

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Studijní program: M401 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Specializace: Rostlinolékařství

**Hodnocení růstových a produkčních parametrů
nematofágní houby *Arthrobotrys oligospora***

(DIPLOMOVÁ PRÁCE)

Vedoucí diplomové práce

prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.

Autorka

Monika Šedivá

České Budějovice

2010

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

Jméno a příjmení: **Monika ŠEDIVÁ**
Osobní číslo: **Z05738**
Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Všeobecné zemědělství**
Název tématu: **Hodnocení růstových a produkčních parametrů
nematofágní houby *Arthrobotrys oligospora***
Zadávací katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

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

Cílem diplomové práce je vyhodnotit růstové a produkční vlastnosti nematofágní houby *Arthrobotrys oligospora* kultivované na vybraných umělých živných půdách a vybraných přirozených substrátech.

- 1) Charakteristika a fotodokumentace hlavních vývojových fází nematofágní houby *Arthrobotrys oligospora*.
 - 2) Optimalizace postupu standardní kultivace nematofágní houby *A. oligospora* na umělých živných půdách a hodnocení růstových a produkčních vlastností pomocí "in vitro" laboratorních testů (radiální růst, výtěžnost spor).
 - 3) Ověření technik produkce biomasy nematofágní houby *A. oligospora* pro účely aplikace houby do půdy (produkce spor na přirozených substrátech a inkorporace biomasy houby do alginátových pelet obohacených různým nutričním zdrojem).
-

Rozsah grafických prací: 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 40 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná


Seznam odborné literatury:

- Goettel M.S., Inglis G.D., Wraight S.P. 2000: Fungi. In: Lacey L.A., Kaya H.K. (Eds.): *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publishers, 255-282
- Jansson H.B., Lopez-Lorca L.V. (2001): Biology of Nematophagous Fungi. In: Mirsa J.K. and Horn B.W. (eds.): *Mycology: Trichomycetes and Other Fungal Groups*, Science Publishers, Inc., Endfield, 145-173
- Ciancio A., Mukerji K. G. 2008: Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes : Integrated Management of Plant Pests and Diseases. Springer London, Limited, 356
- Články získané z bibliografické a citační databáze Web of Science a bibliografické databáze CAB, BA, ZR.

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Zdeněk Landa, CSc.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Konzultant diplomové práce: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Datum zadání diplomové práce: 15. února 2010
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2010

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
učební osídlení
Studentská 13 ④
370 05 Česko Budějovice


prof. Ing. Miroslav Šoch, CSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. února 2010

Prohlášení:

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.

.....

datum

.....

podpis studenta

Poděkování:

Děkuji vedoucímu diplomové práce Prof. Ing. Zdeňku Landovi, CSc. za odborné vedení a věcné připomínky. Dále děkuji Ing. Andree Bohaté PhD. za její čas a všestrannou pomoc v průběhu zpracování této diplomové práce. Děkuji také pracovnícům Katedry rostlinné výroby, oddělení ochrany rostlin, Marii Nýdlové a Olze Divišové za technickou a praktickou pomoc při zakládání a vyhodnocování pokusů.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá hodnocením růstových a produkčních schopností nematofágní houby *Arthrobotrys oligospora*. V provedených pokusech byly zjišťovány informace týkající se růstu a sporulace houby na umělých živných půdách a na přirozených substrátech, vlivu podmínek kultivace na produkci biomasy a možnosti formulace biopreparátu na bázi *A. oligospora*.

Na základě provedených pokusů lze říci, že *A. oligospora* má výraznou schopnost saprofytického růstu. Houba rostla na všech vybraných druzích umělých (PDA, SDA, SLA, YEA, CMA, CDA, V8J, TSA) i přirozených substrátů (rýže, nahý oves, pluchatý oves, kroupy, ovesné vločky). Z výsledků vyplývá, že z hlediska růstu a výtěžnosti spor se jako nejvhodnější jeví umělá živná půda SLA, na které houba vykazuje velmi dobrý růst a současně produkuje nejvíce spor. Z přirozených substrátů byla nejvyšší sporulace zjištěna u ovesných vloček.

V dalších pokusech byl hodnocen vliv zdroje inokula *A. oligospora* (bloček z vysporulované kultury, suspenze konidií), způsobu třepání (vertikální, orbitální) a složení tekutého živného média na růst *A. oligospora*. Výsledky experimentů neprokázaly, že by jeden z výše uvedených faktorů nebo jejich možná kombinace měla na tekutá živná média podobný vliv. Při mikroskopickém posouzení byly v médiích zjištěny pouze fragmenty mycelia a náznak tvorby chlamydospor.

V poslední části práce byla hodnocena vitalita *A. oligospora* inkorporované do alginátových pelet, které se jeví jako vhodná formulace pro aplikaci houby do půdního prostředí. Pro jejich tvorbu byly použity různé druhy substrátů (kroupy, ovesné vločky, otruby, kukuřice, rýže). Houba rychle regenerovala, rostla a sporulovala na všech testovaných druzích alginátových pelet. Z hlediska rychlosti obrůstání a výtěžnosti spor se jako nejlepší substrát se jeví ovesné vločky a otruby.

klíčová slova: biologická ochrana; nematofágní houby; *Arthrobotrys oligospora*; kultivace; růstové parametry; produkční parametry

ABSTRACT

This M.Sc. thesis is aimed to describe growth and production parameters of nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. There was determined information about growth and sporulation of fungus on artificial and natural substrates, influence of cultivation condition on production biomass and possibility of formulation alginate pellets.

A. oligospora has very good saprophytic abilities. Fungus can growth on the entire tested artificial (PDA, SDA, SLA, YEA, CMA, CDA, V8J, TSA) and natural (rice, pillcorn, common oat, peeled barley, oat flakes) substrates. SLA is optimal artificial medium for growth and sporulation of fungus where fungus grows good and produces the most spores. From natural substrates fungus most sporulates on oat flakes.

In next assays, influence source of the inoculum (block from sporulated culture, conidie), motion of shaker (vertical, orbital) and composition of liquid media was evaluated. Based on results, it can not prove that one of mentioned elements or its combination influence liquid media in the same way. It was determined fragments of mycelium and chlamydospores during microscopic examination of liquid media.

There was evaluated vitality of *A. oligospora* incorporate in alginate pellets. This formulation is suitable for soil application. Alginate pellets were made from different substrates (peeled barley, oat flakes, bran, maize, rice). Fungus recovers, grows and sporulates well on all types of tested alginate pellets. The best substrates for growth and sporulation were oat flakes and bran.

key words: biological control; nematophagous fungi; *Arthrobotrys oligospora*; cultivation; growth parameters; production parameters

| | |
|---|-----------|
| 1. ÚVOD..... | 9 |
| 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED | 11 |
| 2.1 BIOLOGICKÁ OCHRANA | 11 |
| 2.1.1 Používané organismy..... | 12 |
| 2.1.1.1 Makrobiální agens..... | 13 |
| 2.1.1.2 Mikrobiální agens | 14 |
| 2.2 NEMATOFÁGNÍ HOUBY | 17 |
| 2.2.1 Definice a rozdělení..... | 17 |
| 2.2.2 Výskyt..... | 18 |
| 2.2.3 Fytofágní hád'átka..... | 19 |
| 2.2.4 Využití v biologické ochraně..... | 21 |
| 2.3 ARTHROBOTRYS OLIGOSPORA | 23 |
| 2.3.1 Taxonomie..... | 23 |
| 2.3.2 Konidie | 23 |
| 2.3.3 Infekční struktury | 24 |
| 2.3.4 Interakce nematoda – houba..... | 27 |
| 2.3.5 Požadavky na výživu | 29 |
| 2.3.6 Produkce a formulace | 29 |
| 3. MATERIÁL A METODIKA | 31 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY..... | 40 |
| 5. DISKUZE A ZÁVĚRY | 73 |
| 6. POUŽITÉ ZDROJE | 77 |
| 7. PŘÍLOHY..... | 80 |

1. ÚVOD

Snaha člověka o získání maximální zemědělské produkce vedla v minulém století k velkoplošnému a intenzivnímu používání pesticidů. Postupem času se však začala objevovat celá řada problémů spojená s jejich nadměrným a dlouhodobým používáním (vznik rezistentních populací škůdců, rezidua perzistentních pesticidů v prostředí, snížení biodiverzity v agroekosystémech). Tyto vedlejší efekty vedly k nutným změnám v ochraně rostlin.

V roce 1956 byla založena IOBC (Mezinárodní organizace pro biologickou a integrovanou ochranu proti škodlivým živočichům a rostlinám) jako politicky nezávislá, vědecko-odborná instituce orientovaná na problematiku biologické a integrované ochrany rostlin. Založení IOBC bylo motivováno konsensuální snahou vědecké a odborné komunity cíleně vyvíjet a do zemědělské praxe zavádět pěstitelské technologie šetrné k životnímu prostředí, s jednoznačným důrazem a orientací na biologické metody regulace populací škůdců a supresi vývoje a šíření původců onemocnění rostlin a na integrovanou ochranu rostlin (IPM – Integrated Pest Management). Tato organizace sehrává klíčovou roli ve vývoji obecného pojetí integrované produkce (definice, cíle, principy) a tvorbě standardních směrnic a metodických návodů orientovaných do oblasti IP v Evropě (Hrabánková et al. 2005).

Oproti konvenčnímu zemědělství, ve kterém jsou k potlačování škodlivých organismů používány převážně chemické metody, jsou v IPM upřednostňovány biologické, agrotechnické, fyzikální a biotechnické metody. Cílem IPM není úplné lokální vyhubení škůdců, ale udržení jejich populací pod ekonomickým prahem škodlivosti při současném minimálním vlivu na životní prostředí.

V důsledku tohoto konceptu došlo u zemědělských producentů ke zvýšení zájmu o biologickou ochranu. Biologické přípravky jsou dnes používány v mnohem větší míře, než tomu bylo v minulosti. Biopreparáty se používají hlavně u plodin pěstovaných ve sklenících, kde je jejich využití díky řízenému prostředí snazší a úspěšnější, avšak celá řada z nich nachází uplatnění i v běžné zemědělské praxi, kde představují významnou alternativu ke konvenční chemické ochraně.

Využívání biologických metod v ochraně rostlin je v současné době podporováno i samotnými spotřebiteli, kteří žádají chemicky neošetřené produkty a

neváhají za ně zaplatit vyšší cenu. Tomuto požadavku se podřizuje řada pěstitelů, kteří od používání pesticidů odstupují a přecházejí na ekologický systém produkce. Tento trend významnou měrou přispívá k výzkumu a vývoji nových biologických přípravků. Smutným faktem však zůstává, že i přes narůstající spotřebu biopreparáty stále představují jen malý zlomek z nákladů vynaložených na ochranu rostlin.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Biologická ochrana

Definice a rozdělení

Pojem biologická ochrana (BO) byl definován mnoha biology. Zakladatel moderní BO prof. H. S. Smith tento termín definoval jako „použití přirozených nepřátel (ať již introdukovaných nebo jinak přinesených) v boji proti hmyzím škůdcům“. Dr. P. DeBach definoval BO jako „působení parazitů, predátorů nebo patogenů na udržování populační hustoty škůdců na nižší úrovni, než jaká by byla v jejich nepřítomnosti“. DeBach odlišil BO (biological control) od přirozené regulace (natural control), kterou definoval jako „udržování fluktuující populační hustoty organismu v mezích daných definovatelnými horními a spodními limity po dobu působení abiotických a/nebo biotických podmínek prostředí“. Později tyto termíny upravil Dr. van der Bosch, který BO chápal jako „manipulaci člověka s přirozenými nepřáteli v boji proti škůdcům“ a přirozenou ochranu jako „ochranu, která se vyskytuje bez zásahu člověka“ (Anonym 2)

BO zahrnuje tři hlavní strategie: **1) Klasickou** (někdy nazývanou inokulativní), **2) Augmentativní** – zde rozlišujeme: a) inundativní introdukci a b) sezónní inokulativní introdukci a **3) Konzervativní** (Bale et al. 2007).

1) Klasická nebo inokulativní strategie je většinou používána proti nepůvodním škodlivým organismům, kteří pronikli do nových zemí nebo oblastí světa. Relativně malé množství jedinců přirozeného nepřítele je vzato z areálu původního rozšíření škůdce a inokulováno do nového prostředí. Zde vytvoří populaci, která může přežít po velmi dlouhou dobu. Tento typ BO je nejvíce účinný ve vytrvalých plodinách, kde dlouhodobá interakce škůdce – přirozený nepřítel umožní zajistit dlouhodobý efekt (Bale et al. 2007).

2) Augmentativní strategie zahrnuje činnosti, ve kterých jsou populace přirozených nepřátel zvyšovány pomocí masového chovu a periodické introdukce (inokulativní nebo inundativní). Po osídlení nového areálu introdukovaný druh potlačí původní nebo nepůvodní škůdce (Orr 2009). Augmentativní ochrana je používána tam, kde se populace přirozených nepřátel nevyskytují nebo nejsou schopny dostatečně rychle korespondovat s růstem populací škůdce (Landis and Orr 1996).

a) Při metodě sezónní inokulativní introdukce se inokuluje relativně nízký počet přirozených nepřátel, kteří se následně pomnoží. Jakmile se populace přirozených nepřátel zvětší, potlačí škodlivý organismus po delší časové období. Výskyt škůdce být regulován po celou sezónu, nebo dokud klimatické podmínky nebo nedostatek potravy nezpůsobí zánik populace (Henn et al. 1995). Vlastní ochranný efekt je dosažen především následujícím pokolením, ne populací přímo vypuštěnou. Tento způsob má dlouhodobější efekt (Vondrášková 2008).

b) Cílem inundativní introdukce je vytvoření širokého poměru ve prospěch přirozených nepřátel a podobně jako při aplikaci pesticidů, vyvolat rychlé snížení nebo lokální vymizení populace škůdce (Bale et al. 2007). Ochranného efektu je dosaženo přímo vypuštěnými jedinci. Tento způsob má krátkodobější efekt (Vondrášková 2008).

3) V konzervativní ochraně se používají přirození predátoři a parazitoidi proti nativním škůdcům (Bale et al. 2007). Při této strategii jsou vylučovány zásahy narušující přirozený vývoj přirozených nepřátel a eventuálně prováděny opatření pro zvýšení jejich výskytu (Vondrášková 2008). Pomocí úprav prostředí se snažíme zlepšit účinnost přirozených nepřátel při potlačování škodlivých organismů (Orr 2009). Konzervace přirozených nepřátel zahrnuje jednak omezování faktorů, které mají na jejich výskyt nepříznivý vliv a poskytování zdrojů, které v prostředí potřebují (přístup k náhradním hostitelům, zdroj potravy pro dospělé, dobré podmínky k přezimování, konstantní přísun potravy a vhodné mikroklima) (Landis and Orr 1996).

Výhody a nevýhody

Výhody a nevýhody BO jsou často vyjadřovány ve srovnání s pesticidy (Bale et al. 2007). Výhody spočívají v bezpečnosti pro člověka a jiné necílové organismy, snižování reziduí v potravě, zachování přirozených nepřátel a zvýšení biodiverzity ekosystémů (Lacey et al. 2001). Je nepravděpodobné, že by došlo ke vzniku rezistence k bioagens. V mnoha případech ochrana přetrvává po dlouhou dobu (Bale et al. 2007).

Nevýhody biologický přípravků oproti chemickým insekticidům jsou často spojeny s perzistencí, rychlostí účinku, specificitou (příliš široké nebo úzké hostitelské spektrum) a cenou (Lacey et al. 2001).

2.1.1 Používané organismy

Dominantní roli v biologické regulaci hrají přirození nepřátelé škůdců, kteří se běžně vyskytují v ekosystémech a v různé míře se podílejí na tzv. přirozené regulaci

populací různých druhů organismů, z nichž některé patří k významným škůdcům i v zemědělství (Vondrášková 2008).

Mnoho schémat BO používá dravý hmyz a roztoče (predátory), hmyz parazitující na jiném hmyzu (parazitoidy) anebo hlístice proti škodlivému hmyzu. Tyto organismy nazýváme „makrobiální“ agens. V BO proti členovcům se také používají „mikrobiální“ agens (bakterie, viry a houby) (Bale et al. 2007).

2.1.1.1 Makrobiální agens

Masová produkce přirozených nepřátel zaznamenala za posledních 30 let rychlý vývoj. Byly vynalezeny nové metody masové produkce, což umožnilo navýšit produkci a rozšířit spektrum používaných organismů. Rozvoj v oblasti masové produkce, kontroly kvality, skladování, dopravování a vypouštění přirozených nepřátel snížilo cenu produkce a vedlo k zlepšení kvality (van Lenteren 2000).

Predátoři

Predátoři jsou zpravidla stejně velcí nebo větší než jejich oběť, na kterou jsou vázáni pouze potravně. Někteří predátoři se živí dravě pouze v larválních stádiích, jiní jsou predátory v juvenilních stádiích i v dospělosti. Predátoři mohou být potravně nespécializovaní (živící se širokou škálou druhů) nebo specializovaní (živící se jen jedním nebo několika příbuznými druhy) (Henn et al. 1995).

Druhy používané v BO náleží do řádů *Coleoptera*, *Hemiptera* (dravé ploštice), *Diptera*, *Neuroptera* (zlatoočka) a *Hymenoptera* (dravé vosičky). V ochraně proti roztočům jsou důležití zástupci z čeledi *Phytoseiidae* (Flint et al. 1999).

Parazitoidi

Oproti parazitům, bývají parazitoidi velcí jako jejich hostitelé, které během svého vývoje zabíjí. Většina parazitoidů je vysoce specializovaná a vajíčka kladou na nebo do jednoho vývojového stádia jednoho nebo několika blízce příbuzných druhů hostitele (Henn et al. 1995).

Většina parazitoidů náleží do řádů *Hymenoptera* (parazitické vosičky) a *Diptera* (Flint et al. 1997). Nejvíce studovanými a používanými parazitoidy v zemědělství jsou *Trichogramma*, *Encarsia*, *Muscidifurax*, *Spalangia* a *Bracon* (Henn et al. 1995).

Celosvětově nejpoužívanějším parazitoidem je parazitická vosička *Trichogramma*. Většina druhů *Trichogrammy* snáší vajíčka do vajíček mūr a motýlů

(Henn et al. 1995). V severní Evropě se nejvíce používá v porostech kukuřice proti zavíječi kukuřičném (*Ostrinia nubilalis*), kdy se vypouštějí jedenkrát do roka puparia různého stáří (van Lenteren et al. 1997).

Jedním z nejlepších příkladů BO je používání *Encarsia formosa* ve sklenících proti molici skleníkové (*Trialeurodes vaporariorum*), m. bavlníkové (*Bemisia tabaci*), molici *B. argentifolii* (van Lenteren et al. 1997). Dospělci Encarsie snášejí vajíčka do třetího a čtvrtého stádia nymfy. Během vývoje larvy, parazitované nymfy molice zčernají a zemřou. (Henn et al. 1995).

Hlístice

Zástupci čeledi *Steinernematidae* a *Heterorhabditidae* poutají nejvíce pozornosti kvůli potenciálnímu využití v ochraně proti půdnímu hmyzu (Lacey et al. 2001). Hlístice zabíjí hostitele pomocí symbiotických bakterií, které mají uvnitř trávicího traktu. V hemolymfě hostitele se bakterie rychle namnoží a během 48 h hostitele zabíjí. Bakterie přemění tkáň oběti na produkty, které hlístice snadno využijí. Hlístice se uvnitř těla množí. Jakmile dosáhnou třetího larválního stádia, opouští tělo hostitele a vydávají se hledat novou oběť (van Lenteren et al. 1997).

V BO vůči slimákům a plzákům se používá parazitická hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita*, která je asociovaná se symbiotickou bakterií *Moraxela osloensis*. Po aplikaci přípravku přestane napadený slimák do 3 dnů přijímat potravu a během 1-3 týdnů hyne (Wilson 2007).

2.1.1.2 Mikrobiální agens

Patogenní organismy jako jsou viry, bakterie, rickettsie, houby, protozoa a hlístice jsou běžně izolovány z hmyzu a jiných bezobratlých. Jejich výskyt v populacích bezobratlých organismů přispívá k přirozené regulaci škůdců lidí, plodin a domestikovaných zvířat (Kaya and Lacey 2007).

Bakterie

Bacillus thuringiensis je aerobní, sporulující, gram pozitivní, tyčinkovitá bakterie (Garczynski and Siegel 2007). V současnosti jsou používány různé varianty této bakterie proti škůdcům v zemědělství, lesnictví a proti některým larvám krve sajícího hmyzu (Lacey et al. 2001). Nejrozšířenějším druhem *B. thuringiensis* v zemědělství je *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, která je obzvláště účinná proti motýlům

(Manion 1995). Ve vodním prostředí se proti moskýtům a muchničkám používá *B. thurengiensis* var. *israelensis* (Kaya and Lacey 2007).

Insekticidní proteiny *B. thurengiensis* jsou vysoce specifické toxiny, které působí jako požerový jed a napadají střevo hmyzu. Jsou velmi bezpečné s ohledem na necílové organismy včetně obratlovců. Mechanismus účinku zahrnuje kaskádu pochodů, které během několika hodin po pozření vedou k smrti organismu. Insekticidní účinek *B. thurengiensis* je spojován s bílkovinnými toxiny, které se nacházejí v parasporální proteinové inkluzi, tzv. krystalu Cry. Krystaly jsou produkovány při sporulaci a zaujímají 30% z vnitřního obsahu bakterie. Souhrnně se toxiny nacházející se v krystalu řadí mezi δ -endotoxiny. Cry1 proteiny, které jsou primárně aktivní proti larvám motýlů, jsou nejvíce studovanými insekticidními proteiny *B. thurengiensis* s ohledem na jejich strukturu a mechanismus účinku. Cry1 proteiny (protoxiny), které se nalézají v krystalu, jsou biologicky neaktivní. Po pozření a rozpuštění krystalu v alkalickém prostředí středního střeva, rozštěpení proteinů proteolytickými enzymy na menší proteiny o velikosti 60-65 kDa, jsou protoxiny aktivovány na toxiny. Toxiny se vážou na specifické receptory na povrchu buněk epitelu středního střeva, jejímž důsledkem je tvorba pórů v buněčných membránách, narušení membránového transportu, lyze buněk a nakonec smrt organismu (Lacey et al. 2001). Otvory ve středním střevě způsobené toxiny umožní smíchání hemolymfy s obsahem střeva, což vede k celkové septikémii a smrti (Garczynski and Siegel 2007). Ostatní bakterie jsou v ochraně proti hmyzu používány v mnohem menším měřítku (Lacey et al. 2001).

V ochraně proti houbovým chorobám je využívána grampozitivní, sporulující bakterie *Bacillus subtilis*, která vytváří odolné spory vůči nepříznivým podmínkám okolí (teplo, vysušení). Spory mohou být snadno formulovány do stabilních produktů (suchý prášek). Kmen *B. subtilis*, Kodiak, je nejen velmi účinný v ochraně plodin vůči patogenům rodu *Fusarium* a *Rhizoctonia*, ale také stimuluje růst rostlin (Emert and Handelsman 1999).

Viry

Velký počet virů nabízí možnost využití jako mikrobiální agens. Největší potenciál mají *Baculoviridae* (*Nucleopolyhedroviry* a *Granuloviry*). Bylo zaznamenáno více než 400 druhů hmyzu, hlavně motýli (*Lepidoptera*) a blanokřídlí (*Hymenoptera*), které mohou být napadány těmito viry.

Zástupci z čeledě *Baculoviridae* jsou tyčinkovité viry, jejichž infekční DNA tzv. virion, je obalen primární bílkovinnou membránou tzv. nukleokapsida. Viriony granulovirů jsou jednotlivě uzavřeny v proteinové matici – granulinu. Nucleopolyhedroviry mají viriony obaleny proteinovou maticí – polyhedrinem, jednotlivě nebo po skupinách (Lacey et al. 2001).

Po požití viru hostitelem dochází v alkalickém prostředí středního střeva k rozpuštění ochranné matrice. Uvolněný virion vstoupí do epitelálních buněk střeva a v jádru se pomnoží. Z buněk střeva se po namnožení uvolňují nezapouzdřené viry, které pomocí hemolymfy pronikají do jiných tkání. Obalené viry slouží jako inokulum pro dalšího hostitele (Lacey et al. 2001).

Houby

V přírodě se vyskytuje velký počet hub z různých taxonomických skupin, které jsou patogenní pro škůdce rostlin (hmyz, roztoče, háďátka, houby).

Velký počet hub parazituje na hmyzu a malých členovcích jako jsou roztoči a pavouci. Tyto houby nazýváme entomopatogenní (Burge 1998). Většina entomopatogenních hub patří do říše *Eumycota* neboli pravé houby, která se dělí do čtyř oddělení – *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota*. Nejznámějším patogenem v oddělení *Chytridiomycota* je rod *Coelomycetes*, jehož zástupci jsou obligátními parazity moskyty a jiných Dipter. Většina entomopatogenů z oddělení *Zygomycota* patří do řádu *Entomophthorales*. Entomopatogenní houby zastoupené v tomto řádu patří do rodů *Conidiobolus*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Neozygites* a *Zoopthora*. Mnoho entomopatogenních hub částečně nebo zcela ztratily schopnost vytvářet pohlavní stádium. K této skupině patří důležité entomopatogenní houby z rodů *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces*, *Tolyocladium*. Protože pohlavní stádium většiny druhů není známo nebo je nacházíme v blízkém spojení s anamorfami, řadíme tyto houby do třídy *Hyphomycetes* umělého oddělení *Deuteromycota* (Goettel et al. 2007). V současné době jsou používány produkty obsahující *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicium lecanii* a *Paecilomyces fumosoroseum* (Lacey et al. 2001).

Dravé houby jsou charakteristické tvorbou pastí, do kterých chytají svoji kořist. Náleží do různých taxonomických skupin. Patří sem všichni zástupci řádu *Zoopagales* (*Zygomycetes*) a mnoho zástupců z čeledi *Moniliaceae* (*Fungi Imperfecti*). *Zoopageles* jsou obligátními predátory, kteří se živí převážně měňavkami a jinými prvky, ačkoli

někteří zástupci jsou schopni lapit i nematody. Dravé houby z čeledi *Moniliaceae* téměř výhradně chytají nematody. Nejsou obligátními parazity a v případě absence hostitele dokáží přežívat saprofytický. K chycení kořisti používají různé mechanismy. *A. oligospora* vytváří z hyf lepkavé sítě, které slouží k zachycení nematoda. Jiní zástupci vytváří na konci laterálních hyf lepkavé knoflíky (*Dactyllela ellipsospora*) nebo oka z buněk (*Dactyllela lysipaga*). U některých druhů (*Arthrobotrys dactyloides*) se tato oka po kontaktu s nematodem rychle zvětší a zachytí jej. Houby parazitující na nematodech se můžeme nalézt u všech tříd nematod. Endoparazité jako *Meria* a *Hirsutella* vytváří lepkavé spory, které přilnou ke kutikule hlístice. Následně houba penetruje kutikulu a proniká do tělní dutiny. Některé houby (*Dactyllela oviparasitica*) napadají vaječná stádia.

Houby mohou být také využity proti jiných houbových patogenům. V BO jsou používány například *Trichoderma harzianum*, která potlačuje houby způsobující padání klíčnicích rostlin a *Coniothyrium minitans*, která napadá patogeny z rodu *Sclerotinia* (Burge 1998).

2.2 Nematofágní houby

2.2.1 Definice a rozdělení

Nematofágní houby jsou organismy, které jsou schopny během životního cyklu napadat všechny stádia nematod (Jansson and Lopez-Lorca 2001).

Zástupce nematofágních hub nalezneme ve všech hlavních skupinách hub, včetně nižších hub (*Oomycetes*, *Chytridiomycetes*, *Zygomycetes*) a vyšších hub (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Deuteromycetes*) (Nordbring-Hertz et al. 2006).

Podle způsobu napadení hostitele se nematofágní houby dělí do čtyř skupin: **1)** Houby chytající nematody do lepkavých nebo mechanických pastí, **2)** Endoparazitické houby, které infikují nematody pomocí spor, **3)** Vaječní parazité, kteří napadají vajíčka a samice nematod pomocí hyfových výběžků, **4)** Houby produkující toxiny, pomocí nichž před průnikem do těla nematody znehybní (Liu et al. 2009).

1) Tyto houby chytají červovité nematody pomocí speciálních chytacích útvarů, které se tvoří na hyfách. Pastí mohou mít funkci lepicí, kdy se hlístice přilepí nebo mechanickou. Mezi lepicí pastí patří dvou nebo tří rozměrné lepkavé sítě (*Arthrobotrys*

oligospora), lepivé knoflíky (*Monacrosporium haptotylum*) a lepivé větve (*Monacrosporium gephyropagum*). Mechanické pasti jsou dvojího typu. Prvním typem jsou škrťící oka tvořené třemi buňkami. Tyto buňky se při kontaktu s hlísticí zvětší, a tak nematoda chytí (*Arthrobotrys dactyloides*). Druhým typem jsou neškrťící oka (*Monacrosporium haptotylum*) (Jansson and Lopez-Llorca 2001).

2) Endoparazitické houby oproti houbám chytajících nematody do pastí netvoří extenzivní mycelium vně těla hostitele. Většina druhů se v půdě vyskytuje jako spory, které zůstávají do kontaktu s vhodným hostitelem dormantní (Stirling 1988). Spory mohou být pohyblivé – např. zoospory *Catenaria anguilluae* nebo nepohyblivé – např. konidie (Jansson and Lopez-Llorca 2001). Nematody infikují buď přilnutím k povrchu jejich těla nebo přímo pozřením. Spory rychle vyklíčí a asimilační hyfy absorbují celý obsah těla nematoda (Liu et al. 2009). Zástupce endoparazitických hub s adhezními sporami můžeme nalézt v rodech *Meria*, *Verticillium*, *Hirsutella*, *Meristacrum* a *Cephalosporium* (Stirling 1998).

3) Mezi detailně studované vaječné parazity patří zástupci z taxonomicky odlišných skupin – např. *Pochonia chlamydosporia* (syn. *Verticillium chlamydosporum*), *Dactylella oviparasitica*, *Paecilomyces lilacinus*, *Rhopalomyces elegans* a *Cylindrocarpon destructor* (Stirling 1998). Tyto houby parazitující na nepohyblivých stádiích nematod, jako jsou například vajíčka, používají různou strategii. Hyfy *Pochonia chlamydosporia* a jiných druhů hub, které rostou k vajíčku, vytváří na hyfovitých výběžcích apresoria, která pronikají skrz vaječnou skořápku. Houby poté obsah vajíček stráví (nezralý i zralý, obsahující mladé nematody) (Nordbring-Hertz et al. 2006).

4) Houby produkující toxiny, například *Pleurotus ostreatus*, před průnikem do těla svou oběť znehybní toxiny (Jansson and Lopez-Lorca 2004). Po znehybnění nematoda roste houba chemotropicky směrem k přirozeným otvorům a infikuje hostitele (Jansson and Lopez-Lorca 2001).

2.2.2 Výskyt

Výskyt nematofágních hub v půdě můžeme zjistit tzv. půdní posypovou metodou. Při této metodě se vezme přibližně 1 g půdy, která se rozptýlí na povrch misek s vodním agarem. Poté se přidají nematodi, kteří slouží jako návnada. Misky se pozorují pod mikroskopem po dobu 5-6 týdnů a hledají se napadení nematodi, infekční struktury a konidie nematofágních hub (Nordbring-Hertz et al. 2006).

Nematofágní houby jsou půdní organismy, které se vyskytují ve většině půd od tropů až po arktické oblasti. Nejhojněji se nalézají v půdách bohatých na humus. V půdním vzorku se obvykle nachází jeden až pět druhů s četností 1,8-150 propagulí na gram půdy. Tento rozdíl je způsoben vlivem vnějších faktorů – např. půdním druhem, obsahem organické hmoty, vlhkostí, teplotou a přítomností nematodů (Jansson and Lopez-Llorca 2004).

V zemědělských půdách v teplejších oblastech nematofágní houby podléhají sezónním změnám. Nejvyšší hustotu a počet druhů nacházíme ke konci léta a na podzim, pravděpodobně kvůli vyšší teplotě půdy a vzrůstajícímu množství organických zbytků. Nejvyšší četnost výskytu hub je v horních 20 cm půdy. V hloubce pod 40 cm se téměř nevyskytují.

Většina zástupců nematofágních hub jsou fakultativní parazité, kteří mohou v půdě přežívat saprofytický na organických zbytcích. Nematofágní houby se liší v saprofytických a parazitických schopnostech. Zatímco houby chytající nematody do pastí a vaječní parazité mohou přežívat v půdě saprofytický, endoparazité jsou většinou závislí na nematodech jako zdroji živin (obligátní parazité) (Nordbring-Hertz et al. 2006). Houby chytající nematody do pastí mají schopnost saprofytického růstu a mohou tak být považovány za fakultativní parazity, s výjimkou zástupců patřících do *Zygomycetes*, kteří jsou obligátní parazité. Až na výjimky mají tyto houby nízkou hostitelskou specificitu a napadají všechny druhy nematod (Jansson and Lopez-Llorca 2001).

Hlavním problémem nematofágních a dalších hub aplikovaných do půdy je jejich nízká schopnost udržet se v půdním prostředí (Nordbring-Hertz et al. 2006). Nematofágní houby, i přes jejich saprofytické schopnosti, nejsou dobrými konkurenty v půdním prostředí. Z tohoto důvodu schopnost napadat jiné organismy – nematody, jiné houby, kořeny rostlin – je důležitá pro jejich přežití v půdě (Jansson and Lopez-Llorca 2004)

2.2.3 Fytofágní háďátka

Fytofágní háďátka mohou být členěna z hlediska taxonomie nebo ekologie. Významné druhy fytofágních háďátek náleží do řádů *Tylenchida* a *Dorylaimida*. Z hlediska ochrany rostlin je toto systematické rozdělení nepraktické, a proto praktická fytonematologie preferuje dělení do skupin podle vývojové vazby na hostitelskou rostlinu. Ačkoliv jsou všechna fytofágní háďátka primárně vázána na půdní prostředí,

nenapadají pouze podzemní orgány rostlin. Hád'átka můžeme podle místa parazitace rozdělit na dvě skupiny:

A. Hád'átka poškozující kořeny rostlin (kořenová hád'átka)

a) sedenterní (nepohyblivá, přisedlá)

- cystotvorná (rod *Heterodera*, *Globodera*)
- hálkotvorná (rod *Meloidogyne*)

b) pohyblivá (volně žijící)

- ektoparazitická (čeleď *Tylenchidae*, rod *Tylenchus*)
- endoparazitická (čeleď *Pratylenchidae*)

B. Hád'átka parazitující převážně na nadzemních částech rostlin

- hád'átka osní (*Tylenchidae*, rod *Ditylenchus*)
- hád'átka listová (*Aphelenchoididae*, rod *Aphelenchoidae*)
- hád'átka květní (*Tylenchidae*, rod *Anguina*)

(Landa 1986).

Kořenová hád'átka jsou hospodářsky důležitější. Působí značné škody a ochrana vůči nim je obtížná. U sedenterních hád'átek se v životním cyklu vyskytuje nepohyblivé stádium. Larvy se po krátké aktivní fázi ztratí svoji pohyblivost a usadí se v pletivech. Po proniknutí larev do pletiva kořínku dochází k charakteristickým změnám v okolí hlavy larvy (Štaif 1981). Tato skupina zahrnuje nejvýznamnější skupiny parazitů rostlin – cystotvorná hád'átka (*Heterodera spp.*, *Globodera spp.*) a hálkotvorná hád'átka (*Meloidogyne spp.*) (Jansson and Lorca-Lopez 2004).

Volně žijící kořenová hád'átka nejsou v půdě vázána na jedno místo parazitace. Mohou se pohybovat od rostliny k rostlině i v rámci korových pletiv kořene. Obě pohlaví mají po celý život hádkovitý tvar těla. Většina druhů je polyfágních a žijí ekto- nebo endoparaziticky (Štaif 1981). Pohybliví ektoparazité způsobují malé škody. Zůstávají v půdě a sají na extracelulárních buňkách v povrchové vrstvě kořenů. Pohybliví endoparazité vstupují do kořenů, kde se pohybují a sají. Způsobují značné škody a společně s ostatními půdními patogeny (houby, bakterie) mohou působit synergicky a vyvolávat další choroby (Jansson and Lorca-Lopez 2004).

Hád'átka škodící na nadzemních částech rostlin se pomocí vodního filmu dostávají z půdy na nadzemní části rostlin. Na ostatní rostliny se šíří pomocí vodních kapek (Štaif 1981).

2.2.4 Využití v biologické ochraně

Jedním z významných aspektů nematofágních hub je jejich možnost využití v biologické ochraně v boji proti nematodům parazitujícím na rostlinách a zvířatech. Hád'átka parazitující na rostlinách, např. hálkotvorná a cystotvorná hád'átka, jsou globálními škůdci, kteří způsobují velké sklizňové ztráty v zemědělství a zahradnictví. Následkem zákazu mnoha nematocidů, např. metylbromidu, kvůli nepříznivému vlivu na zdraví člověka a životní prostředí, je potřeba nalézt nové možnosti v ochraně proti nematodům (Nordbring-Hertz et al. 2006).

Je známo velké množství hub, které napadají nematody. Mezi nejvýznamnější rody patří *Paecilomyces*, *Pochonia*, *Hirsutella*, *Nemathophora*, *Arthrobotrys*, *Drechmeria*, *Fusarium* a *Monacrosporium* (Siddiqui and Mahmood 1996).

První pokusy s nematofágními houbami proti fytofágním hád'átkům se zaměřovaly na houby chytající nematody do pastí (*Arthrobotrys*, *Monacrosporium*). Posléze se začaly provádět experimenty s používáním endoparazitů (*H. rhossoliensis*, *D. coniospora*) a vaječných parazitů (*P. chlamydospora*) (Nordbring-Hertz et al. 2006).

Ačkoliv bylo za posledních 50 let provedeno mnoho experimentů na zjištění účinnosti těchto hub, nenašly zatím nematofágní houby v zemědělských programech ochrany proti hád'átkům uplatnění. Důvody pro nedostatečný rozvoj této oblasti jsou 1) použité druhy hub byly spíše saprofyty než predátoři, 2) výsledky pokusů jsou neprůkazné kvůli metodologickým problémům, 3) masová produkce hub na pevných substrátech je drahá a je obtížné jí přizpůsobovat, 4) aplikační dávky byly pro použití v zemědělství příliš vysoké (Stirling et al. 1998b).

V České republice nejsou dle Seznamu registrovaných přípravků a dalších prostředků na ochranu rostlin pro rok 2009 registrovány žádné přípravky na bázi nematofágních hub (Anonym 3).

Paecilomyces lilacinus

V půdě běžně se vyskytující houba *Paecilomyces lilacinus* je účinný parazit vajíček nematod. V biologické ochraně proti různým druhům fytopatogenních hád'átek se v současné době nejvíce používá *Paecilomyces lilacinus*, kmen 251. Způsob a průběh

infekce různých vývojových stádií nematod se odvíjí podle původu izolátu houby a druhu nematoda. *Paecilomyces lilacinus* je schopna infikovat všechna vývojová stadia *Meloidogyne javanica* přímou penetrací kutikuly nematod. Raná vývojová stadia jsou k infekci více vnímavá oproti vajíčkům obsahující plně vyvinuté mladé nematody. Tato houba také napadá vajíčka a nezralé cysty *Heterodera avenae* a vajíčka *Radopholus similis* (Khan et al. 2006).

Vajíčka háďátek *Meloidogyne spp.* jsou infikována rychleji než vajíčka háďátek *Globodera* a *Nacobbus* (Siddiqui and Mahmood 1996).

Pochonia chlamydosporia

Pochonia chlamydosporia je parazitem cystotvorných a hálkotvorných háďátek. V případě absence vhodného hostitele může přežívat v půdě saprofytický. Tato houba je hlavní příčinou přirozeného poklesu háďátka ovesného (*Heterodera avenae*) v monokulturách. Po introdukci do polních kultur může tato houba redukovat výskyt háďátek až o 90 %. Kombinace této houby s nematocidy nevede k snížení jejího výskytu anebo k poklesu parazitických schopností. Bylo také prokázáno, že houba dokáže zabránit líhnutí vajíček *M. arenaria* a kolonizovat je a pomocí hyfy penetrovat. (Siddiqui and Mahmood 1996).

Arthrobotrys spp.

V roce 1978 Cayrol et al. vyvinuli preparát na bázi izolátu *Arthrobotrys spp.* (Royal 300) proti mykofágnímu háďátku *Ditylenchus myceliophagous*. Při aplikaci přípravku společně s kompostem byla populace háďátka redukována o 40 %. V roce 1979 vyvinuli přípravek na bázi jiného izolátu *Arthrobotrys spp.* (Royal 350) na ochranu rajčat proti háďátku kořenovému. Royal 300 obsahuje *Arthrobotrys robusta*, zatímco podobný produkt Royal 350 je formulován na bázi *Arthrobotrys superba* (Siddiqui and Mahmood 1996).

2.3 *Arthrobotrys oligospora*

Jedna z nejznámějších nematofágních hub, *Arthrobotrys oligospora*, byla izolována v polovině devatenáctého století. Schopnost tvořit pasti a chytat do nich nematody, byla poprvé popsána na konci devatenáctého století. Ale až do třicátých let minulého století nebyl tento fenomén dále studován (Dijksterhuis et al. 1994).

2.3.1 Taxonomie

Většina nematofágních hub, včetně hub chytajících nematody do pastí a endoparazitů patří mezi *Deuteromycetes* (nepohlavní houby). Taxonomické zařazení některých druhů bylo objasněno až po objevení příslušných pohlavních stádií. Pohlavní stádia (teleomorfy) byly zjištěny u mnoha zástupců z rodů *Arthrobotrys*, *Monacrosporium* a *Dactylella* (anamorfy) a označeny jako *Orbilia spp.* patřící do *Discomycetes (Ascomycetes)* (Nordbring-Hertz et al. 2006).

Oddělení: Eumycota

Třída: Deuteromycetes (Fungi imperfecti)

Řád: Moniliales (Hyphomycetes)

Čeleď: Moniliaceae

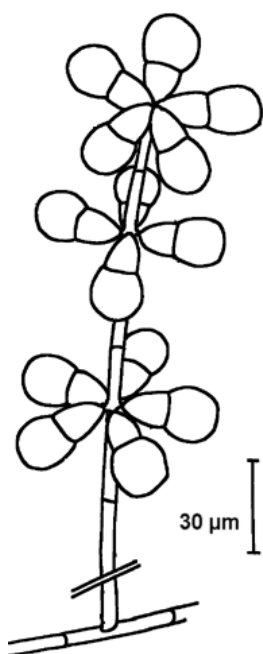
Podčeleď: Hyalodidymae

Rod: *Arthrobotrys* CORDA 1839

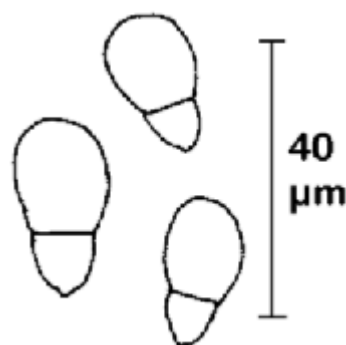
Druh: *Arthrobotrys oligospora* FRESENIUS 1850
(Anonym 1)

2.3.2 Konidie

Vzpřímené konidiofory nesou 20-30 přeslenů s 5-20 dvoubuněčnými konidiemi. Konidie jsou 16-30 um dlouhé a 8-16 um široké, zřetelně rozdělené septou. Distální buňka konidie je přibližně dvakrát větší než proximální buňka (Anonym 1).



Obr. 1 – Konidiofor *A. oligospora*
(Anonym 1)



Obr. 2 – Konidie *A. oligospora* (Anonym 1)

2.3.3 Infekční struktury

Většina zástupců rodu *Arthrobotrys* je charakterizována tvorbou pastí v podobě lepivých sítí. Tyto pasti se mohou skládat z jedné samotné smyčky nebo plně vyvinuté trojrozměrné sítě (Nordbring-Hertz et al. 2006). Infekční struktury jsou nezbytným předpokladem nejen pro schopnost houby napadnout hostitele, ale také pro její přežití a virulenci. Rozmanitost infekčních struktur je veliká a vysoce závislá na vnějším prostředí. V rámci jednoho druhu, *A. oligospora*, se nevyskytují pouze lepivé sítě, ale také tzv. konidiální pasti, hyfální oka okolo hyfy jiné houby a apresoria v rizosféře polních plodin (Nordbring-Hertz 2004). Mnoho zástupců *Arthrobotrys spp.* tvoří pasti spontánně, ale jejich vznik závisí na podmínkách prostředí, zvláště na přítomnosti nematodů (Nordbring-Hertz et al. 2006). Blízký kontakt s nematodou během několika hodin vyvolá diferenciaci mycelia v pasti, pomocí níž houba chytne, penetruje, zabije a stráví obsah těla nematoda (Liu et al. 2008).

Krátké peptidy, např. fenylalanin valin, dokáží spolu s nízkým obsahem živin vyvolat tvorbu pastí (Jansson and Lopez-Lorca 2001). Tento způsob indukce pastí zjistil Friman et al. v roce 1985 při kultivaci *A. oligospora* v tekutém mediu (0,01 % soya pepton) s přidavkem aminokyselin valinu a fenylalaninu. Kultura byla ode dna silně provzdušňována pomocí modifikované dělicí nálevky. Tvorba pastí na myceliu začala za 2 dny. Největšího poměru mezi pastmi a hyfami bylo dosaženo 5-7 den kultivace.

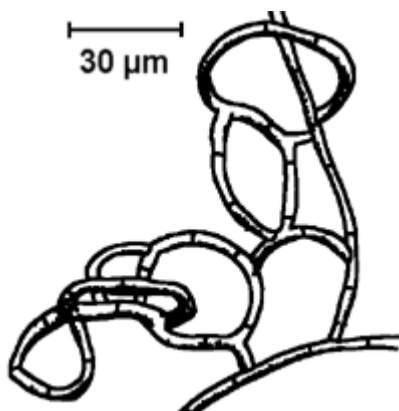
Ačkoliv použité zředěné medium neprodukovalo mnoho biomasy, byla tato metoda kultivace cenným nástrojem při studiích interakcí nematoda – houba (Dijksterhuis et al. 1994).

Lepivé sítě

Lepivé sítě, nejrozšířenější typ pastí, jsou tvořeny kolmou laterální větví, která roste z vegetativní hyfy. Laterální větev se ohýbá ve snaze setkat se a splynout s větví, která se vytváří na mateřské hyfě vzdálené 20-25 μm od laterální větve. Houba dále vytváří více smyček buď na povrchu původní smyčky nebo na mateřské hyfě (Liu et al. 2008). Průměr smyček se pohybuje mezi 20 až 59 μm (Anonym 1).

Konidiální pasti

Klíčení konidií probíhá tak, že se z klíčící hyfy vyvine hyfa, která se následně větví a vytváří mycelium. Některé druhy hub chytající nematody do pastí vytvářejí chytací struktury přímo na klíčící konidii. Tyto pasti jsou plně funkční (Liu et al. 2008). Výhodou konidiálních pastí je, že houba před chycením nematoda spotřebuje méně energie na růst hyf a také může být, podobně jako endoparazitické houby, šířena do nových oblastí (Jansson and Lopez-Lorca 2001). Tyto struktury jsou vytvářeny v přírodním prostředí jako je kravský hnůj nebo v rizosféře (Nordbring-Hertz 2004).



Obr. 3 – Lepivé trojrozměrné sítě
A. oligospora (Anonym 1)



Obr. 4 – Konidiální pasti *A. oligospora*
(Nordbring-Hertz 2004)

Hyfální oka

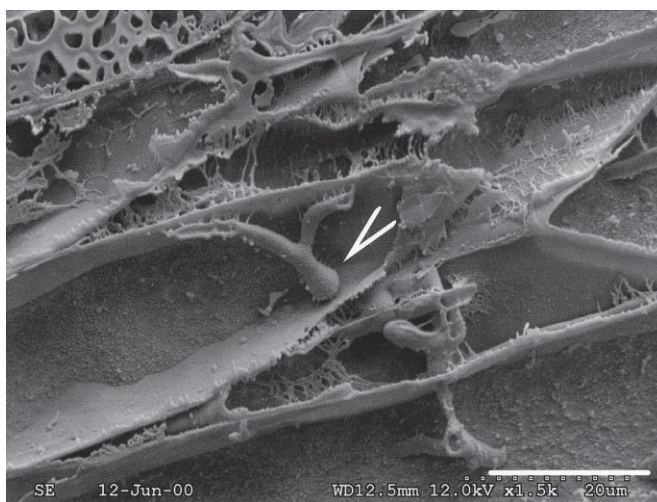
Morfologickou adaptací mycelia *A. oligospora* na přítomnost jiných hub je vytváření hyfálních ok. Hyfy *A. oligospora* se obtočí kolem hyfy houby a stráví obsah buněk (mykoparazitismus) (Nordbring-Hertz et al. 2006). Obtočení hyfy *A. oligospora* kolem hyfy hostitele (*Rhizoctonia solani*) vede k proliferaci buněčných stěn a desintegraci cytoplazmy bez porušení napadené buňky (Nordbring-Hertz 2004). Tato interakce se nazývá kompetice o živiny (Liu et al. 2009).

Apresoria

Na přítomnost kořenů rostlin reaguje *A. oligospora* tvorbou apresorií (Nordbring-Hertz et al. 2006). Houba kolonizuje epidermis a kortex, ale nikdy neporušuje cévní svazky. Kolonizace kořenů spustí obranné reakce rostliny např. tvorba papil, ale nikdy nenaruší její vývoj. Kolonizace kořenů je endofytická a rostlině může přinést větší odolnost vůči parazitickým nematodům a/nebo jiným pangenům (Nordbring-Hertz 2004).



Obr. 5 – Hyfální oka *A. oligospora* okolo hyfy *Rhizoctonia solani* (Nordbring-Hertz 2004)



Obr. 6 – Počátek kolonizace kořenů ječmene houbou *A. oligospora* (apresorium označené šipkou) (Nordbring-Hertz 2004)

2.3.4 Interakce nematoda – houba

Rozpoznání hostitele

Nematofágní houby mají různou hostitelskou specificitu, ale zpravidla nenapadají jiné organismy než červovité nematody a jejich vajíčka. Stejně jako jiné patogenní mikroorganismy, si i nematofágní houby vyvinuly způsob, jak rozpoznat a nalézt hostitele (Jansson and Lopez-Lorca 2001). Rozpoznání hostitele je důležité pro následný postup infekce, včetně penetrace (Nordbring-Hertz et al. 2006).

Přitažlivost

Nematodi jsou přitahováni k myceliu houby, na němž mohou vyvolat tvorbu pastí. K plně vyvinutým pastem a sporám jsou přitahováni silněji než k myceliu (Nordbring-Hertz et al. 2006). Jednotlivé druhy hub přitahují houby různou silou. Jansson a Nordbring-Hertz rozdělily nematofágní houby do tří skupin v závislosti na jejich saprofytických a parazitických schopnostech. Do první skupiny patří houby s rychlým růstem, které tvoří indukované pasti. Tyto houby jsou považovány spíše za saprofyty (*A. oligospora*). Druhá skupina zahrnuje pomalu rostoucí houby, které vytváří spontánní pasti. Zástupci této skupiny jsou spíše parazité (*Monacrosporium haplotyplum*). Třetí skupinu tvoří endoparazitické houby, které jsou obligátními parazity. Síla přitažlivosti vzrůstá se zvyšujícími se parazitickými schopnostmi houby (Jansson and Lopez-Lorca 2001).

Adheze

Zdá se, že účinnost adheze závisí na přítomnosti specifických složek na vnějším povrchu kutikuly. Hostitelskou specificitu nematofágních hub tedy určuje odlišné druhové složení kutikuly (Dijksterhuis et al. 1994). Tento krok zahrnuje interakci mezi uhlovodíkovou vazbou proteinu (lecitinu) houby a uhlovodíkovým receptorem nematoda. Trojrozměrné sítě *A. oligospora* jsou obklopené vrstvou extracelulárních vláken. Po kontaktu s nematody se tato vlákna napřímí kolmo k povrchu těla hostitele, což usnadní zachycení a pozdější invazi houby (Nordbring-Hertz et al. 2006).

Penetrace

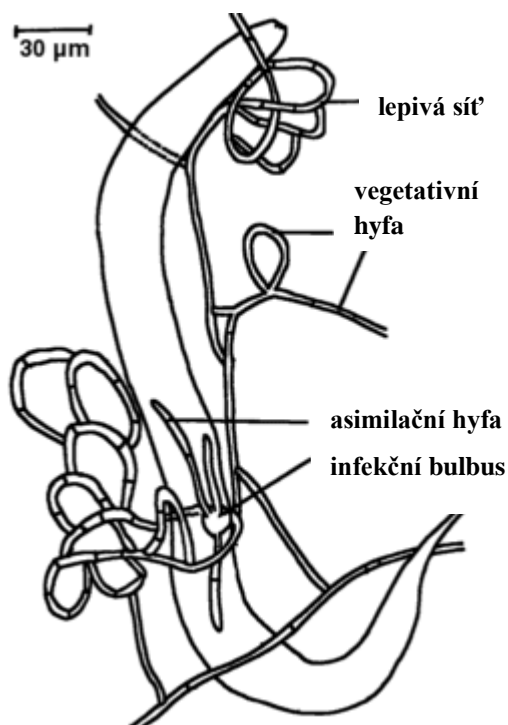
Penetrace následuje po adhezi infekčních struktur (pastí, lepidé spory a apresoria) k tělům nematod a jejich vajíčkům. Zahrnuje sled mechanických a

enzymatických dějů. Kutikula nematod a vajíček je složena především z proteinů, a proto se procesu penetrace nejvíce účastní proteazy (Jansson and Lopez-Lorca 2001).

A. oligospora proráží kutikulu pomocí penetrační trubičky. Makromolekuly obsažené v kutikule jsou rozpuštěny pomocí hydrolytických enzymů a houba pak pomocí mechanického tlaku proniká skrz kutikulu (Nordbring-Hertz et al. 2006).

Trávení a ukládání živin

Následně po penetraci je obsah těla nematoda stráven. Uvnitř těla se penetrační trubička zvětšuje a vytváří velký infekční bulbus (Nordbring-Hertz et al. 2006). Z něj se vyvíjí trofická hyfa (Dijksterhuis et al. 1994). V pozdějším stádiu se do trofické hyfy soustředí lipidová kapénka, která se účastní asimilace a ukládání živin získaných z těla nematoda (Nordbring-Hertz et al. 2006). Vedle lipidové kapénky může *A. oligospora* ukládat živiny pomocí lecitinu (*Arthrobotrys oligospora lecitin AOL*), který ve velkém množství produkuje do cytoplazmy hostitele. AOL se akumuluje v trofické hyfě rostoucí uvnitř těla nematoda a poté je dopravován do ostatních částí mycelia, kde je degradován a slouží jako zdroj živin pro další růst (Nordbring-Hertz et al. 2006). Infekční bulbus a asimilační hyfa mohou být považovány za trofický systém, který přeměňuje obsah těla nematoda na zásobní látky (lipidové kapénky). Ty jsou postupně metabolizovány na živiny, které jsou dopravovány k vegetativnímu myceliu vně tělo hostitele. Degradace tělního obsahu se z části účastní i vlastní autolytický systém nematoda, který je aktivován zvýšením trávicí aktivity během iniciační fáze infekce. Celý infekční proces trvá 48-60 hodin (Dijksterhuis et al. 1994).



Obr. 7 – Nematoda chycený do trojrozměrné sítě *A. oligospora* (Anonym 1)

2.3.5 Požadavky na výživu

A. oligospora může využívat jako zdroj uhlíku široké spektrum látek. Lee et al. (2004) zkoumali využití dextrózy, sacharózy, maltózy, xylózy a škrobu. Na základě této studie určili jako nejlepší zdroj uhlíku sacharózu. Sacharóza je disacharid, který se skládá ze dvou hexóz. Aby mohla houba sacharózu využít, musí ji pomocí enzymu invertáza rozdělit na dvě hexózy. *A. oligospora* pravděpodobně tento enzym má, což jí umožňuje využít sacharózu jako zdroj živin. *A. oligospora* dovede využít několik zdrojů dusíku. Obzvláště dobře roste v mediu s přidavkem extraktu kvasnic a dusičnanu sodným. Extrakt kvasnic zajišťuje houbě potřebné vitaminy a minerální látky jako jsou biotin, thiamin a zinek. Využití dusičnanů a dusitanů značí, že houba produkuje velké množství enzymu reduktáza. Optimální poměr sacharózy a kvasnicového extraktu v mediu je 20:4.

2.3.6 Produkce a formulace

Houby chytající nematody do pastí mohou být snadno kultivovány na různých umělých médiích (Lee et al. 2004). Jedním z důvodů, proč nematofágní houby nejsou masově produkovány je ten, že jsou obvykle kultivovány na pevných substrátech, jako jsou otruby, slupky z rýže nebo obilky a vnášeny do půdy jako směs houby a substrátu.

Nevýhodou tohoto typu substrátu je, že poskytuje živiny také ostatním půdním mikroorganismům, které introdukované houbě při využívání živin z tohoto zdroje konkurují a brání jejímu udržení v prostředí. Možnosti komerční produkce jsou omezené, protože masová produkce na pevných substrátech jdou málo výkonné, drahé a je obtížné kontrolovat kvalitu finálního produktu. Dostupnost zdroje živin může vést k problémům s mikrobiální kontaminací. Objemnost substrátu má za následek náklady na transport, skladování a obtížnou aplikaci konvenčními zemědělskými stroji (Stirling et al. 1998a). Za nejlepší systém masové produkce spor a mycelia pro biologickou ochranu je považována produkce v tekutých kulturách (Lee et al. 2004). Za nevhodnější formulaci mikroorganismů aplikovaných do půdy jsou považovány granule (Siddiqui and Mahmood 1996).

Prvními, kdo popsali médium pro růst nematofágní houby *Arthrobotrys conoides*, byli v roce 1962 Coscarelli a Pramer. Z tekutého media s obsahem glukózy bylo za 12 dní získáno 9 g suchého mycelia. O rok později Blackburn a Gates kultivovali *A. oligospora*, *Arthrobotrys robusta* a *Monacrosporium doedycoides* v tekuté kultuře obsahující maltózu a sůl (Lee et al. 2004).

Stirling a Mani formulovali v roce 1995 *Dactylella candida* a *Arthrobotrys dactyloides* na bázi alginátových granulí s rozdílným obsahem biomasy houby. Nejlepších výsledků bylo dosaženo, když byly granule zformovány po enkapsulaci houby do alginátových granulí. Z takto formulovaných granulí se vytvářela soustava pastí, která v půdě setrvala nejméně 10 dní a dosahovala vzdálenosti 5-10 mm od granule (Siddiqui and Mahmood 1996).

Stirling et al. (1998b) produkovali *A. dactyloides* v baňkách umístěných na třepáčkách, které obsahovaly glukózu a corn steep powder. Za 5-6 dní bylo vyprodukováno 8-10 g biomasy houby na jeden litr média. Problémem bylo převést biomasu do životaschopné formulace vhodná pro použití v biologické ochraně. Získaná biomasa z tekuté kultury byla smíchána s kaolinem a vermikulitem, které sloužily jako nosič a arabskou gumou jako pojidlem. Poté následovala granulace a vysušení na max. 5 % vlhkosti. Po tomto procesu vykazovala houba nízkou životaschopnost. Tento problém byl vyřešen zavedením inkubace v pevné fázi po granulaci a před sušením. Vlhké granule byly po 3 dny inkubovány při 25 °C ve sterilních plastových sáčcích, které byly provzdušňovány sterilním vzduchem. Tento mezistupeň výrazně zlepšil biologickou aktivitu granulí. Při testech granulí v laboratorním mikrokosmu a ve skleníku vykazovala houba dobrý růst a rovnoměrnou tvorbu pastí.

3. MATERIÁL A METODIKA

Druh nematofágní houby používané při pokusech

Při pokusech byla použita nematofágní houba *A. oligospora* kmen F-483, která byla získána z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Aktivní kultura *A. oligospora* kmen F-483 na Malt Extract Agarů byla zaslána v Petriho misce. Houba byla dále rozočkována a udržována na Malt Extract Agarů. Kultury byly uchovávány v klimaboxu při teplotě 20 ± 1 °C a fotoperiodě 18/6 (den/noc). Čisté kultury byly následně použity k pokusům.

Kultivační média

K pokusům s nematofágní houbou *A. oligospora* byly použity následující druhy umělých živných půd a tekutých medií. Umělé živné půdy a tekutá média byla připravena podle návodů uvedených na obalech jednotlivých dehydratovaných kultivačních medií, sterilována a rozlévána do sterilních Petriho misek nebo Erlenmayerových baněk.

Standardní agarizované živné půdy

Pro porovnání radiálního růstu a množství vyprodukovaných konidií *A. oligospora* byly použity vybrané druhy standardních umělých živných půd.

Tab. č. 1: Složení standardních umělých živných půd

| zkratka | živná půda | složení (v gramech na 1 litr destilované vody) |
|---------|-------------------|--|
| CDA | Czapek-Dox Agar | sacharóza – 30 g/l dusičnan sodný – 2 g/l fosforečnan draselný – 1 g/l síran hořečnatý – 0,5 g/l chlorid draselný – 0,5 g/l síran železnatý – 0,01 g/l agar – 15 g/l |
| CMA | Corn Meal Agar | obilná infuze – 50 g/l agar – 15 g/l |
| MEA | Malt Extract Agar | sladinový extrakt – 30 g/l pepton – 5 g/l agar – 15 g/l |

| zkratka | živná půda | složení (v gramech na 1 litr destilované vody) |
|----------|-------------------------------|--|
| PDA | Potato Dextrose Agar | bramborová infuze – 200 g/l dextróza – 20 g/l agar – 15 g/l |
| SDA | Sabouraud Dextrose Agar | dextróza – 40 g/l pepton – 10 g/l agar – 15 g/l |
| SLA | agar se sladidlovým extraktem | sladidlový extrakt tryptický hydrolyzát kaseinu – 15 g/l |
| TSA | Tryptic Soy Agar | sójový pepton – 5 g/l NaCl – 5 g/l agar – 15 g/l V 8 juice – 8,3 g/l L-asparagin – 10 g/l |
| V8J | V 8 Juice Agar | kvasničný extrakt – 2 g/l uhličitan vápenatý – 2 g/l glukóza – 2 g/l agar – 20 g/l peptická natrávenina zvířecí tkáň – 5 g/l |
| YEA | Yeast Extract Agar | kvasničný extrakt – 3 g/l agar – 15 g/l |
| 2 % agar | 2 % vodní agar | agar – 20 g/l |

Standardní tekutá živná média

Pro porovnání produkce biomasy *A. oligospora* byly použity vybrané druhy standardních tekutých umělých živných médií.

Tab. č. 2: Složení standardních tekutých umělých živných médií

| zkratka | živné médium | složení (v gramech na 1 litr destilované vody) |
|---------|--------------------------|--|
| CMB | Corn Meal Broth | obilná infuze – 50 g/l |
| PDB | Potato Dextrose Broth | bramborová infuze – 200 g/l dextróza – 20 g/l |
| SDB | Sabouraud Dextrose Broth | dextróza – 20 g/l pepton – 10 g/l |

| zkratka | živné médium | složení (v gramech na 1 litr destilované vody) |
|---------|-------------------|---|
| TSB | Tryptic Soy Broth | tryptický hydrolyzát kaseinu – 17 g/l sójový pepton – 3 g/l NaCl – 5 g/l síran draselný – 2,5 g/l dextróza – 2,5 g/l dextróza – 10 g/l |
| YMB | YM Broth | pepton – 5 g/l kvasničný extrakt – 3 g/l malt extrakt – 3 g/l |

Připravená tekutá média

Pro porovnání produkce biomasy *A. oligospora* v tekutých médiích s různým poměrem C:N byla připravena tekutá média s různým obsahem glukózy jako zdroje uhlíku a peptonu jako zdroje dusíku.

Tab. č. 3: Složení tekutých živných médií

| množství peptonu (N) | množství glukózy (C) | | |
|----------------------|----------------------|------------------|------------------|
| | 2,5 g | 5,0 g | 10,0 g |
| 1,25 g | č. 1 - C:N = 2:1 | č. 4 - C:N = 4:1 | č. 7 - C:N = 8:1 |
| 2,5 g | č. 2 - C:N = 1:1 | č. 5 - C:N = 2:1 | č. 8 - C:N = 4:1 |
| 5,0 g | č. 3 - C:N = 1:2 | č. 6 - C:N = 1:1 | č. 9 - C:N = 2:1 |

Zjišťování výtěžnosti spor

Konidiová suspenze byla získána přelitím sporulujícího mycelia nematofágní houby *A. oligospora* různým množstvím 0,05 % roztoku Tween 80. Vzniklá suspenze byla následně homogenizována pomocí třepačky s vibračním a kruhovým pohybem *Heidolph Reax Top*. Homogenizovaná konidiová suspenze byla dle potřeby naředěna a znovu homogenizována. Následně byla homogenizovaná suspenze pomocí laboratorní kličky přenesena do hemacytometru (Neubauerova vylepšená počítací komůrka). Po sedimentaci konidií byl v předem stanoveném počítacím poli na základě dvou opakování (horní a dolní počítací pole) vypočten titr. V jenom počítacím poli bylo ± 50 jednotek a rozdíl mezi poli mohl být max. ± 15 %.

Výtěžnost spor byla stanovována v pokusech č. 1, č. 2, č. 5 a č. 6. U všech pokusů bylo postupováno podle této metodiky. Podrobnější informace jsou uvedeny u konkrétních pokusů v experimentální části.

Hodnocení a porovnání růstu *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných umělých živných půdách

Pokus č. 1: Hodnocení a porovnání radiálního růstu a výtěžnosti spor *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných umělých živných půdách.

- V pokuse bylo použito 8 různých druhů umělých živných půd (PDA, SDA, SLA, YEA, CMA, CDA, V8J, TSA). Jejich složení je uvedeno v tab. č. 1. Od každého druhu vybrané živné půdy bylo připraveno pět Petriho misek \varnothing 90 mm. Do středu každé misky byl umístěn bloček \varnothing 5 mm vysporulované kultury nematofágní houby *A. oligospora* kmen F-483. Kultivace probíhala ve světelném klimaboxu při teplotě 20 ± 1 °C a fotoperiodě 18/6 (den/noc) po dobu 21 dní.
- Radiální růst byl měřen 7., 14. a 21. den. U každé misky byly měřeny dva na sebe kolmé rozměry. Z naměřených hodnot byla vypočtena plocha kultur v mm^2 .
- Hodnocení výtěžnosti probíhalo 14. a 21. den kultivace. Povrch Petriho misky byl pomocí kličky smyt 5 ml 0,05 % roztoku Tween. Stanovení koncentrace spor probíhalo podle výše uvedené metodiky zjišťování výtěžnosti spor. Výtěžnost z celé kultury byla následně přepočítána na výtěžnost z 1 mm^2 .

Pokus č. 2: Hodnocení a porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných umělých živných půdách.

- V pokuse č. 2 byly použity tyto umělé živné půdy - PDA, $\frac{1}{2}$ PDA, MEA, 2 % agar. Složení uvedeno v tab. č. 1. Od každé živné půdy byly připraveny Petriho misky \varnothing 90 mm ve čtyřech opakování.
- Od každého druhu živné půdy byla jedna polovina Petriho misek inokulována rozetřením 0,4 ml submerze bazálního média, které bylo inokulované konidiami *A. oligospora* kmen F-483 a umístěné na orbitální třepačce s otáčkami 150 rpm

při teplotě 20 ± 1 °C. Bazální médium obsahovalo KH_2PO_4 – 0.25 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.05 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – 0.005 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.002 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – 0.002 g/l.

- K inokulaci druhé poloviny Petriho misek bylo použito 0,4 ml suspenze konidií o titru 1×10^5 v 1 ml. Suspenze konidií byla získána smytím sporulujícího mycelia *A. oligospora* F-483 rostoucí na umělé živné půdě PDA.
- Obě varianty byly kultivovány ve světelném klimaboxu při teplotě 20 ± 1 °C a fotoperiodě 18/6 (den/noc) po dobu 13 dní.
- Výtěžnost spor se hodnotila po 13 dnech kultivace. Obsah Petriho misek byl smyt 5 ml 0,05 % roztoku Tween. Ve vzniklé suspenzi byla následně stanovena výtěžnost podle výše uvedené metodiky.

Pokus č. 3: Hodnocení a porovnání produkce biomasy *A. oligospora* kmen F-483 ve vybraných tekutých živných médiích.

- V pokuse byly použity následující druhy tekutých živných médií – TSB, SDB, YMB, PDB, CMB. Složení uvedeno v tab. č. 2. Od každého druhu byly ve čtyřech opakování připraveny 250 ml Erlenmayerovy baňky se 100 ml tekutého živného média.
- Do dvou Erlenmayerových baněk od každého druhu živného média byl umístěn bloček vysporulované kultury *A. oligospora* kmen F-483 \varnothing 5 mm, pocházející z kultury rostoucí na umělé živné půdě PDA.
- K inokulaci zbylých dvou Erlenmayerových baněk byla použita suspenze 500 konidií, které byly získány smytím sporulujícího mycelia *A. oligospora* 0,05 % roztokem Tween, které rostlo na umělé živné půdě PDA v Petriho misce.
- Od každého druhu živného média byly vždy dvě Erlenmayerovy baňky s rozdílným druhem inokula umístěny na orbitální třepačku 150 rpm. Zbylé dvě Erlenmayerovy baňky byly dány na vertikální třepačku 125 rpm. Kultivace probíhala při teplotě 20 ± 1 °C po dobu 7 dní.
- Po 7 dnech kultivace byla tekutá živná média přefiltrována pomocí vodní vývěvy. Získaná mokrá biomasy byla zvážena, umístěna do Petriho misek a sušena po dobu tří dnů při 40 ± 1 °C. Usušená biomasy byla zvážena a následně byla u jednotlivých živných médií vypočítána sušina biomasy.

Pokus č. 4: Hodnocení a porovnání produkce biomasy *A. oligospora* kmen F-483 v tekutých médiích s různým poměrem C:N.

- V pokuse č. 4 bylo použito 9 tekutých médií, které se měly rozdílný obsah uhlíku a dusíku (obsah a poměr uveden v tab. č. 3). Od každé druhu tekutého média byly připraveny 250 ml Erlenmayerovy baňky, do kterých bylo dáno 100 ml živného média. Pokus byl založen ve dvou opakování od každého druhu tekutého média.
- K inokulaci živných médií bylo použito 5×10^4 konidií nematofágní houby *A. oligospora* kmen F-483, které byly získány smytím 0,05 % roztokem Tween z kultury kultivované na živné půdě PDA v Petriho misce.
- Polovina tekutých médií byla umístěna na orbitální třepačce při 150 rpm a druhá polovina na vertikální třepačku při 125 rpm. Obě varianty byly kultivovány po dobu 14 dní při teplotě 20 ± 1 °C.
- Počet fragmentů se hodnotil 14. den kultivace. Z tekutých médií byl pipetou odebrán 1 ml, který byl zředěn 9 ml destilované vody a následně homogenizován pomocí třepačky s vibračním a kruhovým pohybem *Heidolph Reax Top*. Podle potřeby byla suspenze dále naředěna a následně homogenizována. Při stanovení počtu fragmentů v tekutém médiu se postupovalo obdobně jako při stanovení počtu konidií, jehož postup je výše uveden.

Hodnocení a porovnání růstu *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných přirozených substrátech

Pokus č. 5: Hodnocení a porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných přirozených substrátech.

- Výtěžnost spor byla zjišťována na následujících pěti druzích přirozených substrátů – rýže, nahý oves, pluchatý oves, kroupy, ovesné vločky. Pokus byl založen ve dvou variantách.
- Od každého substrátu bylo vzato 10 g sterilizovaných semen, které byly umístěny do 100 ml Erlenmayerových baněk. Tato varianta byla založena ve

dvou opakování. Následně byly substráty inokulovány 5 ml submerzí bazálního média nematofágní houby *A. oligospora* kmen F-483. Bazální médium bylo inokulováno bločkem ø 5mm vysporulované kultury *A. oligospora* kmen F-483 rostoucí na živné půdě PDA a umístěno na orbitální třepačce při 150 rpm a teplotě 20±1 °C. Složení bazálního média uvedeno v pokuse č. 2.

- Po inokulaci submerzí bazálního média byly substráty inkubovány po dobu 6 hodin při 25±1 °C. Po 6 hodinách bylo z každého substrátu odebráno 25 semen, které byly vyskládány na povrch 2% vodního agaru v Petriho miskách ø 90 mm (5 řad po 5 partikulí).
- Obě varianty byly kultivovány ve světelném klimaboxu teplotě při 25±1 °C a fotoperiodě 18/6 (den/noc) po dobu 13 dní.
- Při hodnocení výtěžnosti spor 13. den kultivace bylo do Erlenmayerových baněk se semeny přidáno 50 ml 0,05 % roztoku Tween. Obsah byl míchán na magnetické míchačce *Heidolph Mr 3001K* při 700 ot/min po dobu 3 minut. Podle potřeby byla vzniklá suspenze naředěna a opětovně homogenizována. Ve vzniklé suspenzi byl stanoven počet spor.
- Při zjišťování výtěžnosti spor u druhé varianty bylo z povrchu Petriho misek pomocí pinzety vloženo 25 partikulí do zkumavky. Celý povrch misky byl smyt 0,05 % roztokem Tween (5 ml – ovesné vločky, kroupy; 4 ml – rýže; pluchatý a nahý oves; 2 ml – řepka) a vzniklá suspenze byla přelita do zkumavky s 25 semeny. Obsah byl homogenizován pomocí třepačky *Heidolph Reax Top* a poté byla zjištěna výtěžnost spor u jednotlivých substrátů.

Hodnocení a porovnání porůstání *A. oligospora* kmen F-483 na alginátových peletách







Pokus č. 6: Hodnocení a porovnání růstu *A. oligospora* kmen F-483 na alginátových peletách.

- Pro přípravu alginátových pelet byly jako substrát použity při kroupy, ovesné vločky, otruby, kukuřice a rýže. Od každého druhu bylo vzato 10 g rozemletého substrátu a namočeno do 2 % roztoku alginátu sodného. Do vzniklé směsi byly následně přidány 2 ml submerze bazálního média *A. oligospora* kmen F-483 (k inokulaci použito stejné bazální médium jako v pokuse č. 5). Tato směs byla

nakapána do roztoku CaCl_2 (20 g/l destilované vody), kde při reakci alginátu sodného s kationty Ca^{2+} došlo k vytvoření pelet. Vzniklé pelety se nechaly v roztoku vytvrdit 1 hodinu. Poté se roztok přefiltroval a pelety se nechaly vysušit proudem vzduchu. Po vysušení pelet byl založen pokus ve dvou variantách.

- U první varianty bylo na povrch 2 % vodního agaru v Petriho misce \varnothing 90 mm vyskládáno 25 pelet (5 řad po 5 partikulí). Tato varianta byla založena v pěti opakování od každého druhu pelety.
- V druhé variantě byla od každého druhu alginátové pelety vzata 1 peleta a umístěna do středu Petriho misky \varnothing 90 mm na povrch 2 % vodního agaru. Varianta č. 2 byla založena v 10 opakování od každého druhu pelety.
- Obě varianty byly kultivovány ve světelném klimaboxu teplotě při 20 ± 1 °C a fotoperiodě 18/6 (den/noc) po dobu 12 dní.
- U varianty č. 1 byl 2., 3., 4. a 5. den kultivace pomocí binolupy hodnocen index obrůstání alginátových pelet. K hodnocení byla použita šestibodová stupnice, která je uvedena v tab. č. 4. Každé peletě byl na základě pozorování podle této stupnice přidělen příslušný index. Poté byl z každé misky vypočítán průměrný index.
- Výtěžnost spor se hodnotila po 6, 9 a 12. dnech. Z povrchu Petriho misek bylo pomocí pinzety 25 pelet vloženo do zkumavky. Poté byl celý povrch misky smyt 5 ml 0,05 % roztokem Tween. Vzniklá suspenze byla přelita do zkumavky s 25 peletami. Obsah byl homogenizován pomocí třepačky *Heidolph Reax Top* a poté byla zjištěna výtěžnost spor u jednotlivých alginátových pelet.
- U druhé varianty byl 5. a 9. den zjišťován radiální růst. U každé misky byly měřeny dva na sebe kolmé rozměry.
- Výtěžnost spor byla hodnocena po 9 a 12 dnech. Peleta z povrchu 2 % vodního agaru byla vložena do zkumavky. Povrch Petriho misky byl smyt 5 ml 0,05 % roztoku Tween 80. Vzniklá suspenze byla přelita do zkumavky s peletou a homogenizována pomocí třepačky *Heidolph Reax Top*. Následně byla stanovena výtěžnost spor u jednotlivých druhů pelet.

Tab. č. 4: Index obrůstání alginátových pelet s inkorporovanou *A. oligospora*

| Základní struktury | Index obrůstání | Charakteristika |
|---|-----------------|--|
|  1 | 1 | peleta scvrklá, suchá |
|  2 | 2 | peleta nabobtnala |
|  3 | 3 | peleta je nabobtnalá, tvoří se první hyfy |
|  4 | 4 | hyfy vytvořily hustou spleť mycelia na povrchu pelety |
|  5 | 5 | na některých hyfách se již vytvářejí první konidiofory a konidie |
|  6 | 6 | na všech konidioforech se již vytvořily konidie |

(Leitner 2005)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

Hodnocení a porovnání růstu *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných umělých živných mediích

*Pokus č. 1: Hodnocení a porovnání radiálního růstu a výtěžnosti spor *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných umělých živných půdách.*

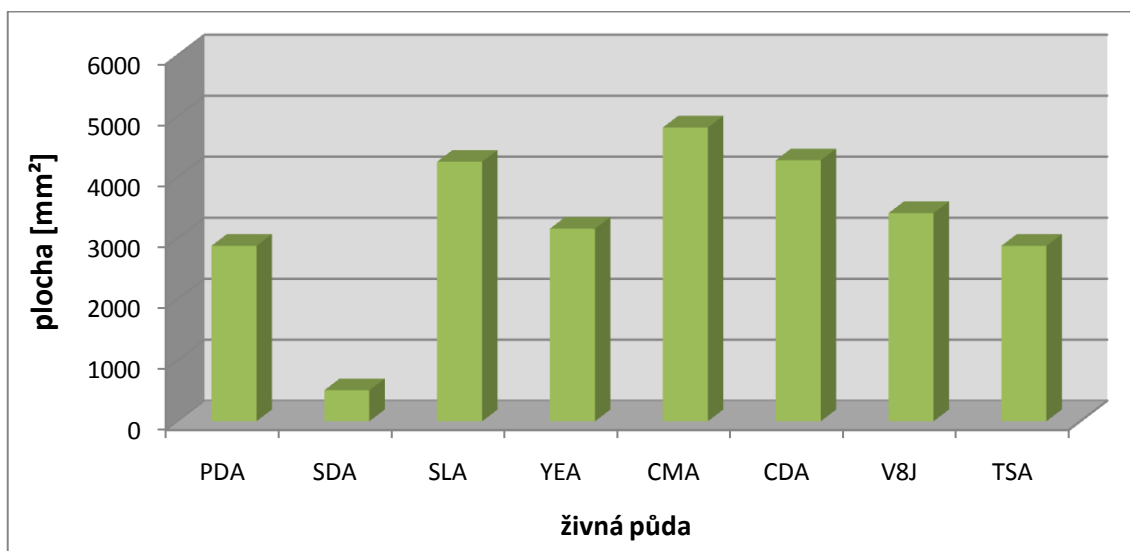
Postup:

- různé druhy umělých živných půd v Petriho miskách \varnothing 90 mm (PDA, SLA, SDA, YEA, CMA, V8J, TSA, CDA)
- u všech variant umístěn do středu Petriho misky bloček \varnothing 5 mm vysporulované kultury nematofágní houby *A. oligospora* kmen F-483
- kultivace ve světelném klimaboxu (teplota 20 ± 1 °C, fotoperioda 18/6) po dobu 21 dní
- hodnocení radiálního růstu 7., 14. a 21. den, následně přepočteno na plochu v mm^2
- hodnocení výtěžnosti spor z celé kultury 14. a 21. den, výtěžnost přepočtena i na 1 mm^2

*Tab. č. 5: Porovnání plochy a průměru kultur *A. oligospora* 7., 14. a 21. den kultivace*

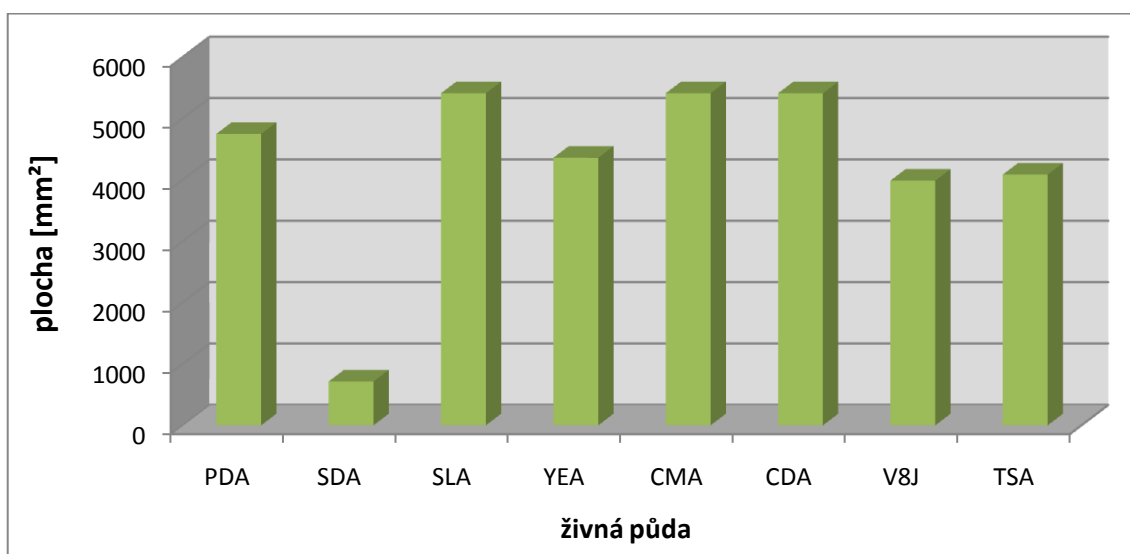
| živná půda | plocha [mm^2] | | | průměr [mm^2] | | |
|------------|--------------------------|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| | 7. den | 14. den | 21. den | 7. den | 14. den | 21. den |
| PDA | 2874,75 | 4747,78 | 5410,60 | 64,20 | 77,75 | 83,00 |
| SDA | 506,71 | 712,76 | 975,91 | 25,40 | 30,13 | 35,25 |
| SLA | 4254,47 | 5410,60 | 5410,60 | 73,60 | 83,00 | 83,00 |
| YEA | 3156,95 | 4359,15 | 4388,46 | 63,40 | 74,50 | 74,75 |
| CMA | 4815,19 | 5410,60 | 5410,60 | 78,30 | 83,00 | 83,00 |
| CDA | 4277,62 | 5410,60 | 5410,60 | 73,80 | 83,00 | 83,00 |
| V8J | 3410,83 | 3987,12 | 4156,77 | 65,90 | 71,25 | 72,75 |
| TSA | 2874,75 | 4085,65 | 4099,89 | 60,50 | 72,13 | 72,25 |

Graf č. 1: Porovnání plochy kultur *A. oligospora* na různých živných půdách po 7 dnech kultivace



Z grafu č. 1 je zřejmé, že 7. den kultivace rostla nematofágní houba *A. oligospora* nejlépe na živné půdě CMA, kde pokrývala plochu 4815,19 mm². Za ostatními variantami v růstu výrazně zaostává živná půda SDA, kde byla plocha mycelia pouze 506,71 mm².

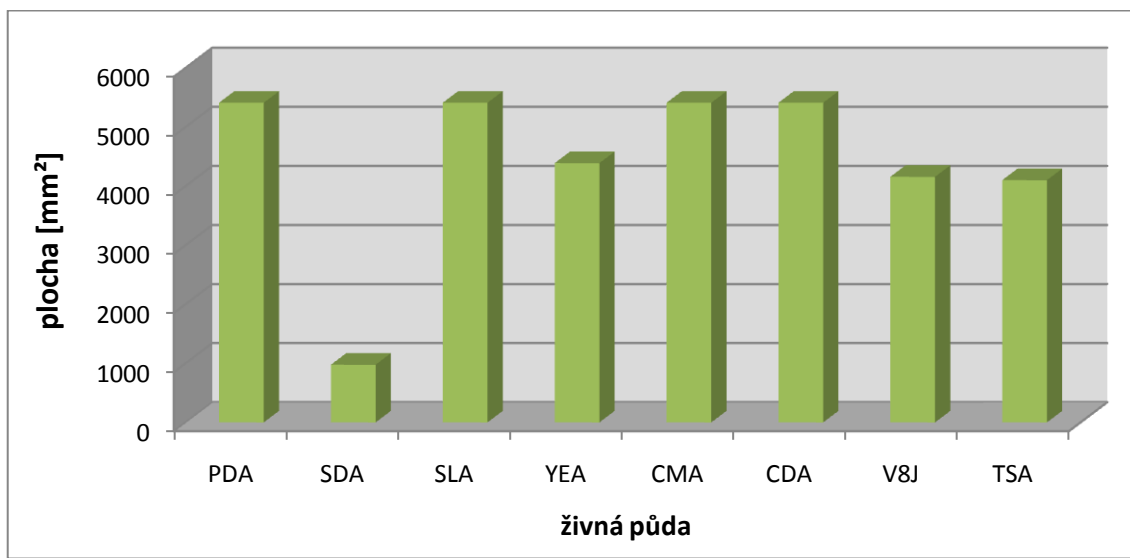
Graf č. 2 Porovnání plochy kultur *A. oligospora* na různých živných půdách po 14 dnech kultivace



Při hodnocení kultur po 14 dnech kultivace bylo zjištěno, že *A. oligospora* dosáhla okrajů Petriho misek u živných půd SLA, CMA a CDA. Nejrychleji houba

rostla na PDA, kde za týden zvýšila plochu z 2874,75 mm² na 4747,78 mm². Prokazatelně nejhorší růst vykazovala *A. oligospora* na živné půdě SDA, kde je zřetelný rozdíl v rychlosti růstu oproti ostatním živným půdám. Na této půdě plocha houba vzrostla nejméně ze všech variant z 506,71 mm² na 712,76 mm².

Graf č. 3: Porovnání plochy kultur *A. oligospora* na různých živných půdách po 21 dnech kultivace

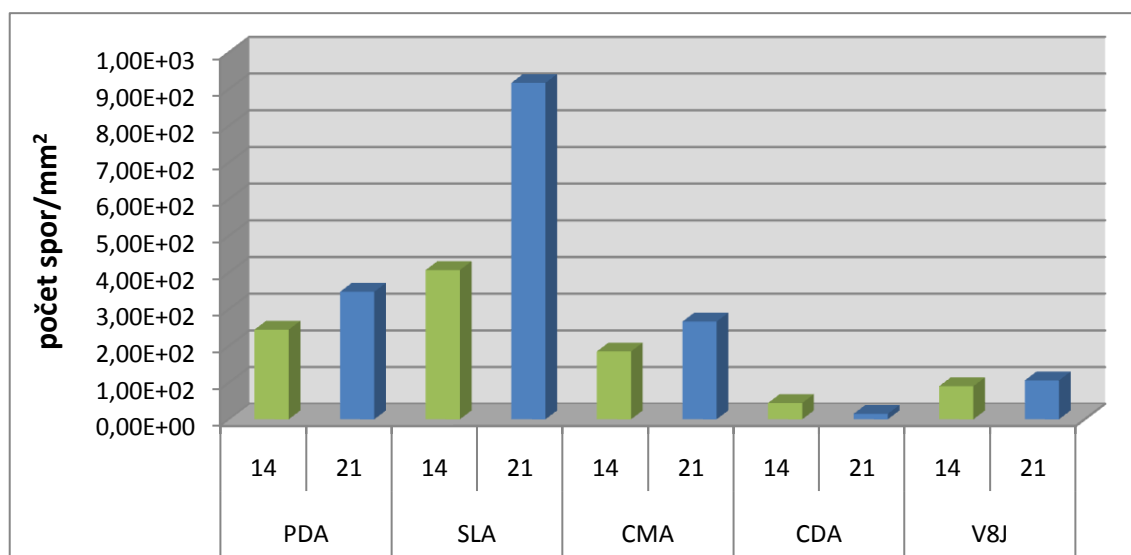


Z hodnot znázorněných v grafu č. 3 je patrné, že 21. den kultivace dorůstala k okrajům Petriho misky i *A. oligospora* rostoucí na živné půdě PDA. Na živných půdách YEA, V8J a TSA pokrývala *A. oligospora* téměř stejnou plochu. Oproti PDA, SLA, CMA a CDA byl růst houby na těchto živných půdách mírně pomalejší a mycelium houby zde porůstalo plochu přes 4000 mm². *A. oligospora* rostoucí na živné půdě SDA opět pokrývala nejmenší plochu a rostla výrazně pomaleji oproti ostatním druhům živných půd.

Tab. č. 6: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z 1 mm² a z celé kultury 14. a 21. den kultivace

| živná půda | výtěžnost/kultura | | výtěžnost/mm ² | |
|------------|-------------------|----------|---------------------------|----------|
| | 14. den | 21. den | 14. den | 21. den |
| PDA | 1,16E+06 | 1,88E+06 | 2,44E+02 | 3,47E+02 |
| SLA | 2,20E+06 | 4,96E+06 | 4,07E+02 | 9,17E+02 |
| CMA | 1,00E+06 | 1,44E+06 | 1,85E+02 | 2,66E+02 |
| CDA | 2,40E+05 | 8,00E+04 | 4,44E+01 | 1,48E+01 |
| V8J | 3,60E+05 | 4,40E+05 | 9,03E+01 | 1,06E+02 |

Graf č. 4: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z 1 mm² 14. a 21. den kultivace



Z výsledků uvedených v tab. č. 6 a znázorněných v grafu č. 4 vyplývá, že nejproduktivnějším druhem živné půdy je SLA s výtěžností 4,96E+06 spor/kultura a 9,17E+02 spor/mm². Tento rozdíl je nejvíce patrný 21. den hodnocení, kdy je výtěžnost spor z kultury oproti ostatním variantám téměř o 2/3 vyšší. U této půdy také došlo k největšímu nárůstu množství spor, kdy se jejich počet během týdne více jak dvojnásobně zvýšil. U ostatních druhů půd nebyl rozdíl mezi prvním a druhým hodnocením takto výrazný. Nejméně produkční živnou půdou z porovnávaných variant byla CDA, kde 21. den byla výtěžnost pouze 8,00E+04 spor/kultura a 1,06E+02 spor/mm².

Zhodnocení:

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, které živné půdy jsou z hlediska rychlosti radiálního růstu a produkce spor pro *A. oligospora* nejvhodnější. Pokud budeme na výsledky pokusu č. 1 nahlížet komplexně, lze říci, že vybrané druhy živných půd jsou z hlediska rychlosti radiálního růstu pro *A. oligospora* vhodné až na SDA, která vykazuje markantní rozdíl, a kultury zde rostou velmi pomalu.

Při srovnání výsledků radiálního růstu a produkce spor se jako nejvhodnější druh živné půdy pro kultivaci *A. oligospora* jeví SLA, na které kultury vykazují velmi dobrý růst a současně nejvyšší výtěžnost spor.

Živné půdy SDA, YEA a TSA pravděpodobně obsahují méně spor než je Neubauerovou komůrkou zjistitelné.

Pokus č. 2: Hodnocení a porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných umělých živných půdách.

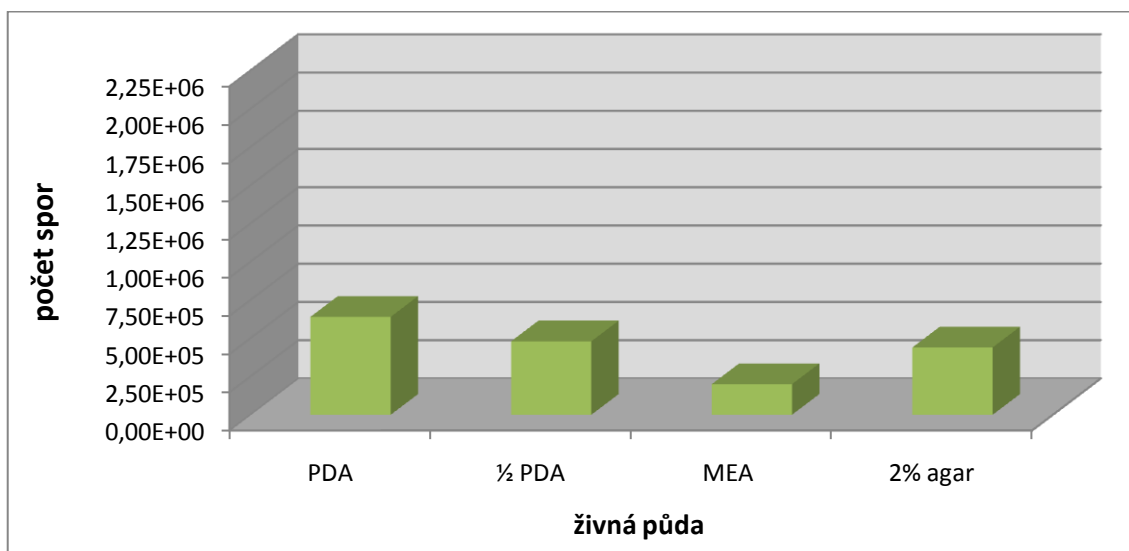
Postup:

- různé druhy umělých živných půd v Petriho miskách \varnothing 90 mm (PDA, $\frac{1}{2}$ PDA, MEA, 2 % agar)
- od každé půdy založeny 2 varianty – jedna polovina inokulována 0,4 ml submerzní kultury *A. oligospora* kmen F-483 (bazální médium), druhá polovina 0,4 ml suspenzí konidií (1×10^5 spor/ml) *A. oligospora* kmen F-483
- kultivace ve světelném klimaboxu (teplota 20 ± 1 °C, fotoperioda 18/6) po dobu 13 dní
- hodnocení výtěžnosti spor z celé kultury 13. den

Tab. č. 7: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z Petriho misek inokulovaných bazálním médiem

| živná půda | výtěžnost |
|-------------------|-----------|
| PDA | 6,40E+05 |
| $\frac{1}{2}$ PDA | 4,80E+05 |
| MEA | 2,00E+05 |
| 2% agar | 4,40E+05 |

Graf č. 5: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z Petriho misek inokulovaných bazálním médiem

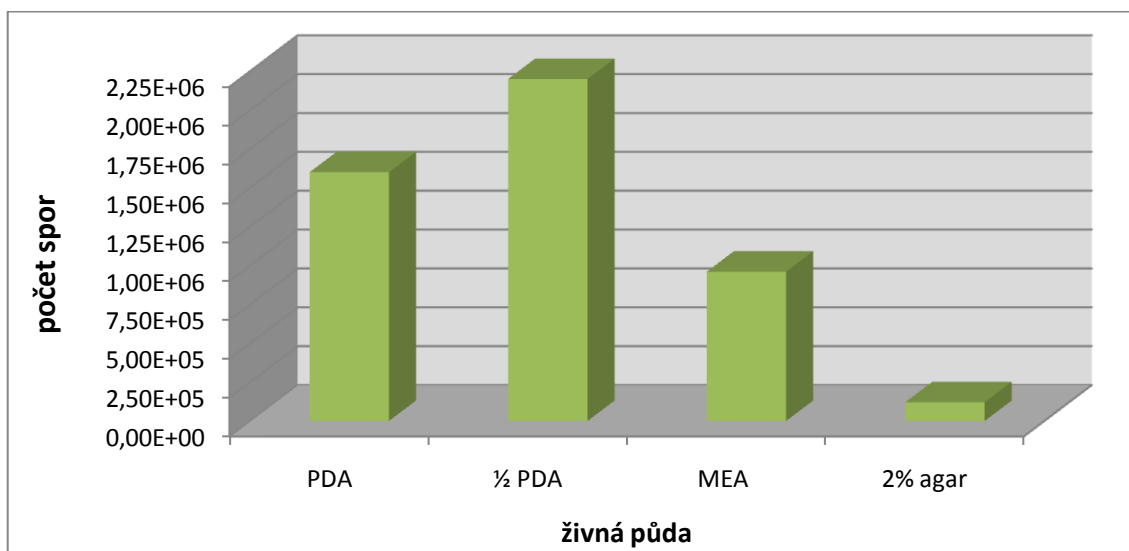


Živnou půdou s nejvyšší výtěžností při inokulaci bazálním médiem je PDA s počtem spor 6,40E+05. Počet spor u PDA je nepatrně vyšší než u ½ PDA, u kterého byla výtěžnost 4,80E+05. Nepotvrdil se tak předpoklad, že by ½ PDA mělo mít vyšší výtěžnost než živná půda PDA a MEA.

Tab. č. 8: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z Petriho misek inokulovaných konidii *A. oligospora*

| živná půda | výtěžnost |
|------------|-----------|
| PDA | 1,60E+06 |
| ½ PDA | 2,20E+06 |
| MEA | 9,60E+05 |
| 2% agar | 1,20E+05 |

Graf č. 6: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z Petriho misek inokulovaných konidii *A. oligospora*



Nejvyšší výtěžnost spor byla u ½ PDA, následována PDA a MEA. Při inokulaci živných půd konidii se potvrdil předpoklad, že *A. oligospora* produkuje více spor na živných půdách s nižším obsahem živin.

Zhodnocení:

Tento pokus byl proveden za účelem porovnání množství konidií vyprodukovaných na různých živných půdách při rozdílném druhu inokula. Z výsledků pokusu č. 2 je patrný velký vliv druhu inokula na produkci spor. U živných půd PDA, ½ PDA a MEA je dosažena výrazně vyšší výtěžnost při použití suspenze konidií, zatímco u 2 % agaru *A. oligospora* produkovala více spor při inokulaci bazálním médiem. Rozdíl mezi druhem inokula je pravděpodobně způsoben tím, že inokulum bazálního media na rozdíl od suspenze konidií obsahuje převážně myceliové fragmenty, které rychle regenerují a vytvářejí bohaté mycelium na úkor tvorby konidioforů.

Pokus č. 3: Hodnocení a porovnání produkce biomasy *A. oligospora* kmen F-483 ve vybraných tekutých živných médiích.

Postup:

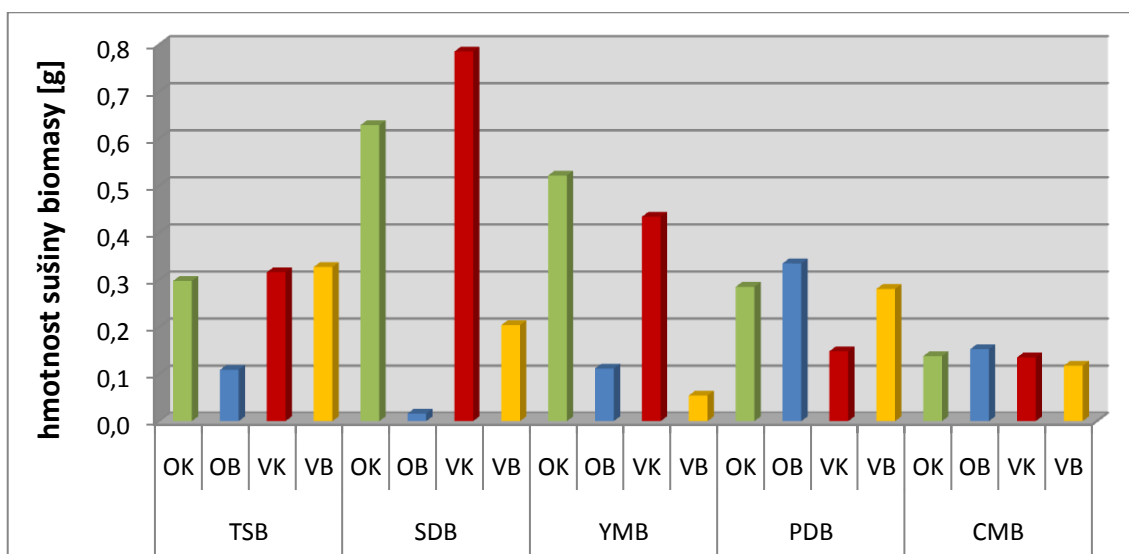
- 100 ml tekutého umělého živného média v Erlenmayerových baňkách 250 ml (TSB, SDB, YMB, PDB, CMB)
- do poloviny baněk vložen bloček vysporulované kultury *A. oligospora* kmen F-483 ø 5 mm, druhá polovina inokulována suspenzí 500 konidií nematofágní houby *A. oligospora* kmen F-483
- jedna polovina baněk z každé varianty umístěna na orbitální, druhá polovina umístěna na vertikální třepačku
- kultivace 7 dní při 150 rpm na orbitální a 125 rpm na vertikální třepačce při teplotě 20±1 °C
- filtrace biomasy pomocí vodní vývěvy
- sušení biomasy při 40 °C

- zkratky použité v tabulce č. 9 a grafech č. 7-11: **OK, OB, VK, VB** označují jednotlivé kombinace – způsob třepání **O** – **orbitální**, **V** – **vertikální** a druh inokula **K** – **konidie**, **B** – **vysporulovaný bloček**

Tab. č. 9: Porovnání hmotnosti sušiny biomasy *A. oligospora* po 7 dnech kultivace

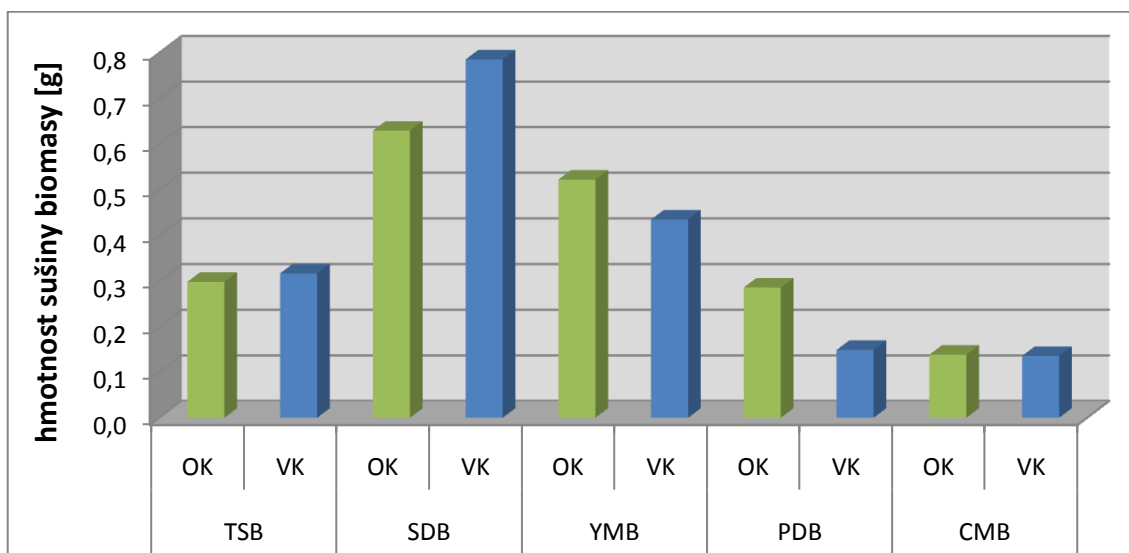
| živné médium | hmotnost sušené biomasy [g] | | | |
|--------------|-----------------------------|------|------|------|
| | OK | OB | VK | VB |
| TSB | 0,30 | 0,11 | 0,32 | 0,33 |
| SDB | 0,63 | 0,02 | 0,79 | 0,20 |
| YMB | 0,52 | 0,11 | 0,43 | 0,05 |
| PDB | 0,29 | 0,34 | 0,15 | 0,28 |
| CMB | 0,14 | 0,15 | 0,14 | 0,12 |

Graf č. 7: Porovnání hmotnosti sušiny biomasy *A. oligospora* po 7 dnech kultivace



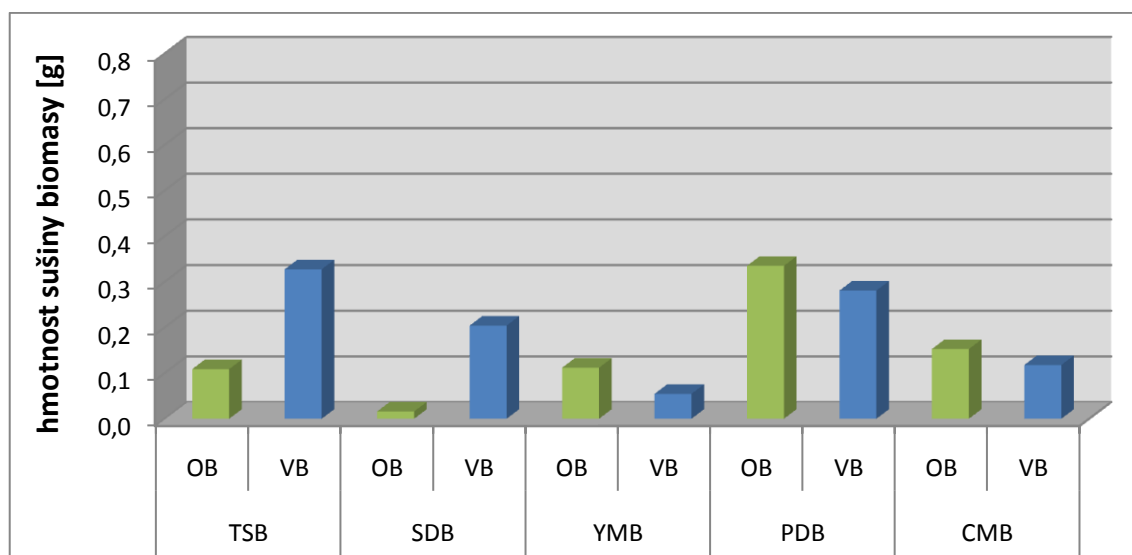
Z hodnot znázorněných v grafu č. 7 je zřejmé, že největší produkce biomasy bylo dosaženo u živného média SDB, které bylo inokulováno konidii a umístěno na vertikální třepačce. U médií SDB a YMB je markantní rozdíl mezi inokulací bločkem a konidii, kdy větší produkce biomasy je dosaženo při inokulaci submerze konidii. Naopak velmi vyrovnané množství biomasy je u CMB, kde druh inokula a způsob třepání jen minimálně ovlivňují produkci.

Graf č. 8: Porovnání vlivu způsobu třepání na média inokulované konidii *A. oligospora*



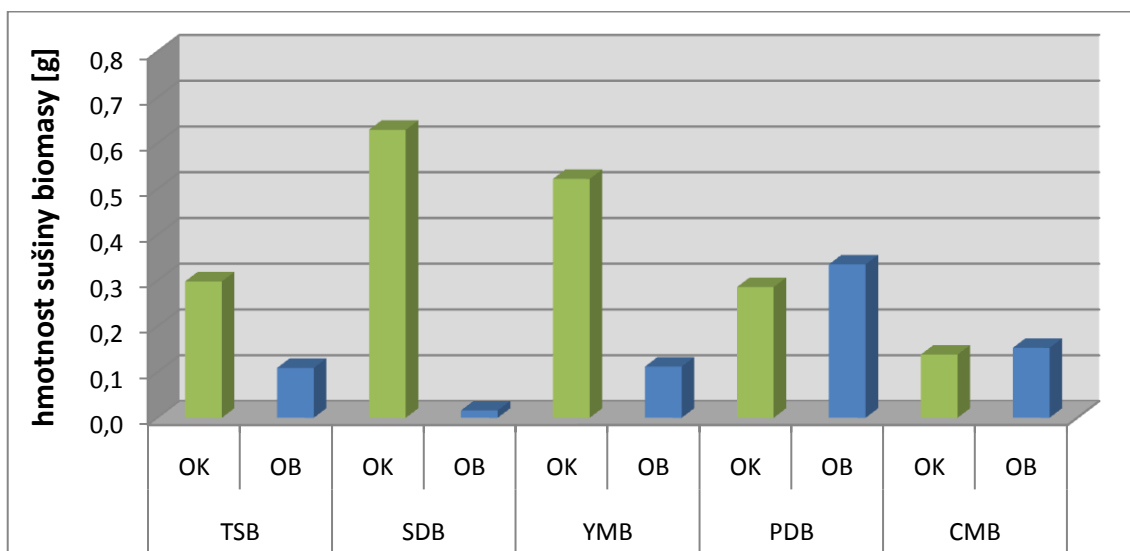
Při použití konidií jako zdroje inokula, má největší vliv způsob třepání u PDB, kde množství sušiny biomasy je při orbitálním pohybu dvojnásobně vyšší oproti vertikálnímu. Naopak u TSB a CMB jsou hodnoty přibližně stejné a způsob třepání má na produkci biomasy zanedbatelný vliv. Nejproduktivnějším živným médiem při inokulaci konidiami je SDB, které dosahuje nejvyšší hmotnosti sušiny biomasy při orbitálním i vertikálním třepání.

Graf č. 9: Porovnání vlivu způsobu třepání při inokulaci médií bločkem vysporulované kultury *A. oligospora*



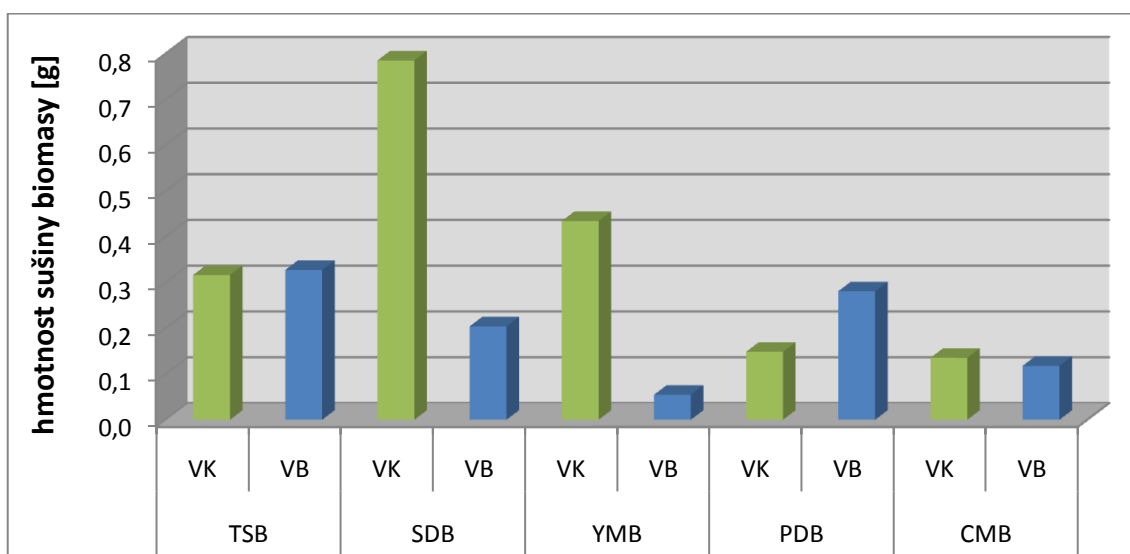
Z grafu č. 9 je patrné, že způsob třepání nejvíce ovlivňuje živná média TSB, SDB a YEB, kde je patrný rozdíl mezi umístěním na orbitální a vertikální třepačce. U médií inokulovaných bločkem je vliv způsobu třepání výraznější než u médií inokulovaných konidiami.

Graf č. 10: Porovnání vlivu druhu inokula na hmotnost sušiny biomasy *A. oligospora* při orbitálním třepání



Z grafu č. 10 vyplývá, že při orbitálním třepání druh inokula nejvíce ovlivňoval živná média TSB, SDB a YMB, u kterých je produkce biomasy při inokulaci konidii výrazně vyšší než u variant inokulovaných bločky. U PDB a CMB druh inokula nemá na produkci biomasy velký vliv.

Graf č. 11: Porovnání vlivu druhu inokula na hmotnost sušiny biomasy *A. oligospora* při vertikálním třepání



Při vertikálním třepání se nejvíce odlišovaly živná média SDB, YMB a PDB. Zatímco u SDB a YMB byly nejproduktivnější varianty inokulované konidii, u PDB

dosahovaly vyšší produkce živná média, u kterých byl použit vysporulovaný bloček. Na TSB a CMB měl druh inokula nepatrný vliv.

Zhodnocení:

Cílem pokusu č. 3 bylo stanovit vliv typu třepání a druhu inokula na produkci biomasy. Živná média SDB a YMB výrazně ovlivňoval zdroj inokula než způsob třepání, kdy nejvyšší produkce bylo dosaženo u medií inokulovaných konidii. U ostatních variant není patrné, že by jeden z uvedených faktorů měl zásadní vliv na množství biomasy.

Pokus č. 4: Hodnocení a porovnání produkce biomasy *A. oligospora* kmen F-483 v tekutých médiích s různým poměrem C:N.

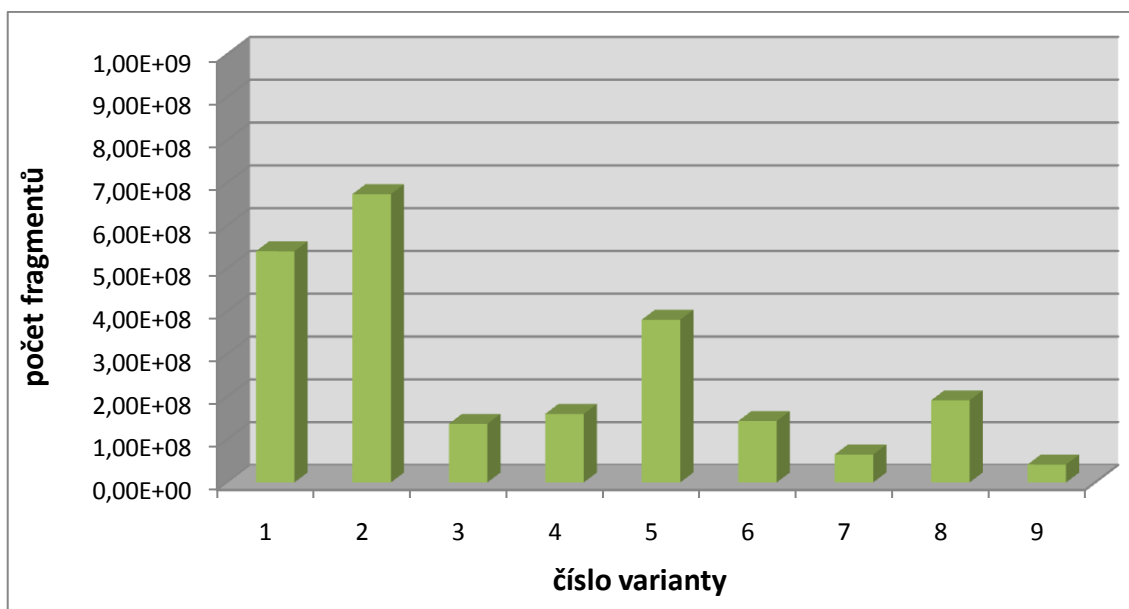
Postup:

- 9 tekutých médií s různým obsahem glukózy a peptonu – obsah glukózy a peptonu a poměr C:N v médiích č. 1-9 jsou uvedeny v tabulce č. 3
- 100 ml tekutého media v 250 ml Erlenmayerových baňkách
- Erlenmayerovy baňky inokulovány suspenzí konidii (5×10^4) nematofágní houby *A. oligospora* kmen F-483
- od každého media založeny 2 varianty
- jedna varianta umístěna na orbitální (**O**) třepačku, druhá polovina umístěna na vertikální (**V**) třepačku
- kultivace 14 dní při 150 rpm na orbitální a 125 rpm na vertikální třepačce při teplotě 20 ± 1 °C
- hodnocení počtu fragmentů bylo prováděno po 14 dnech

Tab. č. 10: Porovnání počtu fragmentů v médiích při orbitálním třepání

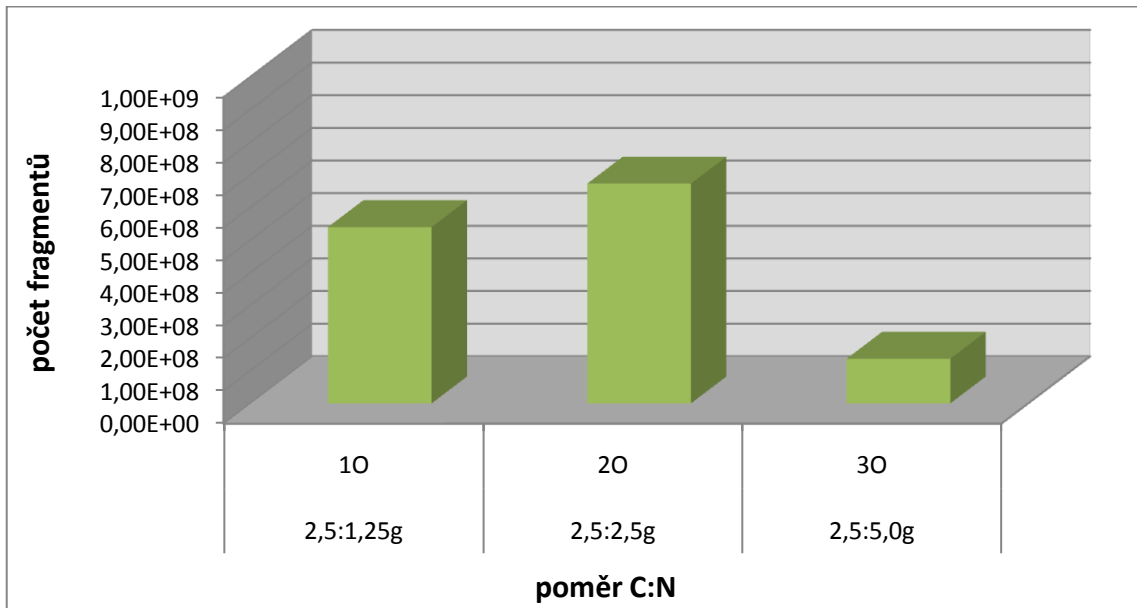
| varianta | C:N | C:N [g] | počet fragmentů |
|----------|-----|-------------|-----------------|
| 1 | 2:1 | 2,50 : 1,25 | 5,40E+08 |
| 2 | 1:1 | 2,50 : 2,50 | 6,73E+08 |
| 3 | 1:2 | 2,50 : 5,00 | 1,37E+08 |
| 4 | 4:1 | 5,00 : 1,25 | 1,60E+08 |
| 5 | 2:1 | 5,00 : 2,50 | 3,80E+08 |
| 6 | 1:1 | 5,00 : 5,00 | 1,43E+08 |
| 7 | 8:1 | 10,0 : 1,25 | 6,50E+07 |
| 8 | 4:1 | 10,0 : 2,50 | 1,92E+08 |
| 9 | 2:1 | 10,0 : 5,00 | 4,17E+07 |

Graf č. 12: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při orbitálním třepání

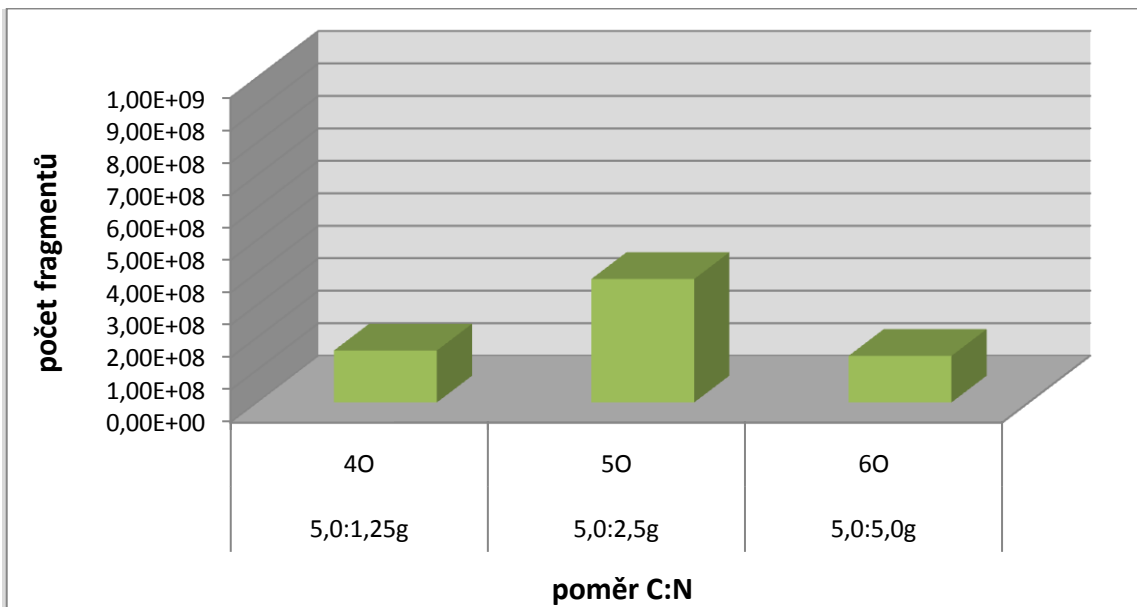


Z grafu č. 12 vyplývá, že při umístění Erlenmayerových baněk na orbitální třepačku nejvíce fragmentů obsahovaly varianty č. 1, č. 2 a č. 5, které se v množství fragmentů výrazně odlišovaly od ostatních variant.

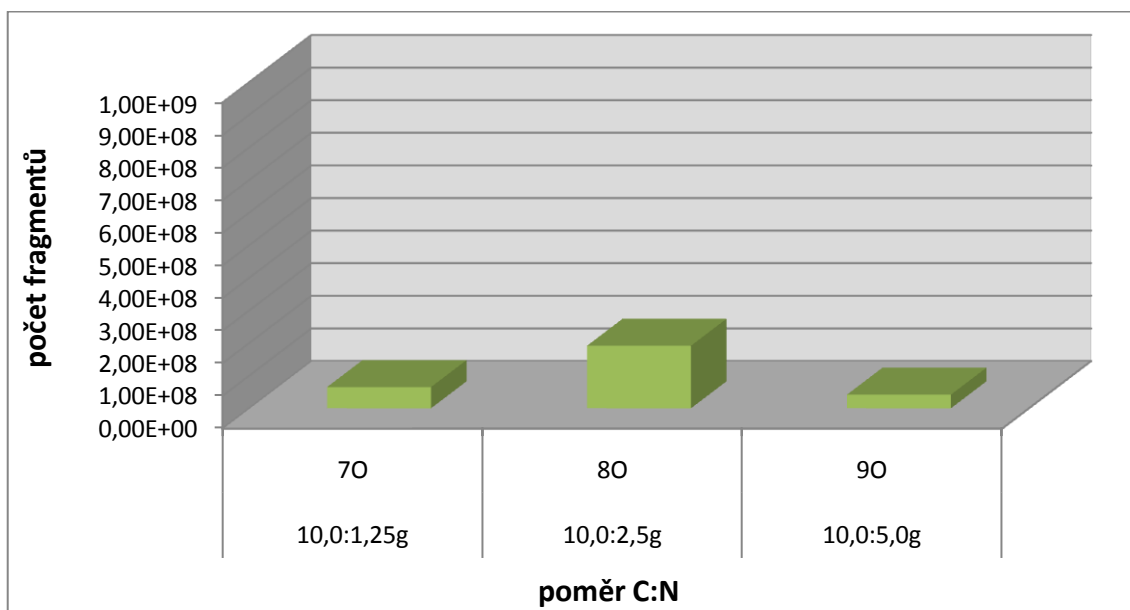
Graf č. 13: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při orbitálním třepání (konstantní množství uhlíku 2,5 g, zvyšující se množstvím dusíku)



Graf č. 14: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při orbitálním třepání (konstantní množství uhlíku 5,0 g, zvyšující se množstvím dusíku)

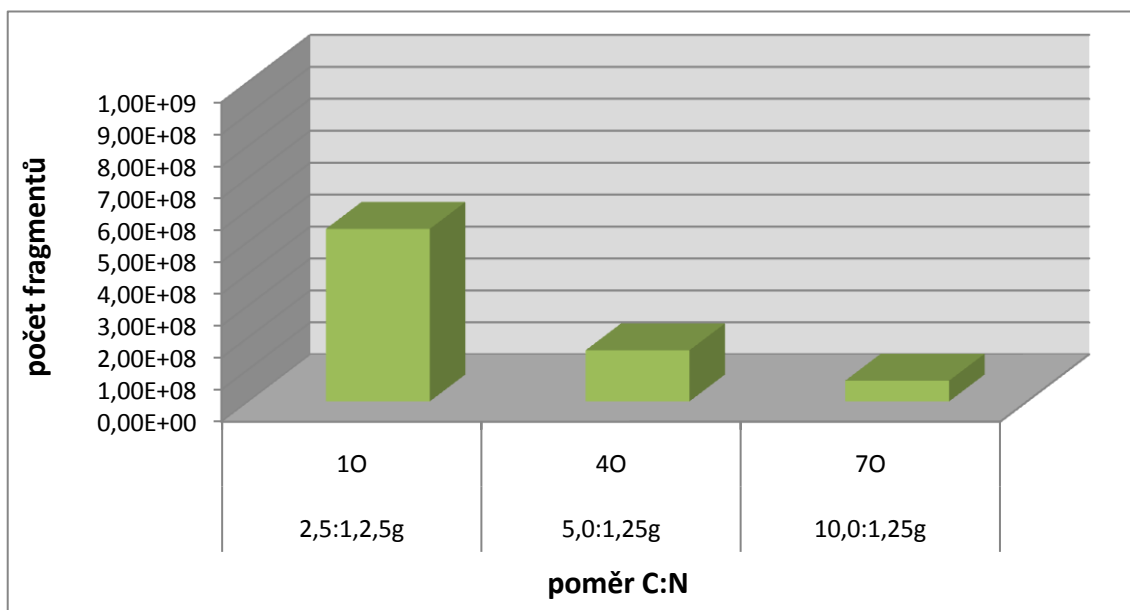


Graf č. 15: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při orbitálním třepání (konstantní množství uhlíku 10,0 g, zvyšující se množstvím dusíku)

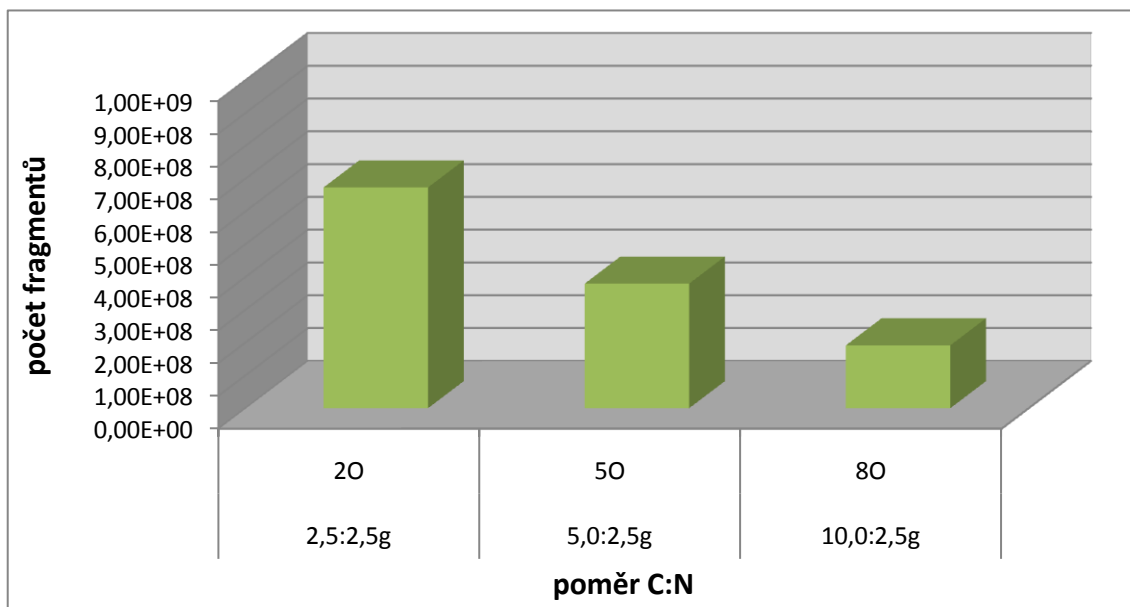


Z výsledků znázorněných v grafech č. 13-15 je patrné, že při porovnání trojic se stejným obsahem glukózy a zvyšujícím se množstvím peptonu, byly u jednotlivých variant nejproduktivnější média č. 2, č. 5 a č. 8, která obsahovala 2,5 g peptonu. Poměr C:N u těchto variant byl u č. 2 = 1:1, č. 5 = 2:1 a č. 8 = 4:1. Dále je zřejmé, že s narůstajícím obsahem glukózy množství fragmentů u porovnávaných trojic klesá. Nejvíce fragmentů bylo zjištěno první trojice médií s obsahem 2,5 g glukózy a naopak nejméně produktivnější byly varianty s obsahem 10 g glukózy.

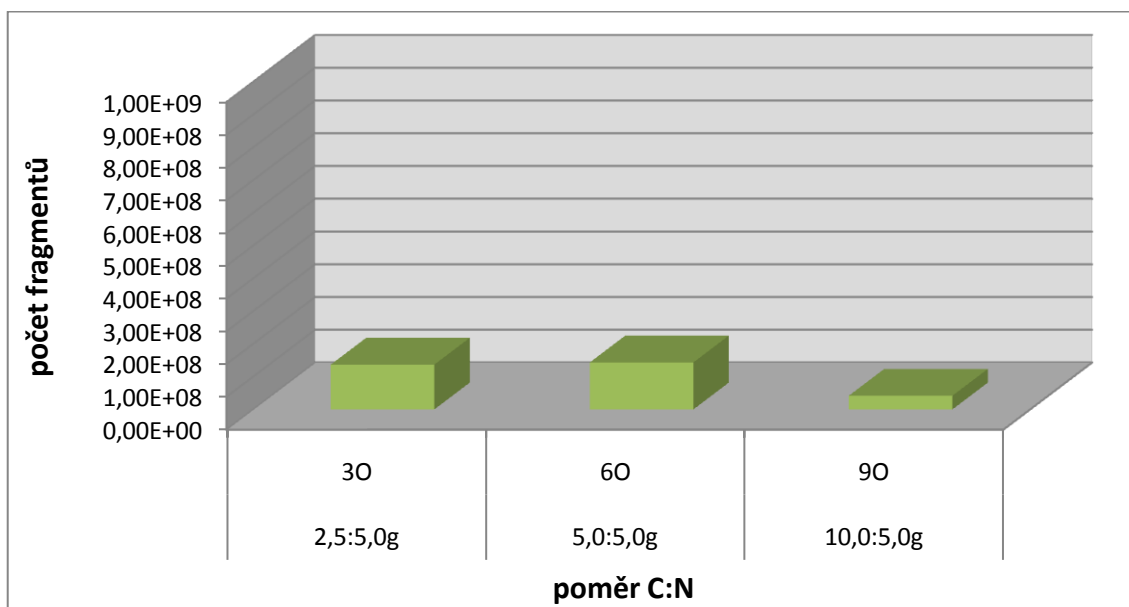
Graf č. 16: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při orbitálním třepání (konstantní množství dusíku 1,25 g, zvyšující se množstvím uhlíku)



Graf č. 17: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při orbitálním třepání (konstantní množství dusíku 2,5 g, zvyšující se množstvím uhlíku)



Graf č. 18: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při orbitálním třepání (konstantní množství dusíku 5,0 g, zvyšující se množstvím uhlíku)

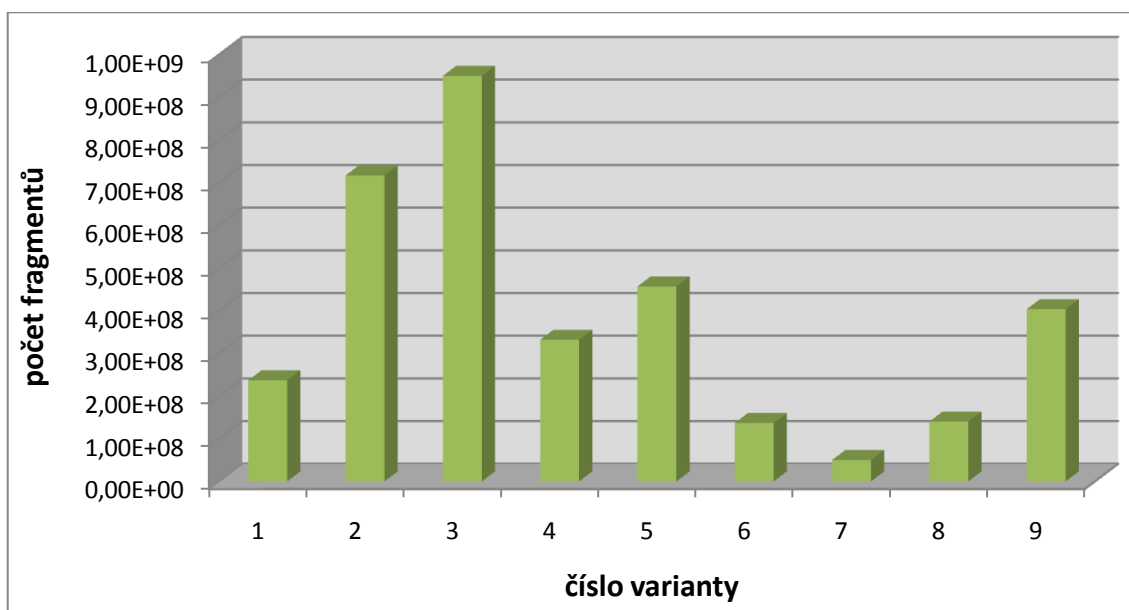


Při porovnání trojic se shodným množstvím dusíku a rozdílným množstvím uhlíku v grafech č. 16-18 lze říci, že s narůstajícím množstvím glukózy se snižuje počet fragmentů. Výjimkou jsou poslední tři média s obsahem 5 g dusíku. U této trojice se vyskytuje více fragmentů u varianty č. 6 s obsahem 5 g glukózy než u varianty č. 3 obsahující 2,5 g glukózy.

Tab. č. 11: Porovnání počtu fragmentů při vertikálním třepání

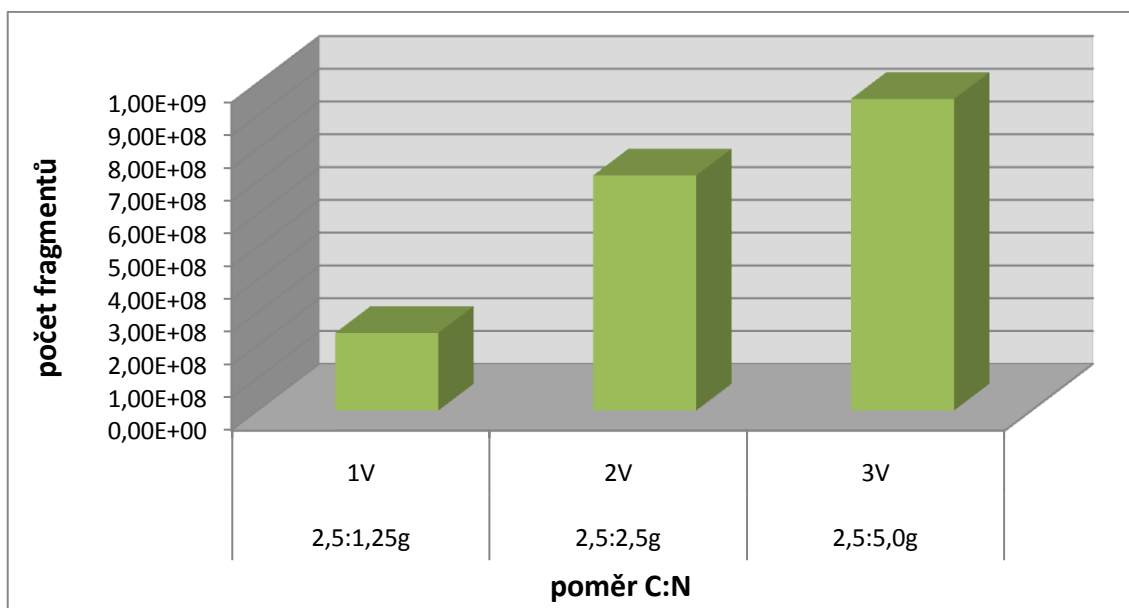
| varianta | C:N | C:N [g] | počet fragmentů |
|----------|-----|-------------|-----------------|
| 1 | 2:1 | 2,50 : 1,25 | 2,37E+08 |
| 2 | 1:1 | 2,50 : 2,50 | 7,17E+08 |
| 3 | 1:2 | 2,50 : 5,00 | 9,50E+08 |
| 4 | 4:1 | 5,00 : 1,25 | 3,32E+08 |
| 5 | 2:1 | 5,00 : 2,50 | 4,57E+08 |
| 6 | 1:1 | 5,00 : 5,00 | 1,37E+08 |
| 7 | 8:1 | 10,0 : 1,25 | 5,00E+07 |
| 8 | 4:1 | 10,0 : 2,50 | 1,40E+08 |
| 9 | 2:1 | 10,0 : 5,00 | 4,03E+08 |

Graf č. 19: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při vertikálním třepání

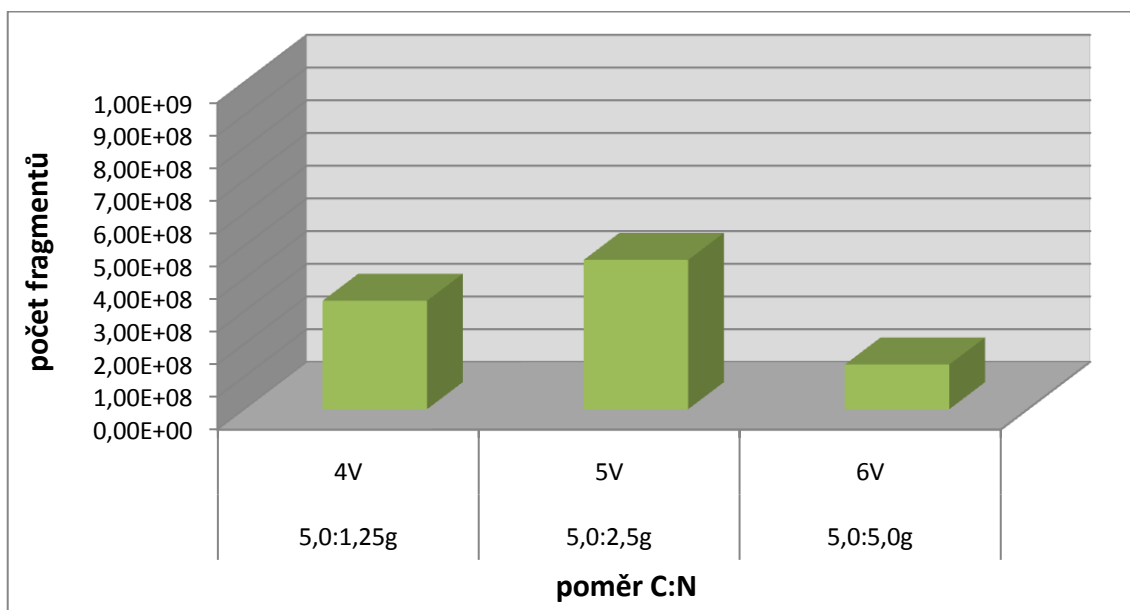


Při vertikálním třepání obsahovaly nejvíce fragmentů media č. 2 a č. 3, následovány médii č. 5, č. 9 a č. 4. Nejmenší počet byl zjištěn u varianty č. 7, která obsahovala pouze 5,00E+07 fragmentů.

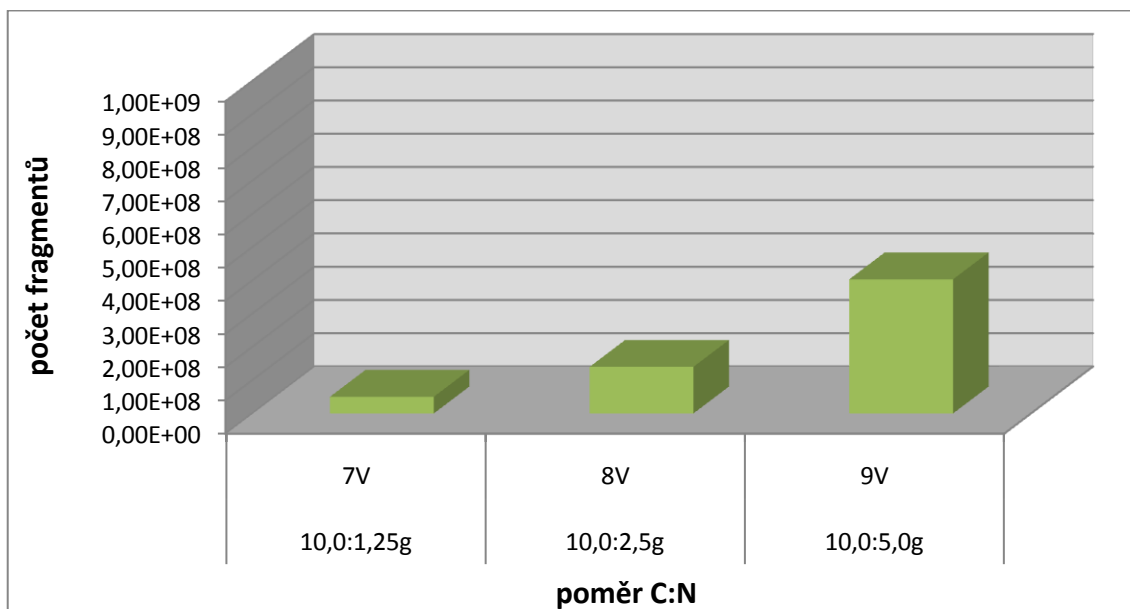
Graf č. 20: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při vertikálním třepání (konstantní množství uhlíku 2,5 g, zvyšující se množstvím dusíku)



Graf č. 21: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při vertikálním třepání (konstantní množství uhlíku 5,0 g, zvyšující se množstvím dusíku)



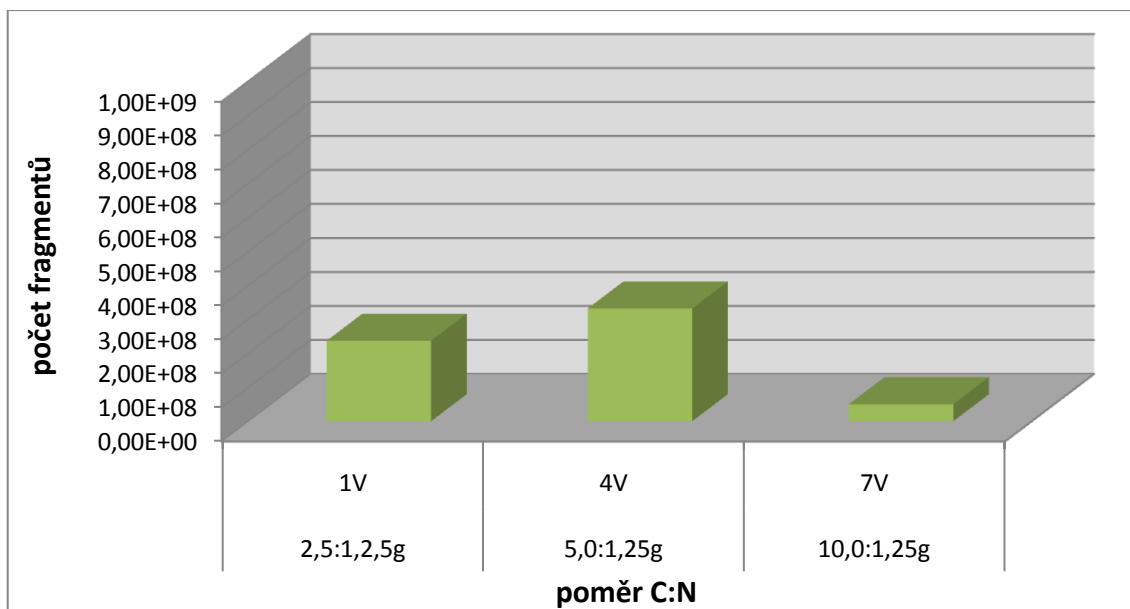
Graf č. 22: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při vertikálním třepání (konstantní množství uhlíku 10,0 g, zvyšující se množstvím dusíku)



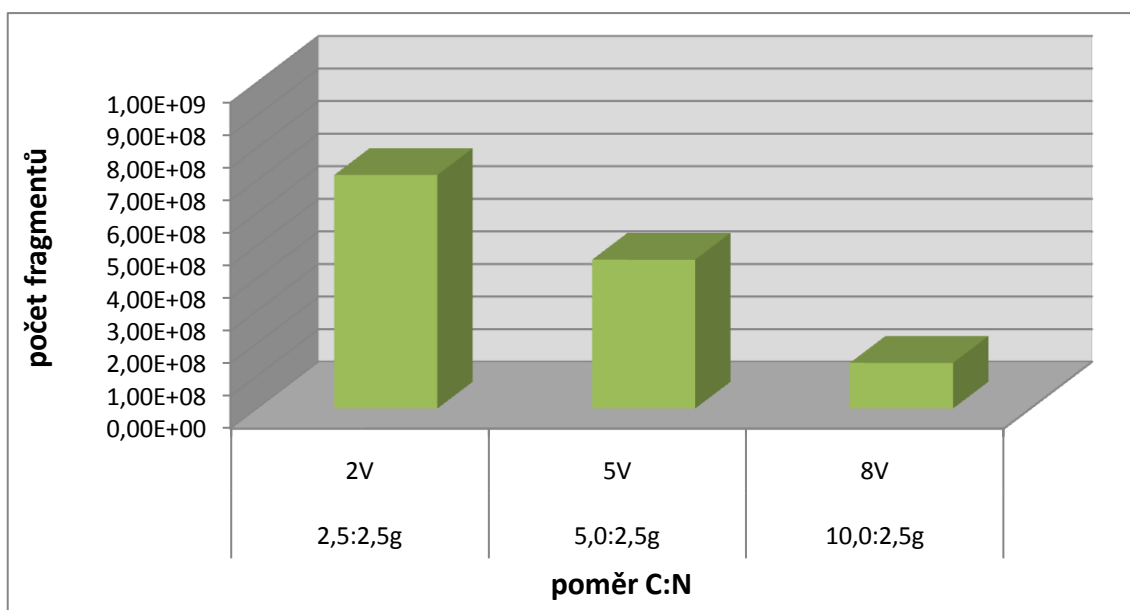
Z hodnot znázorněných v grafech č. 20-22 je patrné, že při stejném množství uhlíku a zvyšujícím se obsahem dusíku dochází u jednotlivých trojic médií k nárůstu počtu fragmentů. Narůstající obsah počtu fragmentů se zvyšujícím se množstvím dusíku

není dodržen u medií s obsahem 5 g glukózy, kde varianta č. 5 s 2,5 g peptonu obsahuje více fragmentů než varianta č. 6 obsahující 5 g peptonu.

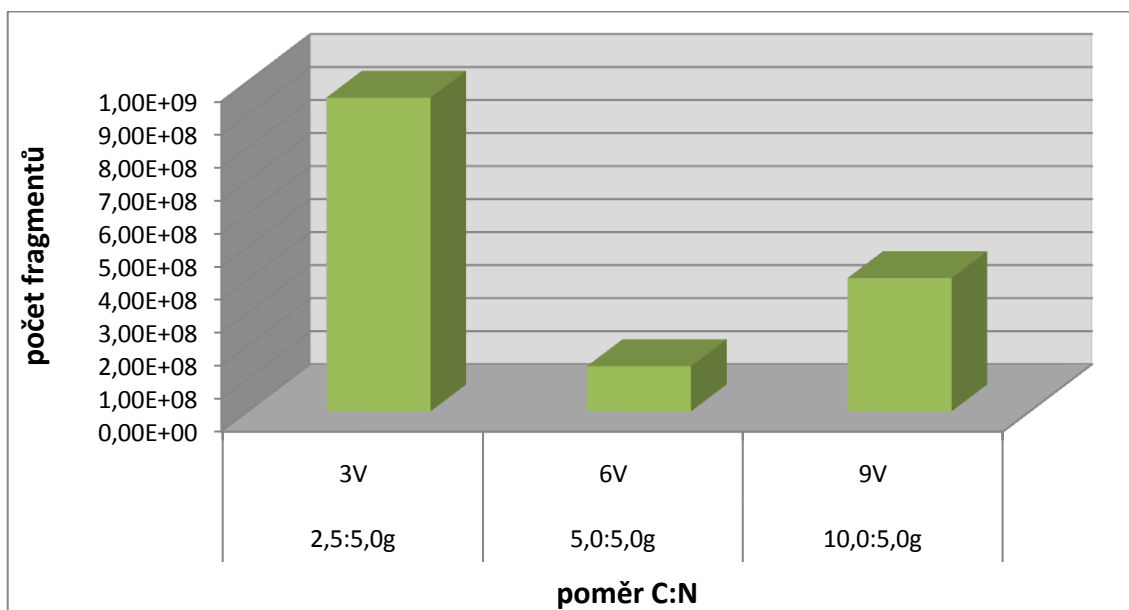
Graf č. 23: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při vertikálním třepání (konstantní množství dusíku 2,5 g, zvyšující se množstvím uhlíku)



Graf č. 24: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* v médiích při vertikálním třepání (konstantní množství dusíku, zvyšující se množstvím uhlíku)



Graf č. 25: Porovnání počtu fragmentů *A. oligospora* při vertikálním třepání (konstantní množství dusíku, zvyšující se množstvím uhlíku)



Při porovnávání médií se shodným množstvím dusíku a zvyšujícím se obsahem uhlíku nelze u všech trojic najít shodnou závislost mezi počtem fragmentů a obsahem nebo poměrem jednotlivých složek v médiu. U variant s obsahem 2,5 g dusíku je z grafu č. 24 patrný vliv uhlíku na počet fragmentů, kdy s narůstajícím obsahem glukózy dochází k poklesu množství fragmentů.

Zhodnocení:

Z výsledků pokusu č. 4 vyplývá, že způsob třepání má na růst *A. oligospora* u většiny médií s různým obsahem uhlíku a dusíku a poměrem C:N velký vliv. Nejméně se lišilo médium č. 7, které u orbitálního i vertikálního třepání dosáhlo podobného počtu fragmentů.

Pokud srovnáme shodné trojice, které se liší pouze v umístění na vertikální nebo orbitální třepače, zjistíme, že u většiny z porovnávaných trojic je odlišná závislost mezi počtem fragmentů a obsahem uhlíku a dusíku v mediích. Pouze u variant č. 2, č. 5 a č. 8 s konstantním obsahem 2,5 g peptonu dochází při orbitálním i vertikálním třepání se zvyšováním glukózy k poklesu počtu fragmentů v médiu.

Cílem pokusu č. 4 bylo zjistit poměr C:N, při kterém nematofágní houba *A. oligospora* produkuje nejvíce biomasy. Z výsledků zjištěných při tomto pokusu nelze

tento poměr určit, protože množství fragmentů v médiích se stejným poměrem C:N se výrazně liší.

Hodnocení a porovnání růstu *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných přirozených substrátech

Pokus č. 5: Hodnocení a porovnání výtěžnosti *A. oligospora* kmen F-483 spor na vybraných přirozených substrátech.

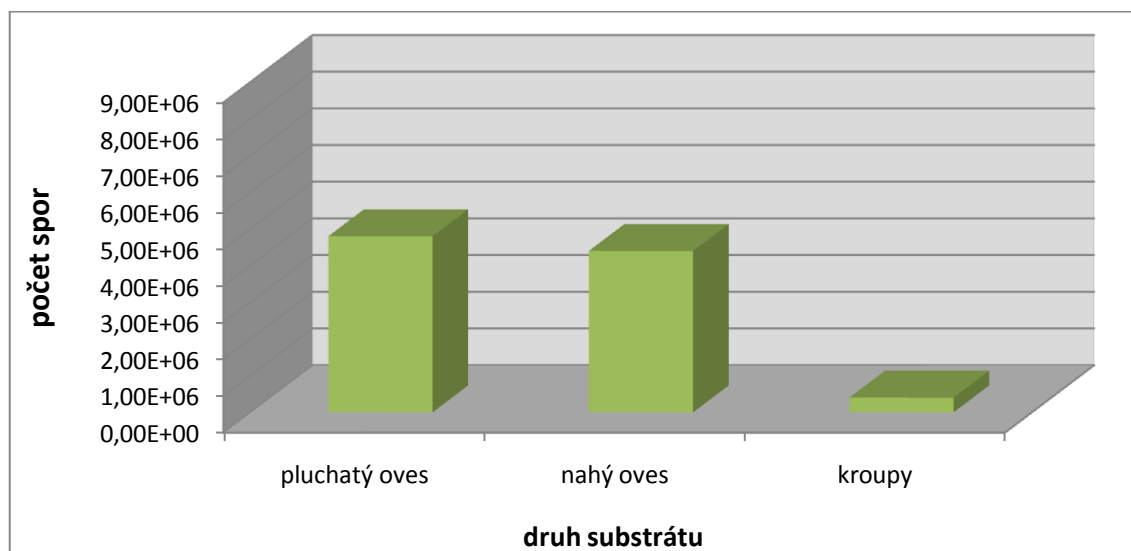
Postup:

- různé druhy sterilizovaných přirozených substrátů (rýže, nahý oves, pluchatý oves, kroupy, ovesné vločky, řepka)
- od každého druhu přirozeného substrátu založeny 2 varianty
- 10 g substrátu umístěno do 100 ml Erlenmayerových baněk
- Erlenmayerovy baňky inokulovány 5 ml submerzní kultury nematofágní houby *A. oligospora* kmen F-483 (bazální médium)
- přirozené substráty byly po inokulaci suspenzí houby inkubovány 6 hodin v 25 ± 1 °C
- po 6 hodinách bylo z každého přirozeného substrátu odebráno 25 partikulí a vyskládáno na povrch 2 % vodního agaru v Petriho miskách \varnothing 90 mm (5x5 partikulí)
- kultivace probíhala po dobu 13 dní ve světelném klimaboxu (teplota 25 ± 1 °C, fotoperioda 16/8)
- hodnocení výtěžnosti spor bylo prováděno po 13 dnech

Tab. č. 12: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z kultur umístěných v Erlenmayerových baňkách

| substrát | výtěžnost |
|---------------|-----------|
| pluchatý oves | 4,80E+06 |
| nahý oves | 4,40E+06 |
| kroupy | 4,00E+05 |

Graf č. 26: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z kultur umístěných v Erlenmayerových baňkách



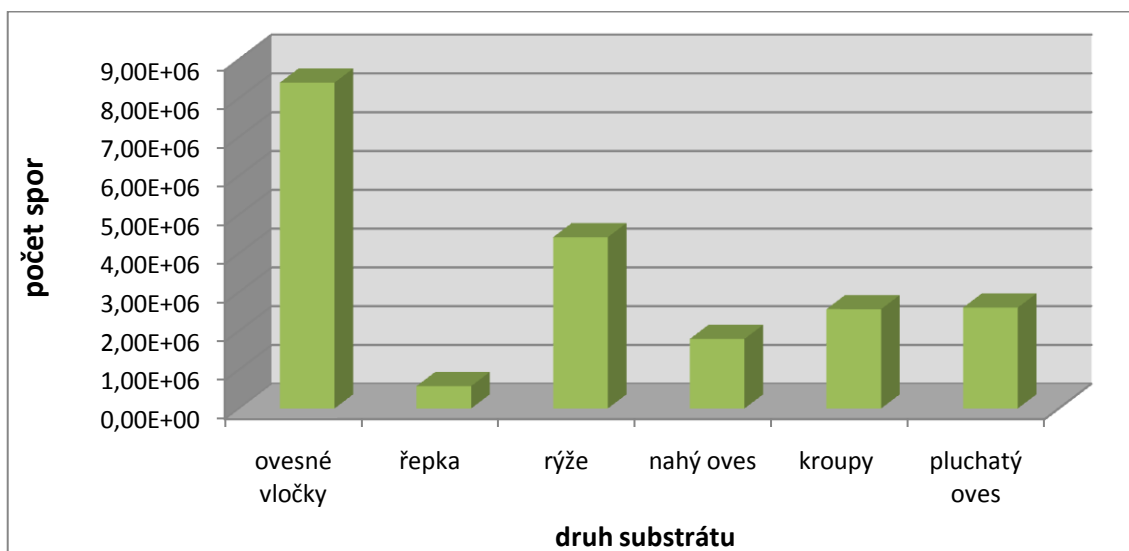
Ze znázorněných hodnot je patrné, že přirozeným substrátem s nejvyšší výtěžností spor *A. oligospora* je pluchatý resp. nahý oves, kde byl počet spor 4,80E+06 resp. 4,40E+06 spor na kulturu. Naopak u krup byla výtěžnost výrazně menší a dosahovala 4,00E+05 spor z jedné kultury.

Výtěžnost u rýže, řepky a ovesných vloček není znázorněna, protože pravděpodobně obsahují méně spor, než je Neubauerovou počítací komůrkou zjistitelné.

Tab. č. 13: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z kultur umístěných v Petriho miskách

| substrát | výtěžnost |
|---------------|-----------|
| ovesné vločky | 8,40E+06 |
| řepka | 5,76E+05 |
| rýže | 4,42E+06 |
| nahý oves | 1,79E+06 |
| kroupy | 2,56E+06 |
| pluchatý oves | 2,60E+06 |

Graf č. 27: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z kultur umístěných v Petriho miskách



Ze substrátů umístěných v Petriho miskách byla dosažena nejvyšší výtěžnost spor u ovesných vloček, na kterých *A. oligospora* produkovala téměř dvojnásobné množství spor než u substrátu s druhou nejvyšší výtěžností – rýží. Obilky ovsu jsou při zpracování na ovesné vločky silně narušeny. Z tohoto důvodu má houba snadný přístup k živinám a produkuje vyšší počet spor. Naopak semena řepky a ovsu chrání osemení, které průnik houby stěžují. Nejmenší výtěžnost byla zjištěna u semen řepky. Tento výrazný rozdíl je pravděpodobně způsoben rozdílným složením semen. Rýže, oves a ječmen patří mezi obilniny a v jejich obilkách převažují sacharidy, zatímco řepka se řadí k olejninám a semena obsahují velké množství mastných kyselin.

Zhodnocení:

Produkce spor na vybraných přirozených substrátech umístěných v Erlenmayerových baňkách a v Petriho miskách s 2 % agarem se výrazně liší. Nejvíce patrný rozdíl je u ovesných vloček, u kterých při kultivaci v Erlenmayerových baňkách nebyly pozorovány žádné spory, zatímco při umístění v Petriho miskách *A. oligospora* produkovala největší množství spor. Odlišnost je patrně způsobena tím, že při umístění v Petriho miskách houba roste nejen na semenech, ale pokrývá také povrch 2 % agaru. Dalším faktorem, který může mít na výtěžnost spor vliv je vlhkost, které je patrně u variant umístěných v Petriho miskách vyšší, což vede k lepšímu růstu mycelia, resp. produkci spor.

Hodnocení a porovnání porůstání *A. oligospora* kmen F-483 na alginátových peletách

Pokus č. 6: Hodnocení a porovnání růstu *A. oligospora* kmen F-483 na alginátových peletách.

Postup:

- alginátové pelety – základ pelet tvoří vybrané druhy rozemletých přirozených substrátů (kroupy, ovesné vločky, otruby, kukuřice, rýže) inokulovaných submerzí kulturou nematofágní houby *A. oligospora* kmen F-483 (bazální médium)
- varianta č. 1 – 25 pelet (5x5 pelet) na povrch Petriho misek \varnothing 90 mm s 2 % agarem
- index obrůstání alginátových pelet se hodnotil po 2, 3, 4 a 5 dnech
- výtěžnost se hodnotila po 6, 9 a 12 dnech

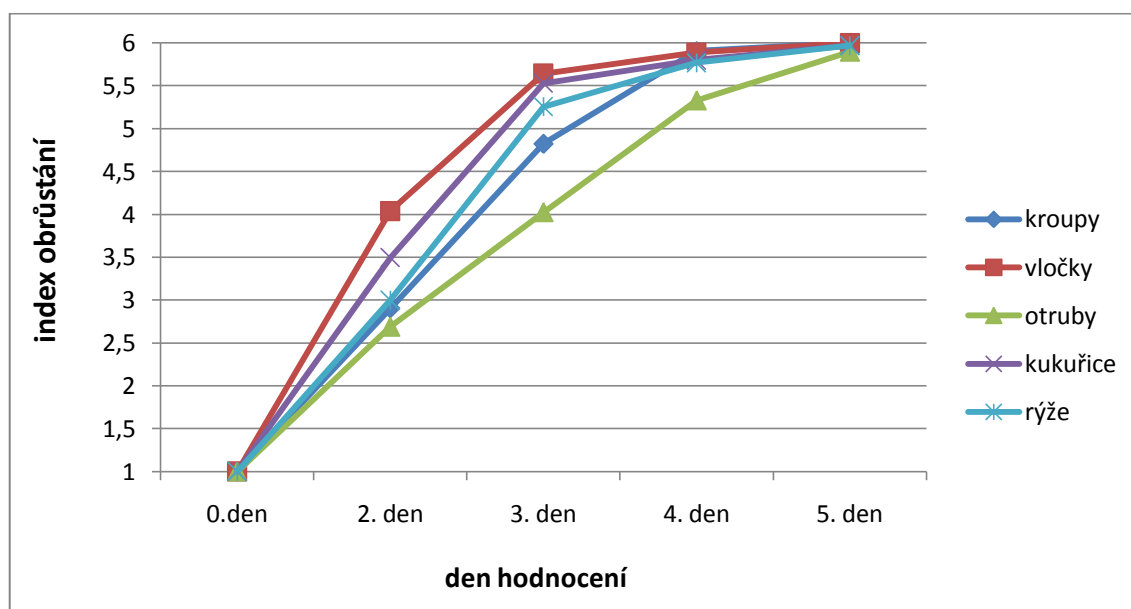
- varianta č. 2 – od každého druhu alginátových pelet byla jedna peleta umístěna na povrch Petriho misek \varnothing 90 mm s 2 % agarem
- výtěžnost se hodnotila po 9 a 12 dnech
- radiální růst byl hodnocen po 5 a 9 dnech, následně přepočteno na plochu v mm^2

- obě varianty kultivovány ve světelném klimaboxu (teplota 20 ± 1 °C, fotoperioda 16/8) po dobu 12 dní

Tab č. 14: Hodnocení indexu obrůstání alginátových pelet s inkorporovanou *A. oligospora* po 2, 3, 4 a 5 dnech

| druh substrátu | den hodnocení indexu obrůstání | | | |
|----------------|--------------------------------|--------|--------|--------|
| | 2. den | 3. den | 4. den | 5. den |
| kroupy | 2,90 | 4,82 | 5,90 | 6,00 |
| vločky | 4,04 | 5,64 | 5,89 | 6,00 |
| otruby | 2,69 | 4,02 | 5,33 | 5,90 |
| kukuřice | 3,50 | 5,53 | 5,80 | 5,97 |
| rýže | 3,00 | 5,26 | 5,77 | 5,97 |

Graf č. 28: Porovnání indexu obrůstání alginátových pelet s inkorporovanou *A. oligospora* po 2, 3, 4 a 5 dnech

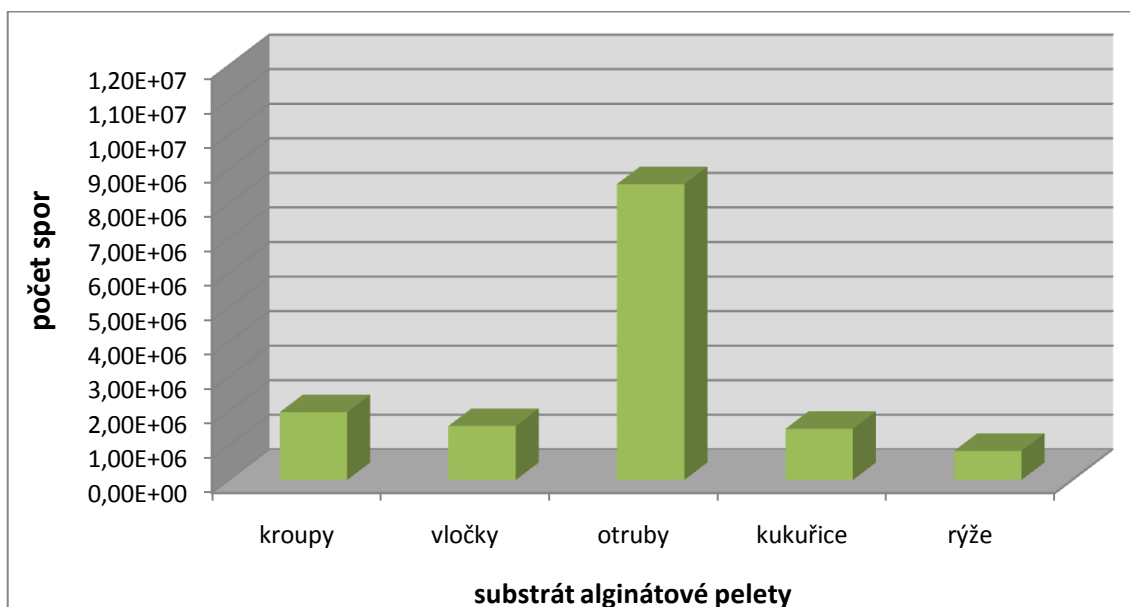


Z výsledků uvedených v tab. č. 14 a znázorněných v grafu č. 28 vyplývá, že všechny druhy alginátových pelet obrůstaly velmi dobře a 5. den hodnocení dosáhly téměř všechny pelety indexu 6, což znamená plnou sporulaci. Nejrychleji obrůstaly pelety, kde byly jako substrát použity ovesné vločky. Tyto pelety dosáhly již po 2 dnech indexu 4,04. Naopak nejpomalejší růst byl na počátku pokusu zaznamenán u alginátových pelet z otrub, ale i na těchto peletách byly 5. den hodnocení patrné spory a index obrůstání dosáhl hodnoty 5,97.

Tab. č. 15: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z různých druhů alginátových pelet

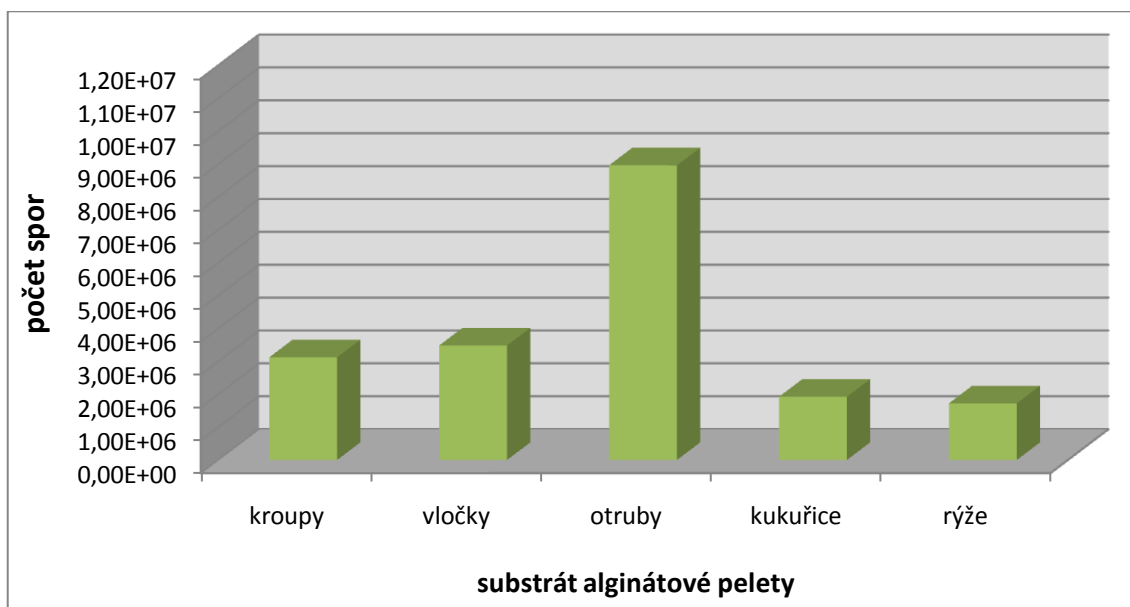
| druh substrátu | výtěžnost | | |
|----------------|-----------|----------|----------|
| | 6. den | 9. den | 12. den |
| kroupy | 1,96E+06 | 3,12E+06 | 4,88E+06 |
| vločky | 1,56E+06 | 3,48E+06 | 4,64E+06 |
| otruby | 8,56E+06 | 8,96E+06 | 1,18E+07 |
| kukuřice | 1,48E+06 | 1,92E+06 | 4,32E+06 |
| rýže | 8,40E+05 | 1,72E+06 | 1,12E+06 |

Graf č. 29: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z různých druhů 25 alginátových pelet po 6 dnech



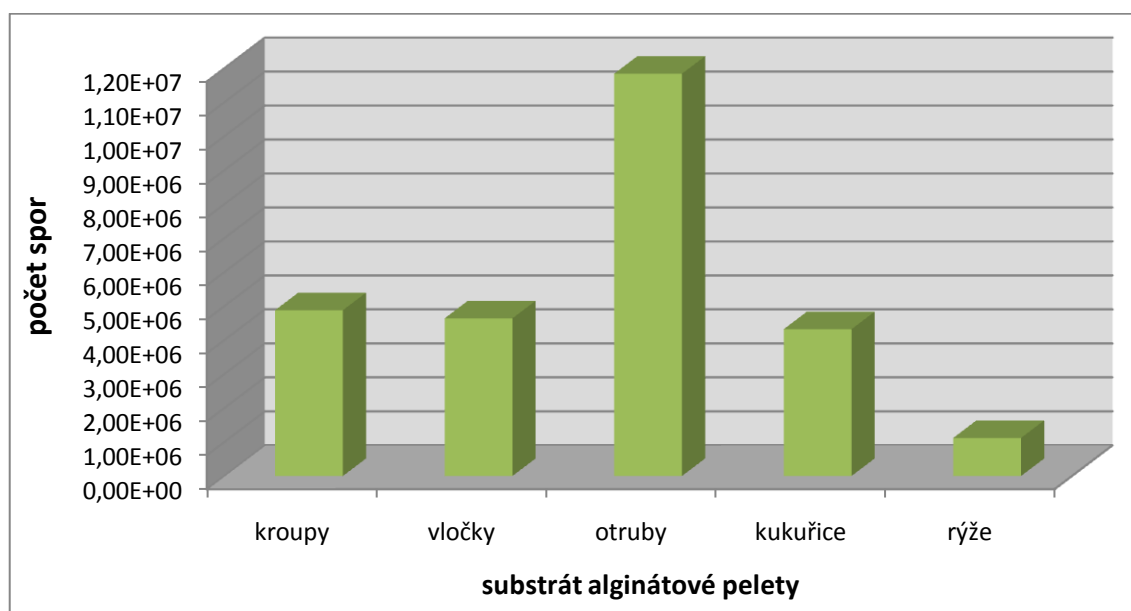
Při porovnání výtěžnosti spor z alginátových pelet 6. den hodnocení se markantně odlišovaly pelety, u kterých byly jako základ použity otruby. U těchto pelet byl počet spor několikanásobně vyšší než u ostatních druhů pelet. Zbylé čtyři druhy alginátových pelet se ve výtěžnosti výrazně nelišily.

Graf č. 30: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z různých druhů 25 alginátových pelet po 9 dnech



Při hodnocení výtěžnosti po 9 dnech byla opět zjištěna nejvyšší výtěžnost u alginátových pelet, u kterých byly jako základ použity otruby. Zatímco u ostatních druhů pelet je nárůst počtu spor zřetelný, u otrubných pelet se výtěžnost zvýšila jen nepatrně. Z grafu č. 30 je vidět, že pelety z otrub již tak výrazně nepřevyšují ostatní varianty, jak tomu bylo v předchozím grafu č. 29.

Graf č. 31: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z různých druhů 25 alginátových pelet po 12 dnech



Z grafu č. 31 je patrné, že při hodnocení výtěžnosti spor po 12 dnech se počet spor téměř u všech pelet zvýšil. Výjimku tvoří rýžové pelety, u kterých výtěžnost mírně poklesla. Nejproduktivnějším substrátem byly opět alginátové pelety z otrub, u kterých byla výtěžnost $1,18E+07$. Výtěžnost u alginátových pelet, jejichž základ tvořily kroupy, vločky a kukuřice byly velmi vyrovnané a počet spor se pohyboval v rozmezí $4,32E+06$ – $4,88E+06$ spor na jednu Petriho misku s 25 partikulemi.

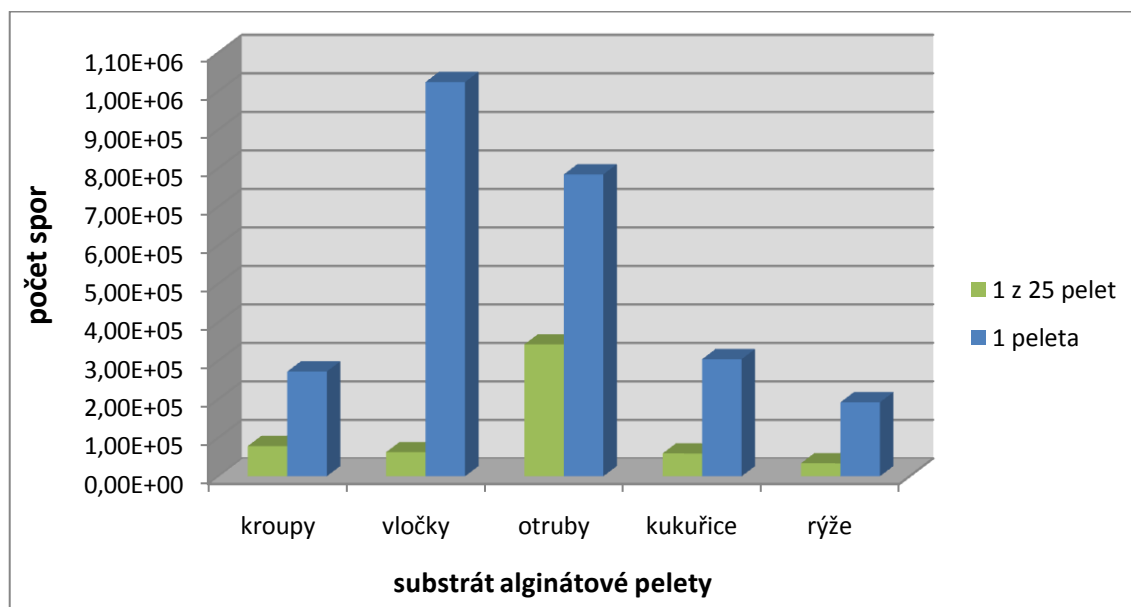
Tab. č. 16: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z 1 alginátové pelety z 25 alginátových pelet

| druh substrátu | výtěžnost spor na 1 alginátovou peletu | |
|----------------|--|----------|
| | 9. den | 12. den |
| kroupy | 7,84E+04 | 1,95E+05 |
| vločky | 6,24E+04 | 1,86E+05 |
| otruby | 3,42E+05 | 4,74E+05 |
| kukuřice | 5,92E+04 | 1,73E+05 |
| rýže | 3,36E+04 | 4,48E+04 |

Tab. č. 17: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z 1 samostatně umístěné alginátové pelety

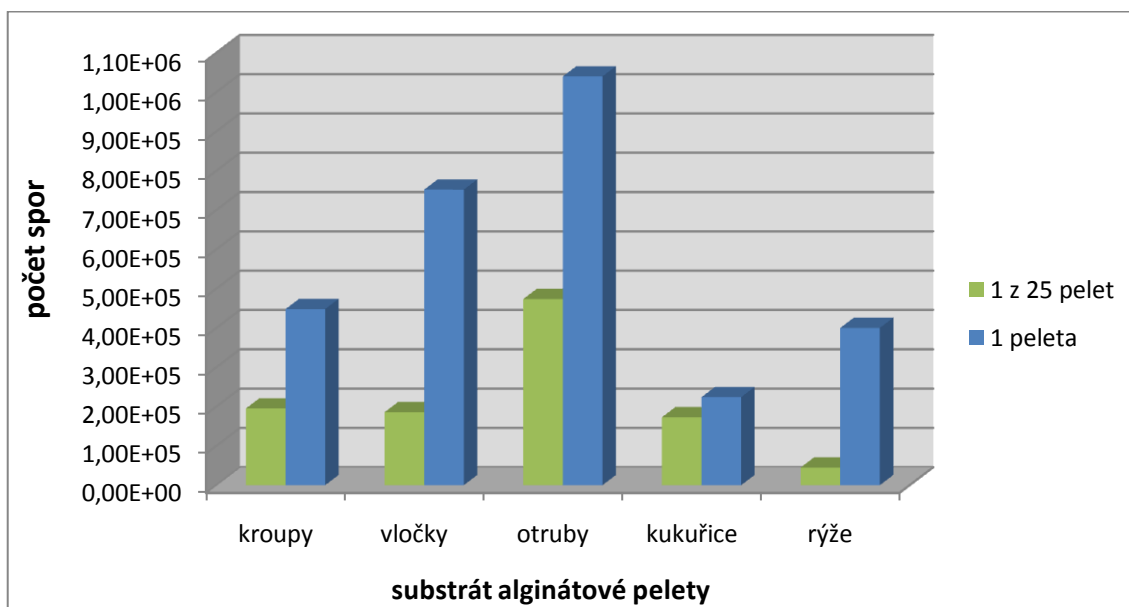
| druh substrátu | výtěžnost/kultura | | výtěžnost/mm ² | |
|----------------|-------------------|----------|---------------------------|----------|
| | 9. den | 12. den | 9. den | 12. den |
| kroupy | 2,72E+05 | 4,48E+05 | 5,03E+01 | 8,28E+01 |
| vločky | 1,02E+06 | 7,52E+05 | 1,89E+02 | 1,39E+02 |
| otruby | 7,84E+05 | 1,04E+06 | 1,45E+02 | 1,92E+02 |
| kukuřice | 3,04E+05 | 2,24E+05 | 5,62E+01 | 4,14E+01 |
| rýže | 1,92E+05 | 4,00E+05 | 3,55E+01 | 7,39E+01 |

Graf č. 32: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z 1 alginátové pelety z 25 alginátových pelet a z 1 samostatně umístěné alginátové pelety po 9 dnech



Při porovnání výtěžností po 9 dnech kultivace vyplývá, že výtěžnosti spor z jedné alginátové pelety umístěné samostatně ve středu Petriho misky byly zřetelně vyšší než u jedné pelety z misek po 25 partikulí. Největší rozdíl vykazují alginátové pelety z ovesných vloček, u kterých je výtěžnost z jedné samostatně umístěné pelety mnohonásobně vyšší než u jedné pelety z Petriho misky s 25 partikulemi. Naopak u 1 pelety z 25 je nejvyšší výtěžnost u otrubných pelet.

Graf č. 33: Porovnání výtěžnosti spor *A. oligospora* z 1 alginátové pelety z 25 alginátových pelet a z 1 samostatně umístěné alginátové pelety po 12 dnech

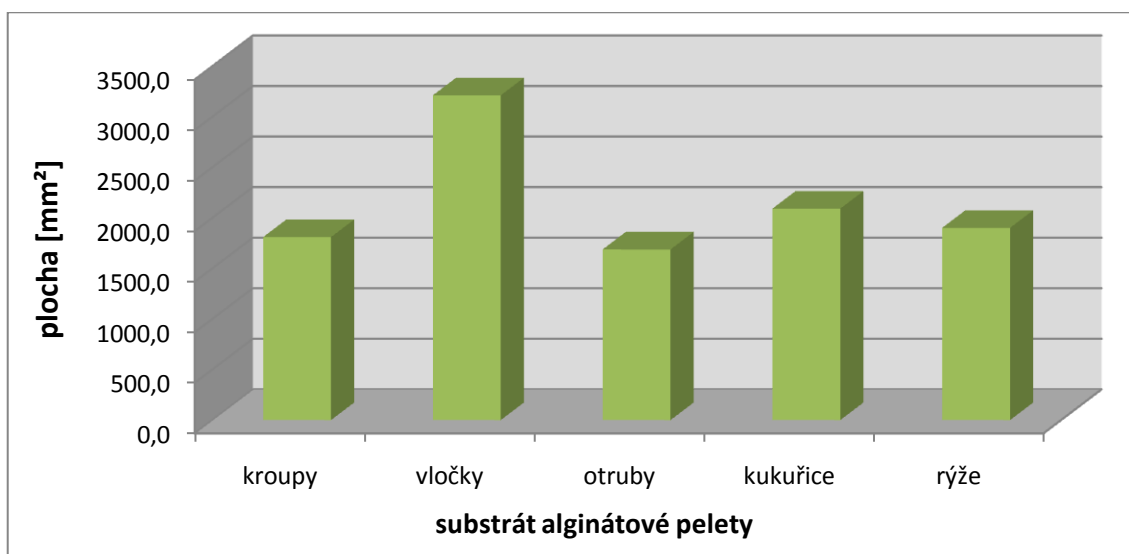


Výtěžnost spor 12. den kultivace byla znovu vyšší u samostatně umístěných alginátových pelet. Při porovnání hodnot zjištěných 12. den kultivace s výsledky 9. den kultivace je vidět, že u pelet z ovesných vloček a kukuřice došlo u samostatně umístěných pelet k poklesu výtěžnosti. Naproti tomu u 1 pelety z 25 došlo ke zvýšení počtu spor. U obou dvou variant byla nejvyšší výtěžnost spor u otrubných pelet.

Tab. č. 18: Porovnání průměru a plochy mycelia *A. oligospora* po 5 a 9 dnech

| druh substrátu | průměr [mm] | | plocha [mm ²] | |
|----------------|-------------|--------|---------------------------|---------|
| | 5. den | 9. den | 5. den | 9. den |
| kroupy | 48,00 | 83,00 | 1809,56 | 5410,60 |
| vločky | 63,95 | 83,00 | 3211,96 | 5410,60 |
| otruby | 46,35 | 83,00 | 1687,29 | 5410,60 |
| kukuřice | 51,60 | 83,00 | 2091,17 | 5410,60 |
| rýže | 49,20 | 83,00 | 1901,16 | 5410,60 |

Graf č. 36: Porovnání plochy mycelia *A. oligospora* po 5 dnech



Radiální růst mycelia z jedné alginátové pelety byl až na pelety, kde byl jako základ pelety použity ovesné vločky, poměrně vyrovnaný a mycelium pokrývalo plochu od 1687,29 mm² u pelet s obsahem otrub až po 2091,17 mm² u kukuřičných pelet. U alginátových pelet, kde základ tvořily ovesné vločky, byla plocha mycelia 3211,96 mm². Při hodnocení po 9 dnech dosahovalo mycelium okrajů Petriho misek u všech alginátových pelet.

Zhodnocení:

Cílem tohoto pokusu bylo ověření vitality biomasy *A. oligospora* imobilizované do alginátových pelet a nalezení nejvhodnějšího substrátu pro tvorbu pelet. Na základě výsledků zjištěných v pokusu č. 6 lze říci, že vhodnými substráty pro alginátové pelety jsou ovesné vločky a otruby. Na těchto alginátových peletách dosahovala nematofágní houba *A. oligospora* výborné výtěžnosti při současném dobrém radiálním růstu a indexu obrůstání. Jako nejméně vhodný substrátem se jeví rýže, která se při hodnocení u většiny pokusů umístila na posledním místě.

Potvrdila se domněnka, že by houba rostoucí ze samostatně umístěné pelety měla mít vyšší výtěžnost než výtěžnost z 1 pelety z 25. Houba rostoucí ze samostatně umístěných pelet nemusí o prostor a živiny soupeřit s jinými konkurenty, což vede k vyšší produkci spor.

Na základě pokusu č. 6 lze říci, že houba na všech druzích alginátových pelet dobře obrůstá a dosahuje velmi rychlého radiálního růstu, což je hlavní podmínkou pro úspěšné osídlení půdního prostředí.

5. DISKUZE A ZÁVĚRY

Tato diplomová práce je první studií, zabývající se hodnocením růstových a produkčních schopností nematofágní houby *A. oligospora*. Většina prací týkajících se tohoto druhu houby se zaměřuje na morfologii a infekční cyklus. Z důvodu nedostatku informací o kultivaci *A. oligospora* nemůže být tato diskuze řešena standardním způsobem.

Cílem této diplomové práce bylo získání biotechnologických charakteristik *A. oligospora*. V provedených pokusech byly zjišťovány informace týkající se:

- růstu a sporulace na umělých živných půdách a na přirozených substrátech
- vlivu podmínek kultivace na produkci biomasy a spor
- možnosti formulace biopreparátu na bázi *A. oligospora*

Biologická účinnost houby vůči fytofágním hád'átkům není v této práci řešena, jelikož vhodné testovací agens nebylo k dispozici.

Obecným předpokladem pro využití hub v biologické ochraně rostlin proti škůdcům je schopnost saprofytického růstu, který umožňuje a usnadňuje jejich kultivaci na umělých živných médiích. Na základě provedených pokusů lze říci, že *A. oligospora* má výraznou schopnost saprofytického růstu. Houba rostla na všech vybraných druzích umělých i přirozených substrátů. Tento fakt je velmi důležitý nejen pro samotnou kultivaci, ale také pro schopnost houby udržet se při absenci vhodného hostitele v půdním prostředí.

Z hlediska praktické účinnosti houby v biologické ochraně jsou významné dva ukazatele – rychlost radiálního růstu, která je důležitá pro schopnost houby kolonizovat prostředí a produkce spor, která je předpokladem šíření se v prostředí. Tyto dva parametry byly hodnoceny při povrchové kultivaci na standardních druzích agarizovaných živných půd v pokuse č. 1. Z výsledků vyplývá, že růst *A. oligospora* byl velmi rychlý. Již 7. den kultivace houba téměř dosahovala okrajů Petriho misek ø 90 mm u živné půdy CMA. Po 21 dnech dorostlo mycelium ke krajům i u živných půd PDA, CDA a SLA. Růst houby na YEA, V8J a TSA byl mírně pomalejší. Nejméně vhodnou agarizovanou živnou půdou bylo SDA. Na této půdě byla rychlost růstu

nejpomalejší a houba v rychlosti růstu výrazně zaostávala za ostatními variantami. Nicméně dobrý radiální růst nezaručuje odpovídající výtěžnost spor. I když se živné půdy s výjimkou SDA v rychlosti radiálního růstu zásadně nelišily, v produkci spor byly zjištěny výrazné rozdíly. Po 21 dnech kultivace byla nejvyšší výtěžnost spor z 1 mm^2 u živné půdy SLA, následována půdami PDA a CMA. Při porovnání výsledků radiálního růstu a produkce spor lze říci, že nejvhodnější druh živné půdy pro kultivaci *A. oligospora* je SLA, na které houba vykazuje velmi dobrý růst a současně nejvyšší výtěžnost spor $9,17\text{E}+02$ spor/ mm^2 .

Cílem pokusu č. 2 bylo ověření nepřímé závislosti mezi produkcí spor a množstvím živin obsažených v umělých médiích, kdy se množství spor zvyšuje s klesajícími živinami. Tato skutečnost se potvrdila pouze u médií inokulovaných suspenzí konidií. Výtěžnost spor zde klesala spolu se zvyšujícím se obsahem živin v pořadí $\frac{1}{2}$ PDA, PDA a MEA. Médium s nejnižším množstvím živin byla sice půda s 2 % agarem, avšak toto kultivační médium se z důvodu velmi nízkého obsahu živin nejvíce jako vhodné pro růst, resp. sporulaci *A. oligospora*.

Růst a sporulace *A. oligospora* na přirozených substrátech (rýže, nahý oves, pluchatý oves, kroupy, ovesné vločky, řepka) byl zkoumán v pokuse č. 5. Tento experiment byl založen ve dvou variantách, ve kterých byla v první variantě inokulovaná semena umístěna do Erlenmayerových baněk a u druhé varianty byla vyskládána na povrch Petriho misky s 2 % agarem. Výrazně lepších výsledků bylo dosaženo u varianty č. 2., kdy *A. oligospora* rostla a sporulovala na všech testovných substrátech, zatímco u první varianty byla produkce spor zaznamenána pouze u krup a pluchatého a nahého ovsu. Tato skutečnost je pravděpodobně dána tím, že v Petriho miskách s 2 % agarem byla vyšší vlhkost než u semen umístěných do Erlenmayerových baněk, což houbě poskytovalo lepší podmínky pro růst mycelia a tvorbu spor. Na základě zjištěných výsledků lze za nejvhodnější substrát považovat ovesné vločky, u kterých bylo množství vyprodukovaných spor téměř dvakrát vyšší než substrátu s druhou nejvyšší výtěžností – rýže.

Vliv odlišných podmínek kultivace *A. oligospora* v tekutých živných médiích byl hodnocen v pokusech č. 3 a č. 4. Jako hlavní ukazatel pro posouzení vhodné kombinace jednotlivých faktorů (druh inokula, typ třepání, druh živného média) bylo použito množství vytvořené biomasy resp. počet fragmentů.

Cílem pokusu č. 3 bylo stanovení vlivu zdroje inokula a typu třepání na kultivaci houby ve standardních živných médiích (TSB, SDB, YMB, PDB, CMB). Z výsledků tohoto experimentu vyplývá, že ani jeden z výše uvedených faktorů nebo jejich možná kombinace neovlivňovala všechna živná média stejným způsobem. Jedinou podobnost lze spatřit u YMB a SDB, u kterých *A. oligospora* vyprodukovala více biomasy při inokulaci konidii. Naopak minimální rozdíly v produkci biomasy byly zaznamenány u živného média CMB. U tohoto média se jednotlivé varianty v množství vyprodukované biomasy lišily pouze o 0,3 g.

V tomto pokuse byla dále média mikroskopicky zkoumána. Obecným předpokladem pro využití submerzní kultivace je schopnost houby vytvářet uniformní biomasu, na jejímž základě je formulována většina biopreparátů na bázi hub. V médiích byly zjišťovány struktury vytvářené při submerzní kultivaci. Jelikož účinnou složku většiny biopreparátů na bázi hub tvoří blastosporý nebo spory, byla v médiích zkoumána možnost tvorby konidií *A. oligospora*, která se však neprokázala. Média obsahovala pouze fragmenty mycelia o různé délce. V některých médiích byl zjištěn náznak tvorby chlamydospor.

V pokusu č. 4 byl studován vliv rozdílného typu třepání a odlišného obsahu uhlíku a dusíku v tekutých médiích na množství fragmentů. Hodnoty zjištěné u médií se stejným obsahem uhlíku a dusíku se při kultivaci na orbitální a vertikální třepače značně liší. Na základě tohoto faktu lze říci, že způsob třepání zásadně ovlivňuje množství vytvořených fragmentů. V tomto experimentu se nepodařilo určit, jaký poměr C:N je pro kultivaci *A. oligospora* nejvhodnější, protože počet fragmentů v médiích se stejným poměrem C:N se výrazně odlišují.

Jelikož nebylo možné formulovat biopreparát na bázi *A. oligospora* standardním způsobem, byla zkoumána možnost vytvořit účinný přípravek na bázi alginátových pelet, jejichž aktivní složkou jsou neinfekční formy biomasy hub (mycelium) nebo infekční jednotky imobilizované v organických nebo anorganických nosičích. Tato formulace byla vyvinuta speciálně pro půdní aplikaci proti škůdcům žijícím v půdním prostředí.

Hodnocení růstu a sporulace *A. oligospora* inkorporované do alginátových pelet, z různých druhů substrátů (kroupy, ovesné vločky, otruby, kukuřice, rýže) bylo prováděno v pokuse č. 6. Všechny zvolené substráty pro inkorporaci *A. oligospora* se ukázaly jako vhodné. Houba rychle regenerovala, rostla a sporulovala na všech

testovaných druhích alginátových pelet. Při hodnocení indexu obrůstání 5. den dosahovala houba u všech typů pelet indexu 6, tedy plné sporulace.

Množství vyprodukovaných spor bylo zjišťováno u jedné samostatně umístěné pelety a u jedné z 25 pelet umístěných v Petriho misce s 2 % agarem. Potvrdil se fakt, že houba rostoucí ze samostatně umístěné pelety produkuje více spor, jelikož nemusí o prostor a živiny soupeřit s jinými konkurenty. Z hlediska vhodnosti substrátu u obou variant se jako nejlepší jeví ovesné vločky a otruby.

Výsledky diplomové práce lze stručně shrnout do následujících bodů a konstatování:

- *A. oligospora* má značné saprotrofní schopnosti
- z hlediska rychlosti radiálního růstu a produkce spor je nejvhodnějším umělým živným médiem SLA a přirozeným substrátem ovesné vločky
- z hlediska růstu a sporulace jsou nejvhodnějším substrátem pro tvorbu alginátových pelet ovesné vločky
- s klesajícím množstvím živin v umělém živném médiu stoupá produkce spor
- nepodařilo se prokázat vliv zdroje inokula nebo způsobu třepání na produkci biomasy při kultivaci v tekutých živných médiích
- nepodařilo se zjistit nejvhodnější poměr C:N na produkci biomasy při kultivaci v tekutých živných médiích
- při submerzní kultivaci houba nevytváří konidie, ale pouze myceliové fragmenty; v některých médiích náznak tvorby chlamydospor
- biopreparát na bázi *A. oligospora* lze formulovat; nejvhodnější formulací jsou alginátové pelety s inkorporovanou biomasou *A. oligospora*

6. POUŽITÉ ZDROJE

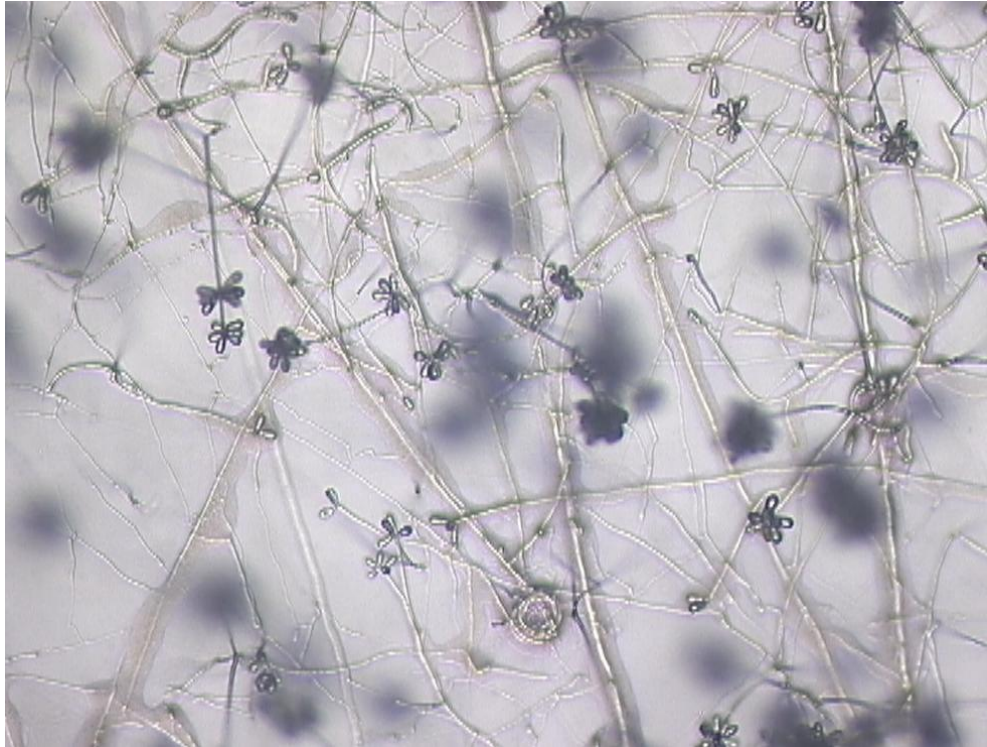
- Anonym 1:** Nematophagous Fungi: Guide by Philip Jacobs. Dostupné z <<http://www.biological-research.com/philip-jacobs%20BRIC/>>, online 13. 10. 2009
- Anonym 2:** Biological Control in the Western USA. Dostupné z <<http://www.cnr.berkeley.edu/biocon/What%20is%20Biological%20Control.htm/>>, online 3. 4. 2010
- Anonym 3:** Seznam registrovaných přípravků a dalších prostředků na ochranu rostlin 2010. Dostupné z <http://www.srs.cz/portaldoc/pripravky_na_ochranu_rostlin/informace_pro_zemedelce/registrace/2B8020E9d01.pdf/>, online 3. 4. 2010
- Bale J.S., van Lenteren J.C., Bigler F.** (2008): Biological Control and Sustainable Food Production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363 : 761-776.
- Burge M.N.** (1988): The Scope of Fungi in Biological Control. In: Burge M.N. (ed.): *Fungi in Biological Control Systems*, Manchester University Press, Manchester, 1-18.
- Dijksterhuis J., Veenhuis M., Harder W., Nordbring-Hertz B.** (1994): Nematophagous fungi: Physiological Aspects and Structure – Function Relationships. In: Rose A.H. and Tempest D.W. (eds.): *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, London, 36 : 111-139.
- Emmert E.A.B., Handelsman J.** (1999): Biocontrol of Plant Disease: a Gram-pozitive Perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 171 : 1-9.
- Flint M.L., Dreistadt S.H., Clark J.K.** (1999): *Natural Enemies Handbook: The Illustrated Guide To Biological Pest Control*, Univerity of California Press, 154.
- Garczynski S., Siegel J.** (2007): Bacteria. In: Kaya H.K., Lacey L.A. (eds.): *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 175-198.
- Goettel M.S., Inglis G.D., Wright S.P.** (2007): Fungi. In: Kaya H.K., Lacey L.A. (eds.): *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 225-282.
- Henn T., Weinzierl R., Koehler P.G.** (1995): Beneficial Insects and Mites. Dostupné z <<http://edis.ifas.ufl.edu/in078>>, online 16. 10. 2009

- Hrabánková M., Landa Z., Bohatá A., Kubíček J.** (2005): Analýza pěstitelského systému šetrného k životnímu prostředí „Integrovaný systém pěstování zemědělských plodin“. ZF JCU, České Budějovice.
- Jansson H.B., Lopez-Llorca L.V.** (2001): Biology of Nematophagous Fungi. In: Mirsa J.K. and Horn B.W. (eds.): *Mycology: Trichomycetes and Other Fungal Groups*, Science Publishers, Inc., Endfield, 145-173.
- Jansson H.B., Lopez-Llorca L.V.** (2004): Control of Nematodes by Fungi. In: Arora D.K. (ed.): *Fungal Biotechnology in Agriculture, Food and Environmental Applications*, Marcel Dekker, New York, 21 : 205-216.
- Kaya H.K., Lacey L.A.** (2007): Introduction to Microbial Control. In: Kaya H.K., Lacey L.A. (eds.): *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 3-7.
- Khan A., Williams K.L., Nevalainen H.K.M.** (2006): Infection of Plant-parasitic Nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. *Biological Control*, 51 : 659-678.
- Lacey L.A., Frutos R., Kaya H.K., Vail P.** (2001): Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. *Biological Control*, 21: 230-248.
- Landa Z.** (1986): Cvičení z ochrany rostlin II. (zemědělská entomologie). VŠZ, Praha, 110-122.
- Landis D.A., Orr D.B.** (1996): Biological control: Approaches and Applications. Dostupné z <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/landis.htm>>, online: 25. 4. 2009
- Lee J. K., Kim D. G., Lee S.B.** (2004): Nutritional Requirements and Mass Production of Nematode-trapping Fungus, *Arthrobotrys oligospora*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 7, 3 : 325-329.
- Leitner L.** (2005): Povrchová kultivace mykoparazitických hub na přirozených substrátech. (Diplomová práce). Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, katedra rostlinné výroby, České Budějovice. 60 s.
- Liu X., Xiang M., Che Y.** (2009): The Living Strategy of Nematophagous Fungi. *Mycoscience*, 50 : 20-25.
- Manion A.M.** (1995): Agriculture, Environment and Biotechnology. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 35 : 31-45.
- Nordbring-Hertz B.** (2004): Morphogenesis in the Nematode-trapping Fungus *Arthrobotrys oligospora* – an Extensive Plasticity of Infection Structures. *Mycologist*, 18, 3 : 125-133.

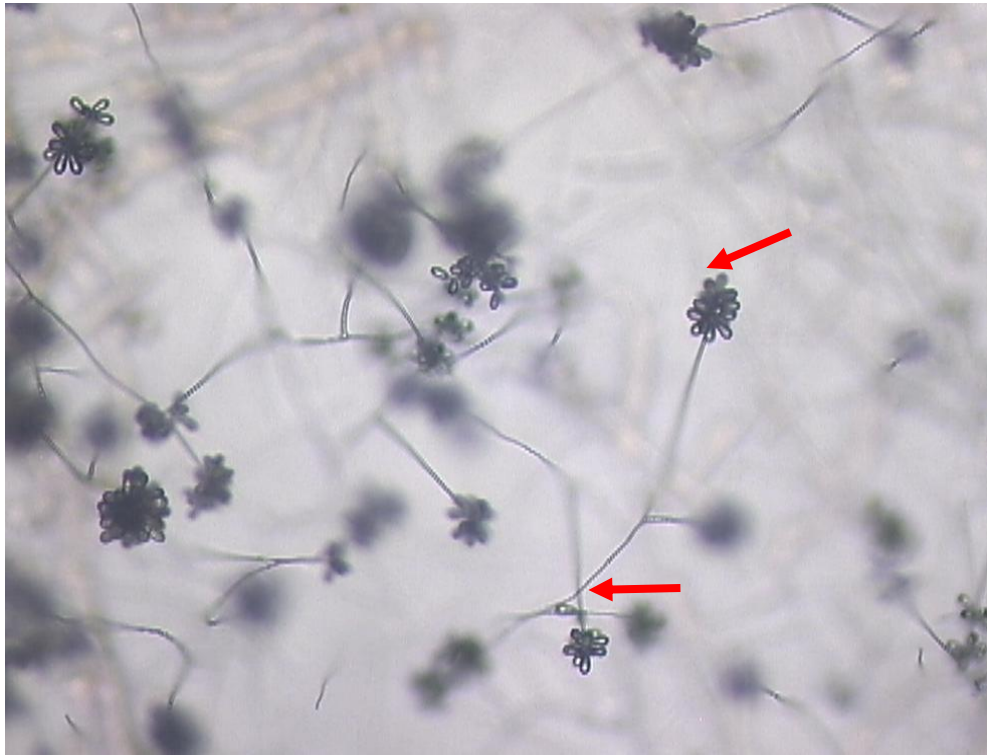
- Nordbring-Hertz B., Jansson H.B., Tunlid A.** (2006): Nematophagous Fungi.
Dostupné z
<<http://mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0000374/current/abstract?hd=All,nematophagous&hd=All,funghi>>, online: 25. 4. 2009
- Orr D.B.** (2009): Biological Control and Integrated Pest Management. In: Peshin R., Dhawan A.K. (eds.): *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*, Springer Science + Business Media, Netherlands, 207-239.
- Siddiqui Z.A., Mahmood I.** (1996): Biological Kontrol of Plant Parasiti Nematodes by Fungi: A Review. *Bioresource Technology*, 58 : 229-239.
- Stirling G.R.** (1988): Prospects for the Use of Fungi in Nematode Control. In: Burge M.N. (ed.): *Fungi in Biological Control Systems*, Manchester University Press, Manchester, 188-210.
- Stirling G.R., Licastro K.A., West L.M., Smith L.J.** (1998a): Development of Commercially Acceptable Formulations of the Nematophagous Fungus *Verticillium chlamydosporium*. *Biological Control*, 11 : 217-233.
- Stirling G.R., Smith L.J., Licastro K.A., Eden L.M.** (1998b): Control of Root-knot Nematode with Formulations of the Nematode-trapping Fungus *Arthrobotrys dactyloides*. *Biological Control*, 11 : 224-230.
- Štaif J.** (1981): Ochrana rostlin I., Živočišní škůdci. VŠZ, Praha. 14-43.
- van Lenteren J.C., Roskam M.M., Timmer R.** (1997): Commercial Mass Production and Pricing of Organisms for Biological Control of Pests in Europe. *Biological control*, 10 : 143-149.
- van Leteren J.C.** (2000): A Greenhouse without Pesticides: Fact or Fatnasy?. *Crop Protection*, 19 : 375-384.
- Vondrášková Š.** (2008): Využití dravého hmyzu v biologické ochraně rostlin.
Dostupné z
<<http://www.agronavigator.cz/UserFiles/File/Vyuit%20dravho%20hmyzu%20v%20biologick%20ochran%20rostlin.pdf>>, online 27. 12. 2009
- Wilson M.J.** (2007): Terrestrial mollusc pests. In: Kaya H.K., Lacey L.A. (eds.): *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 751-768.

7. PŘÍLOHY

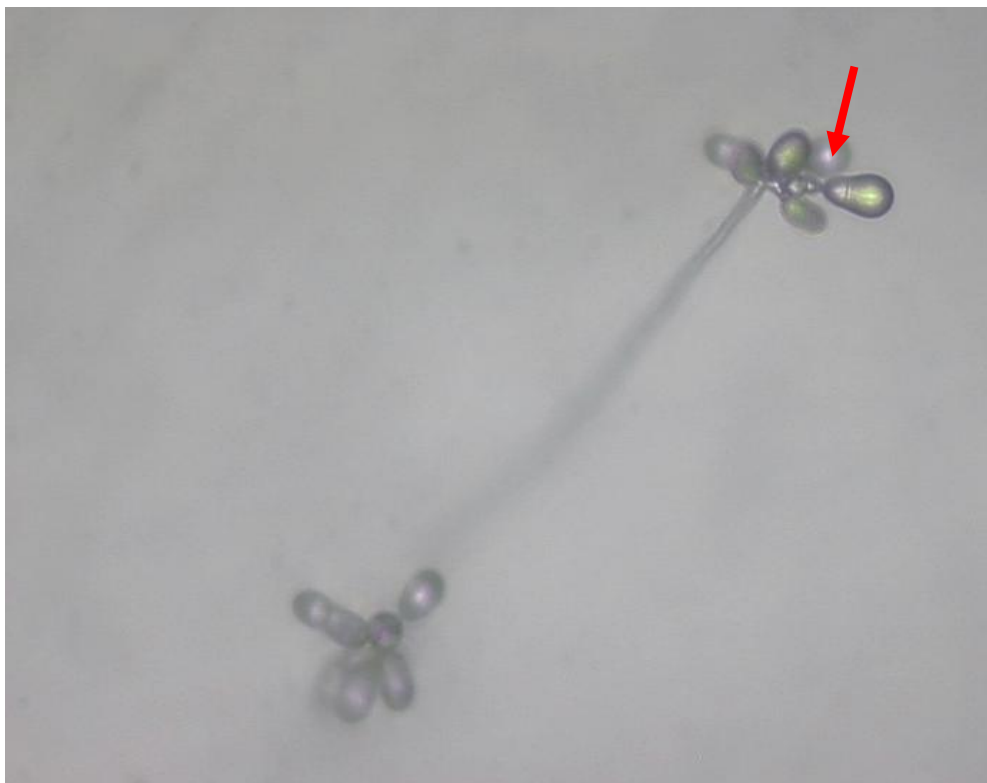
Grafický list č. 1: Mikroskopické fotografie *A. oligospora* kmen F-483



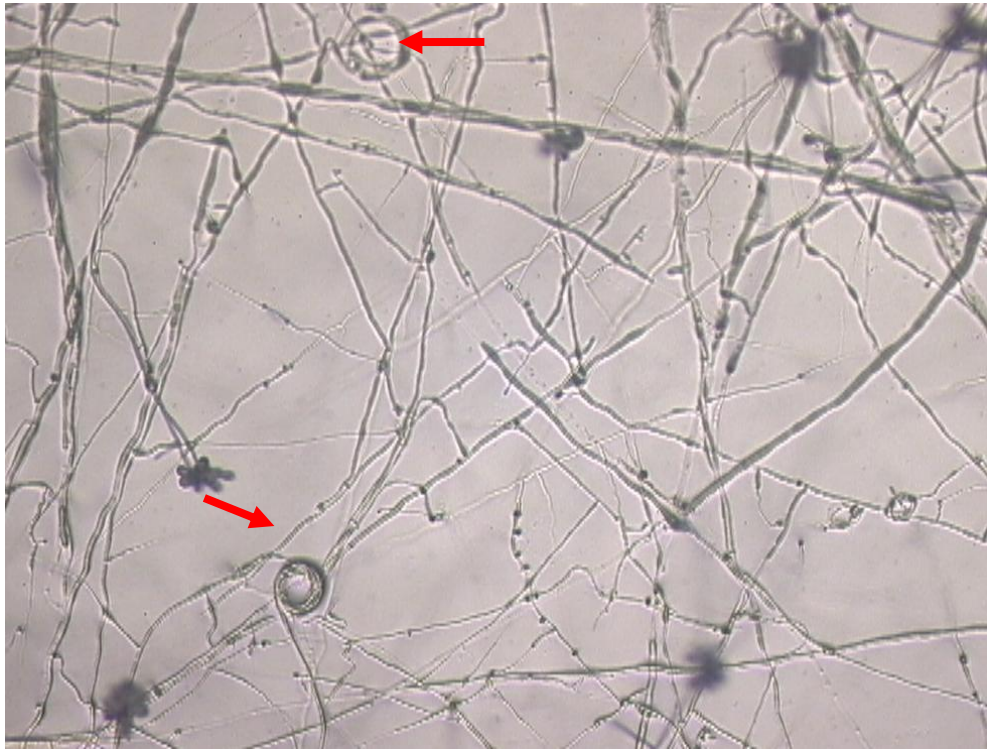
Celkový pohled na mycelium s infekčními strukturami a konidiofory s konidiiemi



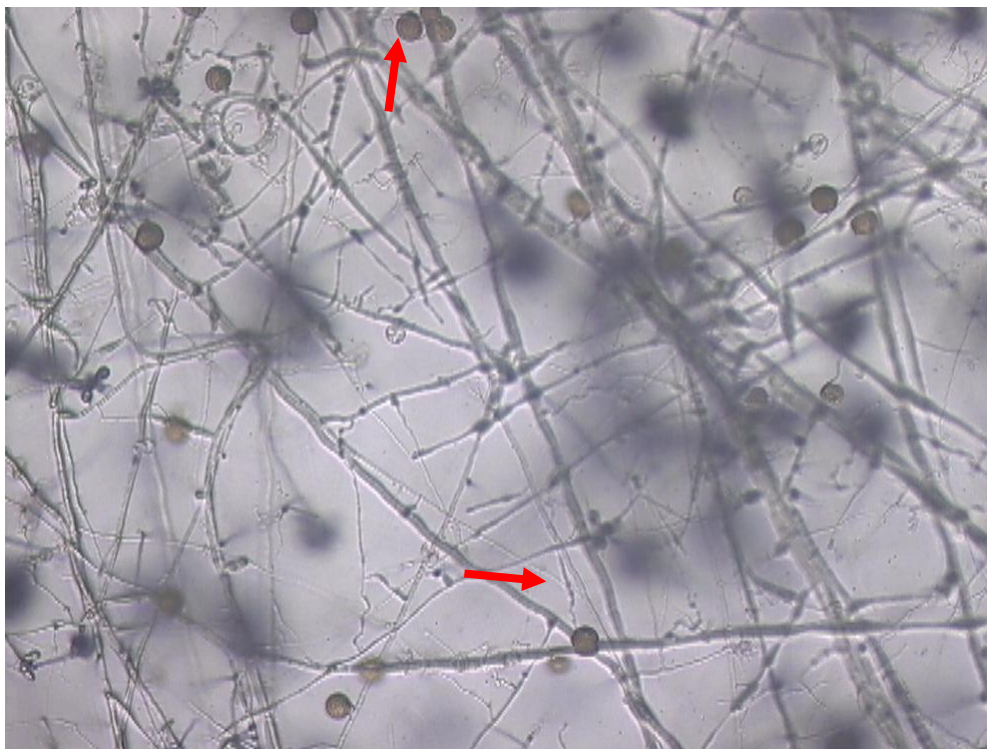
Detailní pohled na konidiofory



Detailní pohled na dvoubuněčné konidie



Detailní pohled na infekční struktury



Detailní pohled na chlamydozoa

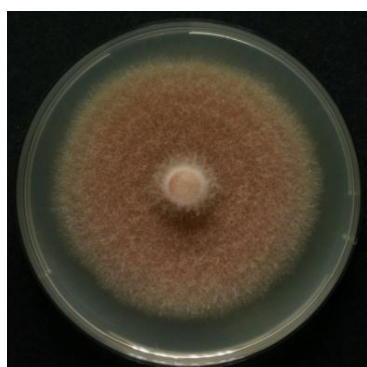
Grafický list č. 2: Růst *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných umělých živných půdách 7. den kultivace



CDA



CMA



V8J



SDA



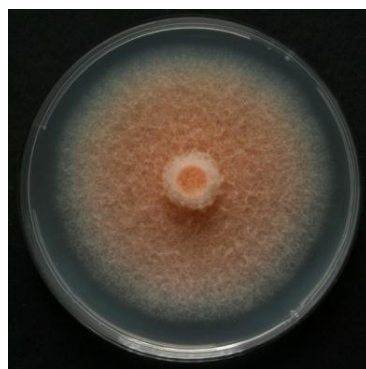
SLA



YEA



TSA



PDA

Grafický list č. 3: Růst *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných umělých živných půdách 14. den kultivace



CDA



CMA



V8J



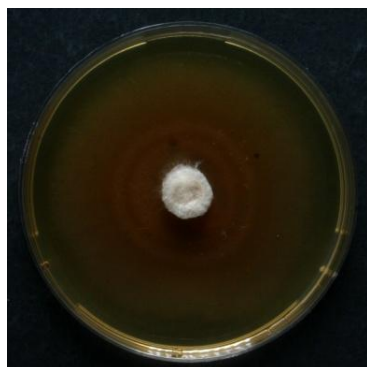
SDA



SLA



YEA

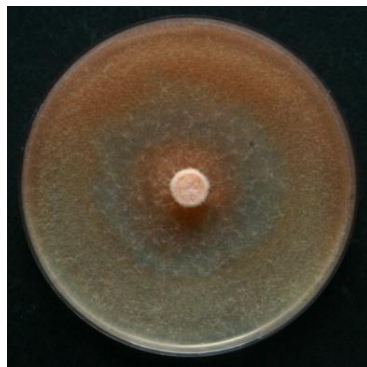


TSA



PDA

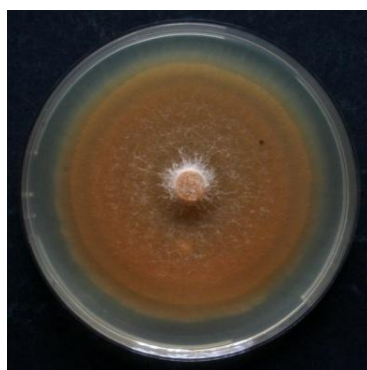
Grafický list č. 4: Růst *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných umělých živných půdách 21. den kultivace



CDA



CMA



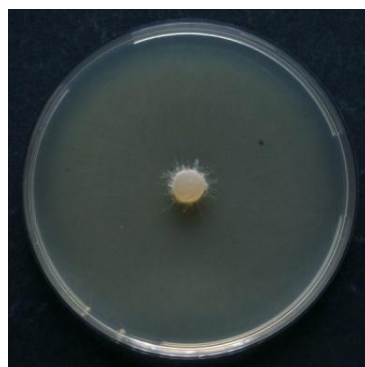
V8J



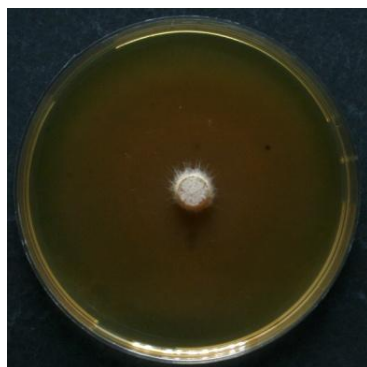
SDA



SLA



YEA

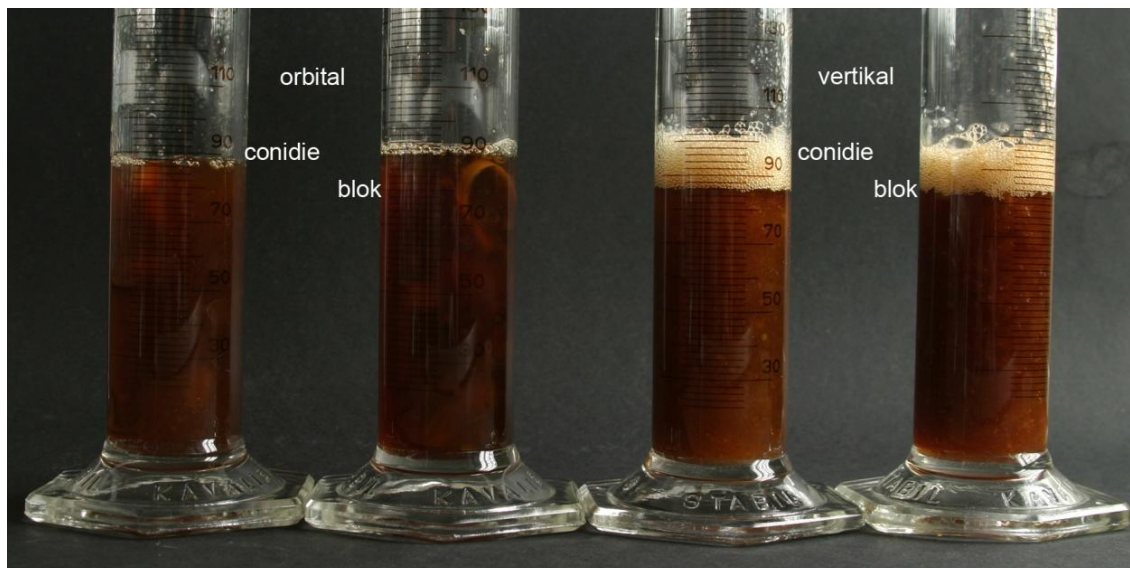


TSA



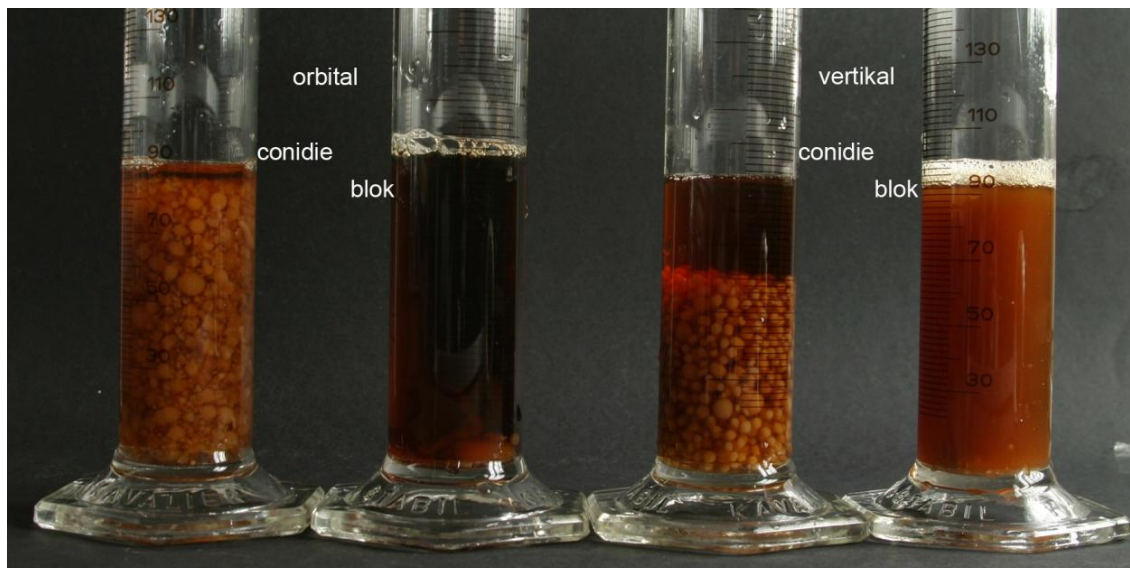
PDA

Grafický list č. 5: Produkce biomasy *A. oligospora* kmen F-483 v tekutém živném médiu TSB 7. den kultivace



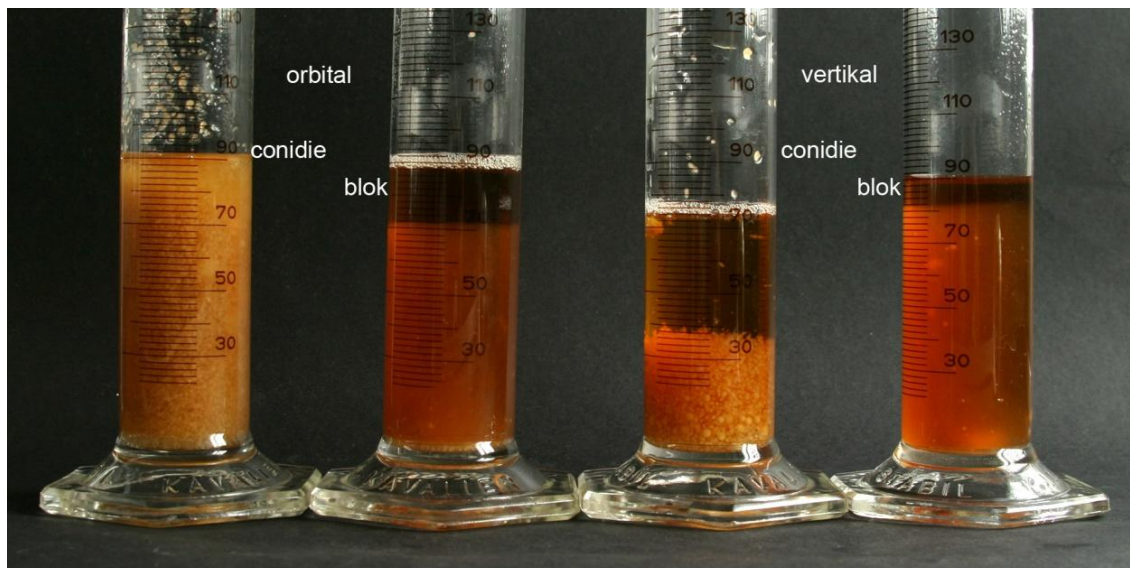
| živné medium | varianta | makroskopický popis |
|--------------|----------|--|
| TSB | OK | <i>prstenec:</i> ano <i>barva:</i> tmavě hnědá, matná <i>útvary:</i> myceliové vločky |
| | OB | <i>prstenec:</i> ano <i>barva:</i> typické TSB, tmavší než OK varianta <i>útvary:</i> myceliové vločky větší velikost a menší množství než OK varianta |
| | VK | <i>prstenec:</i> ne, na stěně mycelium <i>barva:</i> hnědá, světlejší než OK a OB varianta <i>útvary:</i> velké množství vloček |
| | VB | <i>prstenec:</i> ano <i>barva:</i> tmavě hnědá, matná <i>útvary:</i> typicky rozprostřené mycelium |

Grafický list č. 6: Produkce biomasy *A. oligospora* kmen F-483 v tekutém živném médiu SDB 7. den kultivace



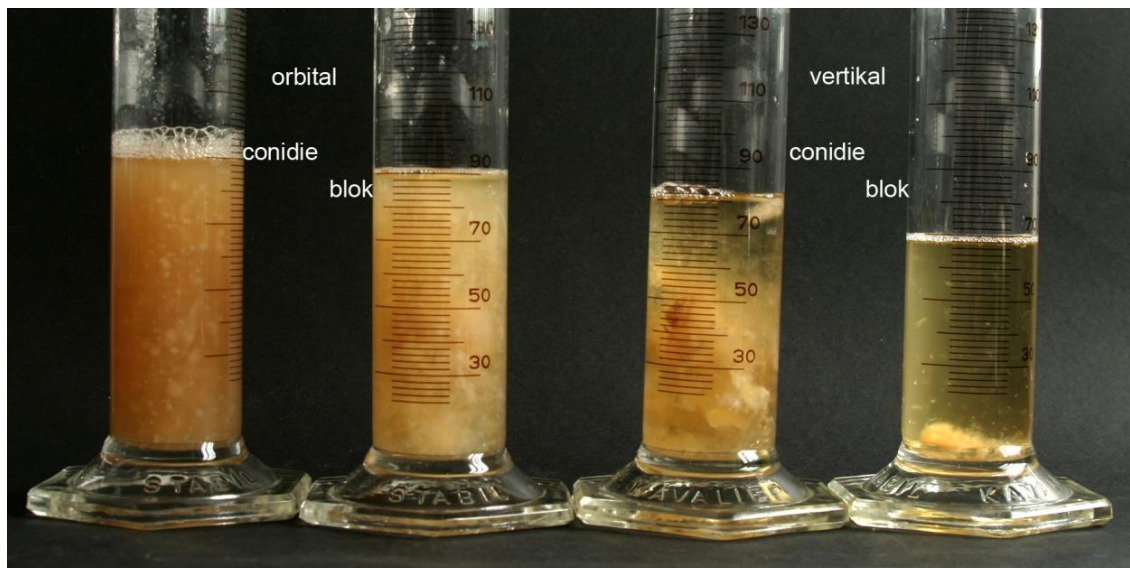
| živné medium | varianta | makroskopický popis |
|--------------|----------|--|
| SDB | OK | <i>prstenec:</i> ano <i>barva:</i> rezavá, světlé SDB <i>útvary:</i> myceliové vločky, myceliové pelety (více) |
| | OB | <i>prstenec:</i> ne <i>barva:</i> vínová, typické SDB <i>útvary:</i> myceliové pelety (do 10 ks), myceliové provazce (asi spadlý prstenec) |
| | VK | <i>prstenec:</i> ano <i>barva:</i> tmavě rezavá <i>útvary:</i> myceliové kulovité a uniformní pelety, bez vloček |
| | VB | <i>prstenec:</i> ne <i>barva:</i> oranžovohnědá, neprůhledná <i>útvary:</i> myceliové vločky (do 10 ks), typicky rozprostřené mycelium |

Grafický list č. 7: Produkce biomasy *A. oligospora* kmen F-483 v tekutém živném médiu YMB 7. den kultivace



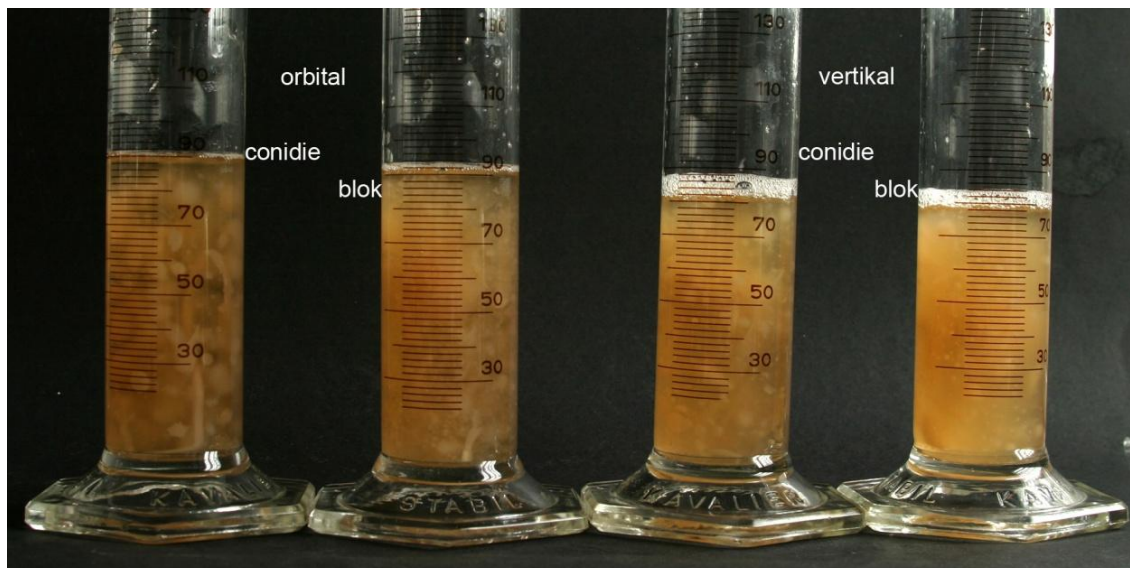
| živné medium | varianta | makroskopický popis |
|--------------|----------|---|
| YMB | OK | <i>prstenec:</i> ano <i>barva:</i> žlutohnědá, matná (dáno množstvím pelet) <i>útvary:</i> velké množství malých myceliových pelet |
| | OB | <i>prstenec:</i> ne <i>barva:</i> tmavě hnědooranžová, matná <i>útvary:</i> myceliové pelety (do 30 ks), typicky rozprostřené mycelium |
| | VK | <i>prstenec:</i> ano (široký) <i>barva:</i> světle hnědooranžová, průhledná <i>útvary:</i> malé myceliové pelety, o ½ méně než OK varianta |
| | VB | <i>prstenec:</i> ne <i>barva:</i> tmavě hnědooranžová, (tmavší než OB varianta) <i>útvary:</i> typicky rozprostřené mycelium bez myceliových pelet a vloček |

Grafický list č. 8: Produkce biomasy *A. oligospora* kmen F-483 v tekutém živném médiu PDB 7. den kultivace



| živné medium | varianta | makroskopický popis |
|--------------|----------|--|
| PDB | OK | <i>prstenec:</i> ne <i>barva:</i> světle hnědooranžová, neprůhledná <i>útvary:</i> myceliové pelety, malé myceliové vločky |
| | OB | <i>prstenec:</i> ne <i>barva:</i> světle žlutá, neprůhledná <i>útvary:</i> paprscité myceliové vločky |
| | VK | <i>prstenec:</i> ano (široký) <i>barva:</i> typické PDB, průhledné <i>útvary:</i> myceliové pelety (do 10 ks) |
| | VB | <i>prstenec:</i> ano (široký) <i>barva:</i> průhledná, slabý zákal <i>útvary:</i> myceliové pelety (do 30 ks) |

Grafický list č. 9: Produkce biomasy *A. oligospora* kmen F-483 v tekutém živném médiu CMB 7. den kultivace



| živné medium | varianta | makroskopický popis |
|--------------|----------|--|
| CMB | OK | <i>prstenec:</i> ne <i>barva:</i> světle hnědooranžová, matná <i>útvary:</i> velké mycelivé vločky, myceliové pelety |
| | OB | <i>prstenec:</i> ne <i>barva:</i> světle hnědooranžová <i>útvary:</i> myceliové vločky |
| | VK | <i>prstenec:</i> ne, na stěně mycelium <i>barva:</i> světle hnědooranžová <i>útvary:</i> myceliové pelety, myceliové vločky (málo) |
| | VB | <i>prstenec:</i> ne <i>barva:</i> světle hnědooranžová <i>útvary:</i> myceliové pelety, myceliové vločky (málo) |

Grafický list č. 10: Růst *A. oligospora* kmen F-483 na vybraných přirozených substrátech umístěných v Petriho miskách s 2 % agarem po 13 dnech kultivace



rýže



nahý oves



pluchatý oves



kroupy



řepka



ovesné vločky

Grafický list č. 11: Detailní foto růstu *A. oligospora* kmen F-483 na 1 partikuli přirozeného substrátu (umístění v Petriho miskách s 2 % agarem, kultivace po dobu 13 dní)



rýže



nahý oves



pluchatý oves



kroupy



řepka



ovesné vločky

Grafický list č. 12: Příprava alginátových pelet s inkorporovanou *A. oligospora* kmen F-483

Vytvrzování alginátových pelet v roztoku CaCl_2



alginátové pelety z krup, rýže, kukuřice, ovesných vloček, otrub

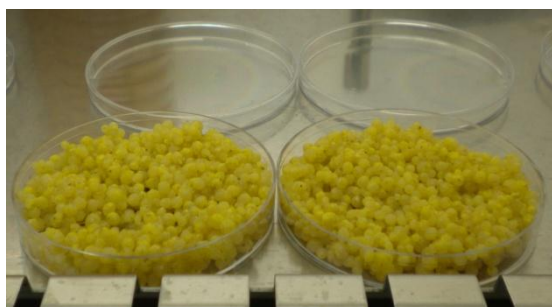
Sušení alginátových pelet



alginátové pelety z krup



alginátové pelety z rýže



alginátové pelety z kukuřice

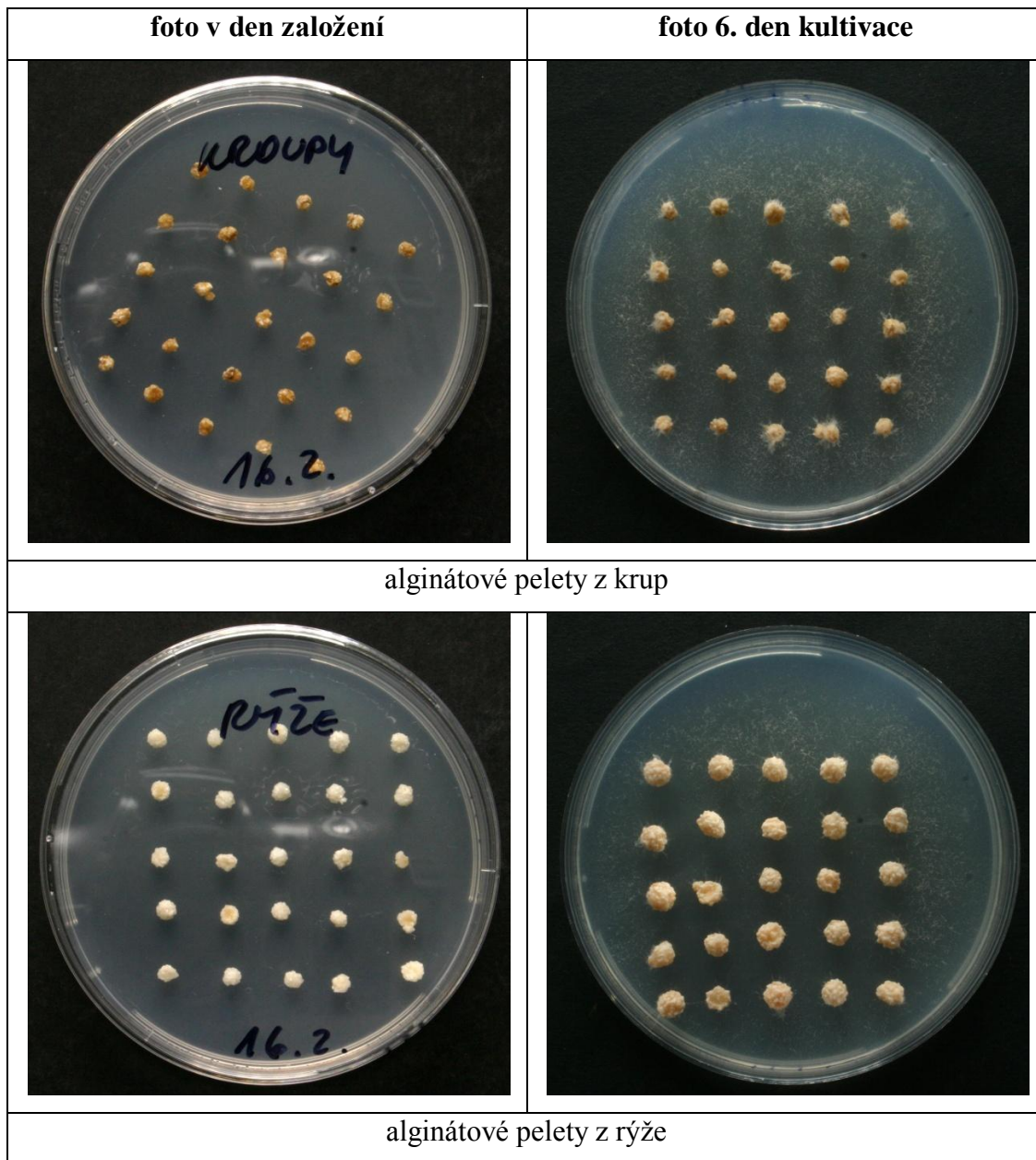


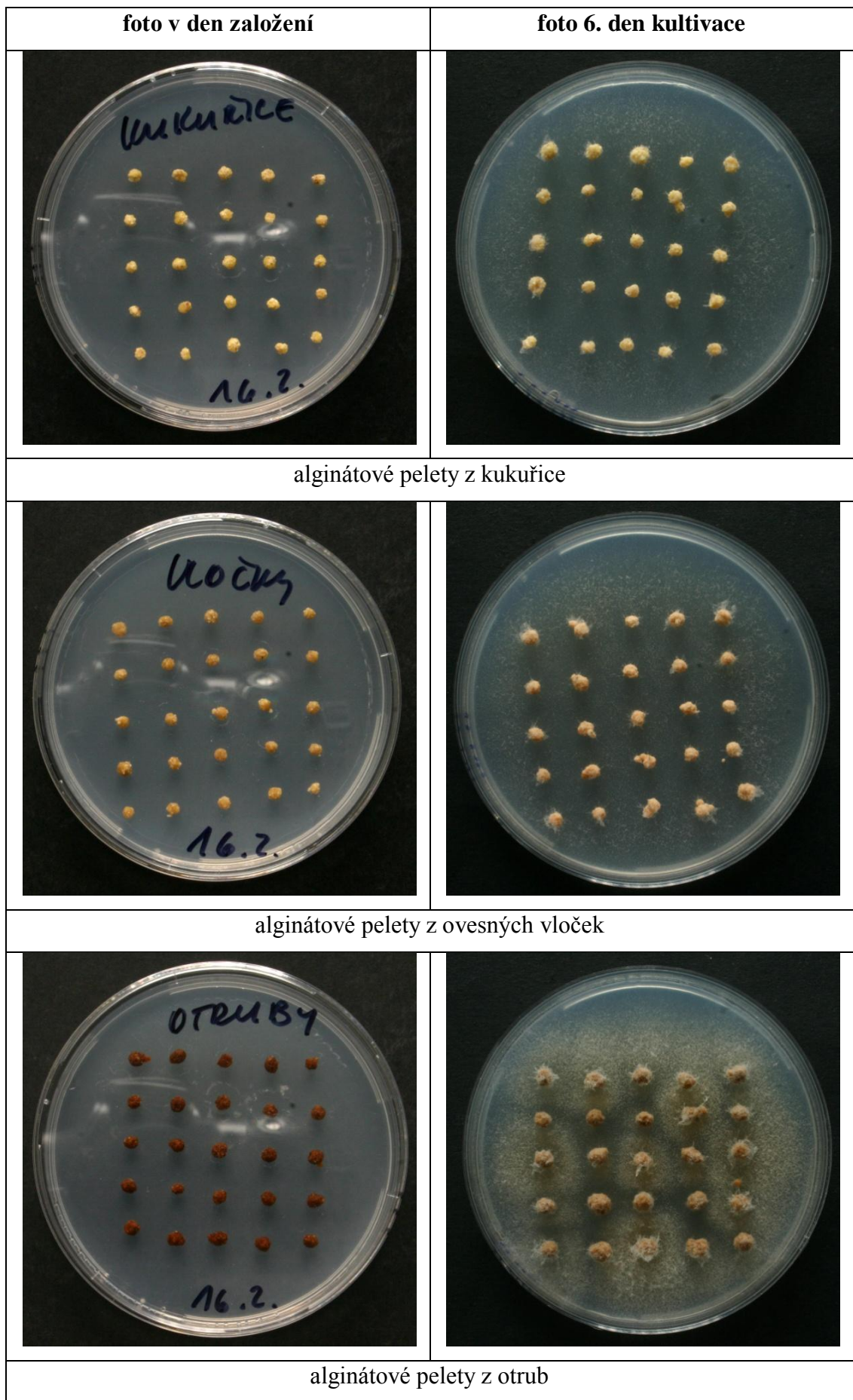
alginátové pelety z ovesných vloček



alginátové pelety z otrub

Grafický list č. 13: Obrůstání alginátových pelet s inkorporovanou *A. oligospora* kmen F-483 po 6 dnech kultivace





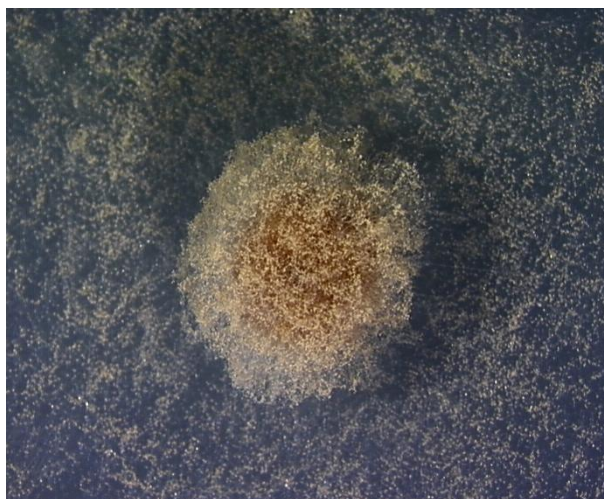
Grafický list č. 14: Detailní pohled na obrůstání alginátových pelet z otrub s inkorporovanou *A. oligospora* kmen F-483



Alginátová peleta po 3 dnech kultivace – index obrůstání č. 4



Alginátová peleta po 5 dnech kultivace – index obrůstání č. 6



Alginátová peleta po 7 dnech kultivace – index obrůstání č. 6

