

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA

V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Studium vztahu fytoparazitických háďátek a
mikroskopických hub**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Jana Mazáková, Ph. D.

Autor práce: Pavla Strnadlová

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: Studium vztahu fytoparazitických háďátek a mikroskopických hub vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: 22. 2. 2012

podpis autora práce:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své vedoucí diplomové práce ing. Janě Mazákové, Ph. D. za ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi poskytla. Dále ing. Milošovi Zouharovi, Ph. D. za úzkou spolupráci v průběhu celé práce a také a Magdě Strnadlové za odbornou pomoc při překladech z anglického jazyka. Také bych chtěla poděkovat členům katedry Ochrany rostlin. Poděkování též patří přátelům a rodině jak za pomoc při psaní této práce, tak za podporu v průběhu celého studia. V neposlední řadě velmi ochotnému a aktivnímu pracovnímu týmu knihovnic Zemědělské a potravinářské knihovny v Praze.

Souhrn

Fytoparazitická háďátka patří mezi významné škůdce a přitom jejich chemická ochrana je z důvodu velké toxicity látek velmi omezená. Proto je nasnadě, že by se měla hledat jiná alternativní řešení.

Cílem této práce bylo *in vitro* testy vyhodnotit, která nematofágní houba vykazuje největší nematofágní aktivitu vůči háďátkům a vyzkoušet její nematofágní schopnosti v nádobových pokusech.

V *in vitro* testech byla pozorována nematofágní aktivita těchto nematofágních hub *Arthrobotrys oligospora*, *Pochonia chlamydosporia*, *Dactylellina lysipaga* a *Monacrosporium phymatophagum* na modelovém háďátku *Caenorhabditis elegans*. V těchto testech prokazovala největší nematofágní aktivitu *Arthrobotrys oligospora*.

V nádobových pokusech se testovala schopnost *Arthrobotrys oligospora* potlačit výskyt háďátek rodů *Globodera rostochiensis* na bramborech, *Ditylenchus dipsaci* na čekance a *Meloidogyne hapla* na mrkvi. Jednotlivé rostliny byly uměle inokulovány. Jednotlivé varianty lišící se v koncentraci houby v suspenzi, kterou byly ošetřeny, byly srovnány s negativní kontrolou. Testy byly prováděny v řízených skleníkových podmínkách.

Z výsledků vyplývá, že *Arthrobotrys oligospora* má schopnost potlačit výskyt *Meloidogyne hapla* na mrkvi. Výskyt háďátek *Meloidogyne hapla* byl nepřímo úměrný koncentraci houby *Arthrobotrys oligospora* v suspenzi, kterou se ošetřovalo. U ostatních háďátek nebyly mezi kontrolou a variantami pozorovány statisticky významné rozdíly.

Dále se v nádobových pokusech testoval vliv *Stropharia rugosoannulata* na háďátko *Meloidogyne hapla* na mrkvi. Kde nižší výskyt háďátek oproti kontrole byl pozorován u nejnižší koncentrace houby, ale ani ten nebyl statisticky průkazný.

Klíčová slova: *Globodera rostochiensis*, *Ditylenchus dipsacii*, *Meloidogyne hapla*, *Arthrobotrys oligospora*, *Stropharia rugosoannulata*, ochrana rostlin, *in vitro* test, *in vivo* test.

Summary

Phytoparasitic nematodes count among the most prevalent pests although their chemical protection is for reasons of high toxicity very limited. It is therefore evident that new alternative solutions should be looked for.

The aim of this work was to evaluate by *in vitro* tests which fungus evince the highest nematicidal activity towards nematodes and examine its nematicidal abilities in container experiments.

Within *in vitro* tests nematicidal activity of these nematofagous fungi was observed: *Arthrobotrys oligospora*, *Pochonia chlamydosporia*, *Dactylellina lysipaga* and *Monacrosporium phymatophagum* on model nematode *Caenorhabditis elegans*. In these tests, the highest nematicidal activity was exhibited by *Arthrobotrys oligospora*.

In container experiments, the ability of *Arthrobotrys oligospora* to restrict occurrence of *Globodera rostochiensis* nematodes on potatoes, *Ditylenchus dipsaci* on chicory and *Meloidogyne hapla* on carrots was tested.

Individual plants were artificially inoculated. The individual variants which differ according to the fungi concentration in suspension by which they were treated were compared with negative control. The tests were conducted under controlled greenhouse conditions.

The results show that *Arthrobotrys oligospora* has the ability to restrict the occurrence of *Meloidogyne hapla* on carrots.

The incidence of *Meloidogyne hapla* nematodes was inversely related to the concentration of *Arthrobotrys oligospora* fungus in suspension used for treatment. Concerning other nematodes there was not a statistically significant difference observed between the control and the variants.

Additionally, the influence of *Stropharie rugosoannluaty* on nematode *Meloidogyne hapla* on carrots was tested at container experiments. Here there was observed a lower incidence of nematodes at the lowest concentration of fungi in comparison with the control but even this was not statistically conclusive.

Key words: *Globodera rostochiensis*, *Ditylenchus dipsacii*, *Meloidogyne hapla*, *Arthrobotrys oligospora*, *Stropharia rugosoannulata*, plant protection, *in vitro* tests, *in vivo* tests.

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod..... | 8 |
| 2. Vědecká hypotéza a cíl práce..... | 9 |
| 3. Literární rešerše..... | 10 |
| 3.1. Ochrana proti fytoparazitickým hád'átkům..... | 10 |
| 3. 1. 1. Chemická ochrana..... | 10 |
| 3. 1. 2. Biologická ochrana | 11 |
| 3. 2. <i>Nematoda</i> (Hlístice)..... | 11 |
| 3. 2. 1. <i>Globodera rostociensis</i> (Hád'átko bramborové)..... | 12 |
| 3. 2. 2. <i>Ditylenchus dipsaci</i> (Hád'átko zhoubné) | 13 |
| 3. 2. 2. <i>Meloidogyne hapla</i> | 14 |
| 3. 3. Nematofágní houby..... | 15 |
| 3. 3. 1. Lapací struktury hub | 16 |
| 3. 3. 1. 1. Lepkavý přisedlý knoflík (sessile adhesive knob)..... | 16 |
| 3. 3. 1. 2. Stopkatý lepkavý knoflík (stalked adhesive knob)..... | 17 |
| 3. 3. 1. 3. Postranní myceliální větve (adhesiv branches)..... | 17 |
| 3. 3. 1. 4. Fixní oka (non-constricting rings) | 18 |
| 3. 3. 1. 5. Škrťící oka (constricting ring)..... | 18 |
| 3. 3. 1. 6. Sítě (nets)..... | 19 |
| 3. 3. 1. 7. Čepy (pegs) | 19 |
| 3. 3. 1. 8. Nespecifické výběžky (protuberances)..... | 19 |
| 3. 3. 1. 9. Stefanocysty..... | 19 |
| 3. 3. 1. 10. Vystřelovací buňky | 19 |
| 3. 3. 2. <i>Arthrobotrys oligospora</i> Fresen. 1850 | 20 |
| 3. 3. 3. <i>Stropharia rugosoannulata</i> Farl. ex Murrill 1922 | 21 |
| 4. Materiál a metodika | 22 |
| 4.1. Příprava biologického materiálu..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 4. 1. 1. Kultivace a namnožení hub..... | 22 |
| 4. 1. 2. Příprava háďátek..... | 23 |
| 4. 2. Příprava pokusů | 24 |
| 4. 2. 1. Příprava <i>in vitro</i> testů..... | 24 |
| 4. 2. 2. Příprava nádobových pokusů..... | 25 |
| 4. 2. 2. 1. <i>Globodera rostochiensis</i> x <i>Arthrobotrys oligospora</i> | 25 |
| 4. 2. 2. 2. <i>Ditylenchus dipsacii</i> x <i>Arthrobotrys oligospora</i> | 25 |
| 4. 2. 2. 3. <i>Meloidogyne hapla</i> x <i>Arthrobotrys oligospora</i> | 26 |
| 4. 2. 2. 4. <i>Meloidogyne hapla</i> x <i>Stropharia rugosoannulata</i> | 26 |
| 4. 3. Vyhodnocení testů | 26 |
| 4. 3. 1. Vyhodnocení <i>in vitro</i> testů..... | 26 |
| 4. 3. 2. Vyhodnocení nádobových pokusů..... | 27 |
| 4. 3. 2. 1. Extrakce cyst <i>Globodera rostochiensis</i> z půdy..... | 27 |
| 4. 3. 2. 2. Extrakce háďátek <i>Ditylenchus dipsaci</i> pomocí Baermannovy metody | 27 |
| 4. 3. 2. 3. Barvení háďátek <i>Meloidogyne hapla</i> na kořenech mrkve | 28 |
| 5. Výsledky | 29 |
| 5. 1. Výsledky <i>in vitro</i> testů..... | 29 |
| 5. 2. Výsledky nádobových pokusů | 30 |
| 5. 2. 1. <i>Globodera rostochiensis</i> x <i>Arthrobotrys oligospora</i> | 30 |
| 5. 2. 2. <i>Ditylenchus dipsacii</i> x <i>Arthrobotrys oligospora</i> | 31 |
| 5. 2. 3. <i>Meloidogyne hapla</i> x <i>Arthrobotrys oligospora</i> | 33 |
| 5. 2. 4. <i>Meloidogyne hapla</i> x <i>Stropharia rugosoannulata</i> | 34 |
| 6. Diskuse..... | 36 |
| 7. Závěr | 38 |
| 8. Seznam literatury | 39 |
| 9. Seznam obrázků..... | 43 |
| 10. Přílohy..... | 45 |

1. Úvod

V České republice tak jako v celé Evropské unii vzrůstá zájem o ekologické zemědělství. Jsou také zvýšené nároky na klasické zemědělství, kde je stále více kladen důraz na integrovanou ochranu rostlin. V integrované ochraně rostlin je podstatou snížení výskytu patogenů a škůdců pod práh škodlivosti, a to na základě využití všech možných způsobů ochrany počínaje preventivními opatřeními, biologickou ochranou až k chemickým přípravkům, na které by se měl zemědělec obrátit až v poslední řadě. Stále více se snažíme najít schůdné „nechemické cesty“.

V ochraně rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům bylo v minulosti vyvinuto několik chemických přípravků, které ovšem neměly na životní prostředí příliš dobrý vliv. Nevhodnost používání chemických přípravků je v případě hád'átek umocněna také jejich způsobem života a od toho se odvíjejícím promořováním půd nematocidními látkami, které se takto mohou lehce dostat do spodních vod, kde mohou působit značné ekologické problémy.

Fytoparazitická hád'átka jsou rozšířena po celém světě a i v naší republice patří mezi významné škodlivé činitele. Některá z nich patří i mezi karanténní organismy. Proto je v tomto směru důležitý rozvoj biologické ochrany, která by byla schopna snížit výskyt těchto organismů, aniž by zatížila životní prostředí.

Nematofágní houby jsou v půdě přirozeně vyskytující se organismy a tak se zdá, že jejich využití v boji proti hád'átkům je jedna z nejpřirozenějších cest. Proto je biologická ochrana proti hád'átkům založená na využití těchto nematofágních hub nejvíce zkoumanou metodou.

2. Vědecká hypotéza a cíl práce

Vědecká hypotéza: Existují interakce mezi nematofágními druhy hub a fytofágními druhy hád'átek.

Cílem práce bylo zjistit druhy vztahů mezi nematopatogeními houbami a fytoparazityckými hád'átkami.

3. Literární rešerše

3.1. Ochrana proti fytoparazitickým hád'átkům

Ochrana rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům je prozatím založena na aplikaci chemických látek, nematocidů (Douda a kol., 2010).

Řadu let se používání chemických přípravků proti parazitickým hlísticím považovalo za efektivní a vhodnou ochranu rostlin. Následně se nebezpečné látky vyskytovaly v půdě i ve studnách až několik měsíců (USA, Hawai) (Bromilow, 1983).

Některé tyto pesticidy potlačily funkci nitrifikačních bakterií, což má za následek fytotoxické hromadění dusitanů (McKenry, 1981).

Z toho důvodu je snaha najít takové metody ochrany rostlin, které neohrožují necílové organismy ani životní prostředí. Vycházejí především z přirozených ekologických vztahů, reakcí a vlastností organismů. Nejčastěji se využívají a taky byly nejlépe prostudovány tyto metody: biologická, biotechnická, mechanická a fyzikální (Tichá, 2001).

3. 1. 1. Chemická ochrana

Používání toxických nematocidů pro absolutní sterilizaci půdy je značně omezováno. Používání některých látek jako je metylbromid, je už v EU zakázáno (Douda a kol., 2010).

V tuto chvíli je povoleným nematocidem Basamid Granulát s účinnou látkou dazomet. Dalším přípravkem je insekticid CAREO Combi Granulát proti škůdcům s účinnou látkou acetamiprid (Anonym A, 2012). Přípravek Basamid granulát je určen k aplikaci do půdy před setím a výsadbou. Při používání tohoto přípravku je velké riziko kontaminace podzemních vod, a to hlavně na lehkých půdách, kde je nejčastější výskyt *Meloidogyne hapla*. Je také třeba brát v úvahu negativní vliv na půdní mikrofaunu (Douda a kol., 2010).

3. 1. 2. Biologická ochrana

Používání chemických přípravků se stále snažíme nahradit kvůli vysoké toxicitě, které se snaží vyhnout integrovaná ochrana rostlin. Důvodem je také stále častější využívání systémů alternativního zemědělství, kde se tyto chemické látky nepoužívají vůbec (Douda a kol., 2010).

Biologické metody ochrany rostlin (v užším pojetí bez transgenních rostlin, použití extraktů z rostlin nebo metabolitů z mikroorganismů atd.) jsou založeny na antagonistických mezidruhových vztazích, které jsou ovlivněny celou řadou faktorů (Koubová, 2009).

V biologické ochraně proti hád'átkům se mohou využívat například aplikace rostlinných extraktů. Existuje také řada parazitických či patogenních organismů vůči fytoparazitickým druhům hád'átek. Jedná se například o zástupce říše Protozoa, schopné napadat hád'átka rodu *Meloidogyne* a další. Dále pak bakterie druhu *Pseudomonas denitrificans*, jejichž místo účinku je většinou lokalizováno v zažívacím traktu hád'átek. Množení hád'átek je zase schopna ovlivnit bakterie *Pasteuria penetrans*. Nepřátelé hád'átek mohou být i různí zástupci skupin makroorganismů jako jsou dravá hád'átka, roupice, draví roztoči a hmyz, kteří jsou obvykle součástí půdní mikrofauny. K velmi významným antagonistům hád'átek s vysokým antagonistickým potenciálem patří nematofágní houby. Vyskytují se téměř ve všech půdních ekosystémech, především v těch s vysokým obsahem organických látek (Douda a kol., 2010).

3. 2. Nematoda (Hlístice)

Hlístice patří do velmi početné skupiny především parazitických živočichů, vyvolávající mnohdy velmi vážná onemocnění epidemického charakteru. Jsou to gonochoristé s velmi výrazným pohlavním dimorfismem, samečkové jsou oproti samičce drobnější (Jelínek a Zicháček, 2005).

Pojem „hád'átka“ je celkové označení všech fytoparazitických druhů hlístic, který se v rostlinolékařské praxi užívá běžně. Jsou to mnohobuněčné nečlánkovité organismy červovitého tvaru, obvykle s protáhlými válcovitými těly pokrytými kutikulou, která je vylučovaná hypodermis nacházející se pod ní. Od kroužkovic se odlišují exoskeletem, který je tvořen pružnou kutikulou. Hlístice také nemají specializovaný oběhový a dýchací systém, naopak dobře vyvinutou mají zažívací, nervovou a rozmnožovací soustavu. Pohlaví jsou většinou oddělena. Životní cyklus je většinou přímý, a to: vajíčko, čtyři larvální stádia a dospělec. Mezi každým larválním stádiem dochází ke svlékání. Dospělci některých

fytoparazitických háďátek dorůstají délky až 5 mm, ale většina dosahuje velikosti do 1 mm a průměru 0,05 mm. Parazitují na povrchu nebo uvnitř rostlin či živočichů. Mohou také žít v půdě, vodě a v rozkládající se hmotě (Maloy et Murray, 2001).

3. 2. 1. *Globodera rostociensis* (Háďátka bramborové)

Kmen: Nematoda Potts 1932

Třída: Chromadorea Inglis 1982

Podtřída: Chromdoria Pearse 1942

Řád: Rhabditida Chitwood 1933

Podřád: Tylenchida Thorne 1949

Nadčeleď: Tylenchoidea Orley 1880

Podčeleď: Heteroderinae Filipjev & Schuurmans Stekhoven 1941

Rod: *Globodera* Skarbilovich 1959

Druh: *Globodera rostochiensis*

Toto háďátko patří mezi cystotvorné sedentární druhy. Larvy 1. vývojového stupně se vyvíjejí ve vaječných obalech v cystě. Tuto cystu opouštějí teprve larvy druhého vývojového stádia. Líhnutí na jaře stimuluje látky, které produkuje hostitelská rostlina, a také teplota. Invazní larvy vyhledají hostitelskou rostlinu a pronikají do jejích vláscitých kořenů. Tam sáním vyvolávají vznik takzvaných obřích buněk, které se stávají jejich zásobárnou živin. Ve třetím stádiu se larva samičky začne zvětšovat a po dalších dvou svlékáních se z ní stává cysta. Dlouhý, tenký sameček opustí kořeny, aby mohl vyhledat a oplodnit samičku a následně hyne (Šefrová, 2006).

Napadení se po vzejití hostitelských rostlin projevuje menším vzrůstem a později rostliny vadnou. Toto vadnutí začíná od spodních listů a postupně vadne celý trs. Napadená rostlina tvoří více kořenového vlášení, a to je opět napadáno a pak předčasně odumírá. Poškozená rostlina má málo hlíz, které jsou drobné, a stává se, že i úplně chybějí (Vlk, 1985).

Háďátka bramborové tvoří zpravidla jednu generaci do roka (Häni, 1993).

Cysta háďátka bramborového má vejčitý až kulovitý tvar, kde zadní část je zaoblená a je většinou lesklá (Zouhar, 2002).

3. 2. 2. *Ditylenchus dipsaci* (Hád'átka zhoubné)

Kmen: Nematoda Potts 1932

Třída: Chromadorea Inglis 1982

Podtřída: Chromdoria Pearse 1942

Řád: Rhabditida Chitwood 1933

Podřád: Tylenchida Thorne 1949

Nadčeleď: Sphaerularioidea Lubbock 1961

Čeleď: Anguinidae Nicoll 1935

Podčeleď: Anguiniae Nicoll 1935

Rod: *Ditylenchus* Filipjev 1936

Druh: *Ditylenchus dipsaci*

Toto hád'átka patří mezi stonková neboli osní hád'átka. Tato hád'átka nesají na jednom místě, ale pohybují se v půdě a střídají hostitelé. Pronikají do rostlin, do mezibuněčných prostor a pak vysávají obsah buněk, ty potom rychle nekrotizují (Šefrová, 2006).

Hád'átka zhoubné patří k nejškodlivějším druhům a je u nás velmi rozšířené. Nejčastějším zdrojem napadení bývá půda. Hád'átka může do rostliny proniknout poraněním nebo za pomoci svých enzymů (Kazda, 2007).

Hád'átka svým styletem aplikuje do rostlinných pletiv trávicí enzymy, které poškozující živé buňky a ty potom přestávají růst. V důsledku nerovnoměrného růstu rostliny v místě poškození praskají a deformují se. Nejčastěji bývá napadeno kořenové podpučí a to způsobuje odumírání kořenů. Takto poškozená pletiva jsou často infikována bakteriemi nebo houbami a hnijí. Napadené rostliny žloutnou, rostliny krní a postupně odumírají, díky oslabení kořenového systému jdou zlehka vytáhnout z půdy (Kazda, 2005).

3. 2. 2. *Meloidogyne hapla*

Kmen: Nematoda Potts 1932

Třída: Chromadorea Inglis 1982

Podtřída: Chromdoria Pearse 1942

Řád: Rhabditida Chitwood 1933

Podřád: Tylenchida Thorne 1949

Nadčeleď: Tylenchoidea Orley 1880

Čeleď: Meloidogynidae Skarbilovich 1959

Podčeleď: Meloidogyninae Skarbilovich 1959

Rod: *Meloidogyne* Goeldi 1892

Druh: *Meloidogyne hapla*

Rod *Meloidogyne* patří mezi nejvýznamnější zástupce hálkotvorných háďátek (Vlk, 1985).

Toto hálkotvorné háďátko se může vyskytovat ve sklenicích tak i ve volné půdě. Poškozuje celou řadu kulturních i plevelných rostlin. Různě velké háčky tvořící se po napadení je možné pozorovat pouhým okem. Rostliny jsou opožděné v růstu a při příliš teplém počasí rychleji vadnou (Kazda a kol., 2007).

První vývojový stupeň probíhá ve vaječném obalu. Z toho se vylíhne infekční 2. larvální stádium. Toto líhnutí je závislé především na dostatečné teplotě a vlhkosti, ale jsou i jiné faktory jako je blízkost hostitelské rostliny a další. V půdě je 2. larvální stádium zranitelné, proto musí co nejrychleji najít hostitele. Toto stádium začíná přijímat potravu hned poté, co napadne kořen. Napadením se začnou diferencovat takzvané obří buňky. Jakmile se tyto buňky vytvoří, začne hlístice přecházet do 3. larválního stádia a po čtrnácti dnech do 4. stádia až nakonec do dospělosti (Perry et al., 2009).

2. larvální stádium nejčastěji napadá sekundární, až terciární kořínky, které vyhledává pomocí vyvinutých chemoreceptorů a proniká do nich těsně za kořenovou špičkou. Tam vyhledává buňky vodivého pletiva. Vznik obřích buněk je podmíněn jícnovými sekrety háďátka, které ovlivní buňku tak, aby se v ní hromadily živiny a voda. Takto pozmění jen buňku v nejbližším okolí, ze kterých přijímá potravu a ztrácí schopnost pohybu a přechází do nepohyblivého 3. a 4. larválního stádia. Háčka vzniká ještě během života larvy a to tak, že kolem obřích buněk dojde k nadměrnému zmnožení okolních buněk (Nováková a Zouhar, 2009).

3. 3. Nematofágní houby

Díky stejnému prostředí, ve kterém prošla háďátka i houby dlouhým vývojem, vzniklo mezi těmito druhy velké množství různých vzájemných vztahů. Nematofágní houby jsou souborem hub, který je velmi rozmanitý a obsahuje zástupce různých rodů a druhů. V tomto souboru se mohou vyskytovat tyto skupiny: 1. houby s lapacími pastmi, 2. endoparazitující houby, 3. houby parazitující na vajíčkách nebo na cystách a 4. houby produkující toxické látky pro háďátka (Barron, 1975).

Do první skupiny patří houby s relativně dobrými saprofytickými schopnostmi, zachycující háďátka do lepivých nebo mechanických pastí. Běžné druhy této skupiny jsou *Arthrobotrys oligospora* a *Dactylaria candida*. Endoparazitické houby, *Drechmeria coniospora*, infikují svými spory hlístice. Jsou to často obligátní paraziti živých hlístic a, na rozdíl od dravých druhů, mají vysokou specifitu. Třetí skupina je typická tím, že napadá pouze určitá stádia životního cyklu hlístic a to zoosporami nebo hyfami. Houby, které produkují toxiny, se většinou vyskytují na rozkládajícím se dřevě (Anke et al., 1995).

Největší nevýhodou těchto predátorů je absence pohybu a s tím spojená neschopnost vyhledání a ulovení kořisti, a to je hlavním důvodem, proč je mezi houbami predace tak málo rozšířená (Bečvář, 1999a).

Tyto houby mohou být nejen predátory, ale také jim velmi podobnými parazity. Oba typy produkují chemické atraktanty a různé typy pastí (Bečvář, 1999a).

Rozdíl mezi nimi je takový, že predátor kořist zachytí do pastí, které jsou odvozeny z vláken hub, a po zachycení kořisti ji pevně připoutá k myceliu. U parazitů není cílem houby chycení kořisti, ale pouhé zachycení jedné a více konidií, tedy zárodků nového jedince, na tělo hostitele, které jej odnáší a tím zajišťuje nejen zdroj energie, ale také možnost rozšíření (Bečvář, 1999a).

Kořistí houbových predátorů bývají obvykle organismy do velikosti asi 100 μ m, čili prvoci, někdy také chvostokoci, klanonožci, želvušky, někdy i malí roztoči a v neposlední řadě háďátka. Dravé houby se vyskytují hlavně v půdním humusu nebo v tlejícím dřevě, mnoho z nich žije i vodě. Většina těchto predátorů ale není striktně vázána na kořist. Tento druh výživy může být do jisté míry náhodný, protože spoléhat se na nepřetržitý přísun tohoto druhu potravy by silně omezil životaschopnost těchto hub. Většina těchto fakultativních predátorů využívá tento typ potravy jako zdroj dusíku a ne pro přísun energie. Jde o houby žijící

v chudším prostředí na dusík, jako je dřevo. Vznik samotných pastí indukuje více faktorů, a to jak endogenních, tak exogenních. Může to být například stáří mycelia, obsah minerálních látek v myceliu, nutriční hodnota substrátu, vlhkost, pH, světlo nebo také produkce látek potenciální kořisti, například háďátky, jejichž přítomnost v prostředí spouští tvorbu pastí (Bečvář, 1999a).

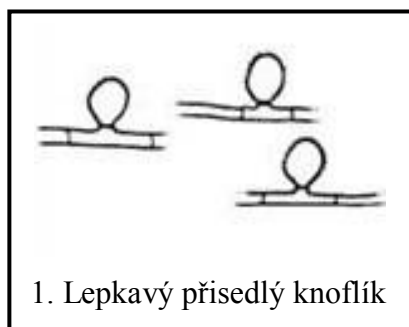
3. 3. 1. Lapací struktury hub

Mezi základní životní strategie hub patří saprofytismus, parazitismus a predace. Houby řádu Orbiliaceae (kmen- Ascomycota) se živí živočichy prostřednictvím specializovaných struktur určených k lovu. Je známo pět typů lapacích struktur, ale jejich evoluční původ a odlišnosti příliš známé nejsou (Yang et al., 2007).

Na základě komplexní fylogenetické analýzy bylo prokázáno, že první lapací struktura se vyvíjela ve dvou liniích, ze kterých vznikly dva mechanismy. Jeden se vyvinul do škrťáčích kroužků a druhý se rozvinul do lepících pastí. Co se týče lepících pastí, nejprve se ve vývoji oddělily lepící sítě, které se dále pomalu vyvíjely samostatně. Lepící knoflík se vyvinul prodloužením stonku a z něj se vyvinula fixní oka. Vývoj lapacích pastí dokládá adaptivní evoluci těchto hub (Yang et al., 2007).

Je známo až 11 typů lapacích struktur, které jsou úspěšně houbami využívány. Tyto lapací struktury neboli pastí se vyznačují velkou různorodostí. I velmi podobný mechanismus chytání se nemusel vyvinout ze stejného fylogenetického původu, ale na druhé straně pastí velmi odlišné mohou být původu stejného. Různé typy pastí jsou velmi dobře prostudovány a tak mohou být používány jako charakteristický znak při taxonomickém zařazování. Některé houby někdy disponují více typy lapacích pastí. U některých, obvykle obligátních, predátorů dochází k tomu, že spora nevyklíčí hyfou nýbrž rovnou pastí. Označujeme je za konidiální pastí a stává se, že někdy fungují jako trvalá stádia (Bečvář, 1999a).

3. 3. 1. 1. Lepkavý přisedlý knoflík (sessile adhesive knob)



1. Lepkavý přisedlý knoflík

Tuto past tvoří kulovitá nebo podlouhlá buňka pokrytá lepavou vrstvou. Někdy dojde k proliferaci a pak vytvoří kratší větve, které se mohou ohýbat a tak vytvářejí oblouky. (Bečvář, 1999b).

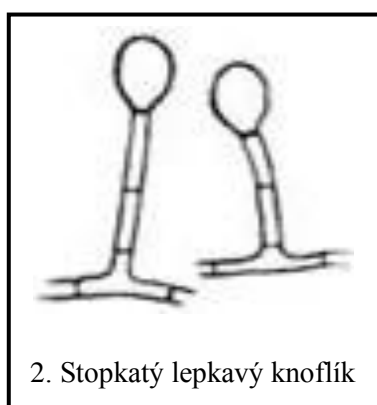
Kulovitý tvar knoflíku má nevýhodu v tom, že styčná plocha s kořistí je malá, což má za následek větší možnosti úniku

brání se hlístice. Tento fakt se houba snaží překonat několika způsoby. Například, když se hlístice přichytí, začne houba produkovat více lepicí látky a tím zvýší mnohonásobně plochu uchycení (Dowsett et al., 1977a,b).

Lepkové knoflíky jsou rozmístěny po celé délce hyf, takže když je hlístice chycena a snaží se vymanit, svým pohybem se tak naváže na několik dalších knoflíků (Nordbring-Hert et Stalhammar-Carlemalm, 1978).

V některých případech se stává, že hlístice z pasti unikne, protože se lepkavý knoflík odlomí v místě přepážky. Zůstává přichycen na kořisti. Následně na kořisti vyklíčí jako obvykle. Tento jev je běžný u několika druhů (Barron, 1975).

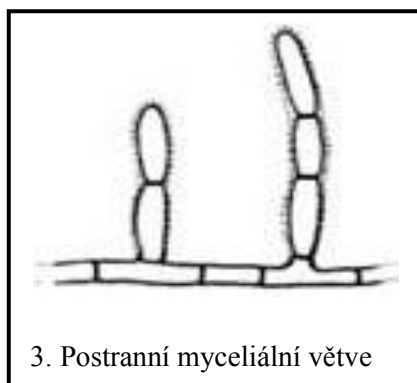
3. 3. 1. 2. Stopkatý lepkavý knoflík (stalked adhesive knob)



2. Stopkatý lepkavý knoflík

Stopkatý lepkavý knoflík je past založena na stejném principu jako přisedlý lepkavý knoflík. Jak je již z názvu patrné, jejich rozdíl je v tom, že stopkatý knoflík je vyvýšen několika buněčnými vlákny nad mycelium. Ačkoliv chytání kořisti probíhá stejným způsobem, je tato past efektivnější díky vynesení pasti do prostoru. Houby s tímto typem pastí mohou chytat háďátka (ovšem ne vždy příliš selektivně) a také chvostokoky (Bečvář, 1999b).

3. 3. 1. 3. Postranní myceliální větve (adhesiv branches)

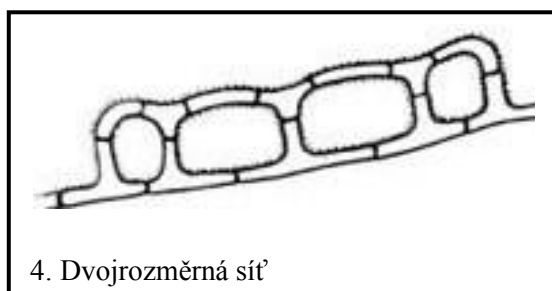


3. Postranní myceliální větve

Lepící větve jsou další lapací pasti s jednoduchou morfologií, vzniklé z nemodifikovaných hyf, které jsou pokryté adhezivní vrstvou. Celá větev bývá pokryta vrstvou lepicí látky, tak aby při styku hlístice s jakoukoliv částí hyfy byla kořist chycena. Vzpřímené větve, tedy většinou rostoucí kolmo na nosnou hyfu, jsou obvykle složeny z 1- 3 článků. Tyto větve mají často tendence k anastomózám a

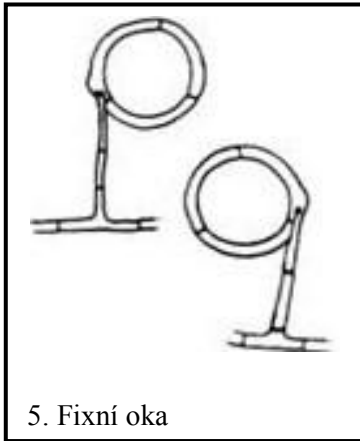
vytvářejí tak lepicí oblouky či dvojrozměrné sítě.

Lepící větve vyrůstají blízko u sebe, tak aby se kořist, která se snaží z pasti vymanit svým pohybem, přilepila k dalším lepicím větvím způsobem, aby nemohla uniknout (Gray, 1987).



4. Dvojrozměrná síť

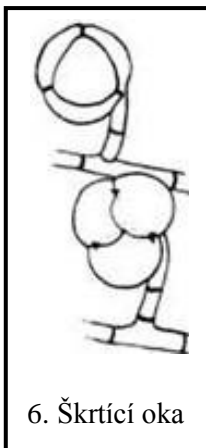
3. 3. 1. 4. Fixní oka (non-constricting rings)



S tímto lapacím mechanismem se setkáváme zřídka, je znám pouze u čtyř druhů nematofágních hub. Fixní oka vyrůstají ze vztyčených bočních větví vyrůstajících z vegetativní větve. Oko je tvořeno třemi nebo čtyřmi buňkami na tenké hyfě. Hlístice je pasivně chycena zaklíněním jejího těla do prstence. Čím více se snaží hlístice vymanit z prstence, tím víc je vklíněna a stažená pastí. Může se stát, že se kroužek od mycelia odlomí a hlístice unikne, ale kroužek na jejím těle

zůstane a po čase kořist infikuje. Stejně jako u lepkavých knoflíků je pod oky slabší místo, kde dochází při bránění kořisti k utržení. Z toho můžeme usuzovat, že oddělení od mycelia je záměrné a houba se tak snaží zajistit své rozptýlení po půdním profilu (Gray, 1987).

3. 3. 1. 5. Škrťící oka (constricting ring)

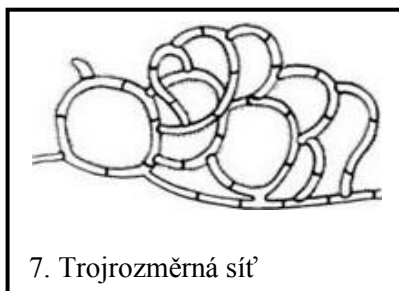


Toto je možná nejvíce agresivní a úspěšný typ lapacích struktur u hub a je znám u dvanácti druhů. Škrťící kroužky jsou pasti mechanické a nevyužívají adhezní vrstvu (Gray, 1987).

Lapací mechanismus škrťících ok je velmi odlišný od jiných pastí využívajících adhezní vrstvu. Oko této pasti je složeno ze tří buněk, které se po vniknutí kořisti do oka uzavrou kolem hlístice, a tím ji znehybní. I jiné podněty, jako styk s hrotem na vnitřní straně oka nebo teplo, mohou také někdy spustit stažení oka. Reakce je velmi rychlá a nevratná. Stažení oka je

způsobeno zvětšením objemu buněk. Mechanismus uzavírání škrťícího oka zatím není přesně znám, ale je známo, že během zvětšování buněk oka se vnitřní stěny buňky roztrhnou podél určité linie. Toto uvolnění následně vede k velmi zvýšenému příjmu vody a rozpínáním elastické vnitřní stěny buněk škrťícího oka se oko téměř uzavře (Nordbring-Hertz et al., 2006).

3. 3. 1. 6. Sítě (nets)



Nejčastější metodou lovu vyvinutou nematofágními houbami jsou trojrozměrné lepící sítě. Je známo okolo 35 druhů s touto lapací strukturou, které můžeme potkat prakticky ve všech typech půd. Mezi ty nejznámější patří *Arthrobotrys ologispora* (Gray, 1987).

Sítě vytváří velké množství vzájemně propojených smyček a oblouků. Tyto útvary se skládají do trojrozměrné sítě a vyčnívají tak nad mycelium a jsou pokryty lepící vrstvou. Nejčastější kořisti těchto hub jsou háďátka, ale mnohdy také jiní drobní živočichové, protože predátoři využívající tyto síťovité struktury k lovu, nejsou příliš selektivní. Síť se tvoří tak, že kolmo vyrůstající hyfy se stáčí bezprostředně zpět směrem k malému výrůstku, nacházejícím se na mateřské hyfě, se kterým v zápětí splývá. K přesnosti tohoto procesu napomáhají chemické atraktanty, které produkuje výrůstek v místě, kde se mají spojit (Bečvář, 1999c).

3. 3. 1. 7. Čepy (pegs)

Tato lapací struktura je opět založena na odchytu zachycením kořisti na adhezni látku. Jsou to kolíkovité útvary, které jsou pravidelně rozmístěny po hyfách, nebo se mohou vyskytovat ve skupinkách na terminálních částech protáhlých či kyjovitých výběžků, které vrůstají kolmo na hyfách (Bečvář, 1999c).

3. 3. 1. 8. Nespecifické výběžky (protuberances)

Jsou to nespecifické výběžky a hyfy mající na sobě místa s lepící látkou, které nejsou nápadně morfologicky odlišná od zbytku mycelia a na ty se kořist přichytí (Bečvář, 1999c).

3. 3. 1. 9. Stefanocysty

Jsou to specifické elipsovité útvary na myceliu nebo na bazidiosporách některých druhů hub. V místě největšího průměru z nich vyrůstají ostny, které jsou pokryty lepící vrstvou. Lapací mechanismus je v podstatě na stejném principu jako u lepkavých knoflíků. Poté co je kořist přichycena k ostnům ztrácí stefanocysty svůj původní tvar a tím umožňuje lepší přilnutí ke kořisti (Bečvář, 1999c).

3. 3. 1. 10. Vystřelovací buňky

Tento typ pastí svou stavbou připomíná malé dělo. Celý mechanismus je ukotven slizovitou lafetou k substrátu a protáhlým ústím namířeným směrem do prostoru. Pokud se přiblíží kořist, a mechanismus podráždí, okamžitě (1 sekunda) vystřelí do prostoru sporidie, které

proniknou kutikulou hlístice. Poté dochází k infekci a houba může začít parazitovat (Bečvář, 1999c).

3. 3. 2. *Arthrobotrys oligospora* Fresen. 1850

Říše: Fungi

Oddělení: Ascomycota

Pododdělení: Pezizomycotina

Třída: Orbiliomycetes

Podtřída: Orbiliomycetidae

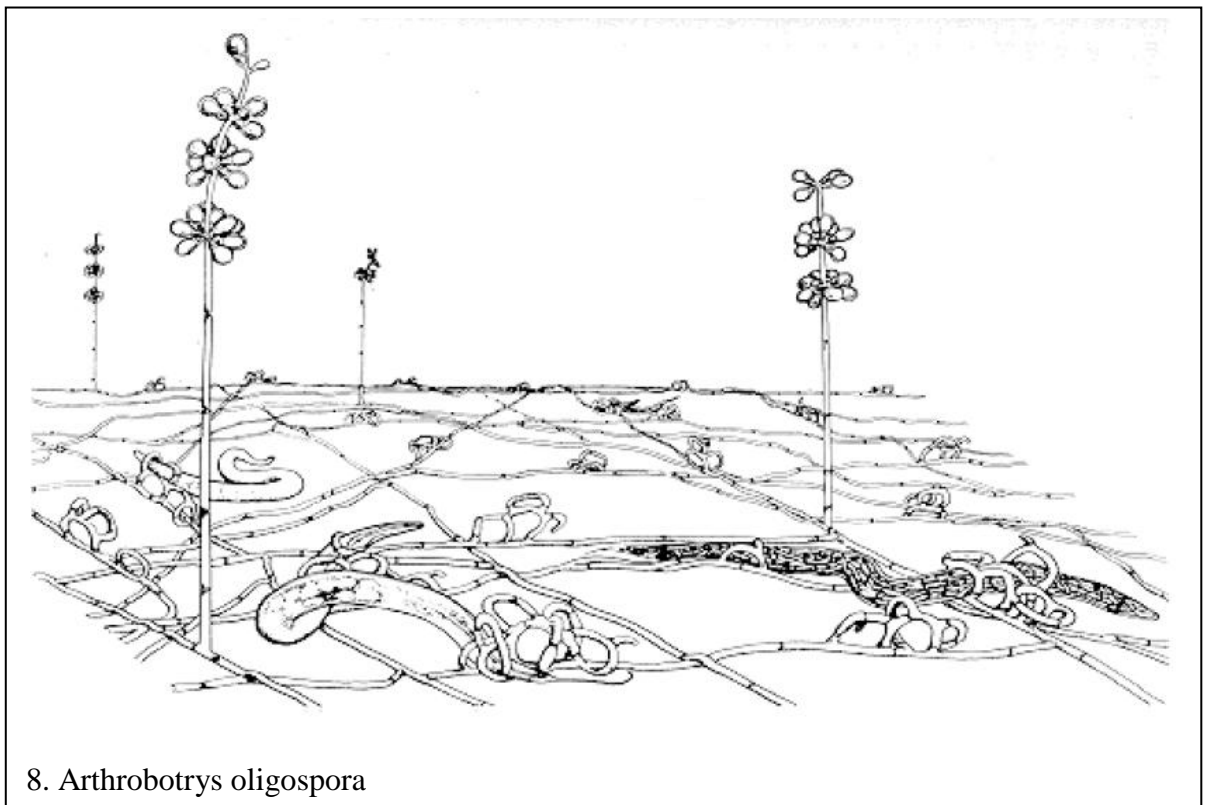
Řád: Orbiliales

Čeleď: Orbiliaceae

Rod: *Arthrobotrys*

Druh: *Arthrobotrys oligospora* Fresen 1850 (Anonym B, 2012)

Arthrobotrys oligospora je nematofágní houba patřící k nejběžnějším, nejvíce rozšířeným a nejprozkoumanějším druhům. Dá se izolovat z různých substrátů, nejčastěji z kompostů a ztrouchnivělého dřeva. Svým způsobem chování, růstem a lapací strukturou, kterou je trojrozměrná síť, se podobá *Arthrobotrys superba*. Konidiofory jsou vzpřímené a nesou 20-30 přeslenů s 5-20 dvoubuněčnými, 16-30 μm dlouhými a 8-16 μm širokými sporami (Drechsler, 1937)



3. 3. 3. *Stropharia rugosoannulata* Farl. ex Murrill 1922

Říše: Fungi

Oddělení: Basidiomycota

Pododdělení: Agariomycotina

Třída: Agaricomycetes

Podtřída: Agariomycetidae

Řád: Agaricales

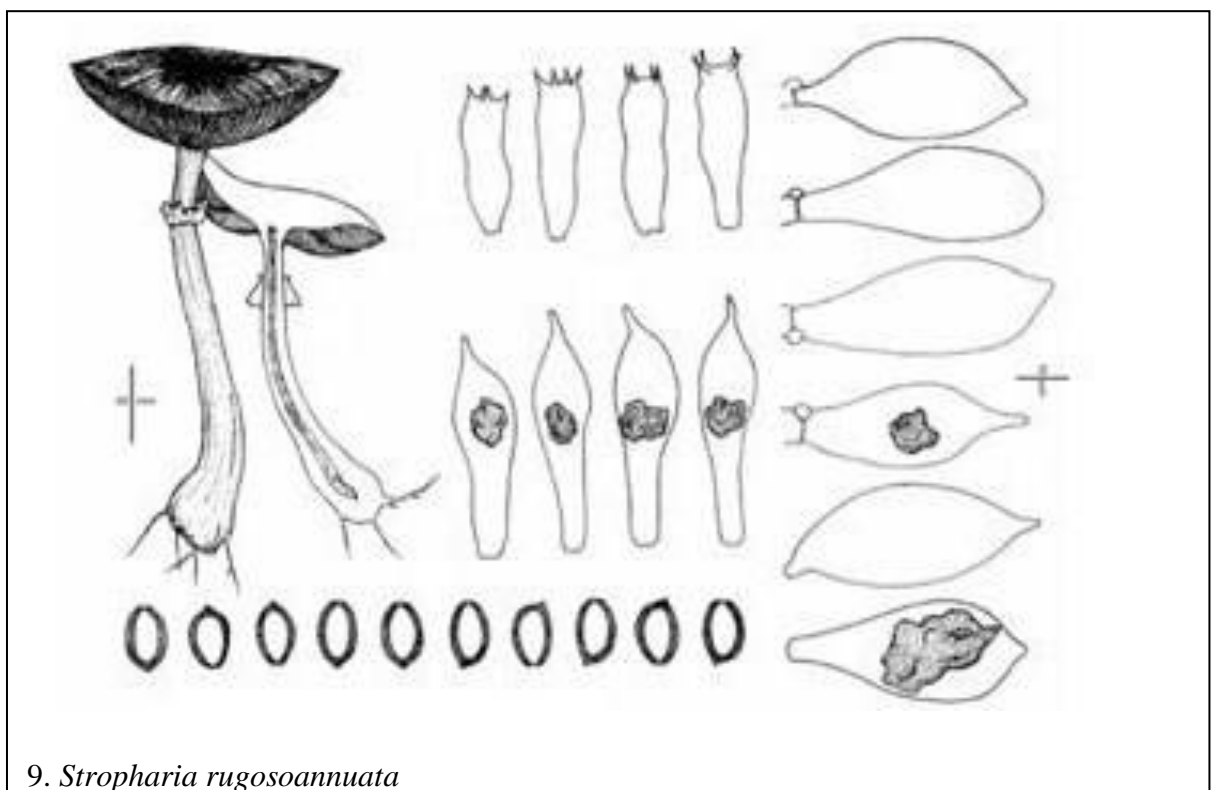
Čeleď: Strophariaceae

Rod: *Stropharia*

Druh: *Stropharia rugosoannulata* Farl. ex Murrill 1922 (Anonym b, 2012)

Druhy rodu *Stropharia* mají purpurově hnědé až tabákově hnědé spory a vyskytují se v lese, na pastvinách, kompostech a živočišném hnoji. *Stropharia* může vytvářet jedinečné hvězdicovité buňky, které se nazývají akantocyty. Schopnost *Stropharia* spp. tvořit akantocyty je charakteristické pro celý rod (Farr, 1980).

Akantocyty byly také nalezeny mezi půdními částicemi v zemině a ve dřevních štěpcích a listových nečistot v půdě. Bylo také zjištěno, že *S. rugosoannulata* produkuje více akantocyt v půdě, než na agaru (Luo, 2006).



9. *Stropharia rugosoannulata*

4. Materiál a metodika

4.1. Příprava biologického materiálu

4. 1. 1. Kultivace a namnožení hub

Pro sledování nematofágní aktivity na zvolené druhy háďátek byly zvoleny dva druhy hub s nematofágním účinkem - *Arthrobotrys oligospora* a *Stropharia rugosoannulata*. Houby byly kultivovány, množeny a uchovávány na živných půdách, které nejlépe odpovídaly podmínkám pro růst a vývoj daného druhu houby.

Pro kultivaci houby *Arthrobotrys*, která pochází ze sbírky katedry ochrany rostlin ČZU byl použit ovesný agar OA (Oat meal agar, Himedia) a kukuřičný agar CMA (corn meal agar, Himedia). Podle návodu bylo naváženo potřebné množství agaru do Erlenmeyerovy baňky a přidáno potřebné množství vody. Baňka byla poté uzavřena dvojitou vrstvou alobalu a v případě OA byl ještě před uzavřením vložen špunt vyrobený z buničiny. V tlakovém hrnci došlo k úplnému rozpuštění agaru a následně při teplotě 121 °C po dobu 20 minut sterilizaci media. Agar byl po té rozlit do Petriho misek za dodržení co největší sterility v očkovací místnosti v laminárním boxu. Samotné přeočkování hub bylo také prováděno ve sterilním prostředí v laminárním boxu.

Složení ovesného agaru v g/l

| | |
|--------------|------|
| Ovesná mouka | 60 |
| Agar | 12,5 |
| Výsledné pH | 7,2 |

Složení kukuřičného agaru v g/l

| | |
|------------------|-----|
| Kukuřiční infuse | 50 |
| Agar | 15 |
| Výsledné pH | 6,0 |

Pro kultivaci houby *Stropharia*, která byla získána z naočkovaného substrátu používaného pro komerční prodej, byl použit kukuřičný agar CMA (corn meal agar, Himedia). Pro zamezení růstu případných bakterií agar obsahoval tetracyklin (0,1 g na 1 l).

Pro testování nematofágní aktivity těchto dvou druhů hub byly použity kultury mycelia namnožené v tekutých médiích. V případě *Arthrobotrys oligospora* bylo použito médium obsahující sladový extrakt a pepton.

Složení v g/l

| | |
|--------------------|----|
| sladový extrakt | 30 |
| mykologický pepton | 5 |

Stropharia byla namnožena v tekutém mediu 2% Malt extract powder (MEP, Himedia), což je vodní extrakt z naklíčených zrn sladovnického ječmene.

Pro jednotlivé agary byly naváženy látky a ty rozpuštěny v ddH₂O v dvoulitrové Erlenmeyrově baňce opatřené disruptory, které umožnily dostatečné provzdušnění množených kultur. Média byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 min. Po vychladnutí médií, byla média naočkována myceliem setřeným z jedné Petriho misky (90 mm). Kultury hub byly inkubovány při pokojové teplotě 22-24 °C a třepány na horizontální třepačce (IKA-KS 260 Basic) při otáčkách 200 - 250.

Po dostatečném namnožení byly kultury hub připravené na pevných živných médiích použity pro sledování nematofágní aktivity proti zvoleným druhům háďátek v *in vitro* testech a kultury hub připravené v tekutém mediu použity v nádobových pokusech.

4. 1. 2. Příprava háďátek

Příprava *Caenorhabditis elegans*:

Pro *in vitro* testy byl použit modelový druh háďátek *Caenorhabditis elegans*. Toto háďátko bylo množeno na NGM (nematode growth medium).

Složení NGM v g/l

| | |
|----------------------|-----|
| NaCl | 3 |
| pepton (bakteriální) | 2,5 |
| agar (bakteriální) | 17 |

Směs těchto látek byla smíchána s potřebným množstvím vody a sterilizována v autoklávu po dobu 30 minut při teplotě 121 °C. Po vychladnutí média bylo sterilně ve flowboxu přidáno: 1 ml cholesterolu (rozpuštěný v etanolu 5 mg na 1 ml), 1 ml sterilního 1M CaCl₂, 1 ml sterilního 1M MgSO₄ a 25 ml sterilního 1M KPO₄ (pH 6). Poté bylo médium rozlito do 90

mm Petriho misek. Na připravené medium bylo aplikováno 50 mikrolitrů *E. coli* (OP 50). Petriho misky byly uzavřeny parafilmem a inkubovány při pokojové teplotě. Po nárůstu kolonie bakterií *E. coli* bylo do každé Petriho misky přidáno 20 samiček háďátek *C. elegans*.

Příprava *Globodera rostochiensis*:

Pro nádobové pokusy s háďátkou rodu *Globodera rostochiensis* bylo potřeba si připravit cysty tohoto háďátka. Cysty byly získány z kontaminované půdy extrakcí pomocí Fenwickovy flotační nádoby.

Příprava *Ditylenchus dipsaci*:

Háďátka rodu *Ditylenchus dipsaci* byla namnožena na čekance odrůdy Bravo a Pan di Zuccheru. Nejdříve byly rostliny čekanky namnoženy a ve fázi 4-5 listů byly přidány k listům háďátka jako suspenze. Háďátka byla získána z napadených rostlin Baermannovou metodou.

Příprava *Meloidogyne hapla*:

Pro pokus s háďátkou rodu *Meloidogyne hapla* byla použita kontaminovaná půda tímto druhem.

4. 2. Příprava pokusů

4. 2. 1. Příprava *in vitro* testů

Nejprve byl připraven rose bengal agar (RBA, Himedia) s 20% obsahem jednotlivých živin. Agar byl sterilizován po dobu 20 minut v tlakovém hrnci.

Složení agaru v g/l

| | |
|--------------------------------|------|
| dextrosa | 10 |
| dihydrogenfosforečnan draselný | 1 |
| sojový pepton | 5 |
| bengálská červeň | 0,05 |
| síran hořečnatý | 0,5 |
| agar | 15 |

Veškerý použitý materiál byl před jeho použitím řádně sterilizován. Krycí a podložní sklička byla zabalena do alobalu, vložena do kádinky, která byla taktéž přikryta alobalem a poté byla vložena a sterilizována v tlakovém hrnci po dobu 15 minut. Do Petriho misky byl vložen filtrační papír a malá Petriho miska a vše bylo po dobu 15 minut sterilizováno UV zářením ve flowboxu. Poté byl filtrační papír navlhčen destilovanou vodou, aby bylo udrženo vlhké prostředí pro dobrý růst houby. Podložní skličko bylo sterilně vloženo do Petriho misky na vrchní díl malé Petriho misky. Agar byl nanesen na skličko skleněnou tyčinkou a jehlou, která byla nejprve vysterilizována krátce nad plamenem, bylo přeneseno malé množství houby a poté byl agar přikryt krycím skličkem. Velikost nanesené kapky nemohla být moc velká, aby po přikrytí krycím skličkem agar nezaujímal celý prostor pod skličkem, aby se poté lépe vkládala háďátka. Petriho misky byly uzavřeny parafilmem a inkubovány v termostatu při teplotě 22°C po dobu tří dnů: Poté byla přidána háďátka. 50-ti mikrolitrovou pipetou byly háďátka aplikovány pod okraj krycího sklička. Množství aplikovaných háďátek bylo zjištěno pod binokulární lupou a poté bylo skličko vloženo zpět do Petriho misek a opět zafixováno parafilmem. Petriho misky byly ponechány další tři dny v termostatu a potom byl vyhodnocen účinek nematofágních hub.

4. 2. 2. Příprava nádobových pokusů

Pokusy byly zakládány ve skleníkových podmínkách.

4. 2. 2. 1. *Globodera rostochiensis* x *Arthrobotrys oligospora*

Jako vhodná hostitelská rostlina pro tento druh háďátka byla zvolena citlivá odrůda bramboru kříženec HR 23/495. Pokus byl založen v květináčích 13x13 cm. Jako substrát byl použit čistý písek. Do každého květináče byla vložena jedna hlíza a k ní bylo přidáno 10 cyst *G. rostochiensis*. Takto bylo připraveno 60 květináčů. 15 jich bylo ponecháno bez nematofágní houby jako negativní kontrola. Poté byly tři varianty po 15 květináčích. Ty byly zality suspenzí nematofágní houby s koncentrací: u první varianty 250 mg na 1 ml, u druhé 500 mg na 1 ml a u třetí 1000 mg na 1 ml.

4. 2. 2. 2. *Ditylenchus dipsacii* x *Arthrobotrys oligospora*

V tomto případě byl pokus připraven do květináčů velikosti 10x10, kde do pěstebního substrátu byly umístěny suché listy napadené čekanky. Do každého květináče byly vysety dvě semínka čekanky odrůdy Bravo. 15 květináčů bylo ponecháno bez ošetření nematofágní houbou jako negativní kontrola a ostatní byly zality třemi koncentracemi roztoku

s nematofágní houbou. V první variantě byla použita suspenze s koncentrací 250 mg nematofágní houby na 1 ml, u druhé 500 mg na 1 ml a u třetí 1000 mg na 1 ml.

4. 2. 2. 3. *Meloidogyne hapla* x *Arthrobotrys oligospora*

Tento pokus byl založen v květináčích o velikosti 9x9 cm. K výsevu byla použita kontaminovaná půda háďátky rodu *Meloidogyne hapla*. Do každého květináče byla vyseta čtyři semínka mrkve odrůdy Nanténská. Jako u výše uvedených pokusů bylo 15 neošetřených kontrolních nádob a další tři varianty opět po 15 květináčích. Kdy v první variantě byla použita suspenze s 250 mg nematofágní houby na 1 ml, u druhé 500 mg na 1 ml a u třetí 1000 mg na 1 ml.

4. 2. 2. 4. *Meloidogyne hapla* x *Stropharia rugosoannulata*

V tomto pokusu byla opět použita kontaminovaná půda, do které byl nejprve přidán roztok s nematofágní houbou, kromě 10 květináčů, které byly použity jako kontrolní varianta. Po týdně inkubace *S. rugosoannulata* v půdě byly do květináčů vysazeny dvě tentokrát již předpěstované rostlinky mrkve odrůdy Nanténská. Varianty byly po 10 květináčích, kdy v první variantě byla použita suspenze s 600 mg nematofágní houby na 1 ml, u druhé 400 mg na 1 ml a u třetí 200 mg na 1 ml.

Testy byly hodnoceny po dostatečném nárůstu rostlin a kontrolním prohlédnutím příznaků způsobených háďátkou na rostlině z kontrolní varianty.

4. 3. Vyhodnocení testů

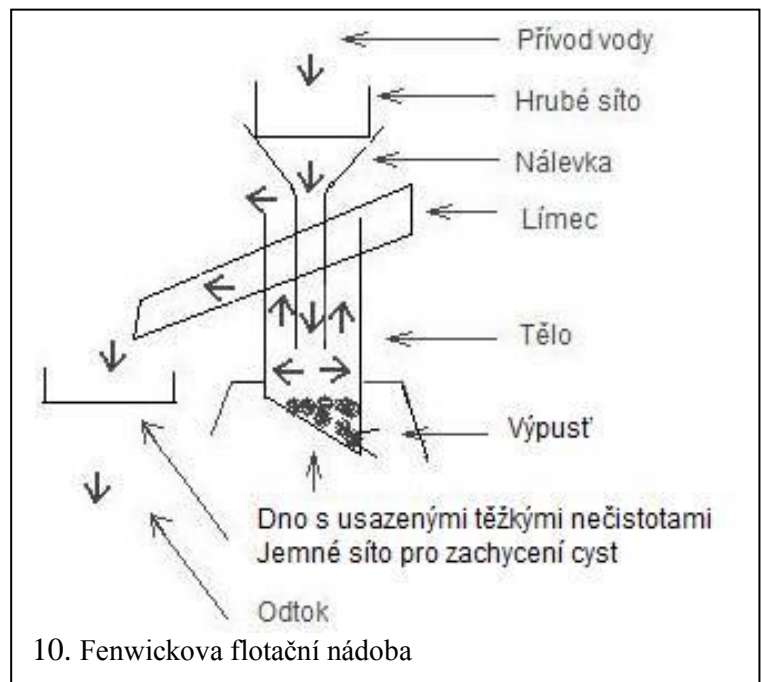
4. 3. 1. Vyhodnocení *in vitro* testů

V průběhu testu byly zaznamenávány počty uhynulých háďátek. Počítání byli pouze mrtví jedinci očividně usmrcení působením nematofágní houby.

4. 3. 2. Vyhodnocení nádobových pokusů

4. 3. 2. 1. Extrakce cyst *Globodera rostociensis* z půdy

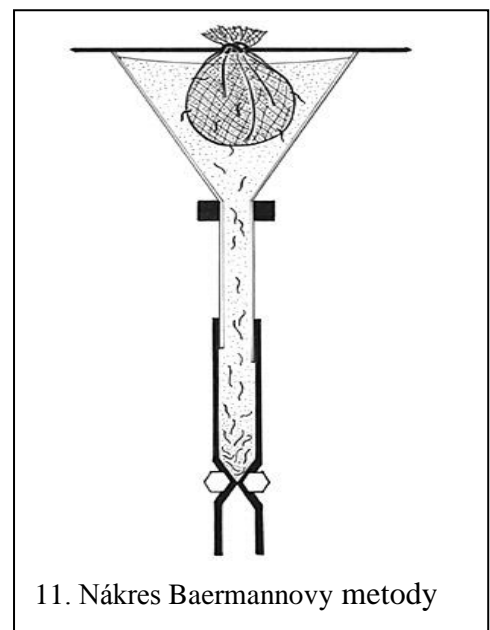
Pro zjištění počtu cyst byla použita extrakce cyst pomocí Fenwickovy flotační nádoby. Na hrubé síto byl vysypán veškerý obsah květináče. Proudem vody obsah bez větších nečistot propadl sítem a byl s proudem unášen ke dnu, kde zůstal těžký písek. Ostatní lehké částice včetně cyst byly vynášeny nahoru k límci nádoby, kterým voda odtéká. Přes hranu konve se dostávají



jen ty nejlehčí částice a odtékají límcem, pod kterým je velmi jemné síto zachycující cysty a ostatní jemné částice, které byly vodou vyneseny. Obsah na sítu se pomocí vody jemně rozprostřel, aby se cysty pod binokulární lupou lépe počítaly.

4. 3. 2. 2. Extrakce háďátek *Ditylenchus dipsaci* pomocí Baermannovy metody

Čekanka byla nejprve nakrájena na menší kousky. Tyto kousky byly zabaleny do jedné vrstvy kapesníku a poté položeny na síťovinu umístěnou v nálevce. Na nálevku umístěnou na stojanu byla připevněna silikonová hadička s kovovou tlačkou a pod ní umístěna kádinka. Do nálevky bylo přidáno dostatečné množství vody tak aby byl celý vzorek pod hladinou. Po vyplavení háďátek do oblasti silikonové hadičky byla pomocí tlačky odpuštěna voda obsahující háďátka.



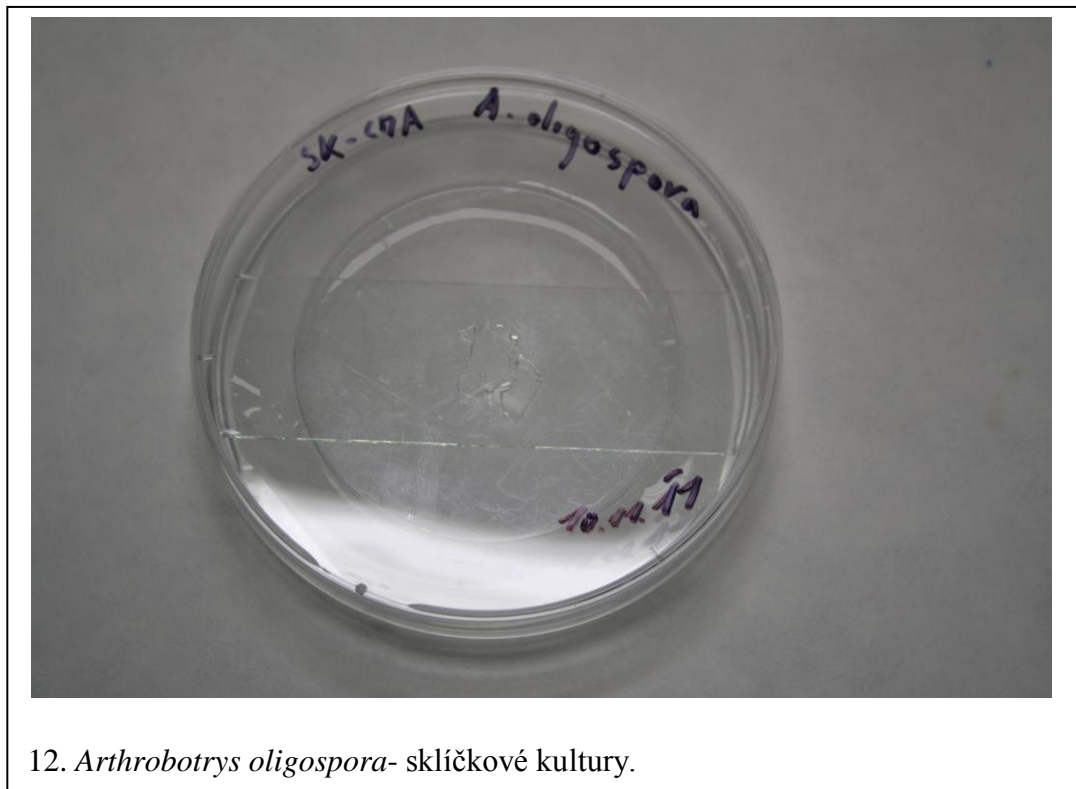
4. 3. 2. 3. Barvení háďátek *Meloidogyne hapla* na kořenech mrkve

Kořínky mrkve byly nejprve důkladně propláchnuty vodou. Kořínky jsou velmi jemné, a proto bylo při proplachování postupováno velmi opatrně. Dobře propláchnuté kořínky byly odbarveny v roztoku sava s destilovanou vodou v poměru 1:9. Kořeny v takto ředěném savu byly ponechány 10 minut a poté důkladně opláchnuty vodou. Dále byly přemístěny do kádinky, do které bylo přidáno 40 ml destilované vody a 10 kapek fuchsiového barviva. Kádinka byla dána na vařič a po přivedení do varu byla nechána 3 minuty vařit a následně 10 minut chladnout. Takto obarvené kořínky byly umístěny do polypropylenové zkumavky a zality 10 ml glycerolu s přidáním 5 kapek kyseliny chlorovodíkové. Obsah zkumavky byl přesunut do Petriho misky, kořínky rozprostřeny a za pomoci pinzety byly prohlédnuty kořínky a pomocí binokulární lupy bylo spočítáno množství háďátek.

5. Výsledky

5. 1. Výsledky *in vitro* testů

V *in vitro* testech byly testovány houby rodů *Arthrobotrys oligospora*, *Pochonia chlamydosporia*, *Dactylellina lysipaga*, *Monacrosporium phymatophagum* na modelovém druhu háďátka *Caenorhabditis elegans*. V těchto testech vykazovala největší nematofágní aktivitu houby rodu *Arthrobotrys oligospora*.



12. *Arthrobotrys oligospora*- sklíčkové kultury.

5. 2. Výsledky nádobových pokusů

Výsledky byly vyhodnoceny na základě počtu vyskytujících se háďátek ve variantách a srovnány s počtem háďátek vyskytujících se v negativní kontrole.

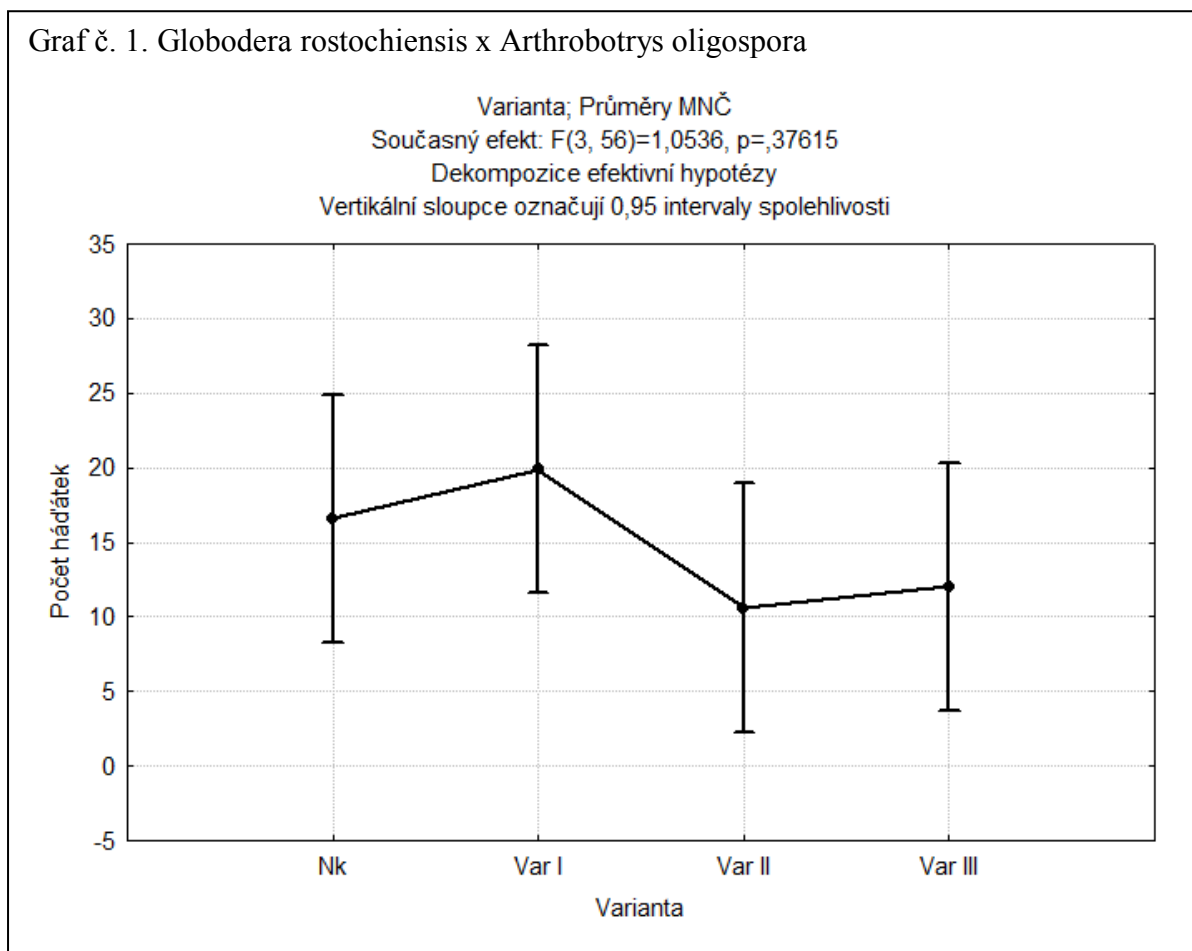
5. 2. 1. *Globodera rostochiensis* x *Arthrobotrys oligospora*

V nádobovém pokusu, kde byla testována nematofágní aktivita houby *Arthrobotrys oligospora* na háďátko rodu *Globodera rostochiensis* se v negativní kontrole v průměru vyskytovalo 17 háďátek na jeden květináč. V první variantě, která byla ošetřena nematofágní houbou suspenzí obsahující 250 mg houby na 1 ml byl v průměru 20 háďátek na květináč. Ve druhé variantě, kde ošetřující suspenze obsahovala 500 mg houby na 1 ml bylo 11 háďátek na květináč a ve třetí variantě, kde byla největší koncentrace *A. oligospora* suspenze 1000 mg houby na 1 ml bylo 12 háďátek na květináč.

Tabulka č. 1 počty zjištěných háďátek rodu *G. rostochiensis* v jednotlivých květináčích

| Negativní kontrola | Vraianta I 250 mg | Varianta II 500 mg | Varianta III 1000 mg |
|--------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| 5 | 6 | 13 | 5 |
| 23 | 19 | 18 | 5 |
| 17 | 26 | 12 | 64 |
| 24 | 16 | 11 | 15 |
| 14 | 24 | 17 | 11 |
| 8 | 8 | 8 | 32 |
| 25 | 105 | 9 | 0 |
| 39 | 31 | 7 | 4 |
| 10 | 14 | 4 | 2 |
| 35 | 5 | 16 | 4 |
| 14 | 6 | 12 | 8 |
| 15 | 6 | 2 | 17 |
| 12 | 17 | 7 | 4 |
| 5 | 7 | 13 | 7 |

Při statistickém zpracování na hladině významnosti 95 % bylo zjištěno, že mezi variantami a kontrolou není statisticky významný rozdíl, což je patrné i z následujícího grafu (Graf č. 1).



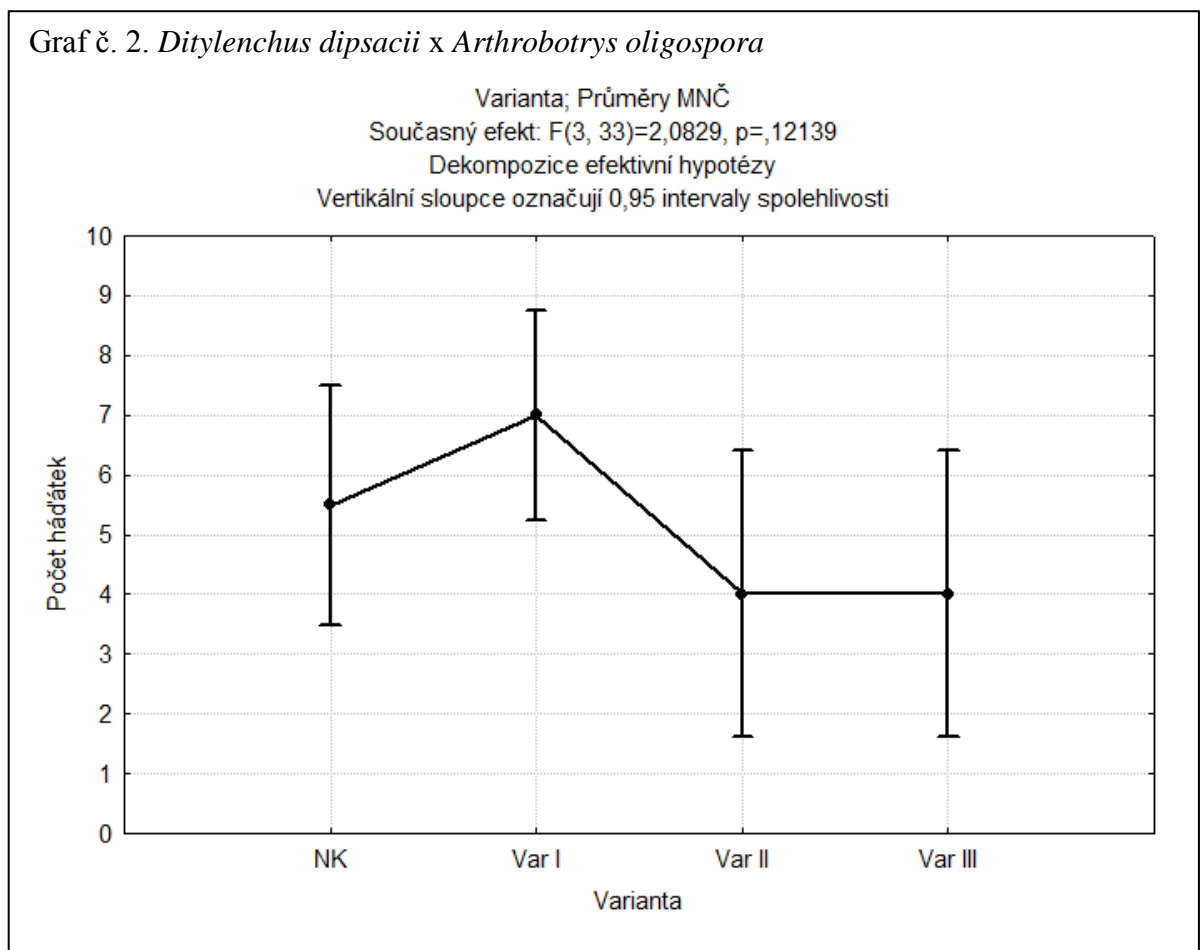
5. 2. 2. *Ditylenchus dipsaci* x *Arthrobotrys oligospora*

V tomto pokusu byl sledován vliv nematofágní aktivity *Arthrobotrys oligospora* na háďátko *Ditylenchus dipsaci*. V negativní kontrole bylo při vyhodnocování napočítáno v průměru 6 háďátek na květináč. V první variantě, která obsahovala suspenzi s 250 mg houby na 1 ml bylo zjištěno 7 háďátek na květináč. U druhé varianty, která byla ošetřena suspenzí obsahující 500 mg houby na 1 ml byly napočítány 4 háďátka na květináč a v třetí variantě s nevyšší koncentrací houby a to 1000 mg na 1 ml bylo taktéž v průměru napočítána 4 háďátka na květináč.

Tabulka č. 2 počty zjištěných háďátek rodu *D. dipsacii* v jednotlivých květináčích

| Negativní kontrola | Vraianta I 250 mg | Varianta II 500 mg | Varianta III 1000 mg |
|--------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 3 | 3 | 3 |
| 4 | 4 | 4 | 4 |
| 5 | 5 | 5 | 5 |
| 6 | 6 | 6 | 6 |
| 7 | 7 | 7 | 7 |
| 8 | 8 | 1 | 1 |
| 9 | 9 | 2 | 2 |
| 10 | 10 | 3 | 3 |
| | 11 | 4 | 4 |
| | 12 | 5 | 5 |
| | 13 | 6 | 6 |
| | | 7 | 7 |

Při statistickém zpracování výsledků na hladině významnosti 95 % nebyl mezi variantami a negativní kontrolou nalezen statisticky významný rozdíl. Na grafu č. 2 je podobnost souboru znatelná.



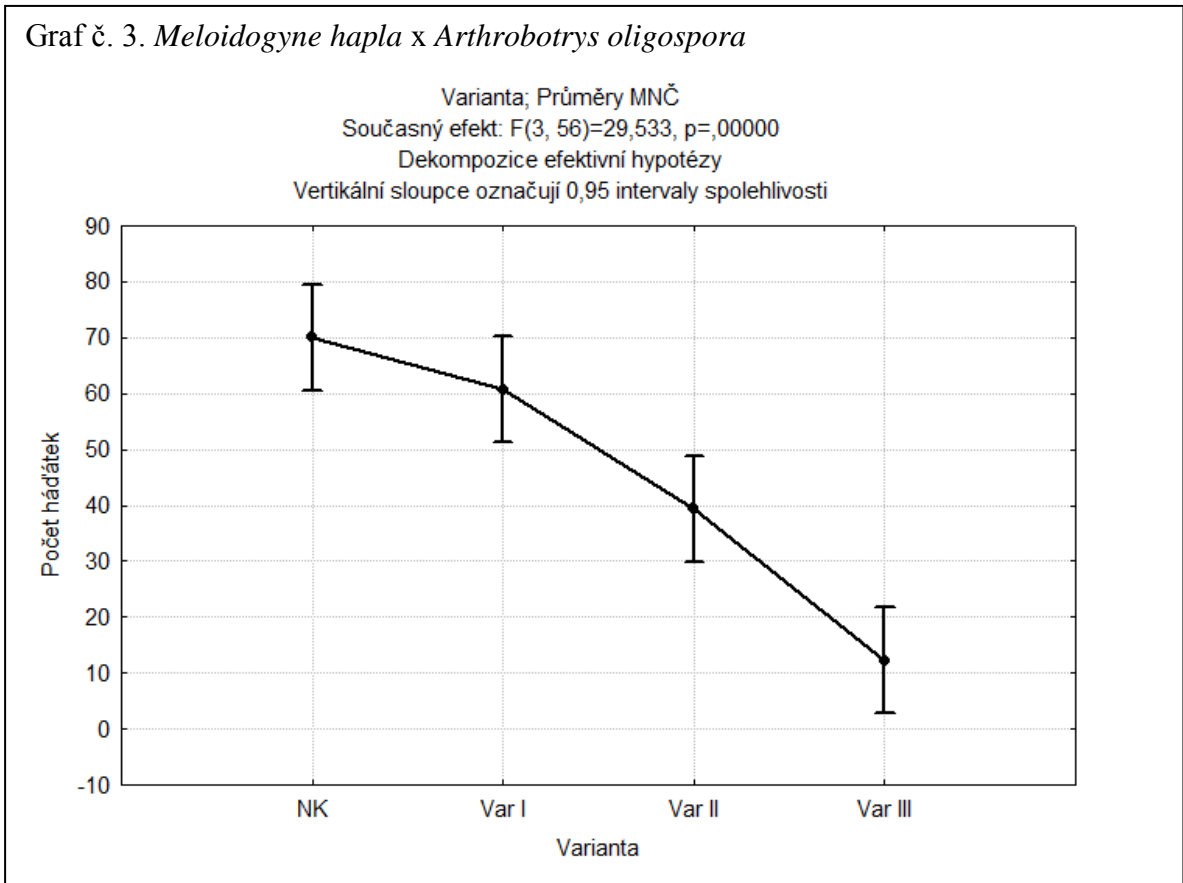
5. 2. 3. *Meloidogyne hapla* x *Arthrobotrys oligospora*

Pokus, ve kterém byl testován vliv nematofágní aktivity *Arthrobotrys oligospora* na *Meloidogyne hapla* bylo zjištěno, že v negativní kontrole se v průměru nacházelo 70 háďátek. V první variantě, která obsahovala suspenzi s 250 mg houby na 1 ml, bylo zjištěno 61 háďátek. Ve druhé variantě ošetřené suspenzí s 500 mg houby na 1 ml bylo 39 háďátek a ve třetí variantě, kde bylo v suspenzi ještě o 500 mg na 1 ml více houby bylo napočítáno pouze 12 háďátek.

Tabulka č. 3 počty zjištěných háďátek rodu *M. hapla* v jednotlivých květináčích

| Negativní kontrola | Vraianta I 250 mg | Varianta II 500 mg | Varianta III 1000 mg |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 56 | 56 | 35 | 11 |
| 85 | 101 | 31 | 16 |
| 45 | 54 | 29 | 15 |
| 64 | 64 | 27 | 15 |
| 35 | 78 | 34 | 5 |
| 56 | 52 | 32 | 6 |
| 48 | 45 | 56 | 22 |
| 75 | 63 | 21 | 10 |
| 98 | 48 | 56 | 19 |
| 64 | 56 | 48 | 5 |
| 36 | 51 | 51 | 21 |
| 56 | 45 | 58 | 14 |
| 102 | 54 | 45 | 7 |
| 152 | 78 | 39 | 10 |

Statistické zpracování výsledů na hladině významnosti 95 % nám potvrdilo statisticky významné rozdíly mezi negativní kontrolou a variantami a i mezi variantami mezi sebou navzájem. Z grafu č. 3 je patrné, že čím větší je koncentrace houby *Arthrobotrys oligospora* v suspenzi, která byla přidána do květináče, tím menší je výskyt háďátek rodu *Meloidogyne hapla*.



5. 2. 4. *Meloidogyne hapla* x *Stropharia rugosoannulata*

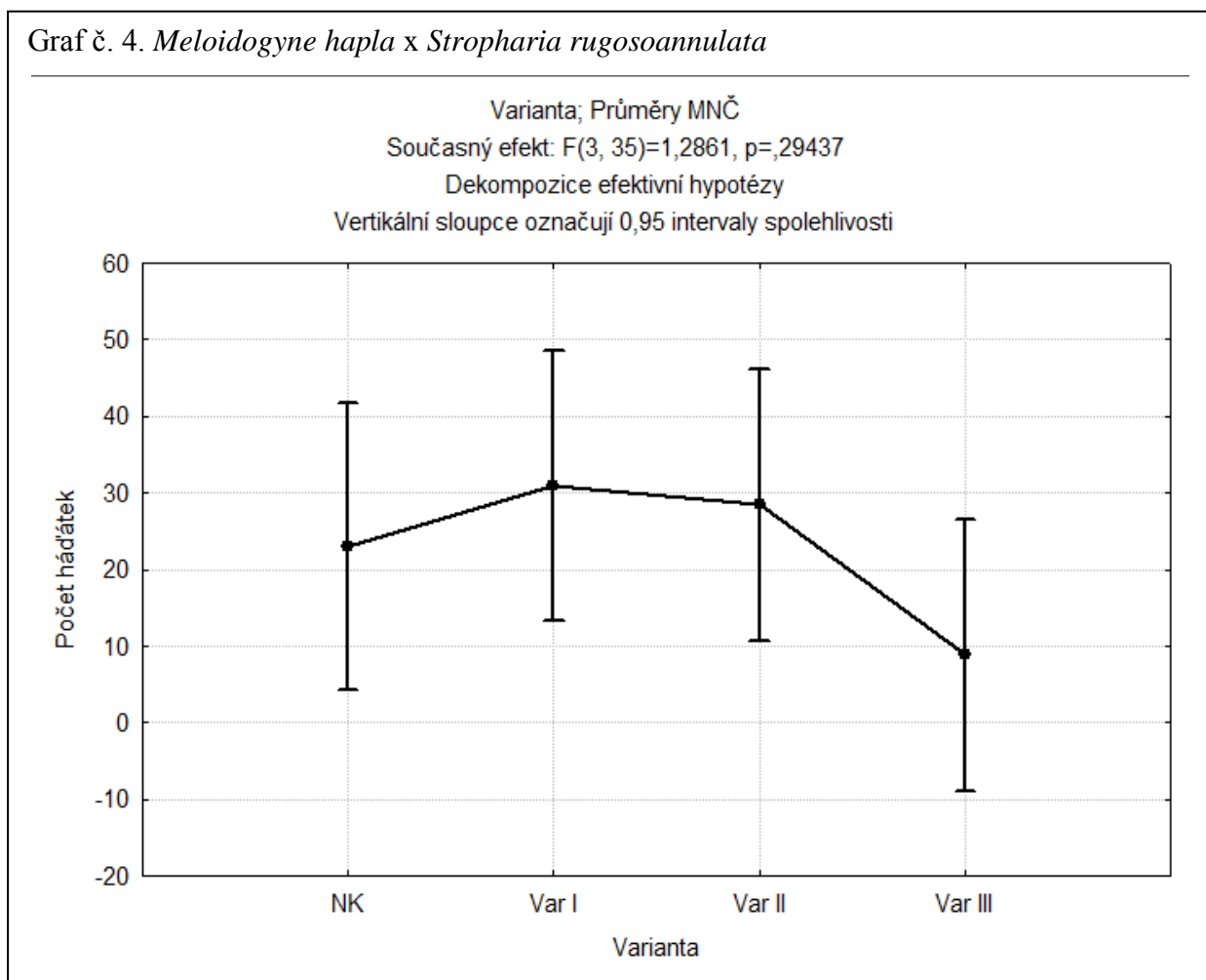
V tomto pokusu byl sledován vliv nematofágní aktivity houby rodu *Stropharia rugosoannulata* na háďátko rodu *Meloidogyne hapla*. V negativní kontrole bylo zjištěno v průměru 23 háďátek na květináč. V první variantě s nejsilnější koncentrací houby v suspenzi a to 600 mg na 1 ml bylo v průměru 31 háďátek na květináč. V druhé variantě, která byla ošetřena suspenzí s koncentrací 400 mg na 1 ml bylo nalezeno 28 háďátek a ve třetí variantě, kde suspenze obsahovala 200 mg houby na 1 ml bylo nalezeno 9 háďátek na květináč.

Tabulka č. 4 počty zjištěných háďátek rodu *M. hapla* v jednotlivých květináčích

| Negativní kontrola | Var I 600mg | Var II 400mg | Var III 200mg |
|--------------------|----------------|-----------------|------------------|
| 32 | 15 | 3 | 3 |
| 23 | 3 | 85 | 14 |
| 5 | 41 | 6 | 3 |
| 25 | 8 | 3 | 2 |
| 11 | 28 | 4 | 9 |
| 4 | 2 | 26 | 9 |
| 59 | 14 | 13 | 14 |
| 35 | 69 | 15 | 18 |
| 13 | 86 | 127 | 11 |
| | 43 | 2 | 5 |

Statistické zhodnocení nám při hladině významnosti 95% nenašlo žádný statisticky významný rozdíl. Graf č. 4 ukazuje, že výsledky jsou hodně vyrovnané, největší odchylku má nejnižší koncentrace houby.

Graf č. 4. *Meloidogyne hapla* x *Stropharia rugosoannulata*



6. Diskuse

Při *in vitro* testech byly testovány vybrané rody hub a pozorována jejich interakce s živými háďátky *Caenorhabditis elegans*. K testům byly zvoleny houby rodů *Arthrobotrys oligospora*, *Pochonia chlamydosporia*, *Dactylellina lysipaga*, *Monacrosporium phymatophagum*.

Největší nematofágní aktivitu na háďátku *Caenorhabditis elegans* prokázala v našich *in vitro* pokusech *Arthrobotrys oligospora*. *A. oligospora* vykazuje v *in vitro* testech dobré výsledky také proti *Meloidogyne hapla* jak uvádí Singh et al. (2012). K srovnatelným výsledkům dospěl také Zouhar a kol. (2010), který testoval houby rodů *Arthrobotrys oligospora*, *Dactylella oviparasitica*, *Dactylellina candida*, *Dactylellina lysipaga*, *Dactylellina phymatopaga* a *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Ve svých výsledcích *in vitro* pokusů uvádí rovněž *Arthrobotrys oligospora* jako neúčinnější, a to proti háďátkům rodů *Globodera rostochiensis*, *Ditylenchus dipsaci* a *Meloidogyne hapla*.

Je nutné poznamenat, že Belder et Jansen (1994) ve své práci studovali v *in vitro* testech vztah mezi nematofágními houbami a fytoparazitickými háďátky rodů *Globodera* a *Meloidogyne* ovšem nikoli rodu *Ditylenchus*. Tato diplomová práce potvrdila výsledky dosažené Zouhar et. al. (2010) a je tedy chronologicky druhou prací zabývající se kromě jiného i významným a často opomíjeným rodem *Ditylenchus*. Celá řada autorů pak pracovala zpravidla se sbírkovými kmeny studovaných nematofágních hub (Galper et al. 1995, Gomes et al. 1999, Kumar et Singh 2006).

V této práci byl v případě *A. oligospora* použit kmen izolovaný z volné přírody a je tedy předpoklad, že jeho virulence není snížena mnohačetným pasážováním, či skladováním na šikmých agarech v genobance.

Na základě těchto výsledků proběhla realizace nádobových pokusů, kde byla testována nematofágní aktivita *Arthrobotrys oligospora in vivo* na háďátkách rodu *Globodera rostochiensis*, *Ditylenchus dipsaci* a *Meloidogyne hapla*.

V přirozených podmínkách v půdě aktivita nematofágních hub často selhává. Z možných důvodů, které uvádí Monfort et al. (2006) to může být například neschopnost houby se v těchto podmínkách množit. Tento fakt může být důvodem, proč výsledky našich pokusů *in vivo* s houbou *Arthrobotrys oligospora* neměly u háďátek rodu *Globodera rostochiensis* a *Ditylenchus dipsaci* statisticky významné rozdíly mezi kontrolou a variantami. A to i přes to,

že v pokusech *in vitro* byla nematofágní aktivita *Arthrobotrys oligospora* nejvyšší jak v našich pokusech na *Caenorhabditis elegans*, tak v pokusech *in vitro*, které uvádí Zouhar a kol. (2010), který *A. oligospora* testoval proti háďátkům rodů *Globodera rostochiensis*, *Ditylenchus dipsaci* a *Meloidogyne hapla*. Z uvedeného vyplývá, že negativní výsledky s největší pravděpodobností spočívají ve schopnosti houby přežít, množit se a tvořit lapací struktury v půdě vytvořeného experimentálního systému a vývojovým cyklem konkrétního druhu fytoparazitického háďátka.

V našich nádobových pokusech byl po ošetření *A. oligosporou* statisticky významný rozdíl oproti negativní kontrole pouze u háďátka rodu *Meloidogyne hapla*. U tohoto druhu je výskyt háďátek nepřímo úměrný ke koncentraci houby v suspenzi, kterou byly varianty ošetřeny.

Z výsledků které uvádí Zouhar a kol. (2010) se dá vyvodit, že z testovaných druhů je na nematofágní aktivitu půdních hub nejnáchylnější *Meloidogyne hapla*. Z jeho pokusů je patrné, že *M. hapla* má u všech testovaných hub vyšší mortalitu než *G. rostochiensis* nebo *D. dipsaci*. Je tedy evidentní, že vliv nematofágních hub na mortalitu fytoparazitických háďátek nelze unifikovat a je nutné zohlednit druh případně rod studovaného háďátka.

Při nádobovém pokusu, kde byla hodnocena nematofágní aktivita *Strofaria rugosoannulata* na *M. hapla*, byly dosaženy podobné výsledky jako u *A. oligospora* s háďátky *D. dipsaci* a *G. rostochiensis*. Mukerji et al. (2000) se ovšem o *S. rugosoannulata* zmiňuje jako o mykorrhizní houbě. V případě, že by *S. rugosoannulata* podporovala růst testovaných rostlin, tak by tyto rostliny více lákaly háďátka. Při vysokých koncentracích houby v nádobových pokusech by se proto neprojevovala nematofágní aktivita v takové míře jako v *in vitro* testech, kde není na vliv rostliny brán zřetel. Uvedené závěry tak s největší pravděpodobností vysvětlují, proč se nejméně háďátek vyskytovalo ve variantě, která byla ošetřená suspenzí s nejnižší koncentrací houby. Je rovněž nutné uvést, že využití *S. rugosoannulata* jako bioagens proti těmto druhům fytoparazitických háďátek nebylo dosud publikováno a tyto dosažené výsledky jsou první svého druhu. Komparovat je lze pouze s prací Luo et al., (2006) kde ovšem byly popsány struktury využitelné proti háďátkům a to na modelovém organismu a na háďátku *B. xylophilus*, který nepatří k háďátkům vyskytujícím se na území ČR.

7. Závěr

V této práci jsme se věnovali vztahu nematofágních hub a háďátek, a to na dvou úrovních. A to v pokusech *in vitro*, kde se mohla pečlivě studovat interakce háďátka - nematofágní houba a poté v nádobových pokusech kde se podmínky více přiblížily podmínkám, které by nastaly při využití hub v praxi.

V *in vitro* testech se houby testovaly na modelovém druhu háďátka kde nejvyšší nematofágní aktivitu jasně vykazovala *Arthrobotrys oligospora*.

Ta byla poté použita v nádobových pokusech na háďátka druhů *Globodera rostochiensis*, *Ditylenchus dipsaci* a *Meloidogyne hapla*. V těchto nádobových pokusech, ale nematofágní aktivitu *A. oligospora* vykazovala pouze u *Meloidogyne hapla*.

Dále se v nádobových pokusech na *Meloidogyne hapla* testovala *Strofaria rugosoannulata*, která ovšem nevykazovala významnou nematofágní aktivitu.

V budoucnu by se výzkum měl zabývat tím jak zajistit i v *in vivo* podmínkách aby nematofágní houby byly schopné se rozrůstat a vykazovat nematofágní aktivitu a byly tak použitelné pro praxi jako spolehlivý prostředek k regulaci háďátek.

8. Seznam literatury

Anonym A. 2012. Seznam registrovaných přípravků a dalších prostředků na ochranu rostlin 2012. Věstník Státní rostlinolékařské správy. Státní rostlinolékařská správa. 9. 405 s.

Anonym B. *Arthrobotrys oligospora*. Mycobank. [online]. 2012 [cit. 2012-3-04]. Dostupné z <<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=1708&Fields=All>>.

Anonym C. *Stropharia rugosoannulata*. Mycobank. [online]. 2012 [cit. 2012-3-04]. Dostupné z <<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=26574&Fields=All>>.

Anke, H., Stadler, M., Mayer, A., Sterner, O. 1995. Secondary metabolites with nematocidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and Ascomycetes. *Canadian Journal of Botany*. 73(S1). p. 932-939

Barron, G. L. 1975. Detachable adhesive knobs in *Dactylaria*. *Transactions of the British Mycological Society*. 65. p. 311-312

Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Dep. of Environmental Biol. Ontario Agric. Coll., Univ. of Guelph. Canada. p. 140. ISBN: 0920370004

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

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

Bečvář, K. 1999c. Dravé houby III. *Živa*. nakladatelství Academia, Středisko společných činností AV ČR, (3) 109-111 s.

Belder, E., Jansen E. 1994. Capture of plant-parasitic nematodes by an adhesive hyphae forming isolate of *Arthrobotrys oligospora* and some other nematode-trapping. *Nematologica*. 40. p. 423-437

Bromilow, R. H. 1983. Breakdown and fate of oxine carbonate nematocides in crops and soils. *Ann. Appl. Biol.* 75. p. 473-479

Douda, O., Zouhar, M., Nováková, J. 2010. Nematofágní mikroskopické houby. *Zahradnictví*. 9. (2) 28-29 s.

- Drechsler, C. 1937. Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. *Mycologia*. 29. p. 447-552
- Dowsettj, A., Reid, J., James, A. 1977a. Light microscope observations on the trapping of nematodes by *Dactylaria candida*. *Canadian Journal of Botany*. 55. (23) p. 2956-2962
- Dowsettj, A., Reid, J., James, A. 1977b. Transmission and scanning electron microscope observations on the trapping of nematodes by *Dactylaria candida*. *Canadian Journal of Botany*. 55. p. 2963-2970
- Farr, D. F. 1980. The acanthocyte, a unique cell type in *Stropharia* (Agaricales). *Mycotaxon*. 11. p. 241-249
- Galper, S., Eden, L. M., Stirling, G. R., Smith, L. J. 1995. Simple screening methods for assessing the predacious activity of nematode-trapping fungi. *Nematologica*. 41. p. 130-140
- Gomes, A. P. S., Araújo, J. V., Ribeiro, R. C. F. 1999. Differential in vitro pathogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32. p. 79-83
- Gray, N. F. 1987. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. *Biological revue*. Great Britany. 62. p. 245-304
- Häni, F., Popow, G., Reinhard, H., Schwrz, A., Tanner, K., Vorlet, M. 1993. *Obrazový atlas chorob a škůdců polních plodin*. Scienta s. r. o., Pedagogické nekladatelství. Praha. 355 s. ISBN: 3906679039
- Jelínek, J., Zicháček, V. 2005. *Biologie pro gymnázia*. Studio nakladatelství Olomouc. Olomouc. 575 s. ISBN: 8071821772
- Kazda, J. Hád'átka zhoubné (*Ditylenchus dipsaci*). *Zahrada web*. [online] 2005. [cit. 2012-03-22] Dostpné z <http://www.zahradaweb.cz/informace-z-oboru/zelinarska-vyroba/Hadatko-zhoubne-Ditylenchus--dipsaci__s512x43745.html>.
- Kazda, J., Prokinová, E., Ryšánek, P. 2007. *Škůdci a choroby rostlin*. Euromedia Group k. s. Praha. 288 s. ISBN:9788024218861
- Koubová, D. 2009. *Využití hub v biologické ochraně proti škůdcům*. Ustav zemědělské ekonomiky a informací, Praha

- Kumar, D., Singh, K. P. 2006. Assessment of predacity of *Arthrobotrys dactyloides* for biological control of root knot disease of tomato. *J. Phytopathology*. 154. p. 1-5
- Luo, H., Li, X., Li, G., Pan, G., Zhang, K. 2006. Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* Function as a Nematode-Attacking Device. *Appl Environ Microbiol*. 72. (4) p. 2982–2987
- Maloy, O. C., Murray, T. D. 2000. *Encyclopedia of plant pathology*. Vol. 2 John Wiley and Sons, New York. p. 682-689 ISBN: 9780471298175
- McKenry M. V. 1981. Nature, mode of action and biological activity of nematicides. *Handbook of pests management in Agricultura*. p. 59-73
- Monfort, E., Lopez-Llorca, L. V., Jansson, H. B., Salinas, J. 2006. In vitro soil receptivity assays to egg-parasitic nematophagous fungi. *Mycol Progress*. 5. p. 18–23
- Mukerji, K. G., Chamola, B. P., Singh, J. 2000. *Mycorrhizal biology*. Kluwer Academic Publishers Group. New York. p. 352 ISBN: 9780306462948
- Nordbring-hertz, B., Stålhammar-Carlemalm, M. 1978. Capture of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*, an electron microscope study. *Canadian Journal of Botany*. 56. (10) p. 297-1 307
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H. B., Tunlid, A. 2006. *Nematophagous Fungi*. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, New York
- Nováková, J., Zouhar, M. Meloidogyne hapla – škůdce, kterého možná neznáte. *Zahrada web*. [online] 2009. [cit. 2012-03-22] Dostupné z <http://www.zahradaweb.cz/informace-z-oboru/zelinarska-vyroba/Meloidogyne-hapla-%E2%80%93-skudce-ktere-ho-mozna-neznate__s512x45068.html>.
- Perry, N. R., Moens, M., Starr, J. L. 2009. *Root-knot nematodes*. MPG Books Group. London. p. 487. ISBN: 9781845934927
- 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.) *Biological Control*. 60. p. 262–270
- Šefrová, H. 2006. *Rostlinolékařská entomologie*. AZ Color print. Brno. 258 s. ISBN: 8073020866
- Tichá, K. 2001. *Biologická ochrana rostlin*. Grada publishing. Praha. 86 s. ISBN: 8024790432

- Vlk, F. 1985. Ochrana rostlin – Nematologie obecná a speciální. Videopress MON. Praha. 157 s.
- Yang, Y., Yang, E., An, Z., Liu, X. 2007. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences
- Zouhar, M., Ryšánek, P., Tesařová, B., Marek, M. 2002. Metodická příručka pro diagnostiku karanténích háďátek rodů Globodera, Meloidogyne a Ditylenchus. PowerPrint. Praha. 44 s. ISBN: 8021308737
- Zouhar, M., Douda, O., Novotný, D., Nováková, J., Mazáková, J. (2010). Evaluation of the pathogenicity of selected nematophagous fungi – Czech Mycol. 61. (2) p. 139–147

9. Seznam obrázků

1. **Lepkavý přisedlý knoflík** převzato z Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Dep. of Environmental Biol., Ontario Agric. Coll., Univ. of Guelph. Canada. p. 140. ISBN: 0920370004
2. **Stopkatý lepkaavý knoflík** převzato z Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Dep. of Environmental Biol., Ontario Agric. Coll., Univ. of Guelph. Canada. p. 140. ISBN: 0920370004
3. **Postranní myceliální větve** převzato z Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Dep. of Environmental Biol., Ontario Agric. Coll., Univ. of Guelph. Canada. p. 140. ISBN: 0920370004
4. **Dvojozměrná síť** převzato z Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Dep. of Environmental Biol., Ontario Agric. Coll., Univ. of Guelph. Canada. p. 140. ISBN: 0920370004
5. **Fixní oka** převzato z Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Dep. of Environmental Biol., Ontario Agric. Coll., Univ. of Guelph. Canada. p. 140. ISBN: 0920370004
6. **Škrťící oka** převzato z Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Dep. of Environmental Biol., Ontario Agric. Coll., Univ. of Guelph. Canada. p. 140. ISBN: 0920370004
7. **Trojrozměrná síť** převzato z Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Dep. of Environmental Biol., Ontario Agric. Coll., Univ. of Guelph. Canada. p. 140. ISBN: 0920370004
8. **Arthrobotrys oligospora** převzato z G. Barron (2001). The Nematode-Destroying Fungi. In The Fifth Kingdom. Sidney, Vancouver Island, British Columbia, Canada: Mycologue Publications
9. **Stropharia rugosoannulata** převzato z Cortez, V.G. and Silveira, R.M.B. 2008. The agaric genus Stropharia (Strophariaceae, Agaricales) in Rio Grande do Sul State, Brazil. Fungal Diversity. p. 31-57.
10. **Fenwickova flotační nádoba** vlastní nákres.

11. Nákres Baermannovy metody převzato z 28. 4. 2012

<http://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/Baermann/Principle.htm>

12. *Arthrobotrys oligospora*- sklíčkové kultury autor ing. Jana Nováková

10. Přílohy

1. Fenwickova Flotační nádoba převzato z http://www.mekupollaehne.de/Produkte/sonst__Gerate/Saaten-Union/Products/Nematode_instruments/body_nematode_instruments.htm



2. Nádobové pokusy *Stropharia rugosoannulata* autor ing. Zouhar Miloš, Ph. D.

