

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

KATEDRA ROSTLINNÉ VÝROBY A AGROEKOLOGIE

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Profilace: Rostlinolékařství

**Standardní laboratorní biotesty účinnosti
entomoparazitických hlístic**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vedoucí práce
prof. Ing. Z. Landa, CSc.**

**Autor
Zuzana Trnková**

2010

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Katedra rostlinné výroby
Akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana TRNKOVÁ**
Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Všeobecné zemědělství**

Název tématu: **Standardní laboratorní biotesty účinnosti entomoparazitických hlístic**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Úvod - cílem diplomové práce je porovnání účinnosti (virulence) vybraných druhů hlístic rodu *Steinernema* na modelové druhy škůdců.

Literární přehled - rešerše zaměřené na základní biologické a morfologické charakteristiky vybraných druhů entomopatogenních hlístic, jejich účinnosti na dané spektrum škůdců a možnosti využití v biointenzivních programech ochrany rostlin, včetně standardních laboratorních postupů používaných při testování účinnosti entomopatogenních hlístic.

Experimentální část a výsledky - zavedení standardního postupu při testování účinnosti vybraných druhů hlístic v laboratorních podmínkách, porovnání účinnosti jednotlivých druhů hlístic na zástupce řádu *Lepidoptera* a *Coleoptera*.


Závěry a výstupy - vypracování standardního metodického postupu, který by byl využitelný k testování účinnosti entomopatogenních hlístic, určení citlivosti daného hostitelského druhu k vybranému druhu hlístice v návaznosti na stanovení optimální aplikační dávky bioagens.

Rozsah grafických prací: 10-15 stran
Rozsah pracovní zprávy: 50 - 60 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Mráček Z., Weiser J., 1988: Parazitické hlístice hmyzu. Academia, Praha.
Grewal P.S., Ehlers R.-U., Shapiro D.I., 2005: Nematodes as biocontrol agent, CABI Publishing, Oxon, UK.
Grunder J. M., 2005: Quality Control of Entomopathogenic Nematodes, COST Action 819.
Gaughler R., 2001: Entomopathogenic nematology. CABI Publishing, Oxon, UK.
Publikace získané pomocí průběžných rešerší v databázových systémech WoS a CABI, případně v plnotextových databázích (Science Direct, Springer)

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.
Katedra rostlinné výroby
Konzultant diplomové práce: RNDr. Zdeněk Mráček, DrSc.
Datum zadání diplomové práce: 21. března 2008
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2010


prof. Ing. Miloslav Soch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studěmská 13
370 05 České Budějovice

doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 21. března 2008

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou, ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 31.3. 2010

.....
Zuzana Trnková

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc. za cenné rady a připomínky, dále Ing. Štěpánce Radové za velkou pomoc při zpracování dat i časté konzultace a samozřejmě velký dík patří mé rodině za materiální i duševní podporu.

ABSTRAKT

V této práci byla testována účinnost entomoparazitických hlístic (EPN's) z čeledi *Steinernematidae* za různých laboratorních podmínek. Porovnávána byla virulence druhů *Steinernema arenarium*, *S. carpocapsae* a *S. feltiae* vůči čtvrtému instaru larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* a potemníka moučného *Tenebrio molitor*. U prvního biotestu byly navozeny standardní podmínky (teplota 25°C a vlhkost 12,5 %). U larev *T. molitor* byla prokázána vyšší účinnost druhu *S. carpocapsae* (LD₅₀ 44,1 IJs), zatímco larvy *G. mellonella* byly citlivější vůči *S. arenarium* (LD₅₀ 35 IJs). Druhý typ biotestu byl zaměřen na vliv teplot 10, 15 a 25°C na infektivitu *S. feltiae* a *S. carpocapsae*. Oba druhy projevovaly při 25°C obdobnou účinnost při vyšší koncentraci (500 IJs), ale při nižších teplotách 15 a 10°C byla výkonnější *S. feltiae*. V třetím typu biotestu byl zkoumán vliv nižší vlhkosti a následné rehydratace na infektivitu hlístic. Bylo prokázáno, že nižší vlhkost (6 %) má výrazný vliv na schopnost hlístice infikovat hostitele. V případě larev *G. mellonella* se virulence po dovlhčení na 12,5 % u *S. carpocapsae* navyšovala při obou testovaných koncentracích (50 and 500 IJs), zatímco u *S. feltiae* vzrostla pouze při koncentraci 500 IJs. Avšak u *T. molitor* prokázala *S. feltiae* vůči nízké vlhkosti vyšší toleranci.

Klíčová slova: *Steinernema arenarium*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, účinnost, biotest

ABSTRACT

The efficacy of three entomopathogenic nematodes (EPN's) of family *Steinernematidae* was tested in different laboratory conditions in this study. The virulence of *Steinernema arenarium*, *S. carpocapsae* and *S. feltiae* was evaluated to fourth - instar larvae of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. Standard temperature (25°C) and humidity (12,5 %) was used in bioassay No I. *S. carpocapsae* was the most virulent one (LD₅₀ 44,1 IJs) for larvae of *T. molitor*, whereas *S. arenarium* for larvae *G. mellonella* (LD₅₀ 35 IJs) at the temperature 25°C. Trial No II focused on impact of temperature 10, 15 and 25°C on effectivity of *S. feltiae* and *S. carpocapsae*. Both proved similar efficacy at higher concentration (500 IJs) at 25°C, but *S. feltiae* was more effectual at temperature 15 a 10°C. Bioassay No III examined the influence of lower humidity and in consequence rehydration on virulence nematodes. Lower moisture (6 %) influenced ability to infect the host. In case of *G. mellonella*, virulence of *S. carpocapsae* went up at both concentration (50 and 500 IJs), while virulence of *S. feltiae* rised only at concentration 500 IJs after rehydration to 12,5 %. However *S. feltiae* showed higher tolerance to fluctuating humidity in case of *T. molitor*.

Key words: *Steinernema arenarium*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae*, efficacy, bioassay

OBSAH:

1. ÚVOD.....	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	12
2.1 Klasifikace hlístic.....	12
2.2 Základní charakteristika hlístic.....	13
2.2.1 Čeleď <i>Steinernematidae</i>	14
2.2.2 Morfologie <i>Steinernema arenarium</i>	14
2.2.3 Morfologie <i>Steinernema carpocapsae</i>	15
2.2.4 Morfologie <i>Steinernema feltiae</i>	16
2.3 Biologie a patogenita.....	16
2.3.1 Životní cyklus.....	16
2.3.2 Symbiotické bakterie.....	18
2.4 Hostitelské spektrum.....	19
2.5 Faktory ovlivňující účinnost hlístovek.....	20
2.5.1 Biotické faktory.....	20
2.5.2 Abiotické faktory.....	20
2.6 Chov hlístic a čištění suspenze před testem.....	22
2.7 Přehled metod využitelných k testování EPN's.....	23
3. MATERIÁL A METODY.....	25
3.1 Kultivace entomopatogenních hlístic.....	25
3.2 Příprava suspenze hlístic.....	25
3.3 Zavíječ voskový <i>Galleria mellonella</i> (<i>Lepidoptera: Pyralidae</i>).....	26
3.4 Potemník moučný <i>Tenebrio molitor</i> (<i>Coleoptera: Tenebrionidae</i>).....	26
3.5 Metoda pro sledování mortality <i>Galleria mellonella</i> a <i>Tenebrio molitor</i> entomopatogenními hlísticemi rodu <i>Steinernema</i> za standardních podmínek.....	26
3.6 Metoda pro sledování mortality <i>Galleria mellonella</i> a <i>Tenebrio molitor</i> entomopatogenními hlísticemi rodu <i>Steinernema</i> za rozdílných teplotních podmínek.....	27
3.7 Metoda pro sledování mortality <i>Galleria mellonella</i> a <i>Tenebrio molitor</i> entomopatogenními hlísticemi rodu <i>Steinernema</i> za rozdílných vlhkostních podmínek.....	28

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY.....	29
4.1 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality <i>Galleria mellonella</i> a <i>Tenebrio molitor</i> entomopatogenními hlísticemi rodu <i>Steinernema</i> za standardních podmínek.....	29
4.2 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality <i>Galleria mellonella</i> a <i>Tenebrio molitor</i> entomopatogenními hlísticemi rodu <i>Steinernema</i> za rozdílných teplotních podmínek.....	33
4.3 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality <i>Galleria mellonella</i> a <i>Tenebrio molitor</i> entomopatogenními hlísticemi rodu <i>Steinernema</i> za rozdílných vlhkostních podmínek.....	35
5. DISKUSE.....	41
6. ZÁVĚR.....	45
7. LITERATURA.....	46
8. PŘÍLOHY.....	50
8.1 Fotodokumentace.....	50
8.2 Tabulky.....	51

1. ÚVOD

Biologická ochrana může být definována jako využití organismu k omezení hustoty populace jiného organismu a tudíž zahrnuje i kontrolu živočichů, plevelů a chorob. Početnost významných škůdců může být díky záměrnému využívání přirozených nepřátel udržována na nízké hustotě po dlouhou dobu. Jednou ze základních strategií biologické ochrany rostlin proto je podpora a konzervace přirozených nepřátel. Tato strategie zahrnuje řadu agroekologických opatření, jako je zakládání biokorikodů, atraktance přirozených nepřátel, rozmanitost používaných kulturních plodin, vytvoření příznivého mikroklimatu v porostech pěstovaných rostlin a další, vedoucí k podporování a ochraně endemických druhů.

Pojem přirozený nepřítel je vymezen jako troficky nadřazený druh, který škůdci konkuruje osídlením shodné ekologické niky. Rozlišujeme tři základní kategorie přirozených nepřátel: parazity (resp. parazitoidy), predátory a patogenní mikroorganismy. Mezi entomopatogenní organismy využívané v mikrobiální ochraně se zahrnují bakterie, viry, houby, hlístovky a prvoci. V porovnání s konvenčními chemickými pesticidy jsou prostředky na bázi entomopatogenů obvykle limitovány především svou účinností a cenou. Avšak neopomenutelných je řada výhod zahrnujících nízkou toxicitu, krátkou dobu perzistence, bez ohrožení kontaminace podzemních vod, a limitovaný dopad na člověka a necílové organismy. Dalším pozitivem je i podpora aktivity ostatních přirozených nepřátel a zvyšování biodiverzity ekosystémů. Z technického hlediska lze poukázat i na nenáročnost aplikace a samozřejmě i nákladovost je zcela srovnatelná s nákladovostí na používání běžných chemických insekticidů. Programy biologické ochrany fungují po celém světě jako součást řízení a regulace škůdců v zemědělství, lesnictví a zahradnictví.

Existují tři hlavní postupy biologické ochrany: klasická, někdy popisovaná jako inokulativní biologická ochrana, augmentativní, která zahrnuje sezónní inokulaci a inundaci, a metoda konzervace přirozených nepřátel. Klasická neboli inokulativní ochrana je využívána hlavně proti „exotickým“ škůdcům. Tento typ ochrany se prosazuje v porostech trvalých kultur (ovocné plantáže). Augmentativní ochrana se vztahuje na všechny formy biologické kontroly, ve kterých jsou přirození nepřátelé periodicky introdukováni. Inundace se týká masové produkce a vypouštění velkého

množství jedinců, jako je parazitická vosička *Trichogramma*, vyvíjecí se ve vajíčkách mnoha škůdců z řádu *Lepidoptera*, včetně zavíječe kukuřičného *Ostrinia nubilalis*. Sezónní inokulace je forma augmentativní ochrany, při níž jsou přirození nepřátelé obdobným způsobem chováni masově v laboratoři a opakovaně introdukováni v kontrolovaných pěstebních systémech, kde se objevuje více generací za každou sezónu. Jako příklad může sloužit kontrola mšic, roztočů, vrtalek a molic parazitoidy a predátory ve sklenicích. Konzervativní ochrana se týká využívání původních predátorů a parazitoidů zaměřených proti původním škůdcům. V tomto případě jsou prováděny rozmanité kroky ke zvýšení abundance či aktivity přirozených nepřátel zahrnující vytvoření úkrytu pro přečkání zimy, zvětšování dostupnosti alternativních hostitelů a kořisti či poskytování nezbytných potravních zdrojů, jako jsou květy pro dospělé parazitoidy (Bale *et al.*, 2008).

Nejvíce rozšířeným inundativně používaným organismem mikrobiální ochrany je *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Dnes je množství isolátů této bakterie komerčně produkováno proti řádům *Lepidoptera*, *Coleoptera* a *Diptera*. Také velké množství virů nabízí uplatnění v mikrobiální ochraně proti hmyzu. Ty, které mají největší potenciál, jsou zástupci *Baculoviridae* – *nucleopolyhedroviruses* (*NPV*) a *granuloviruses* (*GV*). Více jak 400 druhů hmyzu, většinou zástupci řádů *Lepidoptera* a *Hymenoptera*, bylo označeno jako hostitelé bakulovirů. Také entomopatogenní houby skýtají široké spektrum využití. K nejznámějším vláknitým houbám patří houby rodu *Beauveria*, *Lecanicillium*, *Metarhizium* a *Paecilomyces*. V těchto rodech je zastoupena řada druhů, z nichž přibližně 25 je v současnosti využívána ve formě standardních biopreparátů při biologické regulaci populací škůdců zemědělských plodin a kultur (Lacey *et al.*, 2001).

Entomoparazitické hlístice patří v současné době k dynamicky se rozvíjející skupině bioagents využívané v biologické ochraně rostlin, včetně ekologického zemědělství. Jsou přirozenou součástí půdních biocénóz a jsou schopni atakovat rozsáhlou škálu škůdců.

Cílem této práce je porovnání virulence vybraných druhů hlístovek rodu *Steinernema* proti modelovým zástupcům hmyzích řádů *Lepidoptera* a *Coleoptera* a určit vliv různých abiotických faktorů (vlhkost, teplota) na účinnost hlístic. Dílčí část práce tvoří zavedení standardního metodického postupu při jejich testování.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Entomoparazitické hlístice (EPN's) jsou známy od 17. století, ale až od počátku 30. let 20. století začaly být používány v boji proti hmyzím škůdcům. Hlísticemi infikované larvy japonského brouka, *Popillia japonica*, byly nalezeny v roce 1929. Steiner ve stejném roce popsal hlístici *Neoplectana* (= *Steinernema*) *glaseri* (Smart, 1995). Glaserovi pozoruhodné výzkumy upadly dočasně v zapomnění díky všeobecně rozšířenému využívání relativně levných chemických látek. V 60. a 70. letech se ale zájem o EPN znovu oživil.

2.1 Klasifikace hlístic

Kmen *Nematoda* zahrnuje celkem 184 čeledí, ale pouze něco málo přes 30 zástupců z nich napadá nebo žije na hmyzím hostiteli (Weiser and Mráček, 1988). Sedm čeledí je možné využít v biologické ochraně - *Allantonematidae*, *Heterorhabditidae*, *Mermitidae*, *Phaenopsitylylenidae*, *Sphaerulariidae*, *Steinernematidae* a *Tetradonematidae* (Kaya and Stock, 1997). V současné době jsou nejvíce využívány čeledi *Steinernematidae* a *Heterorhabditidae*.

Zařazení podle Maggentiho (1981):

Kmen: *Nematoda*

Třída: *Secernentea*

Řád: *Rhabditida*

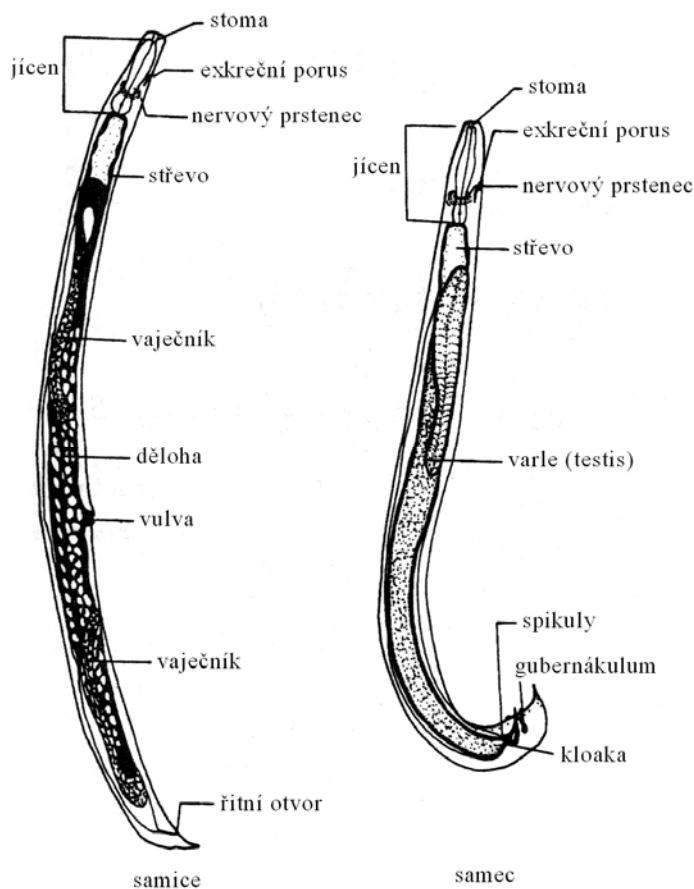
Čeleď: *Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*

Rod: *Steinernema*, *Heterorhabditis*

Steiner (1923) popsal první entomopatogenní hlístovku *Aplectana kraussei*. Travassos (1927) přejmenoval rodové jméno na *Steinernema* (Weiser and Mráček, 1988). O dva roky později Steiner objevil další druh *Neoplectana glaseri*, který se podobal *S. kraussei*. Wouts *et al.* (1982) přezkoumal oba druhy (*N. glaseri* i *S. kraussei*) a došel k závěru, že jsou identické, a *Neoplectana* je synonymem pro *Steinernema* (Adams and Nguyen, 2002).

2.2 Základní charakteristika hlístic

Název kmene *Nematoda* je odvozen z řeckého slova „nema“, což znamená nit a plně vystihuje celkový tvar těla z vnějšího pohledu. Většina hlístic si je svým tvarem velmi podobná. Výjimku tvoří jen někteří značně specializovaní jedinci. Délka těla hlístic nalézáných v těle hmyzu je značně kolísavá. Např. u čeledi *Steinernematidae* kolísá u dospělců od 1 do 10 mm. Hlístice jsou bilaterálně souměrné, ale vykazují také prvky primitivní radiální souměrnosti ve stavbě hlavy a ve tvaru jícnu. Hexaradiální uspořádání smyslových prvků a papil kolem ústního otvoru je považováno za nejprimitivnější znak. Povrch těla je bez segmentace a přívěšků. Ústní otvor je umístěn terminálně a kolem něj jsou uspořádány hlavové papily, ve 2 - 3 kruzích. Papily nese také ocasní část samců. Kopulační orgány samců jsou umístěny v koncové části těla. Jsou tvořeny párovými spikulami, které slouží k roztahování samičí vulvy, a nepárovým gubernákulem s funkcí jakéhosi natahovače spikul (obr. č. 1).



Obr. č. 1: Schéma tělesné stavby hlístic (Kaya and Stock, 1997).

Třívrstevná kutikula, hypodermis a podélné svaly tvoří elasticou trubici, která uzavírá druhotnou tělní dutinu – pseudocoel. V ní jsou uloženy tubicovité, většinou párové a symetrické gonády. Zbytek pseudocoelu vyplňuje trávicí trubice. Tělo, ačkoliv je ohebné, vykazuje jen nepatrné změny v délce a udržuje si vysoký vnitřní hydrostatický tlak. Tento systém výborně umožňuje provádění vlnivých, plazivých pohybů, kterými hlístice proniká půdou a plave (Weiser and Mráček, 1988).

2.2.1 Čeleď *Steinernematidae* (Chitwood and Chitwood, 1937)

Kutikula dospělců je hladká s jemným příčným kroužkováním. Kutikula invazních larev má podélná laterální pole s rýhami. Kolem ústního otvoru je v kruhu 6 nezřetelných pysků. Každý nese 1 labiální papilu. Druhý, cefalický kruh je tvořen 4 papilami. Amfidy ústí laterálně mezi labiálním a cefalickým kruhem. Stoma je redukované. Jícen má cylindrický prokorpis, poněkud rozšířený metakorpis a kulovitý terminální bulbus. Bulbus má modifikovanou valvu. Ovaria jsou párová, testes nepárové. Spikuly jsou párové. Čeleď zahrnuje jediný rod *Steinernema* (Travassos, 1927). Vedle znaků uvedených v charakteristice čeledi platí ještě další pro rod: samci nemají burzu a ocasní část má 2 řady párových papil a 1 nepárovou papilu umístěnou těsně před vyústěním řitního otvoru. Spikuly jsou srpkovitého tvaru a gubernákulum má často hákovitá zakončení (Weiser and Mráček, 1988). Třetí stádium IJs má stoma redukované. Speciální váček s bakteriemi je umístěný na začátku střeva a má různý tvar. Výrazný exkreceční porus se nachází vpředu nervového prstence (Grewal *et al.*, 2005).

2.2.2 Morfologie *Steinernema arenarium* (Artyukhovsky, 1967) Wouts, Mráček, Gardin and Bedding, 1982

Samice mají tělo s nažloutlým střevem a bezbarvými gonádami. Přední část těla je široce zaoblena se 6 zašpičatělými labiálními papilami a 4 cefalickými papilami. V přední části stoma je 1,5 µm tlustý sklerotizovaný kruh, zadní část je stejná jako u ostatních zástupců čeledi *Steinernema*. Jícen má nápadný metakorpis. Exkreceční kanálek je v přední části široký 3 µm. Děloha má dvě části: část blízko vulvy se stěnami ze zduřelých 2 - 3 jaderných buněk, část v blízkosti vaječnicků má tenčí stěny. U mladých samic jsou tyto části dělohy odděleny zúženinou.

Tělo samců první generace má nažloutlou barvu. Ve ventrální části je zakončeno kruhem se 6 labiálními a 4 markantními cefalickými papilami. Stoma má kulovitý tvar. Jícen je svalnatý, metakorpus a bazální bulba zvětšená. Kardie měří 5 - 7 μm . Exkrece porus je široký 2 μm . Spikuly jsou červenohnědé. Distální konec spikul je obvykle opatřen zduřelou špičkou s malým otvorem na přední straně spikul. Dva páry papil jsou umístěny na ventrální straně u konce ocasu, jeden pár na dorsální straně. Dva páry submediálních papil jsou umístěny blízko kloaky, jeden dodatečný pár na stejné úrovni ještě laterálně. Pět párů prekloakálních papil je umístěno ve dvou šikmých řadách, kdy přední pár je téměř laterálně a poslední pár téměř ventrálně umístěn.

Tělo invazních larev (IJ) je dlouhé a silné. Na laterální straně se nachází 8 hřebenu (9 linií). Příležitostně je přední část těla zakončena kruhem cefalických kapslí širokých 12 - 14 μm . Ocas je kónický s kulatým nebo nepravidelným okrajem mezi hypodermální a hyalinní částí (Nguyen K.B. 1, 2010).

2.2.3 Morfologie *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mráček, Gerdin and Bedding, 1982

Samice jsou různě velké, obří formy dosahují až 14 cm (Weiser and Mráček, 1988). Hlava se pozvolna zužuje do kruhu, pysky jsou spojeny, dva kruhy předních papil se rozlišují na 6 vnitřních labiálních papil a 4 vnější cefalické papily. Tkáň jícnu uzavírá ústní otvor, límeček chybí. Jícen je svalnatý, přední část prokorpusu se rozšiřuje právě za stomou a dále se prodlužuje ve zvětšený metakorpus. Exkrece porus je obvykle v přední části nervového prstence. Vulva je umístěna na výrustku. Ocas je hrubě kónický do tvaru kupole s nebo bez ostnů na špičce.

Přední část samců je podobná samicím. Spikuly jsou párové, symetrické, mírně zkroucené. Na ventrální straně se gubernákulum zužuje v krátkou úzkou část. Kónus je šípovitý anebo tvarovaný do písmene Y. Ocas samců nese 23 genitálních papil, 11 párů a 1 nepárovou papilu (Nguyen K.B. 2, 2010). Ocas vybíhá v krátký mukron (Weiser and Mráček, 1988). Bursa chybí.

Invazní larvy jsou mnohem užší než by odpovídalo parazitickým IJ. Ústní a řitní otvor je uzavřený, jícen a střevo je sesuté, ocas je špičatý, laterální část je výrazná (Nguyen K.B. 2, 2010).

2.2.4 Morfologie *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mráček, Gerdin and Bedding, 1982

Samice mají hladkou kutikulu (Weiser and Mráček, 1988). Hlava nese kruh 6 papil. Každá papila má na špičce jednu labiální papilu. Cefalické papily jsou 4. Amfidy jsou zakryté. Jícen je v porovnání s tělem krátký. Exkreční porus se nachází na úrovni metakorpu nebo trochu víc vpředu. Exkreční žlázy nahrazují přední část střeva na dorzální straně. Ocas se výrazně zužuje do kruhu s mukronem na konci.

Kutikula samců je také hladká a přední část těla je podobná samicím. Spikuly jsou mírně zkroucené. Hrot spikul je prodloužený, poměr délka: šířka spikul je větší než 1,5 (obvykle delší než širší). Gubernákulum se v přední části zužuje. Kónus je krátký, má tvar písmene Y a nedosahuje zadního konce korpusu. Ocas se kruhovitě zužuje a je zakončen mukronem.

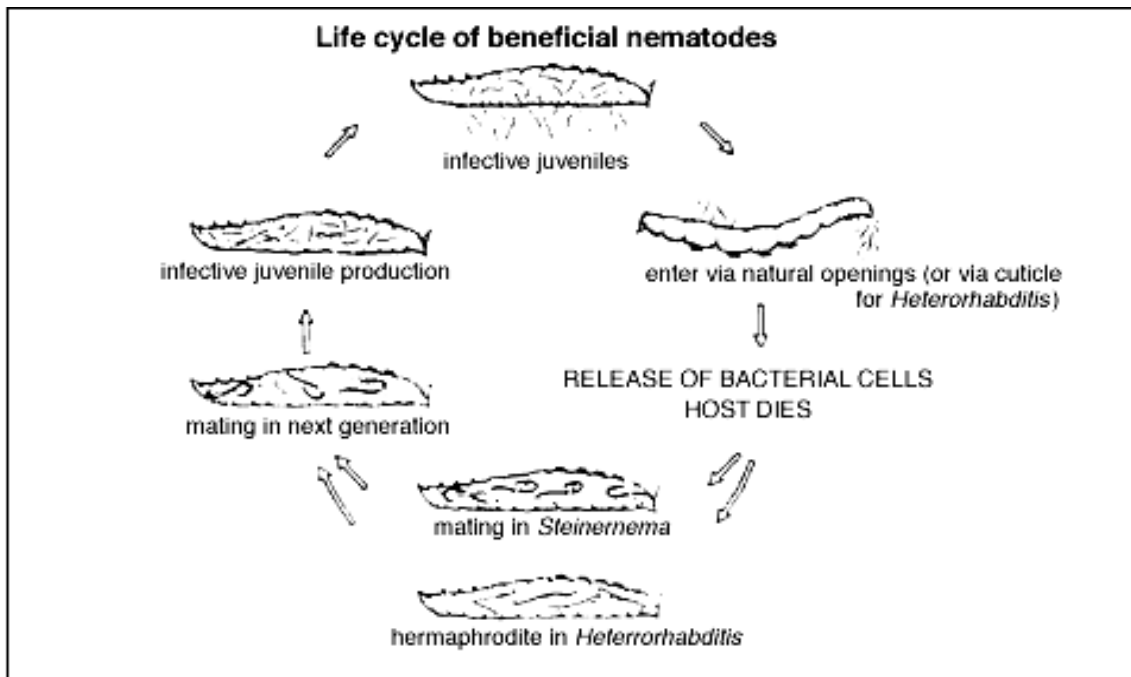
Tělo invazních larev je štíhlé, pravidelně se zužující od báze jícnu dopředu a od řitní oblasti k terminálnímu konci ocasu. Kutikula je s nezřetelným příčným pruhováním, které je velmi jasně viditelné v raném vývoji, kdy je invazní larva ještě obklopená kutikulou předchozího vývojového stádia (L2), a v pozdním vývoji, kdy růst pokračuje v novém hostiteli. Jícen je dlouhý a úzký s třípaprscitým lumenem, zabírající $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{4}$ šířky těla, zřetelně užší v úrovni nervového prstence. Bezprostředně pod kardií je váček s bakteriemi obklopený stěnou střeva. Konečník je dlouhý a úzký. Ocas je kónický špičatě zakončený (Nguyen K.B. 3, 2010).

2.3 Biologie a patogenita

2.3.1 Životní cyklus

Steinernematidae a *Heterorhabditidae* mají podobný životní cyklus (obr. č. 2). Rozdíl u čeledi *Heterorhabditidae* spočívá v tom, že první generací se stávají hermafroditi (Smart, 1995). Jediné neparazitické stádium je infekční juvenilní (IJ) třetí instar (Shapiro-Ilan *et al.*, 2006). Objeví se po vyčerpání mrtvého těla hostitele v půdním prostředí, kde setrvává dokud nenalezne a neinfikuje nového hostitele (Koppenhöfer *et al.*, 1995).

Obr. č. 2: Životní cyklus entomopatogenních hlístic.



(Zdroj 1: <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/nematodes.html>)

Existuje několik různých cest proniknutí do hostitele, záleží na druhu hlístovek a na hostiteli. EPN mohou penetrovat do hemocoelu hmyzu skrze kutikulu přes střešní stěnu pomocí ústního či řitního otvoru anebo přes spirákuly trachejí (Lewis *et al.*, 2006). Řada druhů má vytvořený stylet anebo speciálně modifikovaný zub, kterým prorazí tělní stěnu hmyzu (Weiser and Mráček, 1988). Po proniknutí do hemocoelu hostitele hlístovky uvolní své symbiotické bakterie. Ty se rychle namnoží v krvi hostitele a usmrcení zapříčiní septikémií obvykle během 24 - 48 hodin (Adams and Nguyen, 2002). Hlístovky se potom mění na potravu přijímající juvenilní třetí stádium živící se bakteriemi a jejich metabolickými produkty a přeměňují se na čtvrté stádium, dále pak na samečky a samičky první generace. Po spáření samičky nakladou vajíčka, z kterých se vylíhne juvenilní první stádium, které se postupně přeměňuje na druhý, třetí a čtvrtý instar, a potom na samečky a samičky druhé generace. Dospělci se spáří a vajíčka vyprodukovaná touto druhou generací samiček se přemění na první a dále na druhý instar (Smart, 1995). Reprodukce hlístic pokračuje až do vyčerpání živin z mrtvého hostitele, obvykle dovolující vytvořit dvě nebo tři generace (dlouhý cyklus). Pokud je zásoba živin limitována, vajíčka produkovaná samičkami první generace se vyvíjí přímo v infekční juvenilní stádium (krátký cyklus) (Adams and Nguyen, 2002).

Jednotlivé druhy hlístic se vyznačují určitým druhem strategie napadání hostitele. Ty jsou rozděleny do dvou základních kategorií: cruise a ambush. Cruise („chytači“) jsou velmi pohybliví a aktivně vyhledávají kořist. Ambush („číhači“) mají strategii nazvanou sit-and-wait, tzn. že vyčkávají na místě a napadají spíše pohyblivý hmyz. U většiny nematod jde však o jakési kontinuum mezi oběma – strategiemi (Lewis *et al.*, 2006).

2.3.2 Symbiotické bakterie

Všichni zástupci řádu *Rhabditida* jsou bakteriofágní a mnoho z nich má foretický vztah ke svému hostiteli. Postupně se zřejmě u některých druhů rozvinul v parazitismus. Část střeva infekčního juvenilního stádia čeledi *Steinernematidae* a *Heterorhabditidae* je přeměněna na komůrku, kde mají uloženy symbiotické bakterie. Rod *Xenorhabdus* se váže k rodu *Steinernema* a rod *Photorhabdus* zase k rodu *Heterorhabditis* (Smart, 1995).

Photorhabdus a *Xenorhabdus* jsou gram-negativní entomopatogenní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae* se širokým okruhem hmyzích hostitelů. *Photorhabdus* a *Xenorhabdus* existují ve dvou fenotypických formách, jedná se o fenomén zvaný fázová variace. Fáze I (primární forma) se od fáze II (sekundární forma) liší v jistých morfologických a fyziologických vlastnostech. Sledovaná podobnost v jejich virulenci vůči hmyzím hostitelům může vyjadřovat možnost *in vivo* přeměnu fáze I do fáze II. Molekulární mechanismy a biologický význam fázových variací je dodnes neznámý (Owuama, 2001). Každý jednotlivý druh bakterie je asociován s daným druhem hlístice, ale daný druh bakterií může být asociován s více druhy hlístic (Kaya and Koppenhöffer, 1999). *Xenorhabdus nematophilus* je symbiotický druh bakterie u hlístovky *Steinernema carpocapsae*, *Xenorhabdus poinarii* u *Steinernema glaseri*. *Xenorhabdus bovienii* je asociovaný s několika druhy: *Steinernema affine*, *Steinernema intermedium*, *Steinernema kraussei* a *Steinernema feltiae* (Fischer-Le Saux *et al.*, 1999).

2.4 Hostitelské spektrum

Tab. č. 1: Hostitelské spektrum a možnosti využití jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic v programech biointenzivní integrované ochrany rostlin (Lacey and Kaya, 2000).

Hostitelé	Plodina	Druh hlístovky
<u>Coleoptera</u>		
<i>Curculionidae</i>	trávníky, citrusy, okrasné rostliny, cukrovka, chmel, máta, semenáčky, banánovník	<i>S. carpocapsae</i> , <i>H. bacteriophora</i> , <i>S. carpocapsae</i> , <i>S. riobrave</i> , <i>H. bacteriophora</i> , <i>S. kraussei</i> ,
<i>Chrysomelidae</i>	máta, brambory, cukrovka, zelenina, kukuřice	<i>H. indiga</i> , <i>H. megidis</i> , <i>S. carpocapsae</i> , <i>S. riobrave</i>
<i>Scarabeidae</i>	trávníky, okrasné rostliny, polní plodiny	<i>H. bacteriophora</i> , <i>H. megidis</i>
<u>Diptera</u>		
<i>Agromyzidae</i>	okrasné rostliny, zelenina	<i>S. carpocapsae</i>
<i>Ephydriidae</i>	okrasné rostliny, zelenina	<i>S. feltiae</i>
<i>Sciaridae</i>	okrasné rostliny, zelenina, žampiony	<i>S. feltiae</i>
<i>Tipulidae</i>	trávníky, okrasné rostliny	<i>S. carpocapsae</i> , <i>H. megidis</i>
<i>Muscidae</i>	domácnosti	<i>S. feltiae</i> , <i>H. bacteriophora</i>
<u>Lepidoptera</u>		
<i>Noctuidae</i>	kukuřice, bavlna, trávníky, zelenina	<i>S. carpocapsae</i>
<i>Pterophoridae</i>	artyčok	<i>S. carpocapsae</i>
<i>Pyralidae</i>	brusinky, trávníky, okrasné rostliny	<i>S. carpocapsae</i>
<i>Sessidae</i>	dýně, ovocné stromy, okrasné rostliny,	<i>S. carpocapsae</i>
<i>Cossidae</i>	jabloň, hrušeň	<i>S. carpocapsae</i>
<i>Carposinidae</i>	jabloň	<i>S. carpocapsae</i>
<u>Orthoptera</u>		
<i>Gryllotalpidae</i>	trávníky, zelenina	<i>S. carpocapsae</i> , <i>S. scapterisci</i> , <i>S. riobrave</i>
<u>Blattodea</u>		
<i>Blattellidae</i>	domácnosti	<i>S. carpocapsae</i>

Entomoparazitické hlístice jsou široce polyfágní a mohou napadat velmi rozmanitý sortiment hmyzích druhů. Nejčastěji jsou hlísticemi napadána juvenilní stádia hmyzu, tj. larvy, případně kukly. Přehled řádů a jednotlivých čeledí, u nichž byla zaznamenána citlivost vůči hlísticím, je uveden v tabulce č.1.

2.5 Faktory ovlivňující účinnost hlístovek

2.5.1 Biotické faktory

Do biotických faktorů, které ovlivňují přežívání nematod a jejich symbiontů, lze zařadit organismy, které mohou působit jako intraspecifičtí anebo interpecifičtí konkurenti, dále přirozené nepřátele hlístic či látky antibiotické povahy vylučované samotnými hostiteli hlístic nebo allelopatika vylučované rostlinami, jenž pak mohou negativně ovlivňovat vyhledávací schopnosti nematod (Kaya and Koppenhöfer, 1996). K těmto faktorům lze připočítat i faktor samotného patogena, který disponuje řadou fyziologických a behaviorálních vlastností, které mohou predeterminovat jeho účinnost. Jednou z nich je potravní vztah k hostiteli. Entomofilní druhy z řádů *Diplogasterida* a *Rhabditida* vytvářejí zcela ojedinělou a specifickou skupinu hlístic, které používají hmyz výhradně jako kultivační média pro bakterie, kterými se živí. Jsou to hlístice schopné samostatného saprobiontního způsobu výživy, mimo tělo hmyzu, na mrtvém organickém materiálu. Pravými obligátními parazity jsou zástupci čeledi *Steinernematidae* a *Heterorhabditidae*, u kterých je období saprofytické a parazitické zcela vyváжено (Weiser and Mráček, 1988).

2.5.2 Abiotické faktory

Při udržování životaschopnosti a migrace od hostitele k hostiteli hrají pro hlístovky značnou úlohu také abiotické faktory (teplota, vlhkost, UV - záření, pH, půdní druh, pesticidy aj.).

Vlhkost

Vlhkost je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje životaschopnost a aktivitu invazních larev (Weiser and Mráček, 1988). Všechny

nematody jsou organismy závislé na vodě, která jim umožňuje pohyb. Pokud se hlístice vyskytují v prostředí s postupným poklesem vlhkosti, dokáží přežít ve stavu anhydriobiózy až několik let (Wharton, 1986). V suché půdě mohou hlístice z rodu *Steinernematidae* a *Heterorhabditidae* přetrvávat 2 až 3 týdny (Glazer, 2002). Na druhé straně při extrémně vysoké vlhkosti může docházet k hynutí hlístovek v důsledku nedostatku vzduchu. Do určité míry může chránit nematody před vysycháním tělo hostitele, ve kterém se hlístovky vyvíjí (Koppenhöfer *et al.*, 1997).

Teplota

Teplota stejně jako vlhkost zastává důležitou roli, která modeluje podstatnou měrou rozvoj hlístic v přírodě. Podle řady studií sledující přirozený výskyt EPN lze říci, že jak hlístice rodu *Heterorhabditis*, tak hlístice rodu *Steinernema* jsou schopny odolávat nízkým teplotám, neboť byly izolovány z mnoha míst severní Evropy a Kanady (Burman *et al.*, 1986; Griffin and Downes, 1991; Mráček and Webster, 1993). Dalším extrémem pro přežívání hlístovek jsou podmínky tropických oblastí, kde teploty běžně stoupají k hodnotám nad 30°C. I v takovýchto podmínkách je možno z půd izolovat hlístice zástupců rodu *Steinernema* a *Heterorhabditis*. *S. riobravis* je schopna tolerovat teploty do 37°C. Stejně jako nedávno izolované druhy rodu *Heterorhabditis* v Izraeli a v Egyptě (Glazer, 2002) či v tropické oblasti Srí Lanky (Amarasinghe *et al.*, 1994). Přežívání EPN se pohybuje v širokém teplotním rozmezí od 0 do 40 °C.

Zástupci čeledi *Steinernematidae* potřebují většinou k úspěšné invazi vyšší teploty. Smiege (1963) se zabýval teplotními požadavky *S. carpocapsae*. Při teplotě pod 5°C byla aktivita invazních larev velmi nízká. Od 5 do 11°C se zvyšovala, ale pohyb byl stále pomalý. Teprve nad 15°C byla pohybová aktivita a schopnost larev napadnout hostitele významná. Všeobecně se zvyšovala až do 32°C, pak nastal prudký pokles a při 37°C byla během krátké doby zaznamenána vysoká mortalita (Weiser and Mráček, 1988).

UV - záření

EPN jsou velmi citlivé na sluneční záření, zvláště na ultrafialovou složku. UV záření může inaktivovat anebo zabít hlístovky během pár minut (Lacey and Kaya, 2000). Gaugler *et al.* (1992) prokázal v testech s *H. bacteriophora* vysokou citlivost

tohoto druhu, kdy se patogenita snížila již po 4 minutách expozice při hodnotě záření 302 nm. U *S. carpocapsae* se projevila podobná reakce po 6 minutách.

Osmotický tlak

Nematody jsou obecně velmi tolerantní ke koncentraci solí v prostředí. Midityri (1996) při monitoringu výskytu hlístic na území Belgie potvrdil přítomnost druhů *Steinernema* a *Heterorhabditis* v půdách, jejichž pH se pohybovalo v rozmezí 4,0-8,1.

Půdní druh

Půdní druh může výrazně ovlivňovat přežívání nematod v půdě, jejich pohyb i schopnost detekovat hostitele. Tento činitel působí na výskyt nematod nejen velikostí partikulí substrátu, jež výrazně ovlivňuje pohyb hlístic, ale i celkovým provzdušněním půdy, což je jeden ze zásadních předpokladů k přežívání hlístic. Hlístice jsou aerobními organismy, které nejsou schopny dlouhodobě přežít v prostředí se sníženým obsahem kyslíku (Wharton, 1986). Kyslík se stává limitujícím faktorem v jílových, vodou nasycených půdách nebo v půdách s vysokým obsahem organického materiálu.

2.6 Chov hlístic a čištění suspenze před testem

Entomopatogenní hlístice mohou být kultivovány v *in vivo* nebo *in vitro* systémech. *In vivo* proces produkce je jednoduchý a vyžaduje jen minimální počáteční investiční vklady. Je-li potřeba jen malé množství hlístic pro laboratorní pokusy, může se využít kultivace *in vivo* na náhradách hostitelích jako jsou např. larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella*. Tento hmyz se v laboratoři chová snadno. Metoda spočívá v jednoduchém postupu, kdy je suspenze 100 - 200 IJs (infekční juvenilní stádium) v množství 0,5 ml aplikováno na filtrační papír o průměru 5 cm na dno plastové Petriho misky. Pět až deset larev *G. mellonella* je přemístěno na každou misku a tyto misky jsou inkubovány. Obecně vzato je teplota 25°C dostačující, ale některé hlístice mohou vyžadovat odlišný nárůst teplot. Když dojde k usmrcení hmyzu (24 - 28 hodin od infekce), mrtvá těla jsou přemístěna na „vodní pasti“ (menší Petriho miska obalená navlhčeným filtračním papírem, která je vložena do větší Petriho misky) pro další inkubaci při 25°C. Po 10 až 14 dnech nové IJs migrují z mrtvých těl do vody, která obklopuje filtrační papír v pasti. Hlístice jsou následně několikrát přečištěny a

jako kultura slity do epruvet s molitanem připraveny k uskladnění. Skladovací teplota pro rod *Steinernema* je 4 - 6°C a pro *Heterorhabditis* 8 - 10°C. Pro některé druhy musí být výše uvedené podmínky modifikovány díky rozsáhlé rozmanitosti uvnitř populací hlístic.

Výnosy v *in vivo* systému se pohybují v rozmezí 0,5 - 4,0 x 10⁵ IJs/larva. Tyto výnosy se ovšem ekonomicky v poměru k laboratornímu vybavení a materiálu nevyplácí, pokud bychom chtěli produkovat hlístice ve větším rozsahu. Náklady na jedno IJ se zvyšují lineárně se zvyšující se produkcí. *In vitro* produkce lze řešit dvěma způsoby, kultivací na pevném či tekutém substrátu. V případě kultivace na pevných substrátech jsou využívány psí suchary nebo polyuretanový molitan impregnovaný rozmixovanými vnitřnostmi (ledviny, játra, slezina atd.), který je pak následně inokulován symbiotickými bakteriemi. Výnos při takovémto stylu produkce se pohybuje mezi 6 x 10⁵ až 10 x 10⁵ IJs/g substrátu nebo kultivace v tekutých substrátech, u kterých se využívá speciálních tekutých nutričních médií (Han and Ehlers, 1998).

2.7 Přehled metod využitelných k testování EPN's

S rozšířením obchodních zájmů o entomopatogenní hlístice za začala testovat citlivost mnoha ekonomicky závažných škůdců v širokém rozsahu laboratorních biotestů. Nejčastěji používaný biotest zahrnuje vystavení cílového škůdce infekčnímu juvenilnímu stádiu hlístic na filtračním papíře. Za předpokladu pozitivní korelace mezi koncentrací hlístic a mortalitou hostitele je jako analýza pak použita v testu na analyzování dat od dávky po odezvu a výpočtu LD₅₀.

K testům virulence se používají tyto metody:

- test penetrace
- čas expozice
- biotest v substrátu
- one-on-one test
- vhodnost hostitele

Tyto biotesty aktivity hlístovek jsou řazeny podle rozdílných kroků v procesu infekce. Test penetrace odráží schopnost hlístic proniknout do těla hmyzu, test doby expozice naznačuje rychlost penetrace, biotest v substrátu měří schopnost hlístic nalézt a dále proniknout do cílového hostitele a one-on-one test reprezentuje celkově proces infekce. Vhodnost hostitele je zaznamenávána mírou přijetí v jeho chování (Glazer and Lewis, 2000).

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Kultivace entomopatogenních hlístic

Entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* byly dlouhodobě uchovávány v plastických epruvetách v inertním nosiči (molitan) v lednici při teplotě 5 - 7 °C. Všechny použité druhy hlístic byly získány ze sbírek Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR.

Pro získání dostatečného množství hlístic pro pokusy byl využit následující postup. Z epruvet se získala suspenze, která byla dále naředěna na požadované množství. Vitalita hlístic (tj. % živých hlístic z celkového množství) byla určena pod binokulárem. Pokud byla hodnota vyšší než 85 %, suspenze se dále upravila na koncentraci o přibližné hodnotě 10 IJ na 1 larvu zavíječe voskového *Galleria mellonella* a byla použita pro infekci larev. Aplikace suspenze probíhala následovně: na dno Petriho misky o průměru 9 cm byl vložen filtrační papír a na něj byl naaplikován 1 ml suspenze hlístic. Do připravené misky bylo naintrodukováno 5 - 10 larev *Galleria mellonella*. Petriho misky byly následně inkubovány v termostatu při teplotě 25±1°C (fotoperioda 0/24) po dobu 3 - 5 dní. Během infekce byla nezbytná kontrola vlhkosti v Petriho miskách a v případě nadměrného vysychání byla vlhkost upravována přidáním několika kapek sterilní destilované vody. Po 3 - 5 dnech byly mrtvé housenky s příznaky infekce přemístěny na vodní pasti a uloženy v termostatu při teplotě 25±1 °C (fotoperioda 0/24). Po 10 - 14 dnech od iniciace infekce se do okolí infikovaných larev uvolňovala infekční stádia hlístic, která se shromažďovala ve vodě na dně Petriho misky, odkud byla pravidelně slévána, čištěna a následně skladována po dobu 2 - 3 týdnů před použitím v pokusech.

3.2 Příprava suspenze hlístic

Suspenze hlístic určená k infekci byla získána z nestandardizované suspenze udržované při teplotě 5°C po dobu 2 týdnů v Petriho miskách. Po následném protřepání suspenze byl odebrán vzorek o objemu 5 µl a pod binokulárem určen počet živých hlístovek. Požadovaná koncentrace byla dále počítána z průměrného počtu vitálních hlístic z 5 - ti opakování daného objemu.

3.3 Zavíječ voskový *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae)

Kontinuální chov zavíječe voskového *Galleria mellonella* probíhal za definovaných konstantních podmínek (termostat $30\pm 1^\circ\text{C}$, fotoperioda 0/24) na umělém živném substrátu, tzv. Haydakově živné půdě (22 % kukuřičného šrotu, 11 % pšeničného šrotu, 11 % hladké mouky, 11 % sušeného mléka či sušené syrovátky, 5,5 % sušeného droždí, 17,5 % včelího vosku, 11 % medu a 11 % glycerinu, uvedeno v hmotnostních procentech).

3.4 Potemník moučný *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae)

Larvy potemníka moučného představují skupinu larev se silně sklerotizovanou kutikulou. Významnou předností je pomalý vývoj, díky němuž je možno uchovávat larvy nižších instarů v definovaných podmínkách po dlouhou dobu a pro pokusy vybírat požadované instary, dále nenáročnost chovu a snadná dostupnost. Larvy pro pokusy byly pravidelně kupovány ve specializovaných obchodech a udržovány v plastických boxech na živném substrátu (otruby) v laboratorních podmínkách ($15\pm 1^\circ\text{C}$). K biotestům byly vybírány starší instary.

3.5 Metoda pro sledování mortality *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* entomopatogenními hlísticemi rodu *Steinernema* za standardních podmínek

Cílem pokusu bylo zhodnocení virulence entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* proti modelovému škůdci v závislosti na koncentraci IJ za standardních podmínek.

Materiál

- populace larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* a potemníka moučného *Tenebrio molitor*
- suspenze hlístic *Steinernema feltiae*, *S. arenarium*, *S. carpocapsae*
- půda připravená ze zahradního substrátu a písku v poměru 1 : 1, která byla sterilizována při teplotě 121°C po dobu 120 minut

Postup

- do plastových krabiček bylo odměřeno 40 ml sterilního substrátu a 4 ml sterilní vody, do každé krabičky bylo vloženo 10 larev *G. mellonella* (*T. molitor*)
- do krabiček byla aplikována suspenze hlístic o koncentraci 10, 50, 100 a 200 IJ/krabičku, suspenze byla doplněna sterilní destilovanou vodou na objem 1 ml tak, aby byla zajištěna optimální objemová vlhkost substrátu, tj. 12,5 % (v:v), vzorky byly poté inkubovány v termostatu (teplota 25±1 °C, fotoperioda 0/24), varianta ošetřená pouze sterilní destilovanou vodou sloužila jako kontrola
- kontrolní dny byly stanoveny na 5., 7. a 14. den po aplikaci hlístic, infikované housenky byly dále odebrány, povrchově sterilovány 1 % roztokem chlornanu sodného, opláchnuty sterilní destilovanou vodou a následně umístěny na vodní pasti, kde byl vývoj infekce nadále sledován

3.6 Metoda pro sledování mortality *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* entomopatogenními hlísticemi rodu *Steinernema* za rozdílných teplotních podmínek

Cílem pokusu je určit účinnost testovaných druhů hlístic rodu *Steinernema* proti larvám modelových škůdců v různých teplotních režimech.

Materiál

- populace larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* a potemníka moučného *Tenebrio molitor*
- suspenze hlístic *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*
- půda připravená ze zahradního substrátu a písku v poměru 1 : 1, která byla sterilizována při teplotě 121°C po dobu 120 minut

Postup

- do plastových krabiček bylo odměřeno 40 ml sterilního substrátu a 4 ml sterilní vody, do každé krabičky bylo vloženo 10 larev *G. mellonella* (*T. molitor*)
- do krabiček byla aplikována suspenze hlístic o koncentraci 50, 500 IJ/krabičku, suspenze byla doplněna sterilní destilovanou vodou na objem 1 ml tak, aby byla zajištěna optimální objemová vlhkost substrátu, tj. 12,5 % (v:v), vzorky byly

poté inkubovány při teplotě 25, 15 a 10°C (fotoperioda 0/24), varianta ošetřená pouze sterilní destilovanou vodou sloužila jako kontrola

- kontrolní dny byly stanoveny na 5., 7. a 14. den po aplikaci hlístic, infikované housenky byly dále odebrány, povrchově sterilovány 1 % roztokem chlornanu sodného, opláchnuty sterilní destilovanou vodou a následně umístěny na vodní pasti, kde byl vývoj infekce nadále sledován

3.7 Metoda pro sledování mortality *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* entomopatogenními hlísticemi rodu *Steinernema* za rozdílných vlhkostních podmínek

Cílem pokusu je určit účinnost testovaných druhů hlístic rodu *Steinernema* proti larvám modelových škůdců v různých vlhkostních režimech. V této studii byl sledován také vliv rehydratace na patogenitu studovaných hlístic.

Materiál

- populace larev zavíječe voskového *Galleria mellonella* a potemníka moučného *Tenebrio molitor*
- suspenze hlístic *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*
- půda připravená ze zahradního substrátu a písku v poměru 1 : 1, která byla sterilizována při teplotě 121°C po dobu 120 minut

Postup

- do plastových krabiček bylo odměřeno 40 ml sterilního substrátu a 2 ml sterilní vody, do každé krabičky bylo vloženo 10 larev *G. mellonella* (*T. molitor*)
- do krabiček byla aplikována suspenze hlístic o koncentraci 50, 500 IJ/krabičku, suspenze byla doplněna sterilní destilovanou vodou na objemovou vlhkost 6 % (v:v) a po 7 dnech byla opět doplněna na optimálních 12,5 % (v:v), vzorky byly poté inkubovány při teplotě 15°C (fotoperioda 0/24), varianta ošetřená pouze sterilní destilovanou vodou sloužila jako kontrola
- kontrolní dny byly stanoveny na 5., 7., 14. a 21. den po aplikaci hlístic, infikované housenky byly dále odebrány, povrchově sterilovány 1 % roztokem chlornanu sodného, opláchnuty sterilní destilovanou vodou a následně umístěny na vodní pasti, kde byl vývoj infekce nadále sledován

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

Ke zhodnocení jednotlivých pokusů byla použita analýza variance (ANOVA) a Tukeyho test. Hladina významnosti byla stanovena na $\alpha = 0,05$. Pro určení LD₅₀ byla užitá probitová analýza, pro jejíž realizaci byl použit program BioStat 2009.

4.1 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* entomopatogenními hlísticemi rodu *Steinernema* za standardních podmínek

Při pokusech byla zjišťována mortalita larev *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* po aplikaci IJ larev hlístic *Steinernema feltiae*, *S. arenarium*, *S. carpocapsae* za standardních podmínek, tzn. při teplotě 25°C a objemové vlhkosti substrátu 12,5 %. Úmrtnost byla vyjádřena průměrnou mortalitou a směrodatnou odchylkou v procentech. Dále byla určena dávka LD₅₀ pro jednotlivé druhy hlístic.

Tab. č. 2: Mortalita larev *G. mellonella* (průměrná mortalita %±SD) 5. den po aplikaci vybraných druhů EPN rodu *Steinernema* (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test).

Varianta	Koncentrace IJ/krabička (% průměrná mortalita ±SD)			
	50 IJs	100 IJs	200 IJs	500 IJs
<i>Kontrola</i>	6,00±8,94 b	6,00±8,94 c	6,00±8,94 b	6,00±8,94 b
<i>S. carpocapsae</i>	24,00±18,17 ab	24,00±18,17 bc	58,00±31,14 a	94,00±5,48 a
<i>S. feltiae</i>	40,00±18,71 a	58,00±16,43 a	60,00±30,82 a	98,00±4,47 a
<i>S. arenarium</i>	28,00±19,25 ab	46,00±15,17 ab	62,00±13,04 a	94,00±8,94 a

a, b, c ... průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné

Tab. č. 3: Mortalita larev *G. mellonella* (průměrná mortalita %±SD) 7. den po aplikaci vybraných druhů EPN rodu *Steinernema* (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test).

Varianta	Koncentrace IJ/krabička (% průměrná mortalita ±SD)			
	50 IJs	100 IJs	200 IJs	500 IJs
<i>Kontrola</i>	6,00±8,94 b	6,00±8,94 b	6,00±8,94 b	6,00±8,94 b
<i>S. carpocapsae</i>	30,00±23,45 ab	26,00±15,17 b	60,00±28,28 a	96,00±5,48 a
<i>S. feltiae</i>	46,00±19,49 a	66,00±19,49 a	78,00±17,89 a	100,00±0,00 a
<i>S. arenarium</i>	36,00±26,07 ab	58,00±19,24 a	76,00±16,73 a	94,00±8,94 a

a, b, c .. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné

Tab. č. 4: Mortalita larev *G. mellonella* (průměrná mortalita %±SD) 14. den po aplikaci vybraných druhů EPN rodu *Steinernema* (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test).

Varianta	Koncentrace IJ/krabička (% průměrná mortalita ±SD)			
	50 IJs	100 IJs	200 IJs	500 IJs
<i>Kontrola</i>	8,00±13,04 b	8,00±13,04 b	8,00±13,04 b	8,00±13,04 b
<i>S. carpocapsae</i>	52,00±24,89 a	34,00±13,42 b	78,00±22,80 a	100,00±0,00 a
<i>S. feltiae</i>	50,00±17,32 a	80,00±15,81 a	88,00±16,43 a	100,00±0,00 a
<i>S. arenarium</i>	60,00±25,50 a	84,00±18,17 a	96,00±5,48 a	98,00±4,47 a

a, b, c .. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné

Z výsledků vyplývá, že průměrná mortalita larev *Galleria mellonella* je odlišná v závislosti na testovaném druhu hlístice a zvyšuje se s rostoucí koncentrací IJ larev aplikovaných do substrátu (viz tabulky č. 1, 2, 3). Účinnost jednotlivých druhů se mezi sebou statisticky lišila ($p<0,05$) především u nižších koncentrací (50 a 100 IJs), u vyšších koncentrací (200 a 500 IJs) se účinnost statisticky nelišila. Při nejvyšší testované koncentraci (500 IJs) dosáhla 14. den *S. feltiae* a *S. carpocapsae* 100 % účinnosti, *S. arenarium* dosáhla 98 % mortality larev *G. mellonella*. 100 % mortalita 7. den po aplikaci 500 IJs byla prokázána pouze *S. feltiae*. U *S. carpocapsae* se během testu projevila jistá odchylka v účinnosti, kdy koncentrace 50 IJs vykazovala vyšší účinnost než 100 IJs.

Tab. č. 5: Mortalita larev *T. molitor* (průměrná mortalita %±SD) 5. den po aplikaci vybraných druhů EPN rodu *Steinernema* (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test).

Varianta	Koncentrace IJ/krabička (% průměrná mortalita ±SD)			
	50 IJs	100 IJs	200 IJs	500 IJs
<i>Kontrola</i>	2,00±4,47 b	2,00±4,47 c	2,00±4,47 c	2,00±4,47 c
<i>S. carpocapsae</i>	48,00±10,95 a	52,00±4,47 a	56,00±8,94 b	80,00±10,00 b
<i>S. feltiae</i>	10,00±7,07 b	30,00±7,07 b	40,00±10,00 a	74,00±8,94 a
<i>S. arenarium</i>	10,00±10,00 b	10,00±10,00 c	20,00±12,25 a	26,00±11,40 a

a, b, c .. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné

Tab. č. 6: Mortalita larev *T. molitor* (průměrná mortalita %±SD) 7. den po aplikaci vybraných druhů EPN rodu *Steinernema* (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test).

Varianta	Koncentrace IJ/krabička (% průměrná mortalita ±SD)			
	50 IJs	100 IJs	200 IJs	500 IJs
<i>Kontrola</i>	2,00±4,47 b	2,00±4,47 c	2,00±4,47 c	2,00±4,47 c
<i>S. carpocapsae</i>	50,00±12,25 a	52,00±8,37 a	58,00±4,47 b	86,00±11,40 a
<i>S. feltiae</i>	14,00±11,40 b	36,00±11,40 b	48,00±10,95 a	78,00±13,04 a
<i>S. arenarium</i>	12,00±8,37 b	10,00±7,07 c	20,00±12,25 a	30,00±12,25 b

a, b, c .. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné

Tab. č. 7: Mortalita larev *T. molitor* (průměrná mortalita %±SD) 14. den po aplikaci vybraných druhů EPN rodu *Steinernema* (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test).

Varianta	Koncentrace IJ/krabička (% průměrná mortalita ±SD)			
	50 IJs	100 IJs	200 IJs	500 IJs
<i>Kontrola</i>	6,00±8,94 b	6,00±8,94 c	6,00±8,94 b	6,00±8,94 c
<i>S. carpocapsae</i>	60,00±17,32 a	60,00±17,32 a	68,00±4,45 a	94,00±5,48 a
<i>S. feltiae</i>	28,00±16,43 b	38,00±8,37 b	50,00±10,00 a	82,00±17,89 a
<i>S. arenarium</i>	16,00±8,94 b	12,00±8,37 c	20,00±12,25 b	38,00±8,37 b

a, b, c .. průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné

Na rozdíl od *Galleria mellonella* u *Tenebrio molitor* se mortalita po 14. dni testu pohybovala v širokém rozmezí (16 a 94 %) v závislosti na testovaném druhu a koncentraci aplikované hlístice. Nejvyšší účinnost prokázali druhy *S. feltiae* a *S. carpocapsae*, tj. 82 % resp. 94 % mortalita. Přitom u *S. carpocapsae* se projevila poměrně vysoká účinnost i při nejnižší testované koncentraci 50 IJs (viz tabulka č. 7). Larvy *Tenebrio molitor* vykazovaly velmi nízkou citlivost vůči *S. arenarium*, u něhož mortalita při nejvyšší aplikované koncentraci 500 IJs činila pouze 38 %.

Tab. č. 8: Určení LD₅₀ pro jednotlivé druhy testovaných nematod pro *G. mellonella* a *T. molitor* při teplotě 25°C po 14 dnech testu.

Druh hostitele	Druh EPN	LD ₅₀ (IJs)	Dolní a horní hranice (95% confidence limits)	Chi-square	Pr > Chi2
<i>Galleria mellonella</i>	<i>S. arenarium</i>	35,0	16,915 – 50,034	33,610	< 0,0001
	<i>S. carpocapsae</i>	79,1	57,354 – 100,091	46,910	< 0,0001
	<i>S. feltiae</i>	48,3	29,777 – 63,715	45,244	< 0,0001
<i>Tenebrio molitor</i>	<i>S. arenarium</i>	1491,9	572,499 – 148005,863	24,662	0,003
	<i>S. carpocapsae</i>	44,1	13,024 – 72,373	18,332	< 0,0001
	<i>S. feltiae</i>	159,8	113,600 – 215,143	36,698	< 0,0001

Z tabulky č. 8 lze vyvodit, že larvy *Galleria mellonella* vykazují vyšší citlivost vůči testovaným druhům hlístic rodu *Steinernema* než larvy *Tenebrio molitor*. Hodnoty LD₅₀ pro *G. mellonella* se pohybovaly v rozpětí 35 - 79,1 IJs, zatímco LD₅₀ pro *T. molitor* 44,1 - 1 491,9 IJs. Výsledné hodnoty u larev *G. mellonella* ukazují, že nejúčinnější hlístovka byla *S. arenarium* (35 IJs), naproti tomu u larev *T. molitor* vykazuje tento druh hlístice jistou anomálii v účinnosti. Probitová analýza stanovila LD₅₀ na 1491,9 IJs, což naznačuje extrémně malou citlivost larev vůči této hlístici. *S. carpocapsae* prokázala u larev *T. molitor* nejvyšší účinnost (44,1 IJs), u larev *G. mellonella* je tomu naopak.

4.2 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* entomopatogenními hlísticemi rodu *Steinernema* za rozdílných teplotních podmínek

Při pokusech byla zjišťována mortalita larev *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* po aplikaci IJ larev hlístic *Steinernema feltiae* a *S. carpocapsae* při teplotách 25, 15 a 10 °C. Úmrtnost byla vyjádřena průměrnou mortalitou a směrodatnou odchylkou v procentech.

Tab. č. 9: Vliv různých teplot na virulenci hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *G. mellonella* ve dvou testovaných koncentracích 50 a 500 IJs/krabička (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test).

Teplota	Koncentrace IJ*/krabička	Varianta **	% Mortalita (průměr±SD)		
			5. den	7. den	14. den
25°C	50 IJ	kontrola	6,00±8,94 b	6,00±8,94 b	8,00±13,04 b
		<i>Sf</i>	40,00±18,71 a	46,00±19,49 a	50,00±17,32 a
		<i>Sc</i>	24,00±18,17 a	30,00±23,45 a	52,00±25,00 a
	500 IJ	kontrola	6,00±8,94 b	6,00±8,94 b	8,00±13,04 b
		<i>Sf</i>	98,00±4,47 a	100,0±0,00 a	100,0±0,00 a
		<i>Sc</i>	94,00±5,48 a	96,00±5,48 a	100,0±0,00 a
15°C	50 IJ	kontrola	2,00±4,47 b	2,00±4,47 b	6,00±5,477 b
		<i>Sf</i>	56,00±15,17 a	68,00±13,04 a	74,00±8,95 a
		<i>Sc</i>	6,00±5,48 b	18,00±8,37 b	28,00±4,48 a
	500 IJ	kontrola	2,00±4,47 c	2,00±4,47 c	6,00±5,477 b
		<i>Sf</i>	92,00±8,37 a	100,0±0,00 a	100,0±0,00 a
		<i>Sc</i>	46,00±5,48 b	54,00±11,40 b	68,00±8,37 a
10°C	50 IJ	kontrola	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	4,00±5,48 b
		<i>Sf</i>	0,00±0,00 b	2,00±4,47 b	52,00±21,68 a
		<i>Sc</i>	52,00±14,83 a	58,00±19,24 a	70,00±15,81 b
	500 IJ	kontrola	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	4,00±5,48 b
		<i>Sf</i>	0,00±0,00 b	58,00±13,04 a	100,0±0,00 a
		<i>Sc</i>	60,00±7,07 a	66,00±15,17 a	80,00±15,81 a

* IJ - infekční larvy; ** Sf - *Steinernema feltiae*, Sc - *Steinernema carpocapsae*

a, b, c ..průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné

Z výsledků je zřejmé, že mortalita larev *G. mellonella* narůstala se zvyšující se teplotou (viz tabulka č. 9). Oba druhy hlístovek vykazovaly při nejvyšší testované teplotě (25 °C) poměrně vyrovnanou účinnost bez statisticky významných rozdílů a to v obou testovaných koncentracích. Při nižších teplotách (15 a 10 °C) se ukázala jako

účinnější *Steinernema feltiae*, která prokázala 14. den při koncentraci 500 IJs 100 % mortalitu larev a dokonce i 100 % účinnost 7. den při koncentraci 500 IJs při teplotě 15°C.

Tab. č. 10: Vliv různých teplot na virulenci dvou druhů hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* vůči larvám *T. molitor* ve dvou testovaných koncentracích 50 a 500 IJs/krabička (ANOVA metoda, $\alpha=0,05$; Tukey HSD test).

Teplota	Koncentrace IJ*/krabička	Varianta **	% Mortalita (průměr±SD)		
			5. den	7. den	14. den
25°C	50	kontrola	2,00±4,47 b	2,00±4,47 b	6,00±8,94 b
		<i>Sf</i>	10,00±7,07 b	14,00±11,40 b	28,00±16,43 b
		<i>Sc</i>	48,00±10,95 a	50,00±12,25 a	60,00±17,32 a
	500	kontrola	2,00±4,47 b	2,00±4,47 b	6,00±8,94 b
		<i>Sf</i>	74,00±8,95 a	78,00±13,04 a	82,00±17,89 a
		<i>Sc</i>	80,00±10,00 a	86,00±11,40 a	94,00±5,48 a
15°C	50	kontrola	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	2,00±4,47 b
		<i>Sf</i>	2,00±4,46 b	12,00±13,04 a	12,00±13,04 b
		<i>Sc</i>	20,00±10,00 a	20,00±10,00 a	38,00±16,43 a
	500	kontrola	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	2,00±4,47 b
		<i>Sf</i>	46,00±24,08 a	70,00±14,14 a	80,00±12,25 a
		<i>Sc</i>	52,00±17,89 a	54,00±20,73 a	62,00±22,08 a
10°C	50	kontrola	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	4,00±4,37 a
		<i>Sf</i>	0,00±0,00 a	4,00±5,58 a	10,00±12,25 a
		<i>Sc</i>	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	6,00±5,48 a
	500	control	0,00±0,00 a	0,00±0,00 b	4,00±4,37 a
		<i>Sf</i>	0,00±0,00 a	26,00±25,09 a	66,00±20,74 c
		<i>Sc</i>	0,00±0,00 a	0,00±0,00 b	26,00±5,48 b

* IJ - infekční larvy; ** Sf - *Steinernema feltiae*, Sc - *Steinernema carpocapsae*

a, b, c ..průměry ve sloupci se stejným písmenkem nejsou statisticky rozdílné

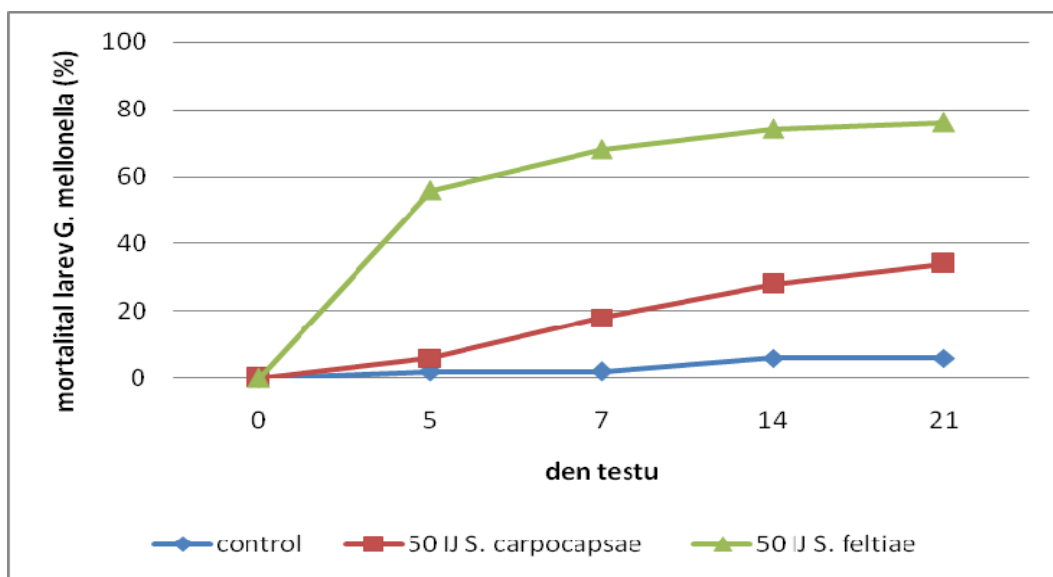
Mortalita larev *T. molitor* dosáhla nejvyšší hodnoty (94 %) při 25°C a koncentraci 500 IJs 14. den testu (viz tabulka č. 10). Z hodnot v tabulce vyplývá, že *S. carpocapsae* vykazuje prokazatelně vyšší účinnost při vyšší teplotě ($F=16,88$, $df=2, 12$, $p<0,05$), zvláště při koncentraci 50 IJs. Při koncentraci 500 IJs tato tendence nebyla statisticky signifikantní. Naopak při nižších teplotách byla vyšší úmrtnost larev prokázána u *S. feltiae*, 14. den testu při koncentraci 500 IJs při teplotě 15°C činila mortalita 80 % a při teplotě 10°C 66 %.

4.3 Hodnocení výsledků metody pro sledování mortality *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* entomopatogenními hlísticemi rodu *Steinernema* za rozdílných vlhkostních podmínek

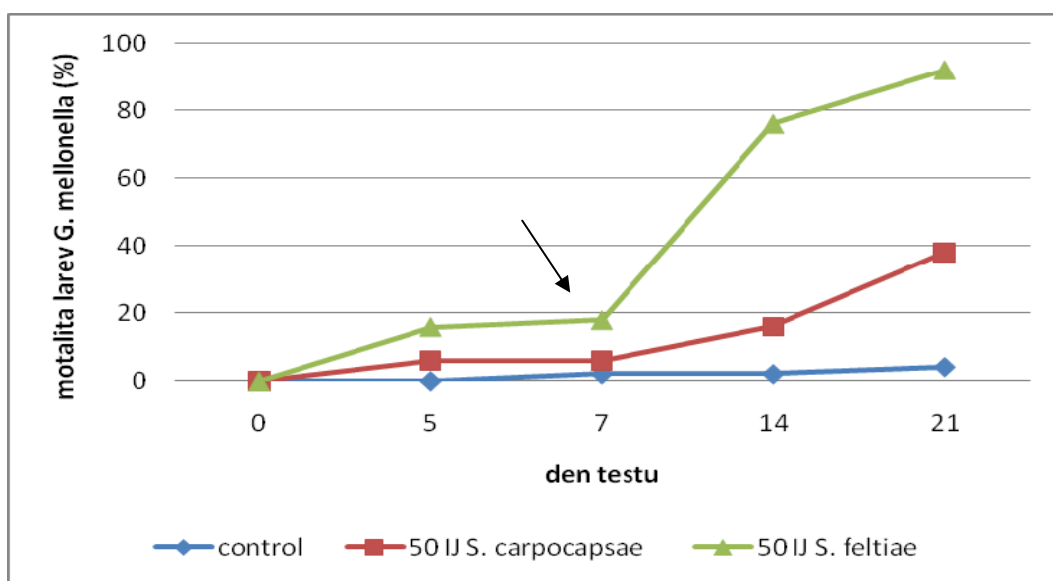
Při pokusech byla zjišťována mortalita larev *Galleria mellonella* a *Tenebrio molitor* po aplikaci IJ larev hlístic *Steinernema feltiae* a *S. carpocapsae* při objemové vlhkosti substrátu 12,5 % a 6 %.

Graf č. 1: Mortalita *G. mellonella* po aplikaci *S. feltiae* nebo *S. carpocapsae* o koncentraci 50 IJs/krabička v teplotě 15°C při objemové vlhkosti půdy (a) 12,5 % nebo (b) 6 % (vlhkost byla po 7 dnech testu doplněna na úroveň 12,5 % - vyznačeno v grafu).

a) 12,5 % vlhkost

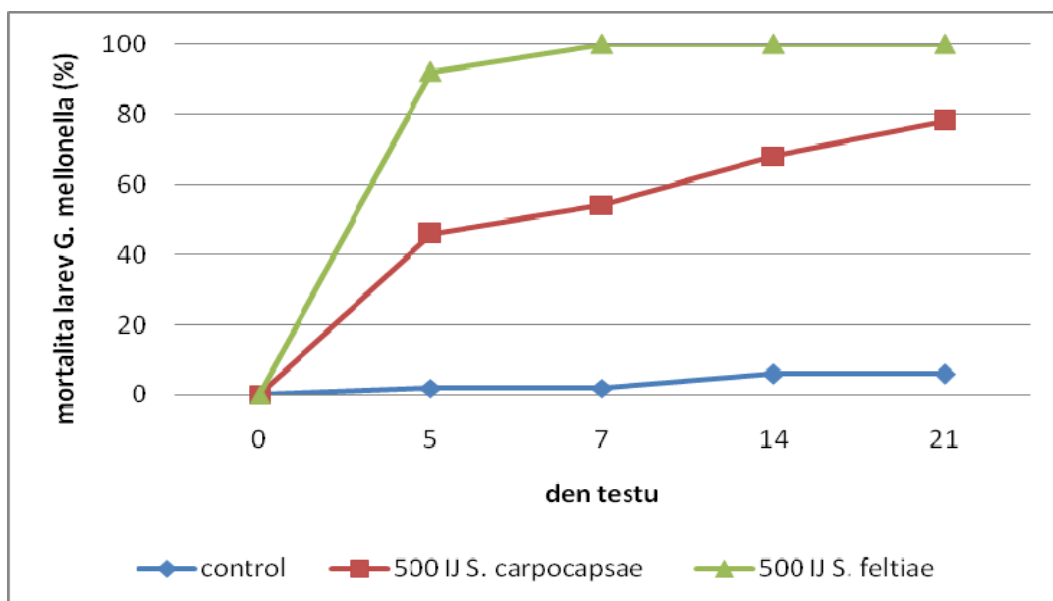


b) 6 % vlhkost (7. den testu navýšena na 12,5 %)

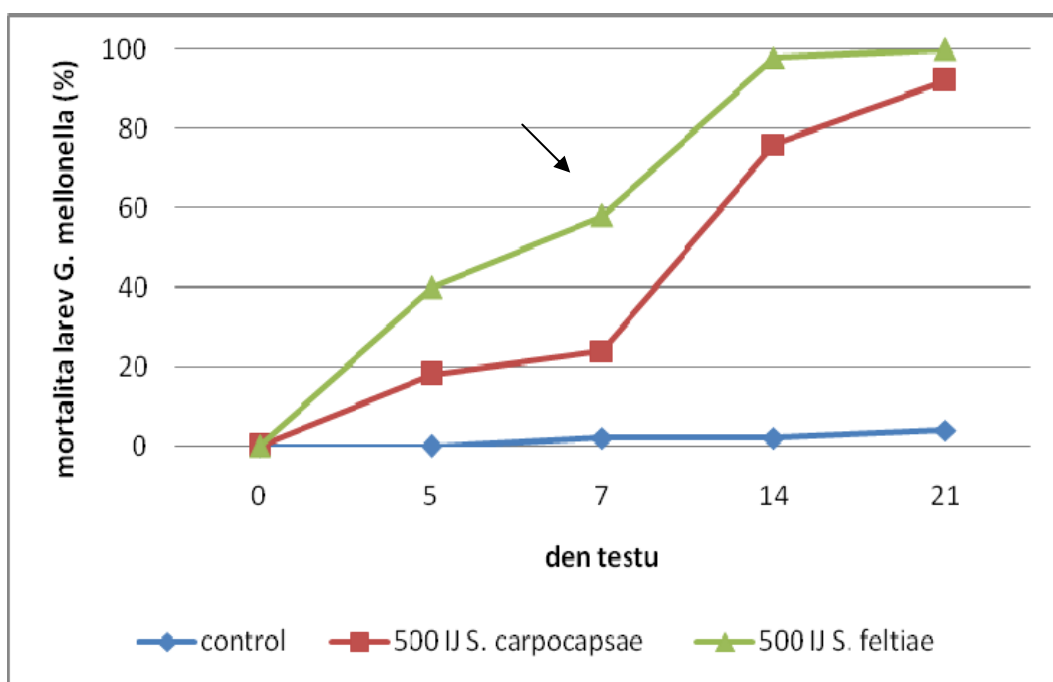


Graf č. 2: Mortalita *G. mellonella* po aplikaci *S. feltiae* nebo *S. carpocapsae* o koncentraci 500 IJs/krabička v teplotě 15°C při objemové vlhkosti půdy (a) 12,5 % nebo (b) 6 % (vlhkost byla po 7 dnech testu doplněna na úroveň 12,5 % - vyznačeno v grafu).

a) 12,5 % vlhkost



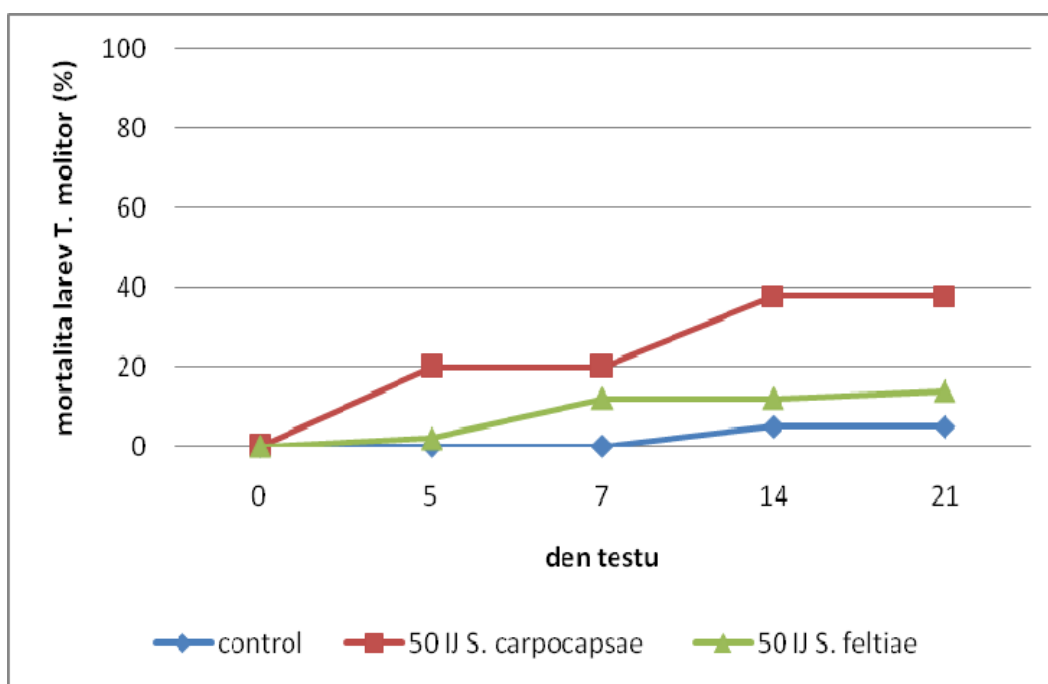
b) 6 % vlhkost (7. den testu navýšena na 12,5 %)



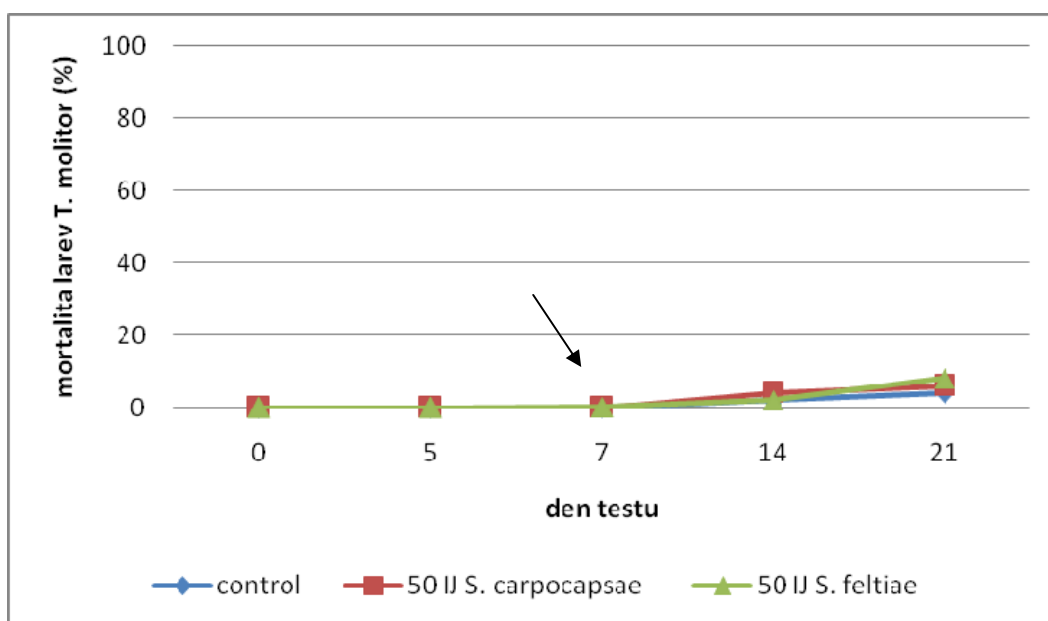
Z grafů č. 1 a 2 vyplývá, že úroveň mortality larev *G. mellonella* se viditelně zvýšila po dovlhčení substrátu na 12,5 %. Navíc je patrný i trend navýšení účinnosti obou testovaných druhů hlístic především při nižší koncentraci 50 IJs. *S. feltiae* dosáhla mortality 92 % po dovlhčení, zatímco při 12,5 % vlhkosti pouze 76 %. U koncentrace 500 IJs u *S. feltiae* se tento jev příliš neprojevil, protože již 7. den testu při vlhkosti 6 % byla zaznamenána úmrtnost 60 % larev. U *S. carpocapsae* se tendence k navýšování účinnosti při této koncentraci ale objevila a úroveň mortality se navýšila o 14 % oproti verzi s optimálními vlhkostními podmínkami.

Graf č. 3: Mortalita *T. molitor* po aplikaci *S. feltiae* nebo *S. carpocapsae* o koncentraci 50 IJs/krabička v teplotě 15°C při objemové vlhkosti půdy (a) 12,5 % nebo (b) 6 % (vlhkost byla po 7 dnech testu doplněna na úroveň 12,5 % - vyznačeno v grafu).

a) 12,5 % vlhkost

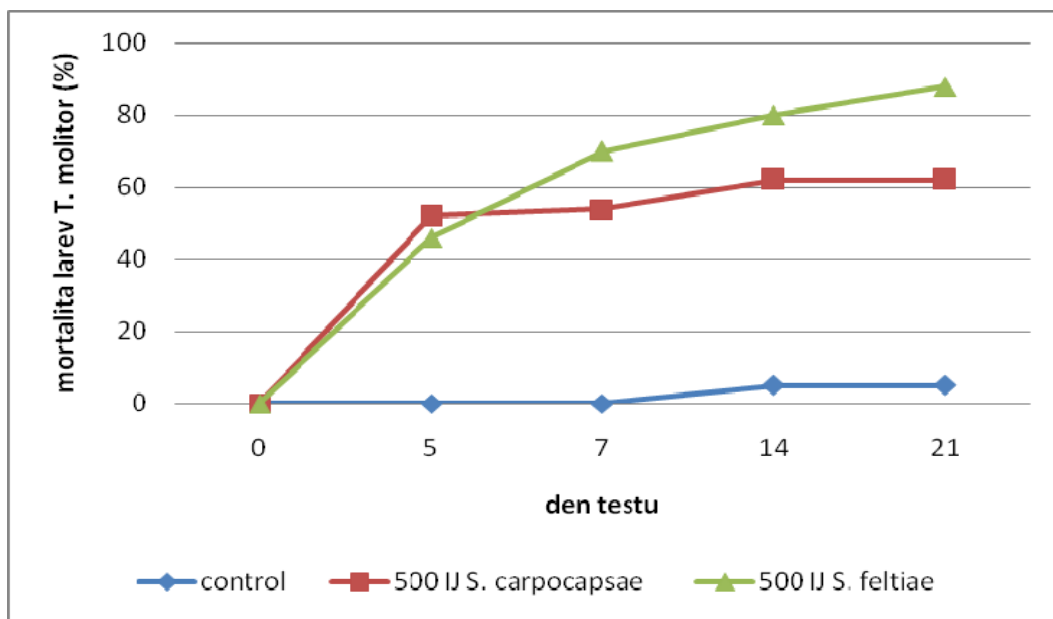


b) 6 % vlhkost (7. den testu navýšena na 12,5 %)

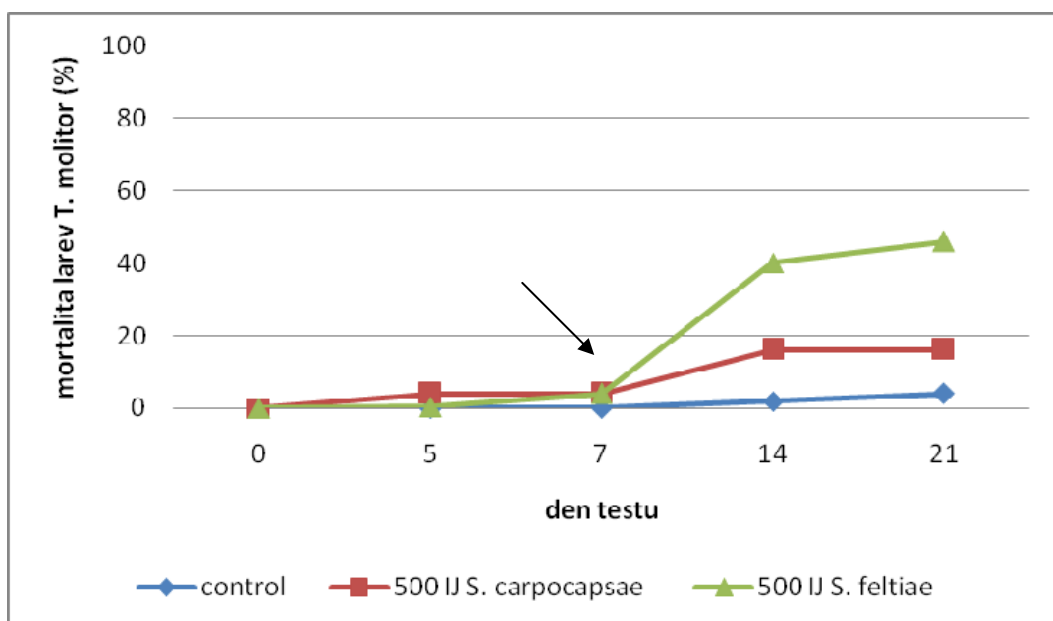


Graf č. 4: Mortalita *T. molitor* po aplikaci *S. feltiae* nebo *S. carpocapsae* o koncentraci 500 IJs/krabička v teplotě 15°C při objemové vlhkosti půdy (a) 12,5 % nebo (b) 6 % (vlhkost byla po 7 dnech testu doplněna na úroveň 12,5 % - vyznačeno v grafu).

a) 12,5 % vlhkost



b) 6 % vlhkost (7. den testu navýšena na 12,5 %)



Z grafů č. 3 a 4 je zřejmé, že na mortalitu larev *T. molitor* měla vlhkost také velký vliv. U obou koncentrací při snížené objemové vlhkosti (6 %) byla zachycena snížená účinnost obou druhů hlístovek. Dovlhčením substrátu na 12,5 % se dosáhlo navýšení mortality, které je zvláště patrné u vyšší koncentrace (500 IJs), kde byl u *S. feltiae* zaznamenán nárůst ze 4 % na 46 % a u *S. carpocapsae* ze 4 % na 16 %. Lze říci, že *S. feltiae* reagovala na navýšení vlhkosti lépe.

5. DISKUSE

V přírodě jsou EPN vystavovány výrazným změnám podmínek a to jak vlhkostním tak teplotním. Díky těmto faktorům je jejich účinnost limitována při použití v polních podmínkách. V mé práci byly testovány tři druhy hlístovek rodu *Steinernema* (*Steinernema feltiae*, *S. arenarium* a *S. carpocapsae*). V experimentální části byla sledována jejich účinnost za standardních i odlišných teplotních a vlhkostních podmínek. Modelovými škůdci byli larvy zavíječe voskového *Galleria mellonella* a potemníka moučného *Tenebrio molitor*.

U *Galleria mellonella* při teplotě 25°C a optimální vlhkosti prokázala při testu největší účinnost *Steinernema feltiae*. U nejvyšší koncentrace 500 IJs byla mortalita 5. den testu 98 % a 7. i 14. den 100 %. 14. den dosáhla 100 % účinnost i *S. carpocapsae*, *S. arenarium* dosáhla 98 % mortality. U larev *Tenebrio molitor* byla nejučinnější *S. carpocapsae*, která při nejvyšší koncentraci 500 IJs dosahovala mortality 5. den 80 %, 7. den 86 % a 14. den 94 %. *S. arenarium* dosáhla mortality pouze 38 %. Vyhodnocení LD₅₀ ukázalo, že larvy *G. mellonella* vykazovaly vyšší citlivost (35 - 79,1 IJs) vůči třem testovaným druhům než larvy *T. molitor*. Zajímavé je, že u *G. mellonella* se jako nejučinnější projevila *S. arenarium*, zatímco u *T. molitor* tomu bylo naopak. Dolinski *et al.* (2006) zkoušeli test v substrátu na *S. riobrave*, *H. indica* a *H. baujardi*. V koncentraci 100 IJs a 200 IJs nebyla mortalita všech tří druhů výrazně odlišná od kontrolních vzorků. Až při koncentraci 500 IJs prokázala *H. indica* a *H. baujardi* průkazně vyšší mortalitu oproti kontrole (68,3 a 62,7 % vs. 12,8 a 13 %). Rozdíly v rychlosti penetrace a následně vyvolání infekce zřejmě vychází, kromě koncentrace IJs, také z potravní strategie jednotlivých druhů. Jak naznačuje Lewis *et al.* (1992) *S. carpocapsae* je typickým představitelem strategie „sit and wait“, raději zůstává blízko povrchu, a tak je možnost atakovat hostitele za určitých podmínek snižena. Zatímco *S. arenarium* je charakteristická právě aktivním vyhledáváním hostitele. *S. feltiae* se pohybuje na pomezí obou strategií. Také Del Pino a Morton (2005) testovali druhy *S. carpocapsae* (Exhibit a M137), *S. arenarium*, *S. feltiae*, *H. bacteriophora* v koncentracích 10 a 150 IJs na larvu *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). Při vyšší koncentraci prokázaly všechny hlístovky vysokou mortalitu 95 % během 5 dní. Nejrychleji však infekce proběhla u obou druhů *S. carpocapsae*, zatímco u ostatních se mortalita pohybovala od 32 - 4 %. 4. den testu již byl tento nepoměr

vyrovnán. Při nižší koncentraci byly ale zaznamenány výrazné odlišnosti. Mortalita *C. tenebrionis* byla vyšší (90,91 %) u těch vzorků, které byly ošetřeny *S. arenarium*, než u ostatních testovaných druhů (*S. carpocapsae* 59,10 %; *S. feltiae* 76,19 % a *H. bacteriophora* 76,19 %).

Při testování vlivu různých teplot na virulenci hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae* bylo zjištěno, že obě hlístice reagují na snížení teploty sníženou účinností jak u larev *Galleria mellonella*, tak i u *Tenebrio molitor*. Je nutno říci, že larvy *G. mellonella* vykazovali vyšší citlivost vůči testovaným druhům, a při teplotě 25°C a dávce 500 IJs byla u obou zjištěna 100% mortalita. Při teplotě 10°C vykazovala 100 % účinnost pouze *S. feltiae*, a to po 14 dnech. Hazir *et al.* (2001) uvádí, že teplota má zásadní vliv na rychlost usmrcení hostitele. Borstein-Forst *et al.* (2005) použili pro vyzkoušení vlivu kolísající teploty na vývoj a infektivitu entomopatogenní hlístice (EPN) *Steinernema carpocapsae* A10 tři rozdílné laboratorní podmínky. Sada 1. pokusu byla zaměřena na vliv tlaku chladných podmínek na začátku vývojového cyklu. Larvy *Galleria mellonella* byly inkubovány 2 dny při teplotě 23°C a následně byly vystaveny od 3 do 36 dne po infekci nižším teplotám -10, 4, 10, 14°C. Pitva infikovaných mrtvých těl prokázala zastavení vývoje dospělců při nižších teplotách. Při druhé sadě pokusů byl zkoušen účinek nižších teplot na začátku vývoje následovaný vrácením teploty na 23°C. Omezené množství populace EPN bylo schopno dokončit vývoj při 10 a 14°C, ačkoli vznikající populace byla prokazatelně menší než ta, která byla nepřetržitě inkubována při 23°C. Při posledním třetím pokusu byli infikovaní hostitelé vystaveni chladným podmínkám ve vývoji později, tj. počínaje 4. dnem po infekci, a následně inkubováni kontrolní teplotou. Přežití dřívější populace prvního a druhého juvenilního stádia bylo redukováno při nižší teplotě nejméně o 95 % i více ve srovnání s kontrolou. Vznikající populace z pokusu č. 3 nebyla infekční. Výsledky naznačují, že teplota má na vývoj a virulenci hlístic rozhodující vliv. Také Grewal *et al.* (1994) ve své studii potvrdili, že druh *S. carpocapsae* má nejužší rozpětí pro reprodukci z dvanácti testovaných druhů a kmenů EPN's. Toto rozmezí se pohybovalo mezi 20 a 30°C, což potvrzuje i tato práce. Také Brown *et al.* (2002) se zabývali schopností *S. carpocapsae* infikovat larvy *Galleria mellonella* a zjistili, že při teplotě 5°C byl proces infekce zastaven a úmrtnost larev byla nulová. Infekce pokračovala latentně pouze tehdy, když byla teplota opětovně navýšena a po 72 hodinách při 25°C mortalita larev vzrostla na 100 %. Naproti tomu *S. feltiae* si udržovala během testů velmi dobré výsledky. Grewal

et al. (1994) uvádí, že *S. feltiae* je druh adaptovaný na chladnější podmínky a je úspěšně používán zvláště proti škůdcům řádu *Diptera*. Tyto závěry potvrzují i výsledky Chen *et al.* (2003), kteří testovali úspěšně tento druh proti larvám květilky (*D. radicum*) v 10°C.

V části sledující vliv objemové vlhkosti na účinnost hlístic ukázaly, že *S. feltiae* reaguje na sníženou vlhkost substrátu lépe než *S. carpocapsae* a to nezávisle na hostitelském druhu. U obou testovaných hlístovek se projevil nárůst účinnosti po navrácení vlhkostních podmínek na optimální úroveň. U *S. feltiae* aplikované proti larvám *T. molitor* došlo ke zvýšení mortality o více než 40 % a u *S. carpocapsae* pouze o 12 %.

Koppenhöfer a Fuzy (2007) testovali účinek půdní vlhkosti na infektivitu 4 druhů hlístovek *Steinernema scarabeidae*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zealandica* a *H. bacteriophora* vůči třetímu instaru *Popillia japonica*. Zjistili, že tyto hlístice jsou silně ovlivněny vzájemným působením mezi typem půdy a jejím vodním potenciálem. Virulence všech testovaných hlístic dosahovala nejvyšších hodnot při moderované půdní vlhkosti (-10 až -100 kPa), kdežto v mírně suchém (-1000 kPa) a vlhkém (-1 kPa) prostředí klesala. Pouze *S. scarabeidae* byla aktivní i v suché půdě (-3000 kPa).

S. carpocapsae je považována za druh obecně lépe adaptovaný na sušší podmínky díky své behaviorální strategii, při které jsou infekční larvy tohoto druhu z 90 % exponovány nad povrchem půdy a mrskavým pohybem se snaží lokalizovat potencionální hostitele pohybující se po povrchu substrátu. Tento druh strategie vystavuje infekční larvy extrémním změnám vlhkosti. Díky tomu jsou nematody tohoto druhu považovány jako odolnější vůči vysychání než druhy ostatní (Campbell and Kaya, 2000). Také Kung *et al.* (1991) potvrdili, že *S. carpocapsae* přežila v nízké vlhkosti 2 a 4 % a po doplnění na 16 % způsobila letální infekci larev *G. mellonella*. Výsledky pokusů dokazují, že hlístice potřebují k pohybu a dalším vitálním projevům určité množství vody. Taktéž Koppenhöfer *et al.* (1995) potvrdili, že *S. carpocapsae* byla schopna při nejnižší testované vlhkosti půdy atakovat hostitele. Na druhé straně však může docházet k snížení účinnosti z důvodu adaptace na stresové podmínky, jež pak vede následně k snížení celkové aktivity a tím i účinnosti. Po znovunarození vhodných podmínek (dovlhčení na úroveň 12,5 %) došlo k určitému zvýšení účinnosti. U *G. mellonella* došlo dokonce k navýšení účinnosti v porovnání s biotestem vedeným již od počátku v podmínkách 12,5 % vlhkosti. Tento efekt by mohl být zapříčiněn

prostým faktem, že vyhledávací schopnost byla posílena předchozími dočasně nevhodnými podmínkami, které mohly indukovat zvýšenou aktivitu nematod. Tyto výsledky se prokázaly zvláště u larev *G. mellonella*, ovšem trend navyšující se účinnosti se neprokázal u *T. molitor*.

6. ZÁVĚRY

- Byla vypracována metodika pro práci s entomopatogenními hlísticemi v půdním substrátu. Během testů se podařilo otestovat tři druhy EPNs (*Steinernema arenarium*, *S. carpocapsae* a *S. feltiae*).
- U všech testovaných druhů EPNs byla prokázána různá citlivost hostitele k testovaným druhům hlístic. Zatímco larvy *T. molitor* vykazaly nejvyšší mortalitu v teplotě 25°C po ošetření *S. carpocapsae*, *G. mellonella* byla nejcitlivější vůči *S. arenarium*. Celkově lze však považovat larvy *G. mellonella* za citlivějšího hostitele oproti *T. molitor*.
- Výsledky studie zaměřené na vliv teploty a vlhkosti na virulenci *S. feltiae* a *S. carpocapsae* ukázal, že oba druhy vykazují při 25°C srovnatelnou účinnost při vyšších testovaných koncentracích (500 IJs), v teplotách nižších (15 a 10°C) se projevila účinnější *S. feltiae* (statisticky však neprůkazně u *G. mellonella*).
- V případě vlivu vlhkosti na virulenci se prokázalo, že nízká vlhkost (6 %) má výrazný vliv na schopnost infikovat hostitele a to u obou studovaných druhů nematod. Při zpětném dovlhčení na úroveň 12,5 % se však v případě *S. carpocapsae* navýšila virulence vůči larvám *G. mellonella* a to u obou testovaných koncentrací (50 a 500 IJs), u *S. feltiae* se tento jev potvrdil pouze při 500 IJs. U *T. molitor* se tento trend neprojevil. *S. feltiae* vykazovala vyšší toleranci vůči nízké vlhkosti v prostředí oproti *S. carpocapsae*.
- *S. feltiae* může být bez velkých obtíží používána za chladnějších podmínek. Na druhé straně oba druhy hlístovek vykazovali problémy při vysoušení. A tudíž by se mělo zabránit vysychání půdy během aplikace i po ní anebo by měla být půdní vlhkost udržována na přiměřené úrovni, aby byla zajištěna alespoň minimální aktivita hlístic.

7. LITERATURA

- Adams B.J., Nguyen K.B. (2002): Taxonomy and Systematics. In: Gaugler R. (Ed.): Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing. UK. Wallingford. pp 1-33.
- Amarasinghe L.D., Hominick W.M., Briscoe B.R., Reid A.P. (1994): Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. *Journal of Helminthology*, 68: 277–286.
- Bale J.S., van Lenteren J.C., Bigler F. (2008): Biological Control and sustainable food production. *Philosophical Transaction of the Royal Society*, 363:761-776.
- Boemare N. (2002): Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler R. (Ed.): Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing. UK. Wallingford. pp 35-56.
- Burman M., Abrahamsson K., Ascard J., Sojoberg A. and Eriksson B. (1986): Distribution of insect parasitic nematodes in Sweden. In: Samson R.A., Vlak J.A. Peters, D. (Eds): Fundamental and Applied Aspects of Invertebrate Pathology: Proceedings of the Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Veldhoven. The Netherlands. Wageningen. pp 300–303.
- Bornstein-Forst S., Kiger H., Rector A. (2005): Impacts of fluctuating temperature on the development and infectivity of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* A10. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88: 147-153.
- Brown I.M., Lovett B.J., Grewal P.S., Gaugler R. (2002): Latent infection : a low temperature survival strategy in steinernematid nematodes. *Journal of Thermal Biology*, 27: 531-539.
- Campbell J.F., Gaugler R. (1997): Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: Dichotomy or variation along a continuum? *Fundamental and Applied Nematology*, 20:393–398.
- Campbell J.F., Kaya H.K. (2000): Influence of insect associated cues on the jumping behavior of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp.). *Behaviour*, 137: 591–609.
- Caroli L., Glazer I., Gaugler R. (1996): Entomopathogenic Nematode Infectivity Essay: Comparison of Penetration Rate into Different Hosts. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 227-233.

- Del Pino F.G., Morton A. (2005): Efficacy of entomopathogenic nematodes against neonate larvae of *Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera: Buprestidae) in laboratory trials. *BioControl*, 50: 307-316.
- Dolinski C., Del Valle E., Stuart R.J. (2006): Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*, 38: 422-427.
- Fisher-le Saux M., Arteaga-Hernández E., Mráček Z., Boemare N.E. (1999): The bacterial symbiont *Xenorhabdus poinarii* (Enterobacteriaceae) is harbored by two phylogenetic related host nematodes: the entomopathogenic species *Steinernema cubanum* a *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *Microbiology Ecology*, 29:149-157.
- Gaugler R., Bednarek A., Campbell J.F (1992): Ultraviolet inactivation of heterorhabditid and steinernematid nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 59: 155-160.
- Glazer I., Lewis E.E. (2000): Bioassays for Entomopathogenic Nematodes. In: Navon A., Ascher K.R.S. (Eds): *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CABI International. UK. Wallingford. pp 229-247.
- Glazer I. (2002): Survival Biology. In: Gaugler R.(Ed): *Entomopathogenic nematology*. CABI Publishing. UK. Wallingford. pp 169-180.
- Grewal P. S., Selvan S., Gaugler R. (1994): Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19: 245-253.
- Grewal P.S., Ehlers R.U., Shapiro-Ilan D.I. (2005): *Nematodes as biocontrol agents*. CABI Publishing. UK. Wallingford.
- Griffin, C.T., Downes, M.J. (1991): Low temperature activity in *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica*, 37: 83–91.
- Han RC, Ehlers R-U (1998): Cultivation of axenic *Heterorhabditis* spp dauer juveniles and their response to non-specific *Photorhabdus luminescens* food signals. *Nematologica*, 44: 425–435.
- Hazir S., Stock S.P., Kaya H.K., Koppenhöfer A.M., Keskin N. (2001): Developmental Temperature Effects on Five Geographic Isolates of Entomopathogenic

- Nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 243-250.
- Chen S., Li J., Han X., Moens M. (2003): Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.) to *Delia radicum*. *BioControl*, 48: 713–724.
- Kaya H.K., Köppenhofer A.M. (1996): Effect of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 333-345.
- Kaya H.K., Stock S.P. (1997): Techniques in insect nematology. In: Lacey L.A. (Ed.): *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press. San Diego. pp 281-324.
- Köppenhofer A.M., Kaya H.K., Taormino S.P. (1995): Infectivity of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at Different Soil Depths and Moistures. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65:193-195.
- Köppenhofer A.M., Baur M.E., Stock S.P., Choo H.Y., Chinnasri B., Kaya H.K. (1997): Survival of entomopathogenic nematodes within host cadavers in dry soil. *Applied Soil Ecology*, 6:231-240.
- Köppenhofer A.M., Fuzy E.M. (2007): Soil moisture effect on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabeidae*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zealandica*, and *H. bacteriophora*. *Applied Soil Ecology*, 35: 128-139.
- Kung S-P., Gaugler R., Kaya H.K. (1991): Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57: 242-249.
- Lacey L.A., Kaya H.K.(Eds.) (2000): *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Publisher. The Netherlands. Dordrecht. pp 285-293
- Lacey L.A., Frutos R., Kaya H.K., Vail P. (2001): Insect Pathogen as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. *Biological control*, 21: 230-248.
- Lewis E.E., Gaugler R. and Harrison R. (1992): Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*, 105: 309–315.
- Lewis E.E., Campbell J., Griffin Ch., Kaya H.K., Peters A. (2006): Behavioral ecology of entomopathogenic nematology. *Biological control*, 38: 66-79.

- Miduturi J.S., Matata G.J.M., Waeyenberge L. (1996): Naturally occurring entomopathogenic nematodes in the province of West-Flanders, Belgium. *Journal of Helminthology*, 70: 319-327.
- Mráček Z., Webster J.M. (1993): Survey of Steinernematidae and Heterorhabditidae (Rhabditida, Nematoda) in western. *Can Journal of Nematology*, 23: 423–437.
- Nguyen K.B. 1 (2010): <http://nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/ARENARIA.htm> (online 25.2.2010).
- Nguyen K.B. 2 (2010): <http://nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/CARPOCI.htm> (online 25.2.2010).
- Nguyen K.B. 3 (2010): <http://nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/FELTIAE.htm> (online 25.2.2010).
- Owuama CI (2001): Entomopathogenic symbiotic bacteria, Xenorhabdus and Photorhabdus of nematodes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 505-515.
- Shapiro-Ilan D.I., Gouge D.H., Piggot S.J., Fife J.P. (2006): Application technology and environmental consideration for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological control*. 38: 124-133.
- Smart G.C., Jr. (1995): Entomopathogenic Nematodes for the Biological control of Insects. *Journal of Nematology*, 27: 529-534.
- Stuart R.J., Barbercheck M.E., Grewal P.S., Taylor R.A.J., Hoy C.W. (2006): Population biology of entomopathogenic nematodes : Concepts, issues, and models. *Biological Control*, 38: 80-102.
- Weiser J., Mráček Z. (1988): *Parazitické hliště hmyzu*. Academia. Praha.
- Wharton, D.A. (1986): *A Functional Biology of Nematodes*. Croom Helm. London.
- Yang X., Jian H., Liu Z., Yang H., Yuan J., Quanli Z., Shuangyue L. (2003): Evaluation of entomopathogenic nematode for control of the beetle, *Luperomorfa suturalis* Chen (Col., Chrysomelidae). *Journal of Applied Entomology*, 127: 377-382.
- Zdroj 1: <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/nematodes.html> (online 13.10.2009).

8. PŘÍLOHY

8.1 Fotodokumentace



Foto č. 1: Epruvety s hlísticemi uložené v ledničce při 5-7°C (foto archiv KRV)

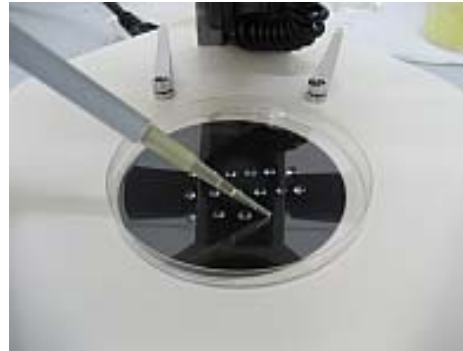


Foto č. 2: Odběr suspenze hlístic mikropipetou o objemu 5 μ l pro počítání živých hlístovek pod binokulárem (foto archiv KRV)



Foto č. 3: Naintrodukované jednotky v plastových krabičkách (foto Trnková)



Foto č. 4: Vitální larva *T. molitor* 5. den od aplikace *S. feltiae* (foto Trnková)



Foto č. 5: Mrtvé housenky *T. molitor* po 14. dnech od aplikace *S. feltiae* (foto Trnková)



Foto č. 6: Vodní past s *T. molitor* (foto

8.2 Tabulka 1: Přehled druhů hlístovek rodu *Steinernema* a k nim příslušné informace o nalezení (Adams and Nguyen, 2002).

Druh	Popsal	Isolováno z	Lokalita
<i>S. abbasi</i>	Elawad, Ahmad and Reid, 1997	půda	Omán
<i>S. affine</i>	(Bovien, 1937) Wouts, Mráček, Gerdin and Bedding, 1982	<i>Bibionidae</i>	Dánsko
<i>S. arenarium</i> <i>syn.</i> <i>N. arenaria</i> <i>N. anomali</i> <i>N. anomalae</i>	(Artyukhovsky, 1967) Wouts, Mráček, Gerdin and Bedding, 1982 Artyukhovsky, 1967 Kozodoi, 1984 (Kozodoi, 1984) Curran, 1989	<i>Anomala dubia</i>	centrální Rusko
<i>S. bicornutum</i>	Tallosi, Peters and Ehlers, 1995	půda	Vojvodina
<i>S. carpocapsae</i> <i>syn.</i> <i>N. carpocapsae</i> <i>N. feltiae</i>	(Weiser, 1955) Wouts, Mráček, Gerdin and Bedding, 1982 Weiser, 1955 sensu Stanuszek, 1974, nec Filipjev, 1934	<i>Cydia pomonella</i>	Československo
<i>S. caudatum</i>	Xu, Wang and Li, 1991	půda	Čína
<i>S. ceratophorum</i>	Jian, Reid and Hunt, 1997	půda	Čína
<i>S. cubanum</i>	Mráček, Hernandez and Boemare, 1994	půda	Kuba
<i>S. feltiae=bibionis</i> <i>syn.</i> <i>N. feltiae</i> <i>N. bibionis</i> <i>S. bibionis</i>	(Filipjev, 1934) Wouts, Mráček, Gerdin and Bedding, 1982 Filipjev, 1934 Bovien, 1937 (Bovien, 1937) Wouts, Mráček, Gerdin and Bedding, 1982	<i>Bibionidae</i> <i>Heliothis armigera</i>	Dánsko Austrálie
<i>S. glaseri</i> <i>syn.</i> <i>N. glaseri</i>	(Steiner, 1929) Wouts, Mráček, Gerdin and Bedding, 1982 Steiner, 1929	<i>Popillia japonica</i>	New Jersey, USA
<i>S. intermedium</i> <i>syn.</i> <i>N. intermedia</i>	(Poinar, 1985) Mamiya, 1988 Poinar, 1985	půda	Severní Karolína, USA
<i>S. kariii</i>	Waturu, Hunt and Reid 1997	půda	Keňa
<i>S. kushidai</i>	Mamiya, 1988	<i>Anomala cuprea</i>	Japonsko

<i>S. kraussei</i> <i>syn.</i> <i>Aplectana</i> <i>kraussei</i>	(Steiner, 1923) Travassos, 1927 Steiner, 1923	<i>Cephaleia</i> <i>abietis</i>	Německo
<i>S. longicaudum</i>	Shen and Wang, 1991	půda	Čína
<i>S. monticolum</i>	Stock, Choo and Kaya, 1997	půda	Korea
<i>S. neocurtillae</i> <i>syn.</i> <i>S. neocurtillis</i>	Nguyen and Smart, 1992 Nguyen and Smart, 1992	<i>Neocurtilla</i> <i>hexadactilla</i>	Florida, USA
<i>S. oregonense</i> <i>syn.</i> <i>S. oregonensis</i>	Liu and Berry, 1996 Liu and Berry, 1996	půda	Oregon, USA
<i>S. puertoricense</i> <i>syn.</i> <i>S. puertoricensis</i>	Roman and Figueroa, 1994 Roman and Figueroa, 1994	půda	Puerto Rico
<i>S. rarum</i> <i>syn.</i> <i>S. rara</i>	(Součet, 1986) Mamiya, 1988 Součet, 1986	půda	Argentina
<i>S. riobravis</i>	Cabanillas, Poinar nad Raulston, 1994	<i>Helicoverpa</i> <i>zea</i>	Texas, USA
<i>S. ritteri</i>	Doucet and Doucet, 1990	půda	Argentina
<i>S. scapterisci</i> <i>syn.</i> <i>N. carpocapsae</i>	Nguyen and Smart, 1990 Nguyen and Smart, 1988	<i>Scapteriscus</i> <i>vicinus</i>	Uruguay
<i>S. siamkayai</i>	Stock, Somsook and Reid, 1998	půda	Thajsko
<i>S. tami</i>	Luc, Nguyen, Reid and Spiridonov, 2000	půda	Vietnam

Tabulka 2: Charakteristika komerčně dostupných druhů hlístic (Lacey and Kaya, 2000)

Druh	Délka IJ (rozpětí) v μm	Barva mrtvého těla hostitele
<i>S. carpocapsae</i>	558(468-650)	běžová
<i>S. riobravis</i>	622(561-701)	běžová
<i>S. feltiae</i>	849(736-950)	žlutohnědá až hnědá
<i>S. glaseri</i>	1130(864-1448)	tmavě šedá až hnědá
<i>S. bacteriophora</i>	588(512-670)	dočervena až tmavě fialová
<i>S. megidis</i>	768(736-800)	oranžohnědá

Tabulka 3: Asociace vybraných druhů hlístovek rodu *Steinernema* a *Heterorhabditis* se symbiotickými bakteriemi (Boemare, 2002)

<i>Steinernema</i> a <i>Xenorhabdus</i>	
<i>Steinernema kraussei</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>S. abbasi</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>S. arenarium</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>S. affine</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>S. bicornutum</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>S. carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus nematophila</i>
<i>S. cubanum</i>	<i>Xenorhabdus poinarii</i>
<i>S. feltiae</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>S. glaseri</i>	<i>Xenorhabdus poinarii</i>
<i>S. intermedium</i>	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
<i>S. kushidai</i>	<i>Xenorhabdus japonica</i>
<i>S. longicaudum</i>	<i>Xenorhabdus beddingii</i>
<i>S. monticulum</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>S. puertoricense</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>S. rarum</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>S. riobrave</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>S. scapterisci</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>S. serratum</i>	<i>Xenorhabdus</i> sp.
<i>Heterorhabditis</i> a <i>Photorhabdus</i>	
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> subgroup Brecon	<i>Photorhabdus luminiscens luminiscens</i>
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> subgroup HP88	<i>Photorhabdus luminiscens laumondii</i>
<i>H. indica</i>	<i>Photorhabdus luminiscens akhurstii</i>
<i>H. zealandica</i>	<i>Photorhabdus temperata</i>
<i>H. bacteriophora</i> subgroup NC	<i>Photorhabdus temperata</i>
<i>H. megidis</i> Nearctic group	<i>Photorhabdus temperata</i>
<i>H. megidis</i> Palaearctic group	<i>Photorhabdus temperata temperata</i>