

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra ochrany rostlin**

**Nematofágní houby jako klíč k biologické ochraně  
rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům**

doktorská disertační práce

Autor: Ing. Jana Pekárková  
Školitel: Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.  
Konzultant: Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.

**Praha 2014**

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně, pod vedením vedoucího disertační práce a s použitím citované literatury.

V Praze dne 26.9.2014

Ing. Jana Pekárková

### **Poděkování**

Nejprve bych chtěla poděkovat mému školiteli Prof.. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc. a konzultantovi Ing. Miloslavu Zouharovi, Ph.D. za čas, který mi věnovali a za veškerou pomoc během mého doktorandského studia, bez nich by tato práce nemohla vzniknout.

Také chci poděkovat Ing. Janě Mazákové Ph.D. za přínosné rady a připomínky k disertační práci a za trpělivost, kterou mi věnovala.

Děkuji taktéž všem svým kolegům z Katedry ochrany rostlin za podporu a dodávání optimismu, který jsem při psaní práce potřebovala.

Důležité poděkování patří celé mé rodině a mému manželovi za jejich úžasnou podporu a Hance, Jiřce a Petrovi, kteří mi drželi palce.

**Obsah:**

|   |             |           |
|---|-------------|-----------|
| <b>1.</b>   | <b>Úvod</b> | <b>9</b>  |
| <b>2. Přehled o současném stavu poznání</b>   |             | <b>10</b> |
| <b>2.1. Fytoparazitická háďátka</b>   |             | <b>10</b> |
| 2.1.1. Háďátka kořenová cystotvorná   |             | 11        |
| 2.1.1.1. Háďátko řepné <i>Heterodera schachtii</i> Schmidt, 1871  |             | 11        |
| 2.1.1.2. Háďátko bramborové <i>Globodera rostochiensis</i> (Wollenweber, 1923), Skarbilovich, 1959 a <i>Globodera pallida</i> (Stone, 1973) |             | 13        |
| 2.1.2. Háďátka kořenová hátkotvorná   |             | 14        |
| 2.1.2.1. <i>Meloidogyne hapla</i> Chitwood, 1949  |             | 14        |
| 2.1.3. Háďátka osní   |             | 15        |
| 2.1.3.1. <i>Ditylenchus dipsaci</i> Kühn, 1857  |             | 15        |
| 2.1.4. Háďátka půdní volně žijící   |             | 18        |
| 2.1.4.1. <i>Caenorhabditis elegans</i> Maupas, 1899   |             | 18        |
| <b>2.2. Ochrana proti fytoparazitickým háďátkům</b>   |             | <b>19</b> |
| 2.2.1. Preventivní opatření   |             | 19        |
| 2.2.2. Fyzikální ochrana  |             | 20        |
| 2.2.3. Chemická ochrana   |             | 21        |
| 2.2.4. Biologická ochrana   |             | 22        |
| 2.2.4.1. Využití rostlin a rostlinných látek  |             | 22        |
| 2.2.4.2. Využití bakterií   |             | 23        |
| 2.2.4.3. Využití houbových organismů  |             | 23        |
| 2.3.1. Vybrané druhy nematofágních hub  |             | 26        |
| 2.3.1.1. <i>Stropharia rugosoannulata</i> Farl. ex Murrill 1922   |             | 26        |
| 2.3.1.2. <i>Arthrobotrys oligospora</i> Fresen. 1850  |             | 27        |
| 2.3.1.3. <i>Verticillium chlamydosporium</i> Goddard 1913   |             | 28        |
| <b>3. Vědecké hypotézy a cíle</b>   |             | <b>30</b> |
| <b>Hypotéza</b>   |             | <b>30</b> |
| <b>Cíl práce</b>  |             | <b>30</b> |
| <b>4. Materiál a metody</b>   |             | <b>31</b> |
| 4.2. Izolace nematofágních hub  |             | 39        |
| 4.2.1. Sběr půdních vzorků  |             | 39        |
| 4.2.2. Živná média  |             | 39        |
| 4.2.3. Izolace s využitím půdního výluhu  |             | 41        |
| 4.2.4. Izolace s využitím půdních částic  |             | 41        |
| 4. 2. 5. Izolace acanthocytů <i>Stropharia rugosoannulata</i>   |             | 42        |
| Izolace s využitím parafilmu  |             | 42        |
| Izolace s využitím celofánové membrány  |             | 42        |
| 4.3. Uchovávání nematofágních druhů hub   |             | 42        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3.1. Lyofilizace  | 42        |
| 4.3.2. Šikmé agary  | 43        |
| 4. 4. Diagnostika izolovaných nematofágních hub   | 44        |
| 4.4.1. Morfologická diagnostika   | 44        |
| 4.4.2. Molekulárně biologická diagnostika   | 44        |
| 4.4.2.1. Izolace DNA  | 44        |
| 4.4.2.2. Polymerázová řetězová reakce   | 45        |
| 4.4.2.3. Izolace fragmentů DNA z agarosového gelu   | 47        |
| 4.4.2.4. Ligace PCR produktu do plazmidu a transformace plazmidového vektoru do bakteriálních buněk   | 48        |
| <b>4.5. Testování nematofágní aktivity získaných hub</b>  | <b>50</b> |
| 4.5.1. In vitro testování   | 50        |
| 4.5.1.1. Testování nematofágní aktivity získaných izolátů z půdních vzorků  | 50        |
| 4.5.1.2. Testování mortality hádátek s využitím nematofágních hub pomocí sklíčkových kultur   | 50        |
| 4.5.1.3. In vitro testy imobilizace a mortality hádátek pomocí <i>Stropharia rugosoannulata</i> a <i>Arthrobotrys oligospora</i>  | 51        |
| 5. 4. 3.1. Testování nematofágní aktivity <i>Stropharia rugosoannulata</i> na <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>   | 51        |
| 4.5.1.3.2. Testování účinnosti nematofágní aktivity <i>Stropharia rugosoannulata</i> a <i>Arthrobotrys oligospora</i> na fytoparazitická hádátka <i>Meloidogyne hapla</i> | 52        |
| 4.5.2. In vivo testy  | 52        |
| 4.5.2.1. Nádobové pokusy  | 52        |
| 4.5.2.2. Polní pokusy   | 53        |
| <b>4.6. Testování schopnosti růstu a reprodukce nematofágních hub na agarech s různými nutričními příměsmi</b>  | <b>55</b> |
| <b>5. Výsledky</b>  | <b>57</b> |
| <b>5.1. Izolace nematofágních hub</b>   | <b>57</b> |
| <b>5.1.1. Sběr půdních vzorků</b>   | <b>57</b> |
| <b>5.1.2. Izolace nematofágních hub z půdních vzorků (s využitím půdního výluhu a půdních částic)</b>   | <b>57</b> |
| <b>5.3. Uchovávání jednotlivých izolátů nematofágních hub</b>   | <b>57</b> |
| 5.3.1. Lyofilizace  | 57        |
| 5.3.2. Šikmé agary  | 57        |
| <b>5.4. Morfologická a molekulárně biologická diagnostika izolovaných nematofágních druhů hub</b>   | <b>58</b> |
| <b>5.5. Získané druhy nematofágních hub</b>   | <b>59</b> |
| <b>5.6. Testování nematofágní aktivity získaných hub</b>  | <b>60</b> |
| 5.6.1. In vitro testování   | 60        |
| 5.6.1.1. Testování nematofágní aktivity získaných izolátů z půdních vzorků  | 60        |
| 5.6.1.2. Testování mortality hádátek s využitím nematofágních hub pomocí sklíčkových kultur   | 61        |
| 5.6.1.2.1. Testování mortality <i>Ditylenchus dipsaci</i>   | 61        |
| 5.6.1.2.2. Testování mortality <i>Globodera rostochiensis</i>   | 62        |
| 5.6.1.2.3. Testování mortality <i>Meloidogyne hapla</i>   | 62        |
| 5.6.1.3. In vitro testy imobilizace a mortality hádátek pomocí <i>Stropharia rugosoannulata</i> a <i>Arthrobotrys oligospora</i>  | 63        |
| 5.6.1.3.1. Výsledky testování nematofágní aktivity <i>Stropharia rugosoannulata</i> na <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>  | 63        |
| 5.6.1.3.2. Výsledky účinnosti nematofágní aktivity <i>Stropharia rugosoannulata</i> a <i>Arthrobotrys</i>   |           |

|   |           |
|---|-----------|
| oligospora na fytoparazitická háďátka <i>Meloidogyne hapla</i>  | 65        |
| <b>5.6.2. In vivo nádobové testy</b>  | <b>66</b> |
| 5.6.2.1. <i>Globodera rostochiensis</i>   | 66        |
| 5.6.2.1.1. Výsledky statistického hodnocení účinnosti nematofágních hub na háďátko <i>Globodera rostochiensis</i> ve skleníkových řízených podmínkách | 66        |
| 5.6.2.2. <i>Meloidogyne hapla</i>   | 67        |
| 5.6.2.2.1. Výsledky statistického hodnocení účinnosti nematofágních hub na háďátko <i>Meloidogyne hapla</i> ve skleníkových řízených podmínkách       | 67        |
| 5.6.2.3. <i>Ditylenchus dipsaci</i>   | 68        |
| 5.6.2.3.1. Výsledky statistického hodnocení účinnosti nematofágních hub na háďátko <i>Ditylenchus dipsaci</i> ve skleníkových řízených podmínkách     | 68        |
| 5.6.3. In vivo polní testy  | 68        |
| <b>5.7. Testování schopnosti růstu a reprodukce nematofágních hub na agarech s různými nutričními příměsmi</b>  | <b>70</b> |
| <br>  |           |
| <b>6. Diskuze</b>   | <b>76</b> |
| <br>  |           |
| <b>7. Závěr</b>   | <b>81</b> |
| <br>  |           |
| <b>6. Citace</b>  | <b>83</b> |
| <br>  |           |
| <b>Přílohy</b>  | <b>93</b> |
| Seznam obrázků, tabulek a grafů v příloze   | 93        |
| Klíč k určování nematofágních hub   | 117       |
| Seznam zkratk použitých v textu   | 123       |
| Seznam publikací  | 124       |

## Abstrakt

Fytoparazitická hád'átka jsou skupinou mikroskopických škůdců rostlin způsobující závažné ztráty na pěstovaných komoditách a jejich význam je v ČR často opomíjen. Vzhledem k vysoké škodlivosti a problematické ochraně se fytoparazitická hád'átka řadí k hospodářsky významným škůdcům, které je třeba potlačovat všemi dostupnými prostředky. Vzhledem k nedostačující chemické ochraně je kladen důraz na nalezení vhodné náhrady v podobě biologické ochrany. Využití nematofágních hub je jedním z alternativních řešení, které by mohlo mít pozitivní dopad na boj proti fytoparazitickým hád'átkům.

Tato práce je založena na hypotéze, že v půdách na území ČR jsou přítomny nematofágní druhy hub, které lze izolovat a využít k biologické ochraně proti fytoparazitickým hád'átkům.

Cílem práce bylo nalézt druhy nematofágních hub, kterým by vyhovovaly klimatické podmínky ČR, tyto druhy charakterizovat a otestovat možnost jejich využití v systémech integrované ochrany rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům.

Odběr vzorků půdy potřebných pro zjištění výskytu nematofágních druhů hub v ČR byl proveden na místech s půdou bohatou na organické látky, kde se předpokládal výskyt těchto hub. Nematofágní aktivita jednotlivých izolátů hub byla testována v in vitro a následně in vivo podmínkách. Následně, byla testována schopnost růstu a reprodukce nematofágních hub na agaru s příměsmi. Oat meal agar s příměsí zeolitu byl vyhodnocen jako nejlepší kombinací pro následné použití v polních podmínkách.

Z pokusů, které byly provedeny v jednotlivých letech, vyšlo najevo, že nejúčinnějšími druhy nematofágních hub, které by byly vhodné pro využití v rámci biologické ochrany proti fytoparazitickým hád'átkům jsou houby druhu *Arthrobotrys oligospora*, využitelné pro široké spektrum jednotlivých druhů hád'átek a *Stropharia rugosoannulata*, která byla nejúčinnější v potlačování hád'átek *Meloidogyne hapla* a *Bursaphelenchus xylophilus*.

Klíčová slova: nematofágní houby, biologická ochrana, fytoparazitická hád'átka, *Arthrobotrys oligospora*, *Stropharia rugosoannulata*

## Abstract

Plantparasitic nematodes are the group of microscopic pests of plants causing serious losses to crops and their importance is often underestimated in the Czech Republic. With respect to considerable harmfulness and difficult protection the plantparasitic nematodes belong to the economically important pests that need to be suppressed by all available means. As the chemical methods of protection are considered inadequate, finding a suitable replacement in the form of biological control would be highly desirable. One of the alternative solutions is the utilization of nematophagous fungi that could have a positive impact on the pest management of plantparasitic nematodes.

This work is based on the hypothesis that the soils in the Czech Republic are inhabited by nematophagous species of the fungi that can be isolated and used for biological control of plantparasitic nematodes.

The object of the work is to find the species of nematophagous fungi which would be favoured by climatic conditions in the Czech Republic, to characterize these species and to test a possibility of their use in the systems of integrated plant protection against plantparasitic nematodes.

The sampling of the soil needed to determine the incidence species of nematophagous fungi in the Czech Republic was carried out in places with the soil rich in organic matter, i.e., where the incidence of these fungi can be expected.

The nematophagous activity among isolates of the fungi was tested in vitro and then in vivo conditions. Consequently, the ability of growth and reproduction of the nematophagous fungi on the agar with admixtures was tested. The Oat meal medium with zeolit has shown the best suitability for application of the fungi in the field conditions. It has resulted from the experiments, that the most effective species of nematophagous fungi which would be suitable for use for biological control of plantparasitic nematodes, are *Arthrobotrys oligospora* applicable for a wide range of different nematode species, and *Stropharia rugosoannulata* that was most effective in suppressing the nematodes *Meloidogyne hapla* and *Bursaphelenchus xylophilus*.

Key words: nematophagous fungi, biological control, plantparasitic nematodes, *Arthrobotrys oligospora*, *Stropharia rugosoannulata*



## 1. Úvod

Fytoparazitická háďátka jsou skupinou mikroskopických škůdců rostlin způsobující závažné ztráty na pěstovaných komoditách a jejich význam je nejen v ČR často opomíjen. Odhaduje se, že celosvětově se fytoparazitická háďátka podílejí 10 % na ztrátách zemědělské produkce, přičemž v ČR např. *Globodera rostochiensis* může způsobit ztráty, které dosahují až 60 % z celkového výnosu. Vzhledem k vysoké škodlivosti a problematické ochraně se fytoparazitická háďátka řadí k hospodářsky významným škůdcům, které je třeba potlačovat všemi dostupnými prostředky.

Dosavadní postupy ochrany rostlin proti těmto škodlivým organismům zahrnovaly především aplikaci chemických látek. V současné době není v ČR povolen téměř žádný chemický přípravek na ochranu rostlin proti fytoparazitickým háďátkům, kromě chemického přípravku Basamid granulát a DuPont™ Vydate®, u kterých je však z důvodů vysoké toxicity pro životní prostředí snaha nahradit je jinými, méně toxickými přípravky.

Dalším způsobem boje proti fytoparazitickým háďátkům je využití fyzikálních metod, jako jsou propařování půdy, solarizace apod., které lze využít pouze na menších plochách například ve sklenících. Z tohoto důvodu je potřeba nalézt vhodnou alternativu ochrany proti těmto škůdcům.

Jako jednou z možných vhodných alternativ se jeví využití nematofágních hub jako bioagens. Nematofágní houby se vyskytují téměř ve všech půdních ekosystémech, zvláště pokud půdy obsahují větší množství pro houby nepostradatelných organických látek. Pro tyto druhy hub představují háďátka, hostitele, který jim dodává živiny.

Mezi nejúčinnější mikroskopické nematofágní houby se řadí především druhy *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys superba*, *Pochonia chlamydosporia* a z makromycet byl nematofágní účinek zjištěn u rodu *Stropharia*, který tvoří na svém myceliu unikátní struktury nazývané acanthocyty.

V současné době je v ČR jedním z nejdůležitějších cílů ochrany plodin proti fytoparazitickým háďátkům získání prakticky použitelného přípravku na bázi nematofágní houby, jež by byl aplikovatelný a účinný v podmínkách České republiky.

## 2. Přehled o současném stavu poznání

### 2.1. Fytoparazitická hádátka

Hádátka je organismus vyznačující se nečláňkovaným, nitkovitým tvarem těla; (z řečtiny nema = nit') odtud pramení jejich název nematoda (de Ley a Blaxter, 2002). Jsou to obecně škůdci velmi malých rozměrů, jejichž velikost kolísá od 0,2 mm do několika milimetrů. Způsobují významné onemocnění rostlin, kdy rostliny přímo nezabíjejí, ale snižují výnosy na neekonomickou úroveň, navzdory správnému agronomickému ošetřování (zavlažování, hnojení, použití agrochemikálií, apod.) (Jansson a Lopez-Llorca, 2004).

Fytoparazitická hádátka např. skupina hálkotvorných a cystotvorných hádátek napadají významné polní a zahradní plodiny, u nichž způsobují závažné výnosové ztráty (Nordbring - Hertz et al., 2006). V současné době bylo popsáno asi 4100 druhů fytoparazitických hádátek (což je téměř 15 % z celkového počtu známých druhů hlístic). Za účelem omezit nebo dokonce zabránit vstupu tohoto limitujícího faktoru do zemědělské výroby, jsou prováděny testy na přítomnost hádátek a studována jejich biologie (Perry a Moens, 2006).

Fytoparazitická hádátka přísluší do třech řádů, Dorylaimida (hlístkové) ze třídy Adenophorea a Tylenchida a Aphelenchida (oba nazývané hádáta) ze třídy Secernentea. Pojem „hádátka“ je souhrnné označení veškerých fytoparazitických druhů hlístic, který se běžně používá v rostlinolékařské praxi. Většina ekonomicky významných fytoparazitických hádátek přísluší k řádu Tylenchida (Kúdela a Braunová, 2007, Mekete et al., 2012). Hádátka jsou známa také tím, že napomáhají sekundárnímu napadení hostitele např. patogeny (Chen et al., 2004). Životní cyklus hádátek zpravidla obsahuje fáze tvorby vajíčka, čtyř larválních stupňů a dospělého samečka a samičky (Perry a Moens, 2006). Hádátka jsou typicky pohlavně dimorfní. Nicméně řada druhů postrádá ve svém vývojovém cyklu samečky a množí se buď partenogeneticky, nebo méně zřídka jako hermafrodité. Doba vývoje se může lišit v závislosti na daném druhu hádátka, kdy se některé druhy mohou vyvinout v dospělého jedince již během několika hodin či dní, a naopak u jiných druhů jejich vývoj může trvat i více než jeden rok (Walker a Tsui, 1968).

Dle agronomického členění lze hádátka rozdělit do následujících skupin: hádátka napadající kořeny a parazitující v nadzemních částech rostlin. Ty, které

poškozuje kořeny, se dále dělí na háďátka cystotvorná, hálkotvorná a volně žijící. Háďátka, která poškozuje nadzemní části, jsou pak osní, listová a poškozující květy (Perry a Moens, 2006).

### 2.1.1. Háďátka kořenová cystotvorná

Cystotvorná háďátka jsou závažnými škůdci mnoha plodin po celém světě (Dackman a Nordbring-Hertz, 1985). První ze zástupců cystotvorných háďátek byl popsán botanikem Schachtem (1859) na kořenech řepy cukrové v Magdeburské oblasti. O několik let později pojmenoval Schmidt toto háďátko *Heterodera schachtii* (Tanha Maafi et al., 2007). Cystotvorná háďátka odvozují svůj název ze zduřelé (cystám podobné) samičky, která obsahuje velké množství vajíček a larev prvního stupně uvnitř svého těla chráněného tvrdou kutikulou (Luc et al., 1988).

#### 2.1.1.1. Háďátko řepné *Heterodera schachtii* Schmidt, 1871

kmen: Nematoda (Rudolphi, 1808) Lankester, 1877

třída: Secernentea Von Linstow, 1905

podtřída: Tylenchia (Thorne, 1949) Inglis, 1983

řád: Tylenchida G. Thorne, 1949

podřád: Hoplolaimina Chizhov & Berezina, 1988

nadčeleď: Hoplolaimoidea (Filipjev, 1934) Paramonov, 1967

čeleď: Heteroderidae (Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941) Skarbilovich, 1947

podčeleď: Heteroderinae Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941

rod: *Heterodera* Schmidt, 1871

druh: *Heterodera schachtii* Schmidt, 1871

Zástupci skupiny Heteroderidae patří mezi nejvíce rozšířená fytoparazitická háďátka v zemědělství, a to zejména v mírném pásmu (Sharma, 1998). *Heterodera schachtii* patří mezi nejdůležitější škůdce cukrové řepy (*Beta vulgaris*). Poškozuje dále více než 200 druhů rostlin v 95 rodech, které jsou řazeny do 23 různých čeledí (Amiri et al. 2002).

Velikost samičky je 0,6 až 0,8 mm, cysta je citrónkovitého tvaru, žlutobílá až

červenohnědá. Samec je 1 mm dlouhý, štíhlý, červovitého tvaru (Táborský a Šedivý, 1997). Cysty obsahují několik set vajíček s larvami, které zůstávají uvnitř vajíček až do druhého juvenilního stadia (J2). Po vylíhnutí se J2 pohybuje volně v půdě a napadá kořeny hostitelské rostliny. Uvnitř kořene larva vytváří tzv. syncytium, z něhož se živí. Juvenilní larvy se poté vyvíjejí buď v samičky, které zůstávají přisedlé a postupně zduřují a protrhávají kořen, nebo v samce, kteří opouštějí kořen a vyhledávají samičky vhodné k oplodnění. Oplozená vajíčka zůstávají uvnitř samičky, která při přeměně na cystu umírá (Perry a Moens, 2006).

Háďátko *H. schachtii* způsobuje závažné snížení výnosu a snižuje rovněž obsah cukru v cukrové řepě všude tam, kde se řepa pěstuje a kde se toto háďátko vyskytuje. V evropských zemích byly odhadovány ztráty ročního výnosu na cca 90 milionů euro (Müller, 1999). Příznakové rostliny jsou na poli viditelné většinou v ohniscích, řepa špatně roste, vnější listy vadnou, žloutnou a předčasně usychají. Na kořenu lze pozorovat nadměrnou tvorbu bočních kořínků („vousatost“ řepy). Na koříncích se zhruba od začátku července nacházejí bělavé, později nahnědlé cysty (Häni et al., 1993).

K ochraně cukrovky proti cystotvorným háďátkům doposud neexistuje žádný biologický přípravek (Slaats et al., 2006). V ČR je k dispozici pouze chemický přípravek Basamid granulát, ale kvůli jeho vysoké toxicitě je od jeho použití upouštěno.

V roce 2003 se v Česku začaly zkoušet odrůdy cukrové řepy tolerantní či rezistentní k *H. schachtii*. V roce 2009 byla po dvouletých státních odrůdových zkouškách povolena odrůda Bering s tolerancí k háďátku řepnému a viru (BNYVV) způsobujícího rizománii a v roce 2011 odrůda Vaclav, taktéž s tolerancí proti oběma škodlivým organismům. V současnosti jsou v ČR tolerantní či rezistentní odrůdy řepy pěstovány na cca 1/3 ploch. V případě rezistentních odrůd je otázkou, zda v průběhu následujících let nemůže dojít k prolomení rezistence a vyselektování agresivního patotypu háďátka řepného (Chochola, 2011).

**2.1.1.2. Háďátka bramborové** *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923), *Skarbilovich, 1959* a *Globodera pallida* (Stone, 1973)

kmen: Nematoda (Rudolphi, 1808) Lankester, 1877

třída: Secernentea Von Linstow, 1905

podtřída: Tylenchia (Thorne, 1949) Inglis, 1983

řád: Tylenchida G. Thorne, 1949

podřád: Hoplolaimina Chizhov & Berezina, 1988

nadčeleď: Hoplolaimoidea (Filipjev, 1934) Paramonov, 1967

čeleď: Heteroderidae (Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941) Skarbilovich, 1947

podčeleď: Heteroderinae Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941

rod: *Globodera* Skarbilovich, 1959

druh: *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923), Skarbilovich, 1959

druh: *Globodera pallida* (Stone, 1973)

Háďátka bramborové *G. rostochiensis* a *G. pallida* se nacházejí prakticky ve všech oblastech pěstování brambor na celém světě (Marks a Brodie, 1998). Jde o celosvětově ekonomicky významné druhy, kteří při vysoké populační hustotě mohou způsobit až 60% ztráty na výnosu. Oba druhy jsou si velice blízce příbuzné a pocházejí z oblasti jihoamerických And (Gaar a Čermák, 2013).

Sameček má oblé, dlouze protáhlé, nečlánkované tělo, které se směrem k oběma koncům zužuje. Samičky v průběhu vývoje zduřují do kulovitěho tvaru a vyhrézávají na povrch kořenů (Brzeski, 1998). Velikost cysty je 0,3-0,8 mm. Cysta je značně odolná proti vnějším vlivům a chrání vajíčka řadu let (Rawsthorne a Brodie, 1986). Jejich životní cyklus je stejný jako v případě *Heterodera schachtii*.

Tato háďátka jsou specializovaná především na brambory, které jsou jejich hlavní hostitelskou rostlinou (Šedivý, 1999). Napadají ale mimo jiné i rajčata, lilek jedlý a řadu divoce rostoucích druhů plevelů, zejména z čeledi lilkovitých Solanaceae. Oba druhy háďátek mají několik odlišných patotypů, které se liší virulencí, schopností napadat jednotlivé rostlinné druhy i např. odrůdy brambor (Gaar a Čermák, 2013). Patotypy jsou charakterizovány jejich schopností množit se na určitých klonech a hybridech rodu *Solanum*, které se používají při šlechtění. Bylo zjištěno 5 patotypů *Globodera rostochiensis* (Ro1- Ro5) a 3 patotypy *Globodera pallida* (Pa1 – Pa3) (Kort et al., 1977).

Příznaky nejsou specifické. Háďátko bramborové se většinou vyskytuje v ohniscích, ve kterých lze pozorovat rostliny s horším vzrůstem, vadnoucí, žloutnoucí nebo i s odumírajícím listovím. Dalším příznakem je tvorba většího počtu malých hlíz a tvorba postranních kořínků na bazální části rostlin (Perry a Moens, 2006, Hudec a Gutter, 2007).

Oba uvedené druhy háďátek jsou karanténními škůdci. Cysty zamořují půdu na desítky let, a proto se na zamořených pozemcích přijímají mimořádná karanténní opatření, aby se zabránilo dalšímu šíření (Rod et al., 2005).

### 2.1.2 Háďátka kořenová hálkotvorná

Doposud bylo z této skupiny háďátek popsáno přibližně 100 druhů háďátek rodu *Meloidogyne*. Nejrozšířenější a ekonomicky důležité druhy jsou *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. chitwoodi* a *M. graminicola*. Hálkotvorná háďátka jsou především tropické a subtropické organismy, nicméně *M. hapla*, *M. chitwoodi* a *M. fallax* nemají problém se přizpůsobit i mírnému podnebnému pásmu (Mitkowski a Abawi, 2003).

#### 2.1.2.1. *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949

kmen: Nematoda (Rudolphi, 1808) Lankester, 1877

třída: Secernentea Von Linstow, 1905

podtřída: Tylenchia (Thorne, 1949) Inglis, 1983

řád: Tylenchida G. Thorne, 1949

podřád: Hoplolaimina Chizhov & Berezina, 1988

nadčeleď: Hoplolaimoidea (Filipjev, 1934) Paramonov, 1967

čeleď: Meloidogynidae (Skarbilovich, 1959) Wouts, 1973

podčeleď: Meloidogyninae Skarbilovich, 1959

rod: *Meloidogyne* Goeldi, 1892

druh: *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949

Fytoparazitické háďátko *Meloidogyne hapla* je významným škůdcem kořenové zeleniny. V posledních několika letech došlo k značnému nárůstu ploch napadených tímto nekaranténním druhem, a to zejména v oblastech s písčitou půdou a

zvýšeným zastoupením kořenové zeleniny v osevním postupu (Zouhar et al., 2012). *M. hapla* má široký okruh hostitelských rostlin, kromě kořenové zeleniny z čeledi miříkovitých napadá i rostlinné druhy z dalších čeledí, např. okurky, salát, papriku, košťálovou zeleninu a různé druhy okrasných rostlin. *M. hapla* je endoparazit, takže jeho vývoj probíhá uvnitř rostlinných pletiv (Hudec a Gutter, 2007).

Samci mají hadovitý tvar těla o velikosti 1 až 1,3 mm se zřetelně odsazenou hlavou od těla a žijí většinou v půdě. Samičky mají hruškovitý tvar těla o délce 0,55 až 0,79 mm a šířce 0,4 až 0,45 mm, žijí v kořenech rostlin. Počet generací kolísá od jedné generace v chladné oblasti až po 12 generací ve sklenicích (Kazda a Prokinova, 2011, Perry a Moens, 2006, Nickle, 1991). Larvy pronikají do tenkých kořínků pomocí aktivního ústního bodce a vlivem vylučovaných látek dochází k tvorbě hálek (Hudec a Gutter, 2007). Napadené rostliny za sucha odumírají ana kořenech jsou nepravidelné, až několik milimetrů silné ztlustlé hálky, vyplněné houbovým pletivem. Kulové kořeny zůstávají krátké, případně vytvářejí velké množství vlásečnicových kořínků. (Rod et al., 2005).

### 2.1.3 Háďátka osní

#### 2.1.3.1. *Ditylenchus dipsaci* Kühn, 1857

kmen: Nematoda (Rudolphi, 1808) Lankester, 1877

třída: Secernentea Von Linstow, 1905

podtřída: Tylenchia (Thorne, 1949) Inglis, 1983

řád: Tylenchida G. Thorne, 1949

podřád: Tylenchina (Thorne, 1949) Chitwood, 1950

nadčeleď: Anguinoidea Nicoll, 1935(1926)

čeleď: Anguinidae Nicoll, 1935(1926)

podčeleď: Anguininae Nicoll, 1935(1926)

rod: *Ditylenchus* Filipjev, 1936

druh: *Ditylenchus dipsaci* Kühn, 1857

Háďátka rodu *Ditylenchus* jsou důležití endoparazité vyšších rostlin a hub (Fortuner a Maggenti, 1987, Evans et al., 1993). Mezi druhy s hospodářským významem patří především *D. dipsaci* a *D. destructor* (Reed et al., 1979). *D. dipsaci*

je jedním z nejdéle známých druhů fytoparazitických háďátek. V roce 1857 Kühn identifikoval a popsal háďátko zhoubné ve strboulech štětky plané (*Dipsacus fullonum*) a následně v roce 1868 zpětně určil toto háďátko jako příčinu poškození žita (Douda, 2007).

Samičky i samci jsou štíhlí a dorůstají délky 1-2,2 mm a šířky 35  $\mu\text{m}$ . Stylet mají krátký a křehký (Perry a Moens, 2006).

Larvy přezimují v půdě a na jaře za vhodných podmínek pronikají do rostlin. Uvnitř rostlin poté probíhá celý životní cyklus. Dospělé samičky kladou okolo 500 vajíček, z nichž se po 2 dnech líhnou larvy druhého juvenilního stadia. Larvy se vyvíjejí v dospělce během 4-5 dnů a samičky žijí více než deset týdnů (Perry a Moens, 2006, Nickle, 1991).

*D. dipsaci* se živí na parenchymatických pletivech stonků a cibulí a způsobuje zkroucení středních lamel buněčných stěn, zduření a deformace (Reed et al., 1979). *D. dipsaci* dává přednost těžkým půdám, které zadržují vodu. Vyskytuje se ve více rasách, jejichž okruhy hostitelů se vzájemně překrývají (Schwarz et al., 1996). Napadené rostliny se vyskytují v ohniscích. Háďátka jsou schopna přežít v půdě několik let v inaktivním stavu. Takto mohou být zavlečena s půdou nebo s rostlinami na nové plochy (Rod et al., 2005). Jejich reprodukční schopnost je velmi rychlá s životním cyklem okolo 3-4 týdnů (Evans et al., 1993).

Sayre a Hwang (1975) ve své práci uvádí, že *D. dipsaci* je značně odolné vůči nízkým teplotám. Přečkává bez poškození i největší mrazy. V laboratorních podmínkách byli někteří jedinci životaschopní i po uskladnění v  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 18 měsíců v 7,5% roztoku dimethyl sulfoxidu.



### **2.1.3.2. *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle, 1934**

kmen: Nematoda Potts 1932

třída: Secernentea Von Linstow, 1905

řád: Aphelenchida

čeleď: Parasitaphelenchidae

rod: *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937

druh: *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner) Nickle, 1934

synonymum: *Aphelenchoides xylophilus* Steiner & Buhner

*Bursaphelenchus lignicolus* Mamiya & Kiyohara

Háďátko *B. xylophilus* bylo poprvé popsáno v USA jako *Aphelenchoides xylophilus* (Steiner a Buhner, 1934). Později bylo znovu popsáno jako *Bursaphelenchus lignicolus* když bylo určeno, že je původcem onemocnění vadnutí borovic v Japonsku (Mamiya a Kiyohara, 1972), a které se vyskytuje rovněž v Severní Americe na různých druzích borovic (Evans et al., 1993).

Toto háďátko má 0,4 až 1,5 mm dlouhé a štíhlé tělo. Stylet je zakončen malým kulatým knoflíkem. Vylučovací póry jsou obvykle za středním bulbem (Nickle, 1991). Samičky se podobají samičkám rodu *Aphelenchoides*, ale na rozdíl od nich mají kutikulární chlopeň rozšiřující se dozadu přes vulvu (Evans et al., 1993). Ocas samiček je zaoblený, ostře špičatý nebo kónický s mukrem. Samečci mají konec ocasu silně obloukovitý, různě zašpičatělý s krátkou terminální bursou (Nickle, 1991). Ve většině případů je však ocasní konec zaoblený (Anonym 1, 2013).

O *B. xylophilus* je známo, že má dvě různé etapy v jeho životním cyklu - propagativní etapu a etapu rozšiřovací. V obou případech jsou jedinci přenášeni z jednoho hostitele na dalšího za účasti vektorů, brouků rodu *Monochamus* (Wingfield, 1983).

Příznaky na borovicích byly nejprve přisuzovány pouze dřevokaznému hmyzu, který se hojně na napadených stromech vyskytoval, ale později bylo zjištěno, že prvotní příznaky předcházejí fázi napadení hmyzem (Rutherford et al., 1990)

## 2.1.4. Háďátka půdní volně žijící

### 2.1.4.1. *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1899

kmen: Nematoda Potts 1932

třída: Secernentea

řád: Rhabditida

čeleď: Rhabditidae Örley, 1880

rod: *Caenorhabditis* Osche, 1952

druh: *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1899

*C. elegans* je široce používáno jako modelový organismus pro studium biologie obranyschopnosti. Popularita *C. elegans* vyplývá ze spojení několika faktorů: jeho vývojový cyklus je prozkoumán na úrovni jednotlivých buněk, je znám jeho kompletní genom a je vhodný pro genetické manipulace, včetně inhibice RNA (Stein et al. 2001, Markaki a Tavernarakis, 2010). Výzkumy prováděné na *C. elegans* byly nástrojem k objasnění molekulárních drah podílejících se na mnoha lidských onemocněních (Markaki a Tavernarakis, 2010). Genomová sekvence *C. elegans* se skládá z 18 600 genů (Blaxter, 1998). V roce 1998 se *C. elegans* stal prvním mnohobuněčným organismem se zcela osekvenovaným genomem (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Jeho genom se skládá z přibližně 100 milionů párů bází, má zhruba dvacetkrát větší velikost genomu než *E. coli*, ale pouze 3 % z velikosti lidského genomu. *C. elegans* má společných mnoho genů a genových produktů s lidmi (přibližně 40% homologie) (Altun a Hall, 2005).

*C. elegans* je malé, volně žijící, půdní háďátko. Roste do délky 1,3 mm a průměru 80 µm. Je to hermafrodit, obvykle tvoří za svůj život cca 300 potomků. Může být snadno chován v laboratoři na agarovém substrátu s bakterií *Escherichia coli*, kterou se *C. elegans* živí (Brenner 1974, Swanson et al., 1984, Deppe et al., 1977, Artal-Sanz et al., 2006).

## **2.2. Ochrana proti fytoparazitickým háďátkům**

Ochrana zemědělských plodin před fytoparazitickými háďátky je znesnadněna nemožností přesné lokalizace těchto škodlivých organismů v půdě. Při snaze o účinný zásah pomocí příslušných chemických prostředků je na tuto skutečnost nutno brát ohled, a proto je nezbytné použití maximálních přípustných dávek chemické látky a její kvalitní zapravení do půdy. Účinnou ochranu proti fytoparazitickým háďátkům také znesnadňuje sortiment nematocidů v registru povolených přípravků na ochranu rostlin. Hledání nových alternativních způsobů ochrany na úrovni bioagens je jednou z cest, která by mohla vést k řešení problémové situace v ochraně rostlin před fytoparazitickými háďátky (Zouhar et al., 2010).

### **2.2.1. Preventivní opatření**

Základním cílem preventivního opatření je zabránit přenosu háďátek, a to zejména na místa dosud nekontaminovaná (Gaar a Čermák, 2013).

Jde především o dodržování všech opatření minimalizující šíření těchto škůdců a to sázení jen uznané sadby z nezamořených ploch, nepoužívat stroje a nářadí používané na plochách zamořených. U háďátka bramborového by se neměly brambory na tomtéž pozemku pěstovat dříve než za 4-5 let po sobě a jedním z důležitých aspektů je i vysazování háďátkům odolných odrůd (Rod et al., 2005). Háďátka mohou být přenášena také znečištěnými nástroji nebo závlahovou vodou, kterou jsou splavována do blízkých oblastí (Dreistadt, 2004). Všechny tyto sanační opatření zahrnují inspekce a certifikaci rozmnožovacího materiálu, které je prosté háďátek, čištění vybavení a využití karantény k zabránění rizika rozšíření háďátek (Mai, 1977).

Dalším doplňkovým opatřením je vhodné organické hnojení, které zvyšuje kapacitu vlhkosti půdy a obsah živin, takže po aplikaci snižuje stres rostlin a stimuluje růst kořenů, čímž zároveň kompenzuje negativní působení háďátek na vitalitu rostlin. Navíc vysoký obsah organické hmoty stimuluje aktivitu nepřátelských organismů kořenových háďátek a tím přispívá i k redukci počtu háďátek (Gaar a Čermák, 2013).

K omezení reprodukce háďátek na náchylných odrůdách mohou být využity i opatření jako je pozdní výsadba a raná sklizeň nebo likvidace plodin. Pozdní výsadba

je praktikována u soji na 20 až 40 % v oblastech produkce sójových bobů., Při sklizni jsou zjišťovány dobré výsledky ve snižování počtu populace háďátek *Heterodera glycines* a *Pratylenchus brachyurus* přítomných v porostu (Bridge, 1996).

V ochraně rostlin proti fytoparazitickým háďátkům hraje významnou roli také šlechtění rostlin na rezistenci a toleranci vůči háďátkům. V rámci šlechtění se intenzivně pracuje na odrůdách s různým stupněm odolnosti k háďátku řepnému, v kombinaci s tolerancí k původci rizománie. V současnosti v pěstitelské praxi převažují tolerantní odrůdy, které tolerují zamoření půdy háďátkem řepným, přičemž nedochází ke snížení výnosu kořene a cukernatosti. Existují i odrůdy s vysokým stupněm odolnosti – rezistence. Při jejich pěstování se populace háďátka v půdách snižuje, mají tedy významný fyto-sanitární efekt, ale jejich výkonnost je zatím nižší než u odrůd tolerantních (Bittner, 2013).

U některých patotypů háďátek *G. rostochiensis* a *G. pallida* je zjištěna neschopnost množení se na konkrétních kultivarech brambor (single-gen resistance). Například nejčastěji pěstované rezistentní kultivary brambor (na základě genu H1 odvozeného od klonů *S. tuberosum* subsp. *andigena*) jsou odolné vůči patotypu Ro1 *G. rostochiensis* (Anonym, 1990).

### 2.2.2. Fyzikální ochrana

Ošetření horkou vodou bývá uváděno jako velmi efektivní způsob ochrany sadby. Ve vztahu háďátka – rostlina je však nutné předem prověřit značné množství kombinací háďátek/rostlinných druhů – kultivarů. Dostupné údaje totiž často uvádějí časové a tepelné hodnoty, které sice zabíjejí háďátka, často ale též mohou ohrozit vlastní rostlinu. Ošetření rostlinného materiálu horkem je velmi pracné a používá se proto buď jako poslední možnost ochrany, nebo u vzácného rostlinného materiálu (Gaar a Čermák, 2013).

Sterilizace půdy párou byla podrobně popsána Maasem v roce 1987, je to však drahý postup a obvykle je používán pouze pro malé plochy půd, jako jsou např. skleníky (Evans et al., 1993).

Fyzikální metody jsou využitelné pro asanaci semen a sadby, použít lze například 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 et al., 2003, Katan, 1981). Experimenty se solarizací v polosuchých tropických oblastech Indie snížily populace několika rodů hlístic, včetně *Heterodera*, *Rotylenchus* a *Pratylenchus*, a byly srovnatelné s fumigací do hloubky přinejmenším 20 cm (Sharma a Nene, 1990). Nicméně, subletální teploty mohou mít přímý vliv na dlouhodobou životaschopnost hádčátka, nebo mohou mít vliv na interakce s jinými půdními mikroorganismy, které zvyšují účinek biologické ochrany (Chen et al., 2004).

### 2.2.3. Chemická ochrana

Jelikož většina fytoparazitických hádčátek tráví alespoň část svého životního cyklu v půdě, mohou být na jejich likvidaci použity chemické látky, ačkoliv je to u velkých ploch obtížné a nákladné a obecně závislé na využívání chemických látek s vysokou toxicitou (Evans et al., 1993). Proto se z důvodů omezené účinnosti, negativního vlivu na životní prostředí a finanční náročnosti chemická ochrana používá jen výjimečně (Gaar a Čermák, 2013).

V současné době lze proti kořenovým hádčátkům využít systémový přípravek ze skupiny karbamátů DuPont™ Vydate® (100 g/kg oxamyl), který se koncentruje v kořenovém pletivu, což je typické místo, kde se hádčátka vyskytují, rychle zabraňuje výživě a tím i poškození hádčátky (Ingham et al., 2004). V ČR je tento přípravek registrován do zeleniny, vinné révy, ovoce, brambor a cukrové řepy.

Do polních podmínek připadá v úvahu i použití Basamid granulátu (účinná složka dazomet), jehož aplikace s sebou nese riziko kontaminace spodních vod a jeho použití nepřichází v úvahu v systémech produkce biopotravin (Douda et al., 2011).

Na hádčátka zhoubné je u nás pro česnekovou sadbu registrována z mořidel Sulka. Používá se v koncentraci 200 ml/5 l vody a doba působení činí 6 až 12 hodin.

## 2.2.4. Biologická ochrana

Využití antagonistických vztahů mezi organismy za účelem udržení jednoho z nich pod ekonomickým prahem škodlivosti je základním principem biologických metod ochrany rostlin (Kerry, 1987). Celkově jsou na světě v současné době k dispozici prostředky využívající téměř sto druhů a kmenů mikroorganismů, více než padesát druhů přírodních produktů a stejný počet semiochemikálií proti různým škodlivým organismům (Bagar, 2011).

Praxe biologické ochrany rostlin proti živočišným škůdcům je prozatím téměř výlučně orientována na využívání dvou (ze čtyř) základních strategií: a) inundaci přirozených nepřátel a b) sezónní inokulaci přirozených nepřátel. Obě tyto strategie stojí na společném základu – biotechnologie produkce biomasy nematopatogenních mikroorganismů, resp. masové produkční chovy vybraných druhů parazitů a predátorů. Nicméně, mezi významné strategie biologické ochrany rostlin patří i strategie ochrany, podpory a konzervace vyskytujících se přirozených nepřátel (Landa et al., 2013). V posledních letech byly podrobně přezkoumávány biologie, ekologie a potenciál biologické ochrany proti fytoparazitickým hád'átkům (Kerry, 1987, Sikora, 1992). Nematologové našli přirozené nepřátele a celou řadou principů, podobných těm, které v současné době studují fytopatologové pro inhibici hád'átek přenášených půdou (Kerry et al., 2005).

### 2.2.4.1. Využití rostlin a rostlinných látek

Za účelem potlačení různých rodů kořenových hád'átek lze využít aksamitník (*Tagetes*), obsahující látku fungující jako širokospektrální biocid. Osvědčily se např. odrůdy Ground Control, Single Gold, Tangerine, Lemondrop, Happy Day či hybrid Polynema. Rostliny se vysévají nahusto na zamořený pozemek. Po několika měsících se provede zaorávka a aksamitník se tak využije jako zelené hnojení. Obdobně fungují další rostlinné druhy s vysokým obsahem glukosinolátů, např. určité odrůdy hořčice či rožky seté (rukoly). Plošná asanace pomocí aksamitníků (*Tagetes patula*, *T. erecta*, *T. minuta*) může snížit populaci hád'átek r. *Pratylenchus* až o 90 %. I některé další rostliny z čeledi hvězdicovitých mohou počty hád'átek v půdě účinně regulovat (rody *Helenium*, *Gaillardia*, *Eriophyllum*) (Gaar a Čermák, 2013).

Další způsob snížení počtu hád'átek na pozemku je použití různých rostlinných

látek. Rostliny produkují široké spektrum účinných látek, které vykazují nematofágní účinek (Chitwood, 2002). Etanolový kořenový extrakt z *Artemisia vulgaris* má negativní dopad na rod *Meloidogyne* (Costa et al., 2003). Taktéž in vitro testování z nativních rostlin Yucatanu odhalilo pozitivní účinek etanolového extraktu z *Eugenia winzerlingii* na životaschopnost *M. icognita* (Cristobal-Alejo et al., 2006).

#### 2.2.4.2. Využití bakterií

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

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

Druhy rodu *Pasteuria* jsou bakteriální obligátní hyperparazité hlístic. Proces uchycení endospor a jejich hostitelská specifita byly rozsáhle studovány zejména s *P. penetrans* na cystotvorných druzích hád'átek (Keith a Yitzhak, 2011). *P. penetrans* je nejčastěji aplikovaná bakterie v biologické ochraně proti fytoparazitickým hád'átkům (Chen a Dickson, 1998).

V roce 1998 byly zveřejněny studie Niere et al., z kterých vyplývá, že nepatogenní kmen *Fusarium oxysporum* měl antagonistický účinek na hád'átko *Radopholus similis*, kdy při skleníkových experimentech došlo k snížení populační hustoty hád'átek.

#### 2.2.4.3. Využití houbových organismů

V posledních dvaceti letech byly zaznamenány tři aspekty, které měly významný vliv na perspektivu a příležitost pro biologickou ochranu rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům; bylo to stažení některých nematicidů z trhu z důvodu ochrany zdraví a prostředí, zjištění pozitivního vlivu nematofágních hub na snížení

populace hád'átek a řada komerčně vyvinutých produktů založených na nematofágních houbách a bakteriích.

Hád'átka jsou přítomna v téměř každém metru čtverečním půdy po celém světě. Fytoparazitická hád'átka mají nepříznivý dopad na rostliny, avšak nematofágní houby mohou pomoci zničit mnoho z těchto hád'átek před tím, než způsobí ještě větší škody (Hauser, 1985).

Pro zachycení, zabití a utilizaci hád'átek se vyvinuly u nematofágních hub speciální struktury, které umožňují zachycení hád'átek; jde o adhesivní hyfy, větve, sítě nebo knoflíky, fixní oka a stephanocysty. Adhezivní hyfy nebo větve jsou většinou produkovány nižšími houbami, Ascomycoty jako jsou např. rod *Arthrobotrys* a *Dactylaria* a Deuteromycoty (Chen et al., 2004).

Aby mohly houby efektivně „lapat“ svou potravu, mnoho druhů hub vyvinulo schopnost detekovat některé z chemických látek, které hád'átka používají ke komunikaci, nebo jsou důležité pro jejich růst. Tyto chemické látky jsou detekovány, pokud se hád'átka pohybuje blízko houby. V případě, že houba potřebuje živiny, které jí nejsou jinak dostupné, vytváří v oblasti, ve které detekovala chemické látky hád'átek, pasti, do kterých lapá svou potravu (Hsueh et al., 2013).

Některé nematofágní houby produkují nematotoxiny, které znehybňují nebo zabíjejí hád'átka. Ultrastrukturální a histochemické studie naznačují, že pronikání pokožkou hlád'átek zahrnuje i aktivitu hydrolytických enzymů (Jansson a Nordbring-Hertz, 1988).

Společným znakem nematofágních hub je přítomnost četných cytosolických organel, které se v buňce vytvářejí během zachycování hád'átka buňkami hyf (Heintz a Pramer, 1972). Dalším společným rysem je přítomnost rozsáhlých vrstev extracelulárních polymerů, které jsou považovány za významné při uchycení povrchu hád'átka do pasti (Tunlid et al., 1991).

Jednotlivé druhy se liší v saprotrofických a parazitických schopnostech. Zatímco houby, které tvoří pasti a houby napadající vajíčka přežívají saprotroficky v půdě, tak endoparazitické houby jsou většinou závislé na hád'átkách jako na nutričním zdroji, a jsou tedy obligátními parazity (Nordbring-Hertz et al., 1997).

V návaznosti na vývoj pastí probíhá proces infekce přes stejný sled událostí: upevnění buněk pastí na povrch hád'átka, penetrace kutikuly a vstřebávání živin z usmrceného hád'átka (Fekete et al., 2008).

Nematofágní houby mohou být limitovány množstvím jedinců hád'átek, které



jsou k dispozici a hád'átka jsou naopak redukována nematofágními houbami (Hauser, 1985).

Nematofágní houby lze naléznout ve všech hlavních skupinách hub, včetně nižších (chytridiomycetes a zygomycetes) a vyšších hub (ascomycetes, basidiomycetes a deuteromycota). Většina nematofágních hub včetně těch, které používají lapací struktury a endoparazitických druhů patří do deuteromycota (nepohlavní houby).

Taxonomické postavení některých z těchto druhů bylo upřesněno objevem odpovídající pohlavní fáze houby (Pfister, 1997).

Nematofágní houby byly nalezeny ve všech regionech světa, od tropických oblastí po Antarktidu. Byly hlášeny ze zemědělské, zahradní a lesní půdy, a jsou obzvláště hojné na půdách bohatých na organický materiál (Nordbring-Hertz, 2006).

Už v roce 1969 Decker zaznamenal, že většina nematofágních hub se vyskytuje v listovce a půdách bohatých na humus, což je jeden z důvodů proč brát na zřetel dostatečné zásobení půd organickou hmotou, zejména v oblastech s výskytem fytoparazitických hád'átek.

V zemědělských půdách mírného podnebného pásma je výskyt nematofágních hub závislý na sezónních podmínkách. V největším počtu a hustotě se nematofágní houby vyskytují na konci léta a na podzim. Je to pravděpodobně způsobeno vyšší teplotou půdy a zvýšeným přísunem organických zbytků. Nejhojněji se nacházejí v horních 20 cm půdy, a téměř vůbec nejsou hlouběji jak 40 cm pod povrchem (Barron, 1977, Jansson a Lopez-Llorca, 2004, Nordbring-Hertz et al., 2006).

*A. oligospora*, *P. chlamydiospora* a další nematofágní houby mají rovněž schopnost kolonizovat kořeny rostlin nebo infikovat další houby (mohou být mykoparazity). *A. oligospora* při napadení další houby obtáčí své hyfy okolo hyfy hostitele a to má za následek rozpad buněčné cytoplazmy hostitele bez penetrace. (Bordallo et al. 2002, Nordbring-Hertz et al., 2006).

### 2.3.1. Vybrané druhy nematofágních hub

#### 2.3.1.1. *Stropharia rugosoannulata* Farl. ex Murrill 1922

říše: Fungi

oddělení: Basidiomycota

podkmen: Agaricomycotina Doweld

třída: Agaricomycetes

podtřída: Agaricomycetidae

řád: Agaricales

čeleď: Strophariaceae

rod: *Stropharia*

druh: *Stropharia rugosoannulata* Farl. ex Murrill

Druhy rodu *Stropharia* jsou saprofyté rostoucí na tlejícím dřevě, půdě, hnoji, v trávě nebo mezi mechy (Knudsen a Vesterholt, 2008). Do Evropy byla *Stropharia rugosoannulata* introdukována v 50. letech 20. století za účelem umělé kultivace. V 60. letech téhož století byla nalezena v Německu poblíž Berlína na slámě z krechtů brambor; jedná se o první nález v přirozeném prostředí (Watling a Gregory, 1987).

Na území ČR se nachází okolo 11 druhů, z nichž hospodářsky nejvýznamnějším je *Stropharia rugosoannulata*, která se u nás pěstuje za účelem konzumace plodnic (Jablonský a Šašek, 2006).

Druhy rodu *Stropharia* mají fialovohnědé až tabákově hnědé spory a objevují se na dřevě, trávníku, kompostových hromadách a zvířecím trusu.

Houby rodu *Stropharia* mohou produkovat unikátní hvězdicovité buňky, které se nazývají acanthocyty (Luo et al., 2006). Tato schopnost hub rodu *Stropharia* formovat acanthocyty se zdá být charakteristikou celého rodu a konstantní výskyt těchto struktur naznačuje, že mají taxonomickou hodnotu (Readhead, 1984, Norvell a Redhead, 2000).

Vnímání acanthocytů jako určujícího znaku pro rod *Stropharia* (Fr.) Quel. se datuje do 80. let 20. století. Tyto ostatné útvary byly poprvé pozorovány Farrem (1980) na podhoubí v kultuře, ale také je našel na bazálním myceliu (u úpatí třeně) sušených vzorků téměř všech druhů *Stropharia*, které zkoumal. Farr (1980) dále poznamenává, že acanthocyty se vyskytují téměř výhradně v rhizomorfech, ale

výjimečně se nacházejí i na částech basidiomat.

Také molekulární studie prokázaly, že acanthocyty jsou vhodným morfologickým znakem rodu (Moncalwo et al. 2002).

### **2.3.1.2. *Arthrobotrys oligospora* Fresen. 1850**

říše: Fungi

oddělení: Ascomycota

podkmen: Pezizomycotina

třída: Orbiliomycetes

podtřída: Orbiliomycetidae

řád: Orbiliales

čeleď: Orbiliaceae

rod: *Arthrobotrys*

druh: *Arthrobotrys oligospora* Fresen. 1850

Rod *Arthrobotrys* byl popsán Cordou v roce 1839 na základě typového zástupce *Arthrobotrys superba* Corda 1839. Druh *Arthrobotrys oligospora* byl poprvé popsán Freseniem v roce 1850 (Gray, 1987). Nematofágní aktivity si však povšimnul Zopf a zaznamenal ji až v roce 1888, kdy jako první prokázal zachycení živého háďátka touto houbou.

*Arthrobotrys oligospora* je nejčastější, nejvíce rozšířený a doposud nejlépe zkoumaný druh nematofágní houby. Houba byla izolována z mnoha různých substrátů, z kompostů, hniljícího dřeva a zvířecích výkalů (Drechsler, 1937, Domsch et al., 1980). Může růst v symbioze s rhizosférou zemědělských plodin a rostlin, což je velmi časté v horních 30 cm vrstvy zeminy. Výskyt byl zjištěn i v hloubce více jak 40 cm (Persmark et al. 1996).

Konidiofory této houby jsou dlouhé, štíhlé, jednoduché, přehrádkované, průhledné, mírně zvětšené ve špičce i sporulující oblasti (Barnett a 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 než proximální buňka (Haard, 1968).

*A. oligospora* patří do skupiny nematofágních hub, které vytvářejí lapací

struktury. Kromě tvorby typických lepivých sítí formuje tento druh v rámci parazitismu i další struktury sloužící k získávání živin - konidiové pasti, hyfové spirály a apresoria. Všechny tyto struktury jsou utvářeny v rámci morfologické adaptace houby jako odezva na okolní podmínky prostředí (Nordbring - Hertz et al. 2006). Mnoho druhů z rodu *Arthrobotrys* netvoří pasti spontánně, ale v závislosti na podmínkách prostředí, zejména na přítomnosti hlístic, které jsou důležité pro indukci tvorby pastí. Životní projevy *A. oligospora* jsou různorodé. Není jen parazitem hlístic, ale i saprofyt a parazit jiných hub (Yang et al., 2011). Dále je *A. oligospora* modelovým organismem pro pochopení interakcí mezi nematofágními houbami a jejich hostitelskými hád'átky (Yang et al., 2011).

### **2.3.1.3. *Verticillium chlamydosporium* Goddard 1913**

říše: Fungi

oddělení: Ascomycota

podkmen: Pezizomycotina O. E. Erikss. & Winka

třída: Sordariomycetes

podtřída: Hypocreomycetidae

řád: Hypocreales

čeleď: Plectosphaerellaceae

rod: ***Verticillium* Ness**

druh: ***Verticillium chlamydosporium* Goddard 1913**

Druh *Verticillium chlamydosporium* je známý jako půdní houba od roku 1913 a je celosvětově rozšířený (Chen et al., 2004). První zmínka o *V. chlamydosporium* jako parazitu cystotvorných hád'átek byla uvedena Willcoxem a Tribealem v roce 1974 po izolaci této houby z vajíček *Heterodera schachtii*. V roce 1975 Kerry izoloval *V. chlamydosporium* i z *H. avenae*.

*V. chlamydosporium* je fakultativní endoparazit vajíček cystotvorných a hálkotvorných hád'átek. Tato houba byla také zaznamenána na vajíčkách plžů a na hyfách různých druhů hub. *V. chlamydosporium* může kolonizovat rhizosféru některých druhů rostlin. Tvorba mycelia v půdě je omezena ve srovnání s růstem houby v rhizosféře, výjimkou jsou organicky bohaté půdy (Kerry, 2001, de Leij a

Kerry, 1991).

Množí se na mase vajíček vytvořených fytoparazitickými hád'átky na kořenech náchylných rostlin, kde produkuje robustní konidie. Po napadnutí vajíček houbou dochází k jejich zničení a tím i k narušení životního cyklu (de Leij a Kerry, 1991).

*V. chlamydosporium* vytváří apresoria, jenž pronikají stěnou vajíčka hád'átka, appressorium dává vzniknout infekční hyfě, z které se rozbíhá mycelium kolonizující vajíčka (Morgan-Jones et al., 1983). Houba stěnou vajíčka proniká jak mechanicky tak při průniku využívá i enzymatickou hydrolýzu (Lopez-Llorca a Robertson, 1992).

Pro šíření *V. chlamydosporium* v půdě jsou důležité konidie, které jsou produkovány na vrcholcích jednoduchých phialid (de Leijl et al., 1993).

Potenciál *V. chlamydosporium* jako nematofágního biologického ochranného činitele je stále důležitější vzhledem k zrušení používání přípravků na bázi methylobromidu v zemědělství (Thomas, 1996).

### **3. Vědecké hypotézy a cíle**

#### **Hypotéza**

V půdách na území ČR jsou přítomny nematofágní druhy hub, které lze izolovat a využít k biologické ochraně proti fytoparazitickým hád'átkům.

#### **Cíl práce**

Cílem práce je nalézt druhy nematofágních hub kompatibilních k podnebním podmínkám v ČR, a tyto druhy charakterizovat a otestovat možnost jejich využití v systémech integrované ochrany rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Izolace jednotlivých druhů háďátek

Pro testování nematofágní aktivity vybraných izolátů nematofágních hub bylo nejdříve zapotřebí získat háďátka, která byla následně použita v *in vitro* a *in vivo* pokusech. V těchto pokusech bylo použito 5 druhů fytoparazitických háďátek, a to *Meloidogyne hapla*, *Ditylenchus dipsaci*, *Globodera rostochiensis*, *Heterodera schachtii*, a *Bursaphelenchus xylophilus*. K *in vitro* pokusům bylo využito i volně žijící háďátka *Caenorhabditis elegans*.

#### 4.1.1. *Meloidogyne hapla*

V pokusech, při kterých byla zkoumána imobilizace a mortalita háďátek byla použita háďátka druhu *M. hapla* izolovaná z napadených mrkví získaných z lokality Litovel. Chov háďátek byl proveden na rostlinách rajčete (odrůda Tornádo, Semo). Po třech měsících byly kořeny rajčete obarveny 0,01% eosinem při teplotě 4 °C po dobu 3 hod., aby se dosáhlo zviditelnění vaječných vaků háďátek. Takto obarvené vaky byly nematologickou jehlou přeneseny do fyziologického roztoku. Poté byly vaječné vaky umístěny na síto (průměrem ok 25 µm) ponořené v destilované vodě v Petriho misce o objemu 50 ml. V takto připraveném prostředí se háďátka ponechala líhnout po dobu pěti dnů. V druhém vývojovém stupni háďátek byla provedena úprava koncentrace suspenze obsahující háďátka pomocí centrifugace při 3000 g po dobu 15 minut. Takto připravená háďátka byla využita pro následné experimenty.

#### 4.1.2. *Ditylenchus dipsaci*

Druh *D. dipsaci* byl izolován z česneku, odrůda Elin, pocházejícího z lokality Blatnice pod Svatým Antonínkem a. Jednotlivé česnekové stroužky byly na jemno nakrájeny, a poté plaveny pomocí Baermannovy nálevkové metody po dobu 6 hodin. Následně byla vyplavená háďátka odlita na hodinové sklíčko a odpipetována mikropipetou do připravené 2 ml mikrozkušavky s destilovanou vodou. Háďátka byla 2x promyta v destilované vodě a pomocí centrifugace při 6 000 g a případného ředění byla upravena jejich koncentrace v suspenzi.

#### **4.1.3. *Globodera rostochiensis***

Druh *G. rostochiensis* použitý při testování pocházel z lokality Šluknov a jednalo se o patotyp RO1 český standard. Půda s rostlinnými zbytky byla vysušena při teplotě 25 °C a cysty byly plaveny pomocí Fenwickovy konve. Cysty byly uloženy do skleněných vialek s prodyšným víčkem. Životaschopnost embryonů byla stanovena umístěním cyst do kořenového difusátu rostlin bramboru po dobu 14 dnů při laboratorní teplotě. Pomocí stereomikroskopu bylo pozorováno líhnutí háďátek v dvoudenních časových periodách.

#### **4.1.4. *Bursaphelenchus xylophilus***

Háďátko *B. xylophilus* bylo získáno z Portugalska. Toto háďátko bylo množeno v *in vitro* podmínkách v Petriho miskách na živném médiu s nakultivovanou houbou *Botrytis cinerea*, která je alternativním zdroje živin pro tento druh. Nejdříve byly připraveny Petriho misky s Malt extrakt agarem s přídavkem glycerolu, který zabraňoval sporulaci houby. Na toto médium byla poté naočkována *Botrytis cinerea* sterilní jehlou. Takto připravené misky byly kultivovány při teplotě 21 °C po dobu 3 dnů. Po třech dnech byly přidány samičky háďátka *B. xylophilus* v množství deseti kusů.

#### **4.1.5. *Caenorhabditis elegans***

*C. elegans* byl získán od MUDr. Marty Kostrouchové z PřF UK v Praze. Toto háďátko bylo množeno a uchováváno dle metod popsanych níže, které byly zveřejněny v certifikované metodice sepsané Zouharem et al. v roce 2010.



#### 4.1.5.1. Příprava pevného kultivačního média pro *Caenorhabditis elegans*

##### materiál:

NaCl

namnožené bakterie *E. coli* OP50 v tekutém médiu

bakteriologický pepton

Agar

destilovaná voda

pufr 1 M KPO<sub>4</sub> (108,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, rozpuštěno v 1 l H<sub>2</sub>O, pH 6,0), (sterilizováno při teplotě 121 °C po dobu 20 minut)

1M CaCl<sub>2</sub> (sterilizováno při 121 °C po dobu 20 minut)

roztok cholesterolu v etanolu (5mg/ml)

1 M MgSO<sub>4</sub>, (sterilizováno při teplotě 121 °C po dobu 20 minut)

2 l Erlenmayerova baňka

mikropipety

parafilm

sterilní Petriho misky (60, 90 mm)

nematologická jehla

hliníková folie

##### postup:

Do Erlenmayerovy baňky bylo přidáno 3 g NaCl, 17 g agaru a 2,5 g peptonu. Vše bylo doplněno 975 ml destilované vody. Živné médium bylo sterilizováno po dobu 40 minut a teplotě 121 °C. Po sterilizaci bylo médium ochlazeno na teplotu cca 55 °C z důvodu přidání 1 ml cholesterolu v etanolu, 1 ml 1M roztoku MgSO<sub>4</sub>, 25 ml 1 M roztoku pufru KPO<sub>4</sub> a 1 ml 1M roztoku CaCl<sub>2</sub>.

Takto připravené živné médium bylo rozlito do Petriho misek. Následně byly tyto Petriho misky ponechány 2-3 dny při laboratorní teplotě z důvodu zjištění případné kontaminace. Za tuto dobu dojde i k odpaření přebytečné vlhkosti, která znesnadňuje pozorování hád'átek světelným mikroskopem. Po třech dnech bylo do středu Petriho misek napipetováno 500  $\mu$ l tekuté kultury bakterií. Namnožené bakterie *E. coli* OP50 na Petriho miskách byly inkubovány přes noc při laboratorní teplotě.

Den po naočkování bakterií na Petriho misky byla přidána hád'átka (cca 20 ks gravidních samiček), která byla předem promytá v destilované vodě a přenesena pomocí nematologické jehly.

#### **4.1.5.2. Příprava tekutého média pro *C. elegans***

##### **Materiál**

##### **základní roztok pro S médium:**

5,85 g NaCl

1 g K<sub>2</sub>PPO<sub>4</sub>

6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1 ml roztoku cholesterolu v etanolu (5mg/ml)

doplnění na 1 l destilované vody a provedena sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut

##### **1M citronan sodný (pH 6,0):**

20 g monohydrátu kyseliny citronové

293,5 g monohydrátu citronanu sodného

doplnění vodou na 1 l a provedena sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut

##### **roztok stopových prvků:**

1,86 g disodné soli EDTA

0,69 g FeSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O

0,2 g MnCl<sub>2</sub>x4H<sub>2</sub>O

0,29 g ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O

0,025 g CuSO<sub>4</sub>x5H<sub>2</sub>O

doplnění vodou na 1 l a provedena sterilizace opět při stejné teplotě a době jako v předešlých krocích, tento roztok byl poté uchováván ve tmě.

1M roztok MgSO<sub>4</sub> - sterilizace v autoklávu

S médium:

1l sterilního základního roztoku  
10 ml 1M roztoku citronanu sodného (pH 6,0)  
10 ml roztoku stopových prvků  
3 ml 1M CaCl<sub>2</sub>  
3 ml 1M MgSO<sub>4</sub>  
4 Petriho misky obsahující *C. elegans*  
koncentrovaná suspenze *E. coli* OP50  
1 l sterilní láhev se šroubovacím uzávěrem  
50 ml sterilní centrifugační zkumavky s víčkem

postup:

Sterilní S médium v množství 250 ml bylo inokulováno v 1 l sterilní láhvi koncentrovanou suspenzí *E. coli*, která byla připravena centrifugací 2-3 l tekuté kultury *E. coli* v LB médiu při 3000 x g po dobu 10 minut. Do Petriho misek s pevným živným médiem obsahujícím *C. elegans* bylo přidáno 5 ml S média a obsah byl přelit do láhve k S médiu inokulovaného bakteriemi. Láhev byla třepána na třepačce při teplotě 20 °C. Intenzita kmitů by měla být taková, aby byla kultura dobře provzdušněna. Kultura byla kontrolována odebráním kapky suspenze a prohlédnutím pod mikroskopem. Pokud byly bakterie háďátky spotřebovány (roztok už není kalný), bylo zapotřebí přidat další bakterie do S média. Kultivace byla ukončena zpravidla po 4-5 dnech. Láhev byla posléze umístěna na led po dobu 15 minut, aby došlo k usazení háďátek. Poté byla odsáta většina tekutiny z láhve a zbytek byl převeden do 50 ml sterilní centrifugační zkumavky. Centrifugace byla prováděna po dobu 2 minut při 1150 x g, aby byla získána peleta háďátek, zbytek přebytečné tekutiny byl odsát.

#### **4.1.5.3. Příprava bakterií pro výživu *C. elegans* metodický postup dle práce Stiernagle (1999)**

##### materiál:

výchozí kultura *E. coli* OP50

LB agar (pH 7,0)

tekuté LB médium

sterilní Petriho misky (60, 90 mm)

50 ml sterilní centrifugační zkumavky s víčkem

##### složení LB agaru:

10g bakteriologického tryptonu

5 g kvasničného extraktu (Bacto-yeast)

5g NaCl

15 g agaru

doplnění vodou na 1l a sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut

##### složení tekutého LB media:

10 g bakteriologického tryptonu

5 g kvasničného extraktu (Bacto-yeast)

5 g NaCl

doplnění vodou na celkový objem 1l a sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut

##### Postup:

Kultura *E. coli* byla přeočkována na LB agarové plotny, které byly podstoupeny sterilizaci. Takto byly získány jednotlivé kolonie bakterií, kterými bylo inokulováno 30 ml sterilního tekutého LB média, které bylo rozlito v 50 ml zkumavkách. Bakterie byly při teplotě 37 °C inkubovány přes noc. Tekuté kultury bakterií byly dále použity k přípravě kultivačních médií, na kterých probíhalo množení *C. elegans*.

#### 4.1.5.4. Zamrazování *C. elegans* pomocí tekutého média

##### materiál:

S pufr

S pufr + 30% glycerol

Petriho misky s pevným kultivačním médiem pro *C. elegans* obsahující larvy 1. a 2. vývojového stupně bez bakterií

50 ml sterilní centrifugační zkumavky s víčkem

1,5 ml sterilní mikrozukavky

##### Postup zmrazování:

Do Petriho misek (5-6 ks) s *C. elegans* byl přidán S pufr v takovém množství, které bylo následně zamrazeno. S pufr s háďátky byl přelit do centrifugační zkumavky. Dále byl přidán stejný objem S pufru s 30% glycerolem a celá směs důkladně promíchána. Směs byla rozdělena po 1 ml do mikrozukavek, které byly umístěny uzavřené v polystyrenovém boxu nejméně po dobu 12 hodin do mrazicího boxu (-80 °C). Z polystyrenového boxu byly tyto mikrozukavky následující den přemístěny do mrazicího boxu (-80 °C), pro dlouhodobé uchování.

##### Postup rozmrazování:

Mikrozukavka s háďátky byla ponechána při laboratorní teplotě, aby došlo k roztátí. Obsah byl přelit do Petriho misky s pevným kultivačním médiem pro *C. elegans* inokulovaným bakteriemi *E. coli*. Pohybující se háďátka byla pozorovatelná za několik minut. Po 2-3 dnech bylo přeneseno jednotlivě 10-15 jedinců do další Petriho misky s médiem bylo sledováno, zda se potomstvo správně vyvíjí a zda samičky v pravidelných tří denních intervalech kladou vajíčka a nedochází k vývojovým abnormalitám.

Pro použití háďátek při pokusech s izolací nematofágních hub z půdy a v testu nematofágní aktivity, který je popsán níže, byla háďátka nejprve zbavena případných kontaminantů, v tomto případě šlo o bakterie *E. coli*. Pro odstranění byla použita následující metoda.

materiál:

sterilní destilovaná voda

ampicilin

mikropipeta

Petriho misky s 1% vodním agarem

kádinka

1,5 ml mikrozkuhavky

10 ml polypropylenové špičky

parafilm

postup:

Hád'átka z pevného kultivačního média byla smyta sterilní destilovanou vodou do kádinky a pak byl převeden obsah do mikrozkuhavky. K hád'átkům byl připipetován ampicilin (cílová koncentrace 1 µg/ml) Po 30 minutách byla provedena centrifugace při 6 000 x g po dobu 4 minut a hád'átka byla shromážděna na dně mikrozkuhavky. Mikropipetou byl odebrán supernatant a připipetována sterilní destilovaná voda. Po promíchání byla provedena opětovná centrifugace.

Následovalo čištění hád'átek autonomním pohybem v agaru, při kterém došlo během 24 hodin ke sterilizaci nejen povrchu hád'átek, ale i jejich zažívacího traktu. Nejprve byla připravena dráha pro pohyb hád'átek pomocí 10 ml polypropylenové špičky k automatické pipetě. Sterilní jednorázová špička byla nejprve utěsněna několika vrstvami parafilmu na jejím zúženém konci. Takto připravená špička byla naplněna sterilním 1% vodním agarem v množství 5 ml a zakryta parafilmem. Sterilní medium (1% vodní agar musí mít při nálévání teplotu cca 40 °C, aby se předešlo roztavení použitého parafilmu.

Do mikrozkuhavky bylo napipetováno 300 µl sterilní destilované vody. Ze zúženého konce špičky po ztuhnutí agaru byl odstraněn parafilm a špička byla vnořena do této mikrozkuhavky tak, aby se nedotýkala dna a byla zafixována parafilmem. Suspenze byla napipetována přímo do agaru. Po 24 hodinách se hád'átka nacházela již v mikrozkuhavce, odkud je bylo možné přímo využít k následujícím testům.

## 4.2. Izolace nematofágních hub

### 4.2.1. Sběr půdních vzorků

Půdní vzorky byly odebírány z půd bohatých na organický materiál (pole, lesní hrabanka atd.) v různých oblastech ČR. Cca 300 g půdy bylo odebráno lopatkou do igelitového uzavíracího pytlíku, který byl označen číslem a uložen do krabic. Jednotlivé vzorky půdy byly po převozu do laboratoře rozprostřeny na tácky a prosušeny v laboratorních podmínkách.

### 4.2.2. Živná média

K izolaci nematofágních hub a k dalším experimentům byla použita tato živná média

#### Agar s bengálskou červení - Rose bengal agar (RBA) (Himedia)

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| Složení:                       | g/l  |
| Dextrosa                       | 10   |
| dihydrogenfosforečnan draselný | 1    |
| sojový pepton                  | 5    |
| bengálská červen               | 0,05 |
| síran hořečnatý                | 0,5  |
| agar                           | 15   |

#### Brambora-dextrózový agar - Potato dextrose agar (PDA) (Himedia)

|                   |     |
|-------------------|-----|
| složení:          | g/l |
| bramborová infuze | 200 |
| dextrosa          | 20  |
| agar              | 15  |

#### Ovesný agar - Oat meal agar (OA) (Himedia):

|              |      |
|--------------|------|
| složení:     | g/l  |
| ovesná mouka | 6    |
| agar         | 12,5 |

Agar se sladovým extraktem - Malt extract agar (MEA) (Himedia)

|                    |     |
|--------------------|-----|
| složení:           | g/l |
| sladový extrakt    | 30  |
| mykologický pepton | 5   |
| agar               | 15  |

Kukuřičný agar - corn meal agar (CMA) (Himedia)

|               |     |
|---------------|-----|
| složení:      | g/l |
| obilná infuze | 50  |
| agar          | 15  |

vodní agar (VA)

|          |      |
|----------|------|
| složení: | g/l  |
| agar     | 15 g |

Jednotlivé živné půdy byly připraveny dle pokynů výrobce a sterilizovány v autoklávu po dobu 20 min při teplotě 121 °C. Po ochlazení média na teplotu cca 55 °C bylo k médiu přidáno antibiotikum - tetracyklin (0,2 g/l), aby byla potlačena případná kontaminace bakteriemi. Médium bylo rozlito do Petriho misek (60, 90 mm) v laminárním boxu.

Tekuté médium:

|                                |      |
|--------------------------------|------|
| Složení:                       | g/l  |
| Dextrosa                       | 10   |
| dihydrogenfosforečnan draselný | 1    |
| síran hořečnatý                | 0,5  |
| sojový pepton                  | 5    |
| bengálská červen               | 0,05 |

Po sterilizaci média v autoklávu (20 min, 121 °C) byl po vychladnutí přidán tetracyklin v množství 0,2 g/l.



### 4.2.3. Izolace s využitím půdního výluhu

K přípravě výluhu z jednotlivých usušených půdních vzorků bylo použito 10 g půdního vzorku, které bylo přisypano k 50 ml destilované vody v Erlenmayerově baňce o objemu 250 ml. Baňky byly uzavřeny buničinou a hrdlo a alobalem a umístěny na třepačku Ika Vibrax OS 10 Basic a třepány po dobu 20 minut při rychlosti 150 rpm. Po sejmutí z třepačky byl půdní výluh ponechán 10 minut v klidu, aby došlo k sedimentaci půdních částic na dno baňky.

Výluh byl aplikován na jednotlivé Petriho misky s živným médiem (PDA, CMA a RBA) pomocí pipety, a to v množství 1000 µl na jednu misku. Poté byl rozetřen pomocí sterilní tyčinky a Petriho miska byla zaparafilmována. Celá aplikace proběhla ve sterilních podmínkách flowboxu. Petriho misky byly následně umístěny do termostatu při (teplota 22 °C). Každý den byla provedena vizuální a mikroskopická kontrola přítomnosti hub a určování dle klíče. Případné nematofágní houby byly odizolovány a přeočkovávány na nové živné médium.

### 4.2.4 Izolace s využitím půdních částic

Usušené půdní vzorky byly nejemno rozdrceny a v množství 2 g aplikovány sterilní lžičkou na Petriho misku s živným médiem (PDA, CMA, RBA, VA), které obsahovalo 0,2 g/l širokospektrálního antibiotika tetracyklinu. Tetracyklin byl přidán z důvodu zabránění případnému růstu bakterií a tím znehodnocení pokusu. Na takto připravené médium byla následně aplikována háďátka *Caenorhabditis elegans* v množství 20 kusů. Takto připravené Petriho misky byly řádně zaparafilmovány a inkubovány v termostatu při 22 °C. Každý den byly Petriho misky prohlédnuty pomocí binokulárního mikroskopu a pomocí klíče bylo určeno, zda se jedná o nematofágní houby. Případné vzorky jednotlivých hub byly odizolovány na další Petriho misky. Postupně bylo provedeno několikanásobné přeočkovávání k získání čisté kultury jednotlivých izolátů hub.

#### **4. 2. 5. Izolace acanthocytů *Stropharia rugosoannulata***

##### **Izolace s využitím parafilmu**

Tato technika je založena na metodě izolace acanthocytů pomocí parafilmu, kterou zveřejnil ve svých studiích Luo et al. (2006).

Z namnoženého mycelia *Stropharia rugosoannulata*, které tvořilo acanthocyty se tyto hvězdicovité útvary odebíraly pomocí parafilmu. Parafilm byl několikrát za sebou lehce přiložen na mycelium a poté omyt destilovanou vodou nad sterilní Petriho miskou.

##### **Izolace s využitím celofánové membrány**

Na Petriho misky s CMA byla na povrch živného média aplikována celofánová membrána. Na tuto membránu bylo naočkováno malé množství mycelia nematofágní houby *Stropharia rugosoannulata*. Misky byly poté zaparafilmovány a vloženy do termostatu. Inkubace probíhala po dobu 3 dnů při teplotě 22 °C. Po třech dnech byly narostlé acanthocyty smývány pomocí destilované vody z povrchu celofánové membrány do hodinového sklíčka. Odtud byly získané acanthocyty následně odebrány pomocí pipety do připravené mikroskopické misky.

#### **4.3. Uchovávání nematofágních druhů hub**

Byly provedeny testy dvou různých způsobů uchovávání nematofágních hub, které byly využity k dalším pokusům a zároveň budou dále sloužit jako sbírkové kultury.

##### **4.3.1. Lyofilizace**

Postup je založen na sublimaci zmrzlé vody při nízkém tlaku a teplotě. Jeho výhoda spočívá v tom, že nedochází k přímému přechodu vody z kapalného do plynného skupenství, což je v mnohých případech příčina poškození sušeného materiálu.

Byla upravena mikroskopická miska pro potřeby lyofilizace tím, že byl do víčka vyříznut otvor a překryt jemnou tkaninou, která byla k víčku přilepena. Do jednotlivých mikroskopických misek bylo vloženo mycelium o celkovém objemu 1 ml. Mikroskopické misky byly vloženy do mrazicího boxu a zmrazeny na -60 °C.

Druhý den byly mikroskopické vzorky vloženy do lyofilizátoru a proběhla lyofilizace, která trvala 3 dny.

#### **4.3.2. Šikmé agary**

Další možnost uchování nematofágních hub spočívá ve využití šikmých agarů, které byly zalaty parafinovým olejem.

##### Příprava parafinového oleje

Parafinový olej byl rozlit do 12 cm zkumavek asi do 2/3 objemu, uzavřen kovovým uzávěrem a přikryt alobalem. Zkumavky byly následně sterilizovány v autoklávu při teplotě 111,5 °C po dobu 30 minut.

Po sterilizaci byly zkumavky ponechány vychladnout a poté vloženy do horkovzdušného sterilizátoru, kde došlo k odpaření vody, která způsobuje zakalení oleje.

Vysoušení bylo obvykle prováděno 5-6 hodin při teplotě 90 °C při několika opakováních, dokud nebyl olej čirý, ne mléčný. Postupně byly odebírány jednotlivé zkumavky.

##### Šikmý agar

Pro přípravu šikmých agarů byly použity 12 cm zkumavky, corn meal agar a širokospektrální antibiotikum tetracyklin. Jednotlivé zkumavky byly ve sterilním prostředí flowboxu naplněny cca do 1/3 objemu a uzavřeny kovovým uzávěrem, který byl sterilizován nad plamenem. Poté byly zkumavky umístěny na dřevěnou podložku, která měla sklon 30°. Zkumavky byly ponechány v této poloze, dokud nedošlo ke ztuhnutí agaru, poté byly až do použití umístěny v chladničce při teplotě 4 °C, až do dalšího použití.

##### Očkování hub na šikmý agar

Očkování nematofágních hub na šikmé agary pobíhalo ve sterilním prostředí flowboxu. Do každé zkumavky se šikmým agarem bylo jehlou sterilizovanou nad plamenem naočkováno mycelium nematofágní houby, zkumavka byla opět uzavřena kovovým sterilním uzávěrem a zafixována parafilmem. Vše bylo řádně označeno a uloženo do termostatu při teplotě 25 °C. Po nárůstu mycelia bylo provedeno zalití sterilním parafinovým olejem.

Jednotlivé izoláty ve zkumavce byly zalaty parafinovým olejem zhruba do 1-2 cm nad

koncem agaru. Konec zkumavky byl následně po zalití ožehnut a uzavřen ožehnutým víčkem. Víčko bylo následně zaparafilmováno.

Na každou zkumavku s myceliem byla použita jedna zkumavka s parafinovým olejem, pokud olej zbyl, nebyl už dále použit na další zkumavku. Zbytky oleje ve zkumavkách byly dolity nesterilizovaným olejem a znovu sterilizovány.

#### **4. 4. Diagnostika izolovaných nematofágních hub**

Při izolaci byla zároveň provedena diagnostika nematofágních hub. Nejdříve byla použita přímá metoda – kultivační metoda a využití diagnostiky pomocí světelné mikroskopie. Při těchto metodách byly jednotlivé nematofágní houby určeny do rodu. Pro podrobnější určení byla po získání čistého izolátu použita molekulárně biologická diagnostika.

##### **4. 4.1. Morfologická diagnostika**

Pro morfologickou diagnostiku jednotlivých druhů nematofágních hub byl použit určovací klíč, který sestavili Wang a Mc Sorley (2003).

##### **4. 4.2. Molekulárně biologická diagnostika**

Izoláty nematofágních hub, u kterých bylo zapotřebí následné zařazení do druhů pro pozdější pokusy, byly podrobeny molekulárně biologické diagnostice.

###### **4. 4.2.1. Izolace DNA**

U jednotlivých vzorků byla nejdříve provedena izolace DNA pomocí komerčního kitu DNeasy Plant Minikit (QIAGEN) podle metodického postupu výrobce.

Množství 50 mikrogramů vzorku mycelia bylo seškrábnuto do třecí misky, zmrazeno pomocí tekutého dusíku a rozdrceno.

Každý vzorek byl rozdělen do dvou mikrozkuvek.

Do jednotlivých mikrozkuvek bylo připipetováno 400  $\mu$ l roztoku API a obsah byl promíchán na vortexu. Poté byly mikrozkuvky vloženy do vodní lázně nebo

termostatu o teplotě 65 °C po dobu 10 minut. V průběhu inkubace byl obsah v mikrozkušavkách 2 -3x promíchán.

Následně bylo přidáno 130 µl roztoku AP2. Po promíchání byly mikrozkušavky vloženy po dobu 5 minut na led.

Mikrozkušavky byly poté centrifugovány při 20 000 g po dobu 5 minut.

Supernatant byl přepipetován do fialových kolonek mikrozkušavek a 2 minuty centrifugován při 20 000 g. Ze spodní části kolonky byl odpipetován obsah v množství 400 µl a přenesen do nových mikrozkušavek a k němu bylo připipetováno 675 µl roztoku AP3/E a směs byla promíchána.

Pipetou bylo přeneseno množství 650 µl do bílých kolonek mikrozkušavek a poté následovala centrifugace při otáčkách 20 000 g po dobu 1 minuty. Obsah ve spodní části kolonky byl vylit a centrifugace byla opakována.

Po opětovné centrifugaci byla kolonka přemístěna do nové mikrozkušavky a do kolonky bylo napipetováno 500 µl roztoku AW. Následovala další centrifugace při otáčkách 20 000 g po dobu 1 minuty. Spodní část byla vylita a byl přidán opět roztok AW v množství 500 µl a následovala centrifugace při stejných otáčkách jako v předchozím kroku po dobu 2 minut.

Kolonka byla přemístěna do nové 2 ml mikrozkušavky. Do kolonky bylo napipetováno 50 µl elučního pufru AE. Po inkubaci po dobu 5 minut při laboratorní teplotě následovala centrifugace při otáčkách 20 000 g po dobu 1 minuty. Izolovaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C do dalšího použití.

#### **4. 4.2.2. Polymerázová řetězová reakce**

DNA byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce, s využitím primerů nasedajících univerzálně na cistron ribozomální DNA obsahující mezerníky 1 a 2 a gen pro subjednotku ribozomu 5,8 S.

Primery, které byly použity, mají tuto skevenci:

ITS1 5'-TCCGAGGTGAACCTGCGG-3'

ITS4 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Tyto dva oligonukleotidy (ITS1 a ITS4) jsou specifické pro rDNA hub a byly vybrány kvůli následnému sekvenování a porovnání v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Složení směsi pro PCR:

|   |   |
|---|---|
| pufr pro <i>Taq</i> polymerázu (ThermoScientific) | · 2,5 µl (1x)                             |
| MgCl <sub>2</sub>                                 | ···· 1,5 µl (1,5 mM)                      |
| <i>Taq</i> polymeráza (ThermoScientific)          | 0,5 µl (2,5 U)                            |
| dNTP (ThermoScientific)                           | ····· 0,25 µl (0,4 mM každého nukleotidu) |
| primer mix  | ·· 0,4 µl (0,4 mM každého nukleotidu)     |
| izolovaná DNA                                     | ·· 1-10 µl                                |
| ddH <sub>2</sub> O                                | ········· doplnit do 25 µl                |

Pro každý vzorek byly připraveny čtyři reakce pro amplifikaci DNA fragmentu.

Program termocykléru pro PCR:

- 94 °C 3 minuty
- 94 °C 2 minuty
- 60 °C 30 sekund
- 72 °C 2 minuty
- 30x od druhého kroku
- 72 °C 4 minuty
- 4 °C

Program byl optimalizován v podmínkách naší laboratoře na termocykléru MJ Research PTC 200. Výsledky amplifikace DNA fragmentů byly zkontrolovány pomocí horizontální agarózové elektroforézy.

Pro účely sekvenování byla použita pro amplifikaci DNA úseků *Pfu* polymeráza

Složení směsi pro PCR:

|                       |                                    |
|-----------------------|------------------------------------|
| pufr                  | 5 µl (1x)                          |
| dNTP                  | 0,5 µl (0,4 mM každého nukleotidu) |
| pmix                  | 0,8 µl (0,4 mM každého nukleotidu) |
| <i>pfu</i> polymeráza | 1 µl (2,5 U)                       |
| DNA                   | 2 µl                               |
| ddH <sub>2</sub> O    | 40,7 µl                            |

Program termocykléru pro PCR byl stejný jako v předchozím případě.

Po ukončení PCR byla provedena horizontální elektroforéza na 1,5% agarózovém gelu. Do každé jamky byl aplikován výsledný produkt PCR v množství 50  $\mu$ l, který byl před aplikací do jamek smíchán s barvivem pro elektroforetickou separaci (nanášecí barvivo Loading dye).

Z výsledného gelu byly vyřezány amplifikované fragmenty DNA, které byly použity pro následující sekvenaci.

#### **4. 4.2.3. Izolace fragmentů DNA z agarosového gelu**

Pro následné zaslání vzorků k sekvenaci bylo nutné provést izolaci DNA z vyřezaných fragmentů (zjišťování čistoty a koncentrace jednotlivých vzorků) a ligaci.

Agarózový gel, který obsahoval fragmenty DNA jednotlivých vzorků byl nejdříve zvážen v mikrozkuvkách a hmotnost byla zaznamenána. Pro izolaci byl využit Gene JET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

V prvním kroku byl k výřezu gelu přidán pufr Binding Buffer v poměru 1:1. Mikrozkuvky byly vloženy do vodní lázně na 10 minut při 50 °C, aby došlo k úplnému rozpuštění gelu v pufru. Poté byl do mikrozkuvek přidán izopropanol opět v poměru 1:1. Vše bylo promícháno pomocí vortexu.

Obsah mikrozkuvky byl přenesen na kolonku v mikrozkuvce a centrifugován po dobu 1 minuty při otáčkách 12 000 g. Spodní část kolonky byla vylita a na kolonku byl přidán promývací pufr v množství 700  $\mu$ l a opět následovala centrifugace po dobu 1 minuty při stejných otáčkách. Tento krok byl zopakován. Kolonka byla přemístěna do nové 1,5 ml mikrozkuvky. Na kolonku byl aplikován eluční pufr a po 5ti minutovém působení byla opět provedena centrifugace 1 minutu. Mikrozkuvky byly uloženy do mrazicího boxu při -50 °C. U takto získaných vzorků byla provedena horizontální agarózová elektroforéza, na kterou byly vzorky aplikovány v množství 5  $\mu$ l. Podle snímků byla vypočítána koncentrace v mg/ $\mu$ l DNA.

Měření čistoty a koncentrace DNA bylo prováděno na spektrofotometru.

#### 4.4.2.4. Ligace PCR produktu do plazmidu a transformace plazmidového vektoru do bakteriálních buněk

Pro namnožení bakterií *E. coli* bylo použito pevné LB medium v množství 17,5 g, které bylo smícháno s 500 ml destilované vody. Následně byla provedena sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci bylo LB medium schlazeno na 50 °C a byl přidán ampicilin v množství 0,5 ml. Do připravených Petriho misek o průměru 9 mm bylo LB medium rozlito ve sterilním prostředí flowboxu. Takto připravené Petriho misky byly ponechány ve sterilním prostředí do druhého dne, kdy byly použity při transformaci.

Dále bylo připraveno 500 ml LB media, do kterého však nebyl přidán ampicilin. Na toto medium byly po aplikaci na Petriho misky naočkovány bakterie *E. coli* GM2163 od firmy Thermo Scientific. Misky nebyly zaparafilmovány a byly uloženy dnem vzhůru do termostatu při 37 °C do druhého dne.

CloneJET PCR Cloning Kit prováděný pokus na ledu

|                                    |                     |
|------------------------------------|---------------------|
| příprava plazmidu: Reaction buffer | 10 µl               |
| produkt PCR                        | vypočteno z tabulky |
| pJET 1,2/blun/                     | 2,5 µl              |
| ddH <sub>2</sub> O                 | vypočteno z tabulky |
| T4 DNA ligase                      | 1 µl                |

Po napipetování do mikrozkuavek proběhla inkubace po dobu 5 minut při laboratorní teplotě.

#### Transformace

Do mikrozkuavek s C mediem předeřátých na 37 °C byla přenesena kolonie z narostlých bakterií. Mikrozkuavky byly poté 2 hodiny třepány na třepáče.

Poté byla provedena centrifugace při 12 000 x g po dobu 1 minuty. Bakterie zůstaly na dně a horní obsah byl odpipetován. T-solution (A) a T-solution (B) byl smíchán a na každou peletku bakterie v mikrozkuavce bylo použito množství 420 µl T-solution (A+B). Peletka byla jemně rozpuštěna, spíše omývána a poté byla mikrozkuavka inkubována 5 minut na ledu. Následovala centrifugace 1 minutu při 12 000 x g a poté byl vylit supernatan. Buňky byly znovu rozpuštěny v 120 µl a opět



inkubovány 5 minut na ledu.

Obsah mikrozkuvek byl rozdělen na 2x 50  $\mu$ l a bylo k němu přidáno 5  $\mu$ l připravených plazmidů a vše bylo inkubováno 5 minut na ledu.

Dále byla provedena aplikace 50  $\mu$ l obsahu mikrozkuvek na Petriho misky s LB médiem s příměsí ampicilinu a proveden roztěr bakteriální kličkou. Petriho misky byly inkubovány přes noc v termostatu při 37 °C.

#### Testování přítomnosti fragmentů v plazmidech

Z Petriho misek byla odebrána kolonie bakterií a vložena špičkou mikropipety do víčka malé mikrozkuvky, do které bylo předtím napipetováno jednotlivé množství látek potřebných k PCR, které jsou zaznamenány níže.

|                         |  |
|-------------------------|--|
| pufř                    | 2,5 $\mu$ l (1x)                         |
| MgCl <sub>2</sub>       | 1,5 $\mu$ l (1,5 mM)                     |
| dNTP                    | 0,25 $\mu$ l (0,4 mM každého nukleotidu) |
| pJet R a F (primer mix) | 0,4 $\mu$ l (0,4 mM každého nukleotidu)  |
| <i>Taq</i> polymeráza   | 0,2 $\mu$ l (2,5 U)                      |
| DNA                     | 1 $\mu$ l                                |
| dd H <sub>2</sub> O     | 19,15 $\mu$ l                            |

Po PCR byla provedena horizontální agarózová elektroforéza. Pozitivní vzorky byly odeslány na sekvenaci do firmy Macrogen.

Získané sekvence byly upraveny a pomocí BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (základní vyhledávací klíč) byly porovnány sekvence s databází a zjištěny jednotlivé druhy nematofágních hub.

## **4.5. Testování nematofágní aktivity získaných hub**

### **4.5.1. In vitro testování**

#### **4.5.1.1. Testování nematofágní aktivity získaných izolátů z půdních vzorků**

Izoláty, které nesporulovaly a bylo tedy obtížné je určit, byly přeočkovány na 1,5% vodní agar a sporulace byla indukována jednak světlem a jednak přidáním vodného extraktu z hád'átek k podpoření tvorby lapacích orgánů. Dále byl proveden test nematofágní aktivity u jednotlivých izolátů, u kterých by se mohlo jednat o nematofágní druh.

Pro testování nematofágní aktivity bylo použito modelového organismu hád'átka *Caenorhabditis elegans*. Nematofágní houby byly přeočkovány na 1,5% vodní agar a ke každému izolátu bylo přidáno 500 ks *C. elegans*. Izoláty MHP 1-9 byly získány z půd napadených *Meoidogyne hapla* (Suchdol, parcelky za skleníky) a izoláty GR-C byly odebrány z cyst *Globodera rostochiensis*. Tyto pak byly použity pro zjišťování nematofágní aktivity. Test byl proveden ve 4 opakováních.

Byly vybrány izoláty nematofágních hub, které měly předpoklady k využití v rámci biologické ochrany proti fytoparazitickým hád'átkům. Na těchto izolátech, které byly pořízeny ze sbírkových kultur z banky Centraalbureau voor Schimmelcultures se sídlem v Utrechtu v Holandsku (*Arthrobotrys oligospora*, *Dactylaria oviparasitica*, *Dactylaria candida*, *Dactylaria lysiphaga* a *Verticillium chlamydosporium*), byla provedena optimalizace metody testování nematofágních hub pomocí sklíčkových kultur. Následně byla tato metoda využita k pokusům na námi vyizolovaných nematofágních houbách.

#### **4.5.1.2. Testování mortality hád'átek s využitím nematofágních hub pomocí sklíčkových kultur**

Pro pěstování nematofágních hub na sklíčku bylo použito 20% rose bengal agar. Medium bylo sterilizováno po dobu 20 minut při 121 °C. Do Petriho misek byl vložen kulatý filtrační papír navlhčený destilovanou vodou, na který byl položen vrchní díl malé Petriho misky o průměru 60 mm a vše bylo vysterilizováno pod UV zářením v flowboxu po dobu 30 minut. Následně byla podložní sklíčka vložena sterilně do Petriho misek (na vrchní díl malé Petriho misky) a skleněnou tyčinkou

byla nanášena na sklíčko kapka agaru a jehlou vysterilizovanou nad plamenem bylo do kapky agaru nanášeno malé množství mycelia testovaného izolátu nematofágní houby. Poté byl agar přikryt krycím sklíčkem. Na okrajích byl ponechán malý volný prostor pro následnou aplikaci hádátek. Petriho misky byly zafixovány parafilmem a inkubovány v termostatu při teplotě 22 °C. Po nárůstu houbového izolátu byla následně provedena aplikace určitého počtu hádátek do mezery mezi krycím a podložním sklíčkem pomocí pipety. Množství aplikovaných hádátek bylo kontrolováno pod binokulárním mikroskopem. Vše bylo opět důkladně zafixováno parafilmem a inkubováno při teplotě 22 °C. Kontrola byla prováděna po 2, 4 a 24 hod. Bylo provedeno sedm opakování od každé varianty plus negativní kontrola.

Pro testování nematofágní aktivity izolovaných hub byla využita hádátka druhu *Globodera rostochiensis*, *Meloidogyne hapla* a *Ditylenchus dipsaci*.

#### **4.5.1.3. In vitro testy imobilizace a mortality hádátek pomocí *Stropharia rugosoannulata* a *Arthrobotrys oligospora***

#### **5. 4. 3.1. Testování nematofágní aktivity *Stropharia rugosoannulata* na *Bursaphelenchus xylophilus***

Pro testování byl použit izolát houby *S. rugosoannulata*, který byl izolován z infikované slámy získané z komerčně dostupného zdroje. Nejdříve byl proveden pokus s homogenátem *B. xylophilus* za účelem zjištění reakce *S. rugosoannulata* na přítomnost hádátek. Homogenát byl připraven ze 100 kusů hádátek *C. elegans*, která byla vložena do 25 ml falkonky s přidanou destilovanou vodou v množství 10 ml. Následně byla hádátka ve falkonce rozdrcena. Na Petriho misku s 1,5% vodním agarem bylo naočkováno malé množství mycelia a po třech dnech inkubace při teplotě 22 °C byl pipetou aplikován homogenát *C. elegans* v množství 500 µl. Další den proběhlo vyhodnocení pomocí stereomikroskopu.

Testy imobilizace a mortality byly provedeny dle předchozí metody kultivace nematofágních hub pomocí sklíčkových kultur. Po nárůstu houbového izolátu bylo následně přidáno 10 kusů hádátka *B. xylophilus* na sklíčko.

Vyhodnocování nematofágní aktivity bylo provedeno po 2, 24 a 48 hod. Testování bylo provedeno v 10. opakování.

#### **4.5.1.3.2. Testování účinnosti nematofágní aktivity *Stropharia rugosoannulata* a *Arthrobotrys oligospora* na fytoparazitická háďátka *Meloidogyne hapla***

Pro testování byl použit izolát houby *Stropharia rugosoannulata*, který byl izolován z infikované slámy získané z komerčně dostupného zdroje. Kultivace byla provedena na živném médiu MEA po dobu 5 dní při teplotě 21 °C. Izoláty *A. oligospora* byly získány z půdních vzorků, které byly odebrány z pole (lokalita Hradištko, GPS 50°9'46.001 " N 14°53'47.022 " E).

Při jednotlivých pokusech s nematofágními houbami *S. rugosoannulata* a *A. oligospora* bylo do Petriho misky s jednotlivými izoláty hub přidáno pomocí nematologické jehly 5 kusů háďátek *Meloidogyne hapla*. Jako kontrola byla použita Petriho miska s živným médiem bez izolátů hub, na kterou bylo aplikováno taktéž 5 kusů háďátek *Meloidogyne hapla*. Misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 21 °C a vyhodnocení imobilizace a mortality háďátek bylo provedeno v časovém sledu 4 a 24 hodin pomocí binokulárního mikroskopu. Pokus byl proveden ve 20 opakováních a získané výsledky byly zaznamenány do tabulky a vyhodnoceny pomocí ANOVA, a následně Tukeyho testem v programu Statistica 9.0.

#### **4.5.2. In vivo testy**

##### **4.5.2.1. Nádobové pokusy**

K namnožení nematofágních hub bylo použito tekuté medium, které bylo vysterylizováno v autoklávu při teplotě 121 °C v množství 1000 ml. Po sterilizaci a následném zchladnutí na 45 °C bylo přidáno antibiotikum tetracyklin v množství 0,1 g/l. Do sterilního vychladlého tekutého media bylo ve flowboxu přidáno mycelium nematofágní houby a Erlenmayerova nádoba byla následně vložena na třepačku Ika vibrax OS 10 Basic umístěnou v termostatu, který byl nastaven na 22 °C. Medium s houbou bylo třepáno při 150 rpm, dokud se houba nenamnožila, obvykle 14 dní.

Poté bylo mycelium nematofágní houby filtrováno přes síto, aby došlo k oddělení média od mycelia, na sítu bylo mycelium navíc několikrát promyto destilovanou vodou, čímž došlo k většímu vyplavení média z mycelia.

Mycelium houby o hmotnosti 20 g bylo převedeno do označených 50 ml

plastových zkumavek, které byly přes noc umístěny v lednici při teplotě 4 °C.

Druhý den byla provedena aplikace mycelia do půdy. Mycelium z každé zkumavky bylo pečlivě promícháno v uzavřené nádobě s 400 g sterilní půdy. Na dno květináčů (o objemu 500 ml), byly vloženy čtverce netkané textilie, aby nedocházelo k odplavení zeminy. Na dno byla vsypána sterilní půda do výšky 7 cm. Takto bylo připraveno osm květináčů pro každý izolát nematofágní houby. Půda smíchaná s myceliem byla následně umístěna do květináčů. Sedm květináčů bylo inokulováno izoláty a osmý květináč byl použit jako kontrolní (prost jakéhokoliv inokula), do nějž byla doplněna pouze sterilní půda. Do každého květináče byly poté na povrch aplikovány vaječné vaky hád'átek v množství 5 kusů nebo samotná hád'átka v množství 20 kusů a zasypány 5 cm sterilní půdy. Bylo tedy připraveno osm květináčů pro každý druh fytoparazitického hád'átka. Všechny květináče byly následně osety. U *Meloidogyne hapla* se jednalo o semena mrkve obecné (*Daucus carota* L.) odrůda Flakkeer, u *Globodera rostochiensis* o semena rajčete tyčkové (*Lycopersicon esculentum* Mill.) odrůda Torino F1 a u *Ditylenchus dipsaci* o semena čekanky salátové (*Cichorium intybus* L.).

Po 12 týdnech bylo provedeno vyhodnocení. U *Meloidogyne hapla* byly spočítány všechny háčky na kořenech, které byly hád'átky způsobeny. Hád'átka *Ditylenchus dipsaci* byla vyplavena pomocí Baermannovy nálevkové metody a spočítána v hodinovém sklíčku. U hád'átek *Globodera rostochiensis* byla nejdříve půda vysušena a následně proplachována pomocí Fenwickovy konve, vyplavené cysty byly poté spočítány na sítích. Následně byly všechny údaje vyhodnoceny pomocí programu Statistica 11.

#### 4.5.2.2. Polní pokusy

Testování nematofágní aktivity v polních podmínkách bylo prováděno s využitím izolátu *Arthrobotrys oligospora*. Inokulum bylo namnoženo pomocí velkoobjemové fermentace v tekutém malt extraktmédiu. Po dobu 11 dní bylo mycelium kultivováno v 2 l Erlemayerových baňkách s disruptory. Poté bylo mycelium přefiltrováno pomocí sít s průměrem ok 0,04 mm a uskladněno při teplotě 10 °C.

Dva dny před aplikací mycelia na pozemek byla provedena homogenizace pomocí nožového homogenizátoru. Jako pokusné pole byl vybrán pozemek zamořený

*M. hapla*. V rámci pokusu byl pozemek rozdělen na 5 variant, kdy každá parcelka zabírala plochu 10 arů. Mezi jednotlivými parcelkami se nacházely izolační pásy o šířce 1 m. Jedna varianta byla ošetřena 5 kg mycelia *A. oligospora*, a to pomocí vysokotlakého motorového postřikovače. Poté byla provedena příprava pozemku před setím mrkve za pomoci rotačního záhonkovače. Po 14 dnech od této přípravy byla na pozemek vyseta mrkev (odrůda Diana).

Po 15 týdnech byla provedena sklizeň mrkve a vyhodnocení získaných dat.

#### **4.6. Testování schopnosti růstu a reprodukce nematofágních hub na agarech s různými nutričními příměsmi**

##### Materiál:

Živná media (Corn meal agar, Oat meal agar)

Sterilní destilovaná voda

Nutriční příměsi (nosiče):

Vermikulit – přídavek do substrátu pro rostliny a houby

Kaolin – substrát pro růst hub a rostlin

Mastek – velmi jemný inertní nosič, využívaný pro *Bauveria bassiana*

Experlit – pomocná půdní látka pro vylehčení a provzdušnění půdy, stabilizace vlhkosti při zakládání travnatých ploch

Zeolit – příznivé působení na růst a vývoj plodin, zlepšuje úrodnost a zvyšuje výnos pěstovaných plodin

Antibiotikum tetracyklin

Hliníková folie

500 ml Erlenmayerovy baňky

Parafilm

Sterilní jehla

2 ml mikrozskumavky

Na jednotlivé pokusy bylo naváženo určené množství agaru (17,5 g Oat meal agaru, 8,5 g Corn meal agaru) a smícháno v Erlenmayerově baňce s 500 ml destilované vody, poté bylo přidáno 6 ml objemově nutriční příměsi, která byla rozmělněna v oscilačním mlýnku. Uzavřená baňka byla vložena do autoklávu a sterilizována při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

Po zchlazení na teplotu cca 55 °C bylo přidáno širokospektrální antibiotikum tetracyklin v množství 0,1 g/l.

Pokusy byly prováděny s použitím 11 různých izolátů nematofágní houby *Arthrobotrys oligospora*. U každého izolátu bylo provedeno naočkování na jednotlivé Petriho misky s OA a CMA, do kterých byly přimíchány jednotlivé příměsi. Takže každý izolát byl naočkován na samostatný OA a na OA s Vermikulitem, Zeolitem, Mastkem, Experlitem a Kaolinem. To samé bylo realizováno u pokusů s CMA

agarem. Všechny pokusy s příměsmi byly provedeny v 10. opakování.

Při očkování ve flowboxu bylo na jehlu nabráno malé množství agarů z misky, na kterou byla houba následně přenesena. Lehkým dotykem agarů na mycelium nematofágní houby došlo k zachycení spor na agar a ten byl následně přenesen na připravenou Petriho misku. Petriho misky byly poté řádně zaparafilmovány a uchovávány v termostatu při pokojové teplotě 21 °C a s denním osvětlením.

Měření bylo prováděno v určitých časových etapách a to 1, 2, 3, 6 a 7. den od naočkování. První a druhý den byl růst mycelia měřen pomocí binokulárního mikroskopu, další dny pak klasickým pravítkem, kdy byl měřen průměr kruhu, který mycelium tvořilo. Pozorování růstu mycelia bylo u některých nutričních příměsí ztížené neprůhledností jednotlivých misek při pozorování binokulárním mikroskopem. Jednalo se především o vermikulit a mastek. V těchto případech bylo v prvních dvou dnech přistoupeno k měření pouze pouhým okem viditelného mycelia na povrchu. Všechny číselné údaje byly zaznamenány do tabulek a následně vyhodnoceny v programu Statistica 11.



## **5. Výsledky**

### **5.1. Izolace nematofágních hub**

#### **5.1.1. Sběr půdních vzorků**

Celkem bylo získáno z různých oblastí České Republiky 85 půdních vzorků. Oblasti s GPS souřadnicemi jsou zaznamenány v tabulce č. 1, která je zařazena do příloh. Sběr byl proveden v oblastech bohatých na organický materiál (pole, hrabanka, kompost, atd.).

#### **5.1.2. Izolace nematofágních hub z půdních vzorků (s využitím půdního výluhu a půdních částic)**

Byly provedeny pokusy se třemi metodami izolace a následné kultivace jednotlivých izolátů nematofágních hub, aby bylo dosaženo optimální metody, při které by došlo k vytváření lapacích orgánů a ideálního růstu houby.

Metoda kultivace na 1,5% agaru byla z výsledků vyhodnocena jako nejvhodnější metodou k izolaci a kultivaci nematofágních hub.

### **5.3. Uchovávání jednotlivých izolátů nematofágních hub**

#### **5.3.1. Lyofilizace**

Lyofilizace byla provedena u izolátů druhu *Arthrobotrys oligospora* a *Stropharia rugosoannulata*. Růst mycelia po opětovném naočkování lyofilizovaných vzorků byl pozorován jen u izolátu nematofágní houby *A. oligospora* A1/10. Ostatní izoláty neprokazovaly žádnou růstovou schopnost.

#### **5.3.2. Šikmé agary**

Celkem bylo přeočkováno na šikmé agary 12 izolátů nematofágní houby *A. oligospora* ( A1/10, A2/10, A3/10, A4/10, A5/10, A6/10, A7/10, A9/10, A10/10, A11/10 a A12/10) a *S. rugosoannulata*. Takto zakonzervované izoláty nematofágních hub byly uloženy při teplotě 4 °C a připraveny pro následné použití a případné uchování jako sbírkové kultury.

Obrázek. 2: Šikmé agary připraveny k naočkování nematofágních hub



#### **5.4. Morfologická a molekulárně biologická diagnostika izolovaných nematofágních druhů hub**

Bylo vyizolováno a určeno velké množství saprofytických a fytopatogenních hub především z rodu *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Z nematofágních hub, které byly vyizolovány šlo o rod *Arthrobotrys*.

Celkem bylo získáno 12 jednotlivých monosporových izolátů, které byly po určení pomocí světelného mikroskopu a klíče, zaslány k osekvenování. V tabulce č. 2 jsou zaznamenány jednotlivé monosporické izoláty zasláné k osekvenování.

tab. 2: Druhy nematofágních hub získané z půdních vzorků

| vzorek | druh                 | vzorek | druh                 |
|--------|----------------------|--------|----------------------|
| A1     | <i>A. oligospora</i> | A6/10  | <i>A. oligospora</i> |
| A1/10  | <i>A. oligospora</i> | A7/10  | <i>A. oligospora</i> |
| A2/10  | <i>A. oligospora</i> | A8/10  | <i>A. superba</i>    |
| A3/10  | <i>A. oligospora</i> | A10/10 | <i>A. oligospora</i> |
| A4/10  | <i>A. oligospora</i> | A11/10 | <i>A. oligospora</i> |
| A5/10  | <i>A. oligospora</i> | A12/10 | <i>A. oligospora</i> |

## 5.5. Získané druhy nematofágních hub

Během pokusů bylo získáno 11 izolátů nematofágní houby *A. oligospora* a 1 izolát *A. superba* izolovaných z půd na území ČR, které byly uloženy do sbírkových kultur katedry ochrany rostlin na ČZU. Dále byla sbírka rozšířena o izoláty získané ze sbírkových kultur z banky Centraalbureau voor Schimmelcultures se sídlem v Utrechtu v Holandsku (*Arthrobotrys oligospora*, *Dactylaria oviparasitica*, *Dactylaria candida*, *Dactylaria lysiphaga* a *Verticillium chlamydosporium*) a o izolát *Stropharia rugosoannulata* izolovaný z infikované slámy získané z komerčně dostupného zdroje. V tabulce č. 3 jsou uvedeny všechny získané druhy nematofágních hub.

tab. 3: Získané druhy nematofágních hub, uložené do sbírkových kultur katedry ochrany rostlin na ČZU

| označení vzorku | druh                                | získáno  |
|-----------------|-------------------------------------|--|
| A1              | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku č.18                                |
| A1/10           | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku                                     |
| A2/10           | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku č.23                                |
| A3/10           | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku č.35                                |
| A4/10           | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku č.35                                |
| A5/10           | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku č.38                                |
| A6/10           | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku č.40                                |
| A7/10           | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku č.40                                |
| A8/10           | <i>Arthrobotrys superba</i>         | izolováno z půdního vzorku č.40                                |
| A10/10          | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku č.43                                |
| A11/10          | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku č.46                                |
| A12/10          | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | izolováno z půdního vzorku č.50                                |
| SA              | <i>Stropharia rugosoannulata</i>    | infikovaná sláma z komerčně dostupného zdroje                  |
| MP              | <i>Monacrosporium phymatophagum</i> | banka Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holansko) |
| AR              | <i>Arthrobotrys oligospora</i>      | banka Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holansko) |
| DO              | <i>Dactylaria oviparasitica</i>     | banka Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holansko) |
| DL              | <i>Dactylaria lysiphaga</i>         | banka Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holansko) |
| DC              | <i>Dactylaria candida</i>           | banka Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holansko) |
| VCH             | <i>Verticillium chlamydosporium</i> | banka Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht, Holansko) |

## 5.6. Testování nematofágní aktivity získaných hub

### 5.6.1. In vitro testování

#### 5.61.1.. Testování nematofágní aktivity získaných izolátů z půdních vzorků

Jak je znázorněno v grafu 1 byl detekován statisticky významný rozdíl mezi kontrolní variantou a variantami ošetřenými izoláty MHZP8, GR-C a GR-C

U ostatních izolátů nebyla prokázána žádná nebo téměř žádná mortalita. U izolátů MHZP8, GR-C(žf) a GR-C (kž) byla následně provedena izolace, amplifikace DNA a příprava DNA pro odeslání k osekvenování. Druh nematofágní houby se potvrdil pouze u vzorku MHZP8, kde se jednalo o *Arthrobotrys oligospora*. U vzorků GR-C (žf) a GR-C (kž) se v obou případech jednalo o *Penicillium spp.*

graf 1: Mortalita *C. elegans* v závislosti na působení získaných izolátů z půdních vzorků (tab. 3, kapitola Přílohy)



### 5.6.1.2. Testování mortality háďátek s využitím nematofágních hub pomocí sklíčkových kultur

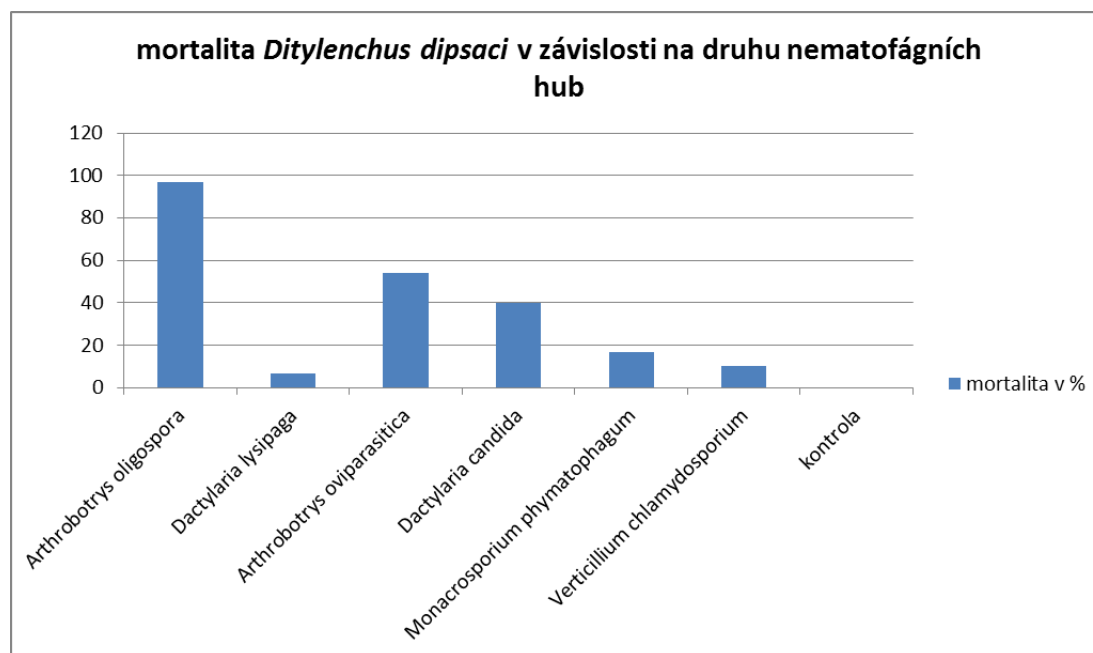
Byla testována mortalita tří druhů háďátek (*Ditylenchus dipsaci*, *Meoidogyne hapla* a *Globodera rostochiensis*). Tyto výsledky byly zveřejněny v práci Zouhar et al. (2010).

#### 5.6.1.2.1. Testování mortality *Ditylenchus dipsaci*

V rámci varianty *Ditylenchus dipsaci* prokázaly největší účinnost nematofágní houby druhu *A. oligospora* (prům. mortalita háďátek 97 %), *D. oviparasitica* (prům. mortalita háďátek 54%) a *A. candida* (prům. mortalita háďátek 40 %).

Údaje, které jsou znázorněny v grafu 2, zaznamenávají statisticky průkazné rozdíly v mortalitě háďátek oproti kontrole.

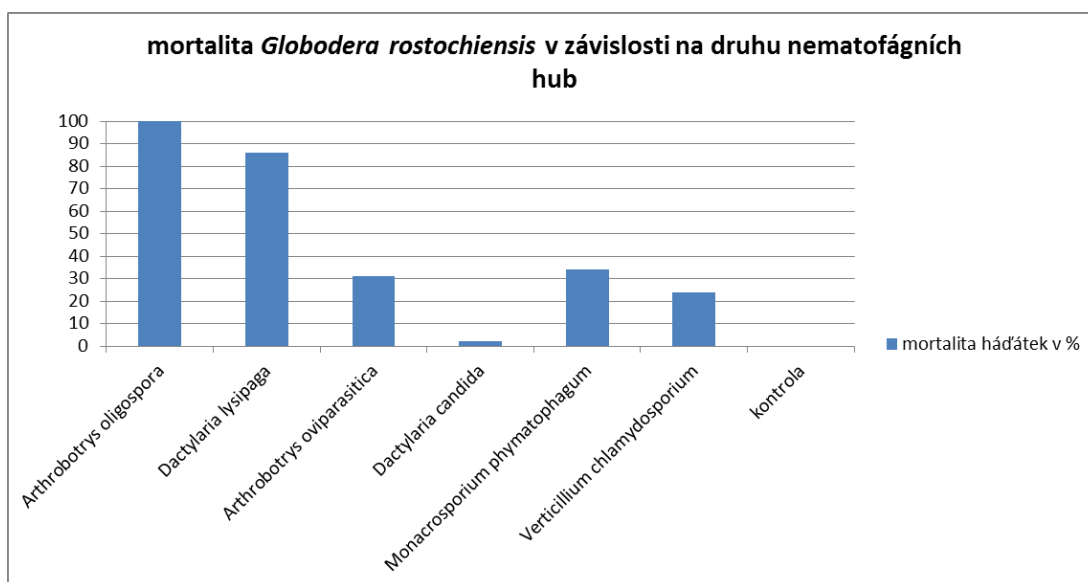
Graf 2: Mortalita *Ditylenchus dipsaci* v závislosti na druhu nematofágní houby (tab. 3 a 4, kapitola Přílohy)



### 5.6.1.2.2. Testování mortality *Globodera rostochiensis*

*Globodera rostochiensis* byla nejvíce potlačena nematofágním druhem *A. oligospora*, kde mortalita háďátek dosahovala 100 %. Vysokou účinnost měla taktéž *D. lysipaga* (mortalita háďátek 86 %) a *D. phymatophaga*, u které byla mortalita háďátek oproti dvěma předešlým druhům nižší a dosahovala 34 %. Údaje o mortalitě jsou zaznamenány v grafu 3.

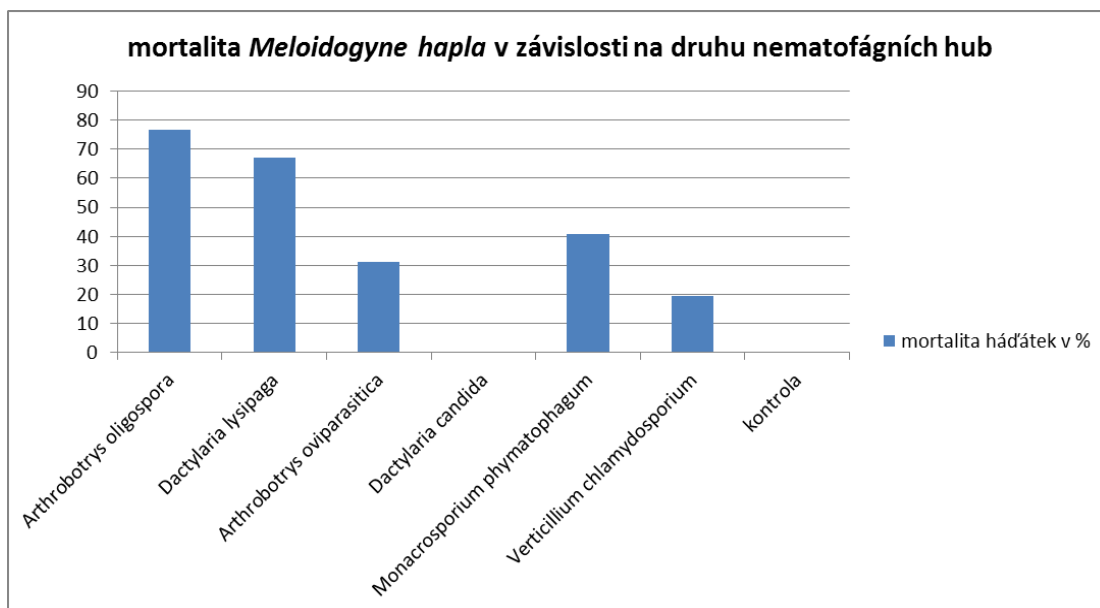
Graf č. 3: Mortalita *Globodera rostochiensis* v závislosti na druhu nematofágní houby (tab. 5 a 6, kapitola Přílohy)



### 5.6.1.2.3. Testování mortality *Meloidogyne hapla*

V případě *Meloidogyne hapla* byly všechny testované druhy nematofágních hub účinné, což je zaznamenáno v grafu 4. Nejúčinnější byla *A. oligospora*, u které byla zaznamenána 80% mortalita háďátek. Téměř totožný výsledek byl i u *D. lysipaga* a to 79 %. *D. phymatophaga* dosahovala 66% mortality háďátek. U ostatních druhů nematofágních hub byla zaznamenána mortalita háďátek nižší než 50 %.

Graf 4: Mortalita *Meloidogyne hapla* v závislosti na druhu nematofágní houby (tab. 7 a 8, kapitola Přílohy)

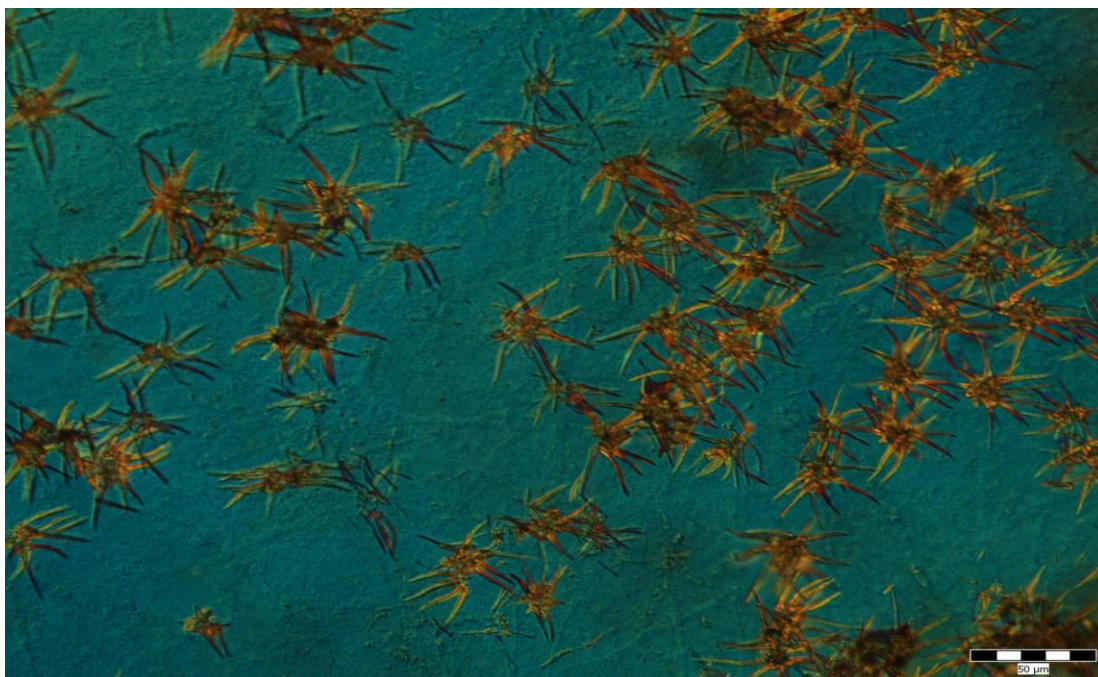


Druh *Arthrobotrys oligospora* byl nejvíce účinný ze všech testovaných nematofágních hub, a to vůči všem druhům hádčátek.

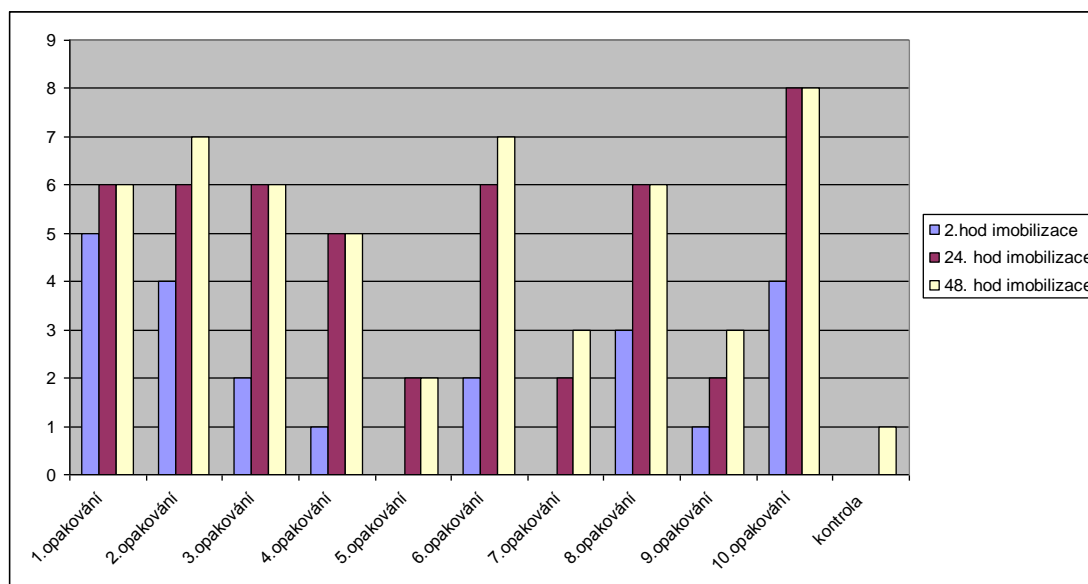
### 5.6.1.3. In vitro testy imobilizace a mortality hádčátek pomocí *Stropharia rugosoannulata* a *Arthrobotrys oligospora*

#### 5.6.1.3.1. Výsledky testování nematofágní aktivity *Stropharia rugosoannulata* na *Bursaphelenchus xylophilus*

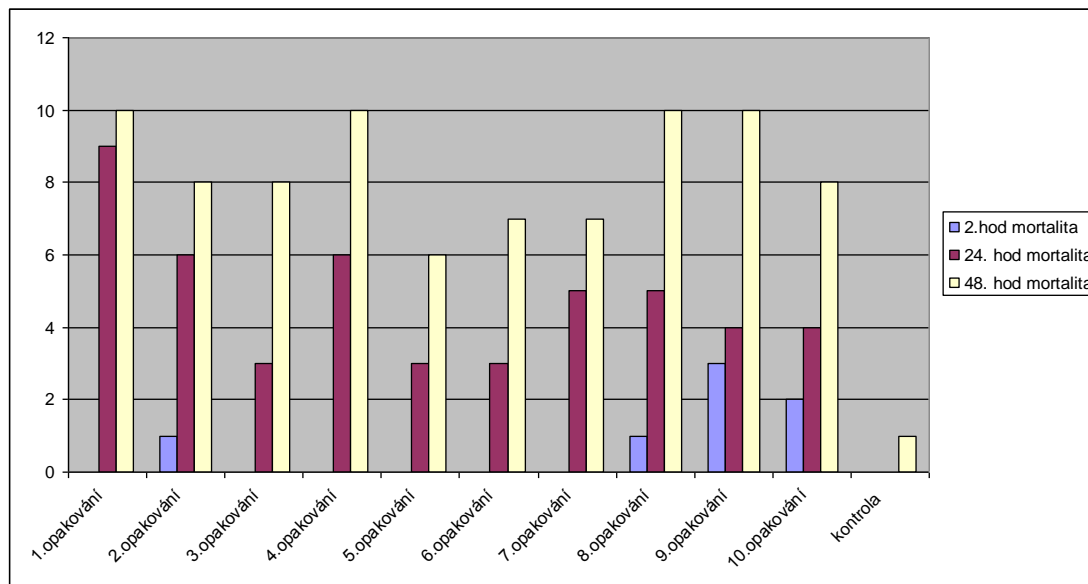
Před samotným testováním nematofágní aktivity byla zjišťována reakce *Stropharia rugosoannulata* na aplikaci homogenátu *B. xylophilus* a následná produkce acanthocytů. Na obr. 1 je zřetelně viditelná masivní tvorba acanthocytů, které se začaly vytvářet již 24 hod po aplikaci homogenátu *Bursaphelenchus xylophilus* na mycelium *Stropharia rugosoannulata*.

Obr. 1: Tvorba acanthocytů po 24 hodinách od aplikace homogenátu *B. xylophilus*

V grafu 5 a 6 (tab. 9, kapitola Přílohy) je zaznamenána imobilizace a mortalita *B. xylophilus* v jednotlivých časových periodách. *B. xylophilus* byl imobilizován již po 2 hod. od aplikace na mycelium, kdy u některých hádčátek došlo i k usmrcení. Vysoká mortalita hádčátek byla zaznamenána po 24 hod a po 48 hod došlo k usmrcení u 84 % všech hádčátek.

Graf 5: Imobilizace *Bursaphelenchus xylophilus* pomocí *Stropharia rugosoannulata*



Graf 6: Mortalita *Bursaphelenchus xylophilus* působením *Stropharia rugosoannulata*

#### 5.6.1.3.2. Výsledky účinnosti nematofágní aktivity *Stropharia rugosoannulata* a *Arthrobotrys oligospora* na fytoparazitická hádčátka *Meloidogyne hapla*

Oba druhy vybraných hub vykazovaly vysokou nematofágní aktivitu vůči fytoparazitickému hádčátku *Meloidogyne hapla* (tab. 10, kapitola Přílohy). Nicméně druh *Stropharia rugosoannulata* byl účinnější již při krátkém časovém intervalu 4 hod.

Druh *Arthrobotrys oligospora* měl po 4 hod nízkou imobilizační účinnost vůči *M. hapla*. Při vyhodnocování po 24 hod došlo k zaznamenání rapidního nárůstu účinnosti u tohoto druhu.

U *Stropharia rugosoannulata* byla po 24 hod zjištěna téměř 100% účinnost na imobilizaci hádčátek.

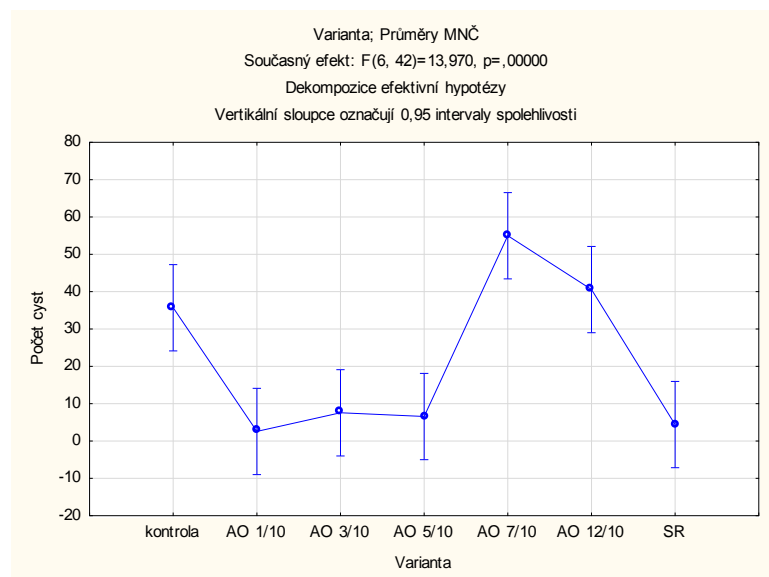
## 5.6.2. In vivo nádobové testy

### 5.6.2.1. *Globodera rostochiensis*

#### 5.6.2.1.1. Výsledky statistického hodnocení účinnosti nematofágních hub na háďátka *Globodera rostochiensis* ve skleníkových řízených podmínkách

Z grafu 7 je jednoznačné, že nejvíce háďátka potlačoval izolát nematofágní houby AO 1/10. Je zde zřejmý statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou a jednotlivými variantami. Izoláty AO 1/10 a SR vykazovaly index Pf/Pi 0,97 a 0,67. U izolátů AO 3/10 a AO 5/10 byl zaznamenán index Pf/Pi mezi 1,3-2,8, tento výsledek se taktéž významně lišil od kontroly. AO 7/10 a AO 12/10 s indexem Pf/Pi od 8,11 do 15,9 byly uznány za nevhodné pro použití k potlačení háďátek *G. rostochiensis*.

graf 7: Nematofágní aktivita jednotlivých izolátů nematofágních hub vůči háďátku *Globodera rostochiensis* ve skleníkových řízených podmínkách (tab. 11, kapitola Přílohy)

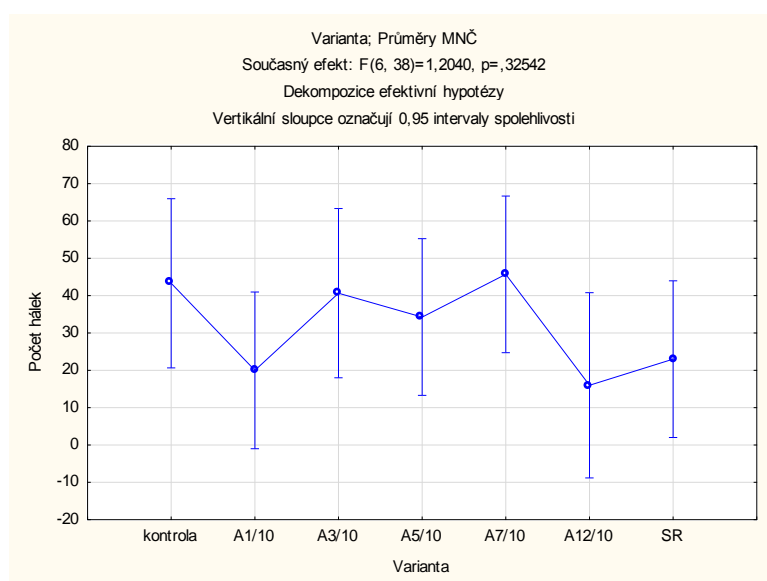


## 5.6.2.2. Meloidogyne hapla

### 5.6.2.2.1. Výsledky statistického hodnocení účinnosti nematofágních hub na háďátka *Meloidogyne hapla* ve skleníkových řízených podmínkách

Při testování nematofágní aktivity na *Meloidogyne hapla* byl detekován statisticky významný rozdíl u izolátu A12/10. Z grafu 8 lze vyčíst, že snížení počtu hálek oproti kontrolní variantě bylo patrné i u izolátů A1/10 a SR.

graf 8: Nematofágní aktivita jednotlivých izolátů nematofágních hub vůči háďátku *Meloidogyne hapla* ve skleníkových řízených podmínkách (tab. 12, kapitola Přílohy)

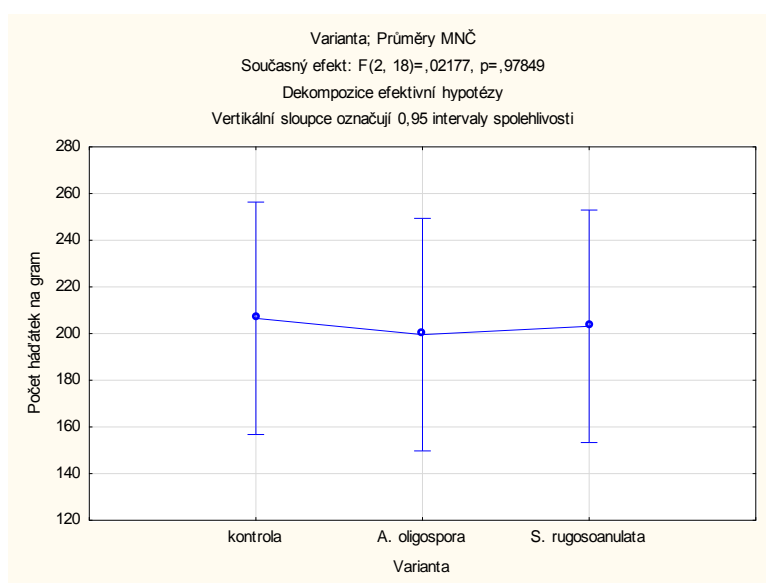


### 5.6.2.3. *Ditylenchus dipsaci*

#### 5.6.2.3.1. Výsledky statistického hodnocení účinnosti nematofágních hub na hád'átka *Ditylenchus dipsaci* ve skleníkových řízených podmínkách

V případě *D. dipsaci* nebyla prokázána žádná nematofágní aktivita u testovaných izolátů (graf 9), nepotvrdily se tak výsledky získané v předchozích in vitro testech.

Graf 9: Grafické znázornění účinnosti nematofágních hub na *D. dipsaci* v řízených podmínkách (tab. 13, kapitola Přílohy)

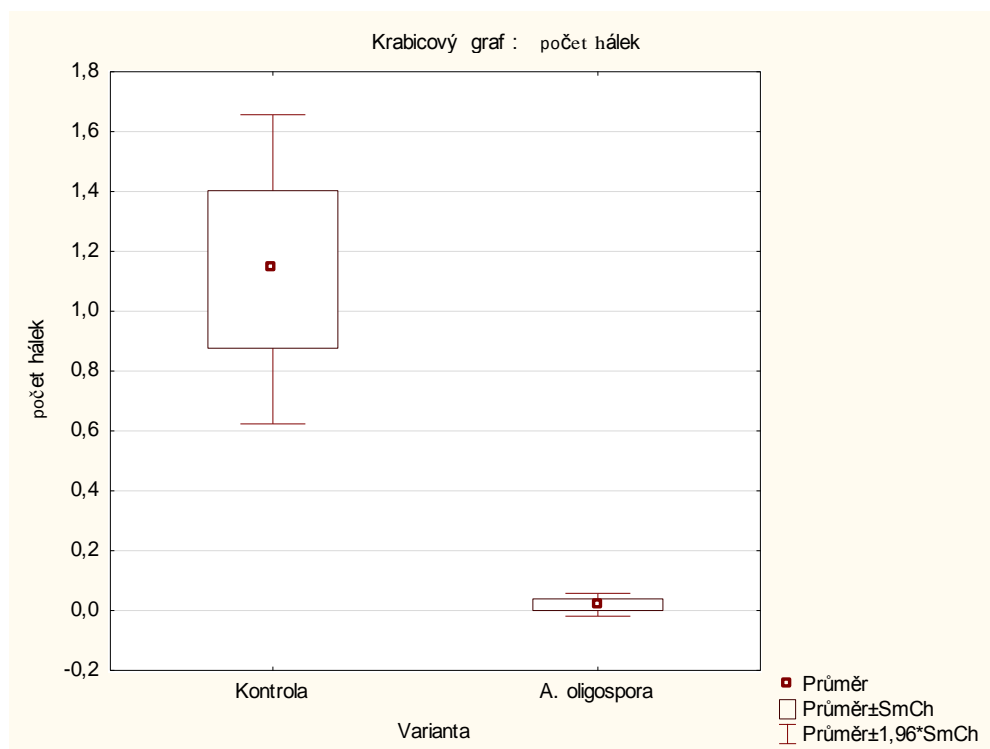


### 5.6.3. In vivo polní testy

Pro testy v polních podmínkách byl vybrán izolát nematofágní houby *Arthrobotrys oligospora* A1/10. Tento izolát vykazoval v přechodných pokusech největší účinnost vůči fytoparazitickým hád'átkům.

V grafu č. 10 je vidět působení vybraného izolátu na snížení počtu hálek *M. hapla* na mrkvi seté. Z grafu je patrné, že při použití izolátu *A. oligospora* A1/10 bylo po vyhodnocení zjištěno snížení výskytu hálek na mrkvi seté oproti kontrole. Účinnost aplikace vybraného izolátu nematofágní houby druhu *Arthrobotrys oligospora* byla v polních podmínkách potvrzena.

Graf 10: Výsledky polního pokusu účinnosti vybraného izolátu *A. oligospora* na snížení počtu hálek *M. hapla* na mrkvi seté

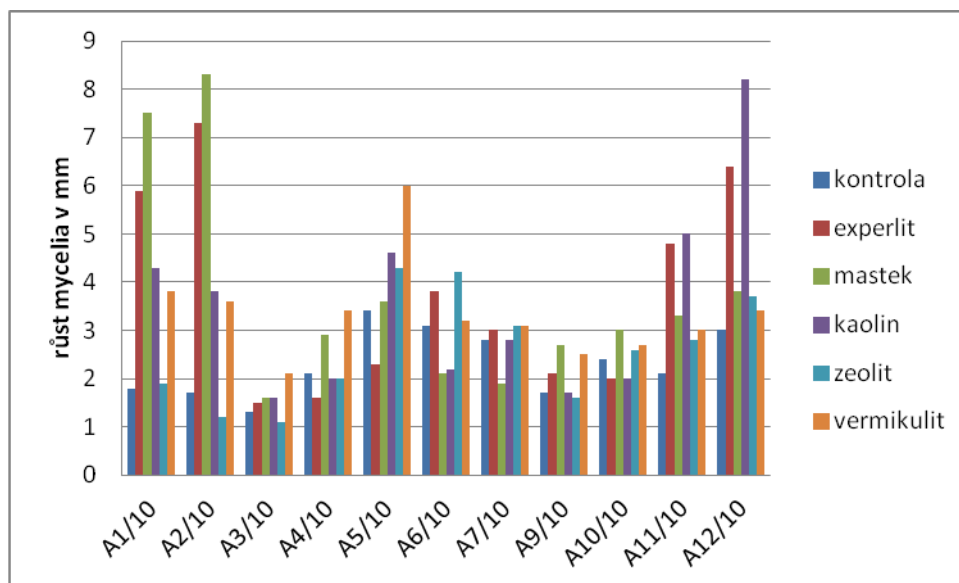


## 5.7. Testování schopnosti růstu a reprodukce nematofágních hub na agarech s různými nutričními příměsmi

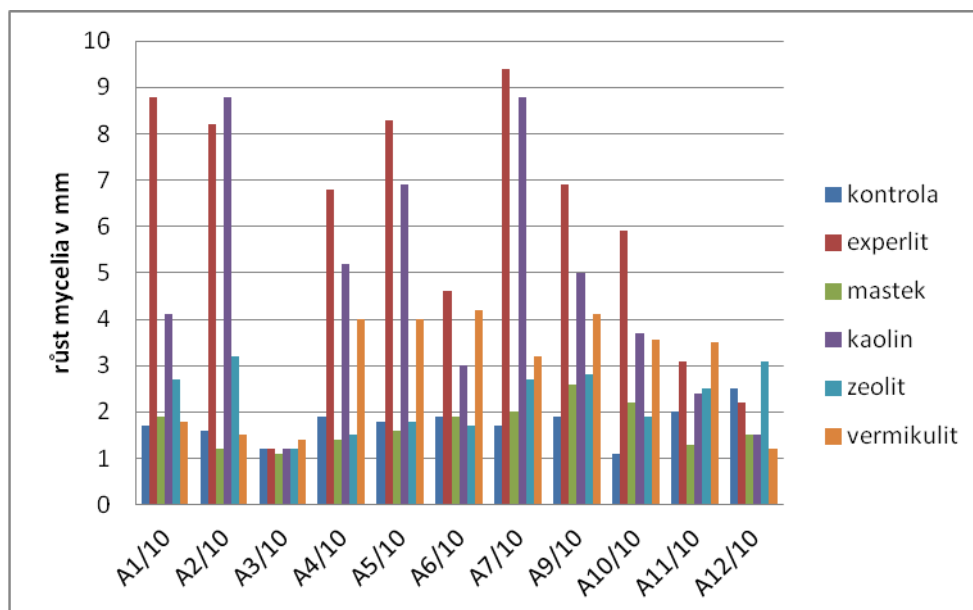
Tabulky výsledků z měření růstové schopnosti izolátů *A. oligospora* na OA a CMA s různými nutričními příměsmi jsou zařazeny do příloh.

Výsledky z prvního dne měření vykazovaly značné rozdíly v růstu mezi jednotlivými izoláty *Arthrobotrys oligospora* v závislosti na druhu agaru a nutriční příměsi. Největší růstovou schopnost prokázal izolát A7/10 na corn meal agaru (CMA) s nutriční příměsí experlitu. Téměř totožnou růstovou schopnost vykazovaly i izoláty A2/10 a A7/10 pěstované na CMA s nutriční příměsí kaolinu. Obecně nejpomalejší růstovou schopnost měl izolát A3/10 jak na CMA, tak na OA, přičemž rozdíly v růstu A3/10 mezi jednotlivými nutričními příměsmi byly minimální.

Graf 11: růst mycelia na OA s jednotlivými příměsmi - 1. den měření (tab. 14 a statisticky vyhodnocený graf 12, kapitola Přílohy)

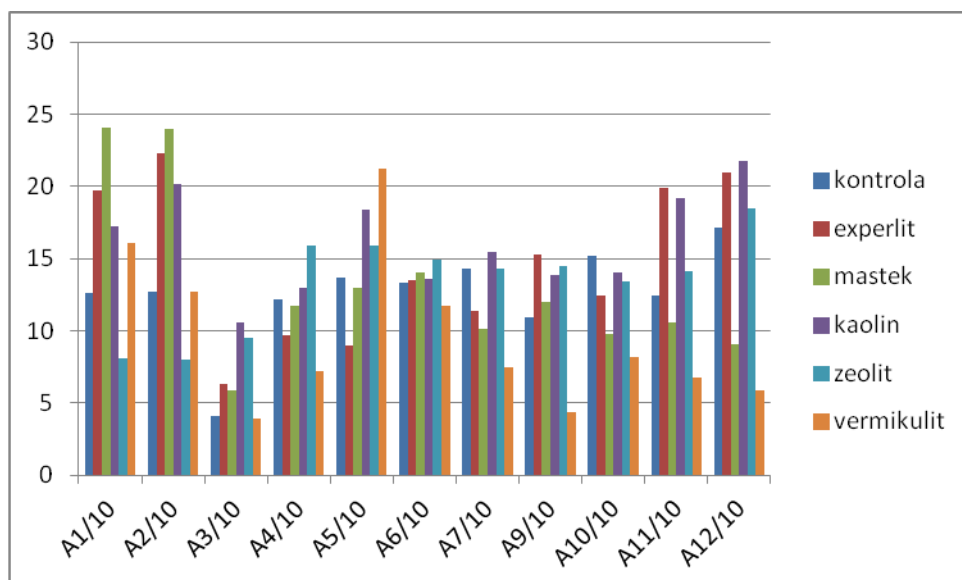


Graf 13: Růst mycelia na CMA s jednotlivými příměsmi - 1. den měření (tab. 15 a statisticky vyhodnocený graf 14, kapitola Přílohy)

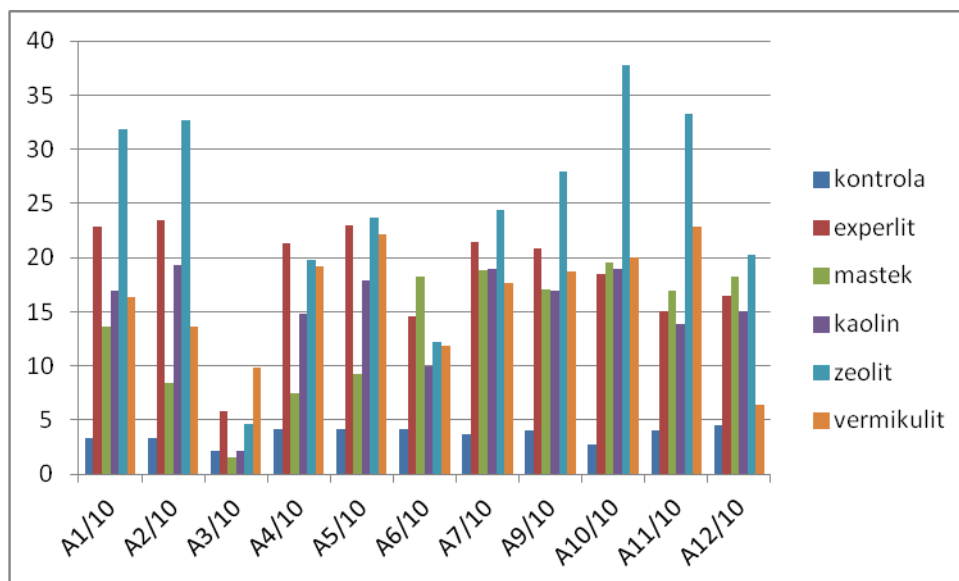


Po 48 hodinách od naočkování prokazovaly největší růst izoláty A1/10 a A2/10 na OA s nutriční příměsí mastku. Stejně izoláty měly podobnou rychlost růstu i na experlitu. Izolát A3/10 byl se svojí růstovou schopností opět vyhodnocen jako nejhorší, za 48 hodin vyrostl jen o 5,1 mm.

Graf 15: růst mycelia na OA s jednotlivými příměsí - 2. den měření (tab. 16 a statisticky vyhodnocený graf 16, kapitola Přílohy)

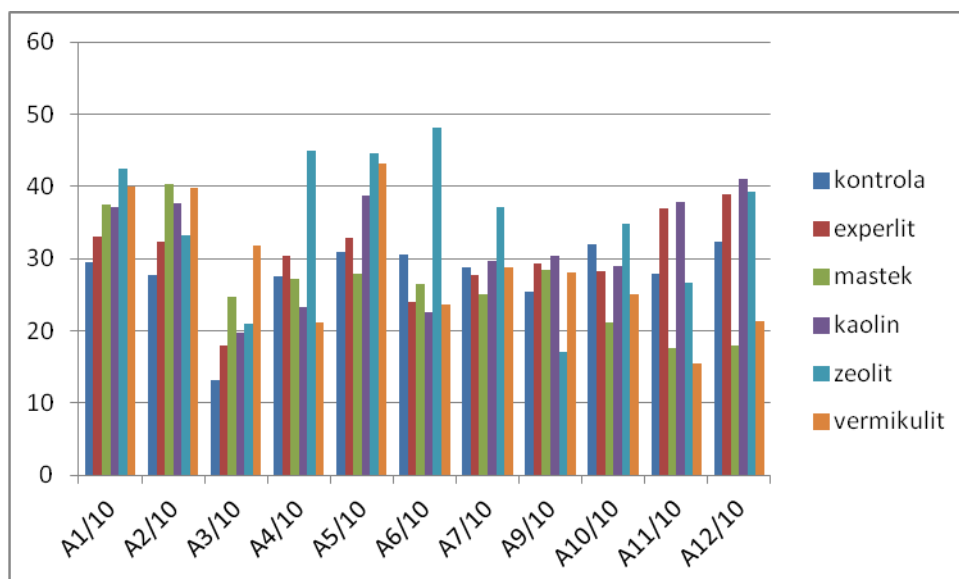


Graf 17 : růst mycelia na CMA s jednotlivými příměsmi - 2. den měření (tab. 17 a statisticky vyhodnocený graf 18, kapitola Přílohy)



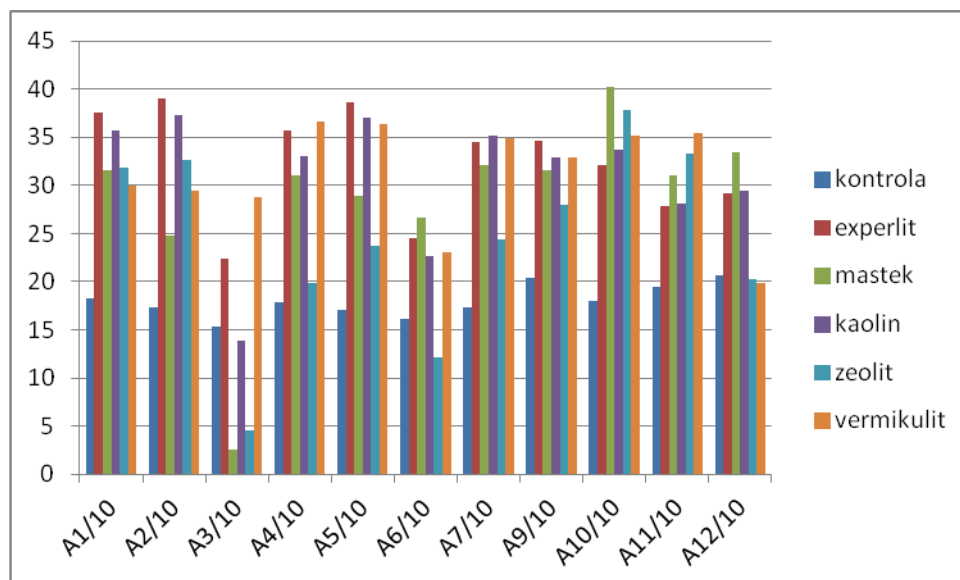
Při hodnocení růstu po 72 hodinách došlo opět k výrazným změnám v rychlosti nárůstu mycelia mezi jednotlivými izoláty nematofágní houby *A. oligospora*. Největší průměr mycelia dosáhly izoláty A6/10, A4/10 a A5/10 všechny pěstovány na OA s nutriční příměsí zeolitu.

Graf 19 : růst mycelia na OA s jednotlivými příměsmi - 3. den měření (tab. 18 a statisticky vyhodnocený graf 20, kapitola Přílohy)



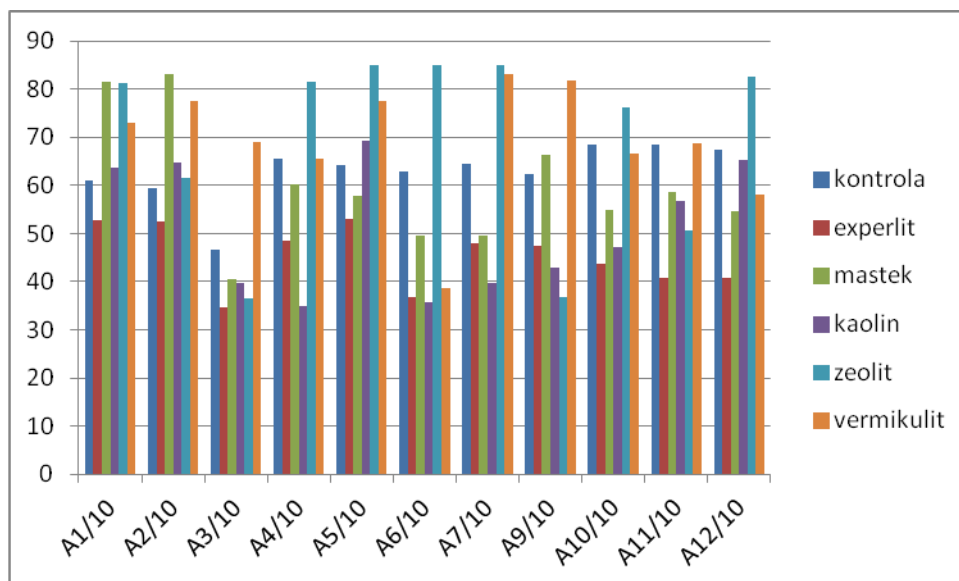


Graf 21 : růst mycelia na CMA s jednotlivými příměsmi - 3. den měření (tab. 19 a statisticky vyhodnocený graf 22, kapitola Přílohy)

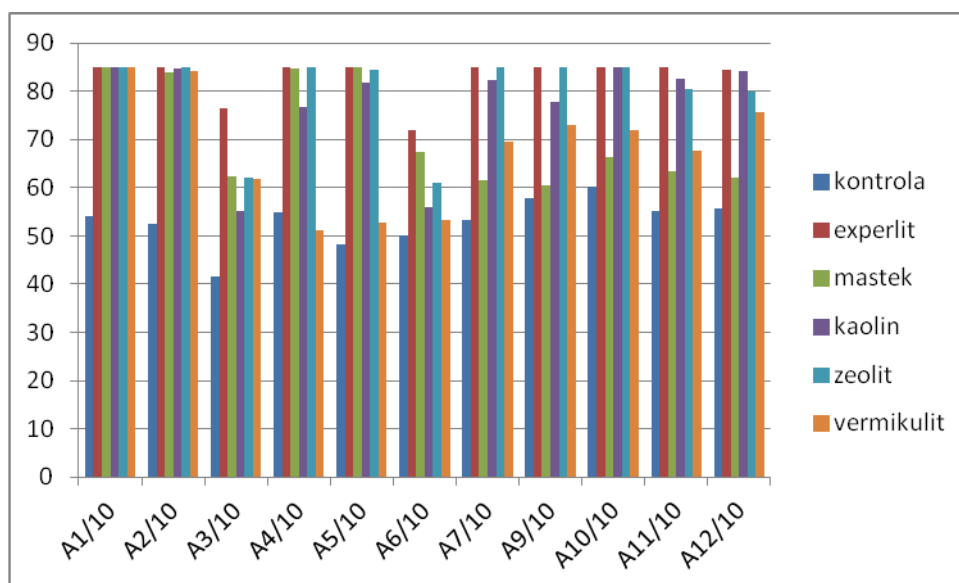


Při měření po 144 hodinách byly u některých izolátů Petriho misky zcela pokryty myceliem, především u izolátů pěstovaných na CMA. Nejvíce izolátů pak dosáhlo růstového maxima u CMA s nutriční příměsí experlitu.

Graf 23 : růst mycelia na OA s jednotlivými příměsmi - 6. den měření (tab. 20 a statisticky vyhodnocený graf 24, kapitola Přílohy)

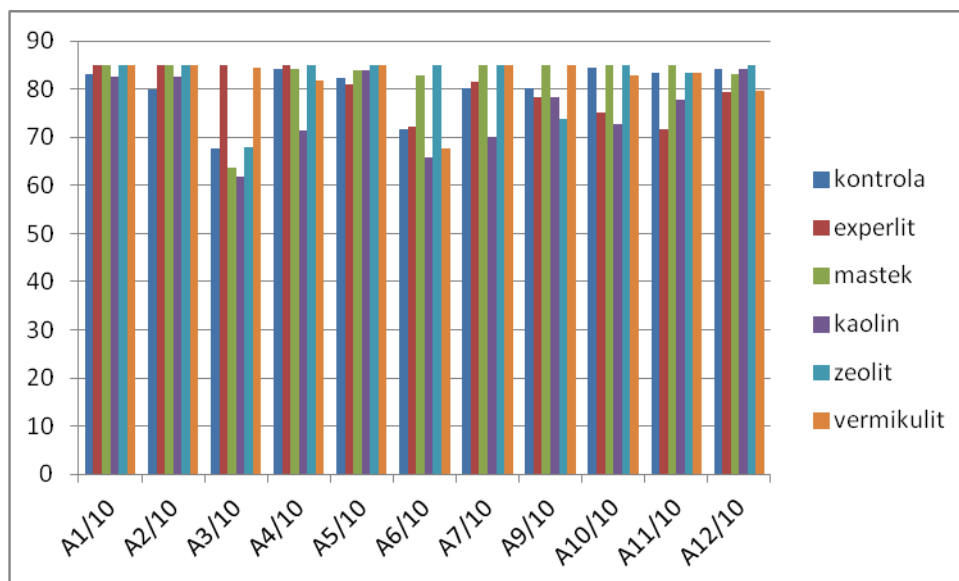


Graf 25: růst mycelia na CMA s jednotlivými příměsmi - 6. den měření (tab. 21 a statisticky vyhodnocený graf 26, kapitola Přílohy)

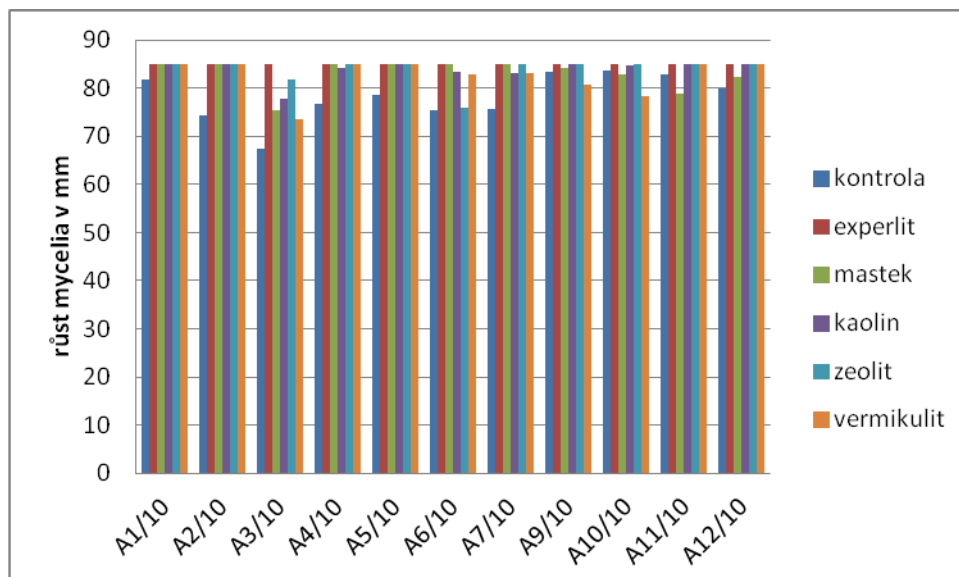


Výsledky po 168 hodinách od naočkování *A. oligospora* byly téměř u všech izolátů stejné, houba dosáhla maximálního růstu mycelia na Petriho misce. Výkyvy v růstu se nacházely u izolátu A3/10, který vykazoval jednoznačně nejhorší schopnosti růstu oproti ostatním izolátům. V porovnání CMA vůči OA byly lepší výsledky zjištěny při pěstování *A. oligospora* na Corn meal agaru.

Graf 27: růst mycelia na OA s jednotlivými příměsmi - 7. den měření (tab. 22 a statisticky vyhodnocený graf 28, kapitola Přílohy)



Graf 29: růst mycelia na CMA s jednotlivými příměsmi - 7. den měření (tab. 23 a statisticky vyhodnocený graf 30, kapitola Přílohy)



Růst všech izolátů na živných médiích, do kterých byla přidána nutriční směs, nebyl oproti kontrole ovlivňován, naopak docházelo k rychlejšímu růstu v prvních dnech hodnocení, než tomu bylo u kontroly.

## 6. Diskuze

Na biologickou ochranu rostlin je v posledních letech pohlíženo jako na nový perspektivní způsob boje proti škodlivým organismům s prakticky nulovou zátěží na životní prostředí. V našich experimentech byla řešena problematika biologické ochrany rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům s využitím nematofágních hub a to s důrazem na původní izoláty z území ČR.

Z výsledků našich pokusů v předchozích letech vyplynulo, že nejefektivnější pro použití v biologické ochraně rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům je nematofágní houba druhu *Arthrobotrys oligospora*, která vykazovala v zahraničí dobré výsledky např. při testování nematofágní aktivity na *Meloidogyne graminicola* v Indii (Sing et al., 2012), a v některých zemích je v současné době již používána v rámci biologické ochrany. Důležitým aspektem pro vhodnost této nematofágní houby, je i schopnost kolonizace rhizosféry polních plodin, aniž by docházelo k snižování jejich výnosů a zhoršení jejich růstu (Niu a Zhang, 2011).

Na základě studií Deckera (1969) a Nordbring-Hertze (2006) byly odebírány vzorky z půdy především na lokalitách dobře zásobených živinami nebo na lokalitách zamořených fytoparazitickými hád'átky. Na těchto lokalitách se předpokládá zvýšený výskyt nematofágních hub, které by mohly být využity pro získání vhodného izolátu využitelného k biologické ochraně proti fytoparazitickým hád'átkům. Dle Persmarka et al. (1996) se nematofágní houba *A. oligospora* vyskytuje nejčastěji v horní vrstvě zeminy cca do 30 cm pod povrchem, proto byly vzorky půdy odebírány jen do maxima této hloubky.

Současně byl prováděn i průzkum oblastí ČR za účelem nalezení hub *Stropharia rugosoannulata* a *Stropharia aeruginosa*, jenž byly shledány jako velmi zajímavý druh v rámci biologické ochrany proti hád'átkům vzhledem k tvorbě acanthocytů na svém myceliu, které slouží k usmrcení hád'átek. Na podzim roku 2012 byla nalezena *S. aeruginosa* v oblasti Sedlčanska, po odebrání vzorků se však nepodařilo namnožit mycelium a provést další pokusy.

Pro izolaci nematofágních hub z půdních vzorků byly optimalizovány izolační metody, které byly uveřejněny ve studiích Warcupa (1950) a Routiena (1957). Nejdříve proběhly pokusy s využitím půdních výluhů aplikovaných na plnohodnotná živná média. Při této metodě nedocházelo ke sporulaci ani k tvorbě lapacích orgánů,

proto se od této metody ustoupilo a byla nahrazena metodou aplikace rozmělněného půdního vzorku na Petriho misky s živným médiem. Při využití plnohodnotného média byl opět problém v absenci tvorby lapacích orgánů, což bylo následně vyřešeno využitím 1,5% vodního agaru a přidáním háďátek, což je zmiňováno v práci Persson a Jansson (1999), kde byla tato metoda úspěšně využita při získávání nematofágních hub z půdních vzorků. Tato metoda byla vyhodnocena jako optimální pro izolaci jednotlivých druhů nematofágních hub. Absence živin v živném médiu u těchto hub evokovala po přidání háďátek růst lapacích orgánů. U hub byla taktéž pozorována masivní tvorba spor. Touto metodou byla taktéž potvrzena studie Zopfa (1888), který se ve své práci zmiňuje o tom, že lapací orgány se začínají tvořit, pokud je houbou zjištěna přítomnost háďátka, a pokud je prostředí, v kterém se nematofágní houba nacházejí, chudé na živiny.

Vzhledem k obtížnosti získávání jednotlivých izolátů nematofágních hub z půdy bylo zapotřebí nalézt také vhodnou formu dlouhodobého uchovávání těchto hub pro další pokusy. Za tímto účelem byly provedeny pokusy s lyofilizací a pěstováním nematofágních hub na šikmých agarech. Větší úspěšnost v dlouhodobém uchovávání mělo pěstování na šikmých agarech, jelikož lyofilizované vzorky měly při pokusech s opětovným namnožením velmi nízkou schopnost růstu a vytvářelo se především sterilní mycelium. V rámci těchto pokusů bylo využito poznatků ze studií Cazin et al. (1989) a Mueller et al. (2004), kde je pro dlouhodobé uchovávání hub upřednostňována metoda pěstování na šikmých agarech. Tato metoda je rychlá, levná, nevyžaduje vysoké nároky na uchovávání a lze jí využít i u hub, u kterých je nevhodná kryokonzervace.

Izolace a následné přenesení spor nematofágních hub sloužilo k namnožení jednotlivých izolátů pro další pokusy. Problematická byla především izolace acanthocytů. Luo et al. (2006) uvádí jednoduchý způsob izolace, kdy je prováděn odběr acanthocytů z mycelia pomocí parafilmu, který je na mycelium přiložen. Acanthocyty se zachytí na parafilm a jsou následně smyty destilovanou vodou do připravené misky. Při našich pokusech bylo dosaženo minimálního odběru acanthocytů touto metodou. Z jednotlivých misek bylo po přikládání parafilmu získáno pouze 5-10 acanthocytů, které byly částečně poškozeny. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k metodě kultivace *S. rugosoannulata* na celofánové membráně (Sigler et al., 2005). Při této metodě došlo k výraznému zlepšení izolace acanthocytů, jak v množství, tak i v kvalitě získaných acanthocytů. S využitím této metody budou v

budoucnu prováděny další pokusy, vzhledem k tomu, že pro přípravu vhodného bioagens bude nezbytně nutné optimalizovat metodu produkce acanthocytů ve velkých objemech a dále pak metodu izolace těchto struktur v množství a kvalitě dovolujících jejich další využití.

Pro pozorování nematofágní aktivity jednotlivých izolátů nematofágních hub byla modifikována metoda testování účinnosti pomocí metody sklíčkových kultur. Po nárůstu nematofágních hub na podložních sklíčkách probíhala aplikace hád'átek a následné pozorování pod binokulárním mikroskopem. Při pozorování byly zajímavé především rozdíly v rychlosti usmrcení hád'átek jednotlivými druhy nematofágních hub. Nejvíce aktivní byla *A. oligospora*, u které se už po pár hodinách začala tvořit lapací oka a již druhý den docházelo k prvnímu zachycení hád'átek.

Testy, při kterých byla zjišťována nematofágní aktivita u makromycéty *S. rugosoannulata* se shodovaly s výsledky pokusů, které byly provedeny Luem et al. v roce 2006. Tato houba prokázala v pokusech vysokou nematofágní aktivitu a rychlou účinnost na znehybnění jednotlivých hád'átek a poté i následné usmrcení. Zajímavostí bylo, že v pokusech s hád'átkou druhu *Meloidogyne hapla* došlo po usmrcení hád'átek k následnému rychlému rozkladu pomocí hyf, které prorostly celým tělem hád'átka. U hád'átek *B. xylophilus* byla těla hád'átek patrná i po pár dnech od usmrcení a došlo spíše k rozkladu jednotlivých těl než ke strávení. Tento poznatek by byl vhodný k podrobnějšímu zkoumání tohoto jevu.

*S. rugosoannulata* se projevila jako vysoce účinná v pokusech s imobilizací a mortalitou hád'átek a v porovnání s *A. oligospora* měla jak vyšší účinnost, tak zde byl i časově kratší interval od počátku imobilizace až do usmrcení hád'átka. Po 24 hodinách byla u *S. rugosoannulata* prokázána téměř 100% účinnost na imobilizaci hád'átek druhu *Meloidogyne hapla*, což je vlastnost, která je pro využití nematofágní houby jako bionematicidu vysoce pozitivní. *A. oligospora* pomalejší účinnost vynahrazuje vyšším spektrem působnosti. V pokusech byla s úspěšností testována na široké škále hád'átek (*Ditylenchus dipsaci*, *Meloidogyne hapla*, *Globodera rostochiensis*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Caenorhabditis elegans*).

In vivo testy byly prováděny jak v rámci nádobových pokusů, tak i jako polní pokusy na jednotlivých parcelkách. Pro tyto pokusy bylo zapotřebí napěstovat velké množství mycelia. Nejlépe se osvědčilo pěstování mycelia v tekutém médiu, u kterého bylo jednodušší následné odstranění média pomocí filtrování přes síto. Po přefiltrování a pročištění destilovanou vodou bylo získáno mycelium, které bylo využitelné pro nádobové pokusy ve skleníku i pro následné parcelkové pokusy. Pro rychlejší nárůst mycelia byly používány velkoobjemové Erlenmayerovy baňky s disruptory, které napomáhaly promíchávání mycelia při třepání na třepačce.

Dalším krokem pro zjištění vhodnosti jednotlivých izolátů nematofágní houby *A. oligospora* jako organismu s „bionematicidním“ účinkem bylo testování schopnosti růstu a reprodukce na agarech s různými nutričními příměsmi. Od těchto pokusů byly očekávány výsledky, které by poukázaly na vhodný výběr nosiče při aplikování nematofágní houby v polních podmínkách. K pokusům bylo vybráno pět různých nutričních příměsí (vermikulit, kaolin, mastek, experlit a zeolit) a 11 různých izolátů nematofágní houby *A. oligospora*.

Všechny výsledky byly následně statisticky vyhodnoceny. Jednotlivé izoláty *A. oligospora* měly v závislosti na čase různou rychlost růstu. Některé izoláty měly největší přírůstky v prvních pár dnech a pak se jejich růst zpomalil, naopak u jiných izolátů byl pozorován pomalejší průběh růstu na začátku a po pár dnech nastoupil rychlý nárůst mycelia. Některé izoláty měly po celou dobu pozorování pravidelný nárůst. Obecně vzato bylo patrné, že většina izolátů nematofágních hub měla vyšší rychlost růstu na agarech s nutričními příměsemi než na samostatných agarech bez použití příměsí, které sloužily jako kontrola. Nejvhodnější kombinací pro kultivaci nematofágní houby *A. oligospora* se při testech jevílo použití směsi zeolitu a Oat meal agaru, na níž houba projevila nejrychlejší schopnost nárůstu mycelia. Küçük (2005) ve svých pokusech s *Trichoderma harrzianum* využil zeolit, který byl stejně jako v našich testech vyhodnocen jako nejvhodnější varianta nosiče. Dále uvádí, že ve formě alginátových pelet s přidáním zeolitu má houba 70% životaschopnost při následném uchovávání při teplotě 4 °C a 30 °C po dobu 6 týdnů.

Další pokusy ukáží, zda je tato kombinace účinná při použití v rámci testování v in vivo podmínkách na zamořeném pozemku. Od toho se později budou odvíjet

postupy k vyvinutí ideální kombinace houby a nosiče, které budou následně využity pro biologickou ochranu proti fytoparazitickým háďátkům.



## 7. Závěr

První část práce byla věnována optimalizaci kultivačních a izolačních metod, které se staly základním pilířem pro práci s jednotlivými druhy nematofágních hub. Během pokusů bylo získáno 11 izolátů nematofágní houby *A. oligospora* a 1 izolát *A. superba* izolovaných z půd na území ČR, které byly uloženy do sbírkových kultur katedry ochrany rostlin na ČZU. Dále byla sbírka rozšířena o izoláty získané ze sbírkových kultur z banky Centraalbureau voor Schimmelcultures se sídlem v Utrechtu v Holandsku (*Arthrobotrys oligospora*, *Dactylaria oviparasitica*, *Dactylaria candida*, *Dactylaria lysiphaga* a *Verticillium chlamydosporium*) a o izolát *Stropharia rugosoannulata* izolovaný z infikované slámy získané z komerčně dostupného zdroje.

Další část disertační práce byla věnována testování v in vitro podmínkách. Výsledky z pokusů s izoláty nematofágních hub, které byly získány ze sbírkových kultur, byly uveřejněny v publikaci Evaluation of the pathogenicity of selected nematophagous fungi vydané v roce 2010 v Czech Mycology. Z výsledků je zřejmé, že nejúčinnějším izolátem je *Arthrobotrys oligospora*, která mě výbornou účinnost na potlačení všech testovaných druhů hádčátek. V závislosti na těchto pokusech mohly být prováděny navazující in vitro testy s izoláty, které byly získány z půdních vzorků odebraných na území ČR. Výsledky těchto testů byly shrnuty v publikacích, které byly vydané v letech 2011-2013. Testované izoláty nematofágních hub *Arthrobotrys oligospora* a *Stropharia rugosoannulata* vykazovaly v in vitro testech pozitivní výsledky v potlačování hádčátek a vzhledem k tomu, že byly izolovány z půdy a infikované slámapocházející z České republiky jsou považovány zakompatibilní s přírodními podmínkami na našem území.

Třetí část práce byla věnována testování v in vivo podmínkách, kdy byly prováděny nádobové a polní pokusy. V rámci nádobových pokusů byla testována efektivita vybraných izolátů *Arthrobotrys oligospora* a *Stropharia rugosoannulata* na mortalitu *Globodera rostochiensis*, *Meloidogyne hapla* a *Ditylenchus dipsaci*. Na základě in vivo nádobových testů byl vybrán izolát nematofágní houby *A. oligospora* A1/10, který vykazoval nejlepší výsledky z hlediska rychlosti růstu, sporulace, vytváření lapacích struktur a efektivity působení na mortalitu hádčátek. Tento izolát

byl poté využit při testování v polních podmínkách, kdy byl zjištěn pokles výskytu hálek na kořenech mrkve po ošetření pokusného pole myceliem tohoto izolátu.

Poslední část práce byla zaměřena na testování schopnosti růstu a reprodukce nematofágních hub na agarech s různými nutričními příměsmi. K pokusům bylo vybráno pět různých nutričních příměsí (vermikulit, kaolin, mastek, experlit a zeolit) a 11 různých izolátů nematofágní houby *A. oligospora*. Nejvhodnější kombinací pro kultivaci nematofágní houby *A. oligospora* bylo použití směsi zeolitu a Oat meal agaru. Toto složení kultivačního media je vhodné pro množení *Arthrobotrys oligospora* za účelem výroby biologického přípravku na bázi nematofágních hub.

Pro další testování nematofágních hub bude využito výsledků především z in vivo pokusů a z testování schopnosti růstu a reprodukce nematofágních hub na agarech s různými nutričními příměsmi. Všechny tyto poznatky budou v budoucnu použity pro dosažení optimálního využití nematofágních hub v biologické ochraně. Tato práce dává ucelený přehled nad problematikou a je základem pro detailnější výzkum v budoucích letech.

## 6. Citace

- Altun Z. F., Hall D. H. (2005): Handbook of *C. elegans* Anatomy. In WormAtlas.  
[online] [citace 2009] Dostupné z:<http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/contents.htm>
- Amiri S., Subbotin S. A., Moens M. (2002): Identification of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by PCR. European J Plant Pathol. 108: 497-506.
- Anonym 1 [online] [cit. 2010-12-15]. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). Dostupné z:  
[https://www.eppo.int/QUARANTINE/nematodes/Bursaphelenchus\\_xylophilus/BURSXY\\_ds.pdf](https://www.eppo.int/QUARANTINE/nematodes/Bursaphelenchus_xylophilus/BURSXY_ds.pdf)
- Artal-Sanz M., de Jong L., Tavernarakis N. (2006): *Caenorhabditis elegans*: A versatile platform for drug discovery. Biotechnol. J. 2006 (1), 1405–1418.
- Bagar M. (2011): Biologická ochrana jádřovin a peckovin v ekologické produkci. In Metodické listy č. 47 [online]. EPOS ČR – Spolek poradců v ekologickém zemědělství ČR. 2011, č. 47. Dostupné z: [http://www.eposcr.eu/wp-content/uploads/2011/04/ML47\\_Jadroviny-a-peckoviny-v-EZ1.pdf](http://www.eposcr.eu/wp-content/uploads/2011/04/ML47_Jadroviny-a-peckoviny-v-EZ1.pdf).
- Barnett H. L., Hunter B. B. (1999): Illustrated genera of imperfecti fungi. The Amer. Phytopathol. Soc. St. Paul, Minnesota (USA) Aps Pres. 451 p.
- Barron G. L. (1977): The nematode-destroying fungi (Topics in Mycobiology, No. 1). 19 (4): 309.
- Bittner V. (2013): Háďátka řepné (*Heterodera schachtii* Schmidt). Listy cukrovarnické a řepářské 129 (7–8), 234-235.
- Blaxter M. (1998): *Caenorhabditis elegans* is a nematod. Science. 282, 2041 – 2046.
- Bordallo J. J., Lopez-Llorca L. V., Jansson H. B., Salinas J., Persmark L., Asensio L. (2002): Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. New Phytologist 154: 491-499.
- Brenner S. (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 77(1):71-94.
- Bridge J. (1996): Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. Annual Review of Phytopath. 34. 201-225.
- Brzeski M. W. (1998): Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe. Muzeum i Institut Zoologii Polska Akademia Nauk Warszawa, 395 p.
- Cazin Jr. J, Wiemer D. F., Hovard J. J. (1989): Isolation, growth characteristics and

- long-term storage of fungi cultivated by Attine ants. *Applied and Environmental Microbiology*. 1346-1350.
- Costa J., Almeida C. E., Dotson E. M., Lins A., Vinhaes M., Silveira A. C., Beard C. B. (2003): The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 443-449.
- Cristobal – Alejo J., Tun- Suarez J. M., Moguel - Catzin S., Marbana – Mendoza N., Medina – Baizabal L. (2006): In vitro sensitivity of *Meloidogyne inkognita* to extracts from native yucatecan plants. *Nematropica* 36: 89-98.
- Dackman C., Nordbring-Hertz B. (1985): Fungal parasites of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* in Southern Sweden. *Journal of Nematology*, 17(1): 50-55.
- de Leij F. A. A. M., Kerry B. R. (1991): The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue Nématol.* 14 (1): 157-164.
- De Leij F. A. A. M., Dennehy J. A., Kerry B. R. (1993): The effect of watering on the distribution of *Verticillium chlamydosporium* in soil and the colonisation of eggs masses of *Meloidogyne incognita* by the fungus. *Nematologica* 39: 250 – 265.
- Decker H. (1969): *Phytonematologie*. VEB Deutcher Landwirtschaftsverlag Berlin, 526 s.
- De Ley P., Blaxter M. L. (2002): Systematic position and phylogeny. In: Lee, D. L. (ed.) *The Biology of Nematodes*. Taylor and Francis, London, 635 p.
- Deppe U., Schierenberg E., Cole T., Krieg Ch., Schmitt D., Yoder B., Ehrenstein G. (1977): Cell lineages of the embryo of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 75 (1): 376-380
- Domsch K. H., Gams W., Anderson T. - H.. (1980): *Compendium of Soil Fungi*. Vols. I, II. Academic Press, London, United Kingdom. 860 p.
- Douda O. (2007): Háďátka zhoubné – významný škůdce. *Profi Press, Úroda* 55, 7: 66-69.
- Douda O., Zouhar M., Mazáková J., Nováková J. (2011): *Arthrobotrys oligospora* jako alternativní bioagens proti *Meloidogyne hapla*. certifikovaná metodika ČZU v Praze. 36 s.
- Drechsler C. (1937): New Zoopagaceae destructive to soil rhizopods. *Mycologia* 29.

229-249.

- Dreistadt S. H., Clark J. K., Flint M. L. (2004): Pests of landscape trees and shrubs: An integrated pest management guide. Oakland: Univ. Calif. Agric. Nat. Res. 3359 p.
- 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.
- Farr D. F. (1980): The acanthocyte, a unique cell type in *Stropharia* (Agaricales). *Mycotaxon* 11: 241-249.
- Fekete C., Tholander M., Rajashekar B. (2008): Paralysis of nematodes: shifts in the transcriptome of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium haptotylum* during infection of *Caenorhabditis elegans*. *Environ Microbiology* 10: 364-375.
- Fortuner R., Maggenti A. R. (1987): A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 4. The family Anguinidae Nicoll, 1935 (1926). *Revue de Nematologie* 10: 183-202.
- Gaar V., Čermák V. (2013): Cystotvorná háďátka přišla z Peru. *Profi Press s.r.o., Úroda* 61, 11: 39-42.
- Gray N. F. (1987): Nematophagous 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 chorob a škůdců polních plodin. Příručka ochrany rostlin v integrované produkci.* Scientia, s.r.o., pedagogické nakladatelství Praha. 335 s.
- Hauser J. (1985): "Nematode-trapping fungi," *Carniverous Plant Newsletter*. 14: 8-11. online. accessed on 4/7/13
- Heintz C. E., Pramer D., (1972): Ultrastructure of nematode-trapping fungi. *J Bacteriol* 110:1163–1170.
- Hsueh Y. P., Mahanti P., Schroeder F. C., Sternberg P. W. (2013): "Nematode-trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones." *Curr Biology*. 2013 Jan 7. 23(1):83-6.
- Hudec K., Gutten J. (2007): *Encyklopedie chorob a škůdců. komplexní ochrana vaší*

- zahrady. Computer press 2007. 359 s.
- Chen Z. X., Dickson D. M. (1998): Review of *Pasteuria penetrans*: biology, ecology, and biological control potential. *Journal Nematology* 30: 313-340.
- Chen Z. X., Chen S. Y., Dickson D. W. (2004): Nematology advances a perspectives. *Nematode Management and Utilization*. CB International. Tsinghua University Press. 608 p.
- Chitwood D.J., (2002): Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology* 40: 221–49.
- Chochola J. (2011): Vliv nematodů *Heterodera Schachtii* Schmidt na výnos cukrové řepy. *LCaŘ* 127, 12, 379 – 383.
- Ingham R. E., Charlton B. A., Nick D., McKinley N. (2004): Effects of Vydate® on control of root-knot nematode and corky ringspot in the Klamath Basin. Klamath Experiment Station. Annual Report. P. 51-63.
- Jablonský I., Šašek V. (2006): Jedlé a léčivé houby Pěstování a využití. Vydavatelství Brázda. 263 s.
- Jansson H. B., Nordbring-Hertz B. (1988): Infection mechanisms in the fungus-nematode system, 59-72.
- Jansson H. B., Lopez-Llorca L. V. (2004): Control of nematodes by fungi. In *Fungal Biotechnology in Agriculture, Food and Environmental Applications*. 205–215.
- Katan J. (1981): Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Annual Review of Phytopathology* 19: 211-236.
- Kazda J., Prokinová E. (2011): Choroby a škodcovia poľných plodín, ovocia a zeleniny. Profi Press Nitra. 183 s.
- Keith D., Yitzhak S. (2011): Biological control of plant-parasitic nematodes: building coherence between microbial ecology and molecular mechanism. *Progress in biological control* 11, Springer Science+Business Media B. V. 2011. 305 p.
- Kerry, B. R. (1975): Fungi and the decrease of cereal cystnematode populations in cereal monoculture. *OEPP Bull.*, 5: 353-361.
- Kerry B. R. (1987): Biological control of nematodes: prospects and opportunities Principles and practice of nematode control in crops. *Biological control* In R. H. Brown a R. B. Kerry, eds. 92. Sydney, Australia, Academic Press. 233-263.

- Kerry B. R. (2001): Exploitation of the nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). CAB International. Fungi as Biocontrol Agents: Progress Problems and Potential. 390 p.
- Kerry B., Esteves I., Atkins S. D., Peteira B., Puertas A., Hidalgo-Diaz L. (2005): *Pochonia chlamydosporia*, a biological control agent for use against root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in intensive vegetable production Journal of Nematology 37 (3), 375-375.
- Knudsen H., Vesterholt J. (2008): Funga Nordica, Agaricoidm boletoid and cypheloid genera Kopenhagen 965 p.
- Kort J., Ross H., Rumpenhurst H. J., Stone A. R. (1977): An international scheme for the identification of pathotypes of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. Nematologica 23: 333-339.
- Küçük, C., Kivanç, M. (2005): Effect of formulation on the viability of biocontrol agent, *Trichoderma harzianum* conidia. African Journal of Biotechnology. 4 (5): 483-486.
- Kůdela V., Braunová M. (2007): Česko-anglická rostlinolékařská terminologie. Nakladatelství Academia. 874 s.
- Landa Z., Šimková J., Bohatá A., Skalický A., Kalista M. (2013): Entomopatogenní houby v kontextu strategie biologické ochrany rostlin – zhodnocení jejich výskytu v konvenčním a ekologickém zemědělství. Profi Press s.r.o., Rostlinolékař 24, 5: 26-31.
- Lopez – Llorca L. V., Robertson W. M. (1992): Immunocytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. Exp Mycology 16: 261-267.
- Luc M., Fortuner R., Maggenti A. R. (1988): A reappraisal of Tylenchina (Nemata). 9. The family *Heteroderidae* Filip ev a Schuurmans Stekhoven 1941. Revue de Nematologie 11: 159-176.
- Luo H., Li X., Li G., Pan Y., Zhang, K. (2006): Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* function as a nematode- attacking device. Appl Environ Microbiol. 72 (4): 2982-2987.
- Maas P. W. T. (1987): Physical methods and quarantine. In: Brown R. H. and Kerry B. R. (eds), principles and Practice of Nematode Control in Crops. Academic Press, Sydney, 13-47.

- Mai W. F. (1977): Worldwide distribution of potato-cyst nematodes and their importance in crop production. *Journal of Nematology* 9. 30-34.
- Mamiya Y., Kiyohara T. (1972): Description of *Bursaphelenchus lignicolus* sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pinewood and histopathology of nematode-infested trees. *Nematologica* 18, 120-124.
- Markaki M., Tavernarakis N. (2010): Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnol. J.* 29;5(12):1261-76.
- Marks R. J., Brodie B. B. (1998): Potato cyst nematodes: biology, distribution, and control. CAB International, Oxon, UK. 408 p.
- Mekete T., Dababat A., Sekora N., Akyazi F., Abebe E. (2012): Identification key for agriculturally important plant-parasitic nematodes Prepared for the International Nematode Diagnosis and Identification Course 2012 - A manual for nematology. Mexico, D.F.: CIMMYT. 39 p.
- Mitkowski N. A. Abawi G. S. (2003): Root-knot nematodes. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2003-0917-01. 5p.
- Moncalvo J-M., Vilgalys R., Redhead S. A., Johnson J. E., James T. Y., Aime M. C., Hoffstetter V., Verduin S. J. W., Larsson E., Baroni T. J., Thorn R. G., Jacobsson S., Clémenton H., Miller Jr. O. K. (2002): One hundred and seventeen clades of euagarics. *Mol Phylogenet Evol* 23:357–400.
- Morgan-Jones G., White J. F., Rodriguez-Kabana R. (1983): Phytonematode pathology: ultrastructural studies. I. Parasitism of Meoidogyne arenaria eggs by Verticillium chlamydosporium. *Nematropica* 13: 245-260.
- Mueller G. M., Foster M. S., Bills G. F. (2004): Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Academic Press. 777 p.
- Müller J. (1999): The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. *Helmintologia* 36: 205-213.
- Nickle W. (1991): Manual of agricultural nematology. 1. Plant nematodes – handbooks, manuals, etc. 2. Nematoda – Handbooks, manuals, etc. MARCEL DEKKER, INC. 1035 p.
- Niere B. I., Speijer P. R., Gold C. S., Sikora R. A. (1998): Fungal endophytes from bananas for the biocontrol of *Radopholus similis*. p.313-318. In: E.A. Frison, C.S. Gold E. B. Karamura and R.A. Sikora (eds.), Mobilizing IPM for Sustainable Banana Production in Africa. Proceedings of a Workshop on Banana IPM Held in Nelspruit, South Africa, 23-28.



- Niu X. M., Zhang K. Q. (2011): *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. *Mycology* 2 (2), 59–78.
- Nordbring-Hertz B., Jansson H. B., Tunlid A. (2006): Nematophagous fungi. In *Encyclopedia of life sciences*. Chichester: John Wiley a Sons, Ltd. 18348 p.
- Nordbring-Hertz B., Jansson H. B., Tunlid A. (1997): Nematodes. In *fungal Biotechnology*. Weinheim: Chapman & Hall. 38-50.
- Norvell L. L., Redhead S. A. (2000): *Stropharia albivelata* and its basionym *Pholiota albivelata*. *Mycotaxon* 76: 315-320.
- Perry R. N., Moens M. (2006): *Plant nematology*. CABI 2006. 447 s.
- Persmark L., Banck A., Jansson H. B. (1996): Population dynamics of nematophagous fungi and nematodes in an arable soil: vertical and seasonal fluctuations. *Soil Biol Biochem.* 28:1005–1014.
- Persson CH., Jansson H. – B. (1999): Rhizosphere colonization and control of *Meloidogyne* spp. by nematode-trapping fungi. *J Nematol.* 31(2): 164–171.
- Pfister D. H. (1997): *Castor, pollux and life histories of fungi*. *SMycologia* 89: 1-23.
- Rawsthorne D., Brodie B. B.(1986): Relationship between root growth of potato root diffusate production and hatching of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Nematology* 18: 379-384.
- Redhead S. A. (1984): Additional Agaricales on wetland Monocotyledoneae in Canada. *Can. J. Bot.* 62: 1844-1851.
- Reed B. M., Richardson P. E., Russell C. C. (1979): Stem nematode infection of resistant and susceptible cultivars of alfalfa. *Phytopathology* 69: 993-996.
- Rod J., Hluchý M., Zavadil K., Prášil J., Somssich I., Zacharda M. (2005): *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy*. Biocont Laboratory, spol s.r.o., Semo s.r.o. 392 s.
- Routien J. B. (1957): Fungi isolated from Soil. *Mycologia* 49 (2): 188-196.
- Rutherford T. A.; Mamiya Y.; Webster J. M. (1990): Nematode-induced pine wilt disease: factors influencing its occurrence and distribution. *Forest Science* 36: 145-155.
- Sayre R. M., Hwang S. (1975): Freezing and Storing *Ditylenchus dipsaci* in Liquid Nitrogen. *J Nematol.* 7(2): 199-202.
- Schacht H. (1859): Über einige Feinde der Rübenfelder. *Zeit. Ver.*

- Rubenzuckerindustrie Zolluer. 9:175-179.
- Schwarz A., Etter J., Künzler R., Potter C., Rauchenstein H. R. (1996): *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny. Ochrana zeleniny v integrované produkci.* Biocont Laboratory, spol. s.r.o., Brno. 320 s.
- Sharma S. B., Nene Y. L. (1990): Effects of soil solarization on nematodes parasitic to Chickpea and Pigeonpea. *Journal of Nematology* 22 (4S): 658-664.
- Sharma S. B. (1998): *The cyst nematodes.* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 452 p.
- Sikora R. A. (1992): Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plantparasitic nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 30: 245-270.
- Siddiqui Z. A., Mahmood I. (2000): Effects of *Bacillus subtilis*, *Glomus mosseae* and ammonium sulphate on the development of *Meloidogyne javanica* and on growth of tomato. *Thai J Agri Sci* 33: 29-35.
- Singh U. B., Sahu A., Singh R. K., Singh D. P., Meena K. K., Srivastava J. S., Manna M. C. (2012): Evaluation of biocontrol potential of *Arthrobotrys oligospora* against *Meloidogyne graminicola* and *Rhizoctonia solani* in Rice (*Oryza sativa* L.). *Biol. Control*, 60(3): 262-270.
- Slaats B. E., Patel A., Vorlop K., Beitzel-Heineke W., Hallmann J. (2006): Wirksamkeit von verkapseltem *Hirsutella rhossiliensis* gegen *Heterodera schachtii* an Zuckerrüben. *BBA, Berlin* 404: 75-87.
- Stein L., Sternberg P., Durbin R., Thierry-Mieg J., Spieth J. (2001): WormBase: network access to the genome and biology of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* 29(1):82-86.
- Steiner G., Buhner E. M. (1934): *Aphelenchoides xylophilus* sp. A nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. *Journal of Agricultural Research* 48: 949-955.
- Stiernagle T. (1999): Maintenance of *C. elegans*. In: Hope I. A. (ed.): *C. elegans, a practical approach.* Oxford University Press, Oxford, UK. 304 p.
- Swanson M. M., Edgley M. L., Riddle D. L. (1984): *Caenorhabditis elegans*. In *Genetic Maps*, S. O'Brien, ed. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory). 244-258.
- Swanson M. M., Edgeley M. L., Riddle D. L. (1984): *Caenorhabditis elegans*. In: *Genetic maps* (O'Brien S, ed): 244-258.

- Šedivý J. (1999): Population changes of the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*) during irregular crop rotation. *Plant Protection Science*, 35: 125-130.
- Táborský V., Šedivý J. (1997): *Rostlinolékařství*. Credit Praha. 1. vydání. 347 s.
- Tanha Maafi Z., Sturhan D., Handoo Z., Mor M., Moens M., Subbotin S. A. (2007): Morphological and molecular studies on *Heterodera sacchari*, *H. goldeni* and *H. leuceilyma* (Nematoda: Heteroderidae). *Nematology* 9: 483-497.
- Thomas W. B. (1996): Methyl bromide: effective pest management tool and environmental thread. *Journal of Nematology* 28: 586–589.
- Tunlid A., Johansson T., Nordbring-Hertz B. (1991): Surface polymers of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *J Gen Microbiol* 137: 1231–1240.
- Yang J., Wang L., Ji X., Feng Y., Li X., et al. (2011): Genomic and proteomic analyses of the Fungus *Arthrobotrys oligospora* Provide Insights into Nematode-Trap Formation. *PLoS Pathog* 7 (9): e1002179. doi: 10.1371/journal.ppat.1002179
- Walker J. T., Tsui R. K. (1968): Induction of ovoviviparity in *Rhabditis* by sulfur dioxide. *Nematologica* 14: 148-149.
- Wang K. H., McSorley R. (2003): Key to commonly occurring nematophagous fungi in Hawai'i and Florida. Department of Entomology and Nematology University of Florida, USA. Available at: <http://agroecology.ifas.ufl.edu/nematophagous%20fungi/Beneficial%20Soil%20fungi.htm>.
- Warcup J. H. (1950): The soil-plate method for isolation of fungi from soil. *Nature* 166. 117 – 118.
- Watling R., Gregory N. M. (1987): *British Fungus Flora 5. Strophariaceae & Coprinaceae*. p. p.: *Hypholoma, Melanotus, Psilocybe, Stropharia, Lacymaria, & Panaeolus*. Edinburgh: Royal Botanic Garden, 120 pp.
- Willcox J., Tribe H. T. (1974): Fungal parasitism of cysts of *Heterodera*. 1 Preliminary investigations. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, 62 : 585-594.
- Wingfield M. J. (1983) Transmission of pine wood nematode to cut timber and girdled trees. *Plant Disease* 67, 35-37.
- Zouhar M., Douda O., Mazáková J., Nováková J., Urban J. (2010): Predikce nematofágní aktivity půdních hub. certifikovaná metodika, ČZU v Praze. 32

s.

Zouhar M., Douda O., Nováková J., Procházka J., Nováková E., Mazáková J., Ryšánek P., Pavela R. (2012): Biologická ochrana mrkve proti háďátku *Meloidogyne hapla*. Profi Press s.r.o., Úroda 60, 9: 60-62.

Zouhar M., Douda O., Novotný D., Nováková J., Mazáková J. (2010): Evaluation of the pathogenicity of selected nematophagous fungi – Czech Mycol. 61(2): 139–147.

Zopf F. W.(1888): Zur Kenntnis der Infektions- Krankheiten niederer Thiere und Pflanzen. Nova Acta Leopold Carol, 52: 314-376.

## Přílohy

### ***Seznam obrázků, tabulek a grafů v příloze***

- Obr. 3.** Izolace nematofágních druhů hub z půdních vzorků (Petriho misky s CMA)
- Obr. 4.** Izoláty *A. oligospora* s jednotlivými příměsmi připravené k měření
- Obr. 5.** Háďátko *Ditylenchus dipsaci* chycené do oka 3-D sítě vytvořené nematofágní houbou *Arthrobotrys oligospora*
- Obr. 6.** Háďátko *Caenorhabditis elegans* nabodnuté na acanthocyty houby *Stropharia rugosoannulata*
- Obr. 7.** Acanthocyty tvořené nematofágní makromycetou *Stropharia rugosoannulata*
- Obr. 8.** Nahřívání rose bengal agaru pro aplikaci na podložní skličko při přípravě skličkových preparátů
- Obr. 9** *Stropharia aeruginosa* nalezena na lokalitě Počepice v okrese Příbram
- Obr. 10** Vzorky *Stropharia aeruginosa* sesbírané z lokality v Počepicích
- Tab. 1** GPS souřadnice lokalit, z kterých byly sebrány půdní vzorky pro izolaci nematofágních druhů hub
- Tab. 4** Mortalita *C. elegans* v závislosti na působení nematofágních hub
- Tab. 5** Jednorozměrný test mortality *Ditylenchus dipsaci* v závislosti na druhu nematofágní houby
- Tab. 6** Mortalita *Ditylenchus dipsaci* v závislosti na druhu nematofágní houby - vyhodnocení analýzy rozptylu metodou Tukeyův HSD test
- Tab. 7** Jednorozměrný test mortality *Globodera rostochiensis* v závislosti na druhu nematofágní houby
- Tab. 8** Mortalita *Globodera rostochiensis* v závislosti na druhu nematofágní houby - vyhodnocení analýzy rozptylu metodou Tukeyův HSD test
- Tab. 9** Jednorozměrný test mortality *Meloidogyne hapla* v závislosti na druhu nematofágní houby
- Tab. 10** Mortalita *Meloidogyne hapla* v závislosti na druhu nematofágní houby - vyhodnocení analýzy rozptylu metodou Tukeyův HSD test
- Tab. 11** Mortalita a imobilizace *Bursaphelenchus xylophilus* pomocí *Stropharia rugosoannulata*
- Tab. 13** Účinnost jednotlivých izolátů nematofágních hub na *G. rostochiensis*

v řízených podmínkách

**Tab. 14** Vyhodnocení účinnosti jednotlivých izolátů nematofágních hub na *M. hapla* v řízených podmínkách

**Tab. 15** Vyhodnocení účinnosti jednotlivých izolátů nematofágních hub na *D. dipsaci* v řízených podmínkách

**Tab. 16** Vyhodnocení 1. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na OA s jednotlivými příměsmi

**Tab. 17** Vyhodnocení 1. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na CMA s jednotlivými příměsmi

**Tab. 18** Vyhodnocení 2. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na OA s jednotlivými příměsmi

**Tab. 19** Vyhodnocení 2. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na CMA s jednotlivými příměsmi

**Tab. 20** Vyhodnocení 3. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na OA s jednotlivými příměsmi

**Tab. 21** Vyhodnocení 3. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na CMA s jednotlivými příměsmi

**Tab. 22** Vyhodnocení 6. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na OA s jednotlivými příměsmi

**Tab. 23** Vyhodnocení 6. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na CMA s jednotlivými příměsmi

**Tab. 24** Vyhodnocení 7. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na OA s jednotlivými příměsmi

**Tab. 25** Vyhodnocení 7. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na CMA s jednotlivými příměsmi

**Graf 12** Testované izoláty *A. oligospora* na OA mediu s příměsmi a doba hodnocení 1. den

**Graf 14** Testované izoláty *A. oligospora* na CMA mediu s příměsmi a doba hodnocení 1. den

**Graf 16** Testované izoláty *A. oligospora* na OA mediu s příměsmi a doba hodnocení 2. den

**Graf 18** Testované izoláty *A. oligospora* na CMA mediu s příměsmi a doba hodnocení 2. den

**Graf 20** Testované izoláty *A. oligospora* na OA mediu s příměsmi a doba hodnocení

3. den

**Graf 22** Testované izoláty *A. oligospora* na CMA mediu s příměsmi a doba hodnocení 3. den

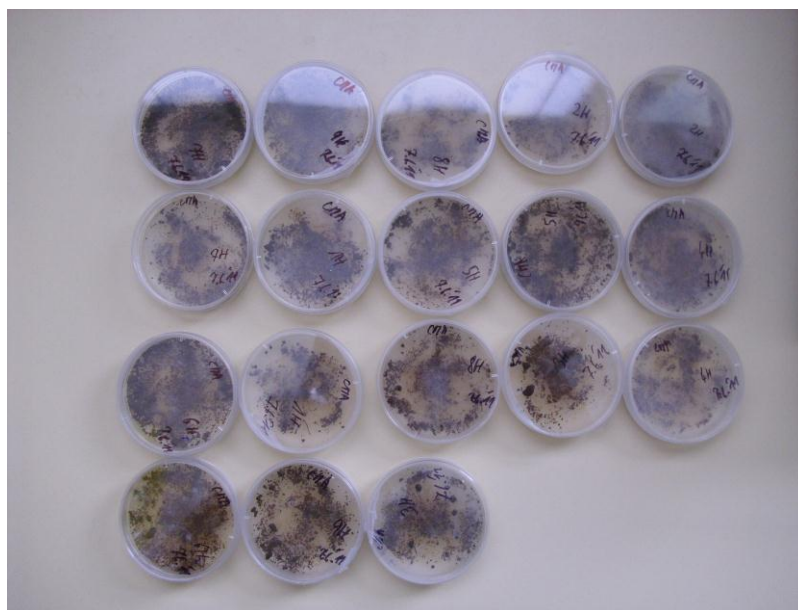
**Graf 24** Testované izoláty *A. oligospora* na OA mediu s příměsmi a doba hodnocení 6. den

**Graf 26** Testované izoláty *A. oligospora* na CMA mediu s příměsmi a doba hodnocení 6. den

**Graf 28** Testované izoláty *A. oligospora* na OA mediu s příměsmi a doba hodnocení 7. den

**Graf 30** Testované izoláty *A. oligospora* na CMA mediu s příměsmi a doba hodnocení 7. den

Obr. 3. Izolace nematofágních druhů hub z půdních vzorků (Petriho misky s CMA)



Obr. 4. Izoláty *A. oligospora* s jednotlivými příměsmi připravené k měření

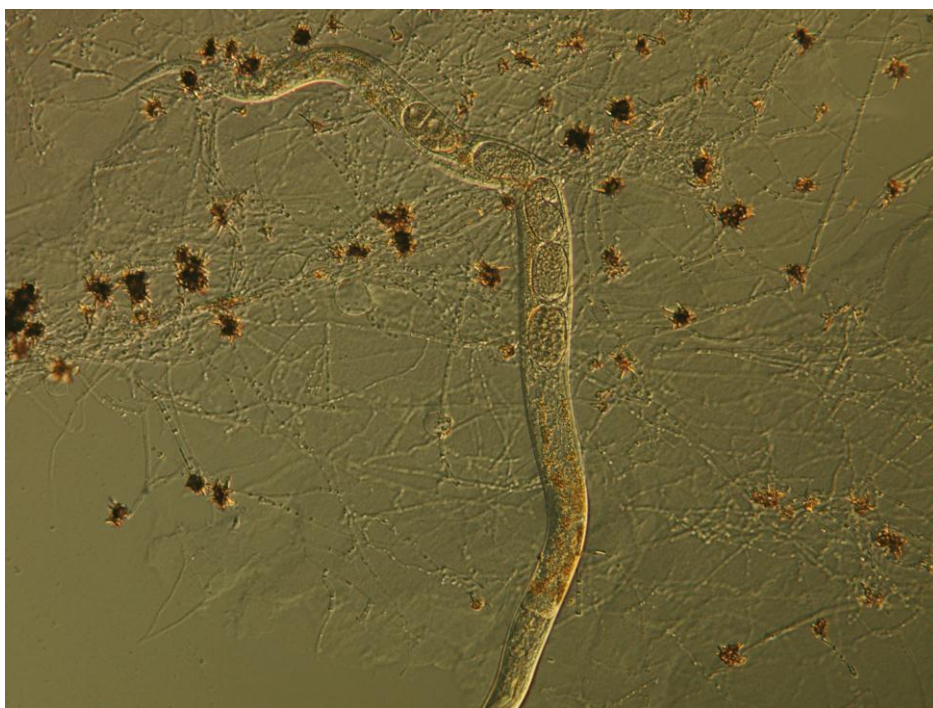




Obrázek 5: Háďátko *Ditylenchus dipsaci* chycené do oka 3-D sítě vytvořené nematofágní houbou *Arthrobotrys oligospora*



Obrázek 6: Háďátko *Caenorhabditis elegans* nabodnuté na acanthocyty houby *Stropharia rugosoannulata*



Obrázek 7: Acanthocyty tvořené nematofágní makromycetou *Stropharia rugosoannulata*



Obrázek 8: Nahřívání rose bengal agaru pro aplikaci na podložní sklíčko při přípravě sklíčkových preparátů



Obrázek 9: *Stropharia aeruginosa* nalezena na lokalitě Počepice v okrese Příbram



Obrázek 10: Vzorčky *Stropharia aeruginosa* sesbírané z lokality v Počepicích



**Tabulka 1:** GPS souřadnice lokalit, z kterých byly sebrány půdní vzorky pro izolaci nematofágních druhů hub

| vzorek č. | GPS souřadnice lokality | vzorek č. | GPS souřadnice lokality   |
|-----------|-------------------------|-----------|---------------------------|
| 1         | N50 00.843 E16 38.592   | 44        | N49 41.354 E14 38.161     |
| 2         | N50 03.093 E16 32.569   | 45        | N49 41.293 E14 38.173     |
| 3         | N50 06.852 E16 14.741   | 46        | N49 39.689 E14 34.556     |
| 4         | N50 25.371 E15 01.191   | 47        | N49 35.647 E14 22.476     |
| 5         | N50 27.833 E15 10.940   | 48        | N49 35.553 E14 22.579     |
| 6         | N50 25.867 E15 26.602   | 49        | N49 35.587 E14 25.649     |
| 7         | N50 22.332 E15 33.937   | 50        | N49 32.509 E15 22.355     |
| 8         | N50 23.393 E15 34.635   | 51        | N49 15.447 E17 41.652     |
| 9         | N50 23.472 E15 34.469   | 52        | N49 16.455 E17 42.345     |
| 10        | N50 23.077 E15 34.727   | 53        | N49 20.485 E17 46.035     |
| 11        | N50 22.212 E15 35.727   | 54        | N49 34.067 E17 34.022     |
| 12        | N50 21.005 E15 37.830   | 55        | N49 34.788 E14 30.989     |
| 13        | N50 20.417 E15 38.433   | 56        | N49 26.699 E14 20.442     |
| 14        | N50 19.572 E15 38.630   | 57        | N49 26.840 E14 17.949     |
| 15        | N50 19.560 E15 38.629   | 58        | N49 28.284 E14 23.642     |
| 16        | N50 19.571 E15 38.651   | 59        | N49 24.414 E14 12.582     |
| 17        | N50 19.216 E15 38.812   | 60        | N49 25.247 E14 1.911      |
| 18        | N50 19.227 E15 38.824   | 61        | N49 28.669 E13 48.083     |
| 19        | N50 15.614 E15 48.378   | 62        | N49 32.086 E13 48.876     |
| 20        | N50 16.370 E15 48.770   | 63        | N49 32.668 E13 43.149     |
| 21        | N50 20.077 E15 56.222   | 64        | N49 43.378 E14 0.829      |
| 22        | N50 16.802 E15 58.325   | 65        | N49 43.378 E14 0.829      |
| 23        | N50 15.592 E15 58.074   | 66        | N49 47.468 E14 8.246      |
| 24        | N50 15.598 E15 58.085   | 67        | N49 47.5652 E14 8.8959    |
| 25        | N50 15.606 E15 58.030   | 68        | N49 47.75808 E14 9.31884  |
| 26        | N50 15.597 E15 58.033   | 69        | N49 48.0177 E14 7.97988   |
| 27        | N50 10.052 E16 02.723   | 70        | N49 48.15864 E14 7.11348  |
| 28        | N50 07.173 E16 13.591   | 71        | N49 49.06836 E14 12.17628 |
| 29        | N50 06.331 E16 17.623   | 72        | N49 50.52306 E14 16.95222 |
| 30        | N50 06.341 E16 17.596   | 73        | N49 49.75248 E14 8.34174  |
| 31        | N49 53.078 E16 28.051   | 74        | N49 49.75248 E14 8.34174  |
| 32        | N49 51.735 E16 29.494   | 75        | N50 7.9209 E14 22.23156   |
| 33        | N49 47.445 E16 29.806   | 76        | N50 7.87842 E14 22.16298  |
| 34        | N49 42.803 E17 03.490   | 77        | N50 7.44456 E14 21.4773   |
| 35        | N49 42.801 E17 03.500   | 78        | N50 7.45242 E14 21.79206  |
| 36        | N49 45.113 E16 54.590   | 79        | N50 6.24762 E14 19.41924  |
| 37        | N49 44.708 E16 51.660   | 80        | N49 15.42336 E14 27.09762 |
| 38        | N49 44.702 E16 51.646   | 81        | N50 0.2529 E12 54.81252   |
| 39        | N49 44.700 E16 51.670   | 82        | N49 56.013 E15 54.10938   |
| 40        | N49 42.448 E16 44.893   | 83        | N49 19.292 E15 28.401     |
| 41        | N49 48.805 E14 30.766   | 84        | N49 50.49186 E14 19.18746 |
| 42        | N49 44.649 E14 40.566   | 85        | N49 58.55766 E13 15.90624 |
| 43        | N49 44.273 E14 40.675   | 86        | N49 53.89074 E12 46.90236 |

Tabulka 4: Mortalita *C. elegans* v závislosti na působení nematofágních hub

| Tukeyův HSD test; proměnná Mortalita (Tabulka1)<br>Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy<br>Chyba: meziskup. PČ = ,00246, sv = 40,000 |                                   |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |          |
|---|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Č. buňky  | Varianta                          | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      | {7}      | {8}      | {9}      | {10}     | {11}     | {12}     | {13}     | {14}     |
|   |                                   | ,04940   | 0,0000   | 0,0000   | ,02701   | 0,0000   | ,07486   | ,01582   | 1,5438   | ,01118   | ,26810   | ,42422   | 0,0000   | 0,0000   | 0,0000   |
| 1   | MHzP1                             |          | 0,975313 | 0,975313 | 0,999993 | 0,975313 | 0,999986 | 0,999329 | 0,000145 | 0,997508 | 0,000206 | 0,000145 | 0,975313 | 0,975313 | 0,975313 |
| 2   | MHzP2                             | 0,975313 |          | 1,000000 | 0,999936 | 1,000000 | 0,772270 | 1,000000 | 0,000145 | 1,000000 | 0,000146 | 0,000145 | 1,000000 | 1,000000 | 1,000000 |
| 3   | MHzP3                             | 0,975313 | 1,000000 |          | 0,999936 | 1,000000 | 0,772270 | 1,000000 | 0,000145 | 1,000000 | 0,000146 | 0,000145 | 1,000000 | 1,000000 | 1,000000 |
| 4   | MHzP4                             | 0,999993 | 0,999936 | 0,999936 |          | 0,999936 | 0,990103 | 1,000000 | 0,000145 | 1,000000 | 0,000152 | 0,000145 | 0,999936 | 0,999936 | 0,999936 |
| 5   | MHzP5                             | 0,975313 | 1,000000 | 1,000000 | 0,999936 |          | 0,772270 | 1,000000 | 0,000145 | 1,000000 | 0,000146 | 0,000145 | 1,000000 | 1,000000 | 1,000000 |
| 6   | MHzP6                             | 0,999986 | 0,772270 | 0,772270 | 0,990103 | 0,772270 |          | 0,946736 | 0,000145 | 0,910549 | 0,001833 | 0,000145 | 0,772270 | 0,772270 | 0,772270 |
| 7   | MHzP7                             | 0,999329 | 1,000000 | 1,000000 | 1,000000 | 1,000000 | 0,946736 |          | 0,000145 | 1,000000 | 0,000147 | 0,000145 | 1,000000 | 1,000000 | 1,000000 |
| 8   | MHzP8                             | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 |          | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 |
| 9   | MHzP9                             | 0,997508 | 1,000000 | 1,000000 | 1,000000 | 1,000000 | 0,910549 | 1,000000 | 0,000145 |          | 0,000147 | 0,000145 | 1,000000 | 1,000000 | 1,000000 |
| 10  | GR - C (žlutofialové mycelium)    | 0,000206 | 0,000146 | 0,000146 | 0,000152 | 0,000146 | 0,001833 | 0,000147 | 0,000145 | 0,000147 |          | 0,011608 | 0,000146 | 0,000146 | 0,000146 |
| 11  | GR - C (mycelium kanárkově žluté) | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 | 0,011608 |          | 0,000145 | 0,000145 | 0,000145 |
| 12  | GR - C (černé)                    | 0,975313 | 1,000000 | 1,000000 | 0,999936 | 1,000000 | 0,772270 | 1,000000 | 0,000145 | 1,000000 | 0,000146 | 0,000145 |          | 1,000000 | 1,000000 |
| 13  | GR - C (nevýrazné, bílé mycelium) | 0,975313 | 1,000000 | 1,000000 | 0,999936 | 1,000000 | 0,772270 | 1,000000 | 0,000145 | 1,000000 | 0,000146 | 0,000145 | 1,000000 |          | 1,000000 |
| 14  | Kontrola                          | 0,975313 | 1,000000 | 1,000000 | 0,999936 | 1,000000 | 0,772270 | 1,000000 | 0,000145 | 1,000000 | 0,000146 | 0,000145 | 1,000000 | 1,000000 |          |

Tabulka 5: Jednorozměrný test mortality *Ditylenchus dipsaci* v závislosti na druhu nematofágní houby

| Jednorozměrné testy významnosti pro Mortalita (Data <i>Ditylenchus</i> )<br>Sigma-omezená parametrizace<br>Dekompozice efektivní hypotézy |         |                 |         |         |      |
|---|---------|-----------------|---------|---------|------|
| Efekt   | SČ      | Stupně volnosti | PČ      | F       | p    |
| Abs. člen   | 15,0737 | 1               | 15,0737 | 205,197 | 0,00 |
| Houba   | 18,7468 | 6               | 3,1244  | 42,533  | 0,00 |
| Chyba   | 4,6279  | 63              | 0,0734  |         |      |

Tabulka 6: Mortalita *Ditylenchus dipsaci* v závislosti na druhu nematofágní houby - vyhodnocení analýzy rozptylu metodou Tukeyův HSD test

| Tukeyův HSD test; proměnná Mortalita (Data <i>Ditylenchus</i> )<br>Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy<br>Chyba: meziskup. PČ = ,07346, sv = 63,000 |                             |         |         |         |         |         |         |         |
|---|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Č. buňky  | Houba                       | {1}     | {2}     | {3}     | {4}     | {5}     | {6}     | {7}     |
|   |                             | ,13179  | 1,4919  | ,63375  | ,03464  | ,85163  | ,10466  | 0,0000  |
| 1   | Monacrosporium phymatophagi |         | 0,00013 | 0,00202 | 0,98405 | 0,00013 | 0,99999 | 0,92963 |
| 2   | Arthrotrichum oligosporum   | 0,00013 |         | 0,00013 | 0,00013 | 0,00015 | 0,00013 | 0,00013 |
| 3   | Dactylaria oviparasi        | 0,00202 | 0,00013 |         | 0,00024 | 0,55471 | 0,00102 | 0,00016 |
| 4   | Dactylaria lypisag          | 0,98405 | 0,00013 | 0,00024 |         | 0,00013 | 0,99727 | 0,99995 |
| 5   | Dactylaria candid           | 0,00013 | 0,00015 | 0,55471 | 0,00013 |         | 0,00013 | 0,00013 |
| 6   | Pochonia sp                 | 0,99999 | 0,00013 | 0,00102 | 0,99727 | 0,00013 |         | 0,97667 |
| 7   | Kontrola                    | 0,92963 | 0,00013 | 0,00016 | 0,99995 | 0,00013 | 0,97667 |         |

Tabulka 7: Jednorozměrný test mortality *Globodera rostochiensis* v závislosti na druhu nematofágní houby

| Efekt     | Jednorozměrné testy významnosti pro Mortalita (C<br>Sigma-omezená parametrizace<br>Dekompozice efektivní hypotézy |                    |         |         |      |
|-----------|---|--------------------|---------|---------|------|
|           | SČ  | Stupně<br>volnosti | PČ      | F       | p    |
| Abs. člen | 28,0068   | 1                  | 28,0068 | 1263,94 | 0,00 |
| Houba     | 20,1554   | 6                  | 3,3592  | 151,60  | 0,00 |
| Chyba     | 1,3738  | 62                 | 0,0221  |         |      |

Tabulka 8: Mortalita *Globodera rostochiensis* v závislosti na druhu nematofágní houby -vyhodnocení analýzy rozptylu metodou Tukeyův HSD test

| Tukeyův HSD test; proměnná Mortalita (Data Globodera)<br>Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy<br>Chyba: meziskup. PČ = ,02216, sv = 62,000 |                             |         |         |         |         |         |         |         |
|---|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Č. buňky  | Houba                       | {1}     | {2}     | {3}     | {4}     | {5}     | {6}     | {7}     |
|   |                             | ,61397  | 1,5708  | ,46513  | 1,2741  | ,09398  | ,44477  | 0,0000  |
| 1   | Monacrosporium phymatophagi |         | 0,00013 | 0,29201 | 0,00013 | 0,00013 | 0,16270 | 0,00013 |
| 2   | Arthrobotrys oligospora     | 0,00013 |         | 0,00013 | 0,00079 | 0,00013 | 0,00013 | 0,00013 |
| 3   | Dactylaria oviparasitidis   | 0,29201 | 0,00013 |         | 0,00013 | 0,00014 | 0,99993 | 0,00013 |
| 4   | Dactylaria lysipagae        | 0,00013 | 0,00079 | 0,00013 |         | 0,00013 | 0,00013 | 0,00013 |
| 5   | Dactylaria candida          | 0,00013 | 0,00013 | 0,00014 | 0,00013 |         | 0,00019 | 0,81332 |
| 6   | Pochonia sp.                | 0,16270 | 0,00013 | 0,99993 | 0,00013 | 0,00019 |         | 0,00013 |
| 7   | Kontrola                    | 0,00013 | 0,00013 | 0,00013 | 0,00013 | 0,81332 | 0,00013 |         |

Tabulka 9: Jednorozměrný test mortality *Meloidogyne hapla* v závislosti na druhu nematofágní houby

| Efekt     | Jednorozměrné testy významnosti pro Mortalita (Data Meloidogyne<br>Sigma-omezená parametrizace<br>Dekompozice efektivní hypotézy |                    |         |         |         |
|-----------|--|--------------------|---------|---------|---------|
|           | SČ   | Stupně<br>volnosti | PČ      | F       | p       |
| Abs. člen | 36,9765  | 1                  | 36,9765 | 459,878 | 0,00000 |
| Houba     | 9,8056   | 5                  | 1,9611  | 24,390  | 0,00000 |
| Chyba     | 4,3418   | 54                 | 0,0804  |         |         |

Tabulka 10: Mortalita *Meloidogyne hapla* v závislosti na druhu nematofágní houby - vyhodnocení analýzy rozptylu metodou Tukeyův HSD test

| Č. buňky | Tukeyův HSD test; proměnná Mortalita (Data Meloidogyne)<br>Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy<br>Chyba: meziskup. PČ = ,08040, sv = 54,000 |          |          |          |          |          |          |
|----------|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|          | Houba   | {1}      | {2}      | {3}      | {4}      | {5}      | {6}      |
|          |   | 1,0028   | 1,1160   | ,68618   | 1,2185   | ,68673   | 0,0000   |
| 1        | Monacrosporium phymatophagi   |          | 0,94666: | 0,14340: | 0,53691: | 0,14470: | 0,00013: |
| 2        | Arthrobotrys oligospora   | 0,94666: |          | 0,01586: | 0,96477: | 0,01605: | 0,00013: |
| 3        | Dactylaria oviparatica  | 0,14340: | 0,01586: |          | 0,00146: | 1,00000: | 0,00015: |
| 4        | Dactylaria lysipaga   | 0,53691: | 0,96477: | 0,00146: |          | 0,00148: | 0,00013: |
| 5        | Pochonia sp.  | 0,14470: | 0,01605: | 1,00000: | 0,00148: |          | 0,00015: |
| 6        | Kontrola  | 0,00013: | 0,00013: | 0,00015: | 0,00013: | 0,00015: |          |

Tabulka 11: Mortalita a imobilizace *Bursaphelenchus xylophilus* pomocí *Stropharia rugosoannulata*

|                  | imobil. po<br>2. hod | mortalita<br>po 2. hod | imobil. po<br>24. hod | mortalita<br>po 24. hod | imobil. po<br>48. hod | mortalita<br>po 48. hod |
|------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1. opakování     | 5                    | 0                      | 1                     | 9                       | 0                     | 10                      |
| 2. opakování     | 4                    | 1                      | 2                     | 6                       | 1                     | 8                       |
| 3. opakování     | 2                    | 0                      | 4                     | 3                       | 0                     | 8                       |
| 4. opakování     | 1                    | 0                      | 4                     | 6                       | 0                     | 10                      |
| 5. opakování     | 0                    | 0                      | 2                     | 3                       | 2                     | 6                       |
| 6. opakování     | 2                    | 0                      | 4                     | 3                       | 1                     | 7                       |
| 7. opakování     | 0                    | 0                      | 2                     | 5                       | 1                     | 7                       |
| 8. opakování     | 3                    | 1                      | 3                     | 5                       | 0                     | 10                      |
| 9. opakování     | 1                    | 3                      | 5                     | 4                       | 0                     | 10                      |
| 10.<br>opakování | 4                    | 2                      | 4                     | 4                       | 0                     | 8                       |
| kontrola1        | 0                    | 0                      | 0                     | 0                       | 0                     | 1                       |
| kontrola2        | 0                    | 0                      | 0                     | 0                       | 0                     | 0                       |
| kontrola3        | 0                    | 0                      | 0                     | 0                       | 0                     | 0                       |

Tab. 12: Imobilizace juvenilních stádií *Meloidogyne hapla* pomocí *Stropharia rugosoannulata* (izolát SA) a *Arthrobotrys oligospora* (izolát AO 1/10).

| druh                             | inkubační doba | průměrný počet<br>imobilizovaných<br>háďátek +/- SO | průměrný počet<br>pohyblivých háďátek<br>+/- SO | % poměr<br>imobilizovaných<br>háďátek +/- SO | hladina významnosti v ANOVA<br>pro imobilizovanou háďátku |
|----------------------------------|----------------|---|---|--|---|
| <i>Stropharia rugosoannulata</i> | 4 h            | 4.1 ± 1.4   | 0.9 ± 1.4                                       | 81.7 ± 27.5                                  | 0.000121  |
| <i>Arthrobotrys oligospora</i>   | 4 h            | 0.9 ± 0.8   | 4.1 ± 0.8                                       | 17.8 ± 15.6                                  | 0.021786  |
| kontrola                         | 4 h            | 0.0 ± 0.0   | 5.0 ± 0.0                                       | 0.0 ± 0.0                                    | -   |
| <i>Stropharia rugosoannulata</i> | 24 h           | 4.9 ± 0.3   | 0.1 ± 0.3                                       | 98.3 ± 5.8                                   | 0.000121  |
| <i>Arthrobotrys oligospora</i>   | 24 h           | 3.0 ± 1.0   | 2.0 ± 1.0                                       | 60.0 ± 20.0                                  | 0.000121  |
| kontrola                         | 24 h           | 0.0 ± 0.0   | 5.0 ± 0.0                                       | 0.0 ± 0.0                                    | -   |

Tabulka 13: Účinnost jednotlivých izolátů nematofágních hub na *G. rostochiensis* v řízených podmínkách

| Tukeyův HSD test; proměnná index pf/pi (Tabulka 2)<br>Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy<br>Chyba: meziskup. PČ = 9,2000, sv = 42,000 |          |         |         |         |         |         |         |         |
|--|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Č. buňky   | Varianta | {1}     | {2}     | {3}     | {4}     | {5}     | {6}     | {7}     |
|  |          | 7,1429  | ,51429  | 1,5143  | 1,3143  | 11,000  | 8,1143  | ,88571  |
| 1  | kontrola |         | 0,00346 | 0,01923 | 0,01381 | 0,23292 | 0,99654 | 0,00664 |
| 2  | AO 1/10  | 0,00346 |         | 0,99594 | 0,99886 | 0,00014 | 0,00066 | 0,99998 |
| 3  | AO 3/10  | 0,01923 | 0,99594 |         | 1,00000 | 0,00014 | 0,00364 | 0,99972 |
| 4  | AO 5/10  | 0,01381 | 0,99886 | 1,00000 |         | 0,00014 | 0,00256 | 0,99997 |
| 5  | AO 7/10  | 0,23292 | 0,00014 | 0,00014 | 0,00014 |         | 0,56845 | 0,00014 |
| 6  | AO 12/10 | 0,99654 | 0,00066 | 0,00364 | 0,00256 | 0,56845 |         | 0,00122 |
| 7  | SR       | 0,00664 | 0,99998 | 0,99972 | 0,99997 | 0,00014 | 0,00122 |         |

Tabulka 15: Vyhodnocení účinnosti jednotlivých izolátů nematofágních hub na *D. dipsaci* v řízených podmínkách

| Tukeyův HSD test; proměnná Počet háďátek na gr<br>Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy<br>Chyba: meziskup. PČ = 3933,9, sv = 18,000 |                  |         |         |         |
|--|------------------|---------|---------|---------|
| Č. buňky   | Varianta         | {1}     | {2}     | {3}     |
|  |                  | 206,57  | 199,57  | 203,14  |
| 1  | kontrola         |         | 0,97639 | 0,99435 |
| 2  | A. oligospor     | 0,97639 |         | 0,99384 |
| 3  | S. rugosoanulati | 0,99435 | 0,99384 |         |

Tabulka 16: Vyhodnocení 1. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na OA s jednotlivými příměsmi

|            | A1/10 | A2/10 | A3/10 | A4/10 | A5/10 | A6/10 | A7/10 | A9/10 | A10/10 | A11/10 | A12/10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| kontrola   | 1,8   | 1,7   | 1,3   | 2,1   | 3,4   | 3,1   | 2,8   | 1,7   | 2,4    | 2,1    | 3      |
| experlit   | 5,9   | 7,3   | 1,5   | 1,6   | 2,3   | 3,8   | 3     | 2,1   | 2      | 4,8    | 6,4    |
| mastek     | 7,5   | 8,3   | 1,6   | 2,9   | 3,6   | 2,1   | 1,9   | 2,7   | 3      | 3,3    | 3,8    |
| kaolin     | 4,3   | 3,8   | 1,6   | 2     | 4,6   | 2,2   | 2,8   | 1,7   | 2      | 5      | 8,2    |
| zeolit     | 1,9   | 1,2   | 1,1   | 2     | 4,3   | 4,2   | 3,1   | 1,6   | 2,6    | 2,8    | 3,7    |
| vermikulit | 3,8   | 3,6   | 2,1   | 3,4   | 6     | 3,2   | 3,1   | 2,5   | 2,7    | 3      | 3,4    |

Tabulka 17: Vyhodnocení 1. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na CMA s jednotlivými příměsmi

|            | A1/10 | A2/10 | A3/10 | A4/10 | A5/10 | A6/10 | A7/10 | A9/10 | A10/10 | A11/10 | A12/10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| kontrola   | 1,7   | 1,6   | 1,2   | 1,9   | 1,8   | 1,9   | 1,7   | 1,9   | 1,1    | 2      | 2,5    |
| experlit   | 8,8   | 8,2   | 1,2   | 6,8   | 8,3   | 4,6   | 9,4   | 6,9   | 5,9    | 3,1    | 2,2    |
| mastek     | 1,9   | 1,2   | 1,1   | 1,4   | 1,6   | 1,9   | 2     | 2,6   | 2,2    | 1,3    | 1,5    |
| kaolin     | 4,1   | 8,8   | 1,2   | 5,2   | 6,9   | 3     | 8,8   | 5     | 3,7    | 2,4    | 1,5    |
| zeolit     | 2,7   | 3,2   | 1,2   | 1,5   | 1,8   | 1,7   | 2,7   | 2,8   | 1,9    | 2,5    | 3,1    |
| vermikulit | 1,8   | 1,5   | 1,4   | 4     | 4     | 4,2   | 3,2   | 4,1   | 3,55   | 3,5    | 1,2    |



Tabulka 18: Vyhodnocení 2. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na OA s jednotlivými příměsmi

|            | A1/10 | A2/10 | A3/10 | A4/10 | A5/10 | A6/10 | A7/10 | A9/10 | A10/10 | A11/10 | A12/10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| kontrola   | 12,6  | 12,7  | 4,1   | 12,2  | 13,7  | 13,3  | 14,3  | 10,9  | 15,2   | 12,4   | 17,1   |
| experlit   | 19,7  | 22,3  | 6,3   | 9,7   | 9     | 13,5  | 11,4  | 15,3  | 12,4   | 19,9   | 21     |
| mastek     | 24,1  | 24    | 5,9   | 11,7  | 13    | 14    | 10,1  | 12    | 9,8    | 10,6   | 9,1    |
| kaolin     | 17,2  | 20,2  | 10,6  | 13    | 18,4  | 13,6  | 15,5  | 13,9  | 14     | 19,2   | 21,8   |
| zeolit     | 8,1   | 8     | 9,5   | 15,9  | 15,9  | 14,9  | 14,3  | 14,5  | 13,4   | 14,1   | 18,5   |
| vermikulit | 16,1  | 12,7  | 3,9   | 7,2   | 21,2  | 11,7  | 7,5   | 4,4   | 8,2    | 6,8    | 5,9    |

Tabulka 19: Vyhodnocení 2. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na CMA s jednotlivými příměsmi

|            | A1/10 | A2/10 | A3/10 | A4/10 | A5/10 | A6/10 | A7/10 | A9/10 | A10/10 | A11/10 | A12/10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| kontrola   | 3,3   | 3,3   | 2,1   | 4,2   | 4,2   | 4,2   | 3,7   | 4,1   | 2,8    | 4,1    | 4,5    |
| experlit   | 13,6  | 8,4   | 1,5   | 7,5   | 9,3   | 18,3  | 18,8  | 17,1  | 19,6   | 16,9   | 18,2   |
| mastek     | 13,6  | 8,4   | 1,5   | 7,5   | 9,3   | 18,3  | 18,8  | 17,1  | 19,6   | 16,9   | 18,2   |
| kaolin     | 17    | 19,3  | 2,1   | 14,8  | 17,9  | 10    | 18,9  | 17    | 19     | 13,9   | 15,1   |
| zeolit     | 31,8  | 32,7  | 4,6   | 19,8  | 23,7  | 12,2  | 24,4  | 28    | 37,8   | 33,3   | 20,3   |
| vermikulit | 16,1  | 12,7  | 3,9   | 7,2   | 21,2  | 11,7  | 7,5   | 4,4   | 8,2    | 6,8    | 5,9    |

Tabulka 20: Vyhodnocení 3. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na OA s jednotlivými příměsmi

|            | A1/10 | A2/10 | A3/10 | A4/10 | A5/10 | A6/10 | A7/10 | A9/10 | A10/10 | A11/10 | A12/10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| kontrola   | 29,5  | 27,7  | 13,1  | 27,5  | 30,9  | 30,5  | 28,7  | 25,4  | 32     | 27,9   | 32,3   |
| experlit   | 33,1  | 32,3  | 17,8  | 30,4  | 32,8  | 24    | 27,7  | 29,4  | 28,2   | 36,9   | 38,9   |
| mastek     | 37,5  | 40,3  | 24,6  | 27,2  | 27,9  | 26,5  | 25,1  | 28,5  | 21,1   | 17,6   | 18     |
| kaolin     | 37,1  | 37,6  | 19,7  | 23,3  | 38,7  | 22,6  | 29,7  | 30,3  | 28,9   | 37,8   | 41,1   |
| zeolit     | 42,4  | 33,3  | 21    | 45    | 44,6  | 48,2  | 37,1  | 17    | 34,8   | 26,6   | 39,2   |
| vermikulit | 39,9  | 39,8  | 31,8  | 21,1  | 43,1  | 23,7  | 28,8  | 28    | 25     | 15,5   | 21,3   |

Tabulka 21: Vyhodnocení 3. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na CMA s jednotlivými příměsmi

|            | A1/10 | A2/10 | A3/10 | A4/10 | A5/10 | A6/10 | A7/10 | A9/10 | A10/10 | A11/10 | A12/10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| kontrola   | 18,3  | 17,3  | 15,3  | 17,9  | 17    | 16,1  | 17,3  | 20,4  | 18     | 19,5   | 20,6   |
| experlit   | 37,5  | 39    | 22,4  | 35,7  | 38,6  | 24,5  | 34,5  | 34,7  | 32,1   | 27,8   | 29,2   |
| mastek     | 31,6  | 24,8  | 2,6   | 31,1  | 28,9  | 26,6  | 32,1  | 31,6  | 40,2   | 31     | 33,4   |
| kaolin     | 35,7  | 37,3  | 13,9  | 33    | 37    | 22,7  | 35,1  | 32,9  | 33,7   | 28,1   | 29,5   |
| zeolit     | 31,8  | 32,7  | 4,6   | 19,8  | 23,7  | 12,2  | 24,4  | 28    | 37,8   | 33,3   | 20,3   |
| vermikulit | 30    | 29,5  | 28,8  | 36,6  | 36,4  | 23,1  | 34,9  | 32,9  | 35,1   | 35,4   | 19,8   |

Tabulka 22: Vyhodnocení 6. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na OA s jednotlivými příměsmi

|            | A1/10 | A2/10 | A3/10 | A4/10 | A5/10 | A6/10 | A7/10 | A9/10 | A10/10 | A11/10 | A12/10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| kontrola   | 60,9  | 59,4  | 46,7  | 65,6  | 64,2  | 62,8  | 64,4  | 62,4  | 68,5   | 68,6   | 67,3   |
| experlit   | 52,7  | 52,6  | 34,6  | 48,4  | 52,9  | 36,7  | 48,1  | 47,4  | 43,8   | 40,8   | 40,9   |
| mastek     | 81,6  | 83,2  | 40,5  | 60,1  | 57,9  | 49,6  | 49,6  | 66,3  | 54,9   | 58,5   | 54,6   |
| kaolin     | 63,8  | 64,8  | 39,6  | 35    | 69,3  | 35,6  | 39,7  | 43    | 47,1   | 56,7   | 65,3   |
| zeolit     | 81,3  | 61,6  | 36,5  | 81,4  | 85    | 85    | 85    | 36,7  | 76,1   | 50,7   | 82,5   |
| vermikulit | 73    | 77,5  | 68,9  | 65,5  | 77,4  | 38,6  | 83    | 81,8  | 66,6   | 68,8   | 58,1   |

Tabulka 23: Vyhodnocení 6. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na CMA s jednotlivými příměsmi

|            | A1/10 | A2/10 | A3/10 | A4/10 | A5/10 | A6/10 | A7/10 | A9/10 | A10/10 | A11/10 | A12/10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| kontrola   | 54,1  | 52,5  | 41,6  | 55    | 48,3  | 50    | 53,3  | 57,7  | 60,3   | 55,1   | 55,6   |
| experlit   | 85    | 85    | 76,4  | 85    | 85    | 71,9  | 85    | 85    | 85     | 85     | 84,4   |
| mastek     | 85    | 83,9  | 62,3  | 84,6  | 85    | 67,5  | 61,6  | 60,5  | 66,3   | 63,5   | 62,2   |
| kaolin     | 85    | 84,6  | 55,2  | 76,6  | 81,7  | 56    | 82,4  | 77,8  | 85     | 82,7   | 84,3   |
| zeolit     | 85    | 85    | 62    | 85    | 84,4  | 61,1  | 85    | 85    | 85     | 80,5   | 79,8   |
| vermikulit | 85    | 84,3  | 61,9  | 51,2  | 52,8  | 53,3  | 69,6  | 73    | 72     | 67,7   | 75,6   |

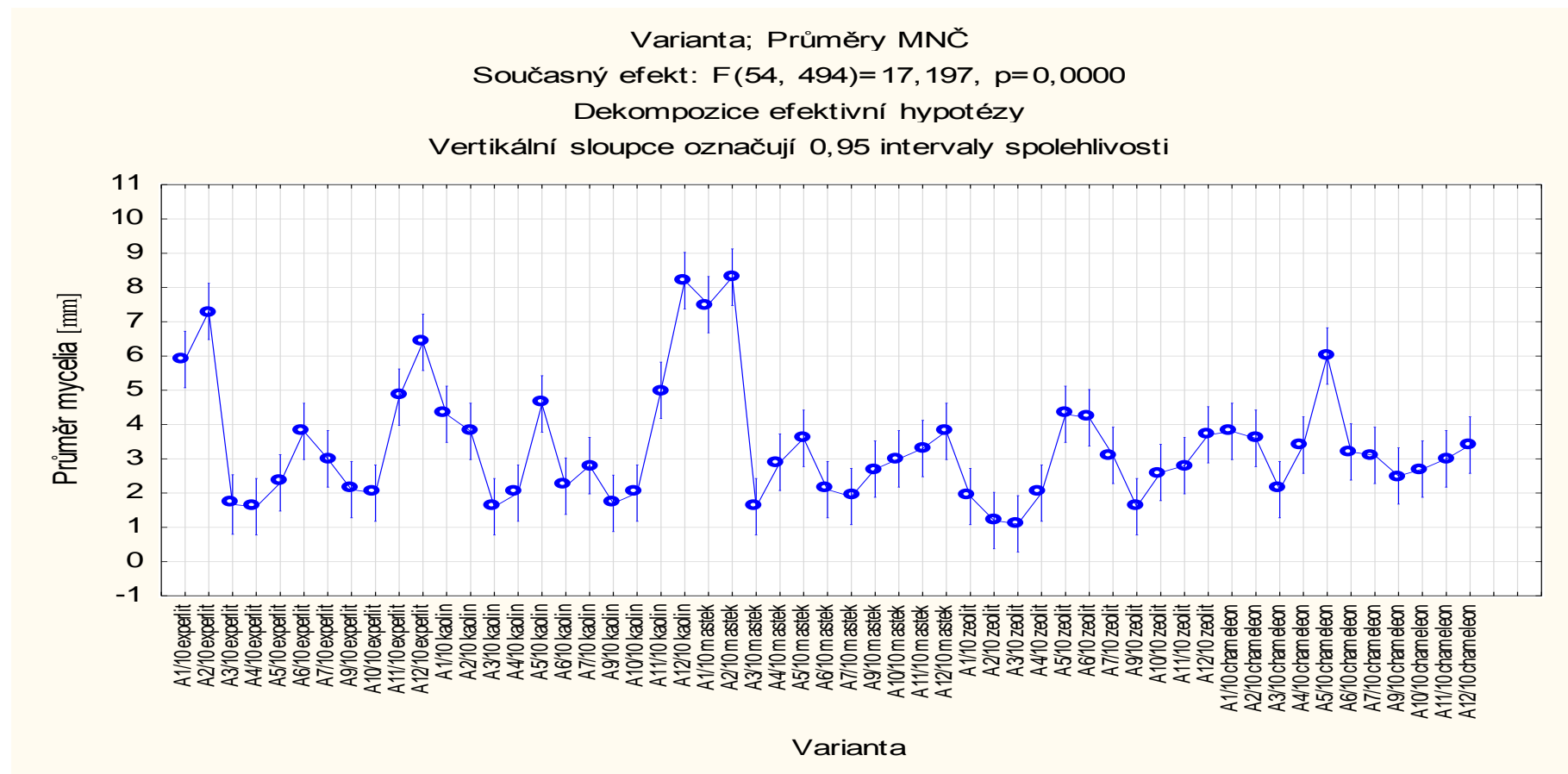
Tabulka 24: Vyhodnocení 7. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na OA s jednotlivými příměsmi

|            | A1/10 | A2/10 | A3/10 | A4/10 | A5/10 | A6/10 | A7/10 | A9/10 | A10/10 | A11/10 | A12/10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| kontrola   | 83    | 79,8  | 67,7  | 84,3  | 82,4  | 71,7  | 80,3  | 80,3  | 84,5   | 83,5   | 84,1   |
| experlit   | 85    | 85    | 85    | 85    | 81    | 72,1  | 81,5  | 78,4  | 75     | 71,7   | 79,4   |
| mastek     | 85    | 85    | 63,75 | 84,1  | 83,9  | 82,8  | 85    | 85    | 85     | 85     | 83,1   |
| kaolin     | 82,6  | 82,5  | 61,7  | 71,4  | 83,9  | 65,8  | 70    | 78,2  | 72,8   | 77,8   | 84,3   |
| zeolit     | 85    | 85    | 68    | 85    | 85    | 85    | 85    | 73,7  | 85     | 83,3   | 85     |
| vermikulit | 85    | 85    | 84,5  | 81,7  | 85    | 67,8  | 85    | 85    | 82,9   | 83,3   | 79,7   |

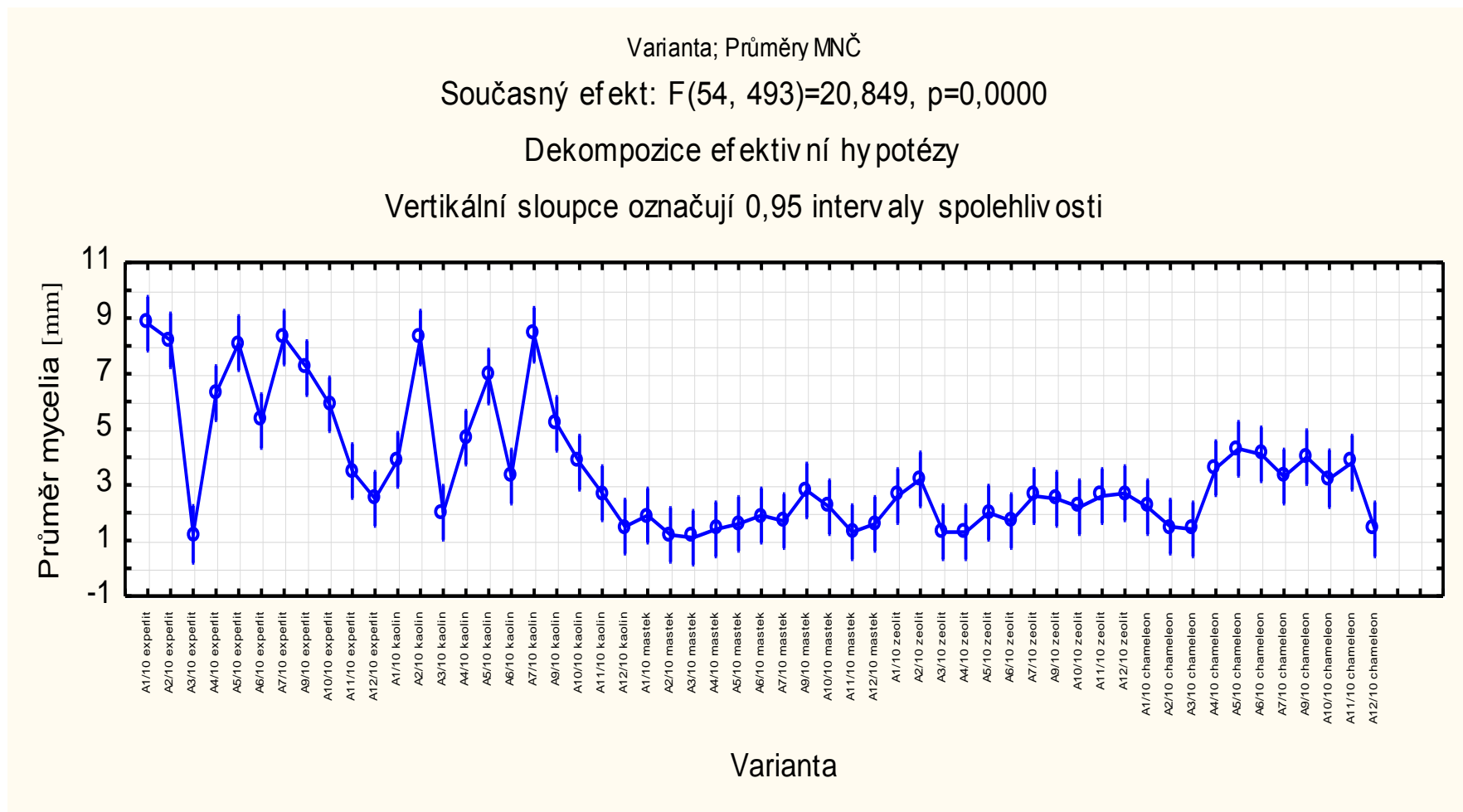
Tabulka 25: Vyhodnocení 7. dne testování schopnosti růstu a reprodukce izolátů nematofágní houby *A. oligospora* na CMA s jednotlivými příměsmi

|            | A1/10 | A2/10 | A3/10 | A4/10 | A5/10 | A6/10 | A7/10 | A9/10 | A10/10 | A11/10 | A12/10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| kontrola   | 81,8  | 74,4  | 67,5  | 76,8  | 78,6  | 75,5  | 75,7  | 83,3  | 83,7   | 82,8   | 80     |
| experlit   | 85    | 85    | 85    | 85    | 85    | 85    | 85    | 85    | 85     | 85     | 85     |
| mastek     | 85    | 85    | 75,3  | 85    | 85    | 85    | 85    | 84,1  | 82,9   | 78,9   | 82,4   |
| kaolin     | 85    | 85    | 77,7  | 84,1  | 85    | 83,3  | 83,2  | 85    | 84,6   | 85     | 85     |
| zeolit     | 85    | 85    | 81,6  | 85    | 85    | 75,8  | 85    | 85    | 85     | 85     | 85     |
| vermikulit | 85    | 85    | 73,5  | 85    | 85    | 82,9  | 83,1  | 80,7  | 78,4   | 85     | 85     |

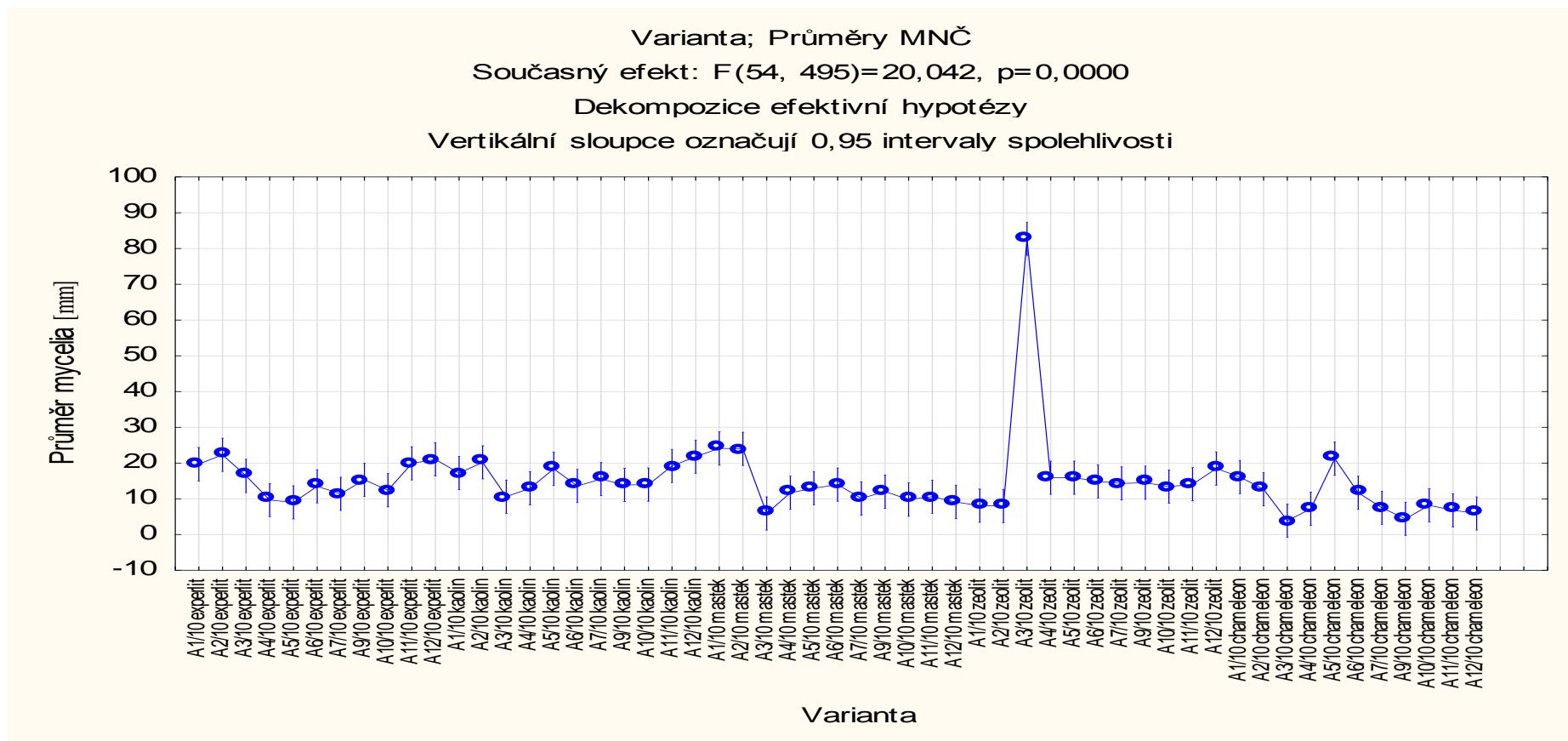
Graf 12: Testované izoláty *A. oligospora* na OA mediu s příměsmi a doba hodnocení 1. den



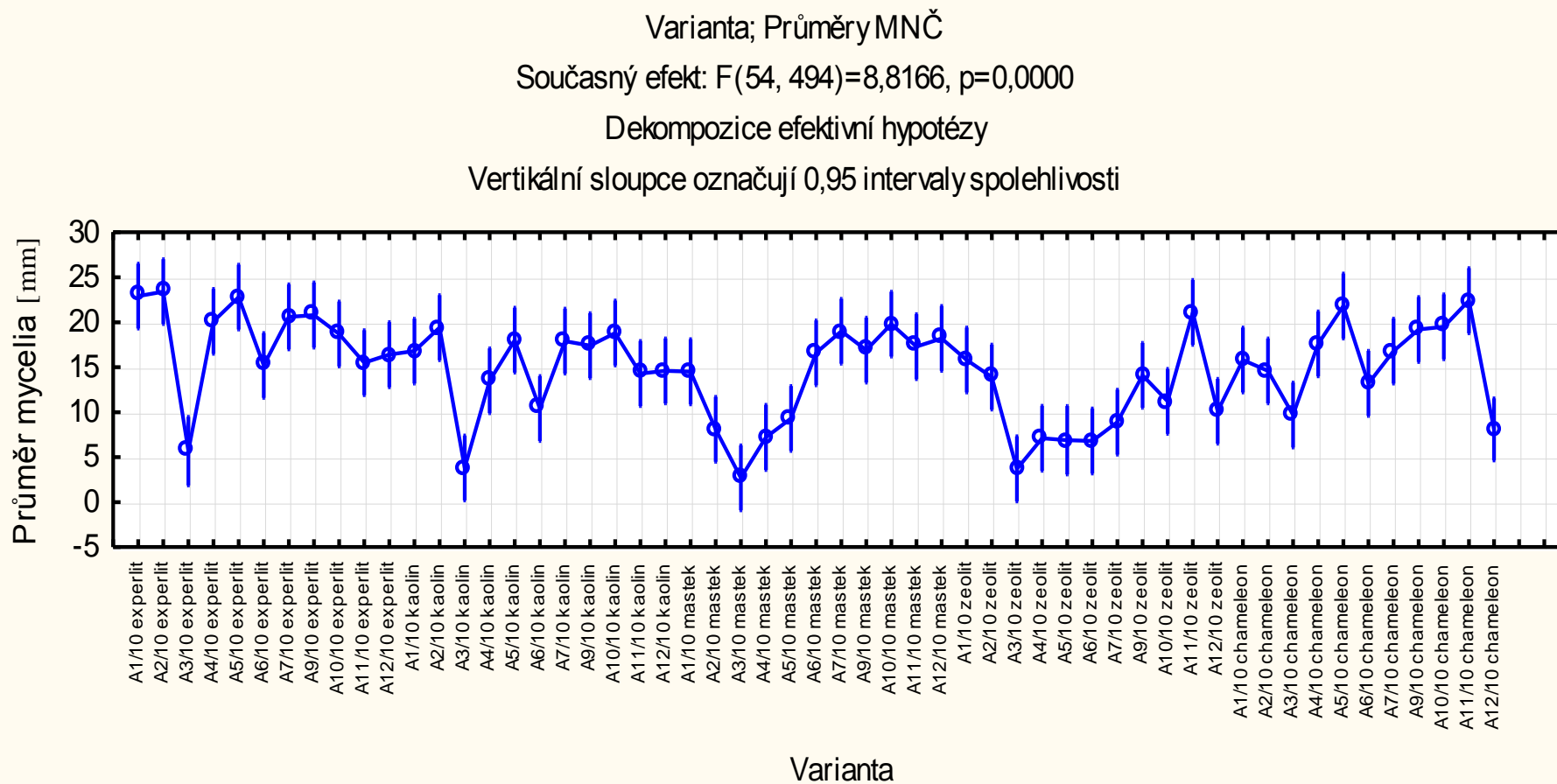
Graf 14: Testované izoláty *A. oligospora* na CMA mediu s příměsmi a doba hodnocení 1. den



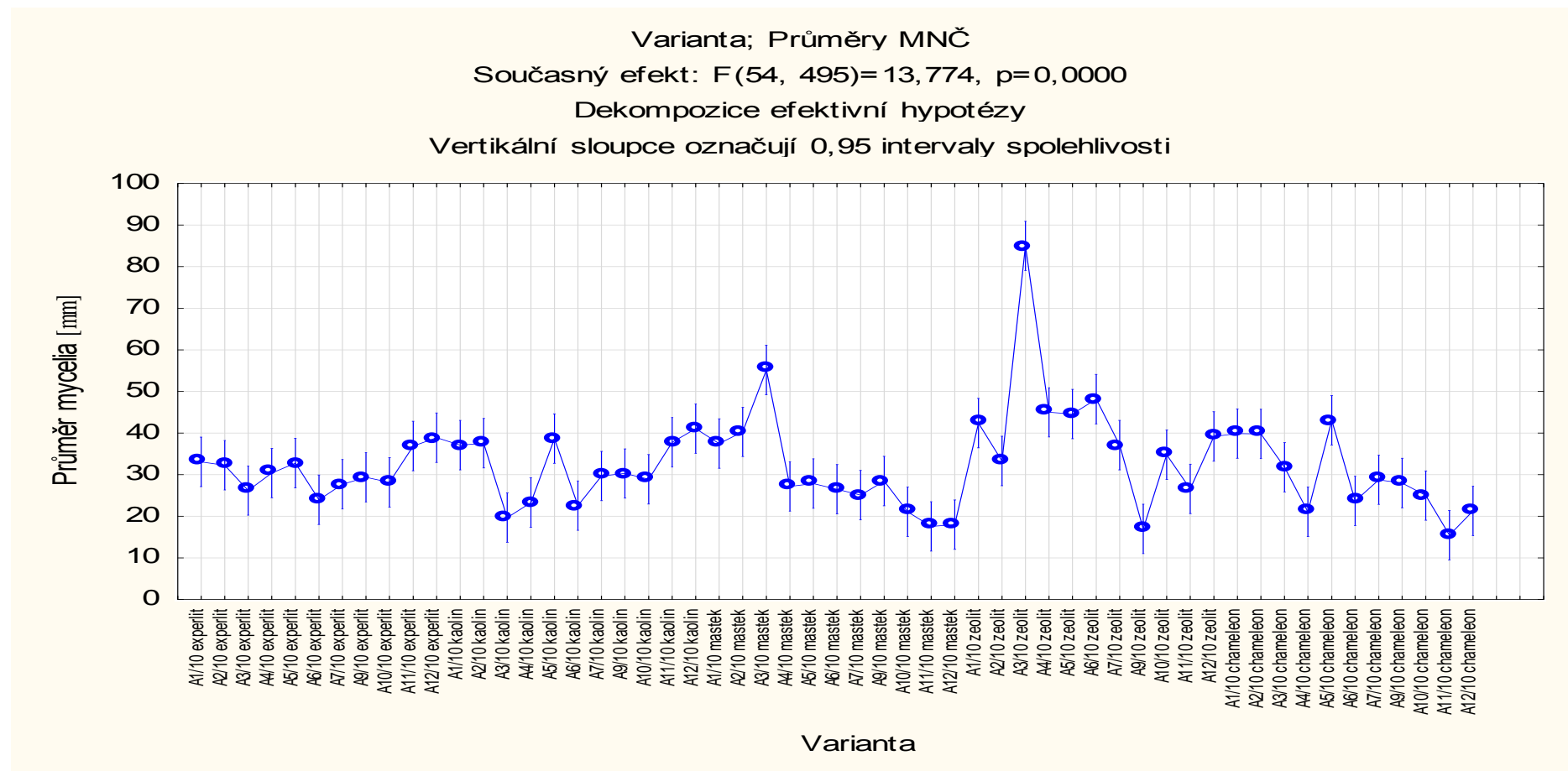
Graf 16: Testované izoláty *A. oligospora* na OA mediu s příměsmi a doba hodnocení 2. den



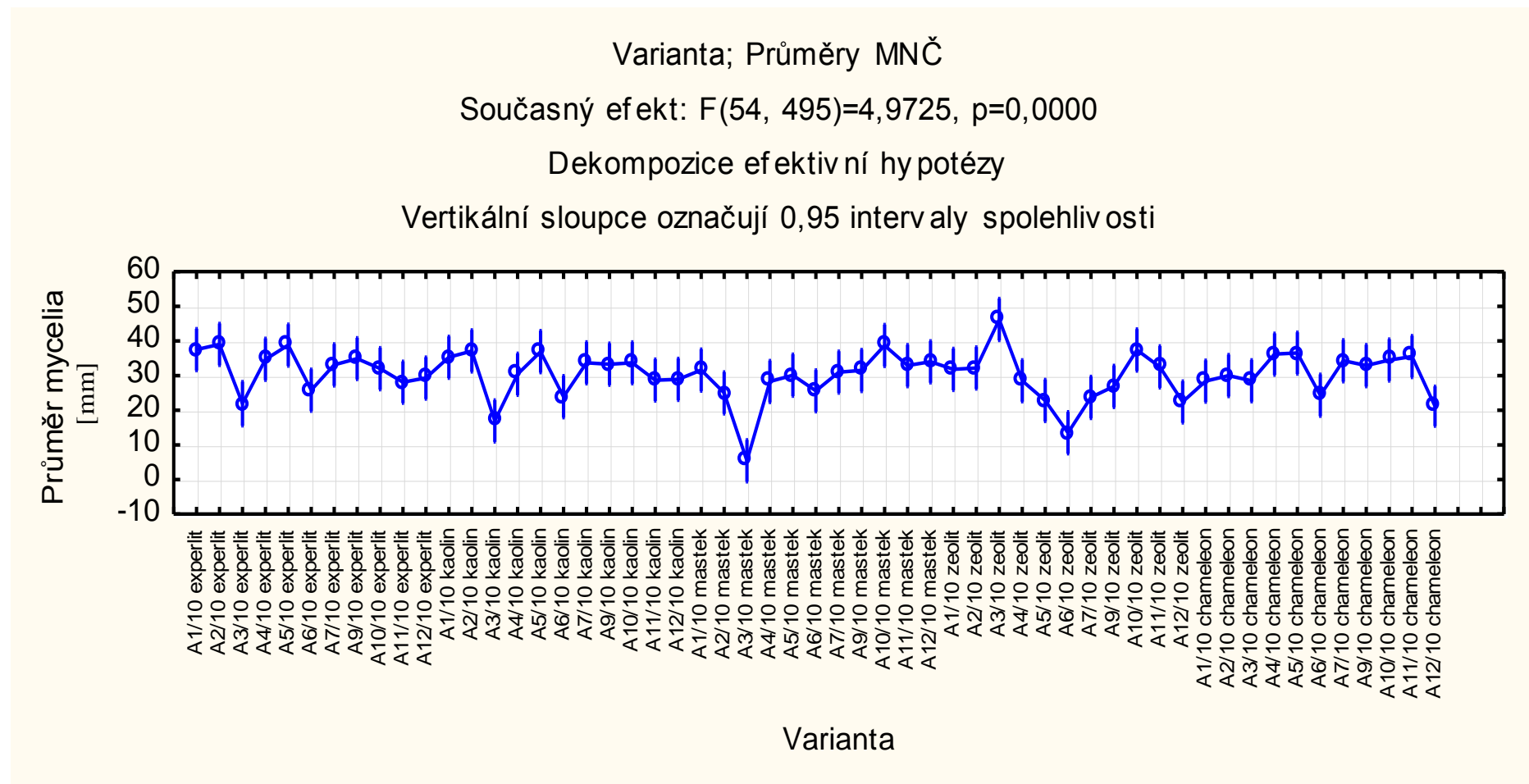
Graf 18: Testované izoláty *A. oligospora* na CMA mediu s příměsmi a doba hodnocení 2. den



Graf 20: Testované izoláty *A. oligospora* na OA mediu s příměsmi a doba hodnocení 3. den

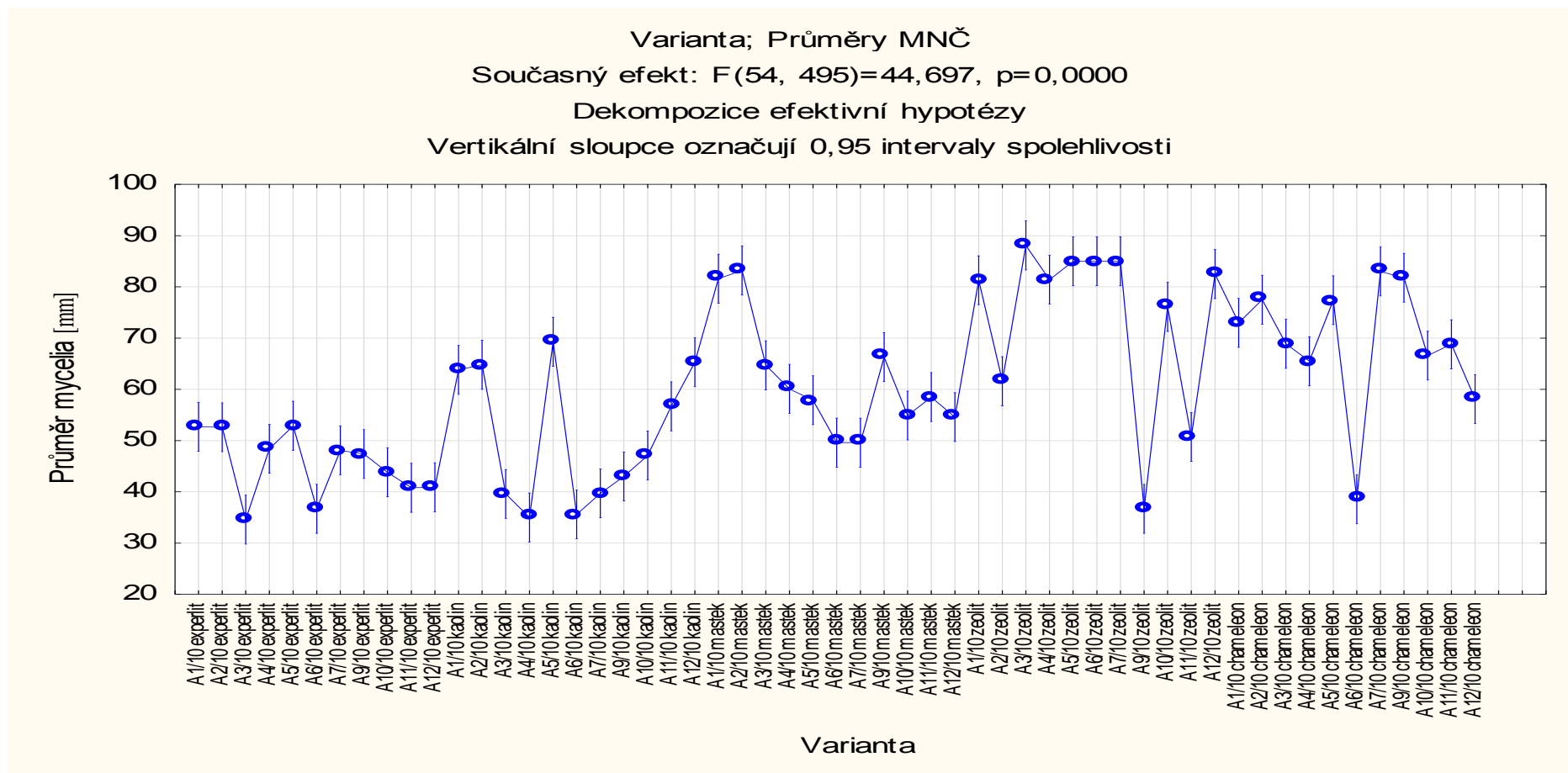


Graf 22: Testované izoláty *A. oligospora* na CMA mediu s příměsmi a doba hodnocení 3. den

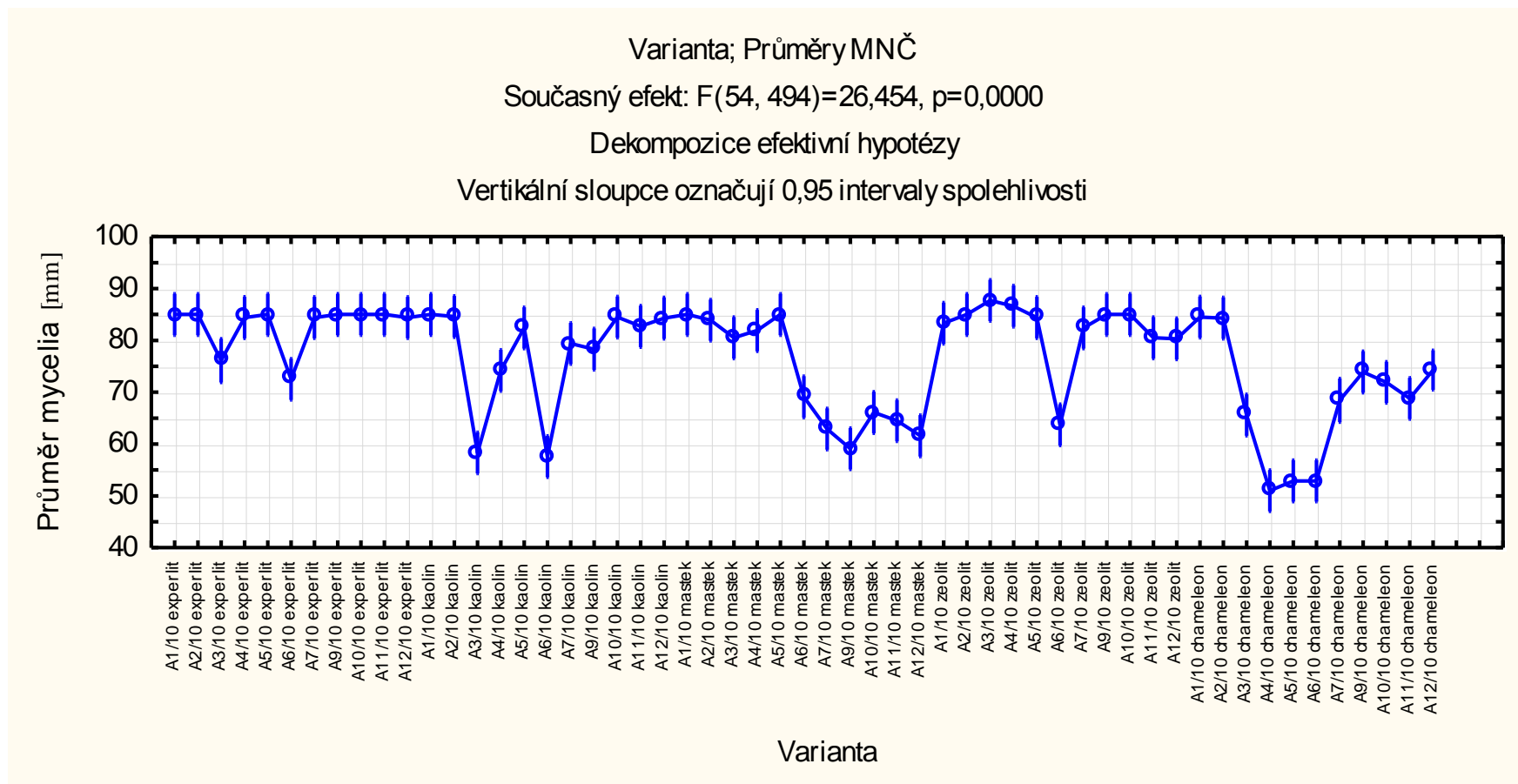




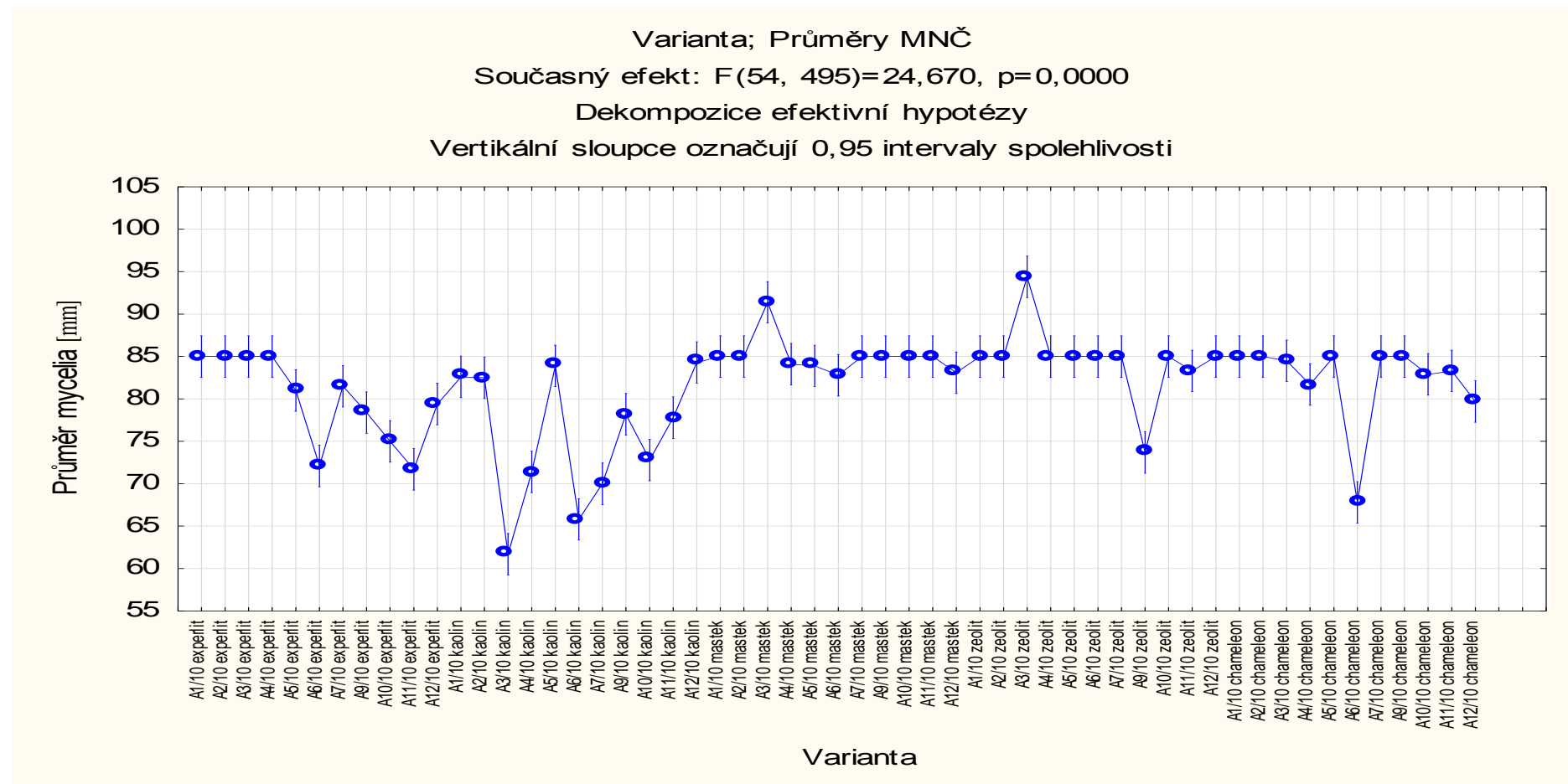
Graf 24: Testované izoláty *A. oligospora* na OA mediu s příměsmi a doba hodnocení 6. den



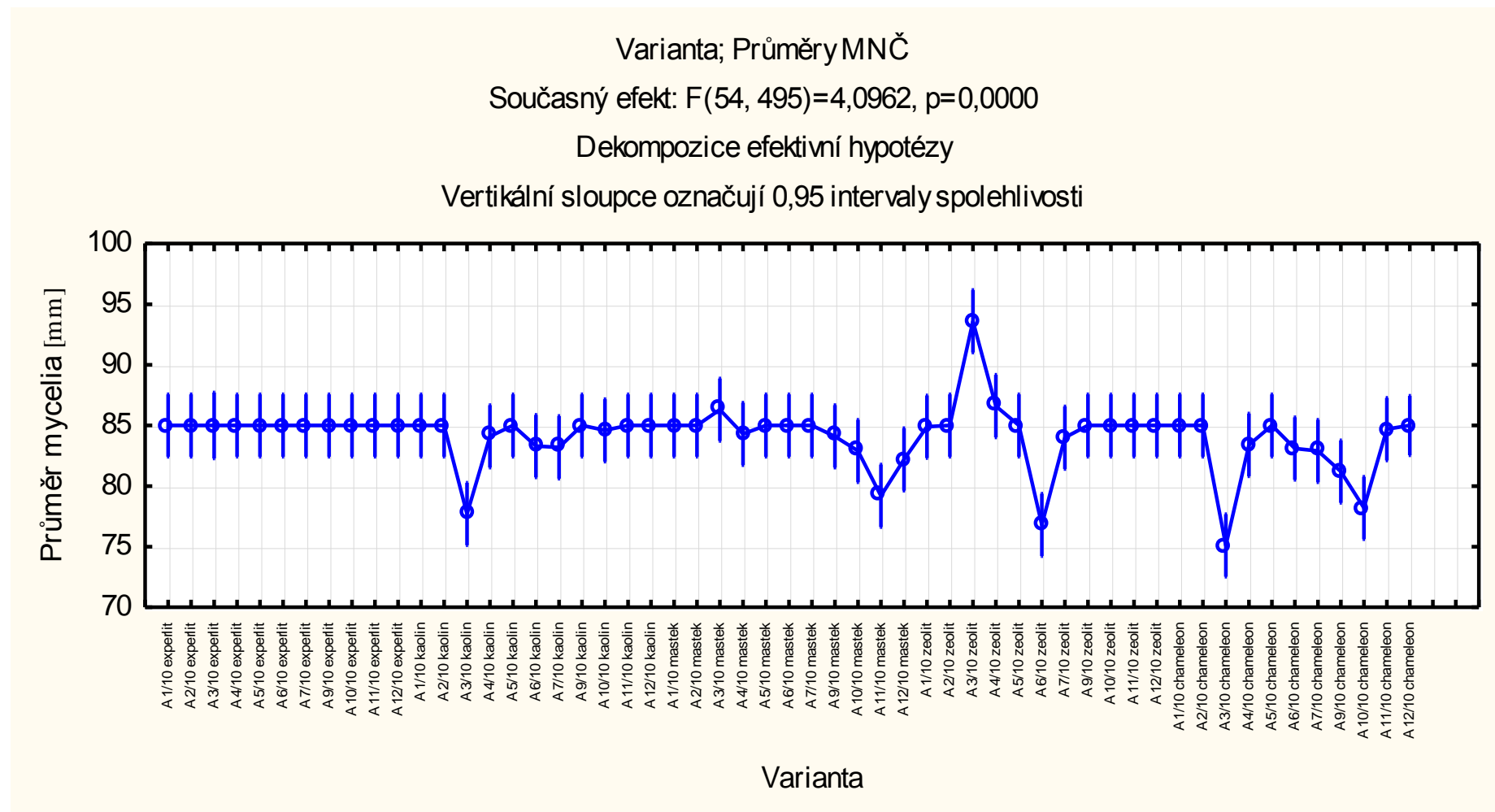
Graf 26: Testované izoláty *A. oligospora* na CMA mediu s příměsmi a doba hodnocení 6. den



Graf 28: Testované izoláty *A. oligospora* na OA mediu s příměsmi a doba hodnocení 7. den



Graf 30: Testované izoláty *A. oligospora* na CMA mediu s příměsmi a doba hodnocení 7. den



## ***Klíč k určování nematofágních hub***

|   |    |
|---|----|
| 1. endoparazitické houby (podhoubí v životním cyklu převážně uvnitř hád'átka) .....   | 2  |
| 1. predatorní houby (podhoubí v životním cyklu převážně vně hád'átka) .....   | 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 sporangií produkující zoospory nebo produkující spory, zygosporu nebo azygosporu .....         | 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 lepicí buňky (uzlíky)   |    |
| a. <i>Nematoctonus robustus</i> Jones   |    |
| b. <i>N. concurrens</i> Drechs.   |    |
| c. <i>N. haptocladus</i> Drechs.  |    |
| d. <i>N. campylosporus</i> Drechs.  |    |
| 5. hyfy nenesou lepicí buňky, ale vyrábějí lepicí uzlíky na konidíích .....   | 6  |
| 6. produkující chlamydospory .  |    |
| a. <i>Nematoctonus pachysporus</i> Drechs   |    |
| b. <i>N. tylosporus</i> Drechs.   |    |
| 6. neprodukující chlamydospory  |    |
| a. <i>Nematoctonus leiosporus</i> Drechs.   |    |
| b. <i>N. leptosporus</i> Drechs.  |    |
| 7. spory vyrůstající na strigmatech, žádné phialidy   |    |
| a. <i>Drechmeria coniospora</i> (Drechs.) Gams & Jansson  |    |
| 7. spory vyrůstající na phialidě .....  | 8  |

- 8. lepicí 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 encysting 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 nebičikaté, 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 lepivé uzlíky

a. *Acaulopage pectospora* Drechs.

17. hyfy přehrádkované.....18

18. hyfy tvořící lepivé větve, někdy formované do jednoduchých 2-rozměrných sítí, konidiofory jednoduché, jednotlivé terminální konidie

#### lepivé větve

a. *Monacrosporium cionopagum* (Drechs) Subram [*Dactylella cionopaga* Drechs]

- Synonym: *M. gephyropagum* (Drechs) Subram. [*Dactylella gephyropaga* Drechs.]
18. hyfy tvořící na stopkách nebo beze stopek lepivé uzlíky.....19
18. hyfy tvořící na stopkách fixní oka, někdy doprovázené stopkatými lepivými uzlíky.....21
18. hyfy tvořící stopkatá stahující se oka.....22
18. hyfy propojené 2 nebo 3- rozměrnými lepivými sítěmi.....23

#### lepivé uzlíky

##### 19. konidiofory rozvětvené

a. *Arthrotrrys 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. lepivé uzlíky beze stopky

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

20. lepivé uzlíky beze stopky nebo krátká stopka, často tvořící krátké řetězce lepivých uzlíků

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

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

c. *M. robustum* (McCulloch)

##### 20. lepivé 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. lepivé uzlíky se nevyskytují

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

##### 21. lepivé uzlíky se vyskytují, konidofory 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. konidie 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. flagans* 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. gamposporum* (Drechs.) Rubner [*Dactylaria gampospora* Drechs.]

### ***Seznam zkratek použitých v textu***

J2 – larva hádčátka druhého juvenilního stadia

BNYVV - Beet necrotic yellow vein virus

LB medium - standardní médium pro kultivaci *E.coli*

CMA – corn meal agar

OA – oat meal agar

MEA – malt extrakt agar

RBA – rose bengal agar

PDA – potato dextrose agar

VA – vodní agar

ITS – nekódující oblast nacházející se mezi velmi konzervovanými kódujícími oblastmi

18S a 28S rRNA.

DNA - deoxyribonukleová kyselina

dNTP - deoxyribonukleotid trifosfát

Taq polymeráza - DNA polymeráza z *Thermus aquaticus*

ddH<sub>2</sub>O – re-destilovaná voda

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool)

PCR - polymerázová řetězová reakce

g - relativní odstředivá síla

## **Seznam publikací**

- Zouhar M., Douda O., Mazáková J., Nováková J., Urban J. (2010): Predikce nematofágní aktivity půdních hub. certifikovaná metodika, ČZU v Praze. 32 s.
- Douda O., Zouhar M., Mazáková J., Nováková J. (2011): *Arthrobotrys oligospora* jako alternativní bioagens proti *Meloidogyne hapla* (Certifikovaná metodika), *Arthrobotrys oligospora* alternative bioagens against *Meloidogyne hapla* (Certified methodology), crop protection, bioagens, alternative methods, nematophagous fungi, 2011, GF - Choroby, škůdci, plevele a ochrana rostlin, A - Uplatněná certifikovaná metodika, *A. oligospora* metodika, SRS 003245/2012, Sortiment bioagens použitelných pro ochranu proti *M. hapla* bude rozšířen o *A. oligospora*. , C - Výsledek je využíván bez omezení okruhu uživatelů, Státní rostlinolékařská správa, 07. 02. 2012
- Zouhar M., Douda O., Novotný D., Nováková J., Mazáková J. (2010): Evaluation of the pathogenicity of selected nematophagous fungi – Czech Mycol. 61(2): 139–147.
- Zouhar M., Douda O., Nováková J., Procházka I., Nováková E., Mazáková J., Ryšánek P., Pavela R. (2012): Biologická ochrana mrkve proti hád'átku *Meloidogyne hapla*. *Úroda*, 2012, roč. 12, č. 9, s. 60-62. ISSN: 0139-6013.
- Zouhar M., Douda O., Nováková J., Nováková E., Mazáková J., Wenzlová J., Ryšánek P., Renčo M. (2013): First report about the trapping activity of *Stropharia rugosoannulata* acanthocytes for Northern Root Knot Nematode. *Helminthologia*, 2013, roč. 50, č. 2, s. 127-131. ISSN: 0440-6605.
- Douda O., Zouhar M., Nováková J. (2010): Nematofágní mikroskopické houby. *Zahradnictví*, 2010, roč. 9, č. 2, s. 28 - 29. ISSN: 1213-7596.