

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Komplexní charakteristika hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita*

Ing. Jiří Nermut²

2012

Školitel: RNDr. Zdeněk Mráček, DrSc.
Biologické centrum AV ČR v. v. i., Entomologický ústav
Braníšovská 31, 37005 České Budějovice

Rád bych poděkoval vedoucímu disertační práce RNDr. Zdeňku Mráčkovi, DrSc. za pomoc a rady, které mi poskytoval v průběhu doktorandského studia. Dále bych rád poděkoval RNDr. Vladimírovi Půžovi, Ph.D. a Lence Kropáčkové, za pomoc a cenné rady, které mi poskytli při řešení této práce.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

Ing. Jiří Nermuť

V Českých Budějovicích dne 1. 8. 2012

Prohlášení spoluautorů o významném podílu Ing. Jiřího Nermutě na společně publikovaných pracích.

RNDr. Zdeněk Mráček, DrSc.:

RNDr. Vladimír Půža, Ph.D.:

V Českých Budějovicích dne 1. 8. 2012

Obsah

1. Úvod.....	1
2. <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i>	2
2.1. Historie.....	2
2.2. Systematické zařazení.....	2
2.3. Morfologická a molekulárně biologická charakteristika.....	2
2.4. Rozšíření a monitoring výskytu.....	6
2.5. Ekologie.....	7
2.6. Asociace s bakteriemi.....	13
2.7. Masová produkce a skladování.....	14
2.8. Ochrana proti škodlivým plžům.....	15
2.9. Metody aplikace <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i> a jejich účinnost.....	16
2.10. Využití <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i> v integrované ochraně.....	17
3. Cíle práce.....	19
4. Experimentální část a výsledky.....	20
4.1. Reakce <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i> (Nematoda: Rhabditidae) a <i>Steinernema feltiae</i> (Nematoda: Steinernematidae) na různé atraktanty.....	20
4.2. Vliv různých živných substrátů na vývoj a kvalitu <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i> (Nematoda: Rhabditidae).....	20
4.3. Vliv vnitrodruhové konkurence na vývoj a kvalitu <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i> (Rhabditida: Rhabditidae).....	21
4.4. Persistence <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i> (Rhabditida: Rhabditidae) v různých substrátech.....	22
5. Závěr.....	23
6. Summary.....	25
7. Literatura.....	26
8. Přehled publikací autora disertační práce.....	37
9. Přílohy.....	39

1. Úvod

Mezi hlísty se nachází celá řada parazitů, parazitoidů a patogenů obratlovců i bezobratlých, ale i veliké množství volně žijících druhů, které se živí bakteriemi, houbami, nebo jsou dokonce dravé a napadají ostatní hlísty a jiné organismy. Tři druhy z čeledí Steinernematidae (*Steinernema feltiae*), Heterorhabditidae (*Heterorhabditis bacteriophora*) a Rhabditidae (*Phasmarhabditis hermaphrodita*) jsou v ČR registrovány jako bioagens k ochraně rostlin (přípravky Larvanem, Entonem a Nemaslug).

P. hermaphrodita, kterému se věnuje tato práce, je parazitem mnoha druhů měkkýšů z třídy plži (Gastropoda). Napadá především zástupce čeledí slimákovití (Limacidae), plzákovití (Arionidae), slimáčkovití (Agriolimacidae), plžicovití (Milacidae) a Vaginulidae, kteří jsou závažnými škůdci ovoce, zeleniny a okrasných rostlin pěstovaných na polích, v zahradách i ve sklenících. Regulace populací těchto škůdců byla dlouhou dobu založena jen na chemických metodách využívajících požerové návnady v podobě granulí, které obsahují metaldehyd, methiocarb, nebo fosfát železa. Všechny tyto látky jsou však silně jedovaté pro vyšší živočichy a velké množství necílových, mnohdy užitečných, organismů. A to je právě jeden z argumentů pro snahu využívat i proti škodlivým plžům metod biologické ochrany. *P. hermaphrodita* je pak jedním z možných řešení.

Předložená disertační práce se snaží představit *P. hermaphrodita* v celé šíři všech dosud známých poznatků o jeho ekologii i způsobech praktického využití a zároveň přináší některé nové informace o životě tohoto parazita. Především se práce zabývá orientací *P. hermaphrodita* v prostředí, reakcí na různé živné substráty, vnitrodruhovou konkurencí a perzistencí hlístice v různých prostředích.

2. Phasmarhabditis hermaphrodita

2.1. Historie

Druh *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Schneider 1859) Andrassy 1983 byl poprvé objeven v roce 1859 v těle rozkládajícího se terestrického plže a byl nazván *Pelodytes hermaphroditus* (Schneider 1859). Tentýž druh izoloval Maupas (1900) ze střeva plzáka černého (*Arion ater*) nalezeného v Normandii a pojmenoval ho jako *Rhabditis caussaneli* (Maupas 1900). V roce 1987 začalo ve Velké Británii v Long Ashton Research Station hledání vhodného bioagens pro kontrolu škodlivých slimáků. O rok později pak byly z plášťové dutiny nakaženého slimáčka síťkovaného (*Deroceras reticulatum*) izolovány *P. hermaphrodita* a také *P. neopapillosa* (Mengert in Osche 1952) Andrassy 1983. *Phasmarhabditis neopapillosa*, ač parazituje v měkkýchích naprosto shodným způsobem jako *P. hermaphrodita*, však zůstal stranou zájmu, který vyústil v dlouhodobý výzkum, jehož výsledkem byl nejen patent chránící technologii masového množení, ale především uvedení přípravku Nemaslug® na světový trh. V současné době je přípravek produkován pouze britskou firmou Becker Underwood (dříve MicroBio Ltd) a výzkum parazitických hlístic měkkýšů, nejen *P. hermaphrodita*, pokračuje dál (Rae *et al.* 2007).

2.2. Systematické zařazení

Rod *Phasmarhabditis* (Andrassy 1976) náleží do řádu Rhabditida, nadčeledi Rhabditoidea, čeledi Rhabditidae (Örley 1880), podčeledi Peloderinae (Andrassy 1976). Podle Andrassyho (Andrassy 1984) je známo celkem pět druhů rodu *Phasmarhabditis*. Jsou to *P. nidrosiensis* (Allgén 1933) Andrassy 1983, *P. papillosa* (Schneider 1866) Andrassy 1976, *P. valida* (Sudhaus 1974) Andrassy 1983, *P. neopapillosa* (Mengert in Osche 1952) Andrassy 1983 a *P. hermaphrodita* (Schneider 1859) Andrassy 1983.

2.3. Morfologická a molekulárně biologická charakteristika

2.3.1. Rod Phasmarhabditis

Tento rod zahrnuje druhy velké 0,9 až 3,4 mm. Všechna vývojová stádia mají hadovité tělo a hladkou nebo jemně kroužkovanou a podélně rýhovanou kutikulu. Hlavová část je krátká, s oddělenými pysky a drobnými labiálními papilami. Amfidy jsou malé v laterální pozici. Stoma bývá 1,2 až 2 krát delší než průměr hlavy. Cheilostom

kutikularizovaný, promesostom prismatický. Metastom isoglotoidní, každé rozšíření nese tři nepatrné zoubky. Jícnový (nervový) prstenec je poměrně vysoko. Jícen proximálně zduřelý. Samičí gonády jsou párové a vulva se nachází ve středu těla. Spikuly jsou oddělené a mírně obloukovitě prohnuté. Bursa je peloderánní, na ventrální straně, středně vyvinutá, otevřená a s devíti páry genitálních papil. Ocasní část samic kuželovitá, nebo kulovitá, klasovitá, ostře zašpičatělá. Ocas samců je kratší a kuželovitý. Phasmidy jsou velké, papiliformní a vyčnívající. Larvy bývají stočené. (Andrássy 1983)

2.3.2. Phasmarhabditis hermaphrodita

Samice

Tělo je téměř rovné, robustní, postupně se zužující k zaoblenému hlavovému konci. Ocas je kónický, přibližně tři anální šířky dlouhý a zužující se do filiformního konce. Přibližně v polovině ocasu jsou na každé straně viditelné phasmidy. Ocas asi tři anální šířky dlouhý a zužující se do filiformního konce. V polovině délky ocasu na obou stranách nápadné phasmidy. Anus je krátký a zahnutý, rektum trochu nafouklé. Kutikula je podélně i příčně rýhovaná, vytváří šachovnicový vzor. Laterální pole mají obvykle 4 linie. Vulva je ventrální, přibližně v polovině délky těla. Ovaria jsou párová, ohnutá zpět a dosahující téměř k vulvě. Oblast pysků je asi 18 µm široká. Pysky jsou uspořádány do tří párů. Každý pysk nese nápadnou vnitřní a méně nápadnou vnější labiální papilu. Amphidy jsou viditelné na vnější straně každého laterálního pysku. Stoma je v příčném průřezu trojúhelníkovité, přibližně stejné délky jako šířka pysků. Promesorhabdiony jsou patrné, 10 - 12 µm dlouhé. Jícnový prstenec obvykle dosahuje až k přednímu konci promesorhabdionů. Metarhabdiony dobře vyvinuté, okrouhlé, každý se třemi nenápadnými hrbolky. Jícen vyvinutý cylindrický, uprostřed mírně zduřelý. Isthmus s nervovým prstencem dobře patrný. Výrazný terminální bulbus se zřetelnou valvulární strukturou typickou pro Rhabditida. Exkreční porus se nachází mezi nervovým prstencem a terminálním bulbem. Deiridy patrné v laterálním poli, obvykle naproti exkrečnímu poru.

Samci

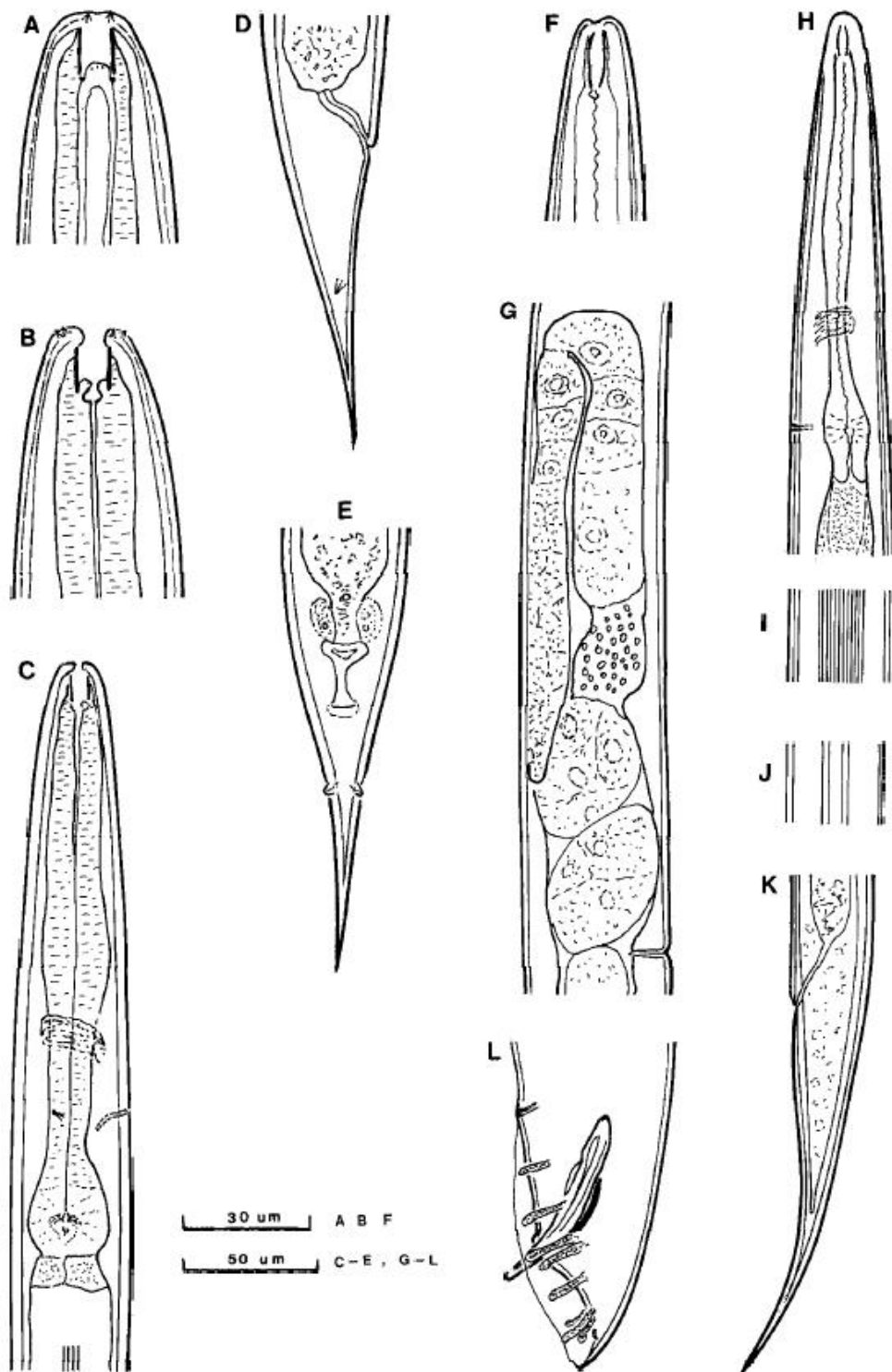
Samci nejsou u tohoto druhu popsáni.

Invazní larvy

Invazní larvy jsou uzavřené v kutikule předchozího instaru. Střevní obsah mají tmavý. Tělo je kratší a tenčí než u dospělců. Pysky jsou asi 11 μm široké. Pohlavní primordia jsou patrná jako světlé skvrny přibližně uprostřed těla. Ocasní část je prodloužená, kónická s filiformním koncem. Na kutikule jsou přítomné jemné podélné i příčné rýhy. Na bocích je 10 až 12 laterálních linií, které se vyskytují přibližně na třetině délky těla v jeho střední části. Ústní otvor je trojúhelníkovitý. Vnitřní kutikula má příčné pruhování. Přítomny jsou pouze 4 laterální linie. Pysků je šest, laterální mají patrné amphidy. Ústní dutina se zdá delší než u dospělců. Promesorhabdiony jsou 13 - 15 μm dlouhé, na konci zahnuté dovnitř. Metarhabdiony jsou redukovány. Telostom je isoglotoidní, jícen bez zřetelné mediální zduřeniny. Exkreční porus je obvykle naproti bazálnímu bulbu. (Hooper *et al.* 1999)

	Nemaslug samice	Nemaslug larva	B1 samice	B1 larva
L	2100 – 2464 2323 \pm 75,9	778 – 978 898 \pm 60,4	2121 – 2626 2383 \pm 128,3	808 – 960 882 \pm 43,4
a	16,1 – 37,7 19,4 \pm 4,5	26,3 – 47,0 33,1 \pm 5,0	14,13 – 20,0 16,4 \pm 1,5	27,3 – 45,0 34,3 \pm 5,7
b	8,7 – 10,4 9,7 \pm 0,5	4,9 – 6,3 5,6 \pm 0,4	8,4 – 10,4 9,16 \pm 0,6	4,7 – 5,7 5,1 \pm 0,3
c	14,5 – 17,2 16,2 \pm 0,9	6,6 – 12,1 8,7 \pm 1,4	12,9 – 21,2 16,7 \pm 2,2	8,0 – 11,6 9,0 \pm 0,8
V	45,9 – 55,8 51,9 \pm 2,1	-	46,2 – 57,1 51,4 \pm 3,0	-
Šířka těla	61 – 141 124 \pm 17,3	20 – 30 28 \pm 3,1	121 – 162 146 \pm 10,6	20 – 30 26 \pm 3,9
Délka jícnu	222 – 263 241 \pm 11,0	152 – 168 159 \pm 4,7	242 – 283 261 \pm 10,2	156 – 180 172 \pm 6,5
Délka ocasu	133 – 156 144 \pm 8,1	78 – 125 104 \pm 12,5	117 – 168 144 \pm 14,7	78 – 106 98 \pm 6,9
Vulva	1131 – 1273 1204 \pm 33,7	-	1131 – 1273 1221 \pm 41,2	-
Anální šířka	51 – 78 59 \pm 6,8	16 – 23 20 \pm 2,5	43 – 67 57 \pm 6,4	12 – 18 15 \pm 1,5

Tabulka 1: Morfometrie *Phasmarhabditis hermaphrodita* (všechny rozměry v μm , n = 20): L - celková délka těla, a - celková délka těla / šířka těla, b - celková délka těla / délka jícnu, c - celková délka těla / délka ocasu, V - vzdálenost od hlavy k vulvě v poměru k celkové délce těla v %; Nemaslug - komerční kmen, B1 - kmen z Benešova u Prahy.



Obrázek 1: *Phasmarhabditis hermaphrodita*: Samice. A: stoma a dorsální metarhabdion, B: stoma a subventrální metarhabdion, C: jícen, laterální rovina; D: ocas, laterální rovina; E: ocas ventrální rovina; G: přední gonáda mladé samice. Invazní larva. F: stoma; H: jícen; I: laterální linie ve středu těla na vnější kutikule; J: laterální linie na vnitřní kutikule; K: ocas, laterální rovina. - *P. neopapillosa*: L: ocas samce, laterální rovina. (Hooper *et al.* 1999)

2.3.3. Molekulárně biologická charakteristika

Pro běžnou druhovou determinaci (Stock 2009) a fylogenetické studie (Ross *et al.* 2010a) se využívá především chromozomální DNA (ITS respektive 18S rRNA), nebo mitochondriální DNA (COI), kterou je možné použít k rozlišení jednotlivých populací (Nermuť *et al.* 2010). Kromě metod založených na izolaci DNA a amplifikaci specifických úseků lze využít i gelovou elektroforézu proteinů, která nám může pomoci s rozlišením morfologicky identických druhů, jako jsou *Phasmarhabdits hermaphrodita* a *P. neopapillosa* (Hooper *et al.* 1999). Veškeré dostupné sekvence pro *P. hermaphrodita* je možné najít on-line v genové bance (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.4. Rozšíření a monitoring výskytu

Zástupci rodu *Phasmarhabdits* jsou suchozemské druhy žijící v půdním prostředí v Evropě, Asii, Africe a v Austrálii. Larvy některých druhů parazitují v měkkýších (Andrássy 1983). *P. hermaphrodita* podle dosavadních poznatků preferuje především vlhčí lokality s půdou, která má vysoký obsah organických látek a případně vrstvu částečně rozložené organické hmoty na povrchu (MacMillan *et al.* 2009, Nermuť *et al.* 2012a).

P. hermaphrodita je v Evropě široce rozšířený druh (Rae *et al.* 2007). V Evropě byl nalezen například ve Velké Británii (Wilson *et al.* 1993a), Francii (Maupas 1900), Německu (Mengert 1953) a Norsku (MacMillan *et al.* 2009). Nálezy jsou však hlášeny i ze zemí jako jsou Írán (Karimi *et al.* 2003), Egypt (Saleh MME, ústní sdělení v Rae *et al.* 2007), Chile (France & Gerdin 2000) nebo Nový Zéland (Wilson *et al.* 2012). V USA byla izolována hlístice považovaná za rod *Phasmarhabdits* (Zaborski 2001), ale současné studie ukazují, že *P. hermaphrodita* se v USA nevyskytuje (Ross *et al.* 2010b). Podobný průzkum výskytu se stejným, negativním, závěrem byl proveden i v Austrálii (Charwat & Davies 1999).

V České republice byl tento hlíst pravděpodobně poprvé izolován z blíže neurčeného mrtvého slimáka nalezeného v Chelčicích v jižních Čechách. Bohužel kultura byla ztracena, a tak není zcela jisté, zda se o *P. hermaphrodita* skutečně jednalo. Nicméně v roce 2010 byl v rybízovně nedaleko Chelčic tento hlíst izolován a jednoznačně určen. Další české izoláty pochází například z Českých Budějovic, Chrudimi a z Benešova u

Prahy, kde došlo k poměrně vzácnému nálezu napadeného hostitele, ze kterého se uvolňovaly nové invazní larvy a dospělci.

Monitoring výskytu je vzhledem k pravděpodobně nízkým abundancím poněkud problematický, a tak využití Baermanových nálevek, které se běžně používají k izolaci hlístů, nemá valného úspěchu. Velmi dobrou, i když dosti pracnou metodou je tak sběr slimáků v přírodě nebo v pastech (Wilson *et al.* 1994a), jejich následná karanténa a pitva, kterou se zjišťují všichni přítomní zástupci třídy Nematoda, kteří v těle měkkýše žijí. Alternativou je námi vyvinutá laboratorní metoda, která je jakousi obdobou Galleriových pastí používaných k izolacím entomopatogenních hlístic (Nermut 2012).

Kromě zmíněných postupů je také možné využít molekulárně biologických metod. Ty nám sice neumožňují získat živé jedince, ale například pomocí real time qPCR a specifických primerů je možné vyčíslit počet hlístic určitého druhu (včetně *Phasmarhabditis hermaphrodita*) ve vzorku půdy, z něhož byla extrahována DNA (MacMillan *et al.* 2006). Podobně je možné stanovit i to, zda *P. hermaphrodita* nebo jiná hlístice byly v nedávné době součástí potravy určitého predátora např. roztoče či chvostoskoka (Read *et al.* 2006).

2.5. Ekologie

2.5.1. Životní cyklus

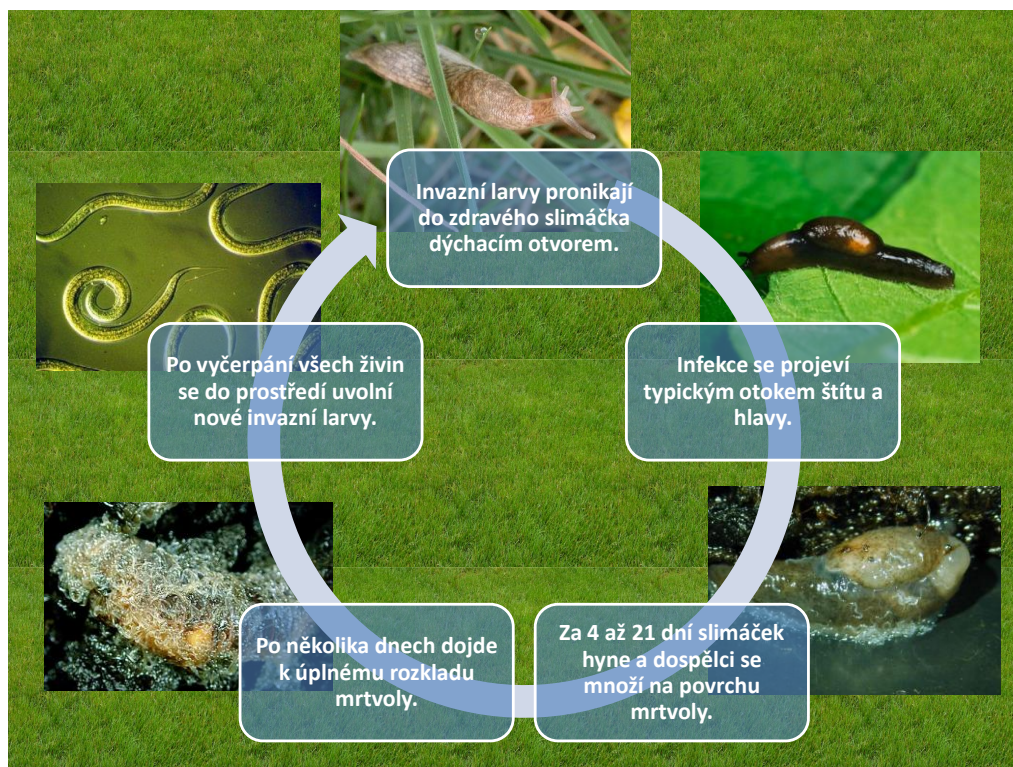
P. hermaphrodita má tři životní cykly nebo strategie (Rae *et al.* 2006, Mengert 1953). Jednotlivé životní cykly mezi sebou nemají jasné hranice ani návaznost a mohou se vzájemně prolínat podle momentální situace, která v prostředí nastává.

První, nejznámější, je parazitický cyklus, kterého se s úspěchem využívá v ochraně rostlin před škodícími plži. V tomto případě larvy třetího instaru žijí v půdě, kde se aktivně pohybují a vyhledávají vhodného hostitele. Pokud takového najdou, pronikají do jeho těla, a to zpravidla dýchacím otvorem. Následně se dostávají do plášťové dutiny, kde dojde k uvolnění "symbiotických" bakterií a vzniku septikémie. Důsledkem toho je výrazná změna chování napadeného plže, který přestává přijímat potravu, vyhledává vhodný úkryt, obvykle hlouběji v půdě a v tomto úkrytu pak hyne. V půdě je mrtvola vystavena menšímu tlaku mrchožroutů než na povrchu (Pechová & Foltán 2008) a zároveň takové prostředí poskytuje lepší podmínky pro přežití a šíření nových larev. Ještě před úhynem však může docházet k hromadění tekutin v těle, což má za následek nápadný otok především v oblasti hlavy a štítu. Někdy může docházet i k

prasknutí. Hlístí se pak uvnitř i na povrchu uhynulého hostitele vyvíjí v hermafroditní dospělce a množí se až do doby, než dojde k úplnému vyčerpání substrátu. Pak vzniká nová generace volně žijících larev třetího instaru a cyklus se může opakovat (Wilson *et al.* 1993a).

Jak již bylo předesláno výše, není parazitismus jediná strategie, kterou *Phasmarhabditis hermaphrodita* ke svému přežití využívá. *Phasmarhabditis hermaphrodita* je fakultativní parazit, který může žít saprofágně na nejrůznější odumřelé organické hmotě (Rae *et al.* 2007). Tou může být například tlející bukové nebo dubové listí (MacMillan *et al.* 2009), zahradní kompost, různé savčí orgány, mrtvý hmyz (Nermuť *et al.* 2012a) nebo mrtvá a homogenizovaná těla plžů a jejich výkaly (Rae *et al.* 2006; Nermuť *et al.* 2012a). Životní cyklus v těchto podmínkách pak probíhá naprosto identicky s parazitickým cyklem s tím rozdílem, že zde jako substrát slouží již mrtvá organická hmota. Avšak určité rozdíly v závislosti na zdroji potravy je možné pozorovat v rychlosti rozvoje populace, produkci potomstva a velikosti hlístů a do určité míry i v energetických zásobách (Hooper *et al.* 1999, Rae *et al.* 2006, Nermuť *et al.* 2012a).

Třetí nejméně prozkoumaný životní cyklus je nekromenický (Maupas 1900, Mengert 1953). V tomto případě larvy infikují hostitele, ale z nějakého důvodu (např.: imunitní systém, nevhodný symbiont ap.) nejsou schopné vyvolat septikémii a začít se množit. Proto setrvávají ve střevě nebo plášťové dutině v neaktivním stavu a čekají na vhodnou příležitost, která povede k oslabení imunitního systému nebo smrti hostitele. V tu chvíli začnou růst a množit se. Tak je zajištěno nejen zachování, ale i šíření druhu v prostředí.



Obrázek 2: Životní cyklus *Phasmarhabditis hermaphrodita*.

2.5.2. Orientace a pohyb v prostředí

Způsob orientace v prostředí a lokalizace hostitele jsou stejné jako u hlístovek. Hlavové papily a také amphidy jsou citlivé smyslové orgány, které mohou zachytit sloučeniny vylučované vhodným hostitelem. Mohou to být například kyselina močová, amoniak, arginin (Schmidt & All 1979), nebo CO₂ (Gaugler *et al.* 1980) a mnohé jiné, které slouží k vyhledání vhodného hostitele nebo substrátu.

P. hermaphrodita využívá při orientaci především atraktanty asociované s vhodnými hosteli. Hlístice je tak například silně přitahována do prostředí, kde se vyskytuje sliz z povrchu těla slimáka (Rae *et al.* 2006, Hapca *et al.* 2007, Small & Bradford 2008). Infekční larvy jsou ale přitahovány výrazně silněji k živému jedinci než k samotnému slizu z povrchu těla (Rae *et al.* 2006). Velmi zajímavá je však informace, že mrtvý jedinec je pro napadení invazními larvami atraktivnější než živý. Toto zjištění potvrzuje hypotézu, že *P. hermaphrodita* je fakultativní parazit, který se může vyvíjet i na mrtvém rostlinném a živočišném materiálu přítomném v půdě (Rae *et al.* 2006, MacMillan *et al.* 2009). Tím jsou např. výkaly slimáčků (*Deroceras* sp.) nebo plzáků (*Arion* sp.), které jsou nejen silně atraktivní (Rae *et al.* 2006, Nermuť *et al.* 2012b), ale zároveň jsou i vhodným substrátem k životu a reprodukci (Nermuť *et al.* 2012a). Silná atraktivita

výkalů a slizu je pak dávána do souvislosti s chováním slimáků, kteří pravidelně využívají tytéž úkryty každý den (South 1965, Newell 1966a, 1966b), přičemž se do nich vrací po své slizové stopě (Wells & Buckley 1972). Svě úkryty brzy znečistí výkaly a slizem (Ingram & Adolph 1943), a tak schopnost vyhledat taková místa dává invazním larvám výhodu v podobě větší šance potkat se s hostitelem (Grewal *et al.* 2001).

2.5.3. Hostitelské spektrum

Phasmarhabditis hermaphrodita je parazitem mnoha plžů (Gastropoda) z čeledi slimákovití (Limacidae), plzákovití (Arionidae), slimáčkovití (Agriolimacidae), plžicovití (Milacidae) a Vaginulidae (Rae *et al.* 2007).

Mezi nejcitlivější hostitele patří bezesporu zástupci čeledi slimáčkovití (Agriolimacidae). Mnoho problematických škodlivých druhů plžů však není k *P. hermaphrodita* citlivých. Jsou to kupříkladu slimák největší (*Limax maximus*), plzák zahradní (*Arion hortensis*) nebo plzák hnědý (*A. subfuscus*). V některých případech (plzák španělský *A. lusitanicus*) jsou napadáni jen mladší jedinci cca do 1 g váhy (Speiser *et al.* 2001, Rae *et al.* 2007). Vůči *P. hermaphrodita* jsou citlivé i některé druhy ulitnatých plžů, jako například hlemýžď kropenatý (*Helix aspersa*) (napadáni jsou jen mladí jedinci), tmavorečka kentská (*Monacha cantiana*), páskovka keřová (*Cepaea hortensis*) a vodní plž plovatka bahenní (*Lymnaea stagnalis*). Poslední tři jmenované druhy byly však infikovány pouze v laboratorních podmínkách, a to dávkami několikanásobně většími než jaké se používají při polních aplikacích (Wilson *et al.* 2000, Morley & Morrill 2006). V polních pokusech, kde se vyskytovaly početné populace devíti druhů plžů, nebyla při standardní dávce 300 000 larev/ha zjištěna redukce početnosti u žádného druhu. V následném laboratorním testu pak při standardní dávce byla prokázána vysoká mortalita jen u slimáčka síťkovaného (*Deroceras reticulatum*), který je cílovým organismem a necílové tmavorečky kentské (*M. cantiana*). Při pětinasobku doporučené standardní dávky se mortalita projevila u obou předchozích a ještě u páskovky keřové (*C. hortensis*), ostatní druhy však byly odolné (Wilson *et al.* 2000).

Poměrně často studovaným necílovým organismem je kromě plžů také žížala obecná (*Lumbricus terrestris*). Důvodem by mohla být zpráva o pravděpodobné izolaci *P. hermaphrodita* z žížaly obecné (*L. terrestris*) (Zaborski 2001). Žádná z dosavadních

studii však nedokázala zvýšenou mortalitu žížal působením *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Grewal & Grewal 2003a, De Nardo *et al.* 2004, Rae *et al.* 2005). Stejně negativní výsledky byly zaznamenány při sledování vlivu *P. hermaphrodita* na mortalitu mnoha druhů hmyzu, např. střevlíček (*Pterostichus melanarius*), potemník moučný (*Tenebrio molitor*), potemník brazilský (*Zophobas morio*) (Wilson *et al.* 1994b) nebo zavíječ voskový (*Galleria mellonella*) (Wilson nepublikováno) jsou zcela odolní, i když na mrtvých jedincích hmyzu (např. moucha domácí (*Musca domestica*), nebo zavíječ voskový (*Galleria mellonella*)) se *P. hermaphrodita* může množit (Nermuť *et al.* 2012a) stejně jako na jiné organické hmotě (Rae *et al.* 2006, MacMillan *et al.* 2009, Nermuť *et al.* 2012a).

Až na několik výše popsaných výjimek nebyl v polních podmínkách nikdy prokázán vliv na žádnou ze složek půdní fauny, plže nevyjímaje.

	Čeľad'	Druh		Vnímavost	
Nazí plži	Slimáčkovití (Agriolimacidae)	<i>Deroceras agreste</i> (L. 1758)	Slimáček polní	ano	
		<i>Deroceras reticulatum</i> (Müller 1774)	Slimáček síťkovaný	ano	
		<i>Deroceras panormitanum</i> (Lessona & Pollonera 1882)	Slimáček středomořský	ano	
		<i>Deroceras laeve</i> (Müller 1774)	Slimáček hladký	ano	
	Slimákovití (Limacidae)	<i>Limax maximus</i> (L. 1758)	Slimák největší	ne	
	Plžákovití (Arionidae)	<i>Arion ater</i> (L. 1758)	Plžák černý	jen mladí jedinci	
		<i>Arion silvaticus</i> (L. 1758)	Plžák hajní	ne	
		<i>Arion intermedius</i> (Lohmander 1937)	Plžák nejmenší	ne	
		<i>Arion distinctus</i> (Mabille 1868)	Plžák obecný	ne	
		<i>Arion lusitanicus</i> (Mabille 1868)	Plžák španělský	jen mladí jedinci	
		<i>Arion subfuscus</i> (Draparnaud 1805)	Plžák hnědý	ne	
		<i>Arion hortensis</i> (Férussac 1919)	Plžák zahradní	ne	
	Plžicovití (Milacidae)	<i>Milax gagates</i> (Draparnaud 1801)	Plžice tmavá	ano	
		<i>Tandonia sowerbyi</i> (Férussac 1823)	Plžice	ano	
		<i>Tandonia budapestensis</i> (Hazay 1881)	Plžice štíhlá	ano	
	Vaginulidae	<i>Leidyula floridana</i> (Leidy & Binney 1851)	-	ano	
	Ulitnatí plži	Hlemýžďovití (Helicidae)	<i>Helix aspersa</i> (Müller 1774)	Hlemýžď kropenatý	jen mladí jedinci
			<i>Monacha cantiana</i> (Montagu 1803)	Tmavoretkka kentská	ano
			<i>Cepaea hortensis</i> (Müller 1774)	Páskovka keřová	ano
<i>Cepaea nemoralis</i> (L. 1758)			Páskovka hajní	ne	
<i>Theba pisana</i> (Müller 1774)			-	ano	
<i>Cochlicella acuta</i> (Müller 1774)			-	ano	
<i>Ceruella virgata</i> (Da Costa 1778)			Suchomilka	ano	
Plovatkovití (Lymnaeidae)		<i>Lymnaea stagnalis</i> (L. 1758)	Plovatka bahenní	ano	
Levatkovití (Physidae)		<i>Physa fontinalis</i> (L. 1758)	Levatka říční	ne	
Pomatiasidae		<i>Pomatias elegans</i> (Müller 1774)	-	ne	
Zemounovití (Zonitidae)		<i>Oxychilus helveticus</i> (Blum 1881)	-	ne	
Závornatkovití (Clausiliidae)		<i>Clausilia bidentata</i> (Ström 1765)	Závornatka černavá	ne	
Vrásenkovití (Endodontidae)		<i>Discus rotundatus</i> (Müller 1774)	Vrásenka okrouhlá	ne	

Tabulka 2: Vnímavost některých plžů k *P. hermaphrodita*, podle Rae *et al.* (2007).

2.5.4. Obranné reakce a chování napadených plžů

Optimální teplota pro infekci slimáčka síťkovaného (*Deroceras reticulatum*) je 15°C až 17°C. Při teplotách pod 5°C a nad 35°C dochází k rychlému úhynu invazních larev (Wilson *et al.* 1993b). K infekci v laboratorních podmínkách dochází během 8 až 16 hodin po vystavení měkkýšů *Phasmarhabditis hermaphrodita*. Slimák poté zpravidla zahyne do 4 až 21 dnů po infekci (Wilson *et al.* 1993a). Ještě před úhynem však dochází k nápadným změnám v chování, jako jsou například razantní snížení příjmu potravy (Glen *et al.* 2000a), tendence zalézat do různých úkrytů (Wilson *et al.* 1994a, Pechová & Foltán 2008) a omezení pohybové aktivity (Bailey *et al.* 2003). Změny v chování slimáků je však možné pozorovat i u zcela zdravých jedinců, kteří jsou prokazatelně schopní detekovat přítomnost parazita v prostředí a takovým plochám ošetřeným *P. hermaphrodita* se pak vyhýbají (Wilson *et al.* 1999). Dokonce i střevlíčci *Pterostichus melanarius* se vyhýbají konzumaci mrtvol slimáčků napadených *P. hermaphrodita* (Foltán & Půža 2009).

Značnou mortalitu a snížení příjmu potravy slimáčka síťkovaného (*D. reticulatum*) a plžice tmavé (*Milax gagates*) potvrdili Rae *et al.* (2008) v rámci studie sledující vnímavost a imunitní odpověď slimáčka síťkovaného (*D. reticulatum*), plžice tmavé (*M. gagates*) a slimáka pestrého (*Limax pseudoflavus*) na vystavení hlístici *P. hermaphrodita*. Avšak u druhu *L. pseudoflavus* toto potvrzeno nebylo. Naopak při pitvě přeživších jedinců byl v jejich těle nalezen značný počet enkapsulovaných jedinců *P. hermaphrodita*. Autoři se tak domnívají, že slimák s rostoucí velikostí těla (stárnutím) získává schopnost takto „vychytat“ invadující larvy. Toto je první zpráva o takovémto obranném mechanismu u plžů. Enkapsulace je však dobře popsána u hmyzu a spočívá v tom, že při invazi větších objektů, jakými jsou i hlístice, dojde k jejich obalení několika vrstvami plasmacytů a granulocytů. Následně se uplatní profenoloxidázy, které katalyzují vznik melaninu. Jde tak o komplexní proces, na jehož konci je melanizovaná a nekrotizovaná kapsule (Kodrík 2004).

2.6. Asociace s bakteriemi

P. hermaphrodita nemá, jako například entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* a *Heterorhabditis*, pouze jednu symbiotickou bakterii, nýbrž v přirozených podmínkách žije v asociaci s mnoha druhy bakterií, které nijak neovlivňují jeho virulenci (Rae *et al.* 2010). Symbiotickou bakterii, kterou je v případě komerčně dostupného kmene

bakterie *Moraxella osloensis*, si není schopen trvale udržet (Rae *et al.* 2010). Dosud bylo izolováno mnoho bakterií, na kterých je *Phasmarhabditis hermaphrodita* schopen růst. Jsou to například bakterie rodů *Pseudomonas*, *Providencia*, *Serratia* a další (Wilson *et al.* 1995a) nebo *Stenotrophomonas maltophilia (rhizophila)* a *Bacillus cereus* (Nermuť *et al.* 2010). Důvod, proč byla jako symbiont vybrána právě bakterie *M. osloensis*, je ten, že poskytuje nejlepší výsledky jak v oblasti patogenity vůči hostiteli, tak v oblasti produkce a kvality potomstva hlístice, i když v jednotlivých dílčích oblastech by ji daleko předčily jiné bakterie. Například *Providencia rettgeri* je pro *P. hermaphrodita* podstatně lepším živným substrátem, na kterém byla pozorována mnohem vyšší produkce potomstva, ale výsledky v testech patogenity vůči hostiteli jsou už značně nejisté (Wilson *et al.* 1995b).

M. osloensis je g- aerobní bakterie třídy Moraxellaceae z gama pododdělení purpurových bakterií. Je citlivá na penicilin, může růst na minerálních médiích s obsahem acetátu a amonných solí a jedná se o příležitostný lidský patogen (Tan & Grewal 2001). *M. osloensis* produkuje termostabilní endotoxin (aktivním endotoxinem je lipopolysacharid) odolný působení proteáz, který je sám o sobě toxický pro slimáky po injekční aplikaci, ale nikoliv orálně nebo kontaktně (Tan & Grewal 2003). Kromě toho endotoxin ze starších buněk stejně jako z buněk ošetřených tepelně a přidáním proteázy vykazuje vyšší aktivitu. Tato skutečnost je přisuzována možné vazbě endotoxinu na jiný strukturní protein, který snižuje aktivitu toxinu z mladších a proteázou neošetřených buněk (Tan & Grewal 2002).

2.7. Masová produkce a skladování

P. hermaphrodita je možné v laboratorních podmínkách chovat na živých nebo nejlépe mrazem zabitých jedincích slimáčka síťkovaného (*Deroceras reticulatum*) (Wilson osobní sdělení), případně monoxenicky *in vitro* v tekutých médiích nebo na agarových plotnách (Wilson *et al.* 1995b). Počáteční pokusy s množением *in vitro* byly prováděny s xenickými kulturami s nedefinovaným počtem druhů bakterií (Wilson *et al.* 1994c). Takováto technologie však neumožňuje dosahovat stabilních výsledků, a proto bylo nezbytné získat monoxenické kultury schopné rozvoje v tekutém médiu (Wilson *et al.* 1995b). Za tímto účelem byly prováděny experimenty s izolací různých bakterií přímo z invazních larev i napadených hostitelů. Nakonec byla jako vhodný "symbiont" vybrána *M. osloensis* (Wilson *et al.* 1995a).

Phasmarhabditis hermaphrodita je komerčně produkován v monoxenické asociaci s *Moraxella osloensis* ve fermentorech v tekutém médiu, které je předmětem patentové ochrany. V těchto podmínkách je produkováno na 1 ml média asi 100 000 larev (Glen *et al.* 1994), které jsou z vyčerpaného média separovány centrifugací a následným promýváním (Young *et al.* 2002) a filtrováním přes síta o velikosti ok 75 až 106 µm, na kterých dojde k separaci dospělců a larev (Wilson *et al.* 2001). Pro separaci se dají využívat i vibrační membrány (Wilson *et al.* 2003). Po separaci a vyčištění larev následuje konečná formulace. Larvy jsou smíchány s montmorillonitem nebo vermikulitem, produkt je zabalen a ukladněn (Glen *et al.* 1994).

Takto formulované larvy vydrží životaschopné až 6 měsíců, pokud je produkt skladován v chladničce při 5°C (Grewal 2001). V laboratorních podmínkách se larvy *P. hermaphrodita* běžně skladují v nízkém sloupci vody při teplotě 15°C (krátkodobé uskladnění) nebo pro dlouhodobé uskladnění při 5°C ve vlhké molitanové drti (Wilson *et al.* 1993b). V molitanu při 5°C jsou larvy schopné přežít bez větších problémů 1 rok, i když s přibývajícím časem pochopitelně roste jejich mortalita. Přežívání při extrémních teplotách, které mohou nastat během transportu lze zvýšit ošetřením larev 10% roztokem glycerolu, které nám zajistí menší mortalitu při teplotách -20 až +35°C (Grewal & Grewal 2003b).

2.8. Ochrana proti škodlivým plžům

Nazí plži způsobují značné škody v kulturách pěstovaných rostlin okusem klíčků a klíčících semen, stonků, lodyh, plodů, hlíz i dužnatých kořenů a listů. Tím rostlinu značně poškozují a v případě mladých rostlin, při současném přemnožení plžů, může dojít k holožírům a úplnému zničení porostu. Jelikož jsou plži obecně široce polyfágními organismy, je ochrana proti nim, zvláště na vlhčích lokalitách, aktuální téměř ve všech běžně pěstovaných plodinách. Škodliví plži v našich podmínkách pocházejí především ze tří čeledí: plzákovití (Arionidae), slimáčkovití (Agriolimacidae) a slimákovití (Limacidae). Zvláště pak slimáček síťkovaný (*Deroceras reticulatum*), slimáček polní (*D. agreste*) a plzák zahradní (*Arion hortensis*) způsobují značné škody (Kazda *et al.* 2003).

Ochrana proti plžům spočívá především ve správné agrotechnice a také aplikaci nejrůznějších přípravků na bázi metaldehydu (Vanish slug pellets®), fosforečnanu železitého (Ferramol schneckenkorn®) nebo methiocarbu (Mesurol 50 WP®, Mesurol

schneckenkorn®). Dalšími osvědčenými způsoby regulace populací slimáků, slimáčků a plzáků je aplikace granulovaného dusíkatého vápna nebo páleného vápna. A v neposlední řadě je možné využít pro boj s těmito škůdci také *Phasmarhabditis hermaphrodita*. Kromě zmíněných metod regulace plžů se nabízí další minoritní, někdy až kuriózní, způsoby řešení problému, jako je na příklad využití plastových plůtků, pivních pastí, kuchyňské soli, kachen, kávové sedliny, dřevěných pilin, rozdrčených vaječných skořápek, lávových kamenů, výluhu z česneku nebo dokonce poprašku kokainu, či robota pro sběr slimáků (SlugBot), který ulovené slimáky používá jako substrát pro výrobu bioplynu sloužícího k pohonu celého mechanismu (Anonym 1 2012).

2.9. Metody aplikace *Phasmarhabditis hermaphrodita* a jejich účinnost

Hlístice *P. hermaphrodita* (Nemaslug®) je používána pro regulaci populací slimáků a plzáků škodících na mnoha polních, zahradních a okrasných rostlinách, jako jsou řepka (Speiser & Adermatt 1996), kapusta (Ester *et al.* 2003a), ozimá pšenice (Wilson *et al.* 1994a), jahody (Glen *et al.* 2000b), hlávkový salát, zelí (Grubisic *et al.* 2003) nebo třeba lilie rodu *Hosta* (Grewal *et al.* 2001) a orchideje (Ester *et al.* 2003b). Ve Velké Británii je *P. hermaphrodita* používán i v porostech rostlin rodu *Asparagus* a celeru (Grewal *et al.* 2001, Ester *et al.* 2003a). Standardně se aplikuje celoplošně na vlhkou nebo předem provlhčenou půdu v dávce 300 000 jedinců na 1 m². Po ošetření je vhodné zalít porost vodou, aby byly hlístice zaplaveny do půdy. Maximální přípustný tlak při aplikaci je 5 barů a otvory trysek a filtrů by měly mít velikost minimálně 1 mm. Přípravek je vhodné aplikovat navečer při optimální teplotě půdy 5 až 20°C, neaplikuje se za intenzivního slunečního svitu (příbalový leták přípravku Nemaslug®).

O úspěších nebo neúspěších různých aplikací *P. hermaphrodita* byl napsáno mnoho. Faktem zůstává, že použití v praxi je poněkud problematické ve vztahu k některým silně škodlivým druhům, které nejsou vůči *P. hermaphrodita* citlivé. Každopádně výsledkem polních pokusů bylo zjištěno, že plochy ošetřené *P. hermaphrodita* v dávce 3 a 10 mld. larev/ha měly výrazně méně napadených rostlin než plochy neošetřené. U ploch ošetřených granulemi s účinnou látkou methiocarb však signifikantní rozdíl nebyl. Na těchto plochách ale bylo výrazně méně slimáků. Na plochách ošetřených *P. hermaphrodita* sice ani po 27 týdnech počet slimáků neklesl, avšak škod bylo výrazně méně, neboť jak je psáno výše *P. hermaphrodita* ovlivňuje chování slimáků, kteří se

méně pohybují a nepřijímají potravu (Wilson *et al.* 2004, Glen *et al.* 2000a). Tyto výsledky potvrzují i pokusy prováděné v ČR (Šenoldová in preparation). Velmi dobrých výsledků je dosahováno i s opakovanými aplikacemi nižších dávek, které vedou k výraznému snížení počtu použitých hlístic (Ester *et al.* 2003a), nebo aplikací přímo do úkrytů (Grewal *et al.* 2001)

Některé aplikační strategie vychází ze znalosti chování *Phasmarhabditis hermaphrodita* a cílových organismů, tedy škodlivých slimáčků (Agrilolimacidae) a plzáků (Arionidae). Slimáček síťkovaný (*Deroceras reticulatum*) se prokazatelně vyhýbá plochám, kde se na 1 cm² vyskytuje 38 až 120 jedinců *P. hermaphrodita* (Wilson *et al.* 1999). Tento poznatek vedl k myšlence o aplikacích na okrajích pozemků nebo individuálně v okolí jednotlivých rostlin, což by mohlo přispět k významné úspoře finančních prostředků ve srovnání s celoplošnou aplikací. Ovšem pokusy v ozimé pšenici prokázaly, že ve skutečnosti mezi lokální a celoplošnou aplikací není rozdíl, neboť na ošetřených plochách dochází postupně ke snížení hustoty populace *P. hermaphrodita* pod úroveň mající repelentní účinek (Hass *et al.* 1999a, Hass *et al.* 1999b).

2.10. Využití *Phasmarhabditis hermaphrodita* v integrované ochraně

Entomopatogenní hlístice, ale i *P. hermaphrodita* jsou velmi citlivé na vyschnutí a působení ultrafialového záření. Proto jedním ze základních opatření při aplikaci a po ní není jen výše zmíněná zálivka, ale i zapravení hlístic do půdy vláčením nebo rotavátorem, čímž je dosahováno prokazatelně lepší účinnosti aplikovaných hlístic (Wilson *et al.* 1996, Hass *et al.* 1999b).

Poměrně slibná je kombinace chemické ochrany a hlístic. *Phasmarhabditis hermaphrodita* totiž vzhledem ke svému způsobu života lépe napadá měkkýše, kteří se vyskytují pod povrchem půdy, zatímco aktivní jedinci na povrchu jsou lépe likvidováni pomocí požerových moluskocidů na bázi metaldehydu (Rae *et al.* 2009, Iglesias *et al.* 2001, Iglesias *et al.* 2003). Moluskocidy na bázi methiocarbu není možné použít, neboť karbamáty jsou nematocidní (Gordon *et al.* 1996, Nermut & Mráček 2010).

K lepšímu využití hlístic a vyšší účinnosti lze využívat nejen výše nastíněné metody, ale i matematické modely, které nám dovedou předpovědět mortalitu a míru redukce příjmu potravy slimáků v závislosti na použité dávce *P. hermaphrodita* (Glen *et al.* 2000a). Tento model však nebere v úvahu čas, jedná se jen o predikci na základě dávky. Dlouhodobé působení hlístic na pozemku zde není zohledněno. Prvek času vnesli do

modelování Hass *et al.* (1999a). Ti vyšli z dlouhodobých pokusů, při kterých sledovali mortalitu a omezení příjmu potravy v čase při použití jedné počáteční dávky. Takovéto modely však neberou v úvahu početnost populace slimáků a její dynamiku, kteréžto výrazně ovlivňují úspěšnost aplikace. Proto byly navrženy složitější modely beroucí již v potaz i početnost populace slimáčka síťkovaného (*Deroceras reticulatum*) (Wilson *et al.* 2004). Sice není snadné stanovit početnost populace přesně a rychle, ale takovýto model už poskytuje docela kvalitní odhad (Rae *et al.* 2007). Ideální by ovšem bylo vnést do modelu ještě dynamiku rozvoje populace cílového organismu (Choi *et al.* 2004), neboť i ta může zcela zásadně ovlivnit úspěch aplikace (např. rozdíl výskytu a škodlivosti slimáků v suchých a vlhkých, nebo teplých a chladných obdobích). A na závěr je třeba si uvědomit, že populaci slimáků neovlivňuje pouze počasí a lidská snaha regulovat slimáky chemicky nebo biologicky, ale i spousty přirozených nepřátel, jakými jsou například střevláci (Coleoptera: Carabidae), nebo mouchy rodu *Tetanocera* (Diptera: Sciomyzidae) a mnoho dalších.

3. Cíle práce

Cílem předložené disertační práce je studium ekologie hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita* a její celková charakteristika v kontextu všech dosavadních poznatků. Práce zkoumá způsob orientace *P. hermaphrodita* v prostředí a reakci na přítomnost různých potenciálních hostitelů či živných substrátů. Dále se práce zabývá reakcí *P. hermaphrodita* na různé živné substráty, hlavně pak tím, jak tyto různé substráty ovlivňují rozvoj populace a kvalitu i kvantitu potomstva. Třetí oblastí zájmu je vnitrodruhová konkurence a závěr tvoří studie zabývající se perzistencí hlístice v různých prostředích.

4. Experimentální část a výsledky

4.1. Reakce *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) a *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) na různé atraktanty

Nermuť, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. The Response of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) to different host-associated cues. *Biological Control* 61: 201-206.

V této studii byla sledována odpověď *P. hermaphrodita* na různé atraktanty asociované s *Deroceras reticulatum*. Pozorování probíhalo na agarových plotnách a v olfaktometrech vyplněných pískem. Jako reference byly použity hlístovka *S. feltiae* a atraktanty asociované s *Galleria mellonella*. Pohyb *P. hermaphrodita* byl ve srovnání se *S. feltiae* mnohem intenzivnější v olfaktometrech i na agaru. Na agaru byl *P. hermaphrodita* přitahován k mrtvému a k homogenizovanému *D. reticulatum*. Výkaly a sliz z *D. reticulatum* a výkaly *G. mellonella* vyvolaly velkou, nikoliv však jasně orientovanou reakci. V olfaktometrech vyvolaly atraktanty z *D. reticulatum* výrazně vyšší reakci než jiné, ačkoliv v případě živého slimáčka a jeho výkalů nebyla tato reakce nijak orientovaná. V případě mrtvého nebo homogenizovaného slimáčka se jednalo dokonce o reakci negativní. Výsledky této práce demonstrují, že *P. hermaphrodita* je schopné velice dobře detekovat volatilní látky asociované s hostitelem a zároveň je schopné se pohybovat v čistě minerálním substrátu. *S. feltiae* byla přitahována jak ke hmyzím, tak měkkýším atraktantům a její silná reakce na mrtvého slimáčka naznačuje, že by hlístovky mohly pro svůj vývoj využívat i jiné než jen hmyzí mrtvolky a hmyzí hostitele.

4.2. Vliv různých živných substrátů na vývoj a kvalitu *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae)

Nermuť, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. The effect of different growing substrates on the development and quality of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae). Under review in: *Biological Control*.

Vliv různých živných substrátů na vývoj *P. hermaphrodita* byl sledován v několika laboratorních pokusech. Komerční, laboratorní a "divoký" kmen *P. hermaphrodita* byly chovány na agarových plotnách na homogenizované prasečí ledvině, homogenizovaných tělech *D. reticulatum*, *Arion lusitanicus* a *G. mellonella*, výkalech *D. reticulatum*, *A. lusitanicus* a *G. mellonella* a na zahradním kompostu. Sledovány byly doba vývoje, produkce potomstva, tukové rezervy a délka těla samic a invazních

larev. Všechny kmeny byly schopné růstu a reprodukce na všech testovaných substrátech, ačkoliv produkce potomstva byla významně vyšší na substrátech živočišného původu. Tukové rezervy a velikost těla byly proměnlivé napříč substráty, nicméně i na rostlinných substrátech byla pozorována normální velikost a tukové rezervy. To tedy znamená, že kvalita živného substrátu ovlivňuje nejvíce produkci potomstva. Vysoká a stabilnější produkce potomstva a rychlejší vývoj divokého kmene by mohly být způsobeny bakteriemi asociovanými s tímto kmenem. U komerčního kmene byla izolována pouze *Moraxella osloensis*. Laboratorní a divoký kmen obsahovaly větší množství druhů bakterií. U obou kmenů byly izolovány *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Stenotrophomonas* sp. a *Bacillus cereus*, zatímco druh *Pseudomonas putida* byl izolován pouze z divokého kmene. Výsledky této práce podporují tvrzení, že *Phasmarhabditis hermaphrodita* je fakultativním parazitem a saprobiontem. Značný rozdíl v produkci potomstva na živočišných a rostlinných substrátech ilustruje evoluční výhodu asociace nematodů s bezobratlými živočichy.

4.3. Vliv vnitrodruhové konkurence na vývoj a kvalitu *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae)

Nermuť, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. The effect of intraspecific competition on the development and quality of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae). Under review in: Biocontrol Science and Technology.

V této studii byl sledován vliv vnitrodruhové konkurence na vývoj, reprodukci a kvalitu *P. hermaphrodita*. Pro vlastní experimenty byl použit divoký kmen *P. hermaphrodita* izolovaný v Benešově u Prahy. Hlísti byli chováni na homogenizovaném těle *Deroceras reticulatum* na agarových plotnách v multiwellech s 24 jamkami. Použito bylo celkem 8 různých počátečních dávek. (1, 10, 25, 50, 100, 250, 500 a 1000 invazních larev na jednu jamku). Stejně jako v předchozí studii byla sledována doba vývoje, produkce potomstva, tukové rezervy a délka těla samic a invazních larev. Velikost a tukové rezervy samic klesají s rostoucí počáteční dávkou. Velikost a tukové rezervy invazních larev byly stabilní (okolo 900 µm respektive index 7) až po dávku 250 larev. Při vyšších dávkách dochází k poklesu. Produkce potomstva rostla s rostoucí počáteční dávkou až k optimu 100 larev počáteční dávky (produkce cca 200 000 larev na 1 g substrátu) a poté opět klesala. V případě nevyšší dávky se jen část inokula vyvíjela v rozmnožující se dospělce. *Phasmarhabditis hermaphrodita* je pravděpodobně schopné tolerovat vnitrodruhovou konkurenci až do určité úrovně (cca 1000 jedinců počáteční dávky),

když je potom počet jedinců příliš vysoký, část larev se nevyvíjí v dospěléce a má tendenci opustit substrát. Tato studie dokazuje, že vnitrodruhová konkurence negativně ovlivňuje produkci potomstva a kvalitu invazních larev *Phasmarhabditis hermaphrodita* a že *P. hermaphrodita* je pravděpodobně schopné se částečně přilísné konkurenci vyhnout opuštěním přesyceného prostoru.

4.4. Persistence *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae) v různých substrátech

Nermuť, J. 2012. The persistence of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae) in different substrates. Russian Journal of Nematology 20: 61-64.

Tato studie se zabývá persistencí *P. hermaphrodita* v různých substrátech. Čtyři různé substráty (písek, zahradní kompost, zahradnický substrát a středně těžká půda) byly inokulovány divokým kmenem *P. hermaphrodita*. Následně byla sledována persistence hlístice po dobu osmi měsíců. Pro zjišťování přítomnosti *P. hermaphrodita* v substrátu byla použita nově vyvinutá past. Bylo zjištěno, že *P. hermaphrodita* dokáže přežít ve vlhkém písku po dobu nejméně 5 měsíců, avšak počet izolovaných jedinců měl po celou dobu pokusu prudce klesající trend. Persistence v kompostu byla velmi nízká pravděpodobně díky velkému množství antagonistů z řad roztočů, chvostoskoků, hub a dalších organismů. Zahradnický substrát a středně těžká půda poskytly *P. hermaphrodita* nejlepší podmínky pro dlouhodobé přežívání. Hlísti se vyskytovali v těchto substrátech v poměrně vysokých počtech po celou dobu experimentu (8 měsíců). Demonstrovali jsme, že *P. hermaphrodita* prokazatelně lépe přežívá v substrátech s vyšším obsahem organické hmoty a ochotně reaguje na námi vytvořené pasti.

5. Závěr

- ✚ Mrtví, homogenizovaní a živí slimáci jsou atraktivní pro invazní larvy *Steinernema feltiae*.
 - ✚ *Phasmarhabditis hermaphrodita* reaguje v olfaktometrech velmi silně na plynné látky.
 - ✚ *P. hermaphrodita* je schopné velmi aktivního pohybu v minerálním substrátu.
-
- ✚ *P. hermaphrodita* je schopné růstu a reprodukce na substrátech rostlinného i živočišného původu, které však poskytují lepší podmínky k vývoji.
 - ✚ Divoký kmen *P. hermaphrodita* vykazuje stabilnější produkci potomstva i obsah tuku a je variabilnější ve velikosti těla, zatímco laboratorní a komerční kmene vykazují opak.
 - ✚ Vyšší produkce potomstva a rychlejší vývoj divokého a komerčního kmene mohou být způsobeny asociovanými bakteriemi.
 - ✚ Kvalita substrátu výrazně ovlivňuje hlavně produkci potomstva, méně velikost těla nebo tukové rezervy.
-
- ✚ Největší samice *P. hermaphrodita* se vyskytují při nízkých počátečních dávkách, zatímco při dávkách vyšších velikost samic klesá.
 - ✚ Tukové rezervy a délka samic a invazních larev *P. hermaphrodita* jsou stabilní až k dávce 250 respektive 100 invazních larev, poté klesají.
 - ✚ Produkce potomstva *P. hermaphrodita* stoupá s rostoucí počáteční dávkou až k optimální dávce 100 invazních larev.
-
- ✚ *P. hermaphrodita* dokáže přežít ve vlhkém písku po dobu nejméně 5 měsíců.
 - ✚ Perzistence *P. hermaphrodita* v kompostu je velmi nízká pravděpodobně díky velkému množství antagonistů.
 - ✚ Zahradnický substrát a středně těžká půda poskytují *P. hermaphrodita* nejlepší podmínky pro dlouhodobé přežívání.

Hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita* byla objevena před více než 150 lety. Většího zájmu vědecké veřejnosti se však dočkala až v devadesátých letech dvacátého století. Od té doby byla uvedena na trh v podobě biopreparátu na ochranu rostlin před škodlivými plži a publikovány byly výsledky mnoha výzkumů zaměřených na laboratorní i masové chovy, vztah k cílovým a necílovým organismům, asociace s bakteriemi, životní cyklus, formulace i skladování a další.

Předložená disertační práce přinesla několik nových poznatků o životě *P. hermaphrodita*, zvláště o jeho schopnosti vyhledání vhodného hostitele, pohybu v prostředí, vývoji v podmínkách různých substrátů i vnitrodruhové konkurence a schopnosti persistence v prostředí. Ačkoliv by se mohlo zdát, že o tomto fakultativním parazitovi měkkýšů je známo téměř vše, ani zdaleka tomu tak není. Dodnes zůstávají neznámé například způsoby jeho šíření a přežívání v prostředí, preference habitatů a mnoho dalšího.

Kam se bude ubírat vývoj je těžké odhadnout. V naší laboratoři to určitě budou izolace nových kmenů a výše zmíněné šíření a přežívání v prostředí. Zvláště producent hlístice a některé laboratoře zaměřené více na aplikovaný výzkum jistě budou využívat izolací nových kmenů pro získání dalších bakterií asociovaných s *P. hermaphrodita*, za účelem vytvoření nových vztahů bakterie a hlísta, které by mohly být efektivnější vůči některým dosud obtížně regulovatelným druhům plžů. Stranou zájmu ale jistě nezůstanou ani možnosti levnější produkce a samozřejmě nejrůznější moderní aplikační strategie, jako jsou například cílené aplikace (Grewal *et al.* 2001) a technologie postupného uvolňování (Menzler-Hokkanen & Hokkanen 2003; Grewal *et al.* 2005), nebo třeba zvyšování odolnosti ke stresovým podmínkám (Grewal & Grewal 2003b).

P. hermaphrodita představuje zajímavý objekt studia, i když v budoucnu nejspíš nezůstane ochrana proti škodlivým plžům jen u jednoho jediného bioagens, ale čas nepochybně přinese i mnohé jiné organismy schopné efektivní regulace škodlivých měkkýšů. Jedním z takových organismů by snad mohla být i další parazitická hlístice *Alloinema appendiculatum* z čeledi Alloionematidae, která v nezanedbatelné míře parazituje v plzácích, včetně invazního druhu *Arion lusitanicus*, a která bude i bez ohledu na její praktické využití dosti zajímavým objektem studia, stejně jako mnoho dalších parazitických hlístic měkkýšů.

6. Summary

Disertační práce „Komplexní charakteristika hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita*“ je zaměřená na studium ekologie parazitické hlístice *P. hermaphrodita* a její celkovou charakteristiku v kontextu všech dosavadních poznatků. Práce sestává z obecného úvodu, který má za cíl představit *P. hermaphrodita* v celé šíři dosavadního výzkumu a čtyř vlastních originálních prací, které na tento přehled navazují. První z nich zkoumá způsob orientace *P. hermaphrodita* v prostředí a reakci na přítomnost různých potenciálních hostitelů či živných substrátů. Další se zabývá reakcí *P. hermaphrodita* na různé živočišné a rostlinné substráty, hlavně pak tím, jak tyto různé substráty ovlivňují vývoj populace a kvalitu i kvantitu potomstva. Třetí oblastí zájmu je vliv vnitrodruhové konkurence na vývoj populace a kvalitu i kvantitu potomstva. Závěr tvoří krátká studie zabývající se perzistencí hlístice v různých prostředích, od minerálního až po čistě organické.

Ph.D. thesis „The complex characterisation of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*“ is focused on the study of ecology of slug parasitic nematode *P. hermaphrodita*, its general characterisation in the context of all nowadays knowledge. The thesis consists the general introduction, that introduces the whole nowadays research of *P. hermaphrodita*, and four original works, that follow the introductory chapter. The first work deals with the orientation of *P. hermaphrodita* in 2D and 3D space and reaction on the presence of different hosts or nutritive substrates. The other study deals with the reaction of *P. hermaphrodita* on various animal and plant nutritive substrates and in the first place the influence of these substrates on the development of nematodes and quality and quantity of progeny. The third scope of this thesis is the influence of intraspecific competition on development, quality and quantity of nematodes and the last part of this text comprises a short study of the persistence of *P. hermaphrodita* in different substrates, from mineral to organic.

7. Literatura

Andrássy, I. 1983. A Taxonomic Review of the Sub-order Rhabditina (Nematoda: Secernentea). Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Paris, 241 p.

Andrássy, I. 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). Akademie – Verlag, Berlin, 509 p.

Anonym 1. 2012. SlugBot: Enemy of Slugs. Wired (online). (cit. 2011-12-28).

Dostupné z:

<http://www.wired.com/gadgets/miscellaneous/news/2001/10/47156?currentPage=all>.

Bailey, S. E. R.; Cairns, A.; Latham, R.; Abdel Kasi, M. & Manning, P. 2003. Onset of immobilization in the slug *Deroceras reticulatum* Müller parasitized by the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* Schneider. In: Slugs and Snails: Agricultural, veterinary and environmental perspectives, BCPC Symposium Proceedings No. 80. British Crop Protection Council, Alton, Hants, UK, pp. 215–220.

Charwat, S. M. & Davies, K. A. 1999. Laboratory screening of nematodes isolated from South Australia for potential as biocontrol agents of helcid snails. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 55-61.

Choi, Y. H.; Bohan, D. A.; Powers, S. J.; Wiltshire, C. W.; Glen, D. M. & Semenov, M. A. 2004. Modelling *Deroceras reticulatum* (Gastropoda) population dynamics based on daily temperature and rainfall. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 103: 519–525.

De Nardo, E. A. B.; Sindermann, A. B.; Grewal, S. K. & Grewal, P. S. 2004. Non-susceptibility of earthworm *Eisenia foetida* to the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*, a biocontrol agent of slugs. *Biocontrol Science and Technology* 14: 93-98.

Ester, A.; van Rozen, K. & Molendijk, L. P. G. 2003a. Field experiments using the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* or salt as control measures against slugs in green asparagus. *Crop Protection* 22: 689-695.

Ester, A.; van Rozen, K. & Hazendonk, A. 2003b. Efficacy of pesticides to control *Lehmannia valentiana* (Férussac) in orchids (*Cymbidium*) in greenhouse experiments. In: *Slugs and Snails: Agricultural, Veterinary and Environmental Perspectives*, BCPC Symposium Proceedings No. 80. British Crop Protection Council, Alton, Hants, UK, pp. 89–94.

France, A. & Gerding, M. 2000. Discovery of *Phasmarhabditis hermaphrodita* in Chile and its pathological differences with the U.K. isolate in slug control. *Journal of nematology* 32:430.

Foltán, P. & Půža, V. 2009. To complete their life cycle, pathogenic nematode-bacteria complexes deter scavengers from feeding on their host cadaver. *Behavioural Processes* 80: 76-79.

Gaugler, R.; Lebeck, L.; Nakagake, B. & Bousch, G. M. 1980. Orientation of the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae* to carbon dioxide. *Environmental Entomology* 9: 649-652.

Glen, D. M.; Wilson, M. J.; Pearce, J. D. & Rodgers, P. B. 1994. Discovery and investigation of a novel nematode parasite for biological control of slugs. In: *Proceedings Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, vol 2, pp. 617-624.

Glen, D. M.; Wilson, M. J.; Brain, P. & Stroud, G. 2000a. Feeding activity and survival of slugs, *Deroceras reticulatum*, exposed to the rhabditid nematode, *Phasmarhabditis hermaphrodita*: A model of dose response. *Biological Control* 17: 73-81.

Glen, D. M.; Wiltshire, C. W.; Hughes, L.; Ester, A.; van Rozen, K. & Castillejo, J. 2000b. The use of slug-parasitic nematodes and other techniques for control of slug and snail damage in horticultural crops. In: Proceedings Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases, British Crop Protection Council, Alton, Hants, UK, pp. 345–350.

Gordon, R.; Chippett, J. & Tilley, J. 1996. Effects of two carbamates on infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* all strain and *Steinernema feltiae* Umea strain. *Journal of Nematology* 28: 310-317.

Grewal, P. S. 2001. Formulation and application technology. In: Gaugler, R. (Ed.). *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, CABI Publishing, pp. 265–287.

Grewal, P. S.; Grewal, S. K.; Taylor, R. A. J. & Hammond, R. B. 2001. Application of molluscicidal nematodes to slug shelters: A novel approach to economic biological control of slugs. *Biological Control* 22: 72-80.

Grewal, S. K. & Grewal, P. S. 2003a. Survival of earthworms exposed to the slug-parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*. *Journal of Invertebrate Pathology* 82: 72-74.

Grewal, S. K. & Grewal, P. S. 2003b. Effect of osmotic desiccation on longevity and temperature tolerance of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae). *Journal of Parasitology* 89: 434-438.

Grewal, P. S.; Ehlers, R.-U. & Shapiro-Ilan, D. I. 2005. Critical issues and research needs for expanding the use of nematodes in biocontrol. In: Grewal, P. S.; Ehlers, R.-U. & Shapiro-Ilan, D. I. (Eds.). *Nematodes as Biocontrol Agents*, CABI Publishing, Wallingford, pp. 479–489.

Grubisic, D., Ostrec, L. J. & Dusak, I. 2003. Biological control of slugs in vegetable crops in Croatia. In: *Slugs and Snails: Agricultural, Veterinary and Environmental Perspectives*, BCPC Symposium Proceedings No. 80. British Crop Protection Council, Alton, Hants, UK, pp. 115–120.

Hapca, S.; Crawford, J.; Rae, R.; Wilson, M. & Young, I. 2007. Movement of the parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* in the presence of mucus from the host slug *Deroceras reticulatum*. *Biological Control* 41: 223-229.

Hass, B.; Glen, D. M.; Brain, P. & Hughes, L. A. 1999a. Targeting biocontrol with the slug-parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* in slug feeding areas: a model study. *Biocontrol Science and Technology* 9: 587-598.

Hass, B.; Hughes, L. A. & Glen, D. M. 1999b. Overall versus band application of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* with and without incorporation into soil, for biological control of slugs in winter wheat. *Biocontrol Science and Technology* 9: 579-586.

Hooper, D. J.; Wilson, M. J.; Rowe, J. A.; & Glen, D. M. 1999. Some observations on the morphology and protein profiles of the slug-parasitic nematodes *Phasmarhabditis hermaphrodita* and *P. neopapillosa* (Nematoda : Rhabditidae). *Nematology* 1: 173-182.

Iglesias, J.; Castillejo, J. & Castro, R. 2001. Mini-plot field experiments on slug control using biological and chemical control agents. *Annals of Applied Biology* 139: 285-292.

Iglesias, J.; Castillejo, J. & Castro, R. 2003. The effects of repeated applications of the molluscicide metaldehyde and the biocontrol nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* on molluscs, earthworms, nematodes, acarids and collembolans: a two-year study in north-west Spain. *Pest Management Science* 59: 1217-1224.

Ingram, W. M. & Adolph, H. M. 1943. Habitat and observations of *Ariolimax columbianus*. *Nautilus* 56.

Karimi, J; Kharazi-Pakadel A. & Robert, S. J. 2003. Report of pathogenic nematodes of slugs, *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditida) in Iran. *Journal of Entomological Society of Iran* 22: 77–78.

Kazda, J.; Jindra, Z.; Kabiček, J.; Prokinová, E.; Ryšánek, P. & Stejskal, V. 2003. Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny. Martin Sedláček, Praha, 148 p.

Kodřík, D. 2004. Fyziologie hmyzu: učební texty. Entomologický ústav AVČR a Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice, 220 p.

MacMillan, K.; Blok, V.; Young, I.; Crawford, J. & Wilson, M. J. 2006. Quantification of the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* from soil samples using real time qPCR. *International Journal for Parasitology* 36: 1453-1461.

MacMillan, K.; Haukeland, S.; Rae, R.; Young, I.; Crawford, J.; Hapca, S. & Wilson, M. J. 2009. Dispersal patterns and behaviour of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* in mineral soils and organic media. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 1483-1490.

Maupas, E. 1900. Modes et formes de reproduction des nématodes. *Archives de Zoologie* 8: 464–642.

Mengert, H. 1953. Nematoden und Schnecken. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie Tiere* 48: 311-349.

Menzler-Hokkanen, I. & Hokkanen, H. M. T. 2003. Entomopathogenic nematode delivery systems for biological control of pests on major outdoor crops: the case of oilseed rape. In: Abstracts for the 36th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology Program, pp.60.

Morley, N. J. & Morrill, D. 2006. The effects of the slug biological control agent, *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda), on non-target aquatic molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 112-114.

Nermut, J. & Mráček, Z. 2010. The Influence of pesticides on the viability and infectivity of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae). *Russian Journal of Nematology* 18: 141-148.

Nermut', J.; Chundelová, D.; Žurovcová, M.; Půža, M. & Mráček, Z. 2010. Drawbacks in the DNA based identification of steinernematid nematodes and characterization of *Steinernema weiseri* ITS sequence. In: Proceedings, 30th International Symposium of the European Society of Nematologists, Vienna, Austria, pp. 150.

Nermut', J. 2012. The persistence of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae) in different substrates. *Russian Journal of Nematology* 20: 61-64.

Nermut', J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012a. The effect of different growing substrates on the development and quality of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae). Under review in: *Biological Control*.

Nermut', J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012b. The Response of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) to different host-associated cues. *Biological Control* 61: 201-206.

Newell, P. F. 1966a. The analysis of the nocturnal behaviour of slugs on the surface of the soil. *Medical and Biological Illustration* 16: 146-159.

Newell, P. F. 1966b. Time lapse cine recording the soil surface activities of slugs. *Animal Behaviour* 13: 583.

Pechová, H. & Foltán, P. 2008. The parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* defends its slug host from being predated or scavenged by manipulating host spatial behaviour. *Behavioural Processes* 78: 416-420.

Rae, R.; Robertson, J. & Wilson, M. J. 2005. Susceptibility of indigenous UK earthworms and an invasive pest flatworm to the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*. *Biocontrol Science and Technology* 15: 623-626.

Rae, R.; Robertson, J. F. & Wilson, M. J. 2006. The chemotactic response of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda : Rhabditida) to cues of *Deroceras reticulatum* (Mollusca : Gastropoda). *Nematology* 8: 197-200.

Rae, R.; Verdun, C.; Grewal, P.; Robertson, J. F. & Wilson, M. J. 2007. Biological control of terrestrial molluscs using *Phasmarhabditis hermaphrodita* - progress and prospects. *Pest Management Science* 63: 1153-1164.

Rae, R.; Robertson, J. F. & Wilson, M. J. 2008. Susceptibility and immune response of *Deroceras reticulatum*, *Milax gagates* and *Limax pseudoflavus* exposed to the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 61-69.

Rae, R. G.; Robertson, J. F. & Wilson, M. J. 2009. Chemoattraction and host preference of the gastropod parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*. *Journal of Parasitology* 95: 517-526.

Rae, R. G.; Tourna, M. & Wilson, M. J. 2010. The slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* associates with complex and variable bacterial assemblages that do not affect its virulence. *Journal of Invertebrate Pathology* 104: 222-226.

Read, D. S.; Sheppard, S. K.; Bruford, M. W.; Glen, D. M. & Symondson, W. O. C. 2006. Molecular detection of predation by soil micro-arthropods on nematodes. *Molecular Ecology* 15: 1963-1972.

Ross, J. L.; Ivanova, E. S.; Spiridonov, S. E.; Waeyenberge, L.; Moens, M.; Nicol, G. W. & M. J. Wilson. 2010a. Molecular phylogeny of slug-parasitic nematodes inferred from 18S rRNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 738-743.

Ross, J. L.; Ivanova, E. S.; Severns, P. M. & Wilson, M. J. 2010b. The role of parasite release in invasion of the USA by European slugs. *Biological Invasions* 12: 603-610.

Small, R. W. & Bradford, C. 2008. Behavioural responses of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditida) to mucus from potential hosts. *Nematology* 10: 591-598.

Schmidt, J. & All, J. N. 1979. Attraction of *Neoplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to common excretory products of insect. *Environmental Entomology* 8: 55–61.

Schneider, A. 1859. Über eine Nematodenlarvae und gewisse Verschiedenheiten in den Geschlechtsorganen der Nematoden. *Zeitschrift für Wissenschaft Zoologie* 10: 176–178

South, A. 1965. Biology and ecology of *Agriolimax reticulatus* (Müller) and other slugs: spatial distribution. *Journal of Animal Ecology* 34: 403-417.

Speiser, B. & Andermatt, M. 1996. Field trials with *Phasmarhabditis hermaphrodita* in Switzerland. In: *Slug and Snail Pests in Agriculture*, BCPC Symposium Proceedings No. 66. British Crop Protection Council, Alton, Hants, UK, pp. 419–424.

Speiser, B.; Zaller, J. G. & Neudecker, A. 2001. Size-specific susceptibility of the pest slugs *Deroceras reticulatum* and *Arion lusitanicus* to the nematode biocontrol agent *Phasmarhabditis hermaphrodita*. *Biocontrol* 46: 311-320.

Stock, S. P. 2009. Molecular approaches and the taxonomy of insect-parasitic and pathogenic nematodes. In: *Stock, S. P.; Vanderberg, J.; Boemare, N. & Glazer, I. (Eds.). Insect pathogens: Molecular approaches and techniques*, CABI Publishing, Wallingford, pp. 71-100.

Šenoldová, P. Rozdílná účinnost parazitických hlístic *Phasmarhabditis hermaphrodita* na slimáčky z rodu *Deroceras* a plzáky z rodu *Arion*. In preparation.

Tan, L. & Grewal, P. S. 2001. Pathogenicity of *Moraxella osloensis*, a bacterium associated with the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*, to the slug *Deroceras reticulatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5010-5016.

Tan, L. & Grewal, P. S. 2002. Endotoxin activity of *Moraxella osloensis* against the grey garden slug, *Deroceras reticulatum*. Applied and Environmental Microbiology 68: 3943-3947.

Tan, L. & Grewal, P. S. 2003. Characterization of the first molluscicidal lipopolysaccharide from *Moraxella osloensis*. Applied and Environmental Microbiology 69: 3646-3649.

Wells, M. J. & Buckley, D. S. K. L. 1972. Snails and trails. Animal Behaviour 20: 345-355.

Wilson, M. J.; Glen, D. M. & George, S. K. 1993a. The rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* as a potential biological control agent for slugs. Biocontrol Science and Technology 3: 503-511.

Wilson, M. J.; Glen, D. M.; George, S. K. & Butler, R. C. 1993b. Mass cultivation and storage of the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*, a biocontrol agent for slugs. Biocontrol Science and Technology 3: 513-521.

Wilson, M. J.; Glen, D. M.; George, S. K.; Pearce, J. D. & Wiltshire, C. W. 1994a. Biological control of slugs in winter-wheat using the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*. Annals of Applied Biology 125: 377-390.

Wilson, M. J.; Glen, D. M.; Hughes, L. A.; Pearce, J. D. & Rodgers, P. B. 1994b. Laboratory tests of the potential of entomopathogenic nematodes for the control of field slugs (*Deroceras reticulatum*). Journal of Invertebrate Pathology 64: 182-187.

Wilson, M. J.; Glen, D. M.; Wiltshire, C. W. & George, S. K. 1994c. Mini-plot field experiments using the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* for biocontrol of slugs. Biocontrol Science and Technology 4: 103-113.

Wilson, M. J.; Glen, D. M.; George, S. K. & Pearce, J. D. 1995a. Selection of a bacterium for the mass-reproduction of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda,

Rhabditidae) as a biocontrol agent for slugs. *Fundamental and Applied Nematology* 18: 419-425.

Wilson, M. J.; Glen, D. M.; Pearce, J. D. & Rodgers, P. B. 1995b. Monoxenic culture of the slug parasite *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda, Rhabditidae) with different bacteria in liquid and solid phase. *Fundamental and Applied Nematology* 18: 159-166.

Wilson, M. J.; Hughes, L. A.; Jefferies, D. & Glen, D. M. 1999. Slugs (*Deroceras reticulatum* and *Arion ater*) avoid soil treated with the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*. *Biological Control* 16: 170-176.

Wilson, M. J.; Hughes, L. A.; Hamacher, G. M. & Glen, D. M. 2000. Effects of *Phasmarhabditis hermaphrodita* on non-target molluscs. *Pest Management Science* 56: 711-716.

Wilson, J. A.; Pearce, J. D. & Shamlou, P. A. 2001. Scaleable downstream recovery of nematodes used as biopesticides. *Biotechnology and Bioengineering* 75: 733-740.

Wilson, J. A.; Postlethwaite, J.; Pearce, J. D.; Leach, G.; Lye, G. J. & Shamlou, P. A. 2003. Vibrating membrane filtration for recovery and concentration of insect killing nematodes. *Biotechnology and Bioengineering* 83: 235-240.

Wilson, M. J.; Glen, D. M.; Hamacher G. M. & Smith, J. U. 2004. A model to optimise biological control of slugs using nematode parasites. *Applied Soil Ecology* 26: 179-191.

Wilson, M. J.; Burch, G.; Tourna, M.; Aalders, L. T. & Barker, G.M. 2012. The potential of a New Zealand strain of *Phasmarhabditis hermaphrodita* for biological control of slugs. *New Zealand Plant Protection* 65: (In press).

Young, J. M.; Dunhill, P. & Pearce, J. D. 2002. Separation characteristics of liquid nematode cultures and the design of recovery operations. *Biotechnology progress* 18: 29–35.

Zaborski, E. R.; Gittenger, L. A. S. & Roberts, S. J. 2001. A possible *Phasmarhabditis* sp. (Nematoda : Rhabditidae) isolated from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta : Lumbricidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 284-287.

8. Přehled publikací autora disertační práce

Odborné články

Nermuť, J. & Mráček, Z. 2010. The Influence of pesticides on the viability and infectivity of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae). Russian Journal of Nematology 18: 141-148.

Nermuť, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. The Response of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) to different host-associated cues. Biological Control 61: 201-206.

Nermuť, J. 2012. The persistence of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae) in different substrates. Russian Journal of Nematology 20: 61-64.

Nermuť, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. The effect of different growing substrates on the development and quality of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae). Under review in: Biological Control.

Nermuť, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. The effect of intraspecific competition on the development and quality of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae). Under review in: Biocontrol Science and Technology.

Populární články

Nermuť, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. Entomopatogenní a moluskoparazitické hlístice – neviditelní půdní zabijáci. Živa: 10-13.

Konferenční příspěvky

Nermuť, J. 2009. The response of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) to different cues. In: Proceedings, Second International Participated Entomopathogen and Microbial Control Symposium, Sarigerme-Mugla, Turekey, pp. 41.

Nermut, J. & Půža, V. 2010. *Phasmarhabditis hermaphrodita* - life cycle and orientation. In: Book of Abstracts, 18th Helminthological days, Masaryk University, Brno, Czech republic, pp. 11.

Nermut, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2010. The response of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) to volatile and water soluble cues. In: Program and Abstracts, 43rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Trabzon, Turkey, pp. 100.

Nermut, J.; Chundelová, D.; Žurovcová, M.; Půža, V. & Mráček, Z. 2010. Drawbacks in the DNA based identification of steinernematid nematodes and characterization of *Steinernema weiseri* ITS sequence. In: Proceedings, 30th International Symposium of the European Society of Nematologists, Vienna, Austria, pp. 150.

Nermut, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2010. The first report on the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) in the Czech Republic. In: Proceedings, 30th International Symposium of the European Society of Nematologists, Vienna, Austria, pp. 56.

Nermut, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2011. The influence of intraspecific competition and substrate on *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae). In: Insect Pathogens and Entomopathogenic Nematodes, Biological Control in IPM Systems, IOBC wprs Bulletin, Innsbruck, Austria, pp. 355-358.

Nermut, J. & Mráček, Z. 2011. The use of entomopathogenic and mollusc parasitic nematodes as biocontrol agents. In: 2nd Annual meeting of the european PhD network in insect science, abstract book, Tours, France, pp. 73.

Nermut, J.; Mráček, Z.; Půža, V.; Skrzypek, H. W.; Kazimierczak, W. S. & Kref, A. M. 2012. Head papillae, postanal swelling and vulval pattern, diagnostically valuable characters in the family Heterorhabditidae. In: Proceedings, 31st International Symposium of the European Society of Nematologists, Adana, Turkey, pp. -.

9. Přílohy

Práce použité v disertaci

Nermut, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. The Response of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) to different host-associated cues. *Biological Control* 61: 201-206.

Nermut, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. The effect of different growing substrates on the development and quality of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae). Under review in: *Biological Control*.

Nermut, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. The effect of intraspecific competition on the development and quality of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae). Under review in: *Biocontrol Science and Technology*.

Nermut, J. 2012. The persistence of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae) in different substrates. *Russian Journal of Nematology* 20: 61-64.

Ostatní přílohy

Odborné a populární články

Nermut, J. & Mráček, Z. 2010. The Influence of pesticides on the viability and infectivity of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae). *Russian Journal of Nematology* 18: 141-148.

Nermut, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2012. Entomopatogenní a moluskoparazitické hlístice – neviditelní půdní zabijáci. *Živa*: 10-13.

Konferenční příspěvky

Nermut, J. 2009. The response of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) to different cues. In: *Proceedings, Second International Participated Entomopathogen and Microbial Control Symposium, Sarigerme-Mugla, Turekey*, pp. 41.

Nermut, J. & Půža, V. 2010. *Phasmarhabditis hermaphrodita* - life cycle and orientation. In: Book of Abstracts, 18th Helminthological days, Masaryk University, Brno, Czech republic, pp. 11.

Nermut, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2010. The response of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) to volatile and water soluble cues. In: Program and Abstracts, 43rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Trabzon, Turkey, pp. 100.

Nermut, J.; Chundelová, D.; Žurovcová, M.; Půža, V. & Mráček, Z. 2010. Drawbacks in the DNA based identification of steinernematid nematodes and characterization of *Steinernema weiseri* ITS sequence. In: Proceedings, 30th International Symposium of the European Society of Nematologists, Vienna, Austria, pp. 150.

Nermut, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2010. The first report on the slug parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) in the Czech Republic. In: Proceedings, 30th International Symposium of the European Society of Nematologists, Vienna, Austria, pp. 56.

Nermut, J.; Půža, V. & Mráček, Z. 2011. The influence of intraspecific competition and substrate on *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae). In: Insect Pathogens and Entomopathogenic Nematodes, Biological Control in IPM Systems, IOBC wprs Bulletin, Innsbruck, Austria, pp. 355-358.

Nermut, J. & Mráček, Z. 2011. The use of entomopathogenic and mollusc parasitic nematodes as biocontrol agents. In: 2nd Annual meeting of the European PhD network in insect science, abstract book, Tours, France, pp. 73.

Nermut, J.; Mráček, Z.; Půža, V.; Skrzypek, H. W.; Kazimierczak, W. S. & Kref, A. M. 2012. Head papillae, postanal swelling and vulval pattern, diagnostically valuable characters in the family Heterorhabditidae. In: Proceedings, 31st International Symposium of the European Society of Nematologists, Adana, Turkey, pp. -.