort.* **819**, 33–46 (2009).
5. R.U. Ehlers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 623–633 (2001).
6. M. R. de Faria and S. P. Wraight, *Biol. Control.* **43**, 237–256 (2007).
7. J. D. Bruck, *Biol. Control.* **32**, 155–163 (2005).
8. S. Ekesi, N. K. Maniania and S. A. Lux, *Biocontrol Sci. Technol.* **12**, 7–17 (2002).
9. R. Gaugler, S. D. Costa and J. Lashomb, *Env. Entomol.* **18**, 412–417 (1989).
10. N. T. H. Nguyen, C. Borgemeister, H.-M. Poehling and G. Zimmermann, *Biocontrol Sci. Technol.* **17**, 853–864 (2007).
11. E. Prenerová, R. Zemek, F. Weyda and L. Volter, *IOBC/WPRS Bull.* **45**, 321–324 (2009).
12. G. Zimmermann, *Biocontrol Sci. Technol.* **18**, 865–901 (2008).
13. G. M. Mascarín, S. B. Alves and R. B. Lopes, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **53**, 753–761 (2010).
14. R. Zemek, E. Prenerová and F. Weyda, *Entomol. Res.* **37**, A135–136 (2007).

15. E. Prenerová, R. Zemek, L. Volter and F. Weyda, Strain of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the method for controlling insect and mite pests. U.S. Patent No. 08574566 (2013).
16. E. Prenerová, R. Zemek, L. Volter and F. Weyda, Strain of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the method for controlling insect and mite pests. EPO patent, No. EP2313488 (2015).
17. H. Hussein, R. Zemek and E. Prenerová, IOBC/WPRS Bulletin **66**, 241–244 (2011).
18. R. Zemek, H. M. Hussein and E. Prenerová, Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. **77**, 685–689 (2012).
19. R. Zemek, E. Prenerová, M. A. E. E. Awad and H. M. Hussein, Acta Fytotech. Zootech. **15**, 79–80 (2012).
20. H. M. Hussein, R. Zemek, O. Skoková Habušťová, E. Prenerová and M. M. Adel, Arch. Phytopathol. Plant Prot. **46**, 1307–1319 (2013).
21. H. M. Hussein, O. Skoková Habušťová, V. Půža and R. Zemek, PLoS ONE **11**(3), e0152399 (2016).
22. R. Zemek, M. Kopačka and K. Šimáčková, IOBC-WPRS Bulletin **120**, 93–97 (2016).
23. R. Zemek, J. Konopická, V. Půža, A. Bohatá, H. M. Hussein and O. Skoková Habušťová, IOBC/WPRS Bulletin **129**, 157–161 (2017).
24. J. Konopická, A. Bohatá, R. Zemek and V. Čurn, IOBC/WPRS Bulletin **129**, 58–64 (2017).
25. R. Zemek, A laboratory mixing device for low-volume application of solutions and suspensions into loose materials. Utility model, No. 30850, Industrial Property Office, Czech Republic (2017) [in CZECH].
26. A. Chase, L. Osborne and V. Ferguson, Florida Entomol. **69**, 285–292 (1986).
27. M. S. Goettel and G. D. Inglis, “Fungi: Hyphomycetes,” in *Manual of Techniques in Insect Pathology*, edited by L. Lacey, (Academic Press, San Diego, USA, 1997), pp. 213–249.
28. R. W. Behle, C. Garcia-Gutierrez, P. Tamez-Guerra, M. R. McGuire and M. A. Jackson, Southwest. Entomol. **31**, 289–295 (2006).
29. I. Vänninen, J. Tyni-Juslin and H. Hokkanen, Biocontrol, **45**, 201–222 (2000).
30. C.S. Wang, G. Hu and R.J. St Leger, Fungal Gen. Biol. **42**, 704–718 (2005).
31. R. Zemek, J. Konopická, A. Bohatá, J. Nermuť, Z. Mráček and E. Palevsky, IOBC/WPRS Bulletin **130**, 27–30, (2018).
32. W. S. Leal, Y. Kuwahara and T. Suzuki, Agric. Biol. Chem. **54**, 2593–2597 (1990).
33. R. Zemek, E. Prenerová, L. Volter, M. A. E. E. Awad, F. Weyda, H. M. Hussein, O. Skoková Habušťová and V. Půža, in *Proceedings of the 5th International Symposium on Biological Control of Arthropods, Langkawi, Malaysia, September 11-15, 2017*, edited by P. G. Mason et al. (CAB International, 2017), pp. 294–297.

Article

Dissemination of *Isaria fumosorosea* Spores by *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*

Jiří Nermut^{1,*}, Jana Konopická^{1,2}, Rostislav Zemek^{3,4,5} , Michal Kopačka¹, Andrea Bohatá²  and Vladimír Puža¹

¹ Department of Biodiversity and Conservation Biology, Institute of Entomology, Biology Centre CAS, Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; jana.konopicka@entu.cas.cz (J.K.); michal258@centrum.cz (M.K.); vpuza@seznam.cz (V.P.)

² Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice, Czech Republic; abohata@centrum.cz

³ Arthropod Ecology and Biological Control Research Group, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City 758307, Vietnam; rostislav.zemek@tdtu.edu.vn

⁴ Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City 758307, Vietnam

⁵ Department of Biochemistry and Physiology, Institute of Entomology, Biology Centre CAS, Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

* Correspondence: nermut@entu.cas.cz

Received: 16 November 2020; Accepted: 9 December 2020; Published: 11 December 2020



Abstract: Entomopathogenic nematodes and fungi are globally distributed soil organisms that are frequently used as bioagents in biological control and integrated pest management. Many studies have demonstrated that the combination of biocontrol agents can increase their efficacy against target hosts. In our study, we focused on another potential benefit of the synergy of two species of nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*, and the fungus *Isaria fumosorosea*. According to our hypothesis, these nematodes may be able to disseminate this fungus into the environment. To test this hypothesis, we studied fungal dispersal by the nematodes in different arenas, including potato dextrose agar (PDA) plates, sand heaps, sand barriers, and glass tubes filled with soil. The results of our study showed, for the first time, that the spreading of both conidia and blastospores of *I. fumosorosea* is significantly enhanced by the presence of entomopathogenic nematodes, but the efficacy of dissemination is negatively influenced by the heterogeneity of the testing arena. We also found that *H. bacteriophora* spread fungi more effectively than *S. feltiae*. This phenomenon could be explained by the differences in the presence and persistence of second-stage cuticles or by different foraging behavior. Finally, we observed that blastospores are disseminated more effectively than conidia, which might be due to the different adherence of these spores (conidia are hydrophobic, while blastospores are hydrophilic). The obtained results showed that entomopathogenic nematodes (EPNs) can enhance the efficiency of fungal dispersal.

Keywords: entomopathogenic nematodes; entomopathogenic fungi; conidia; blastospores; dispersal; PDA plates; soil substrate

1. Introduction

Entomopathogenic nematodes (EPNs) of the families Steinernematidae Filipjev, 1934, and Heterorhabditidae Poinar, 1976, are ubiquitous soil organisms and can be found in almost all terrestrial ecosystems except for Antarctica. These nematodes live in obligate association with bacteria of the genera *Xenorhabdus* Thomas and Poinar, 1979, and *Photorhabdus* Boemare et al., 1993, (Enterobacterales: Morganellaceae) [1] and infect and kill a wide range of insects [2]. The only

free-living stage is infective juveniles (IJs), which can detect hosts over long distances due to their sense organs. They are able to react to many host-associated cues, such as carbon dioxide, arginine, uric acid, and ammonia [3–7]. When a signal from a host is detected, an IJ starts to move against the gradient of this chemical. When they reach the host, they invade its body, release bacteria into the hemolymph, causing septicemia, and the host usually dies within 24 or 48 h. The ability to actively search for hosts and rapidly kill them make EPNs good biocontrol agents.

Some EPN species are mass cultured in liquid media or in surrogate hosts (e.g., *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) larvae) and widely used in biological control to reduce the damage caused by soil-dwelling pestiferous insects, e.g., grubs, caterpillars, and dipteran larvae [8]. Usually, these nematodes have a wide range of hosts and can be used to control populations of many insects; however, some nematodes (e.g., *Steinernema scapterisci* Nguyen and Smart, 1990 (Rhabditida: Steinernematidae)) show an affinity for and a greater ability to manage populations of one pest (mole crickets) or a group of pests (e.g., grubs are controlled by *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae)) [8].

Entomopathogenic fungi (EPFs) are common in nature, have a cosmopolitan distribution and cause natural epizootics in populations of insects or other arthropods [9–11]. EPFs belonging to the order Hypocreales have a very wide range of hosts. The most important species include *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill, 1912, *Isaria fumosorosea* Wize, 1904 and *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, 1883 (Hypocreales: Cordycipitaceae) [12]. EPFs are unique organisms that are capable of infecting their hosts directly through the exoskeleton, while other entomopathogens (viruses and bacteria) must be ingested with food to infect the host [13]. The process of host infection starts with the adhesion of the fungal conidia to the host cuticle and then involves conidial germination, the differentiation of germ tubes into appressoria, cuticle penetration, hyphal differentiation into blastospores in the hemolymph inside the insect body, host colonization, and hyphal proliferation onto the host cadaver surface [12,14,15]. Under suitable conditions, the fungus grows on the surface of the body of the dead host and sporulates. A secondary generation of conidia is then released into the environment [16]. Conidia can be spread in the environment in several ways, e.g., by weather factors (wind and rain) or by biotic vectors that can spread spores over long distances [17,18]. Common mechanisms of the horizontal transmission of fungal diseases in invertebrate populations include the contact of healthy individuals with infected cadavers and the autodissemination of conidia within populations in connection with specific intrapopulation processes, such as migration, copulation, and oviposition [12,19]. Entomopathogenic fungi persist in the soil for a long time [20–22], but the process of spore dispersion is limited [10]. Entomopathogenic fungi from the Hypocreales order are already promising candidates in practical biological control against serious pests [23,24]. Numerous commercial products based on EPFs are registered around the world. The dominant species incorporated into these bioproducts are *B. bassiana* and *M. anisopliae*, which represent almost 70% of all bioproducts [24]. The fungi are produced either in solid-state fermentation, where they produce aerial conidia, or in a submerged liquid-state fermentation, where they produce blastospores [25]. The EPF *I. fumosorosea*, which is widely spread and has a wide host range, is one of the most prominent species of EPF [26]. This fungus can cause natural insect epizootics in populations of sucking pests [23,27]. Several commercial bioproducts based on various strains of *I. fumosorosea* have been successfully used in biocontrol, especially in Europe and the USA [26,28].

The efficacy of biocontrol agents can be improved by their combination [29–31]. Entomopathogenic fungi and entomopathogenic nematodes applied together performed more efficiently than when applied alone [32–35]. In contrast, Shapiro-Ilan et al. [36] found that when pairs of nematode and fungal pathogens attacked the larvae of the weevil *Curculio caryae* Horn, 1873 (Coleoptera: Curculionidae), most pairings were less effective than a single highly effective entomopathogenic species. Although nematodes do not seem to be directly affected by EPFs, Hussein et al. [35] found that when *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 (Rhabditida: Steinernematidae) was applied to Colorado potato larvae 24 h or later after *I. fumosorosea*, the penetration rate and the development of the nematodes

were negatively affected. A similar negative effect was observed in the interactions between the fungus *M. anisopliae* and nematodes *Steinernema glaseri* Steiner, 1929 (Rhabditida: Steinernematidae) [37] and *H. bacteriophora* [38] and between *B. bassiana* and *Steinernema ichnusae* Tarasco et al., 2008 (Rhabditida: Steinernematidae) [39].

Invertebrates can effectively vectorize fungal spores and increase the chances of contact between them and their hosts. In particular, there is high potential in pollinators [40–42] or predators that have been recently investigated in several studies. Zhang et al. [43] reported that predatory mites can spread conidia of *B. bassiana*. A method has been developed in which the soil predatory mite *Stratiolaelaps scimitus* Berlese (Acari: Laelapidae) and the plant-inhabiting mites *Neoseiulus cucumeris* Oudemans and *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) collect and transport *B. bassiana* conidia directly from commercial rearing substrates to control western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* Pergande, 1895 (Thysanoptera: Thripidae) [44]. To our knowledge, the dissemination of spores of entomopathogenic fungi by EPNs has not yet been studied.

The main goal of this study was to evaluate the possibility of the dispersal of spores (both conidia and blastospores) of the EPF *I. fumosorosea* by the EPNs *S. feltiae* and *H. bacteriophora*. We not only targeted the differences between the different types of spores and different vector species but also tried to estimate the effects of environmental heterogeneity (experimental arenas) and the desheathment of the IJs.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Organisms

The entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* strain NFUST (isolated during the 1980s near the town of Izhevsk, Russia) and *H. bacteriophora* strain HB221 (isolated in 1997, near the village of Pouzdrůany, Czech Republic) were used for this study. Both strains are maintained in the nematode collection of the Laboratory of Entomopathogenic Nematodes, Institute of Entomology, Biology Centre CAS in České Budějovice, Czech Republic.

The nematodes were cultured in vivo in *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae, which were infected with ca. 50 IJs of the appropriate nematode per larva. The dead larvae were placed on White traps [45] and newly released IJs were collected from the water. The IJs were stored for later use in sterile tap water on 90 mm Petri dishes in a refrigerator at 5 °C in the dark.

For this study, strain CCM 8367 of *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) was used. The strain originated from infected pupae of the horse chestnut leaf miner, *Cameraria ohridella* Deschka and Dimić, 1986 (Lepidoptera: Gracillariidae), collected in the Czech Republic [46]. The strain was deposited as a patent culture in the Czech Collection of Microorganisms (CCM) in Brno [47,48].

Isaria fumosorosea was grown on Petri dishes (ø 90 mm) containing potato dextrose agar (PDA, Sigma-Aldrich, Munich, Germany, 39 g/L). The plates were incubated at 25 °C in the dark for 10–14 days. The aerial conidia were harvested by scraping them into a sterile solution of 0.05% (v/v) Tween 80® (Sigma-Aldrich, Germany). The conidial suspension was filtered through sterile gauze to separate the mycelium and clusters of conidia. In the uniform suspension, the number of conidia was counted with a Neubauer improved counting chamber (Sigma-Aldrich, Germany), and subsequently, the suspension was adjusted to a concentration of 1.5×10^8 spores per mL. The blastospores of the fungus were produced in potato dextrose broth (PDB, Sigma-Aldrich, Germany). For submerged cultivation, 95 mL of sterile liquid PDB medium in a 250 mL Erlenmeyer flask was inoculated with 5 mL of conidial suspension at a concentration of 1.0×10^7 spores per mL. The flask was placed in an orbital shaker (Kühner AG, Birsfelden, Switzerland), and the fungus was incubated at a speed of 200 rpm at 25 °C. The blastospores were harvested after 4 days of incubation. The suspension was filtered through sterile gauze to remove the mycelia. The blastospore concentration was determined by a Neubauer improved counting chamber and adjusted to 1.5×10^8 spores per mL.

2.2. Agar Plate Experiments

The ability of EPNs to spread the spores of an EPF was observed on PDA in 90 mm Petri dishes. To simulate the effect of heterogeneity of space in contrast with clean agar we used three different types of experimental arenas: (1) a clean 3.9% PDA plate, (2) a Petri dish with a line of silver sand acting as a barrier across the center and (3) a Petri dish with PDA and a small heap of 0.8 mm sterile silver sand in the center (Figure 1). Sand grains were considered as obstacles which are likely to affect movement of nematodes and can remove some fungus spores from nematodes cuticle. A pipette was used to place the nematodes and fungal spores in the dishes on the agar in the center of the Petri dish (Figure 1A), directly on the top of the silver sand heap (Figure 1H) or on the agar in the middle of half of the Petri dish (Figure 1B). For the experiment, 50 IJs of either nematode species (*S. feltiae* or *H. bacteriophora*) and 20 μ L of spore suspension (either conidia or blastospores) at a concentration of 1.5×10^8 per mL were used. Control dishes received fungus only. When the experiment was established, all the dishes were stored at 16 °C in the dark for 5 days. Then, photos of the dishes were taken, and the digital images were analyzed (see the next paragraph). For each combination, we used 10 experimental and 10 control dishes, and the whole experiment was repeated twice. In total, 480 dishes were used (2 nematode species \times 2 types of spores \times 20 dishes \times 3 types of experimental arenas \times 2 repetitions). Additional five dishes for each experimental design were used for evaluation of nematodes dispersal on the experimental plates and number of nematodes in different zones of the dishes (Figure 1) were counted.

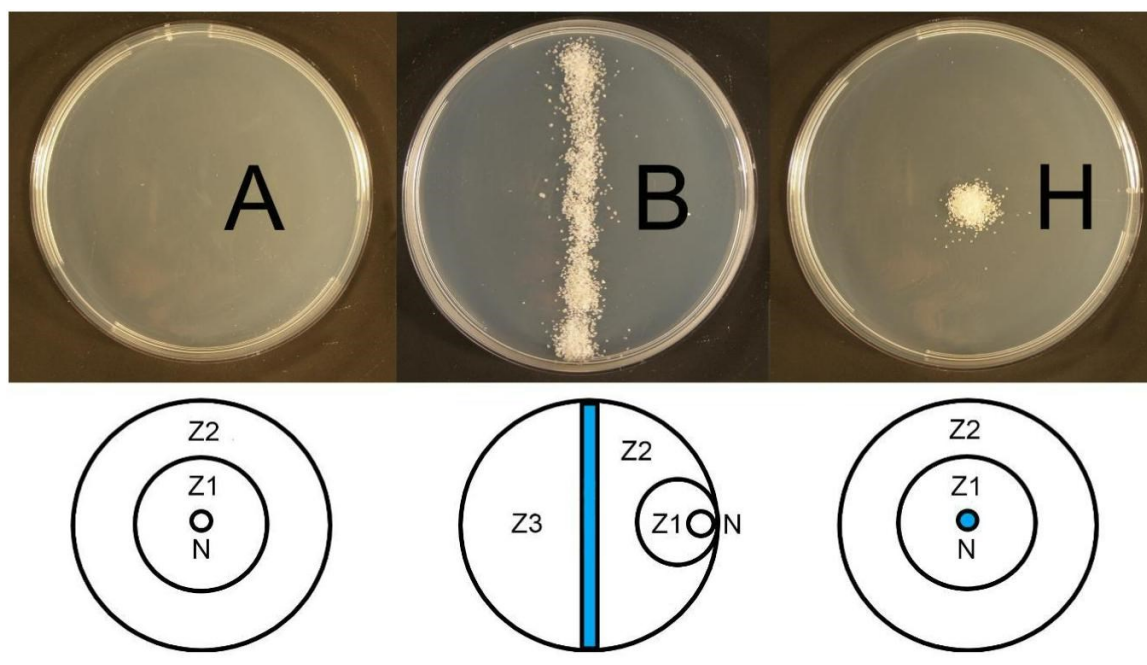


Figure 1. Design of the potato dextrose agar (PDA) plate experiments and zones for nematodes' dispersal evaluation. Clean agar (A), silver sand barrier (B) and silver sand heap (H), Zones 1–3 (Z1–Z3), nematode or nematodes/fungus application side (N), sand marked with blue color.

To estimate the area covered with *I. fumosorosea* colonies, the individual Petri dishes were photographed by an Olympus SP-510 camera. The digital images were manually cleaned, and the colors were inverted to obtain negative images using Adobe Photoshop CS3 and Space Navigator (3Dconnexion). The resulting files were then processed in custom-made image analysis software written in the Java™ programming language [49]. This processing included thresholding to obtain a black and white image, counting the number of black pixels (these indicate fungi) and calculating the percentage of Petri dish area covered by *I. fumosorosea*. The results were stored in a CSV (comma-separated value) file along with a thresholded image to control whether the thresholds were correctly implemented.

2.3. Glass Tube Experiments

This experiment was performed in a simple apparatus that was constructed from one 10 cm long glass tube (with an inner diameter of 5 mm) and two 2 mL Eppendorf tubes attached to the ends of the glass tube (Figure 2). The glass tubes were lined with a piece of parchment paper (10 × 2 cm). Later, the tubes with paper were filled in with 3 mL of slightly wet sterilized brown soil. Openings (diameter of 8 mm) were made in the lids of the Eppendorf tubes, into which the glass tubes were inserted. Pieces of a synthetic cloth with calibrated apertures of 25 × 30 μm were glued onto the bottoms of the Eppendorf tube lids to protect the tubes against pollution by the soil in the glass tube. The Eppendorf tube on the application side of the glass tube was left empty, while one *G. mellonella* larva was added to the opposite Eppendorf tube (*Galleria* side) to stimulate the nematodes to move in that direction. The suspension with nematodes (500 IJs in 40 μL of water) and 20 μL of the suspension with either conidia or blastospores were pipetted directly onto the soil in the glass tubes on the application side (without *G. mellonella*). These glass tubes were stored horizontally at 16 °C in the dark for 3 days. After this time, the soil on top of the parchment paper was removed from the glass tubes and divided into three equal parts, which were used for fungal isolation and consequent evaluation. Each part contained 1 mL of the soil substrate. As a control, we used glass tubes with the fungus but without the nematodes. The experiment was performed with both *S. feltiae* and *H. bacteriophora* nematodes and with both conidia and blastospores of the fungus *I. fumosorosea*. For each combination, we used 10 experimental and 5 control tubes, and the whole experiment was repeated twice. In total, 120 glass tubes were used (2 nematode species × 2 types of spores × 15 glass tubes × 2 repetitions).

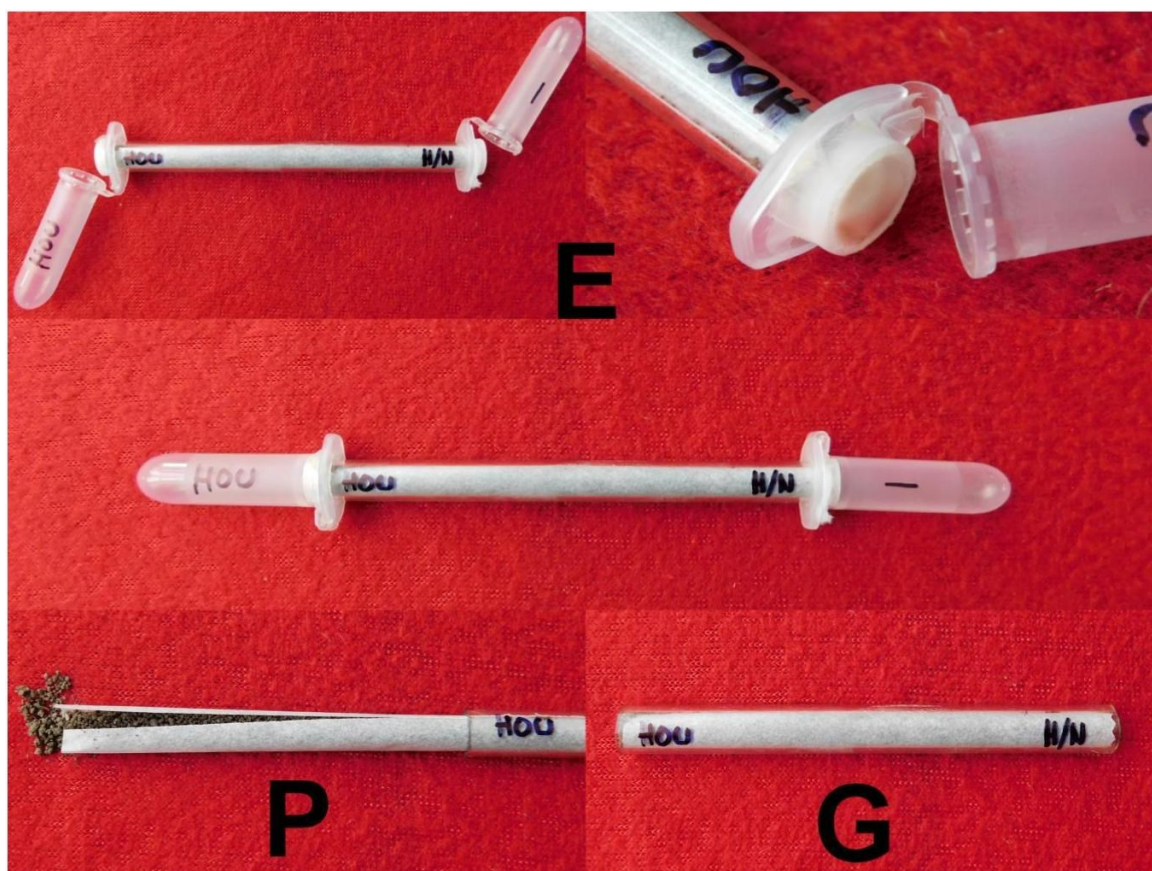


Figure 2. Design of the glass tube experiments. Eppendorf tubes (E), glass tube (G), parchment paper (P).

To explain the effect of nematode species on fungus dispersal and the potential role of the second-stage cuticle, the same experiment was performed with desheathed IJs of both nematode

species. Infective juveniles were desheathed in 1% NaOCl for 5 min [50]. For this experiment, we used 5 experimental glass tubes for each nematode and spore combination and 10 controls. The whole experiment was repeated twice. In total, 60 glass tubes were used (2 nematode species \times 2 types of spore \times 5 glass tubes + 10 controls \times 2 repetitions).

In order to test a possible effect of sheath on nematode movement, the same experiment without fungus was arranged both for ensheathed and desheathed nematodes. Nematodes from each part was extracted by using modified Baerman funnels [51] and counted under the stereomicroscope. For this experiment 6 glass tubes with desheathed and ensheathed nematodes of both species were used making of 24 glass tubes in total.

After 3 days, the concentration of spores in the soil substrate was analyzed from each part obtained from the glass tubes. From all the variants, 1 mL of the soil substrate from the first part (the side where the IJs and spores were applied) was suspended in 100 mL of sterile solution of Tween 80[®] (0.05% v/v) in a 250 mL Erlenmeyer flask. The samples were then placed on an orbital shaker for 20 min at 200 rpm at a temperature of 25 °C. After homogenization, each sample was diluted twice (1:100) with Tween 80[®] solution. One milliliter of soil substrate from the middle part and 1 mL from the last part were suspended in 5 and 3 mL, respectively. The homogenization was performed with a Vortex (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany). These samples were not diluted after homogenization. Each sample was transferred to a volume of 0.5 mL on the surface of a Petri dish with the selective medium dodine [52] and stirred with a sterile L-shaped spatula. The Petri dishes were incubated in a climate chamber for one week at 25 °C. After this period, the numbers of colonies of *I. fumosorosea* on the plates were counted. Three replications of each sample were prepared. The fungus concentration in the substrate was expressed as the number of colony-forming units (CFU) per milliliter of soil substrate.

2.4. Statistical Analyses

All the analyses were performed in the program Statistica 10 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Analysis of variance (ANOVA) was used for the data evaluation. Glass tube experiments were evaluated by factorial ANOVA, for agar plate experiments one-way ANOVA was used due to different (non-factorial design). All the dependent variables were logarithmically transformed to reach normality. The results of these analyses were visualized by using categorized column or box plot graphs based on raw (nontransformed) data.

3. Results

3.1. Agar Plate Experiments

The statistical analysis showed that the dispersion of *I. fumosorosea* on agar plates (Figures 3 and 4) is significantly influenced by the presence of nematodes (df: 1, 48; F: 18.38; $p < 0.001$) and by the type of experimental area (df: 2, 87; F: 32.37; $p < 0.001$). The difference between dispersal of blastospores ($1314 \pm 700 \text{ mm}^2$) and conidia ($1103 \pm 654 \text{ mm}^2$) was not statistically significant (df: 1, 88; F: 2.27; $p > 0.05$). In general, the average fungal dispersion on the plates with *H. bacteriophora* ($1219 \pm 636 \text{ mm}^2$) was similar (df: 1, 88; F: 0.07; $p > 0.05$) to that on the plates with *S. feltiae* ($1203 \pm 707 \text{ mm}^2$). Significant differences ($p < 0.001$) were observed among the different types of experimental arenas. The highest fungal coverage ($1607 \pm 693 \text{ mm}^2$) was recorded from the clean PDA plates with both nematodes and fungi, while in the case of the silver sand barrier ($1314 \pm 282 \text{ mm}^2$) and heap ($704 \pm 654 \text{ mm}^2$), the fungal dispersion was apparently lower.

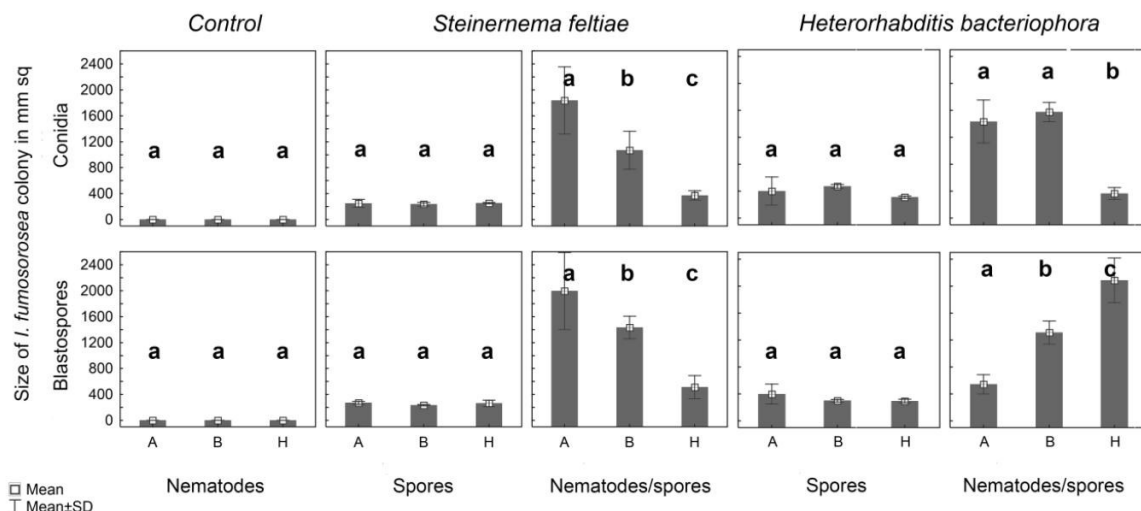


Figure 3. Mean (\pm SD) area of *Isaria fumosorosea* colonies in mm². (A) Clean (pure) PDA, (B) PDA with a silver sand barrier, (H) PDA with a silver sand heap. Statistically significant differences are indicated by letters (a, b, c).

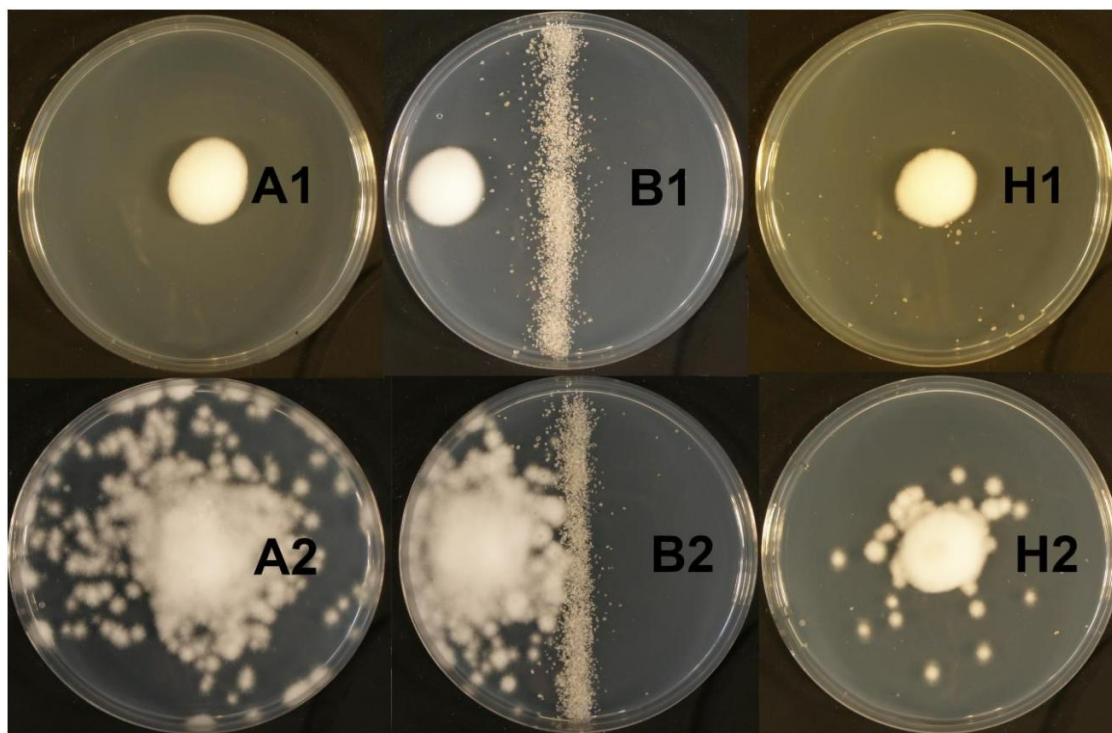


Figure 4. Examples of dissemination of the blastospores of *Isaria fumosorosea* by *Heterorhabditis bacteriophora* on clean PDA plates (A), plates with a line of silver sand as a barrier (B), and a sand heap (H). Replications were performed without nematodes (A1,B1,H1) and with ensheathed infective juveniles (A2,B2,H2). The other combinations of nematodes, spores and experimental arena type are not shown as they seem very similar. This is an illustrative photo that do not have fully correspond with data presented in Figure 3 that shows means and standard deviations.

According to statistical analyses there were no significant differences in the dispersal on PDA plates between *H. bacteriophora* and *S. feltiae* in any experimental arena: agar (df: 1, 54; F: 0.13; $p > 0.05$), barrier (df: 1, 72; F: 0.04; $p > 0.05$), heap (df: 1, 36; F: 1.51; $p > 0.05$). Expectedly there was recorded significant effect of the zone (Figure 1) on nematode’s dispersal: agar (df: 2, 54; F: 6.49; $p < 0.05$), barrier (df: 3, 72; F: 14.48; $p < 0.001$), heap (df: 1, 36; F: 14.86; $p < 0.001$). In general, the data showed no

difference in the dispersal between *H. bacteriophora* and *S. feltiae* on the clean PDA plates and plates with sand heap or sand barrier but according to our observation the movement pattern seemed to be different as the IJs of *H. bacteriophora* were almost always cruising while the IJs of *S. feltiae* tended to remain curled up and inactive after reaching some position in the arena. This effect however was not further evaluated.

3.2. Glass Tube Experiment

Isaria fumosorosea spread within the soil substrate in the glass tubes (Table 1 as a result of its own growth; however, this dispersion was significantly enhanced by the presence of entomopathogenic nematodes (df: 1, 84; F: 5.00; $p < 0.05$). In general, *H. bacteriophora* dispersed to the distant part of the tube significantly (df: 1, 84; F: 13.82; $p < 0.001$) more spores per 1 mL of soil (64 ± 25 CFU/mL) than *S. feltiae* (11 ± 12 CFU/mL). The dispersal of the blastospores (49 ± 34 CFU/mL, 0.022 % of all recovered spores) was significantly higher (df: 1, 84; F: 7.04; $p < 0.05$) than that of the conidia (26 ± 30 CFU/mL). The presence of the second-stage cuticle on the bodies of the infective juveniles was identified as a crucial factor (df: 1, 84; F: 14.08; $p < 0.001$), because spore dissemination by desheathed IJs was almost negligible. Only in the combination treatment with *H. bacteriophora* and blastospores were 3 CFUs disseminated in one of the glass tubes (an average 0.6 CFUs per glass tube). In the other combinations, the conidia and blastospores were not disseminated. Complete results of ANOVA, interactions included, are presented in Table 2.

Table 1. Mean number of colony-forming units (CFUs) of *Isaria fumosorosea* isolated from different sections of the glass tubes with ensheathed infective juveniles of entomopathogenic nematodes. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between “conidia or blastospores only” (control) and “conidia or blastospores + nematodes” in *Galleria* side are marked with asterisks. Dispersal of spores by desheathed nematodes is not shown, as there were almost no CFUs recovered in central and *Galleria* side.

Nematode	Spores	Glass Tube's Side		
		Application	Centre	Galleria
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	Conidia + nematodes ×	590,000	154	51
	Conidia only	608,000	125	10.8
	Blastospores + nematodes ×	120,000	258	77.1
	Blastospores only	154,000	79	11.4
<i>Steinernema feltiae</i>	Conidia + nematodes	527,000	53.1	1.5
	Conidia only	537,000	14.4	0
	Blastospores + nematodes ×	126,000	125	19.8
	Blastospores only	608,000	125	10.8

Table 2. Glass tube experiments—fungi and nematodes’ dispersal: Complete results of factorial ANOVA including interactions that are not presented in the text; degrees of freedom (df), test criterion (F), *p*-value (*p*), numbers 1–4 indicate respective categorical predictors.

Spore Dispersal Experiment				Nematode Dispersal Experiment			
Categorical Predictors	df	F	<i>p</i>	Categorical Predictors	df	F	<i>p</i>
(1) Presence of sheath	1	14.0813	<0.001	(1) Presence of sheath	1	2.8779	>0.05
(2) Nematode species	1	13.8195	<0.001	(2) Part of glass tube	2	86.8856	<0.001
(3) Presence of nematodes	1	5.0018	<0.05	(3) Nematode species	1	1.9545	>0.05
(4) Spore type	1	7.0388	<0.01	(4) Time	2	1.1445	>0.05
1 × 2	1	9.5566	<0.01	1 × 2	2	6.0719	<0.01
1 × 3	1	4.8463	<0.05	1 × 3	1	0.4680	>0.05
2 × 3	1	6.8541	<0.01	2 × 3	2	3.6176	<0.05
1 × 4	1	4.5062	<0.05	1 × 4	2	0.0601	>0.05
2 × 4	1	9.3411	<0.01	2 × 4	4	15.9850	<0.001
3 × 4	1	2.6101	>0.05	3 × 4	2	0.2696	>0.05
1 × 2 × 3	1	4.9220	<0.05	1 × 2 × 3	2	9.6688	<0.001
1 × 2 × 4	1	4.3586	<0.05	1 × 2 × 4	4	2.4874	>0.05
1 × 3 × 4	1	2.4981	>0.05	1 × 3 × 4	2	0.0614	>0.05
2 × 3 × 4	1	4.7677	<0.05	2 × 3 × 4	4	2.8772	<0.05
1 × 2 × 3 × 4	1	2.9877	>0.05	1 × 2 × 3 × 4	4	3.7649	<0.01
error	84	2.8677	>0.05	error	36		

Statistical analyses of additional glass tube experiment for nematodes’ dispersal showed that nematodes species (df: 1, 36; F: 1.955; *p* > 0.05), presence of the second stage cuticle (df: 1, 36; F: 2.878; *p* > 0.05) and time (df: 2, 36; F: 1.144; *p* > 0.05) have no significant effect on nematodes dispersal.

4. Discussion

The present study explored a new alternative method for disseminating entomopathogenic fungi in the environment, mostly in the soil. The goal of this study was to evaluate and quantify the efficacy of the dissemination of conidia and blastospores of *I. fumosorosea* by *H. bacteriophora* and *S. feltiae*. We focused on the differences between the types of spores and vector species. We also estimated the effect of environmental heterogeneity and the presence of a second-stage cuticle on the IJ nematodes. Our results showed, for the first time, that EPNs can enhance the efficacy of EPF dissemination.

The utilization of other invertebrates, such as mites and insects, as vectors of fungal spores increases the chances of contact between a microorganism and its host and is considered a promising strategy for biological control programs [44]. The potential of arthropods, e.g., commercially available and mass-produced pollinators or predators, as vectors of beneficial fungi has been recently investigated in several studies [42]. Al Mazra’awi et al. [40] reported that honeybees, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), effectively dispersed *B. bassiana* conidia in canola fields, increasing the mortality of the target pest, *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois, 1818 (Heteroptera: Myridae), by up to five times compared to the mortality of the control. Entomovectoring systems using bumble bees are already commercially used in greenhouses [42]. Kapongo et al. [41] used *B. bassiana*, while Smaghe et al. [53] reported efficient bumble bee vectoring of *M. anisopliae* spores.

Zhang et al. [43] used two predatory mite species, *N. cucumeris* and *A. swirskii*, as vectors of *B. bassiana* conidia against *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). In vitro experiments showed that the mortality rates of phytoseiid mites were between only 10% and 15%, while the mortality of *D. citri* was 100%. In assays with plants, the majority of *D. citri* individuals were killed by fungi a few days after contact with the mites, which were loaded with fungal spores. A method has been developed in which the soil predatory mite *Stratiolaelaps scimitus* and the plant-inhabiting mites *N. cucumeris* and *A. swirskii* collect and transport *B. bassiana* conidia directly from a commercial rearing substrate to control the western flower thrips, *F. occidentalis* [44]. A study by Lin et al. [54] confirmed that loading *A. swirskii* and *N. cucumeris* with *B. bassiana* can increase their capacity to suppress thrips

populations by combining predation and the dispersal of pathogens. Wu et al. [55] demonstrated that another phytoseiid mite, *Neoseiulus barkeri* Hughes (Acari: Phytoseiidae), is able to disseminate *B. bassiana* conidia. Another study, however, showed that any potential benefits of fungal dissemination by predatory mites were possibly weakened by increased mite grooming time, which likely reduced the searching activity and predation rates of *N. barkeri* and suggested that the simultaneous application of *B. bassiana* and phytoseiid mites would not be recommended for effective biological control [56].

Similar to arthropods, entomopathogenic nematodes may be able to spread the spores of various fungi, and this phenomenon could explain the previously reported synergy between *I. fumosorosea* and *S. feltiae* [35]. The present study has demonstrated that although *I. fumosorosea* is able to spread in the environment through its own growth, the efficacy of its dissemination is enhanced by the presence of EPNs in the system. This effect is clearly visible both on the agar plates and in the glass tubes with soil. The fact that the fungal coverage on the agar plates and the number of CFUs in the glass tubes are higher in the presence of nematodes than in the controls suggests a certain level of synergy between the EPF and EPN, which could lead to higher efficiency against target pests, as reported by other authors [29–34]. Similarly, concomitant infection with *Steinernema diaprepesi* Nguyen and Duncan, 2002 (Rhabditida: Steinernematidae) and the saprophytic fungus *Fusarium solani* (Martius) Saccardo, 1881 (Hypocreales: Nectriaceae) increased the mortality of insects to 83% compared to 58% and 0% mortality when nematodes and fungi, respectively, were applied individually [57]. The final outcome will depend on the timing of the (co)application of the EPFs and EPNs [35], and the EPF species will probably play an important role (as in the joint application of some EPN-EPF pairs (e.g., *M. anisopliae*–*S. glaseri* and *H. bacteriophora* and *B. bassiana*–*S. ichnusae*); nevertheless, a negative effect on the efficacy has been observed [37–39].

In particular, from the agar plates with different treatments (clean agar, sand heap, and sand barrier), we saw that the dispersal of spores is apparently limited by spatial heterogeneity of the environment. The fungus was very effectively spread on the clean agar plates, while the sand barrier strongly limited its dissemination, probably due to the reduction in nematode movement on the plate. Only a limited number of nematodes moved across the barrier; however, the fungus was not disseminated across the barrier in almost any case. A similar effect was also observed on the plates with the sand heaps. Spore dispersal outside the heaps, on the agar surface was significantly lower than the dispersal on the clean agar. Therefore, it is possible to hypothesize that spatial heterogeneity (more abrasive environment) can limit the fungal dissemination due to removing spores from nematodes' surface.

After observing that *H. bacteriophora* was more efficient than *S. feltiae* in transmitting spores, we formulated and tested the hypothesis that the difference could be connected to the presence of the second-stage cuticle. It is well known that *Heterorhabditis* nematodes retain their second-stage cuticle much more firmly than *Steinernema*, which usually loses this cuticle more easily [58]. Indeed, our experiment with desheathed larvae confirmed the crucial effect of the second-stage cuticle for dissemination. Generally, the presence of sheaths plays several important roles in nematode biology and survival. Sheaths can protect nematodes against desiccation [59], prevent infection with the parasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis* Minter and Brady (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) [60] or reduce predation by mites [61]. The second-stage cuticle is more corrugated than the third-stage cuticle, and some parts of the sheath can be disrupted, providing the spores a good opportunity to adhere to the nematode and be transmitted. The less effective spore dispersal by the nematodes in the sand heaps and across the sand barriers could therefore be well explained by the fact that the abrasive environment could desheath the nematodes, decreasing their ability to transmit the spores. The alternative explanation could lie in differences in foraging strategies of these two nematodes. While *H. bacteriophora* is considered typical cruiser, *S. feltiae* is intermediate species [50]. Surprisingly, no significant difference in nematodes' dispersal was observed between these nematodes and that supports our first hypothesis about the crucial role of sheath. On the other hand, we observed, though it was not systematically evaluated, that after moving quite far from the place of application *S. feltiae*

usually remained still, while *H. bacteriophora* was usually observed in active movement. Higher movement activity of *H. bacteriophora* thus could contribute to its more efficient spore dissemination. The situation in the glass tubes is very similar. There was no significant difference in number of nematodes recovered from different parts of glass tubes between *S. feltiae* and *H. bacteriophora*, but the latter dispersed more spores than *S. feltiae*. The fact that desheathed nematodes transmitted almost no spores while their movement did not differ from ensheathed nematodes in both species highlights the important role of sheath. On the other hand, *S. feltiae* was evidently able to move through the tube with soil and find the host more effectively than *H. bacteriophora* as the mortality of *Galleria* larvae and nematodes' invasion rate in dead *Galleria* were apparently higher in *S. feltiae*. This observation highlights the role of foraging behavior in spore transmission. While *S. feltiae* goes directly and quickly to the host, *H. bacteriophora* cruises more in the soil and disperses the spores more effectively. According to our opinion and based on the results and observations both discussed factors influence the ability of the nematodes to disperse spores. In any case it will be necessary to make series of more specific experiments targeting both on the role of sheath and foraging behavior to further clarify their role in spore transmission by the nematodes.

5. Conclusions

This study explored a new, alternative way for dispersal of entomopathogenic fungi in the environment. The obtained results showed that EPN can enhance the efficiency of fungal dispersal. The level of fungal dissemination depends on the nematode species, spore type and heterogeneity of the environment.

Author Contributions: J.N. and J.K. designed and conducted the experiments, participated in the statistical evaluation, and wrote the manuscript. R.Z. conceived the idea, participated in all the experiments, and wrote part of the manuscript. M.K. performed the image and data analyses. A.B. participated in the evaluation of the fungal concentrations in the glass tubes. V.P. conducted the statistical analyses and revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by National Agency for Agricultural Research (NAZV) Project No. QK1910270.

Acknowledgments: This research was supported by National Agency for Agricultural Research (NAZV) Project No. QK1910270. This manuscript was edited for English language by American Journal Experts (AJE).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Boemare, N.; Akhurst, R.; Mourant, R. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen-nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1993**, *43*, 249–255. [[CrossRef](#)]
2. Poinar, G.O. *Nematodes for Biological Control of Insects*; CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, USA, 1979. [[CrossRef](#)]
3. Gaugler, R.; Lebeck, L.; Nakagake, B.; Bousch, G.M. Orientation of the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae* to carbon dioxide. *Environ. Entomol.* **1980**, *9*, 649–652. [[CrossRef](#)]
4. Lewis, E.E.; Gaugler, R.; Harrison, R. Entomopathogenic nematode host finding: Response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology* **1992**, *105*, 309–315. [[CrossRef](#)]
5. Lewis, E.E.; Gaugler, R.; Harrison, R. Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Can. J. Zool.* **1993**, *71*, 765–769. [[CrossRef](#)]
6. Grewal, P.S.; Gaugler, R.; Selvan, S. Host recognition by entomopathogenic nematodes—Behavioural response to contact with host feces. *J. Chem. Ecol.* **1993**, *19*, 1219–1231. [[CrossRef](#)]
7. O'Halloran, D.M.; Burnell, A.M. An investigation of chemotaxis in the insect parasitic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Parasitology* **2003**, *127*, 375–385. [[CrossRef](#)]

8. Pužza, V.; Mráček, Z.; Nermut, J. Novelty in Pest Control by Entomopathogenic and Mollusc-Parasitic Nematode. In *Integrated Pest Management (IPM): Environmentally Sound Pest Management*; Gill, D.H., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2016; pp. 71–102. [\[CrossRef\]](#)
9. Butt, T.M.; Goettel, M.S. Bioassays of Entomogenous Fungi. In *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*; Navon, A., Ascher, K.R.S., Eds.; CAB International: Wallingford, UK, 2000; pp. 141–195. [\[CrossRef\]](#)
10. Meyling, N.V.; Eilenberg, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol. Control* **2007**, *43*, 145–155. [\[CrossRef\]](#)
11. Hajek, A.E.; St. Leger, R.J. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annu. Rev. Entomol.* **1994**, *39*, 293–322. [\[CrossRef\]](#)
12. Inglis, G.D.; Goettel, M.S.; Butt, T.M.; Strasser, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*; Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N., Eds.; CABI International/AAFC: Wallingford, UK, 2001; pp. 23–69. [\[CrossRef\]](#)
13. Augustyniuk-Kram, A.; Kram, K.J. Entomopathogenic Fungi as an Important Natural Regulator of Insect Outbreaks in Forests (Review). In *Forest Ecosystems-More than Just Trees*; Blanco, J.A., Lo, Y.H., Eds.; InTech: Rijeka, Croatia, 2012; pp. 265–294. [\[CrossRef\]](#)
14. Shah, P.A.; Pell, J.K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 413–423. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Butt, T.M.; Coates, C.J.; Dubovskiy, I.M.; Ratcliffe, N.A. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. In *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*; Lovett, B., St. Leger, R.J., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; pp. 307–364. [\[CrossRef\]](#)
16. Gullan, P.J.; Cranston, P.S. *The Insect: An Outline of Entomology*; Blackwell Science: Hoboken, NJ, USA, 2000; pp. 385–395. ISBN 978-1-118.
17. Roy, H.E.; Pell, J.K. Interactions between Entomopathogenic Fungi and Other Natural Enemies: Implications for Biological Control. *Biocontrol. Sci. Technol.* **2000**, *10*, 737–752. [\[CrossRef\]](#)
18. Meyling, N.V.; Eilenberg, J. Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycol. Res.* **2006**, *11*, 188–195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Meadow, R.; Vandenberg, J.D.; Shelton, A.M. Exchange of Inoculum of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes) Between Adult Flies of the Cabbage Maggot *Delia radicum* L. (Diptera: Anthomyiidae). *Biocontrol Sci. Technol.* **2000**, *10*, 479–485. [\[CrossRef\]](#)
20. Vänninen, I.; Tyni-Juslin, J.; Hokkanen, H. Persistence of augmented *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in Finnish agricultural soils. *BioControl* **2000**, *45*, 201–222. [\[CrossRef\]](#)
21. Enkerli, J.; Widmer, F.; Keller, S. Long-term field persistence of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. *Biol. Control* **2004**, *29*, 115–123. [\[CrossRef\]](#)
22. Zemek, R.; Konopická, J.; Bohatá, A. Inoculation of sphagnum-based soil substrate with entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae). *AIP Conf. Proc.* **2018**, *1954*, 030009-1–030009-5. [\[CrossRef\]](#)
23. Osborne, L.S.; Landa, Z. Biological Control of Whiteflies with Entomopathogenic Fungi. *Fla. Entomol.* **1992**, *75*, 456–471. [\[CrossRef\]](#)
24. De Faria, M.R.; Wraight, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* **2007**, *43*, 237–256. [\[CrossRef\]](#)
25. Jackson, M.A.; Dunlap, C.A.; Jaronski, S.T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl* **2010**, *55*, 129–145. [\[CrossRef\]](#)
26. Zimmermann, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): Biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Sci. Technol.* **2008**, *18*, 865–901. [\[CrossRef\]](#)
27. Avery, P.B.; Wekesa, V.W.; Hunter, W.B.; Hall, D.G.; McKenzie, C.L.; Osborne, L.S.; Powell, C.A.; Rogers, M.E. Effects of the fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) on reduced feeding and mortality of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Biocontrol Sci. Technol.* **2011**, *21*, 1065–1078. [\[CrossRef\]](#)

28. Mascarin, G.M.; Jaronski, S.T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J. Microb. Biotechnol.* **2016**, *32*, 177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Chang, G.C. Comparison of single versus multiple species of generalist predators for biological control. *Environ. Entomol.* **1996**, *25*, 207–212. [[CrossRef](#)]
30. Guetsky, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y.; Dinoor, A. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* **2001**, *91*, 621–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Otsuki, H.; Yano, S. Functionally different predators break down antipredator defenses of spider mites. *Entomol. Exp. Appl.* **2014**, *151*, 27–33. [[CrossRef](#)]
32. Barbercheck, M.; Kaya, H. Competitive interactions between entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina, Hyphomycetes) in soilborne larvae. *Environ. Entomol.* **1991**, *20*, 707–712. [[CrossRef](#)]
33. Ansari, M.A.; Shah, F.A.; Butt, T.M. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. *Entomol. Exp. Appl.* **2008**, *129*, 340–347. [[CrossRef](#)]
34. Ansari, M.A.; Shah, F.A.; Butt, T.M. The entomopathogenic nematode *Steinernema kraussei* and *Metarhizium anisopliae* work synergistically in controlling overwintering larvae of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, in strawberry growbags. *Biocontrol Sci. Technol.* **2010**, *20*, 99–105. [[CrossRef](#)]
35. Hussein, H.M.; Skoková Habuštová, O.; Pužá, V.; Zemek, R. Laboratory evaluation of *Isaria fumosorosea* CCM 8367 and *Steinernema feltiae* Ustinov against immature states of Colorado potato beetle. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152399. [[CrossRef](#)]
36. Shapiro-Ilan, D.I.; Jackson, M.; Reilly, C.C.; Hotchkiss, M.W. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Biol. Control* **2004**, *30*, 119–126. [[CrossRef](#)]
37. Ansari, M.A.; Tirry, L.; Moens, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. *Biol. Control* **2004**, *31*, 172–180. [[CrossRef](#)]
38. Acevedo, J.P.M.; Samuels, R.L.; Machado, I.R.; Dolinski, C. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.* **2007**, *96*, 187–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Tarasco, E.; Santiago Alvarez, C.; Triggiani, O.; Quesada Moraga, E. Laboratory studies on the competition for insect haemocoel between *Beauveria bassiana* and *Steinernema ichnusae* recovered in the same ecological niche. *Biocontrol Sci. Technol.* **2011**, *21*, 693–704. [[CrossRef](#)]
40. Al Mazra'awi, M.S.; Shipp, J.L.; Broadbent, A.B.; Kevan, P.G. Dissemination of *Beauveria bassiana* by honey bees (Hymenoptera: Apidae) for control of tarnished plant bug (Hemiptera: Miridae) on canola. *Environ. Entomol.* **2006**, *35*, 1569–1577. [[CrossRef](#)]
41. Kapongo, J.P.; Shipp, L.; Kevan, P.; Broadbent, B. Optimal concentration of *Beauveria bassiana* vectored by bumble bees in relation to pest and bee mortality in greenhouse tomato and sweet pepper. *BioControl* **2008**, *53*, 797–812. [[CrossRef](#)]
42. Baverstock, J.; Roy, H.E.; Pell, J.K. Entomopathogenic fungi and insect behaviour: From unsuspecting hosts to targeted vectors. *BioControl* **2010**, *55*, 89–102. [[CrossRef](#)]
43. Zhang, Y.X.; Sun, L.; Lin, G.Y.; Lin, J.Z.; Chen, X.; Ji, J.; Zhang, Z.; Sayto, Y. A novel use of predatory mites for dissemination of fungal pathogen for insect biocontrol: The case of *Amblyseius swirskii* and *Neoseiulus cucumeris* (Phytoseiidae) as vectors of *Beauveria bassiana* against *Diaphorina citri* (Psyllidae). *Syst. Appl. Acarol.* **2015**, *20*, 177–187. [[CrossRef](#)]
44. Lin, G.Y.; Tanguay, A.; Guertin, C.; Todorova, S.; Brodeur, J. A new method for loading predatory mites with entomopathogenic fungi for biological control of their prey. *Biol. Control* **2017**, *115*, 105–111. [[CrossRef](#)]
45. White, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* **1927**, *66*, 302–303. [[CrossRef](#)]
46. Zemek, R.; Prenerová, E.; Weyda, F. The first record of entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycota: Hyphomycetes) on the hibernating pupae of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Entomol. Res.* **2007**, *37*, A136.

47. Prenerová, E.; Zemek, R.; Weyda, F.; Volter, L. Strain of Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the Method of Controlling Insect and Mite Pests. U.S. Patent No. 8574566, 5 November 2013.
48. Prenerová, E.; Zemek, R.; Weyda, F.; Volter, L. Strain of Entomopathogenic Fungus *Isaria fumosorosea* CCM 8367 (CCEFO.011.PFR) and the Method for Controlling Insect and Mite Pests. EPO Patent No. EP2313488, 29 April 2015.
49. Gosling, J.; Joy, B.; Steele, G.L., Jr.; Bracha, G. *The Java Language Specification*, 3rd ed.; Addison-Wesley Professional: Santa Clara, CA, USA, 2005; ISBN 0-321-24678-0.
50. Campbell, J.F.; Gaugler, R. Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: Dichotomy or variation along a continuum? *Fundam. Appl. Nematol.* **1997**, *20*, 393–398.
51. Gleich, J.G.; Gilbert, F.F.; Kutscha, N.P. Nematodes in terrestrial gastropods from central Maine. *J. Wildl. Dis.* **1977**, *13*, 43–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Chase, A.; Osborne, L.; Ferguson, V. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. *Fla. Entomol.* **1986**, *69*, 285–292. [[CrossRef](#)]
53. Smagghe, G.; De Meyer, L.; Meeus, I.; Mommaerts, V. Safety and acquisition potential of *Metarhizium anisopliae* in entomovectoring with bumble bees, *Bombus terrestris*. *J. Econ. Entomol.* **2013**, *106*, 277–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lin, G.; Guertin, C.; Di Paolo, S.; Todorova, S.; Brodeur, J. Phytoseiid predatory mites can disperse entomopathogenic fungi to prey patches. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 19435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wu, S.Y.; Wang, P.X.; Zhang, Z.K.; Xu, X.N.; Lei, Z.R. Capability of the predatory mite in carrying conidia of *Beauveria bassiana* and conidia vitality and virulence to *Frankliniella occidentalis*. *Sci. Agric. Sin.* **2014**, *47*, 3999–4006.
56. Wu, S.; Gao, Y.; Smagghe, G.; Xua, X.; Lei, Z. Interactions between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and the predatory mite *Neoseiulus barkeri* and biological control of their shared prey/host *Frankliniella occidentalis*. *Biol. Control* **2016**, *98*, 43–51. [[CrossRef](#)]
57. Wu, S.Y.; El-Borai, F.E.; Graham, J.H.; Duncan, L.W. Saprophytic fungus *Fusarium solani* increases the insecticidal efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi*. *J. Invertebr. Pathol.* **2018**, *159*, 87–94. [[CrossRef](#)]
58. Campbell, L.R.; Gaugler, R. Mechanisms for exsheathment of entomopathogenic nematodes. *Int. J. Parasit.* **1991**, *21*, 219–224. [[CrossRef](#)]
59. Womersley, C.Z. Dehydration survival and anhydrobiotic potential. In *Entomopathogenic Nematodes for Biological Control*; Gaugler, R., Kaya, H.K., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1990; p. 123. [[CrossRef](#)]
60. Timper, P.; Kaya, H.K. Role of the second-stage cuticle of entomogenous nematodes in preventing infection by nematophagous fungi. *J. Invertebr. Pathol.* **1989**, *54*, 314–321. [[CrossRef](#)]
61. Epsky, N.D.; Walter, D.E.; Capinera, J.L. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors on entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *J. Econ. Entomol.* **1988**, *81*, 821–825. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

6 Závěr

Na základě výsledků popsaných v této dizertační práci byly všechny cíle splněny a závěry lze shrnout do následujících bodů:

- Pomocí selektivního média na bázi dodine byly z půdních vzorků z České republiky a Izraele vyizolovány kmeny EPH spadající do rodů: *Metarhizium* sp., *Beauveria* sp., *Isaria* sp., *Lecanicilium* sp. a *Purpureocillium* sp.
- Identifikace EPH byla provedena pomocí morfologických a mikroskopických vlastností a pomocí genetické analýzy. Byly identifikovány druhy EPH: *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium brunneum*, *Metarhizium indigoticum*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium muscarium* a *Purpureocillium lilacinum*.
- Nejvyšší účinnost (téměř 100 %) proti roztoči *Rhizoglyphus robini* byla zjištěna u kmenů *Metarhizium anisopliae* izolovaných z půdních vzorků z České republiky a u kmene *Metarhizium indigoticum* z Izraele.
- Kmen EPH *I. fumosorosea* CCM 8367 vykázal nízkou virulenci proti larvám zavíječe zimostřezového (*Cydalima perspectalis*).
- Houba *Beauveria bassiana* BBA 08 byla velmi efektivní proti dospělcům mandelinky bramborové.
- Bylo vyvinuto jednoduché laboratorní zařízení pro aplikaci suspenze spor hub do substrátu.
- Podařilo se optimalizovat proces maloobjemové submerzní kultivace houby *I. fumosorosea* kmene CCM 8367.
- Houba *I. fumosorosea* CCM 8367 byla schopná po dobu 6. měsíců v substrátu přežít a sloužit jako preventivní ochrana vůči půdním škůdcům.
- Šíření spor *I. fumosorosea* CCM 8367 v pokusných arénách je efektivnější za přítomnosti entomopatogenních hlístic.
- Účinněji se šíří blastospory houby, pravděpodobně z důvodu schopnosti vázat vodu (hydrofilní vlastnosti).

Výzkumné hypotézy

Hypotéza 1

Znění hypotézy: Diverzita kmenů hub je natolik vysoká, že je možné vyizolovat z půdy nový (virulentní) kmen entomopatogenní houby s novými vlastnostmi.

Potvrzení/zamítnutí hypotézy: Výsledky provedených experimentů **potvrdily** výše uvedenou hypotézu. Podařilo se vyizolovat z půdy velmi virulentní kmen, který způsobil téměř 100% mortalitu v populaci roztoče *Rhizoglyphus robini*.

Hypotéza 2

Znění hypotézy: Entomopatogenní houby redukují populace škodlivých činitelů.

Potvrzení/zamítnutí hypotézy: Výsledky provedených experimentů **potvrdily i zamítly** výše uvedenou hypotézu. Ne všechny entomopatogenní houby mohou efektivně redukovat populace škodlivých činitelů. *Isaria fumosorosea* CCM 8367 nebyla účinná proti zavíječi zimostrázovému naopak *Beauveria bassiana* BBA 08 vykazovala vysokou efektivitu proti mandelince bramborové.

Hypotéza 3

Znění hypotézy: Pomocí záměrné inokulace kmene entomopatogenní houby lze zvýšit supresivitu půdy.

Potvrzení/zamítnutí hypotézy: Výsledky provedených experimentů **potvrdily** výše uvedenou hypotézu. Podařilo se nainokulovat půdní substrát o houbu *Isaria fumosorosea* CCM 8367, která byla schopná v substrátu přežít více jak 6 měsíců a tím se zvýšila půdní supresivita.

Hypotéza 4

Znění hypotézy: Hlístice mohou šířit spory entomopatogenních hub v životním prostředí.

Potvrzení/zamítnutí hypotézy: Výsledky provedených experimentů **potvrdily** výše uvedenou hypotézu. Šíření spor houby *Isaria fumosorosea* CCM 8367 bylo efektivnější za přítomnosti entomopatogenních hlístic.

7 Seznam použité literatury

- Alves F.M., Bernardo C.C., Paixão F.R.S., Barreto L.P., Luz Ch., Humber R.A., Fernandes É.K.K. (2017): Heat-stressed *Metarhizium anisopliae*: viability (*in vitro*) and virulence (*in vivo*) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasitology Research*, 116: 111-121.
- Arthurs S., Thomas M.B. (2001a): Effect of dose, pre-mortem host incubation temperature and thermal behaviour on host mortality, mycosis and sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in *Schistocerca gregaria*. *Biocontrol Science and Technology*, 11: 411-420.
- Arthurs S., Thomas M.B. (2001b): Effects of Temperature and Relative Humidity on Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in Mycosed Cadavers of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 59-65.
- Augustyniuk-Kram A., Kram K.J. (2012): Entomopathogenic Fungi as an Important Natural Regulator of Insect Outbreaks in Forests (Review). In: Forest Ecosystems - More than Just Trees, Dr Juan A. Blanco (Ed.), 265-282.
- Bailey A., Chandler D., Grant W.P., Greaves J., Prince G., Tatchell M. (2010): Biopesticides: pest management and regulation. *CAB International, Wallingford, UK*, 71-131.
- Bale J.S, van Lenteren J.C., Bigler F. (2007): Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363: 761-776.
- Bamisile B.S., Akutse K.S., Siddiqui J.A., Xu Y. (2021): Model Application of Entomopathogenic Fungi as Alternatives to Chemical Pesticides: Prospects, Challenges, and Insights for Next-Generation Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 12:741804.
- Behie S.W., Padilla-Guerrero I.E., Bidochka M.J. (2013): Nutrient transfer to plants by phylogenetically diverse fungi suggests convergent evolutionary strategies in rhizospheric symbionts. *Communicative & Integrative Biology*, 6(1): e22321.
- Bidochka M.J. (2001): Monitoring the fate of biocontrol fungi. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds.): Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. *CABI, Wallingford, Oxon, United Kingdom*, 193-218.
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A. (2009): A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101: 512-530.
- Boucias D.G., Pendland J.C. (1991): Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial event. of mycoses in arthropod hosts. In: Cole G.T., Hoch H.C. (Eds.): The fungal spore and diseases in plants and animals. *Plenum, New York*, 101- 128.

- Boucias D.G., Pendland J.C., Latgé J.P. (1988): Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied Environmental Microbiology*, 54: 1795-1805.
- Braga G.U.L., Flint S.D., Messias C.L., Anderson A.J., Roberts D.W. (2001a): Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 105: 874-882.
- Braga G.U.L., Flint S.D., Miller Ch.D., Anderson A.J., Roberts D.W. (2001b): Variability in response to UV-B among Species and Strains of *Metarhizium* Isolated from Sites at Latitudes from 61°N to 54°S. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 98-108.
- Braga G.U.L., Flint S.D., Messias C.L., Anderson A.J., Roberts D.W. (2001c): Effects of UVB Irradiance on Conidia and Germinants of the Entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: A Study of Reciprocity and Recovery. *Photochemistry and Photobiology*, 73: 140-146.
- Brooks W.M. (1988): Entomogenous Protozoa. Handbook of Natural Pesticides, Microbial insecticides, Part A. In: Ignoffo C.M., Mandava N.B. (Eds): Entomogenous Protozoa and Fungi, *CRC Press, Boca Raton, V: 1-149*.
- Brunner-Mendoza C., Navarro-Barranco H., León-Mancilla B., Pérez-Torres A., Toriello C. (2017): Biosafety of an entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* in an acute dermal test in rabbits. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 36: 12-18.
- Bugeme D.M., Maniania N.K., Knapp M., Boga H.I. (2008): Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*. *Experimental and Applied Acarology*, 46: 275-285.
- Butt T.M., Goettel M.S. (2000): Bioassays of Entomopathogenous fungi. In: Navon, A., Ascher, K.R.S. (Eds.): Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. *CAB International, Wallingford, UK, 95-140*.
- Cabanillas H.E., Jones W.A. (2009): Effects of Temperature and Culture Media on Vegetative Growth of an Entomopathogenic Fungus *Isaria* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae) Naturally Affecting the Whitefly, *Bemisia tabaci* in Texas. *Mycopathologia*, 167: 263-271.
- Chandler D., Bailey A.S., Tatchell G.M., Davidson G., Greaves J., Grant W.P. (2011): The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 1573: 1987-1998.
- Clarkson J.M., Charnley A.K. (1996): New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4: 197-203.

- Cooke J.R., Bruckart W.L., Coulson J.R., Goettel M.S., Humber R.A., Lumsden R.D., Maddox J.V., McManus M.L., Moore L., Meyer S.F., Quimby P.C., Stack J.P., Vaughn J.L. (1996): Safety of Microorganisms Intended for Pest and Plant Disease Control: A Framework for Scientific Evaluation. *Biological Control*, 7: 333-351.
- Da Silva W.O.B., Santi L., Schrank A., Vainstein M.H. (2010): *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infection. *Fungal Biology*, 114: 10-15.
- Dara K.S. (2018): Entomopathogenic microorganisms: modes of action and role in IPM. Dostupné online 11. 10. 2021 na <https://ucanr.edu/blogs/strawberries-vegetables/index.cfm?start=15>.
- De Carolina Sánchez-Pérez L., Barranco-Florido J.E., Rodríguez-Navarro S., Cervantes-Mayagoitia J.F., Ramos-López M.A. (2014): Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research*, 2: 65-76.
- De Faria M.R., Wraight S.P. (2007): Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237-256.
- Dogan Y.O., Hazir S., Yildiz A., Butt T.M., Cakmak I. (2017): Evaluation of entomopathogenic fungi for the control of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and the effect of *Metarhizium brunneum* on the predatory mites (Acari: Phytoseiidae). *Biological Control*, 111: 6-12.
- Dreistadt S.H. (2007): Biological control and natural enemies: Integrated pest management for home gardeners and landscape professionals. *University of California*, 7 p.
- Driesche V., Heinz R.G. (2004): An overview of biological control in protected culture. *Ball Publishing, Batavia*, 1-24.
- Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. (2001): Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*, 46: 387-400.
- EPA: Definice IOR podle EPA, dostupné on-line 06. 10. 2021 na <https://www.epa.gov/ipm/introduction-integrated-pest-management>.
- Falta V. (2018): Přípravky a metody pro ochranu v ekologické a bezreziduální produkci. *Agromanuál*, 3: 64-69.
- FAO: Definice IOR podle FAO, dostupné on-line 06. 10. 2021 na <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/en/>.
- Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G. (1994): Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 3-34.

- Fernandes E.K.K., Rangel D.E.N., Moraes Á.M.L., Bittencourt V.R.E.P., Roberts D.W. (2007): Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 69-78.
- Ferreira T., Malan A.P. (2014): *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, bacterial symbionts of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* and *Heterorhabditis* and their in vitro liquid mass culture: a review. *African Entomology*, 22: 1-14.
- Ferron P. (1978): Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Fungi. *Annual Review of Entomology*, 23: 409-442.
- Flint M.L., Dreistadt S.H. (1998): Natural Enemies Handbook: The Illustrated Guide to Biological Pest Control. *University of California Integrated Pest Management Program*, 1-31.
- Gani M., Hassan T., Saini P., Gupta R.K., Bali K. (2019): Molecular phylogeny of entomopathogens. In: Khan M.A., Ahmad W. (Eds.): Microbes for Sustainable Insect Pest Management, An Eco-friendly Approach - Volume 1. *Springer Nature Switzerland AG*, 43-51.
- Gillespie J.P., Bateman R., Charnley A.K. (1998). Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 128-137.
- Greathead D.J. (1976): A review of biological control in western and southern Europe. Technical communication. *Farnham Royal, UK: Commonwealth Institute of Biological Control*, 182: 7.
- Gul H.T., Saeed S., Khan F.Z.A. (2014): Entomopathogenic Fungi as Effective Insect Pest Management Tactic: A Review. *Applied Sciences and Business Economics*, 1(1): 10-18.
- Hajek A.E., Eilenberg J. (2018): Natural Enemies: an introduction to biological control. *Cambridge University Press, second edition*, 22-33.
- Hajek A.E. (2004): Natural enemies: an introduction to biological control. *Cambridge university press, UK*, 378 p.
- Hall R.A. (1976): A bioassay of the pathogenicity of *Verticillium lecanii* on the aphid, *Macrosiphoniella sanborni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27: 41-48.
- Hallsworth J.E., Magan N. (1999): Water and Temperature Relations of Growth of the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74: 261-266.
- Helyer N., Cattlin N.D., Brown K.C. (2014): Biological control in plant protection. *CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, an Informa business*, 27 p.
- Helyer N., Brown K. Cattlin N.D. (2003): Biological control in plant protection. *Manson publishing, London*, 126 p.

- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F. (2007): A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological research*, 111: 509-547.
- Hoffmann M.P., Frodsham A.C. (1993): Natural enemies of vegetable insect pests. *Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY*, 63 p.
- Honěk A., Lukáš J., Martinková Z., Pultar O., Řezáč M. (2008): Význam predátorů a parazitoidů v integrovaných systémech ochrany rostlin. *Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně*, 64 p.
- Hnízdil M. (2014a): Integrovaná ochrana rostlin je od roku 2014 v Evropské unii povinná. *Rostlinolékař*, 1: 32-33.
- Hnízdil M. (2014b): Legislativní změny v oblasti ochrany rostlin v roce 2014. *Agromanuál*, 1: 70-71.
- Hu G., St. Leger R.J. (2002): Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere Competent. *Applied and Environmental Ecology*, 68: 6383-6387.
- Humber R.A., Hansen K.S., Wheeler M.M. (2009): *Isaria, Paecilomyces, Evlachovaea* and *Nomuraea*, fully indexed. USDA-ARS Biological Integrated Pest Management Research Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, New York, 66 p.
- Humber R.A. (2008): Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 262-266.
- Hussain A., Tian M.Y., He Y.R., Ruan L., Ahmed S. (2010): *In vitro* and *in vivo* culturing impacts on the virulence characteristics of serially passed entomopathogenic fungi. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(3&4): 481-487.
- Ibrahim M.A., Griko N., Junker M., Bulla L.A. (2010): *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1): 31-50.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H. (2001): Use of hyphomycetes fungi for managing insect pests. In: Butt T.M., Jackson C., Magan N. (Eds): Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. *CAB International, Wallingford, UK*, 23-69.
- Inglis G.D., Goettel M.S., Johnson D.L. (1995): Influence of Ultraviolet Light Protectants on Persistence of the Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana*. *Biological Control*, 5: 581-590.
- Jaronski S.T., Jackson M.A. (2008): Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology*, 18: 849-863.

- Jaronski S.T. (2007): Soil ecology of the entomopathogenic Ascomycetes: A critical examination of what we (think) we know. In: Ekesi S., Maniania N.K. (Eds.): Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. *Research Signpost, Kerala*, 91-143.
- Jarrold S.L., Moore D., Potter U., Charnley A.K. (2007): The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. *Mycological Research*, 111: 240-249.
- Kabiček J. (2004): Tlumení výskytu škůdců pomocí biologických metod. Dostupné online 11. 10. 2021 na <https://www.zahradaweb.cz/tlumeni-vyskytu-skudcu-pomoci-biologickych-metod/>.
- Kachhawa D. (2017): Microorganisms as a biopesticides. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3): 468-473.
- Kaczmarek A., Boguś M.I. (2021): Fungi of entomopathogenic potential in Chytridiomycota and Blastocladiomycota, and in fungal allies of the Oomycota and Microsporidia. *IMA Fungus*, 12: 29.
- Kaya H.K., Gaugler R. (1993): Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.
- Kim J.S., Choi J.Y., Skinner M., Parker B.L. (2013): An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science*, 69(5): 576-581.
- Kope H.H., Alfaro R.I., Lavallée R. (2007): Effects of temperature and water activity on *Lecanicillium* spp. conidia germination and growth, and mycosis of *Pissodes strobi*. *Biocontrol*, 53: 489-500.
- Koppert BV (2021): Mycotal: *Lecanicillium muscarium*. Dostupné online 15. 10. 2021 na https://www.koppert.co.uk/content/uk/Documents/MYCOTAL_UK_label.pdf.
- Koul O. (2011): Microbial biopesticides: opportunities and challenges. CAB Reviews: *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 6, 056: 26 p.
- Kubátová A. (2017): Entomopatogenní houby - nerovný souboj. *Živa*, 5: 250-254.
- Lacey L.A., Georgis R. (2012): Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, 44(2): 218-225.
- Landa Z., Bohatá A., Kalista M. (2008): Záměrné využívání autochtonních kmenů vybraných druhů entomopatogenních hub. *Jihočeská univerzita, České Budějovice*, 47 p.

- Landa Z., Křenová Z., Vojtěch O. (2007): Využití houby *Beauveria bassiana* v ochraně proti lýkožroutu smrkovému. *Lesnická práce*, 86: 10/07.
- Landa Z. (2002): Biologická ochrana zahradních rostlin proti chorobám a škůdcům v polních podmínkách, ve sklenících a fóliovnících. In: Demo M., Hričovský I. (Eds.): Trvalo udržitelné technologie v záhradnictve. *Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*, 225-280.
- Landa Z. (1994): Entomopatogenní houby v biologické ochraně rostlin (habilitační práce). *ZF JU, České Budějovice*, 14-50.
- Liu S.D., Lin S.C., Shiau J.F. (1989): Microbial control of coconut leaf beetle (*Brontispa longissima*) with green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53: 307-314.
- Lovett B., St. Leger R.J. (2017): The Insect Pathogens. *Microbiology Spectrum*, 5/2.
- Lovett B., St. Leger R.J. (2015): Stress is the rule rather than the exception for *Metarhizium*. *Current Genetics*, 61: 253-261.
- Meyling N.V., Eilenberg J. (2007): Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43: 145-155.
- Moayeri H.R.S., Ashouri A., Brodsgaard H.F., Enkegaard A. (2006): Odour-mediated preference and prey preference of *Macrolophus caliginosus* between spider mites and green peach aphids. *Journal of Applied Entomology*, 130: 504-508.
- Mohammadbeigi A. (2013): Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) passaged through artificial media and an insect host *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 6(16): 1147-1152.
- Mora M.A.E., Castilho A.M.C., Fraga M.E. (2017): Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84: 1-10.
- Nafiu B.S., Dong H., Cong B. (2014): Principles of biological control in integrated pest management. *International Journal of Applied Research and Technology*, 3(11): 104-106.
- Naranjo-Ortiz M.A., Gabaldón T. (2019): Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 94(6):2101-2137.
- Navrátilová M. (2015a): Uplatňování systému integrované ochrany rostlin v souvislosti se změnou legislativy (27). Biologická ochrana rostlin jako nedílná součást principů IOR (1). *Agromanuál*, 7: 42-46.

- Navrátilová M. (2015b): Uplatňování systému integrované ochrany rostlin v souvislosti se změnou legislativy (28). Biologická ochrana rostlin jako nedílná součást principů IOR (2). *Agromanuál*, 8: 42-46.
- Omkar O., Kumar B. (2016): Biocontrol of Insect Pests. In: Omkar O. (Ed.): Ecofriendly pest management for food security. *Elsevier Inc., Academic Press*, 25- 61.
- Ondráčková E., Ondřej M., Seidenglanz M., Havel J., Plachká E. (2017): Entomopatogenní houby v ochraně rostlin proti škůdcům. *Agromanuál*, 6: 42-44.
- Osborne L.S., Bolckmans K., Landa Z., Peña J. (2004): Kinds of natural enemies. In: Heinz K.M., van Driesche R.G., Parrella P. (Eds.): Biocontrol in protected culture. *Ball Publishing, Batavia*, 95-128.
- Ouedraogo R.M., Cusson M., Goettel M.S., Brodeur J. (2003): Inhibition of fungal growth in thermoregulating locusts, *Locusta migratoria*, infected by the fungus *Metarhizium anisopliae* var *acridum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82: 103- 109.
- Ownley B.H., Gwinn K.D., Vega F.E. (2010): Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl*, 55: 113- 128.
- Parker B.L., Skinner M., Gouli V., Brownbridge M. (1997): Impact of Soil Applications of *Beauveria bassiana* and *Mariannaea* sp. on Nontarget Forest Arthropods. *Biological Control*, 8: 203-206.
- Pedrini N., Crespo R., Juárez M.P. (2007): Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146: 124-137.
- Pell J.K., Hannam J.J., Steinkraus D.C. (2010): Conservation biological control using fungal Entomopathogens. *BioControl*, 55: 187-198.
- Procházka T. (2019): Chemická VS. biologická ochrana rostlin. Dostupné online 06. 10. 2021 na <https://eagronom.com/cs/blog/chemicka-biologicka-ochrana-rostlin/>.
- Ravensberg W.J. (2010): The development of microbial pest control products for control of arthropods: a critical evaluation and a roadmap to success. *PhD Thesis Wageningen University, NL*, 45-98.
- Rehner S.A., Minis A.M., Sung G.H., Luangsa-ard J.J., Devotto L., Humber R.A. (2011): Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103: 1055-1073.
- Roberts D.W., St. Leger R.J. (2004): *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in applied microbiology*, 54: 1- 70.

- Roberts D.W., Humber R.A. (1981): Entomogenous fungi. In: Cole G.T., Kendrick B. (Eds.): Biology of conidial fungi. *Academic Press, New York*, 201-236.
- Roy H.E., Vega F.E., Chandler D., Goettel M.S., Pell J.K., Wajnberg E. (2010): The ecology of fungal entomopathogens. *Springer Dordrecht Heidelberg London New York*, 147-158.
- Roy H.E., Cottrell T.E. (2008): Forgotten natural enemies: Interactions between coccinellids and insect-parasitic fungi. *European Journal of Entomology*, 105: 391-398.
- Samson R.A. (1974): *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6: 1-43.
- Santi L., Silva W.O.B., Pinto A.F.M., Schrank A., Wainstein M.H. (2010): *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology*, 114: 312-319.
- Santos A.H., Tai M.H.H., Rocha L.F.N., Silva H.H.G., Luz Ch. (2009): Dependence of *Metarhizium anisopliae* on high humidity for ovicidal activity on *Aedes aegypti*. *Biological Control*, 50: 37-42.
- Schaerffenberg B. (1968): Untersuchungen über die Wirkung der insektentötenden Pilze *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. und *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. auf Warmblütler. *Entomophaga* 13: 175-182.
- Shah P.A., Pell J.K. (2003): Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 413-423.
- Shahid A.A., Rao A.Q., Bakhsh A., Husnain T. (2012): Entomopathogenic fungi as biological controllers: New insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences*, 64: 21-42.
- Sharma L., Bohra N., Rajput V.D., Quiroz-Figueroa F.R., Singh R.K., Marques G. (2021): Advances in Entomopathogen Isolation: A Case of Bacteria and Fungi. *Microorganisms*, 9(1): 16.
- Shinde S.V., Patel K.G., Purohit J.R., Pandya J.R., Sabalpara A.N. (2010): "Lecanicillium lecanii (zimm.) zare and games" an important biocontrol agent for the management of insect pests – a review. *Agricultural Review*, 31(4): 235-252.
- Směrnice evropského parlamentu a rady 2009/128/ES. Dostupné online 06. 10. 2021 na: <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0071:0086:CS:PDF>.
- Smith R.J., Pekrul S., Gula E.A. (1981): Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm. *Journal of invertebrate pathology*, 38: 335-344.

- Solter L.F., Becnel J.J. (2000): Entomopathogenic microsporidia. Field manual of Technique in Invertebrate Pathology. In: Lacey L.A., Kaya H.K. (Eds): Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and other Invertebrate Pests. *Kluwer Academic, Dordrecht*, 231-254.
- Song T.T., Feng M.G. (2010): *In vivo* passages of heterologous *Beauveria bassiana* isolates improve conidial surface properties and pathogenicity to *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 211- 216.
- St. Leger R.J., Joshi L., Bidochka M.J., Roberts D.W. (1996): Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 93: 6349-6354.
- Stern V.M., Smith R.F., van den Bosch R., Hagen K.S. (1959): The integrated control concept. *Hilgardia*, 29: 81-101.
- Sung G.H., Hywel-Jones N.L., Sung J.M., Luangsa-Ard J.J., Shrestha B., Spatafora J.W. (2007): Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in mycologi*, 57: 5-59.
- Sutanto K.D., Husain M., Rasool K.G., Al-Qahtani W.H., Aldawood A.S. (2021): Pathogenicity of local and exotic entomopathogenic fungi isolates against different life stages of red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). *PLoS ONE*, 16(7): e0255029.
- Tanada Y., Kaya H.K. (1993): Insect Pathology. *San Diego: Academic Press*, 318- 366.
- Thompson S.R., Brandenburg R.L., Arends J.J. (2006): Impact of moisture and UV degradation on *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin conidial viability in turfgrass. *Biological Control*, 39: 401-407.
- Tiago P.V., de Oliveira N.T., de Luna-Alves Lima E.A. (2014): Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects. *Ciencia Rural*, 44: 645-651.
- Tichá K. (2001): Biologická ochrana rostlin. *Grada Publishing, Praha*, 88 p.
- Van Lenteren J.C. (2012). IOBC Internet Book of Biological Control, version 6. Dostupné online 11. 10. 2021 na http://www.iobc-global.org/download/IOBC_InternetBookBiCoVersion6Spring2012.pdf.
- Van Lenteren J.C., Woets J. (1988): Biological and integrated pest control in greenhouses. *Annual Review of Entomology*, 33: 239-269.
- Varela A., Morales E. (1995): Characterization of Some *Beauveria bassiana* Isolates and Their Virulence toward the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 147-152.

- Vávra J. (2017): Mikrosporidie: houby, co nevypadají jako houby, aneb Sestry říše Fungi? *Živa* 5: 257-261.
- Vega F.E. (2008): Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 277-279.
- Vega F.E. (2007): Naming names: The etymology of fungal entomopathogens. In: Ekesi S., Maniania N.K. (Eds.): Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. *Research Signpost, Kerala*, 1-11.
- Věchet L., Havelka F., Hanzalová J., Kolomazník K., Vrchotová N. (2014): Rostlinné extrakty a jejich využití proti chorobám a škůdcům. *Úroda*, 9: 28-31.
- Vidal C., Fargues J. (2007): Climatic constraints for fungal bioinsecticides. In: Ekesi S., Maniania N.K. (Eds.): Use of Entomopathogenic Fungi in Biological Pest Management. *Research Signpost, Kerala*, 91-143.
- Vyhláška o obecných zásadách integrované ochrany rostlin, 205/2012 Sb. Dostupné online 06. 10. 2021 na <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/cze126461.pdf>.
- Wang C.S., Hu G., St Leger R.J. (2005): Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 704-718.
- Weiser J. (1966): Houbové onemocnění hmyzu. In: Weiser J. (Ed.): Nemoci hmyzu. *Academia, Praha*, 286-290.
- Zare R., Gams W. (2001): A revision of *Verticillium* section prostrata. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. *Nova Hedwigia*, 73: 1-50.
- Zhang Z.Q. (2003): Mites of Greenhouses: Identification, Biology and Control. *CABI Publishing, Wallingford, UK*, 203-208.
- Zimmermann G. (2008): The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*, 18(9): 865-901.
- Zimmermann G. (2007a): Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553- 596.
- Zimmermann G. (2007b): Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 879-920.

8 Seznam vlastních publikovaných prací

Články v impaktovaných časopisech

1. Zemek R., **Konopická J.**, Ul Abdin Z. (2020) Low efficacy of *Isaria fumosorosea* against box tree moth *Cydalima perspectalis*: Are host plant phytochemicals involved in herbivore defence against fungal pathogens? *Journal of Fungi* 6: 342. DOI: 10.3390/jof6040342
(metodika, vyhodnocení výsledků, příprava publikace)
2. Nermuť J., **Konopická J.**, Zemek R., Kopačka M., Bohatá A., Půža V. (2020) Dissemination of *Isaria fumosorosea* spores by *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Fungi* 6: 359. DOI: 10.3390/jof6040359
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, příprava publikace)
3. **Konopická J.**, Bohatá A., Nermuť J., Jozová E., Mráček Z., Palevsky E., Zemek R. (2021) Efficacy of soil isolates of entomopathogenic fungi against the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae). *Systematic and Applied Acarology* 26: 1149–1167. DOI: 10.11158/saa.26.6.11
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)
4. Mráz P., Hýbl M., Kopecký M., Bohatá A., **Konopická J.**, Hoštičková I., Konvalina P., Šipoš J., Rost M., Čurn V. (2021) The Effect of Artificial Media and Temperature on the Growth and Development of the Honey Bee Brood Pathogen *Ascospaera apis*. *Biology* 10(5): 431. DOI: 10.3390/biology10050431
(vyhodnocení výsledků)
5. Zemek R., **Konopická J.**, Jozová E., Skoková Habušťová O. (2021) Virulence of *Beauveria bassiana* strains isolated from cadavers of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insects* 12: 1077. DOI: 10.3390/insects12121077
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)
6. Půža V., Nermuť J., **Konopická J.**, Skoková Habušťová O. (2021) Efficacy of the applied natural enemies on the survival of Colorado Potato Beetle adults. *Insects* 12: 1030. DOI: 10.3390/insects12111030
(metodika, vyhodnocení výsledků)
7. **Konopická J.**, Bohatá A., Palevsky E., Nermuť J., Půža V., Zemek R. (2021) Survey of entomopathogenic and mycoparasitic fungi in the soil of onion and garlic fields in the Czech Republic and Israel. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Early View. DOI: 10.1007/s41348-021-00557-5
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)

Články v recenzovaných časopisech

1. **Konopická J.**, Bohatá Andrea, Vondruška J., Kročáková J., Olšan Pavel, Havelka Zbyněk, Bartos P., Kríž P., Čurn Vladislav, Špatenka P. (2016) Navýšení účinnosti entomopatogenní houby *Metarhizium anisopliae* na vybrané druhy hostitelů. *Úroda* 64: 245-248.
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)
2. **Konopická J.**, Zemek R., Bohatá A., Nermuť J., Mráček Z., Palevsky E., Čurn V. (2017) Možné využití entomopatogenních hub proti roztoči *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae). *Úroda* 65: 73-80.
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)
3. Havelka Z., Olšan P., Strejčková M., Bohatá A., Kríž P., Bartoš P., Čurn V., Špatenka P., **Konopická J.** (2017) Vliv plazmatu na klíčivost modelové houby *Trichoderma virens*. *Úroda* 65: 291-294.
(vyhodnocení výsledků)
4. Bohatá A., Tichá E., **Konopická J.**, Strejčková M., Olšan P., Havelka Z., Kríž P., Bartoš P., Čurn V., Špatenka P. (2017) Vliv biologického ošetření osiva ječmene na klíčení obilek a mortalitu larev *Tenebrio molitor* po vysetí osiva do substrátu. *Úroda* 65: 283-286.
(vyhodnocení výsledků)
5. Mráz P., Bohatá A., **Konopická J.**, Čurn V. (2018) Vliv živné půdy a teploty na radiální růst entomopatogenní houby *Ascospaera apis* způsobující onemocnění včelího plodu. *Úroda* 66: 235-238.
(vyhodnocení výsledků)
6. **Konopická J.**, Zemek R., Bohatá A., Palevsky E. (2018) Výskyt entomopatogenních hub v půdách česnekových a cibulových kultur Čech a Izraele a charakteristika vybraných izolátů. *Úroda* 66: 213-217.
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)
7. **Konopická J.**, Sandala D., Bohatá A., Mráz P. (2018) Teplotní profil růstu a produkce spor entomopatogenní houby *Metarhizium Brunneum*. *Úroda* 66: 209-212.
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)

Články ve sborníku

1. Zemek R., **Konopická J.**, Půža V., Bohatá A., Hussein H. M., Skoková Habuštová O. (2017) Microbial and nematode control of the Colorado potato beetle. *Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests*. IOBC/WPRS Bulletin 129: 157-161.
(metodika, design a vyhodnocení výsledků)

2. **Konopická J.**, Bohatá A., Zemek R., Čurn V. (2017) The effects of natural substrates and artificial media on the production of conidiospores and blastospores of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*, strain CCM 8367 *Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests*. IOBC/WPRS Bulletin 129: 58-64.
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)

3. Zemek R., **Konopická J.**, Bohatá A. (2018) Inoculation of sphagnum-based soil substrate with entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae). *AIP Conference Proceedings* 1954: 030009-1–030009-5. DOI: 10.1063/1.5033389
(vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)

4. Zemek R., **Konopická J.**, Bohatá A., Nermuť J., Mráček Z., Palevsky E. (2018) Susceptibility of the bulb mite *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae) to entomopathogenic fungi. *IOBC-WPRS Bulletin* 134: 33-37.
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)

5. **Konopická J.**, Zemek R., Bohatá A., Nermuť J., Mráček Z., Palevsky E., Čurn V. (2018) Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi against the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae). XV International Congress of Acarology, 2-8 Sept. 2018, Antalya, Turkey. Abstract Book 40.
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)

6. Zemek R., Nermuť J., **Konopická J.**, Palevsky E., Bohatá A., Mráček Z., Půža V. (2019) Microbial and nematode control of the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae). 7th IOBC Working group meeting "INTEGRATED CONTROL OF PLANT-FEEDING MITES"; 16–19 September 2019, Vienna, Austria. Book of Abstracts. 26.
(metodika, design a vyhodnocení výsledků)

7. Mráz P., Bohatá A., **Konopická J.**, Hoštičková I., Čurn V. (2019) Effect of artificial media and temperature on the growth and development of bee brood pathogen *Ascosphaera apis* and optimization its cultivation in vitro. SIP/IOBC, Valencia, Spain, 28.7.-3.8.2019 102-103.
(vyhodnocení výsledků)

8. **Konopická J.**, Zemek R., Bohatá A., Nermuť J., Mráček Z., Palevsky E. (2019) Entomopathogenic fungi as biocontrol agent against the bulb mite, *Rhizoglyphus robini*. SIP/IOBC, Valencia, Spain, 28.7.-3.8.2019. 104.
(metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)

9. Zemek R., Nermuť J., **Konopická J.**, Palevsky E., Bohatá A., Mráček Z., Půža V. (2020) Microbial and nematode control of the bulb mite, *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae). IOBC-WPRS Bulletin 67-68. (metodika, design a vyhodnocení výsledků, shromáždění dostupné literatury, příprava publikace)

Funkční vzorky

1. Zemek R., **Konopická J.**, Bohatá A., Horňák P., Jináček M. (2017) Výsevni substrát s entomopatogenní houbou *Isaria fumosorosea* kmene CCM 8367. Funkční vzorek 1-7.
2. Zemek R., Nermuť J., **Konopická J.**, Bohatá A. (2018) Půdní přípravek na bázi *Isaria fumosorosea* a *Steinernema feltiae*. Funkční vzorek TG02010034_2021_Duoefekt_Zemek: 1-8.

Užitné vzory

1. Zemek R., Nermuť J., **Konopická J.**, Bohatá A. (2018) Insekticidní a akaricidní aditivum do nosného substrátu pro pěstování rostlin. Užitný vzor č. 32259. Úřad průmyslového vlastnictví, reg. č. 2018-35411
2. Zemek R., **Konopická J.**, Bohatá A. (2018) Pěstební substrát s insekticidními a akaricidními vlastnostmi. Užitný vzor č. 31982. Úřad průmyslového vlastnictví, reg. č. 2018-35195

Ověřená technologie

1. **Konopická J.**, Bohatá A., Zemek R. (2019) Technologie výroby blastospor entomopatogenní houby *Isaria fumosorosea* kmene CCM 8367 submerzní kultivací. Ověřená technologie OT-ENTU-01

Grantová činnost

1. TAČR (TG02010034): BCAV21 – Podpora komercializace výsledků VaV na BC. Speciální pěstební substrát (2016-2018) - Člen týmu.
2. GAJU (018/2018/Z): Využití entomopatogenních hub v regulaci roztoče *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae) škůdce cibulové zeleniny (2018-2019) - Hlavní řešitel.
3. NAZV (QK1910270): Inovace integrované ochrany brambor proti mandelince bramborové založené na nových poznatcích genetických a biologických charakteristik (2019 - dosud) - Člen týmu.
4. TAČR Gama (TP01010022): Fungicidní a insekticidní aditivum do substrátu pro pěstování rostlin (2020 - dosud) - Člen týmu.