

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA
V PRAZE**

**FAKULTA AGROBIOLOGIE,
POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ**

KATEDRA OCHRANY ROSTLIN

**Nematofágní houby vyskytující se na
území ČR**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miloslav Zouhar Ph. D.

Konzultanti diplomové práce: Ing. Jana Mazáková Ph. D.

Diplomant: Bc. Nováková Jana

2009

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na dané téma vypracovala samostatně a použila pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

v Praze dne 9.4.2009

.....

podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Ing. Miloslavu Zouharovi Ph. D. za celkové vedení práce a cenné rady při zpracování tématu. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janě Mazákové Ph. D. za odborné konzultace a celé své rodině za podporu ve studiu.

Abstrakt

Hádátka jako škodlivý činitel jsou rozšířena po celém světě. V České republice jsou zaznamenány výskyty háďátek po celém území Čech, Moravy a Slezska, a proto je v současné době důležitý vývoj ochranných opatření proti těmto škodlivým činitelům.

Cílem diplomové práce bylo nalézt a charakterizovat nematofágní houby, vyskytující se na území České republiky a zhodnotit jejich inkorporaci do systémů integrované ochrany "sensu Lato".

V integrované ochraně rostlin proti háďátku je nejvíce perspektivní biologická ochrana, která se obecně vyznačuje potlačováním škůdců pomocí jejich přirozených nepřátel. V širším slova smyslu se využívá pro jakoukoli podporu organismů, které se nějak podílejí na omezování škůdců, v omezeném významu pro cílené vysazování uměle namnožených užitečných organismů – bioagens.

V rámci biologické ochrany proti háďátkům se využívají právě nematofágní houby, na které je tato diplomová práce zaměřena.

Odběr vzorku byl proveden na 12 různých lokalitách a v těchto vzorcích byl zjišťován výskyt nematofágních hub. Dále byly množeny a udržovány izoláty nematofágních hub zakoupené z banky Centraalbureau voor Schimmelcultures se sídlem v Utrechtu v Holandsku.

Byla provedena optimalizace jednotlivých metod pěstování a množení monosporových izolátů, optimalizována byla teplota, pH a živné látky potřebné k vytváření lapacích struktur.

V půdních vzorcích nebyly zjištěny žádné nematofágní houby. Příčinou by mohly být nevyhovující laboratorní podmínky pro tvorbu lapacích struktur, což vedlo k částečnému znemožnění určení nematofágních hub.

Klíčová slova: háďátka, biologická ochrana, nematofágní houby, lapací struktury, optimalizace metod.

Abstrakt

Nematodes like harmful factor are expanded all over the world. In the Czech Republic the nematodes are distributed throughout territory of Czech, Moravia and Silesia. Therefore development of preventive control methods against these harmful organisms is important at present.

Aim of this diploma work was to find and to characterize nematophagous fungi occurring in the Czech Republic and to valorize their incorporation into the system of integrated plant control “sensu Lato”.

The biological control is mostly perspective in integrated control of plants against nematodes. Principles of biological control consist in pests repression by means of their natural enemies, support of organisms participant on pests regulation in the wider sense, targeted introduction of artificially multiplied beneficial organisms (bioagens) in the stricter sense.

In the terms of biological control against nematodes, the nematophagous fungi are used especially.

Collection of samples was performed on 12 different localities and occurrence of nematophagous fungi was searched in these samples. Isolates of nematophagous fungi obtained from Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holland) were multiplied and maintained as well.

Optimalization of multiplication and cultivation methods of monosporic isolates was performed. Temperature, pH and amounts of nutritive substances needed for trap development were optimized.

Nematophagous fungi were not detected in the soil samples. Reason could be unsuitable laboratory conditions for production of trap structures. Absence of trap structures did not enable determination of nematophagous fungi partially.

keywords: nematodes, biological control, nematophagous fungi, trap development, optimalization metods

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíl.....	2
3. Literární řešerše	3
3.1. Hád'átka – základní rozdělení	3
3.1.1. Cystotvorná hád'átka.....	3
3.1.1.1. Hád'átko bramborové	3
3.1.1.2. Hád'átko řepné	4
3.1.2. Hátkotvorná hád'átka	5
3.1.2.1. <i>Meloidogyne hapla</i>	5
3.1.2.2. <i>Meloidogyne incognita</i>	6
3.1.3. Osní hád'átka.....	7
3.1.3.1. Hád'átko zhoubné.....	7
3.1.4. Ochrana proti hád'átkům	8
3.1.4.1. Preventivní opatření.....	8
3.1.4.2. Fyzikální ochrana	8
3.1.4.3. Chemická ochrana	9
3.2. Biologická ochrana.....	9
3.2.1. Biologická ochrana proti hád'átkům	10
3.2.2. Nematofágní houby	11
3.3.1. Lapací struktury nematofágních hub	13
3.3.2. Typy lapacích struktur	14
3.4. Popis jednotlivých druhů nematofágních hub	18
3.4.1. <i>Paecilomyces fumosoroseum</i>	18
3.4.2. <i>Hirsutella rossiliensis</i>	19
3.4.3. <i>Verticillium chlamydosporium</i>	20
3.4.4. <i>Dactylaria candida</i> (Nees) Saccardo1886.....	21

3.4.5. <i>Dactylella lysipaga</i> Drechsler 1937	21
3.4.6. <i>Arthrobotrys brochopaga</i> (Drechsler) S. Schenck, W.B. Kendr. & Pramer 1977	22
3.4.7. <i>Arthrobotrys dactyloides</i> Drechsler 1937	22
3.4.8. <i>Arthrobotrys oligospora</i> Fresen. 1850	23
3.4.9. <i>Monacrosporium phymathophagum</i>	24
4. Metodika	25
4.1. Odběr vzorků	25
4.2. Izolace hub z půdních vzorků	25
4.2.1. Ředění	26
4.2.2. Roztěry na misku	26
4.2.3. Příprava agarů	26
4.2.4. Příprava monosporických izolátů	27
4.2.5. Vzorek Hořátev jaro	28
4.3. <i>Pochonia chlamydosporia</i> – použití jako modelového organismu pro optimalizaci metod	28
4.3.1. Naočkování sterilního substrátu	29
4.4. Izoláty nematofágních hub	30
4.4.1. Optimalizace živných látek ve sterilních médiích	31
4.5. Využití háďátek pro detekci lapacích orgánů	32
4.5.1. Extrakce háďátek	32
4.5.2. Sterilizace háďátek	32
4.5.3. Aplikace háďátek na agarové plotny	33
4.6. Určování nematofágních hub	33
6. Výsledky	40
6.1. Ředění	40
6.2. Monosporové izoláty	40

6.3 Aplikace háďátek na nematofágní houby vypěstované na agaru o různých živných hodnotách	43
6.4. Izolace druhu <i>Pochonia chlamydosporia</i> ze sterilního substrátu.....	44
6.5. Izolace hub z odběrů půdních vzorků	45
6.6. Vzorek Hořátev.....	50
5. Diskuze	51
7.Závěr	53
8. Seznam literatury	54
9. Přílohy.....	59

1. Úvod

Hádátka jako škodlivý činitel jsou rozšířena po celém světě. V České republice jsou zaznamenány výskyty háďátek po celém území Čech, Moravy a Slezska, a proto je v současné době důležitý vývoj ochranných opatření proti těmto škodlivým činitelům.

Mezi perspektivní metody ochranných opatření se řadí biologická ochrana, která v posledním desetiletí zaznamenala vysoký nárůst v oblasti ochrany rostlin. Klasickou biologickou metodou potlačování (regulace) škůdce je zavedení parazitoidů, predátorů nebo patogenů do populace škůdců s tím, že se dosáhne dlouhodobě rovnovážného stavu bez opakovaných intervenčních zásahů – tj. nižší populační hustoty škůdce, než jaká by panovala bez působení uvedených regulačních činitelů.

Pro využití biologické ochrany proti háďátkům byly prováděny v zahraničí pokusy s využitím nematofágních druhů hub.

Nematofágní houby jsou uzpůsobeny k výživě háďátky pomocí různých lapacích struktur, jako např. fixní oka, stahovací oka, lepkavé uzlíky apod.

Vyskytují se hlavně v organických půdách, na tlejícím dřevě a kůře nebo ve výkalech zvířat.

V současné době je využití nematofágních hub nejzkoumanější metodou v rámci biologické ochrany proti háďátkům.

2. Cíl

Nalezení a charakterizace nematofágních hub, vyskytujících se na území ČR a zhodnocení jejich inkorporace do systémů integrované ochrany „sensu Lato“.

3. Literární rešerše

3.1. Hád'átka – základní rozdělení

Hád'átka poškozující kořeny

- a) Hád'átka cystotvorná
- b) Hád'átka kořenová (hátkotvorná)
- c) Pohyblivá kořenová hád'átka (volně žijící)

Hád'átka parazitující převážně v nadzemních částech rostlin

- a) Hád'átka osní
- b) Hád'átka listová
- c) Hád'átka škodící v květech (VLK, 1985)

3.1.1. Cystotvorná hád'átka

Cystotvorná hád'átka byla poprvé zjištěna botanikem Schachtem (1859) na kořenech cukrovky v Magdeburské oblasti. O několik let později pojmenoval Schmidt toto hád'átko *Heterodera schachtii*. V následujících letech byla cystotvorná hád'átka zjištěna na řadě dalších plodin, př. ovsu, ječmenu, bramborách aj., která byla po určitou dobu považována za *H. schachtii*. (VLK, 1985)

3.1.1.1. Hád'átko bramborové

Kmen: Nematoda Potts 1932

Třída: Chromadorea Inglis 1982

Podtřída: Chromadoria Pearse 1942

Řád: Rhabditida Chitwood 1933

Podřád: Tylenchida Thorne 1949

Nadčeleď: *Tylenchoidae* Orley 1880

Podčeleď: *Heteroderinae* Filipjev & Schuurmans Stekhoven 1941

Rod: *Globodera* Skarbilovich 1959

Druh: *Globodera rostochiensis*

Globodera rostochiensis Wollenweber (1923) pochází z oblasti And v Jižní Americe, kde probíhal jeho vývoj společně s hostitelskými rostlinami (ZOUHAR, 2003).

Hád'átka má oblé, dlouze protáhlé, nečlánkované tělo, které se směrem k oběma koncům zužuje. Samičky v průběhu vývoje zduřují do kulovitěho tvaru a vyhřezávají z kořenů (BRZESKI, 1998).

Samice přisedlá na kořenech je 0,5 – 0,8 mm dlouhá, cysta žlutobílá, později světle hnědá až červenohnědá se zřetelným krčkem. Samec je 1 mm dlouhý červovitý (TÁBORSKÝ & ŠEDIVÝ, 1997).

Zpravidla se tvoří jedna generace do roka. Vajíčka v cystách zůstávají v půdě. Na popud kořenových výměšků hostitelských rostlin dochází k jejich líhnutí (HÄNI, 1993).

Příznaky poškození se projevují ohniskovitým zakrslým růstem. Listy jsou žluté, vadnou a usychají. Tvoří se nadměrné množství zhnědlých kořenů, značně rozvětvených (HLUCHÝ, 2005).

3.1.1.2. Hád'átka řepné

Kmen: Nematoda Potts 1932

Třída: Chromadorea Inglis 1982

Podtřída: Chromadoria Pearse 1942

Řád: Rhabditida Chitwood 1933

Podřád: Tylenchida Thorne 1949

Nadčeleď: *Tylenchoidea* Orley 1880

Podčeleď: *Heteroderinae* Filipjev & Schuurmans Stekhoven 1941

Rod: *Heterodera* Schmidt 1871

Druh: *Heterodera schachtii* Schmidt 1871

Cystotvorné hád'átka řepné (*Heterodera schachtii*) je jedním z nejvýznamnějších škůdců cukrovky. Ztráty na výnosech se jenom v Evropě odhadují na 90 mil. EUR ročně (KOUBOVÁ, 2009).

Samice 0,6 až 0,8 mm dlouhá, cysta citronkovitá, žlutobílá až červenohnědá. Samec 1 mm dlouhý, štíhlý, červovitý (TÁBORSKÝ & ŠEDIVÝ, 1997).

Stovky vajíček zůstávají v cystách v půdě. Kořenové výměšky hostitelských rostlin nebo vlhké a teplé počasí dávají podnět k vylíhnutí larev, které pronikají do kořenů. Zadečková část samičky zduří tak silně, že dochází k potrhání pletiv a uvnitř kořenů zůstává pouze hlavová část. Hád'átka řepné má 2 generace do roka (HĀNI, 1993).

Hád'átka přežívá v půdě jako cysta více než 10 roků (TÁBORSKÝ & ŠEDIVÝ, 1997).

3.1.2. Hálkotvorná hád'átka

Hálky na kořenech jako následek napadení hád'átky mohou být způsobeny druhy různých rodů. Nejvýznamnější je rod *Meloidogyne*, jehož zástupci jsou obecně nazývány kořenová hálkotvorná hád'átka (VLK, 1985).

3.1.2.1. *Meloidogyne hapla*

Kmen: Nematoda Potts 1932

Třída: Chromadorea Inglis 1982

Podtřída: Chromadoria Pearse 1942

Řád: Rhabditida Chitwood 1933

Podřád: Tylenchida Thorne 1949

Nadčeled': *Tylenchoidea* Orley 1880

Čeled': *Meloidogynidae* Skarbilovich 1959

Podčeled': *Meloidogyninae* Skarbilovich 1959

Rod: *Meloidogyne* Goeldi 1892

Druh: *Meloidogyne hapla*

Larvy pronikají špičkami do kořenů. Svými výměškami dráždí kořeny k tvorbě hálkovitých novotvarů. Pohlavně dospělé samice zduří a kladou do želatinové hmoty v hálkách kolem 500 vajíček. Z vajíček se vylíhnou larvy, které jsou schopny napadat další rostliny. Vajíčka jsou schopna rovněž přetrvávat delší dobu v půdě (HLUCHÝ, 2005).

Kořeny jsou často zakrslé, abnormálně naběhlé a znetvořené, někdy masivní. Dokonce může zůstat jen málo aktivních vláknitých kořenů, rozsah škod nutně nekoreluje s počtem hlístic, ale obojí se mění podle druhů z rodu *Meloidogyne* a hostitelské rostliny. Na tykvvovitých se vytvářejí velké masité hálky, na dalších rostlinách mohou být malé a pevné. Spodní listy mohou blednout a v období slunečního svitu mohou rychle chřadnout (EVANS et al., 1993).

3.1.2.2. *Meloidogyne incognita*

Kmen: Nematoda Potts 1932

Třída: Chromadorea Inglis 1982

Podtřída: Chromadoria Pearse 1942

Řád: Rhabditida Chitwood 1933

Podřád: Tylenchida Thorne 1949

Nadčeleď: *Tylenchoidae* Orley 1880

Čeleď: *Meloidogynidae* Skarbilovich 1959

Podčeleď: *Meloidogyninae* Skarbilovich 1959

Rod: *Meloidogyne* Goeldi 1892

Druh: *Meloidogyne incognita* Goeldi 1892

Meloidogyne incognita je nejčastějším a nejškodlivějším druhem z rodu *Meloidogyne*.

Samci jsou červovití, 1,2-2 mm dlouzí. Samičky mají tělo baňkovité 0,51-0,69 mm dlouhé a 0,3-0,43 mm široké (VLK, 1985).

Hádátka pronikají z půdy do kořenů. Jejich výměšky dráždí kořeny k tvorbě hálek. Pohlavně dospělé samice hruškovitě zduří a kladou do hálek vajíčka, z nichž se líhne další generace. Po rozpadu hálek se čerstvě nakladená vajíčka uvolňují do půdy, kde mohou po nějaký čas přetrvávat (HLUCHÝ, 2005).

3.1.3. Osní háďátka

3.1.3.1. Háďátko zhoubné

Kmen: Nematoda Potts 1932

Třída: Chromadorea Inglis 1982

Podtřída: Chromadoria Pearse 1942

Řád: Rhabditida Chitwood 1933

Podřád: Tylenchida Thorne 1949

Nadčeleď: Sphaerularioidea Lubbock 1961

Čeleď: *Anguinidae* Nicoll 1935

Podčeleď: *Anguininae* Nicoll 1935

Rod: *Ditylenchus* Filipjev 1936

Druh: *Ditylenchus dipsaci*

Háďátko zhoubné je rozšířeno ve všech světadílech a všude patří k nejrozšířenějším a nejškodlivějším háďátkům (ŠTUSÁK & TÁBORSKÝ, 1983).

Háďátko zhoubné (*Ditylenchus dipsaci*) zůstává, i přes svůj status karanténního škůdce při regulaci prostřednictvím rostlinných pasů, jedním z nejvýznamnějších škůdců postihujících odvětví pěstování cibulnatých rostlin v Evropě (WWW1).

Háďátka tohoto druhu dosahují max. délky 1,5 mm a šířky 35 µm. Netvoří cysty. Podle průběhu teplot trvá vývoj jedné generace 3-6 týdnů, počet generací v jednom roce bývá větší (může docházet k rychlému nárůstu). Vajíčka a „trvalé“ larvy mohou zůstat v půdě připraveny k dalšímu vývoji více než 1 rok (HÄNI,1995).

Pronikají do pletiv rostlin jako larvy, ve tkáních pak tělesně i pohlavně dospívají (ŠTUSÁK & TÁBORSKÝ, 1983).

Háďátko zhoubné je také schopno přemísťovat se prostřednictvím vlhké půdy více než dva metry za rok. Vstupuje do rostlin prostřednictvím malých poranění nebo přirozených otvorů (stomata, lenticely). Živí se rostlinnými šťávami, které saje po

injektování svých trávicích slin do buněk svým bodcem. Poškození tkání a deformace způsobují toxiny ve slinách (WWW6).

3.1.4. Ochrana proti háďátkům

3.1.4.1. Preventivní opatření

Ochrana v ČR je řízena karanténními předpisy vyplývajícími ze zákona č. 187/1996 Sb. o rostlinolékařské péči. Ty zahrnují soubor opatření, jako je povinné ohlášení výskytu, omezené pěstování brambor a jejich distribuce, případně i povinné dodržování čtyřletého pěstování brambor (u *Globodera rostochiensis*) a pěstování odolných odrůd (TÁBORSKÝ & ŠEDIVÝ, 1997).

Nejlevnějším a nejjednodušším způsobem ochrany je dodržování správných osevních postupů (VLK, 1985).

VLK (1985) dále uvádí, že minimalizací zaplevelení můžeme dosáhnout zredukování populací *Heterodera schachtii*, k hubení háďátek vyskytujících se v zemině po transportu cukrovky ze zamořených pozemků může být použito hašené nebo nehašené vápno v poměru 1 díl cukrovky na 4 díly zeminy.

Regulace populační hustoty *H. schachtii* pod práh hospodářské škodlivosti je možná používáním osevních postupů se zastoupením většího počtu plodin a pěstováním rezistentních odrůd cukrovky a rezistentních meziplodin. Osevní postupy se zastoupením více plodin však zemědělci z ekonomického hlediska nepoužívají příliš často. Při pěstování rezistentních meziplodin jako ředkev olejná nebo hořčice se musí výsev kvůli dobrému účinku proti *H. schachtii* uskutečnit do poloviny srpna (KOUBOVÁ, 2009).

3.1.4.2. Fyzikální ochrana

Fyzikální metody jsou využitelné pro asanaci semen a sadby, použít lze moření, horkou vodou. U napadeného osiva, hlíz, či rostlin sadby je časté ošetření vodou při teplotě 43,5 °C, po dobu 30 minut. Pro ošetření výsevního substrátu lze doporučit propařování půdy při teplotě 90-95 °C po dobu 15-20 minut. Pro volné výsadby je možné v teplejších klimatických pásmech využívat solarizace, kdy půda je zakryta polyetylenovou folií a vystavena v průběhu léta po dobu až 3 týdnů slunečnímu záření. Dochází k prohřátí

půdního profilu do hloubky 20-25 cm a k eradikaci majoritního podílu půdní mikrofauny. V ČR je aplikace této metody omezena klimatickými podmínkami (DUAN, 2003).

3.1.4.3. Chemická ochrana

Přímá chemická ochrana je relativně málo účinná, drahá a výrazně snižuje biologickou aktivitu půdy.

Existuje mnoho fumigujících a mnoho nefumigujících nematocidů, které byly otestovány pro komerční použití. Proti jejich běžnému používání hovoří mnoho nedostatků, jako jsou toxicita, cena, fytotoxicita a další. Účinnost nematocidů je srovnatelná s asanačním efektem rezistentní odrůdy (ZOUHAR, 2003).

V současné době je v České republice zakázáno používání všech dostupných nematocidů.

Nejvíce perspektivní je v tuto dobu biologická ochrana proti hád'átkům.

3.2. Biologická ochrana

Termín biologická ochrana obecně označuje potlačování škůdců pomocí jejich přirozených nepřátel. V širším slova smyslu se využívá pro jakoukoli podporu organismů, které se nějak podílejí na omezování škůdců, v omezeném významu pro cílené vysazování uměle namnožených užitečných organismů – bioagens (analogicky ke slovu agens označujícímu účinnou látku) (TICHÁ a kol., 2001).

BAGAR a kol. (2003) uvádí, že biologická ochrana je cílevědomé používání živých organismů (roztoců, hmyzu, hlístic, virů, hub, bakterií, aj.) pro udržení škodlivých biologických činitelů (škůdci, choroby, plevelné rostliny) pod úrovní jejich škodlivého množství v porostech kulturních rostlin.

Klasickou biologickou metodou potlačování (regulace) škůdce je zavedení parazitoidů, predátorů nebo patogenů do populace škůdců s tím, že se dosáhne dlouhodobě rovnovážného stavu bez opakovaných intervenčních zásahů – tj. nižší populační hustoty škůdce, než jaká by panovala bez působení uvedených regulačních činitelů (HRDÝ a kol., 1991).

Hlavními pojmy v biologické ochraně rostlin je bioagens a biopreparát.

Bioagens je organismus nebo jeho produkt, který se používá v biologické ochraně. Bioagens se dělí na entomopatogenní mikroorganismy, na predátory a parazitoidy.

Biopreparát je prostředek na ochranu rostlin, jehož účinnou složkou je bioagens. Biopreparáty se získávají pěstováním a množením bioagens v provozních výrobních zařízeních a jsou dostupné jako komerční prostředky ochrany rostlin (TÁBORSKÝ & ŠEDIVÝ, 1997).

3.2.1. Biologická ochrana proti hád'átkům

Odrůda aksamitníku rozkladitého (*Tagetes patula*) „Ground Control“ je používána při pěstování lilií v Nizozemsku (před sázením) a tvrdí se, že má až 95 %ní účinnost proti určitým druhům hád'átek, jestliže jeho kořeny, obsahující silný širokospektrální bioxid, jsou jediným zdrojem potravy pro hád'átka.

Některé plodiny určené na zelené hnojení mohou potlačovat aktivní hád'átka, jestliže jsou používány k čištění půdy před sadbou nebo setím rostlin. Některé druhy brukvovitých rostlin, například hořčice odrůdy „Caliente“ obsahují přirozené glukosinoláty a které, když jsou rozřezány a zapraveny do půdy, tvoří MITC – sterilizační látku uvolňovanou některými chemickými fumiganty (WWW1).

Pro účely biologické ochrany jsou využívány také mnohé bakteriální organismy osidlující rhizosféru i bakterie parazitující vajíčka rodu *Meloidogyne* spp. (SIDDIQI, 2000).

Různé druhy *Pseudomonas* byly často hlášeny, že ovlivňují životaschopnost a patogenitu širokého okruhu hád'átek. *Pseudomonas fluorescens* je nejvíce studovanou bakterií a údajně zvyšuje růst rostlin a redukuje poškození hád'átky způsobené *Globodera rostochiensis*, *Heterodera* spp., *Hirschmanniella gracilis*, *Meloidogyne* spp., *Radopholus similis* a *Tylenchulus semipenetrans*. *Pseudomonas fluorescens* produkuje široký okruh sekundárních metabolitů a hydrolytických enzymů, které jsou pravděpodobně zdrojem nematicidní aktivity (CHEN et al., 2004).

KHAN et al. (1992) se také zmiňuje, že princip působení *P. fluorescens* a *B. subtilis* je založen na produkci nematotoxických metabolitů.

Jako bioagens je možné použít grampozitivní bakterie *Pausteria penetrans*, které omezují množení háďátek a možnost invazních larev penetrovat do kořenů (JAFFEE et al. 1998).

Dle SAYRE a STARRA (1988) je *Pasteuria penetrans* bakteriální parazit cystotvorných háďátek, který vykazuje ohromný potenciál jako biokontrolní činitel. *Pasteuria penetrans* napadá 205 druhů hlístic patřící do 96 rodů z 51 zemí na 5 kontinentech a různých ostrovech v Atlantiku, Pacifiku a Indickém oceánu.

CHEN et al. (1996) uvádí, že tři druhy z rodu *Penetrans* jsou parazité rostlinných parazitických hlístic. *Pasteuria penetrans* na *Meloidogyne* spp., *Pasteuria thornei* na *Pratylenchus* spp. a *Pasteuria mishizawae* na cystotvorných háďátkách rodu *Heterodera* a *Globodera*.

KOUBOVÁ (2008) uvádí, že rostliny mohou díky kolonizaci endofytickými nepatogenními izoláty *Fusarium oxysporum* získat systémovou rezistenci vůči háďátkům. Ta poskytuje v některých pěstitelských systémech biologickou alternativu ochrany k syntetickým nematocidům.

Mezi nejdůležitější biologické prostředky, které se používají v ochraně rostlin proti háďátkům, patří nematofágní houby, řadící se do entomopatogenních hub.

3.2.2. Nematofágní houby

Houby patří mezi nejdéle známé a nejčastěji determinované mikroorganismy asociované s hmyzem. Vztahy mezi houbami a hmyzem jsou velmi rozmanité. Ve škále vztahů „hmyz – houba“ lze například nalézt vztahy saprofytické, symbiotické, mutualistické i parazitické. Zvláštní skupinu hub představují druhy, které mohou vyvolávat primární onemocnění různých vývojových stádií hmyzu (tzv. houby entomopatogenní). V současné době je známo více než 750 druhů hub, které mohou působit jako obligátní nebo fakultativní původci onemocnění mnoha druhů hmyzu (LANDA, 1998).

První endoparazitickou houbu objevil Lohde v roce 1874, byl to druh *Harposporium anguillulae*. O 14 let později bylo popsáno lapání hlístic jedním z nejběžnějších druhů nematofágních hub *Arthrobotrys oligospora*. Dnes je známo přes 100 druhů endoparazitických hub, nejvíce jich patří do čeledi *Zoopagaceae* (patřící mezi pravé plísňe) a *Moniliaceae* (patřící mezi houby nedokonalé - Fungi imperfecti). Některé endoparazitické houby jsou vodní a nejznámější z nich je *Zoophagus insidians*, lapající vířníky. Většina nematofágních hub žije v půdě a na různých organických substrátech, jako je listová hrabanka, hnůj, tlející dřevo a různé rostlinné zbytky. Příkladem může být právě zmíněná houba *Arthrobotrys oligospora* (WWW5).

Obecně platí, že schopnost lapání kořisti je u hub výjimečná a v průběhu vývoje se objevila vícekrát u různých skupin hub. Mezi příbuznými druhy velmi často nacházíme jak houby lapající kořist, tak druhy uplatňující jiný způsob výživy a jen málo hub lapající kořist je striktně obligátních (BEČVÁŘ, 1999a).

Nematofágní druhy hub jsou přirození nepřátelé hlístic a vyvinuly velmi sofistikované strategie, které způsobují buď nakažení hlístic nebo jejich chycení. Nematofágní houby spadají do dvou širokých skupin, a to do skupiny parazitující hlístice malými sporami nebo zoosporami způsobujícími infekci, nebo do skupiny hub, které hlístice chytají a používají modifikované lapací struktury. V přírodě nematofágní houby pomáhají recyklovat uhlík, dusík a další důležité elementy z často značné biomasy hlístic v půdě, kterou se živí mikrobiální destruenti (GRAY, 1986).

Nematofágní houby jsou obligatorní parazité, kteří potřebují hlístice k přežití, jiní jsou fakultativní nebo oportunističtí parazité, kteří mohou přežívat saprofyticky a jiní mají charakteristické rysy, které jsou středem mezi těmito dvěma kategoriemi. Nematofágní houby mohou být rozděleny na ty, které mají rozsáhlý hyfový růst vně jejich hostitelů jako např. hlísty chytající houby a oportunističtí parazité vajíček hád'átek, a na ty houby, které jsou hlavně endoparazitické (PERRY & MOENS, 2006).

Všichni prozatím známí zástupci, jejichž způsob výživy je založen na lapání kořisti, patří do oddělení Eumycota. Jednou výraznou skupinu nalezneme ve třídě Zygomycetes, speciálně v řádu Zoopagales. Patří sem zejména obligátní predátoři, které můžeme nalézt ve vlhké půdě, kompostu, exkrementech živočichů a ve vodě. Skupinou, ve které lze nalézt

zdaleka největší množství endoparazitických hub (asi 100 druhů), je podkmen Deuteromycotina (BEČVÁŘ, 1999a).

Nematofágní houby jsou rozšířené hlavně v půdách bohatých na humus s rozkládajícími zbytky. Vyhovuje jim poměrně vysoká vlhkost, teplota v rozmezí 10-30°C, pH neutrální nebo slabě alkalické, dostatečně provzdušnění a přítomnost háďátek (saprofytických nebo parazitických) (VLK, 1985).

3.3.1. Lapací struktury nematofágních hub

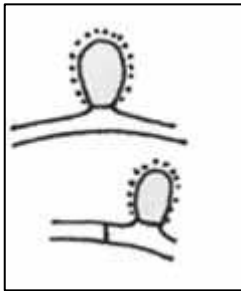
Pasti hub se vyznačují velkou různorodostí. Existují např. pasti, které jsou fylogeneticky nestejného původu, přestože jejich morfologie a mechanismus chytání jsou podobné (např. lepkavé výběžky u některých zástupců skupin Ascomycotina, Zygomycotina, Basidiomycotina). Na druhé straně se setkáváme s morfologicky i funkčně zcela lišícími se typy pastí, které jsou naopak fylogeneticky původu příbuzného (např. fixní, škrťací oka a sítě u rodů *Monacrosporium* a *Arthrobotrys*) (BEČVÁŘ, 1999b).

BEČVÁŘ (1999a) dále uvádí, že na vznik pastí působí celá řada faktorů jak exogenních tak endogenních. Mezi endogenní lze zařadit dispoziční určitého kmene k tvorbě pastí a stádium v ontogenezi, tj. stáří mycelia. Exogenní regulace je mnohem více prozkoumána – lze sem zařadit např. nutriční hodnotu substrátu – za nedostatku lehce využitelných živin je indukce tvorby pastí vyšší. Dále sem patří produkce látek potencionální kořisti, jejichž přítomnost v prostředí indukuje tvorbu pastí.

ANONYM (2008) uvádí, že nematofágní houby v čistých kulturách vůbec netvoří lapací struktury.

3.3.2. Typy lapacích struktur

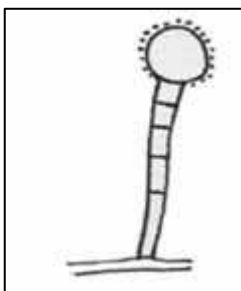
Přisedlý lepkavý uzlík (viz obr. 1) („sessile adhesive knob“) je mnohojaderné syncytium obalené lepkavou substancí. Měří 12-20 μm (WWW3).



obr.1 který má některé drobné morfologické odlišnosti a jeho zástupci jsou výrazně specifictí - chytají jen některé druhy nematodů. Funkčně podobný typ pasti je stefanocysta (WWW4).

Někdy tyto buňky mají tendenci k proliferaci a pak mohou tvořit krátké větve, které se někdy ohýbají a mohou tvořit oblouky. Tento typ pasti je velmi rozšířený (běžný je např. u rodu *Monacrosporium* ze skupiny *Deuteromycotina*). Lepkavý knoflík můžeme najít i u některých druhů rodu *Nematoctonus* (nepohlavní stadium rodu *Hohenbuehelia*, *Tricholomataceae*, *Basidiomycotina*),

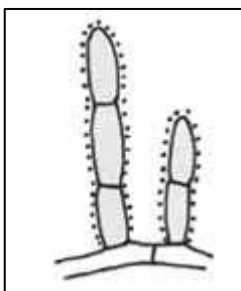
Stopkatý lepkavý uzlík (viz obr. 2) („stalked adhesive knob“) je opět buňka, krytá lepkavou substancí, tentokrát ovšem vynesena krátkým,



obr. 2

několikabuněčným vláknem nad mycelium houby. Chytána mohou být háďátka (někdy nepříliš selektivně), ale např. i chvostoskoci - knoflík je v tomto případě několikanásobně zvětšený a simuluje spermatofovy kořisti. Lepkavé stopkaté knoflíky jsou typické pro některé druhy rodů *Dactylella* a *Monacrosporium* (WWW4).

Postranní myceliální větve (viz obr. 3) („hyphal branches“, „adhesive columns“) jsou



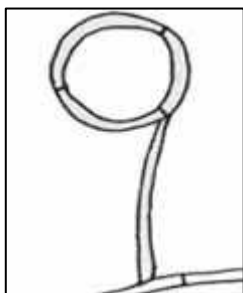
obr.3

další nejjednodušší morfologickou chytací strukturou z nemodifikovaných lepicích hyf. Přímé větve vytvořené z 1-3 buněk, které se pravidelně spojují, tvoří jednoduché lepicí obruče nebo dvojrozměrné sítě, které jsou vzhledem podobné uháčkované řádce. Celá větev je pokryta tenkou vrstvou lepidla tak, že hlístice mohou být chyceny, jestliže přijdou do kontaktu s některou částí větve (GRAY, 1986).

Často vyrůstají vedle sebe a mají tendenci k anastomózám. Vyskytují se u části rodu *Monacrosporium* (WWW4).

GRAY (1986) uvádí, že nejčastějším izolovaným druhem v mírných půdách, který vytváří lepicí větve je *Dactylella cionopaga*.

Fixní oka (viz obr.4) („non-constricting rings“) Tento lapací mechanismus se vyskytuje



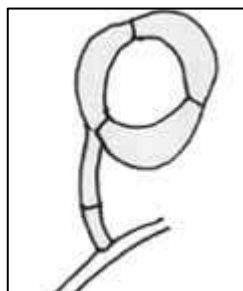
jen u čtyř druhů nematofágních hub, které chytají hlístice. Fixní oka jsou produkovány přímými bočními větvemi vyrůstajícími z vegetativní hyfy. Větev je z počátku velmi štíhlá, ale pak zesiluje a zakřivuje se a vytváří tři až čtyřbuněčný prstenec. Hlístice jsou chyceny pasivně vstoupením do kruhu, který se zaklíní kolem jejich těla (GRAY, 1986).

obr. 4

Na vnitřku prstenu byla pozorována lepicí vrstva, podobná lepicím sítím a lepicím knoflíkům (DOWSETT & REID, 1979).

Vyskytují se pouze u několika druhů např. u *Dactylella leptospora* a vždy spolu se stopkatými knoflíky (nejsou totiž příliš efektivní a chybí jim adhezivní vrstva). Pomocí těchto pastí jsou neselektivně chytáni drobní hlísti (WWW4).

Stahující oka (viz obr.5) („constricting rings“) jsou vytvořeny ze tří obloukovitých buněk,



které tvoří prsten. Ten je spojen s hyfou krátkou stopkou. Hlístice vstoupením stimuluje vnitřní povrch buněk, které se po krátké době (2-3 s) stáhnou kolem kořisti, která je rychle přidržena uvnitř prstene (GRAY, 1986).

obr. 5

Tyto pasti jsou poměrně časté a vyskytují se pouze u obligátních predátorů (jsou známy u mnoha druhů rodů *Dactylella*, *Dactylaria*, *Arthrobotrys* a *Monacrosporium*. Kořisti těchto hub jsou opět především háďátka, ale rovněž

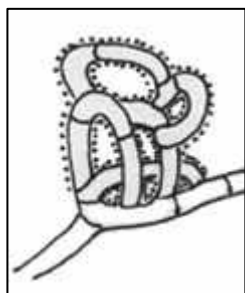
mohou být lapeni nejrůznější další drobní živočichové (např. někteří vířníci) (www4).

Je to možná nejvíce agresivní a úspěšné chytací zařízení nalezené u čeledi *Hyphomycetes*, kde je známo 12 druhů produkujících škrťací prstény.

U několika druhů bylo zaznamenáno produkování obrovských nebo makroskopických prstenců na výživném agaru, ačkoli důvod pro to je nejasný. Makroprstence byly vyvolané u druhů *Dactylella brochopaga* (GRAY, 1986).

INSELL a ZACHARIAH (1978) zjistili, že tyto makroprstence jsou schopny fungovat zcela normálně.

Sítě (viz obr. 6) („nets“) jsou tvořeny množstvím vzájemně propojených oblouků a smyček (www4).

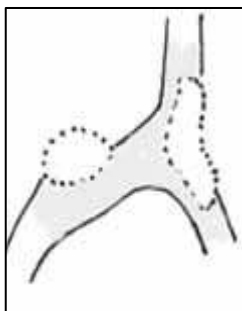


Sítě jsou obaleny lepidivou substancí. Očka měří 20-59 μm . Mají vysoký lapací podíl in vitro, díky jejich trojrozměrnému uspořádání (WWW3).

Lepicí sítě jsou evolučním vývojem z lepicích větví a jsou tvořeny přímou postranní větví vyrůstající z hlavní hyfy, pokřivením dochází ke spojení s mateřskou hyfou (GRAY, 1986).

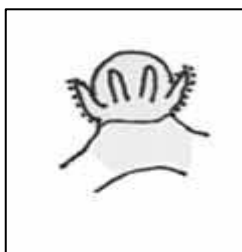
obr.6 Vyskytují se spíše u fakultativních predátorů (kteří jsou schopni rychlého růstu i při čistě saprotrofní výživě) jako doplňkový zdroj dusíkatých látek. Nejčastější kořistí jsou háďátka, ale chyceno může být široké spektrum organismů, protože síťoví predátoři nejsou příliš selektivní. Sítě jsou běžným lapacím zařízením u některých druhů rodů *Arthrobotrys*, *Monacrosporium*, *Geniculifera*, a *Dactylella* (WWW4).

Nespecifické výběžky (viz obr.7) („protuberances“) a hyfy s polštáři adhezivní látky jsou morfologicky v podstatě neodlišitelné pasti od normálních hyf predátora. V literatuře je zmiňován tento či podobné typy pastí i u dalších hub se schopností predace. Ze skupiny *Deuteromycotina* lze např. uvést rody *Haptocara*, *Triposporina*, *Pedilospora* a *Tridentaria*, které používají k lapání kořisti (nejčastěji améb nebo háďátek) buď nespecifických adhezivních výběžků nebo polokulovitých buněk s lepkavou vrstvou (WWW4).



obr.7

Stefanocysty (viz. obr.8) jsou jedinečné reprodukční struktury, zřejmě druhy konidií nebo spor, přítomné u Basidiomycetes u rodů *Hyphoderma*. Typická stephanocysta sestává z poháru, základní buňky a terminální kulovité buňky (CHEN et al., 2004).

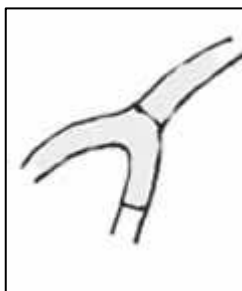


obr.8

V ekvatoriální části stefanocysty je prstenec výrůstků, které jsou kryty adhezivní vrstvou. Mechanismus chytání je v podstatě stejný jako u lepkavých přisedlých knoflíků (WWW 4).

LIU a TZEAN (1992) zpozorovali, že stephanocysty také fungují jako lapací zařízení hlístic. Dvoubuněčné stephanocysty jsou lepidivé a mohou se připojit k hlístici, zatímco jsou připojené nebo oddělené od hyfy nebo jsou na krátkých stopkách. Ihned se zmocní hlístice, vytvoří infekční čep a poté kořist zkonsumuje.

Toxické hyfy (viz. obr. 9). S tímto fenoménem se můžeme setkat pouze u několika druhů rodu *Hyphoderma*. Potravou této houby se stávají pouze mykofágní háďátka, která vyhledávají hyfy hub, napichují svými stiletými jejich buněčné stěny a vysávají obsah. Buněčný obsah je toxický a po pohlcení je kořist ihned znehybněna. Ochromenou kořist poté obrůstají hyfy houby a na více místech ji penetrují (BEČVÁŘ, 1999b).



obr.9

3.4. Popis jednotlivých druhů nematofágních hub

3.4.1. *Paecilomyces fumosoroseus*

Říše: Fungi

Oddělení: Eumycota

Pomocné oddělení: Deuteromycotina

Pomocná třída: Hyphomycetes

Řád: *Moniliales*

Rod: *Paecilomyces*

P. fumosoroseus (Wize) A.H.S.Br. & G. Sm., náleží do vláknitých entomopatogenních hub (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Rod *Paecilomyces* (*P. fumosoroseus*, *P. farinosus*, *P. lilacinus*, *P. variotii*) reprezentuje široce polyfágní entomofágní, akarifágní a nematofágní druhy hub, které iniciují infekce na zástupcích z mnoha řádů hmyzu (*Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Coleoptera*, *Homoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*), fytofágních roztočích (např. sviluškovití – *Tetranychidae*) a některých druzích háďátek (např. cystotvorná háďátka z rodů *Globodera*, *Heterodera*) (WWW5).

Hlavní determinační znaky druhu jsou detekovány na morfologických strukturách sporulujících kultur. V koloniích *P. fumosoroseus* se na vzdušném myceliu nejdříve vytvářejí konidiofory, které jsou na hyfách umístěny přeslenovitým způsobem. Na koncích konidioforů se následně formují konidiogenní phialidy (3-6 phialid / 1 konidiofor), na kterých se vytvářejí oválné konidie. Konidie se na koncích phialid oddělují postupně, nejmladší konidie je vždy v kontaktu s phialidou a odtlačuje starší konidie dál do tvořícího se řetízku. V jednom řetízku konidií přichyceném na konidiogenní phialidě může být přítomno i více než 50 konidií. *P. fumosoroseus* může mít ještě další morfologické stádium (blastospory), které vznikají při růstu v submerzní kultuře (tekutá živná půda) (WWW2).

Povrch kultur *P. fumosoroseum*, a zvláště pak povrch jednotlivých konidií je silně hydrofobní. Po přelití povrchu kolonie *P. fumosoroseum* vodou, plavou uvolněné konidie (zpravidla stále udržující formu kompaktních řetízků) po povrchu vody, kde tvoří prašnou,

nesmáčenlivou vrstvu a jsou snadno rozprášeny i při malém pohybu vzduchu (OSBORNE & LANDA, 1992).

Spory jsou často prostředkem pro rozptylování a přenos entomopatogenních hub, musí se dostat do kontaktu s hlístem, na kterém vyklíčí a potom pronikne pokožkou (JAMES, 2001).

3.4.2. *Hirsutella rossiliensis*

říše Fungi

oddělení: Ascomycota

třída: *Sordariomycetes* »

řád: *Hypocreales*

čeleď: *Clavicipitaceae*

rod: *Hirsutella*

druh: *Hirsutella rhossiliensis*

Hirsutella rhossiliensis byla poprvé popsána v roce 1980 podle vzorku sebraném ve Walesu v roce 1953 (CHEN et al., 2004).

STURHAN a SCHNEIDER (1980) vyizolovali tuto houbu z cyst chmelových hlístic *Heterodera humuli* a pojmenovali ji jako *Hirsutella humuli* (syn. *Hirsutella rhossiliensis*).

Houba má široký okruh hostitelů včetně rostlinných parazitických hlístic, volně žijících hlístic a roztočů, ačkoli různé druhy izolátů mají rozmanité hostitelské preference (CHEN et al., 2004).

H. rhossiliensis se přirozeně vyskytuje v zemědělských půdách. Parazituje různé druhy fytoparazitických háďátek. Lepivé mucilagenní konidie *H. rhossiliensis* se přichytí na kutikulu háďátek. Během dvanácti hodin se vytvoří klíční hyfa, která penetruje kutikulu háďátka. V hostiteli se vytváří infekční bulbus, z něhož vyrůstají asimilační hyfy a prorůstají tělem háďátka. S postupným růstem mycelia hostitel hyne. Nově vytvořené hyfy vyrůstají z těla háďátka a vytvářejí vzdušné mycelium s fialidami, na nichž se tvoří nové spory. Jak ve sklenících, tak i na poli může *H. rhossiliensis* způsobovat vysokou mortalitu

fytoparazitických háďátek. Vysoká hustota populace háďátek podporuje výskyt této houby v půdě (KOUBOVÁ, 2009).

V případě *H. rhossiliensis* se jedná o nadějný antagonistický organismus, jehož integrace do současných strategií ochrany rostlin by mohla být poměrně snadná (WWW7).

3.4.3. *Verticillium chlamyosporium*

syn. *Pochonia chlamyosporia*, syn. *Diheterospora chlamyosporia*

říše Fungi

oddělení: Ascomycota

třída *Sordariomycetes*

řád *Hypocreales*

rod *Verticillium* Ness

druh: *Verticillium chlamyosporium* Goddard 1913

Verticillium chlamyosporium byla uvedena jako půdní houba od roku 1913 a je celosvětově rozšířena (CHEN et al., 2004).

WILLCOX & TRIBE (1974) objevili její patogenitu na vajíčkách háďátek, byla také nalézána na různých háďátkách hlavně druhy z rodu *Heterodera* a *Meloidogyne*.

GAMS (1988) rozřadil houbu do dvou druhů a dvou variet: *Verticillium chlamyosporium* Goddard var. *chlamyosporium*, *Verticillium chlamyosporium* var. *catenulatum*, *Verticillium suchlasporium* var. *suchlasporium* a *Verticillium suchlasporium* var. *catenatum*.

Nematofágní izoláty houby se rozrůstají na vaječných shlucích, které vytvořily patogenní hlístice na kořenech citlivých rostlin, kde vytvářejí robustní chlamyospory. Jak houba napadá vaječné shluky, vajíčka jsou zničena a životní cyklus hlístic je narušen. Zvýšený počet houbových propagulí byl zaznamenán v půdách, které jsou supresivní k obilným hlísticím (KERRY & CRUMP, 1998).

Různé houbové izoláty jsou známé kolísáním účinnosti jejich biologické ochrany a jak rostlinní hostitelé, tak hostitelé ze zástupců hlístic, jsou součástí této interakce (BOURNE et al., 1994).

3.4.4. *Dactylaria candida* (Nees) Saccardo 1886

syn. *Dactylium candidum* Nees 1817

syn. *Dactylella candida* (Nees) De Hoog et V. Oorschot 1985

syn. *Arthrobotrys candida* (Nees) Schenk, Kendrick & Pramer

oddělení: Eumycota

třída: Deuteromycetes (Fungi imperfecti)

řád: *Moniliales* (Hyphomycetes)

čeleď: *Moniliaceae*

podčeleď: *Hyalophragmiae*

rod: *Dactylaria* Seccardo 1880

druh: *candida* (Nees) Saccardo 1886

Myceliální růstová rychlost a hustota *D. candidy* je srovnatelná s *Arthrobotrys dactyloides*, ale její mycelium je znatelně jemnější. Konidiofory *D. candidy* nesou na svém vrcholu 3 skupiny 5-7 mnohobuněčných větvenovitých spor, jejichž centrální buňka je větší než ta na spodu i na vrchu.

D. candida vyvíjí dva druhy pastí: 15-23 µm velké fixní prstence na 10-35 µm dlouhých stopkách a 4-7 µm dlouhé, 3,8-6 µm široké lepivé uzlíky na 4-15 µm dlouhých stopkách (DRECHSLER, 1937).

3.4.5. *Dactylella lysipaga* Drechsler 1937

říše: Fungi

podříše: Dikarya

kmen: Ascomycota

podkmen: Pezizomycotina

třída: Ascomycetes

řád: *Orbiliales*

čeleď: *Orbiliaceae*

rod: *Dactylella*

druh: *Dactylella lysipaga* Drechsler 1937

Konidiofory jsou velké, štíhlé, jednoduché, průhledné, několika- buněčné, elipsoidní, fusoid válečkovitý, nesený po jednom na vrcholu nebo ve volném shluku na vystupujících zubovitých výrůstcích. Parazituje na saprofitických nebo parazitických háďátkách (BARNETT & HUNTER, 1999).

3.4.6. *Arthrobotrys brochopaga* (Drechsler) S. Schenck, W.B. Kendr. & Pramer 1977

říše: Fungi

kmen: Ascomycota

třída: Ascomycetes

řád: *Orbiliales*

čeleď: *Onychiuroidea*

rod: *Arthrobotrys*

druh: *Arthrobotrys brochopaga* (Drechsler) S. Schenck, W.B. Kendr. & Pramer 1977

3.4.7. *Arthrobotrys dactyloides* Drechsler 1937

říše: Fungi

kmen: Ascomycota

třída: Ascomycetes

řád: *Orbiliales*

čeleď: *Hypogastruroidea*

rod: *Arthrobotrys*

druh: *Arthrobotrys dactyloides* Drechsler 1937

A. dactyloides vykazuje významně pomalejší a hustý hyfový růst než většina druhů vytvářející sítě, jako např. *A. superba* a *A. oligospora*.

Na vrcholu vzpřímeného nerozvětveného 200-400 µm velkého konidioforu nese skupinu 4-10 dvoubuněčných, podlouhlých, elipsoidních, mírně zakřivených 35-45 µm dlouhých a 6-10 µm širokých spor na 5 µm dlouhých sterigmatech (DRECHSLER, 1937).

Starší kultury vyvíjejí samostatné žluté, kulovité až 15 µm velké chlamydospory (HAARD, 1968).

3.4.8. *Arthrobotrys oligospora* Fresen. 1850

říše: Fungi

kmen: Ascomycota

třída: Ascomycetes

řád: *Orbiliales*

čeleď: *Hypogastruroidea*

rod: *Arthrobotrys*

druh: *Arthrobotrys oligospora* Fresen. 1850

Arthrobotrys oligospora je nejčastější, nejvíce rozšířený a doposud nejlépe zkoumaný druh nematofágních hub. Všudypřítomná houba byla izolována z mnoha různých substrátů, z kompostů, hnilivého dřeva a zvířecích výkalů.

Pokud jde o její růstové chování a tvar jejích lepicích trojrozměrných sítí, je podobný *A. superba* (DRECHSLER, 1937).

Konidiofory jsou dlouhé, štíhlé, jednoduché, přehrádkované, průhledné, mírně zvětšené ve špičce i sporulující oblasti (BARNETT & HUNTER, 1999).

Vzpřímené konidiofory podpírají 20-30 skupin 5-20 dvoubuněčných 16-30 μm dlouhých a 8-16 μm širokých spor zřetelně vroubkovaných uložených v kalíšku, jejichž distální buňka je asi dvakrát tak velká jak proximální buňka (HAARD, 1968).

3.4.9. *Monacrosporium phymathophagum*

říše:Fungi

oddělení: Ascomycota

třída: Orbiliomycetes

řád:*Orbiliales*

čeleď: *Orbiliaceae*

rod: *Monacrosporium* Oudem. 1885

druh: *Monacrosporium phymatophagum*

Konidiofory jsou velké, obvykle jednoduché, průhledné, štíhlé, pevné. Spory jsou jednotlivě v okolí hrotu, průhledné, několika-buněčné obvykle fusoid s jednou větší buňkou (blízko středu). Je saprofytická v půdě nebo na dřevě nebo parazituje na háďátkách (BARNETT & HUNTER, 1999).

Monacrosporium elliposporum (*Deuteromycotina*) má lapací struktury pokryty mucin-specifickým hemaglutininem s afinitou k některým živočišným mukopolysacharidům (WWW4).

4. Metodika

4.1. Odběr vzorků

Odběr vzorků byl proveden na 12 různých lokalitách. Vzorky byly odebírány v množství 150 g do plastických sáčků pomocí lopatky. Poté byly řádně označeny a vloženy do přepravky.

tab. 1: Místa odběrů vzorků

místo odběru vzorku	typ půdy	označení vzorku
Hořátev jaro	kompost	HJ1
Hořátev podzim	kompost	HP2
Chrást'any 1	orná půda	CH3
Chrást'any 2	orná půda	CH4
Sadská A	lesní půda	SA5
Sadská B	lesní půda	SB6
Sadská C	lesní půda	SC7
Dolínek ml.	orná půda	DM8
Dolínek st.	orná půda	DS9
Skleník	kompost	SK10
Chýniece 1	orná půda	CH11
Chýniece 2	orná půda	CH12

4.2. Izolace hub z půdních vzorků

Z půdních vzorků byly houby izolovány převedením půdy do roztoku a následnou aplikací na agarovou plotnu.

Nejdříve bylo naváženo od každého vzorku 10 g a k tomuto množství bylo přidáno 50 ml destilované vody. Oba komponenty byly smíchány v Erlenmayerových baňkách.

Erlenmayerovy baňky byly umístěny na třepačku Ika vibrax OS 10 Basic a po 20 minutách třepání při rychlosti 150 rpm se vzorky nechaly 10 minut sedimentovat. Poté proběhla aplikace na agarovou plotnu. Aplikace proběhla ve flow boxu, kde byly všechny pomůcky řádně vydesinfikovány 70 % etanolem. A to tak, že byly ponořeny do etanolu a poté nahřáty nad kahanem.

Pro optimální růst byl proveden pokus s několika typy agarových ploten. Jako materiál pro výrobu agarových ploten byl použit potato dextrose agar, rose bengal agar a oat meal agar.

4.2.1. Ředění

Vzorky byly zředěny v posoupné řadě od 10^{-1} do 10^{-10} . Ze vzorků převedených do roztoku byl pipetou odebrán 1 ml a přidán do 10 ml destilované vody. Tak vzniklo ředění 10^{-1} , vše bylo několikrát opakováno až do ředění 10^{-10} .

4.2.2. Roztěry na misku

Půdní roztoky jednotlivých vzorků byly aplikovány na agarovou plotnu pipetou v množství 1000 μ l a poté rozetřeny hokejkou, která byla před každým roztěrem desinfikována v 70 % etanolu a zahřáta nad plamenem.

Každý vzorek byl aplikován na pět agarových ploten, které byly popsány, zafixovány parafilmem a uloženy do termostatu při nastavené teplotě 25 °C.

4.2.3. Příprava agarů

Rose bengal agar:

složení:	g/l
dextrosa	10
dihydrogenfosforečnan draselný	1
sojový pepton	5
bengálská červeň	0,05
síran hořečnatý	0,5
agar	15

Bylo naváženo 17,5 g agaru a smícháno v Erlenmayerově baňce s 500 ml destilované vody, poté byla baňka uzavřena a při zahřívání ve vodní lázni došlo k úplnému rozpuštění agaru v destilované vodě. Po rozpuštění proběhla sterilizace v tlakovém hrnci při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Potato dextrose agar:

Složení:	g/l
Bramborová infuse	200
Dextrosa	20
Agar	15

Na přípravu 500 ml sterilního média bylo naváženo 19,5 g potato dextrose agaru, který byl rozpuštěn v Erlenmayerově baňce v 500 ml destilované vody. Po zahřívání až do úplného rozpuštění, proběhla sterilizace v tlakovém hrnci při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Konečné pH sterilního média bylo 5,6.

Oat meal agar:

Složení:	g/l
Ovesná mouka	60
Agar	12,5

Na přípravu 500 ml sterilního média bylo naváženo 36,25 g oat meal agaru a v Erlenmayerově baňce rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v tlakovém hrnci při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Konečné pH sterilního média bylo 7,2.

4.2.4. Příprava monosporických izolátů

Aby bylo docíleno monokultury bylo provedeno přeočkování jednotlivých kolonií hub na další agarové plotny se širokospektrálním antibiotikem tetracyklinem.

Přeočkování bylo prováděno několikrát, až do té doby, dokud nevznikla monokultura houby.

4.2.5. Vzorek Hořátev jaro

Jelikož byla zjištěna podobnost izolátu z půdního roztoku ze vzorku Hořátev jaro se vzorkem nematofágní houby *Arthrobotrys oligospora*, byl vzorek několikrát přeočkován, až do vzniku monosporové kultury, a následně odnesen na katedru botaniky přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy RNDr. Aleně Kubátové, která vzorek určila.

4.3. *Pochonia chlamydosporia* – použití jako modelového organismu pro optimalizaci metod

P. chlamydosporia byla napěstována na rose bengal agaru, potato dextose agaru a v tekutém médiu.

tekuté médium:

Na 500 ml destilované vody bylo naváženo:

5 g dextrosy

0,5 g dihydrogenfosforečnanu draselného

0,25 g síranu hořečnatého

2,5 g sojového peptonu

0,025 g bengálské červeně

Vařit 15 minut ve 121 °C v tlakovém hrnci.

Celkové množství 500 ml tekutého média bylo rozlito po 50 ml do každé Erlenmayerovy baňky.

Do jednotlivých baněk bylo přidáno po vychladnutí na 45 °C pipetou 100 µl tetracyklinu, který byl rozpuštěn v množství 0,1 g na 500 ml v dd H₂O.

Poté byl přidán vzorek mycelia *P. chlamydosporia*, Erlenmayerovy baňky byly uzavřeny a vloženy na třepačku Ika vibrax OS 10 Basic do termostatu při teplotě 21 °C.

4.3.1. Naočkování sterilního substrátu

Pro naočkování bylo použito 2 g sporulujícího mycelia *Pochonia chlamydosporia* a 50 g sterilního substrátu.

Sporulující mycelium bylo převedeno do vodného roztoku v množství 2 g mycelia *Pochonia chlamydosporia* na 100 ml destilované vody. Roztok byl poté vmíchán do sterilního substrátu.

Erlenmayerova baňka s naočkováným sterilním substrátem byla vložena na třepačku Ika vibrax OS 10 Basic po dobu 20 minut při rychlosti 150 rpm .

Naočkovaný sterilní substrát byl poté aplikován pipetou v množství 1000 µl na agarovou plotnu, která obsahovala rose bengal agar s přidavkem širokospektrálního antibiotika tetracyklinu. Po rozetření na agarovou plotnu byly Petriho misky o průměru 8 cm zafixovány parafilmem a vloženy do termostatu při teplotě 21 °C.

Po 5 dnech proběhlo vyhodnocení výsledků.

4.4. Izoláty nematofágních hub

Jako modelové organismy pro potřebu určování nematofágních hub byly použity monosporické izoláty hub z banky Centraalbureau voor Schimmelcultures se sídlem v Utrechtu v Holandsku. V tabulce 2 je uveden přehled monosporických izolátů, které byly zakoupeny.

Izoláty byly naočkovány na Petriho misky s potato dextrose agarem, rose bengal agarem a oat meal agarem, který obsahoval širokospektrální antibiotikum tetracyklin v množství 0,1 g na 500 ml agaru. Byly použity misky o průměru 8 cm. Reinokulace byla provedena 1x za 3 týdny.

tab.2: Přehled monosporických izolátů nematofágních hub

Monosporické izoláty	Označení vzorku
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	ARO1
<i>Arthrobotrys dactyloides</i>	ARD2
<i>Arthrobotrys brochopaga</i>	ARB3
<i>Dactyllaria candida</i>	DAC4
<i>Dactylella lysiphaga</i>	DAL5
<i>Dactyllaria oviparasitica</i>	DAO6
<i>Monacrosporium phymatophagum</i>	MOP7

4.4.1. Optimalizace živných látek ve sterilních médiích

Pro zjištění reakce houbových izolátů na nedostatek živin ve sterilním médiu byla provedena optimalizace živných látek.

U sterilních médií byl změněn poměr procentuálního zastoupení jednotlivých živných látek, a to na 100 %, 75 %, 50 % a 25 %.

Do agaru, kterého bylo naváženo 3,75 g, byly postupně přidávány jednotlivé živné látky. Poměr množství je udán v tab. 3. Poté byl agar se živnými látkami rozpuštěn v 250 ml destilované vody.

tab.3: Množství obsahových látek ve sterilním médiu, při různém ředění, rozpuštěno v 250 ml destilované vody

obsahové látky/ředění	100 %	75 %	50 %	25 %
agar	3,75	3,75	3,75	3,75
sojový pepton	1,25	0,9375	0,625	0,3125
dextrosa	2,5	1,875	1,25	0,625
dihydrogenfosforečnan draselný	0,25	0,1875	0,125	0,0625
síran hořečnatý	0,125	0,09375	0,06125	0,03125
bengálská červeň	0,0125	0,009375	0,006125	0,003125

Po rozpuštění byla provedena sterilizace v tlakovém hrnci po dobu 20 minut. Následně byl agar rozlít ve flowboxu do Petriho misek o průměru 6 cm. Všechny misky byly řádně označeny a zafixovány parafilmem. Poté byly misky vloženy do termostatu při teplotě 21°C, do doby než proběhla aplikace nematofágních hub.

Inokulace nematofágních hub proběhla ve flow boxu, kde byl vzorek mycelia přenesen na jednotlivé agarové plotny vysterilizovanou jehlou. K sterilizaci byl použit

70 % etanol a plamen.

Po třech dnech proběhlo vyhodnocení.

4.5. Využití háďátek pro detekci lapacích orgánů

Pro zjišťování zda nematofágní houby tvoří v laboratorních podmínkách lapací orgány byly použity háďátka druhu *Ditylenchus dipsaci* a *Caenorhabditis elegans*.

4.5.1. Extrakce háďátek

Nejdříve byla provedena izolace háďátek. Materiál, z kterého byly háďátka izolována, byl česnek napadený háďátko. Česnekové stroužky byly nakrájeny nadrobno kuchyňským nožem a následně bylo provedeno vyplavování. Pro vyplavování háďátek byla použita modifikovaná nálevková metoda dle Baermanna (viz.obr. 42). Bylo použito suchého materiálu, a proto vyplavování trvalo 4 hodiny.

Výsledný extrakt byl odlit na hodinové sklíčko a pod stereomikroskopem Olympus SZ61 byla háďátka mikropipetou odpipetována do malého množství destilované vody v mikrozkuhavce.

4.5.2. Sterilizace háďátek

Mikrozkuhavky z háďátky byly vloženy do centrifugy a centrifugovány při 6000 x g 4 minuty. Mikropipetou byla odebrána vrchní vrstva destilované vody z mikrozkuhavky a následně byla připipetována nová destilovaná voda. Vše bylo opakováno ještě 1x.

Další krok byl proveden v laminárním flow boxu, kde byly veškeré pomůcky vydesinfikovány 70 % etanolem.

Špička k pipetě o objemu 10 ml byla na úzkém konci utěsněná parafilmem, který byl v několika vrstvách. Poté byla naplněna 9 ml sterilního média. Sterilním médiem bylo 6,3 g agarů rozpuštěném v 500 ml destilované vody a sterilizované po dobu 20 minut v autoklávu. Při nalévání musí mít médium nižší teplotu, aby nedošlo k roztavení parafilmu.

Do mikrozkuhavky o objemu 1,5 ml bylo napipetován 1 ml destilované vody. Z úzkého konce špičky, po ztuhnutí agarů, byl odstraněn parafilm a špička byla seříznuta tak, aby se po vnoření špičky do mikrozkuhavky nedotýkala dna.

Spoj mikroskopické sondy se špičkou byl utěsněn několika vrstvami parafilmu. Do vrchní části špičky byla napipetována suspenze háďátek a destilované vody. Suspenze musí být napipetována přímo do agarů. Poté bylo vše ponecháno dva dny při teplotě 17 °C.

Po dvou dnech byla odejmuta špička od mikroskopické sondy a mikroskopická sonda byla uzavřena. Mikroskopická sonda byla vložena do centrifugy a zpuštěna při rychlosti 6 000 x g po dobu 4 minut. Následně byla pipetou odsáta přebytečná destilovaná voda.

4.5.3. Aplikace háďátek na agarové plotny

Háďátka byla aplikována na agarové plotny, na kterých byly předpěstovány monosporové izoláty nematofágních hub. Pro aplikaci byla využita mikropipeta, kterou byla aplikována suspenze háďátek o objemu 500 µl. Poté byly agarové plotny zafixovány a ponechány v termostatu o teplotě 21 °C. Po třech dnech proběhlo vyhodnocení.

4.6. Určování nematofágních hub

Zjišťování nematofágních hub bylo provedeno pomocí světelného inverzního mikroskopu (Olympus BX41), při běžném zvětšení 600x.

K determinaci jednotlivých druhů nematofágních hub bylo použito klíče, který sestavili WANG a MC SORLEY (2003).

Klíč k určování nematofágních hub

1. endoparazitické houby (podhoubí v životním cyklu převážně uvnitř háďátka).....	2
1. predatorní houby (podhoubí v životním cyklu převážně vně háďátka).....	13
2. asimilační hyfy uvnitř hostitele jsou přeměněny v infekční hyfy, které vyrůstají z hostitele, produkující lepicí buňky nebo ingestivní spory	3
2. vegetativní hyfy uvnitř hostitele jsou přeměněny do sporangí produkující zoospory nebo produkující spory, zygospory nebo azygospory	9
<u>endoparazitické houby s lepicími buňkami nebo ingestivními výtrusy</u>	
3. hyfy nepřehrádkované	4
3. hyfy přehrádkované.....	4
4. hyfy se svorkovým spojením.....	5
4. hyfy bez svorkového spojení.....	7
a. <i>Nematoctonus</i>	

- 5. hyfy nesoucí lepkavé buňky (uzlíky)
 - a. *Nematoctonus robustus* Jones
 - b. *N. concurrens* Drechs.
 - c. *N. haptocladus* Drechs.
 - d. *N. campylosporus* Drechs.
- 5. hyfy nenesou lepkavé buňky, ale vyrábějí lepkavé uzlíky na konidíích6
- 6. produkující chlamydospory .
 - a. *Nematoctonus pachysporus* Drechs
 - b. *N. tylosporus* Drechs.
- 6. neprodukující chlamydospory
 - a. *Nematoctonus leiosporus* Drechs.
 - b. *N. leptosporus* Drechs.
- 7. spory vyrůstající na strigmatech, žádné phialidy
 - a. *Drechmeria coniospora* (Drechs.) Gams & Jansson
- 7. spory vyrůstající na phialidě.....8
- 8. lepkavé spory
 - a. *Hirsutella rhossiliensis* Minter & Brandy
 - b. *H. minnesotensis* Chen, Liu, Chen
- 8. vláknité spory
 - a. *Harposporium helicoides* Drechs.
 - b. *H. oxycoracum* Drechs.
 - c. *H. subuliforme* Drechs.
- 8. obloukové spory
 - a. *H. anguillulae* Lohde (Karling)
 - b. *H. liliputanum* Dixon
 - c. *H. crassum* Shepard
- 8. spory přímé nebo mírně zakřivené
 - a. *H. baculiforme* Drechs.
 - b. *H. sicyodes* Drechs.
- 8. spory tvaru hrachového lusku, ostnaté v jednom nebo obou koncích
 - a. *H. bysmatosporum* Drechs.
 - b. *H. diceraeum* Drechs.

9. vegetativní hyfy uvnitř hostitele vyvinuté v konidiofory vycházející z hostitele, produkující spory

a. *Meristacrum asterospermum* Drechs.

endoparazité produkující spory

9. vegetativní hyfy uvnitř hostitele transformované do sporangií produkující výtrusy....10

10 Sporangium (zoosporangium) produkující pohyblivé zoospory.....11

10. Sporagium produkující nepohyblivé spory.....12

11. Zoospory nebičíkaté, žádné zygospor, žádné dormantní spory

a. *Catenaria anguillulae* Sorokin

b. *Rhizophydium* sp.

11. Zoospory se dvěma bičíky, tvorba zygospor, produkce dormantních spor

a. *Lagenidium caudatum* Barron

b. *Myzocyttium vermicola* (Zopf) Fischer

c. *M. glutinosporum* Barron

d. *M. humicola* Barron & Percy

e. *Nematophthora gynophila* Kerry & Crump

12. spory kulaté nebo mnohostěnné s lalokovitými přívěsky.

a. *Haptoglossa heterospora* Drechs.

12. kyjovité výtrusy

a. *Protascus subuliformis* Dangeard

houby lapající háďátka

13. morfologicky nemodifikované hyfy.....14

13. morfologicky upravené hyfy tvořící lapací struktury.....17

14. hyfy nepřehrádkované se žlutými lepivými substancemi.....15

14. hyfy přehrádkované.....16

lepivé mycelium

15. produkce spor na jednoduchých konidioforech

a. *Stylopage hadra* Drechs.

b. *S. leiohypha* Drechs.

c. *S. grandis* Drechs.

15. absence spor, tvorba chlamydospor

- a. tvorba postranních chlamydospor: *Cystopage lateralis* Drechs.
 - b. tvorba vsunutých chlamydospor: *C. intercalaris* Drechs.
 - c. chlamydospory na zakřivených hyfách nebo vsunuté chlamydospory: *C. cladospora* Drechs.
16. rozdvojené spory
- a. *Triposporina aphanopaga* Drechs.
16. rozvětvená spora třícípá
- a. *T. ridentaria implicans* Drechs.
17. hyfy nepřehrádkované, postranní větve nesou špatně rozlišitelné lepidivé uzlíky
- a. *Acaulopage pectospora* Drechs.
17. hyfy přehrádkované.....18
18. hyfy tvořící lepidivé větve, někdy formované do jednoduchých 2-rozměrných sítí, konidiofory jednoduché, jednotlivé terminální konidie
- lepidivé větve**
- a. *Monacrosporium cionopagum* (Drechs) Subram [*Dactylella cionapaga* Drechs]
 Synonym: *M. gephyropagum* (Drechs) Subram. [*Dactylella gephyropaga* Drechs.]
18. hyfy tvořící na stopkách nebo beze stopek lepidivé uzlíky.....19
18. hyfy tvořící na stopkách fixní oka, někdy doprovázené stopkatými lepidivými uzlíky.....21
18. hyfy tvořící stopkatá stahující se oka.....22
18. hyfy propojené 2 nebo 3- rozměrnými lepidivými sítěmi.....23
- lepidivé uzlíky**
19. konidiofory rozvětvené
- a. *Arthrobotrys haptospora* (Drechs.) Schenck, Kendr & Pramer [*Dactylaria haptospora* Drechs.]
 - b. *Monacrosporium haptotylum* (Drechs.) Liu & Zhang [*D. haptotyla* Drechs.]
 Synonym: *M. candidum* (Nees.) Liu & Zhang; *D. sclerohypha* Drechs
 - c. *M. asthenopagum* (Drechs.) Rubner [*Dactylella asthenopaga* Drechs.]
19. konidiofory jednoduché.....20
20. lepidivé uzlíky beze stopky

a. *Monacrosporium phymatopagum* (Drechs.) Subram. [*Dactylella phymatopaga* Drechs.]

20. lepkavé uzlíky bez stopky nebo krátká stopka, často tvořící krátké řetězce lepkavých uzlíků

a. *M. parvicolle* (Drechs.) Cooke & Dickinson [*Dactylella parvicollis* Drechs.]

b. *M. lobatum* (Dudd.) Rubner [*Dactylella lobata* Dudd.]

c. *M. robustum* (McCulloch)

20. lepkavé uzlíky vždy na stopce

a. *M. elliposporum* (Preuss) Cooke & Dickinson [*Dactylella ellipospora* (Preuss) Grove]

b. *M. mammillatum* (Dixon) Cooke & Dickinson [*D. mammillata* Dixon]

fixní oka

21. lepkavé uzlíky se nevyskytují

a. *Monacrosporium leptosporum* (Drechs.) Rubner [*Dactylella leptospora* Drechs.]

21. lepkavé uzlíky se vyskytují, konidiofory jednoduché

a. *Monacrosporium lysipagum* (Drechs.) Subram. [*Dactylella lysipaga* Drechs.]

21. lepkavé uzlíky se vyskytují, konidiofory rozvětvené.

a. *Monacrosporium candidum* (Nees) Liu & Zhang [*Dactylaria candida* (Nees) Sacc. Drechs.]

Synonym: *M. haptotylum* (Drechs) Liu & Zhang

stahující se oka

22. spory vyrůstající v terminálním shluku na konidioforech.

a. *Arthrotrys anchonia* Drechs.

b. *A. dactyloides* Drechs.

c. *A. brochopaga* (Drechs.) Schenck, Kendrick & Pramer [*Dactylella brochopaga* Drechs.]

d. *A. gracilis* (Dudd.) Schenck, Kendrick, & Pramer [*Dactylaria gracilis* Dudd]

22. konide vyrůstající po jednom na jednoduchých konidioforech.

a. *Monacrosporium polybrochum* (Drechs.) Subram. [*Trichothecium polybrochum* Drechs.]

b. *Monacrosporium acrochaetum* (Drechs.) Cooke [*Dactylella acrochaeta* Drechs.]

- c. *M. doedycoides* (Drechs.) Cooke & Dickinson [*D. doedycoides* Drechs.]
- e. *M. stenobrochaum* (Drech.) Subram. [*D. stenobrocha* Drechs.]
- f. *M. bembicodes* (Drech.) Subram [*D. bembicodes* Drechs.]
- g. *M. turkmenicum* (Sopronov) Cooke & Dickinson [*D. turkmenica* Sopronov]
- h. *M. coelobrochum* (Drechs) Subram. [*D. coelobrocha* (Drechs.) Subram.]

3-rozměrné sítě

23. spory s jednou přepážkou

- a. *Arthrotrys cystoporia* (Dudd.) Mekht. [*Trichothecium cystoporium* Dudd.]
- b. *Duddingtonia flagans* (Dudd.) Cooke [*T. flagrans* Dudd.]
- c. *T. pravicovi* Soprunov
- d. *T. globosporum* var *globosporum* Soprunov
- e. *T. globosporum* var *microsporum* Soprunov
- f. *T. globosporum* var *roseum* Soprunov
- g. *Arthrotrys arthrotrypoides* (Berl.) Lindau Drechs.
- h. *A. conoides* Drechs.
- i. *A. oligospora* Fresenius
- j. *A. superba* Corda.
- k. *A. longispora* Soprunov
- l. *A. oviformis* Soprunov
- m. *A. doliformis* Soprunov
- n. *A. kirghizica* Soprunov
- o. *A. cladodes* var *cladodes* Drechs.
- p. *A. cladodes* var *macroides* Drechs.
- q. *A. robusta* Dudd.
- r. *A. musiformis* Drechs.

23. spory s více než jednou přepážkou.

- a. *Monacrosporium eudermatum* (Drechs.) Subram [*Dactylaria eudermata* Drechs].
- b. *M. psychrophilum* (Drechs.) Cooke & Dickinson [*Dactylaria psychrophila* (Drechs) Subram.]
- c. *M. megalosporum* (Drechs) Subram. *Dactylella megalospora* Drechs.

- d. *M. reticulatum* (Peach) Cooke & Dickinson [*Dactylella reticulata* Peach]
 - e. *M. thaumasium* (Drechs.) de Hoog & Oorschot [*Dactylaria thaumasia* Drechs.]
 - f. *Arthrobotrys polycephala* (Drechs.) Rifai [*D. polycephala* Drechs.]
 - g. *A. pyriformis* (Juniper) Schenck, Kendr. & Pramer [*Dactylaria pyriformis* Juniper]
 - h. *A. scaphoides* (Peach) Schenck, Kendr. & Pramer [*Dactylaria scaphoides* Peach]
 - i. *M. gampsosporum* (Drechs.) Rubner [*Dactylaria gampsospora* Drechs.]
- <http://agroecology.ifas.ufl.edu/nematophagous%20fungi/Key%20for%20NTF.htm>

6. Výsledky

6.1. Ředění

K docílení optimálního růstu hub bylo použito ředění jednotlivých roztoků půdních vzorků.

Bylo zjištěno, že pro inokulaci na agarové plotny, je nejvhodnější ředění půdních roztoků na 10^{-5} .

6.2. Monosporové izoláty

Monosporové izoláty byly napěstovány na 3 různých agarech, a to na potato dextrose agaru, oat meal agaru a rose bengal agaru, přičemž nejrychlejší růst se projevil při pěstování na rose bengal agaru u všech monosporových izolátů, kromě izolátu *Dactylaria dactyloides* a *Dactyllaria oviparasitica*. U těchto izolátů byly optimalizovány podmínky pro pěstování na potato dextrose agaru.

Napěstované monosporové izoláty byly zdokumentovány fotoaparátem Konica Minolta Dimage Z20.

Agary:

Oat meal agar - OA

Rose bengal agar - RBA

Potato dextrose agar - PDA

Obr.10: *Dactyllela lysiphaga* - RBA



Obr.11: *Arthrobotrys brochopaga* -RBA



Obr.12: *Dactyllaria oviparasitica* - PDA

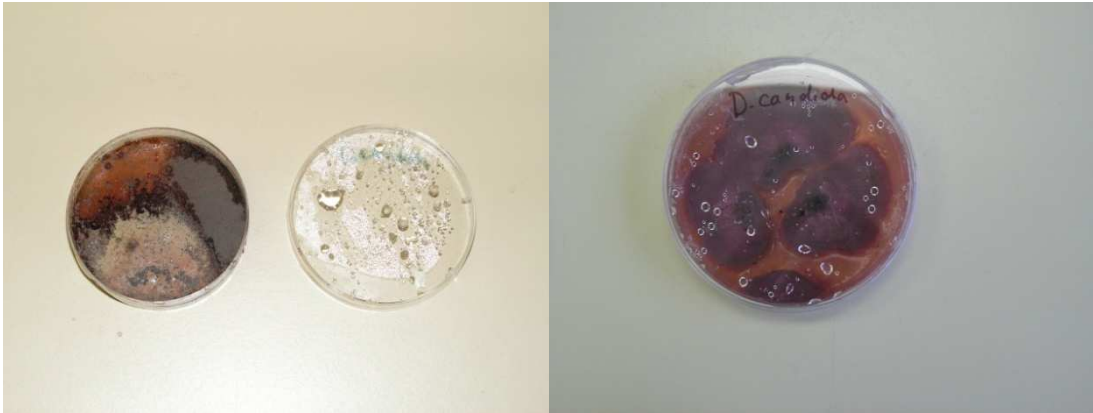


Obr.13: *Dactyllaria dactyloides* - PDA



Obr.14: *Dactyllela candida* – OA

Obr.15: *Dactyllela candida*-RBA

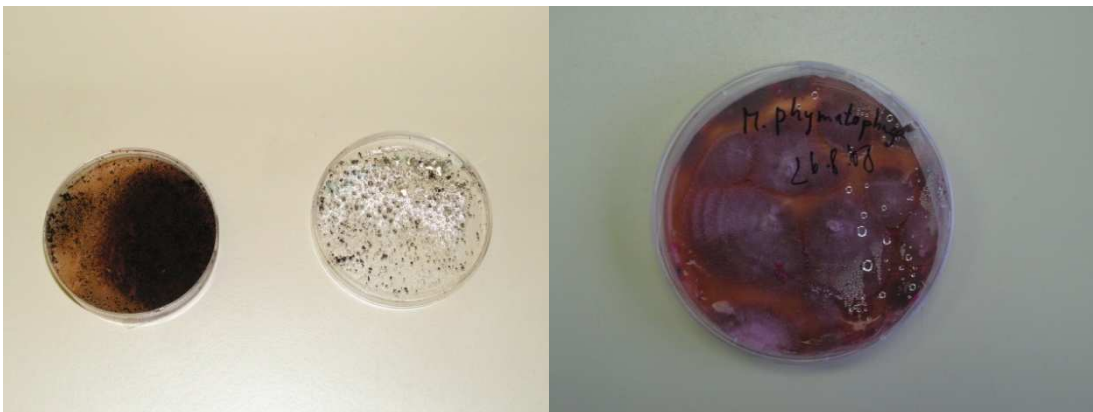


Obr.16: *Monacrosporium phymatophagum*

Obr.17: *Monacrosporium phymatophagum*

OA

RBA



Obr.18: *Pochonia chlamydosporia* - RBA



6.3 Aplikace háďátek na nematofágní houby vypěstované na agaru o různých živných hodnotách

Po aplikaci háďátek druhu *Caenorhabditis elegans* bylo provedeno vyhodnocení tvorby lapacích orgánů u nematofágních hub. V tabulce č. 4 jsou uvedeny výsledky tohoto pokusu.

Tab. 4: Tvorba lapacích struktur v závislosti na procentuálním zastoupení jednotlivých živin

Háďátka / % živin	100 %	75 %	50 %	25 %
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	žádné	žádné	minimální	minimální
<i>Caenorhabditis elegans</i>	žádné	střední	vysoké	střední

Jako optimalizace metody pěstování nematofágních hub na živných médiích byla nejlepší metoda s 50 % zastoupením živin v médiu.

6.4. Izolace druhu *Pochonia chlamydosporia* ze sterilního substrátu

U *Pochonia chlamydosporia* byly optimalizovány podmínky pro pěstování monosporového izolátu na agarové plotně. Bylo zjištěno, že nejvíce perspektivní je volba rose bengal agaru a následné uchování vzorků při teplotě 21 °C v termostatu.

Pro izolaci *Pochonia chlamydosporia* ze sterilního substrátu byla použita metoda namnožení na tekutém médiu (obr.19). Tato metoda zajistila úplné převedení *P. chlamydosporia* do sterilního substrátu a urychlení postupného rozrůstání. Testy ukázaly, že *P. chlamydosporia* je schopna opětovně vyrůst po naočkování na sterilní substrát a je tedy možnost využití této houby jako bioagens v ochraně proti hád'átkům.

Obr.19: *Pochonia chlamydosporia* napěstovaná v tekutém médiu



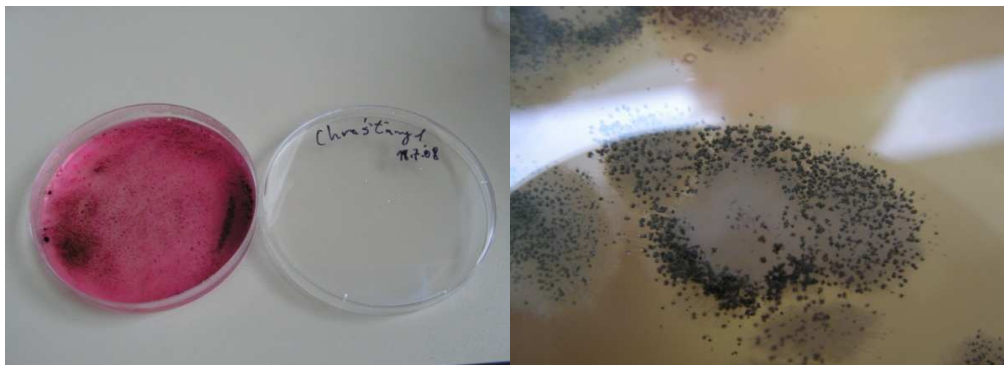
6.5. Izolace hub z odběrů půdních vzorků

Izolace byla provedena na třech různých agarech. Byly použity potato dextrose agar, bengal rose agar a oat meal agar. Optimální růst byl zaznamenán při použití rose bengal agaru, a proto byl tento agar používán při všech ostatních pokusech.

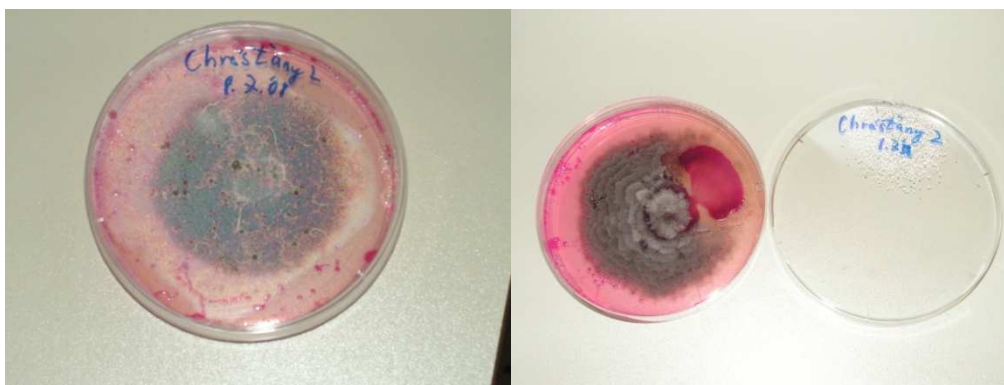
Ve vzorcích bylo zjištěno velké množství saprofytických hub, u kterých bylo obtížné přesné určení.

Jednotlivé izoláty ze vzorků půdních roztoků byly nafoceny fotoaparátem Konicou Minoltou Dimage Z20.

obr. 20: Chrášťany 1



obr. 21: Chrášťany 2

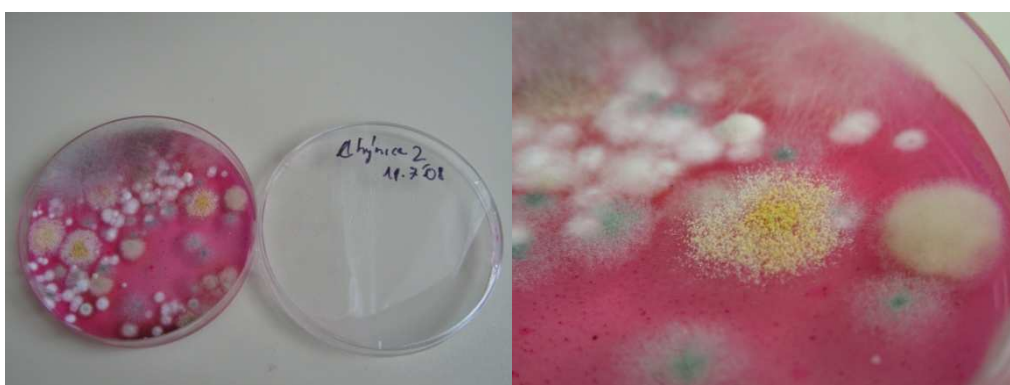


obr. 22: Chýnice1



Na obr. 22 vpravo je znázorněna hlenka *Aceria* sp., jejíž výskyt byl zaznamenán ve vzorku Chýnice 1. Zvětšeno pod binolupou Olympus. Dále zde byla objevena houby *Penicillium* sp.

obr. 23: Chýnice 2



Ve vzorku Chýnice 2 se vyskytovala nejčastěji houba z rodu *Penicillium* sp. a řád *Mucorales*.

obr. 24: Dolínek st.



obr. 25: Dolínek ml.

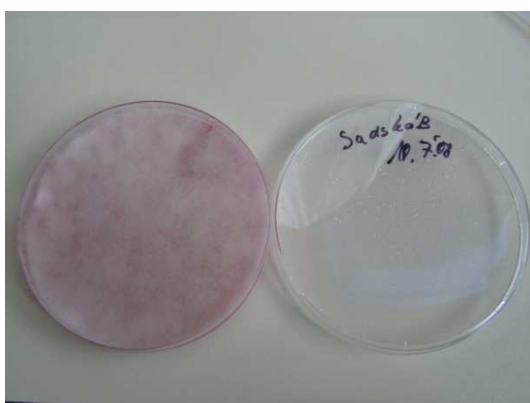


Ve vzorku Dolínek ml. se vyskytovaly houby z rodu *Rhizopus spp.* a *Fusarium spp.*

obr. 26: Sadská A



obr. 27: Sadská B



Ve vzorku Sadská B byla objevena houba z rodu *Microsporium spp.*

obr. 28: Sadská C



Vpravo na obr. 28 je znázorněna hlenka *Aceria* sp., která se vyskytovala ve vzorku ze Sadské C. Zvětšeno pod stereomikroskopem Olympus SZ.

obr. 29: Hořátek jaro

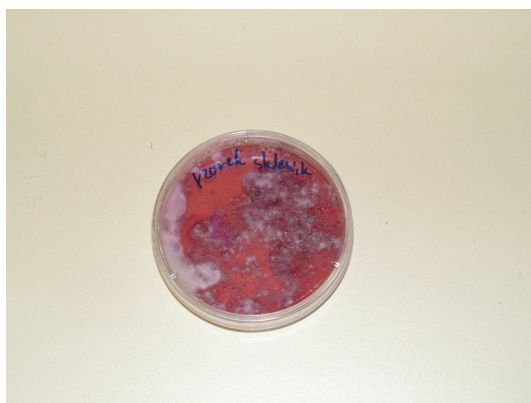


Ve vzorku z Hořátek jaro byla zjištěna houba *Pseudallescheria boydii* (anamorfy *Scedosporium apiospermum* a *Graphium eumorphum*), která je příležitostným patogenem.

obr. 30: Hořátev podzim



obr. 40: Skleník



6.6. Vzorek Hořátev jaro

Byla pozorována určitá podobnost s *Arthrotrrys oligospora*, jak je vidět na obr. 41. Proto byl vzorek odeslán na katedru botaniky přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy RNDr. Aleně Kubátové, která z něho určila houbu *Pseudallescheria boydii* (anamorfy *Scedosporium apiospermum* a *Graphium eumorphum*).

obr. 41: Porovnání *Arthrotrrys oligospora* se vzorkem z Hořátev jaro



5. Diskuze

Základním předpokladem pro úspěšné získání monosporických izolátů hub, které byly vyizolovány z půdních roztoku, bylo použití širokospektrálního antibiotika, řádné vydesinfikování flowboxu a aseptické pracování se vzorky.

VLK (1985) udává, že nejvíce se nematofágní houby vyskytují v supresivních půdách a půdách humusem bohatých s rozkládajícími se zbytky, a proto byla k provedení pokusů použita kompostovaná půda a půda lesní (hrabanka), u kterých byl předpokládán výskyt nematofágních hub.

Nematofágním houbám vyhovuje poměrně vysoká vlhkost, teplota v rozmezí 10-30°C, pH neutrální nebo slabě alkalické, dostatečně provzdušnění a přítomnost háďátek (saprofytických nebo parazitických), proto jsme optimalizovaly podmínky pro pěstování těchto hub. Teplota byla optimalizována na 21 °C a bylo provedeno také vyrovnání pH agarových ploten na neutrální pH.

Nematofágní houby ve vzorcích nebyly objeveny, což mohlo být způsobeno tím, že v laboratorních podmínkách nebyly schopny produkovat lapací struktury. Z tohoto důvodu bylo částečně znemožněno určení, zda se nematofágní houby vyskytovaly v odebraných půdních vzorcích.

V našem pokusu jsme také zjišťovali, zda izoláty nematofágních hub *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys dactyloides*, *Arthrobotrys brochopaga*, *Dactylaria candida*, *Dactylella lysiphaga*, *Dactylaria oviparasitica* a *Monacrosporium phymatophagum* jsou schopny v laboratorních podmínkách vytvářet lapací struktury.

Pro pokusy s izoláty nematofágních hub byly využity háďátka rodu *Ditylenchus dipsaci* a *Caenorhabditis elegans*. Použití obou dvou rodů bylo zdůvodněno snadným získáváním a chovem. U *Ditylenchus dipsaci* proběhla izolace z česneku. Při izolaci se osvědčila nálevková metoda dle Baermanna.

Po přidání vysterilizovaných háďátek rodu *Ditylenchus dipsaci* nebylo zjištěno žádné vytváření lapacích struktur, což se shoduje s výsledky uvedené ANONYMEM (2008), který tvrdí, že nematofágní houby v čistých kulturách netvoří lapací struktury.

Bylo tedy možné, že houby měly velký příjem živin z agarových ploten, a proto nereagovaly na přidanou kořist tvorbou lapacích struktur. Na popud této možnosti byl proveden další pokus, v kterém bylo změněno ředění živin v agarech a to na 100 %, 75 %, 50 %, a 25 %. Lapací struktury se ani v tomto případě nevytvořily.

BEČVÁŘ (1998) navzdory předchozímu tvrzení uvádí, že v umělých podmínkách dochází k vytvoření lapacích struktur, ale až po přidání kořisti. Proto byl proveden další pokus s přidáním tentokrát půdních háďátek *Caenorhabditis elegans* na agarové plotny, v kterých byly naředěny živiny a to na 100 %, 75 %, 50 %, a 25 %.

Caenorhabditis elegans byl naočkován na *Arthrobotrys oligospora*, u které bylo dle literatury očekáváno tvoření lapacích struktur ve formě fixních ok, do kterých se háďátka zachytávají a jsou prorůstány infekční hyfou.

Po naočkování byla objevena tvorba fixních ok u naředění na 25 % a 50 %, čím se potvrdili údaje BEČVÁŘE (1998a), který uvádí, že potenciální kořisti tj. háďátka tvoří látky, jejichž přítomnost v prostředí indukuje tvorbu pastí a že za nedostatku lehce využitelných živin je indukce tvorby pastí vyšší.

Nedávno byla rovněž doložena periodicitu tvorby pastí u *Arthrobotrys oligospora* na myceliu přímo v půdě, s periodicitou kolem 29 hodin, která souvisela s maximy obsahu minerálních látek v myceliu predátora.

7.Závěr

Tato diplomová práce by měla přispět k dalšímu studiu nematofágních hub, které se využívají jako přirozený nepřátelský organismus v biologické ochraně rostlin proti hád'átkům.

Vypěstování nematofágních hub v laboratorních podmínkách vyžaduje optimalizaci působení prostředí a to vyrovnání pH, stabilizaci teploty, a pro tvorbu lapacích struktur přidání kořisti, v závislosti na tomto zjištění, budou provedeny ještě další pokusy, které se budou zaměřovat na optimalizaci jednotlivých metod pěstování nematofágních hub.

V budoucnu by měl být výzkum zaměřen na využití nematofágních hub v biologické ochraně a jejího včlenění do integrované ochrany rostlin.

8. Seznam literatury

Anonym (2008): [online] [cit. 2008-12-08]. dostupné z:
<http://www.gypce.cz/Projekty/4A%20-%202003%20-%20Word/Maso%9Erav%E9%20rostliny.doc>

Bagar, M., Honěk, A., Lukáš, J., Pekár, S., Pultar, O., Stejskal, V., Zacharda, M., Žďárková, E. (2003): Predátoři a parazitoidi v biologické ochraně polních kultur, skleníků a skladovaných komodit, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně, 60 str.

Barnett HL & Hunter BB (1999). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. The Amer. Phytopathol. Soc. St. Paul, Minnesota (USA) Aps Pres. 451 p.

Bečvář, K. (1999a): Dravé houby I. Živa nakladatelství Academia, Středisko společných činností AV ČR, v. v. i. 1999, 1. 16-18

Bečvář, K. (1999b): Dravé houby II. Živa nakladatelství Academia, Středisko společných činností AV ČR, v. v. i. 1999, 2. 62-63

Bourne, J. M., Kerry, B. R. a de Leij, F. A. A. M. (1994): Methods for the study of *Verticillium chlamydosporium* in the rhizosphere. Workshop: Organisms and Methods for Biological Control of Nematodes. J. Nematol. 26 Suppl. 587–591

Brzeski, M. W. (1998): Nematodes of *Tylenchina* in Poland and temperate Europe. Muzeum i Institut Zoologii polska Akademia Nauk Warsawa. 395 p.

Dowsett, J.A.; Reid, J. (1979): Observations on the trapping of nematodes by *Dactylaria scaphoides* using optical, transmission and scanning-electron-microscopic techniques Mycologia 71, 2. 379-391

Drechsler, C. (1937): New Zoopagaceae destructive to soil rhizopods. Mycologia 29. 229-249.

Duan, Y.P., Castro, H.F., Hewlett, T.E., White, J.H., Ogram, A.V. (2003): Detection and characterization of *Pasteuria* 16S rRNA gene sequences from nematodes and soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 53.105-112

Evans, K., Trudgill, D. L., Webster, J. M. (1993): Plant parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. CAB International. 648 p.

Gams, W. (1988): A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Vericillium*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 94. 123-148

Gray, N., F., (1986): Nematophageous fungi with particular reference to their ecology. *Biological revue*. 62. 245-304

Haard, K. (1968): Taxonomic studies on the genus *Arthrobotrys corda*. *Mycologia* 60. 1140-1159

Häni, F., Popow, G., Reinhard, H., Schwarz, A., Tanner, K., Vorlet, M. (1993): *Obrazový atlas choroba škůdců polních plodin*. Scientia s.r.o., pedagogické nakladatelství, Praha 1993. 335 str.

Hluchý, M., Prášil, J., Rod, J., Somssich, I., Zacharda, M., Zavadil, K. (2005): *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy*. Biocont Laboratory s. r. o. 392 str.

Hrdý, I. a kol. (1991): *Biopesticidy v zemědělství*, Praha Ministerstvo zemědělství ČR. 107 str.

Chen, Z. X., Chen S. Y., Dickson, D. W. (2004): *Nematology advances a perspectives*. Nematode Managment and Utilization. CAB International. Tsinghua University Press. 1234 str.

Chen, Z. X., Dickson, D. W., Freitas, L. G., Preston J. F. (1996): Ultrastructure, Morphology and Sporogenesis of *Pasteuria penetrans*. *Phytopathology* 87. 273-283

Insell, J. P. a Zachariah, K. (1978): Some ring-trap mutants of the fungus *Dactylella brochopaga* Drechsler. *Archives of Microbiology* 117. 221-226

Jaffee, B. A., Ferris, H., Scow, K. M. (1998). Nematode-Trapping Fungi in Organic and Conventional Cropping Systems. *Phytopathology*, 88, 4. 344-350.

James, R. R. (2001): Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the silverleaf whitefly for two hyphomycetes. *J Invertebr Pathol* 77. 99–107

Kerry, B. R. a Crump, D. H.(1998): The dynamics of the decline of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, in four soils under intensive cereal production. *Fund. Appl. Nematol.* 21. 617–626

Khan, M.R., Khan, S.M., Mohide, F. (2005): Root-knot nematode problem of some winter ornamental plants and its biomanagement. *Journal of Nematology.*37, 2.198-206

Koubová, D. (2008): *Fusarium oxysporum* v ochraně rostlin proti háďátkům. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 60, 6.142

Koubová, D.(2009): Účinnost enkapsulované houby *Hirsutella rhossiliensis* proti *Heterodera schachtii* na cukrovce [online] [cit. 2009-01-08]. dostupné z: <http://www.bba.de/veroeff/mitt/pdfs/mitt404.pdf>

Landa, Z. (1998): Biopreparáty na bázi entomopatogenních hub. *Agro-ochrana rostlin* 1998, 10. 7-12

Liou, G.Y. a Tzean, S.S. (1997): Phylogeny of the genus *Arthrobotrys* and allied nematode-trapping fungi based on rDNA sequences.- *Mycologia*, 89: 876-884.

Osborne, L.S., Landa, Z., (1992): Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist*, 75, 4. 456 - 471

Perry, R. N., Moens, M. (2006): *Plant Nematology*. CABI North American Office. 447 p.

Sayre, R. M., Starr, M. P. (1985): *Bacterial diseases and antagonists of nematodes. Diseases of Nematodes* CRC Press Boca Raton. 101 p.

Siddiqi, M. R. (2000): *Tylenchida Parasites of Plants and Insects*. 2nd edn. CAB International, Wallingford UK. 645 p.

Štusák, J., Táborský, J. (1983): *Základy ochrany rostlin*. Vysoká škola zemědělská v Praze. 1. vydání. 264 str.

Táborský, V., Šedivý, J. (1997): *Rostlinolékařství*. Credit Praha. 1. vydání. 347 str.

Tichá, K. a kol. (2001): *Biologická ochrana rostlin*, Grada Publishing, spol. s.r.o. Praha, 86 str.

Vlk, F. (1985): *Ochrana rostlin – Nematologie obecná a speciální*. Scriptum VŠZ, Praha. 243 str.

Wang, J. a McSorley, L. (2003): Klíč určování nematofágních hub [online] [citace 26.2.2009] dostupné z:

[http:// agroecology.ifas.ufl.edu/nematophagous%20fungi/Key%20for%20NTF.htm](http://agroecology.ifas.ufl.edu/nematophagous%20fungi/Key%20for%20NTF.htm)

Willcox, J., Tribe, H. T. (1974): Fungal parasitism of cysts of *Heterodera*. I. Preliminary investigations. Transactions British Mycological Society, 62. 585-594

www 1 <http://www.agris.cz/hobby/detail.php?id=145448&iSub=1052&PHPSESSID=bb>

www2 <http://rl.zf.jcu.cz/studijni-informacni-databaze/obecne-informace-1/obecne-informace-1/paecilomyces-fumosoroseus>

www3 <http://www.biological-research.com/philip-jacobs%20BRIC/fangorg.htm>

www4 http://www.masozravky.com/rody/drave_houby/pasti.htm

www5 <http://www.masozravky.com/ostatni/STUDNICKA/studnicka31.htm>

www6 <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=103&ch=1&typ=1&val=41756>

www7 <http://biom.cz/cz/zpravy-z-tisku/hirsutella-rhossiliensis-formulace-ucinek-na-necilove-organismy-a-vliv-pesticidu>

Zouhar, M., Gaar, V. (2003): Základní metody diagnostiky a determinace karanténních druhů háďátek z rodu *Globodera* (*G. Rostochiensis* a *G. Pallida*) pro potřebu praxe (Metodika pro praxi) ČZU v Praze, 1. vydání. 70 str.

9. Přílohy

obrázek 42: nálevková metoda dle Baermanna

obrázek 43: Lapací sítě u *Arthrobotrys oligospora*

obrázek 44: Spory bakterie *Pasteuria penetrans* zachycené na háďátku

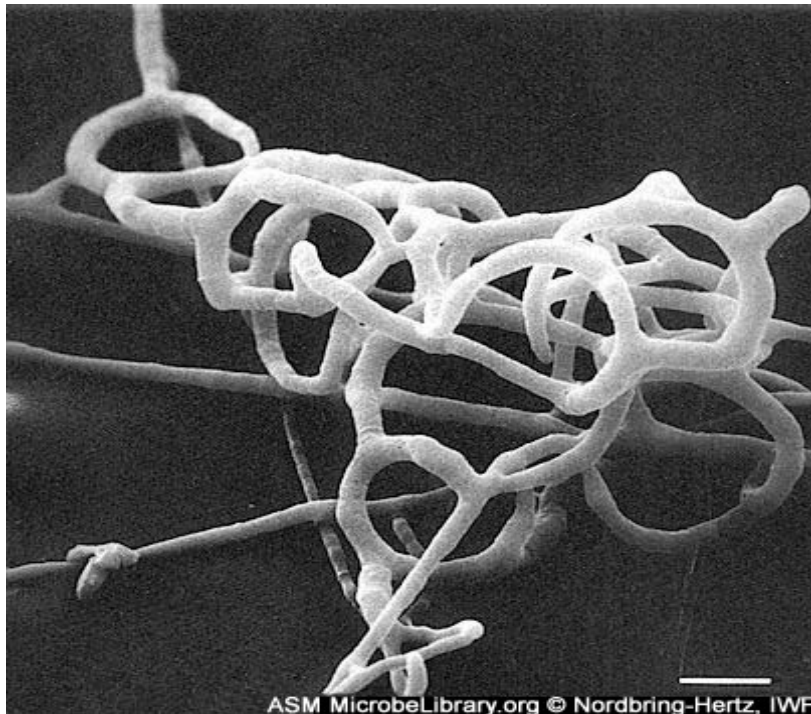
obrázek 45: *Arthrobotrys oligospora* chytající háďátko

obrázek 46: *Dactyllaria candida*

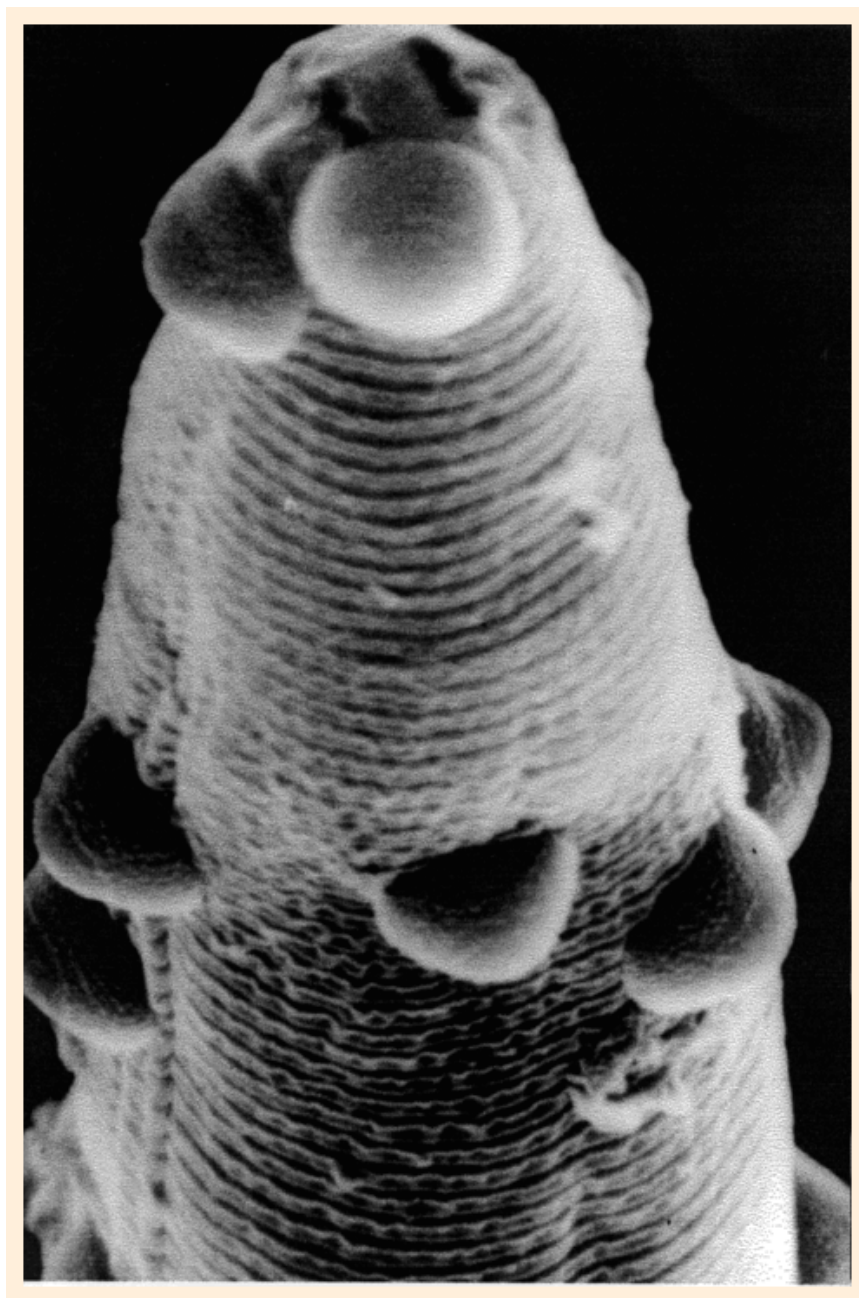
obrázek 47: Spora *Arthrobotrys superba* zachycena na háďátku



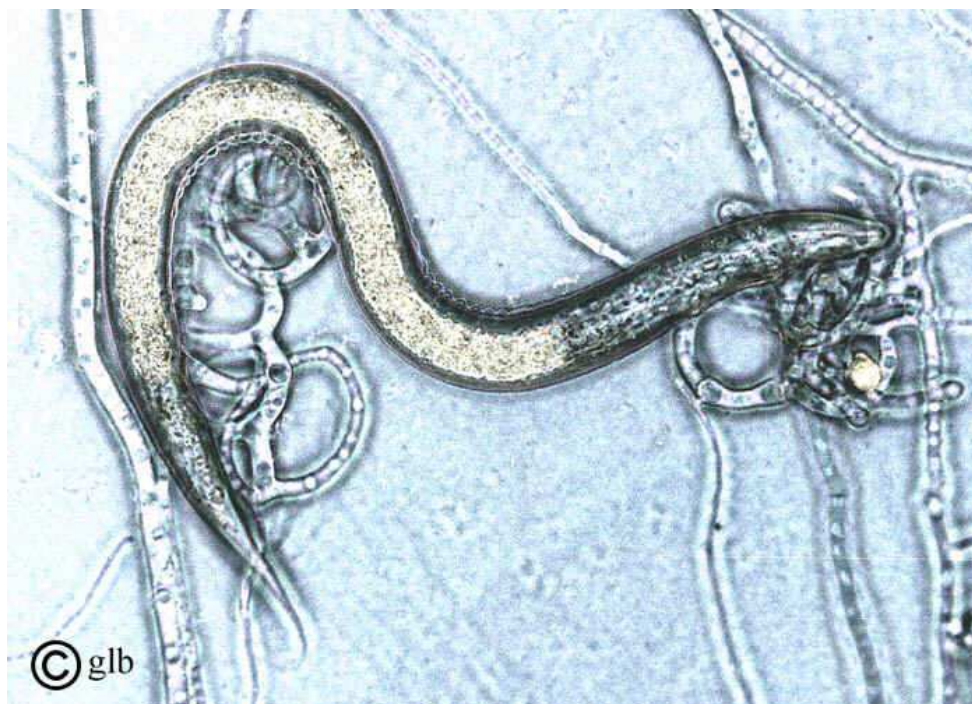
obr.42: Nálevková metoda dle Baermann



obr. 43: Lapací sítě u *Arthrotrys oligospora*

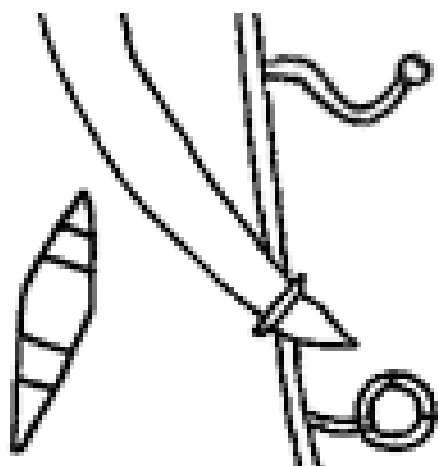


obr.44: Spory bakterie *Pasteuria penetrans* zachycené na háďátku



© glb

obr. 45: *Arthrobotrys oligospora* chytající háďátko



obr. 46: *Dactyilaria candida*



obr. 47: Spora *Arthrobotrys superba* zachycena na háďátku