

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta



Katedra parazitologie

Bakalářská práce

**Manipulace hostitele *Deroceras reticulatum* infekcí
*Phasmarhabditis hermaphrodita***

**Vliv způsobu usmrcení *D. reticulatum* na potravní nabídku pro potenciální
bezobratlé mrchožrouty**

Hana Zajícová

Školitel: Mgr. Pavel Foltan

Školitel - specialista: Doc. RNDr. Oleg Ditrich CSc.

České Budějovice 2007

Bakalářská diplomová práce

Manipulace hostitele *Deroceras reticulatum* infekcí *Phasmarhabditis hermaphrodita*
Vliv způsobu usmrcení *D. reticulatum* na potravní nabídku pro potenciální bezobratlé
mrchožrouty

Manipulation of spatial behaviour of the slug *Deroceras reticulatum* by the parasitic
nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*.

Different types of death of the slugs in relation to availability of the cadavers for the
invertebrate scavengers.

Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech
Republic

Annotation

Slug pathogenic nematodes are under a serious threat of predators and scavenging
invertebrates and can easily be destroyed together with consumption of the host.
Invertebrate cadavers are rapidly and preferentially removed by predators and scavengers
within minutes or hours, The nematodes need several days to finish their life-cycle in the
cadaver.

By comparing the after-death positions of slugs killed by 6 different methods, it is evident that
P. hermaphrodita can manipulate the spatial behaviour of its slug host to prevent the host
from being predated or scavenged, or from desiccation conditions until the nematodes
complete their development.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené
literatury.

V Českých Budějovicích, 1. kvěna 2004

Hana Zajícová

Poděkování

Děkuji Pavlu Foltanovi a Olegu Ditrichovi za cenné rady během mé práce, Martinu Konvičkovi za pomoc se statistikou a rodině za pomoc při sběru pokusných zvířat.

Děkuji Pavlu Pechovi. Za všechno.

Děkuji svým přátelům, jakož i členům oddílu allkampf- jitsu České Budějovice, kteří mi byli, ať vědomě, nebo nevědomě, psychickou oporou.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. <i>Deroceras reticulatum</i>	1
1.2. Metody eliminace slimáků.....	2
1.2.1. Chemické moluskocidy.....	2
1.2.2. Biologická agens.....	2
1.3. Životní cyklus <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i>	2
1.4. Mizení mrtvol bezobratlých živočichů a střevní analýzy.....	5
1.5. Manipulace hostitele parazitem.....	6
2. Cíle práce	8
3. Materiál a metodika	9
3.1. Slimáci.....	9
3.2. Barvivo.....	9
3.3. Značení.....	9
3.4. Předběžný experiment.....	12
3.5. Podmínky vlastního experimentu.....	12
3.6. Hlavní experiment.....	14
3.7. Lokalizace mrtvol.....	14
4. Výsledky	16
4.1. Vlastní experiment	16
5. Diskuse	18
6. Literatura	21
7. Přílohy	25
7.1. Materiál.....	25
7.2. Abstrakt.....	26

1. Úvod

1.1. *Deroceras reticulatum*

Slimáček síťkovaný, *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774) (Mollusca: Agriolimacidae) má statné tělo s klínovitě zúženým zadním koncem a značně vypouklým hřbetem. Štít zaujímá asi dvě pětiny délky těla.

U dospělých jedinců je základní barva špinavě krémová, kávová, nebo olivová. Obvykle má zřetelnou síťovitou kresbu tvořenou načernalými nebo tmavohnědými skvrnami.

Délka nataženého těla je 40 – 60 mm, délka smrštěného těla je do 25 mm.

Žije na otevřených prostranstvích v kulturních biotopech, kde obývá nejrůznější vlhká místa pod kameny, dřevem a podobně. Zřejmě se vyhýbá lesům.

Deroceras reticulatum je jedním z nejvýznamnějších zemědělských škůdců v temperátních oblastech Evropy a Severní Ameriky (Godan 1983, South 1992, Wilson et al. 1993). Například ve Velké Británii je 70% škody v zemědělství způsobeno tímto plžem (South 1992). Napadá široké spektrum zemědělských plodin jak v polích (Barker 2002), tak i malých zahrádkách (Port et Port 1986), zejména pak obilniny, brambory, řepku, cukrovou řepu, brukvovitou zeleninu a další plodiny. K poškození plodin dochází přímým žírem, kontaminací těly slimáků, jejich výkaly a slizem, což vede poklesu výnosu, odpudivému vzhledu a tím i ke značným ekonomickým ztrátám (Iglesias et al. 2003).

Klíčovou pro jeho aktivitu se ukázala být fotoperioda (Hommay et al. 2003) a vlhkost (Young et Port 1991). Slimácci aktivují hlavně v noci, kdy opouštějí své úkryty, živí se a páří. Kladou po 15 – 20 vajíčkách do půdy, či pod rostlinný odpad. Za příznivých podmínek se líhnou okamžitě, za nepříznivých podmínkách vajíčka přežívají dlouhou dobu.

Aktivita se mění také s teplotou. Největší aktivitu vykazuje *D. reticulatum* při 15 – 18 °C (Hommay et al. 1998). *D. reticulatum* nesleduje, narozdíl od jiných druhů slimáků, pravidelný roční cyklus (Schley et Bees 2003).

Deroceras reticulatum je v současnosti rozšířen po celé Evropě od atlantského pobřeží (včetně Velké Británie) až po Kavkaz, druhotně byl zavlečen do Severní Ameriky. Jeho přirozený areál nelze s určitostí stanovit, protože se často vyskytuje v antropogenních a kulturních biotopech, a také proto, že se v minulosti zaměňoval s mnoha jinými příbuznými druhy (Pfleger 1988).

Zatím byl *D. reticulatum* schopný adaptovat se na všechna nová prostředí, do kterých byl zavlečený (Schley et Bees 2003).

1.2. Metody eliminace slimáků

1.2.1. Chemické moluskocidy

Výhodou chemických moluskocidů (metaldehyd, mehiocarb, fosfát železa) je snadná komerční dostupnost, okamžité působení a relativně nižší cena. Způsobují však znečištění životního prostředí, a jsou proto nepoužitelné v ekologickém zemědělství. Mohou také zabíjet zástupce ostatních živočišných druhů včetně přirozených predátorů slimáků a v prostředí vlivem vnějších podmínek rychle ztrácejí svoji účinnost.

1.2.2. Biologická agens

K biologickému boji proti *D. reticulatum* je využívána komerčně dostupná patogenní hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Schneider, 1859) (Nematoda: Rhabditidae). Přípravky obsahující *P. hermaphrodita* jsou komerčně dostupné, ale jsou zatím příliš drahé na to, aby se daly používat jako alternativa chemických moluskocidů (Wilson et al. 1993). Nevýhodou používání *P. hermaphrodita* jako biologického agens je, že hlístice napadá i jiné druhy plžů, než je *D. reticulatum* (Wilson et al. 2000). Pro jeho použití je také třeba optimálních podmínek (teplo, vlhkost atd.), aby hlístice nezahynuly. Komerčně je hlístice *P. hermaphrodita* dostupná od roku 1994, kdy byla registrována ve Velké Británii pro použití v zemědělství (Nemaslug®, MicroBio Ltd, UK), od té doby registrace proběhla prakticky ve všech státech Evropy včetně České Republiky (Biocont Laboratory, s.r.o).

1.3. Životní cyklus *Phasmarhabditis hermaphrodita*

Phasmarhabditis hermaphrodita je asi 1 mm velká hlístice živící se bakteriemi. Žije v půdě a vyskytuje se v místech s hojným výskytem plžů. Byla objevena jako parazit *Deroceras reticulatum* ve Velké Británii na Long Ashton (Wilson et al. 1993).

Přežití *P. hermaphrodita* je, stejně jako přežití jeho hostitele, závislé na vlhkosti prostředí (Wilson et al. 1997). Jedinci *P. hermaphrodita* jsou relativně málo pohybliví. Obvykle zůstávají do 2 cm od místa jejich aplikace (Wilson et al. 1997).

Phasmarhabditis hermaphrodita infikuje pouze plže (Wilson et al. 1993).

K infekci dochází během 8 – 16 hodin po expozici. Infekční stádia (dauer larva) s uzavřeným ústním a řitním otvorem vniknou do hostitele dýchacím otvorem v přední části pláště (Tan et Grewal 2001). V plži (v plášťové dutině) pak ze střeva vypustí symbiotické bakterie.

Phasmarhabditis hermaphrodita žije v symbioze s několika různými druhy bakterií. Podle druhu bakterie se liší patogenita a vývoj hlístic v laboratorních podmínkách v *in vitro* kulturách. Pro masovou produkci v monoxenických kulturách *P. hermaphrodita* je používána bakterie *Moraxella osloensis*.

Moraxella osloensis je gram- negativní aerobní bakterie produkující endotoxiny, které nelze zničit teplem ani proteázami a které zabíjí slimáka, pokud jsou injikovány do plášťové dutiny.

Endotoxin je hlavním činitelem zabíjejícím hostitele (Wilson et al. 1993, Tan et Grewal 2002).

Je citlivá na penicilin. Injekce penicilinu a streptomycinu spolu s kulturou *M. osloensis* snižuje patogenitu bakterie vůči hostiteli.

Moraxella osloensis je lidský oportunní parazit a způsobuje řadu onemocnění – např. zánět endokardu a bakteriální zánět kostní dřevě. *Moraxella osloensis* žije saprofytický na kůži a v hleny, vzácně způsobuje infekce. Bylo popsáno 10 případů infekcí cév u pacientů prodávajících léčbu rakoviny (Han et Tarrand 2004).

Phasmarhabditis hermaphrodita se živí bakteriemi a hostitelskou tkání, pomnoží se, rostou a dají vznik hermafroditním jedincům schopných samooplození. Ti potom nakladou vajíčka, z nichž se vyvine další generace hlístic živících se na bakteriálním symbiontovi a hostitelské tkáni. Během prvních 4 dní po infekci se napadený hostitel přestává žít (Glen et al. 1999).

Poté, co došlo k pomnožení hlístic (3. – 4. den po expozici), začínají infikovaní plži umírat. Juvenilní jedinci nové generace se začínají objevovat 5. – 6. den po expozici (Glen et al. 1999), v době, kdy je jejich zdroj potravy spotřebován, a hledají nového hostitele. Dauer larvy jsou schopné množení nejen ve slimákově, ale i v trusu slimáků a v půdě, což dokazuje, že je *P. hermaphrodita* fakultativní parazit (Tan et Grewal 2001).

Ačkoli mohou slimáka usmrtit juvenilní i dospělé hlístice, pokud jsou injikovány do plášťové dutiny, v přírodních podmínkách jsou infekceschopné pouze dauer larvy (Tan et Grewal 2001).

Slimáci jsou schopni detegovat přítomnost *P. hermaphrodita* a vyhýbají se půdě ošetřené parazitickými hlísticemi a konzumaci potravy v těchto oblastech (Wilson et al. 1999).

V experimentech s plochami ošetřenými *P. hermaphrodita* bylo zjištěno, že slimáci byli schopni detegovat *P. hermaphrodita* v koncentracích vyšších než 38 jedinců hlístic/ cm² .

Způsob, kterým slimáci přítomnost *P. hermaphrodita* rozpoznají, je zatím neznámý (Wilson et al. 1999).

Při testování patogenity entomopatogenních háďátek vůči *D. reticulatum* bylo zjištěno, že entomopatogenní hlístice *Steinernema feltidae* a *Heterorhabditis* sp. (používané jako biologická agens proti hmyzím škůdcům) nejsou schopny vniknout do slimáka. I jejich symbiotické bakterie vykazovaly vůči plžimu hostiteli velmi nízkou patogenitu, pokud byly injikovány přímo do plášťové dutiny (Wilson et al. 1994).

Bylo provedeno také několik experimentů testujících citlivost plžích druhů vůči *P. hermaphrodita*:

Při zkoumání zkoumali citlivosti sedmi druhů plžů - *Monacha cantiana* (Montagu, 1803), *Cepaea hortensis* (Müller, 1774), *Discus rotundatus* (Müller, 1774), *Oxychilus helveticus* (Blum, 1881), *Clausilia bidentata* (Shorm, 1765), *Pomatias elegans* (Müller, 1774) a *Deroceras reticulatum* - a při aplikaci doporučené dávky *P. hermaphrodita* nebyla po dvou týdnech úmrtnost plžů v ošetřených nádobách vyšší, než v nádobách neošetřených (Wilson et al. 2000). Výjimkou byl pouze *D. reticulatum*, u kterého způsobily hlístice vyšší úmrtnost. Při aplikaci 5 krát vyššího množství přípravku Nemaslug®, než je doporučené množství, se zvýšila mortalita u *M. cantiana* a *C. hortensis* po třech týdnech. Na jiné pozorované druhy neměly hlístice vliv.

Zjištěné výsledky jsou v kontrastu s předchozí studií (Wilson 2000), kdy byla zkoumána citlivost tří druhů plžů z východní Francie vůči *P. hermaphrodita* : *Theba pisana* (Müller, 1774) čeledi Helicidae, *Cochicella acuta* (Müller, 1774) a *Cernuella virgata* (da Costa, 1778) z čeledi Hygromiidae.

Při tomto experimentu byli plži umístěni v Petriho miskách obsahujících 300 juvenilů *P. hermaphrodita*. Po osmi dnech po expozici uhynulo 80 – 100 % plžů (Coupland 1995). Zdá se, že důležitým faktorem pro citlivost plžů vůči *P. hermaphrodita* je hmotnost plže. Při experimentech s *Helix aspersa* se ukázalo, že zatímco jedinci vážící méně než 1 g jsou infekci náchylní, jedinci těžší než 1 g nikoli. Podobné výsledky byly získány i při experimentech s *Arion ater* agg. (Wilson et al. 2000).

Plži, které infikuje *P. hermaphrodita* (dle Wilson et Gaugler 2000):

Deroceras reticulatum (Agriolimacidae)

Deroceras caruanae (Agriolimacidae)

Arion ater (Arionidae)

Arion intermedius (Arionidae)

Arion distinctus (Arionidae)

Arion silvaticus (Arionidae)

Tandonia budapestensis (Milacidae)

Tandonia sowerbyi (Milacidae)

Monacha cantiana (Hygromiidae)

Lymnaea stagnalis (Lymnaeidae)

Helix aspersa (Helicidae)

Theba pisana (Helicidae)

Ceriuella virgata (Hygromiidae)

Cochlicella acuta (Cochlicellidae)

1.4. Mizení mrtvol bezobratlých živočichů a střevní analýzy

Vzhledem k tomu, že většina zvířat uhyne z jiného důvodu, než je predace (například parazitace, nemoci, dehydratace, hladovění), nebo jsou zkonsumována predátorem jen z části, je většina mrtvol dostupná mrchožroutům. Ve většině suchozemských ekosystémů mrchožrouti odstraní 50 - 100 % zvířecích mrtvol a živění se mrtvolami je důležitou součástí energetického toku v suchozemských biotopech. Mrtvoly bezobratlých živočichů umístěné na povrchu půdy jsou rychle, během několika hodin, odstraněny bezobratlými mrchožrouty (Foltan et al. 2005). Čas, po který zůstává slimáčí mrtvola v poli, je přímo úměrný hmotnosti daného jedince (Foltan et al. 2005).

Hlístice však potřebuje několik dní k dokončení svého vývoje uvnitř mrtvoly. V půdě mizí mrtvoly výrazně pomaleji (Seastedt et al. 1981). Z různých dosud nepublikovaných pozorování (Pavel Foltan, osobní sdělení) se lze domnívat, že plži napadení *P. hermaphrodita* hynou v půdě.

Mršina představuje lehce dostupný zdroj energie (Lang et Gsödl 2001, Foltan et al. 2005). Mrchožrout nevynakládá energii na chycení kořisti a podstupuje menší riziko zranění způsobené obranou kořisti. Velmi účinnou obranu slimáka představuje hojně produkováný sliz. Při útoku na plže znečistí ústní otvor predátora. Ten by se musel před dalším útokem očistit. To snižuje pravděpodobnost útoků pro slimáka smrtelných (Wheater 1898). Z těchto důvodů se mnoho obratlovcích i bezobratlých predátorů běžně živí mrtvolami (Seastedt et al. 1981, Fellers et Fellers 1982, Young 1984, Retana et al. 1991, Bestelmeyer et Wiens 2003, Foltan et al. 2005, De Vault 2003).

Při studiu trofických interakcí pomocí střevních analýz predátorů různými imunochemickými a molekulárními metodami (Symondson 2002a, Foltan 2005) byl *D. reticulatum* často používán jako modelová kořist (Symonson et al. 1996, Foltan et al. 2005, Calder et al. 2005).

Skutečnost, že se fakultativní predátoři živí na mrtvolách *D. reticulatum*, představuje významný problém pro interpretaci výsledků takových analýz (Symondson et Lidell 1993, Symondson 2002a,b, Foltan et al. 2005, Calder et al. 2005).

Bez znalosti dostupnosti mrtvol pro různé predátory a mrchožrouty je nemožné mezi požíváním již mrtvé kořisti a predací úspěšně rozlišovat. To může vést k zásadním omylům při stanovování trofických vztahů mezi organismy, či vlivu predace na populaci kořisti (Foltan et al. 2005; Calder et al. 2005).

Posmrtné analýzy střevního obsahu predátorů a mrchožroutů používající biochemické a molekulárněbiologické technologie jsou využívány pro určování přítomnosti, četnosti příp. síly trofických vztahů. Takové analýzy ale nerozlišují mezi potravou, která byla pozřena jako mršina, nebo která byla chycena jakožto kořist, což může vést ke značnému zkreslení výsledku. Pro stanovení velikosti takového zkreslení je nezbytně nutné znát distribuci, četnost a dostupnost živé i mrtvé kořisti pro potenciálního predátora či mrchožrouta.

1.5. Manipulace hostitele parazitem

Manipulace hostitele parazitem je jev, kdy parazit manipuluje chování svého hostitele, aby zvýšil pravděpodobnost přenosu na další hostitele (Klein 2004, Thomas et al. 2005).

Parazit může měnit chování, morfologii, nebo fyziologii, případně i výběr prostředí, ve kterém se hostitel zdržuje (Thomas 1999, Poulin et Moore 2002, Thomas et al. 2005).

Předpoklad, že jsou paraziti schopni manipulovat chování svého hostitele se objevil již počátkem dvacátého století (např. Wesenburg et Lind 1931, Cram 1931).

Poprvé fenomén průkazně popsali Bethel a Holmes (1973, 1977). Provedli laboratorní experimenty s vrtejšem *Polymorphus paradoxus* a jeho mezihostitelem, blešivcem *Gammarus lacustris*. Prokázali vyšší riziko pozření infikovaných *G. lacustris* kachnami, které jsou definitivními hostiteli *P. paradoxus* (Thomas 2005).

Paraziti ovlivňují chování svého hostitele buď přímo, nebo nepřímo. Přímo ovlivňuje parazit hostitele přímou interakcí s jeho (hostitelovým) nervovým systémem, nebo se svaly. Mezi ovlivnění nepřímé se řadí postižení jiných částí hostitelova těla, než je nervový systém a svaly. Přítomnost parazita například ovlivní vývoj, metabolismus, nebo imunitu, což sekundárně vede ke změně chování hostitele.

Měněna může být celá řada vlastností (vzhled, chování) v závislosti na způsobu přenosu parazita.

Troficky přenášení paraziti ovlivňují hostitele tak, aby se zvýšila pravděpodobnost pozřením definitivním hostitelem. Tak je tomu u již zmíněného blešivce *G. lacustris* a jeho parazita *P. paradoxus*. Infikovaní blešivci mají při vyrušení tendenci přichytávat se na vegetaci, a stávají se tak snadnou kořistí kachen (definitivních hostitelů *P. paradoxus*). Podobnou strategii užívá *Toxoplasma gondii*. Toxoplasmou nakažená myš neprojevuje strach, pokud ucítí pach kočky (definitivního hostitele) a i její útěkové reflexy jsou pomalejší (Zimmer 2005).

Pokud je přenos závislý na chování typické pro samice, pak parazit feminizuje samce, jak je tomu například u strunic. Samice kořenohlavce, *Sacullina carcini*, svého krabího hostitele kastruje a nutí ho starat se o jeho (parazitova) vajíčka, jako by to byla vajíčka hostitelova. A to i v případě, že hostitelem je samec.

Parazitická vosička donutí svého pavoučího hostitele (i samce, kteří normálně kokony nevytvářejí) usnovat zámotek, který chrání vosí kukly před vnějšími vlivy (Thomas 2005). Strunovci, jejichž larvy parazitují na suchozemských členovcích, nutí svého hostitele skočit do vody, tam svého hostitele opustí, dospívají a páří se (Biron et al. 2005).

2. Cíle práce

- 1) Zpracování důkladné literární rešerše na dané téma.
- 2) Stanovení vlivu infekce *Phasmarhabdits hermaphrodita* na chování hostitele *Deroceras reticulatum*.
- 3) Ověření manipulativní hypotézy- vliv infekce na prostorovou distribuci hostitele s ohledem na ohrožení hlístice potenciálními predátory/ mrchožrouty infikovaného hostitele/mrtvoly.
- 4) Porovnání dostupnosti mrtvol *D. reticulatum* usmrcených různými způsoby pro potenciální bezobratlé predátory/mrchožrouty s ohledem na použití při kalibraci střevních analýz.

3. Materiál a metodika

3.1. Slimáci:

Dospělé jedince *Deroceras reticulatum* jsem sbírala na polích a lukách v okolí Českých Budějovic od července do října 2006. Slimáci byli uchováváni v kontrolovaných podmínkách (L:D: 8: 16, 20 °C) na vrstvě vlhké standardizované zeminy (AROS sro.) a krmení listy *Taraxacum* sp.

Vlhká zemina umožnila plnou hydrataci slimáků před započítím experimentu.

Před označením jsem slimáky umístila do Petriho misky a na přibližně půl hodiny uložila do lednice, abych snížila jejich pohybovou aktivitu.

3.2. Barvivo:

UV fluorescentní barvivo pro značení slimáků jsem připravila rozpuštěním jednoho dílu práškové Radglo JST UV fluorescentní barvy (Radiant color N.V.) v deseti dílech polyetylenglykolu o průměrné $M_r = 400 \text{ g.mol}^{-1}$ (Sigma- Aldrich) za pomoci laboratorní třepačky Vortex. Vzniklý roztok jsem smíchala s fyziologickým roztokem (0,5 g NaCl na 100 ml vody) v poměru 1:1 dle Foltan 2007 (zasláno do tisku).

3.3. Značení:

Před značením jsem si připravila plastové nádoby (9 x 6 x 5 cm) obsahující 0,5 cm silnou vrstvu navlhčené zeminy a listy pampelišky, inzulínovou injekční stříkačku s připraveným UV fluorescentním barvivem, vatovou tyčinku a papírové ubrousky na manipulaci se slimáky (obr. 3.a).

Slimáky jsem značila na Petriho misce, ve které byli v lednici (obr. 3.b)

Samotné značení jsem prováděla následovně: Slimáka jsem přidržela za přední část shora papírovým ubrouskem a vpíchlá mu cca 10 μl barviva pod pokožku zadní části těla (obr. 3.c, 3.d).

Po označení (obr. 3.e) jsem slimáky jednotlivě přemístila do připravené nádoby. Nádobu jsem zavřela a ponechala v místnosti, kde jsem slimáky značila, 2 - 3 dny.

V předběžném experimentu jsem slimáky zkoušela ihned po barvení přemísťovat do klimatizovaného boxu, ale v důsledku stresu vykazovali větší úmrtnost, než když jsem je bezprostředně po značení nepřemísťovala.

Následující 3 dny jsem pokusné jedince pozorovala a zaznamenávala úhyny.

Postup značení *Deroceras reticulatum* UV fluorescentním barvivem (obr. 3.a- 3.e)



Obr. 3.a



Obr. 3.b



Obr. 3.c



Obr. 3.d



Obr. 3.e

3.4. Předběžný experiment:

V předběžném experimentu jsem testovala přežívání značených slimáků oproti kontrole.

Použila jsem 40 jedinců *Deroceras reticulatum*.

Dvacet jedinců jsem označila UV fluorescenční barvou a umístila do plastové nádoby (stejně podmínky jako v předchozím bodě).

Kontrolní skupinu jsem umístila do stejné nádoby se stejnými podmínkami.

V průběhu následujícího měsíce jsem zaznamenávala úhyny slimáků.

3.5. Podmínky vlastního experimentu:

Do pokusných průhledných plastových nádob (výška: 27 cm, průměr: 7,5 cm) jsem nasypala asi 14 cm zeminy, nasela ječmen (cca 25 semen/nádoba) a zasypala další zeminou tak, aby zemina tvořila v nádobě 15 cm vysoký sloupec. Nádobu jsem do výšky 15ti cm

polepila černým neprůsvitným papírem, aby světlo neprocházelo do vrstvy zeminy a neovlivňovalo tak chování pokusných zvířat. (obr. 3.f).

Naseté obilí v nádobách jsem zalila asi 2 - 3 dcl vody. Obilí obvykle vyklíčilo za 5 - 8 dní. Během pokusu jsem zabraňovala úniku slimáků z pokusných nádob pomocí upevněné sítěky proti hmyzu.



Obr. 3.f

3.6. Hlavní experiment:

Označené slimáky, kteří přežili značení barvou a nevykazovali žádné známky poškození, jsem umístila do pokusných nádob (1 jedinec do 1 nádoby) a ponechala je 4 – 5 dní, aby si zvykli na podmínky a našli si úkryty (vzhledem, že se slimáci k ránu vracejí do stejných úkrytů, ze kterých se večer vydali za potravou (Taylor 1902- 1907 ex Grewal et al. 2001), a které jsou schopni detegovat i na větší vzdálenosti (Rollo et Wellington 1981 ex Grewal et al. 2001)). Po uplynutí doby určené na aklimatizaci jsem slimáky usmrtila šesti různými způsoby: třemi typy moluskocidů, simulací zranění pocházejícího z neúspěšné predace a dvěma různými aplikacemi hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nemaslug®). Pro každý způsob usmrcení bylo použito 15 opakování.

Komerčně dostupné chemické moluskocidy, Ferramol (W. Neuedorff GmbH KG, účinná látka fosforečnan železitý), Mesurol (Bayer AG, účinná látka methiocarb) a Vanish Slug Pellets (TransChem Professional BV, účinná látka metaldehyd), byly aplikovány v koncentraci doporučené výrobcem.

Neúspěšnou predaci jsem simulovala nastřížením slimáka nůžkami tak, abych zasáhla hepatopankreas.

Experimenty s *P. hermaphrodita* jsem prováděla ve dvou modifikacích:

1) Přípravek s parazitickými hlísticemi Nemaslug® jsem aplikovala po rozpuštění ve vodě na půdu, přímo do pokusných nádob se slimáky, v doporučené koncentraci 3×10^9 hlístic/ ha⁻¹.

2) Vytvořila jsem na Petriho misce roztok se vysokou koncentrací *P. hermaphrodita* umístila tam slimáky na 20 - 30 minut. Slimáky jsem pak očistila vodou a přemístila do pokusných nádob

Před každou aplikací přípravku Nemaslug® jsem se pomocí binokulární lupy přesvědčila, jsou- li hlístice živé.

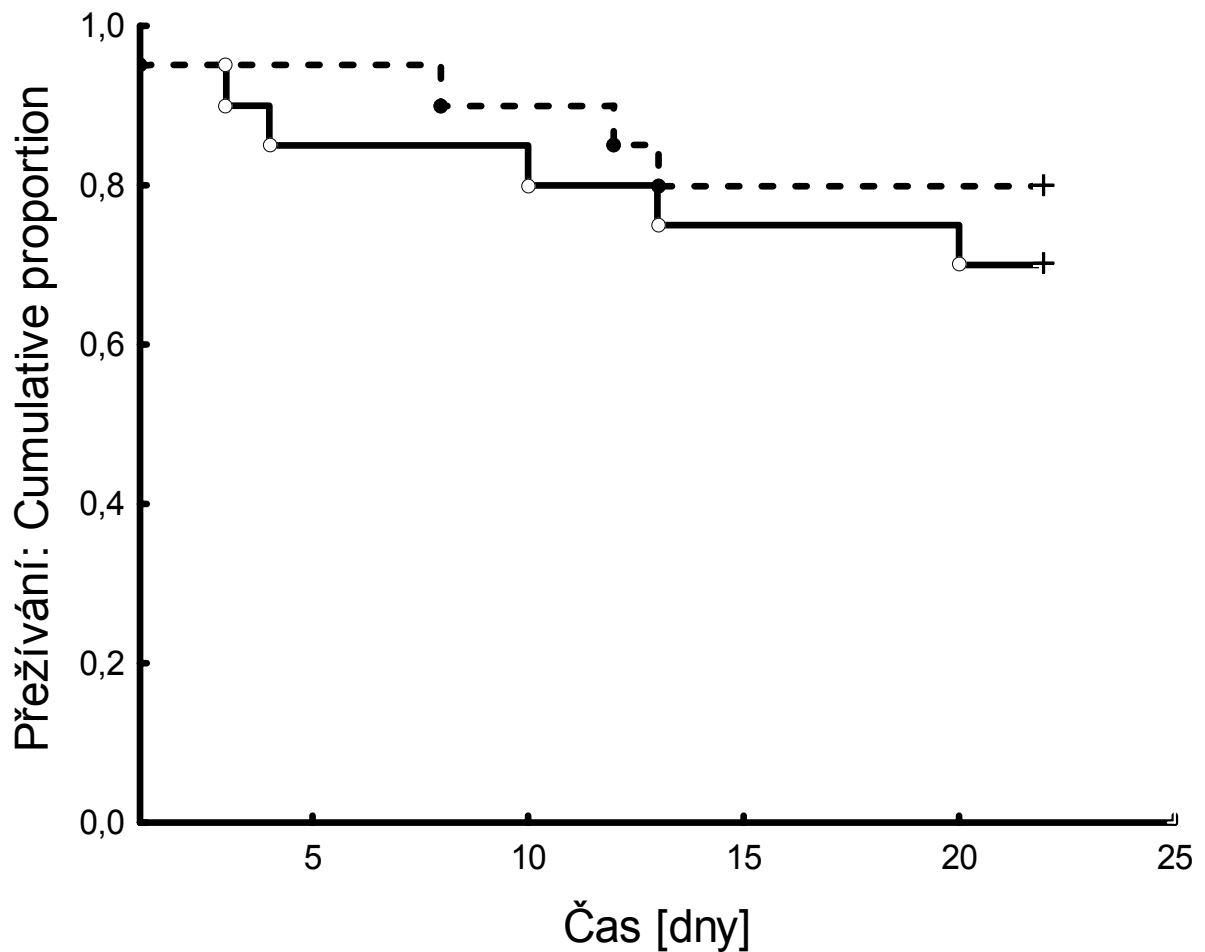
3.7. Lokalizace mrtvol:

Po sedmi dnech od aplikace moluskocidů jsem kontrolovala pokusné nádoby. V případech, kdy nebylo mrtvol možné najít pouhým okem, jsem používala přenosnou UV lampu, umožňující snadnou lokalizaci slimáků označených UV fluorescentním barvivem.

Pozice uhynulých slimáků jsem zahrnula do tří kategorií: i) vegetace nebo stěny nádoby, ii) povrch půdy, iii) pod povrchem. Byla zaznamenána i přesná vertikální pozice (výška nad zemí a hloubka pod povrchem), nicméně tato informace se ukázala nadbytečnou díky extrémně malé variabilitě uvnitř jednotlivých kategorií.

V případech aplikace přípravku Nemaslug® jsem mrtvolu pitvala. Mrtvolu slimáka jsem na Petriho misce zalila menším množstvím vody a pomocí binokulární lupy hledala přítomnost hlístic, abych se ujistila, že smrt byla způsobena aplikací *P. hermaphrodita*, a ne jinými okolnostmi (suboptimální podmínky atp.).

4. Výsledky



Obr. 4.0.1. Křivka přežívání (Cox proportional hazard regressions) pro jedince *D. reticulatum* označené UV fluorescentní barvou (plná čára, N = 20) a kontrolní skupinu (přerušovaná čára, N = 20).

4.1. Vlastní experiment

Prostorová distribuce slimáčích mrtvol se významně lišila mezi jednotlivými způsoby usmrcení ($M-L \chi^2 f = 24.31, df = 10, p < 0.01$). Distribuce slimáčích mrtvol se nelišila uvnitř skupiny obsahující usmrcení třemi typy moluskocidů a simulací neúspěšné predace pomocí nastřížením nůžkami. Tato skupina byla v následných analýzách použita jako skupina kontrolní.

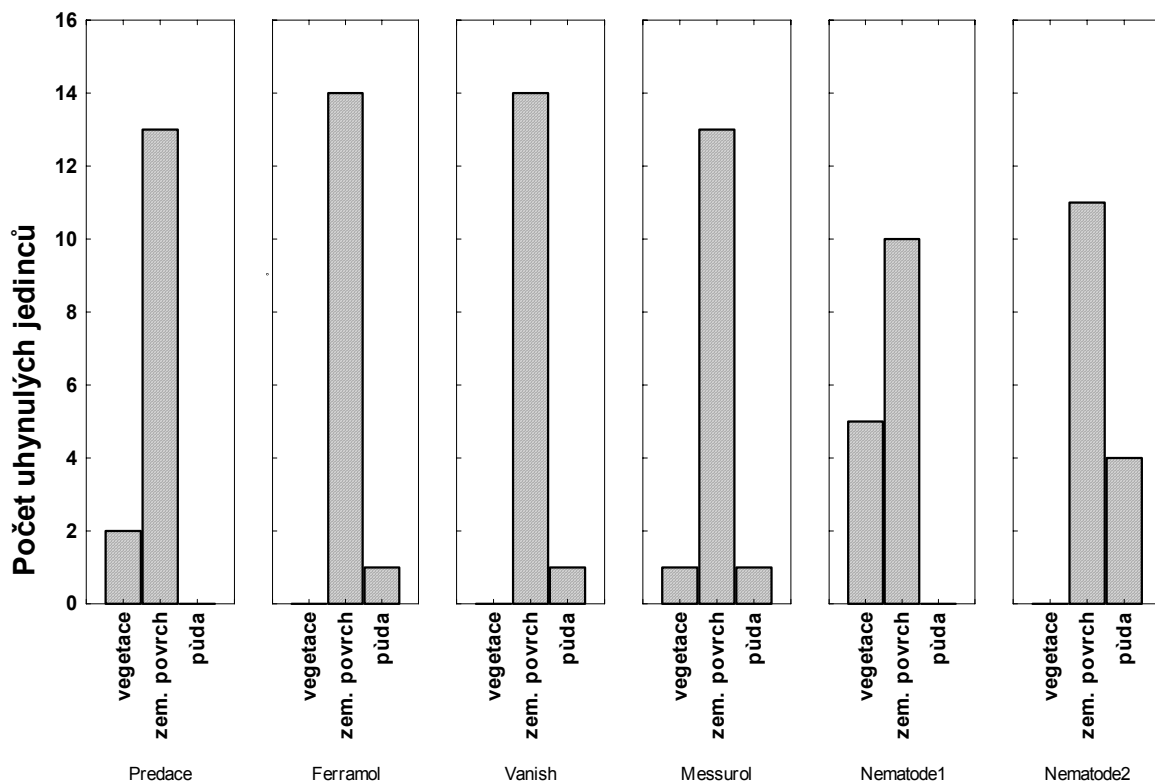
Bez ohledu na způsob usmrcení, většina mrtvol zůstala na povrchu půdy.

V případech, kde jsem použila *P. hermaphrodita* (Nemaslug®) se pozice slimáčích mrtvol lišily od kontrolní skupiny následujícím způsobem:

1) V experimentech, kde jsem Nemaslug® aplikovala po rozpuštění ve vodě na půdu, přímo do pokusných nádob se slimáky, slimáci hynuli průkazně častěji na stěnách nádob a na vegetaci, než tomu bylo u slimáčků kontrolní skupiny (M-L χ^2 f = 9.0, df = 2, p < 0.05).

2) V experimentech, kde jsem slimáky infikovala na Petriho misce a poté je přemístila do pokusné nádoby neobsahující hlístice, hynuli slimáci pod zemským povrchem průkazně častěji, než tomu bylo u kontrolní skupiny (M-L χ^2 f = 6.39, df = 2, p < 0.05).

Prostorová distribuce slimáčích mrtvol se tudíž průkazně lišila mezi oběma experimenty, kde jsem aplikovala *P. hermaphrodita* (M-L χ^2 f = 12.52, df = 2, p < 0.05).



Obr.4.1.1. Pozice uhynulých *D. reticulatum* v závislosti na typu usmrcení

5. Diskuse

Hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita* je udávána jako biologický přípravek proti plžům, který neinfikuje necílové organismy kromě plžů, přičemž více náchylní jsou vůči infekci plži nazí, než ulitnatí (Wilson et al. 2000).

Větší míra úmrtnosti nahých plžů na infekci *P. hermaphrodita*, než je tomu u plžů ulitnatých, může být způsobena tím, že ulitnatí plži netráví tolik času v úkrytech pod zemí, nebo u země, jako nazí plži, takže je u nich menší riziko infekce hlísticí (Wilson 2000). Ulitnatí plži estivují na vegetaci na rozdíl od plžů nahých.

Sama se též domnívám, že roli v menším riziku napadání ulitnatých plžů hlísticemi by mohla hrát poloha dýchacího otvoru v klidovém stavu: Zatímco u většiny ulitnatých plžů je zatažen hluboko v ulitě, u nahých je přístupný.

Experimenty ukázaly, že se distribuce mrtvol *Deroceras reticulatum* průkazně liší v závislosti na způsobu jejich usmrcení.

V experimentech, kde jsem aplikovala tři druhy chemických moluskocidů, zůstávaly mrtvoly *D. reticulatum* na povrchu půdy a mezi jednotlivými moluskocidy nebyly žádné rozdíly. Stejně výsledky v rozmístění mrtvol *D. reticulatum* jsem získala v případě, kdy jsem simulovala neúspěšnou predaci.

Výsledky obou experimentů s použitím *P. hermaphrodita* se lišily od ostatních i od sebe navzájem, tak oproti experimentům s jinými typy usmrcení.

Vysvětluji to tak, že na rozdíl od usmrcení chemickým moluskocidem nebo jiného rychlého usmrcení je úhyn způsobený infekcí *P. hermaphrodita* velmi pomalý. Pomalý postup infekce poskytuje slimákovi čas na infekci reagovat (pokusit se vyhnout se dalším larvám, které zvyšují pravděpodobnost smrti) a umožňuje parazitovi ovlivňovat chování svého hostitele tak, aby zvýšil pravděpodobnost dokončení svého životního cyklu.

Zatímco chemické moluskocidy působí během relativně krátké doby (v experimentech byli slimáčky mrtví do druhého dne po aplikaci moluskocidu), hlístici *P. hermaphrodita* trvá několik dní, než svého hostitele usmrtí, a ten má více času zahrabat se do půdy.

Vzhledem k tomu, že *D. reticulatum* je schopný zaznamenat přítomnost *P. hermaphrodita*, pokud jeho koncentrace přesáhne koncentraci asi 38 hlístic/cm² (Wilson et al. 1999), a vyhýbá se půdě ošetřené touto parazitickou hlísticí, není převažující množství úmrtí slimáčků na stěnách nádoby se substrátem kontaminovaným *P. hermaphrodita* překvapením.

Pokud jsem slimáčky infikovala na Petriho misce, omyla a pak umístila do pokusné nádoby, signifikantně větší počet uhynulých *D. reticulatum* se nacházel v půdě. A to i přes to, že stejně při experimentu se simulací predace neměli čas na aklimatizaci v pokusné nádobě (ze stejných důvodů, jako u simulované predace).

Výsledky experimentů ukazují, že *P. hermaphrodita* s vysokou pravděpodobností manipuluje svého plžního hostitele, aby ten zalezl do půdy.

Pro hlístici je výhodné, aby její hostitel zalezl do půdy ze dvou důvodů:

- 1) V půdě je riziko požití hostitele mrchožroutem pohybujícím se po povrchu země menší, než na povrchu půdy.
- 2) V půdě jsou pro hlístici vhodnější podmínky než na povrchu půdy, kde by byla méně chráněna před vyschnutím a ostatními povětrnostními vlivy (Gordon Port, osobní sdělení). U většiny dosud známých manipulací manipuluje parazit svého hostitele, aby ten byl sežrán dalším hostitelem.

Phasmarhabditis hermaphrodita se svým manipulačním chováním podobá spíš parazitoidům. Svého hostitele před nepříznivými podmínkami chrání, aby se mohlo potomstvo (parazita) vyvinout.

Pravděpodobně by mohlo jít o obdobnou manipulaci, jako je tomu u parazitické vosy manipulující chování svého pavoučího hostitele (viz. úvod), nebo u strunovců vyvíjejících se v suchozemských členovcích (viz. úvod), kdy parazit manipuluje chovní hostitele tak, aby ten vytvořil vhodné podmínky pro parazita, nebo se snažil se do prostředí vhodného pro další vývoj parazita dostat.

Bude sice nutné hypotézu ještě prověřovat dalšími testy zohledňujícími především délku hynutí plže, ale statisticky vysoce průkazné výsledky dosud provedených experimentů hovoří pro její podporu.

Abych si byla jistá správností hypotézy, chtěla bych vyloučit nebo alespoň co nejvíc snížit možnost ovlivnění nejrůznějšími vlivy, které jsou patrné hlavně v experimentu, kde jsem simulovala neúspěšnou predaci.

To, jak moc je simulace neúspěšné predace „přirozený“ způsob smrti, je problematické, stejně jako to, jakým způsobem uhynie většina slimáků v přirozených podmínkách.

Je velmi pravděpodobné, že slimáci ve venkovních podmínkách „přirozeným“ způsobem (stářím, na zranění) téměř nehynou. Staří či oslabení jedinci pravděpodobně uhynou na infekci, nebo je uloví predátor.

Mému záměru by pravděpodobně vyhovovalo izolovat z hlístic bakterii *Moraxella osloensis*, namnožit a injekčně vpravit do slimáka, vzhledem k tomu, že činitelem zabíjejícím plže je

právě bakteriální toxin. Rozdíl mezi polohou hostitelů usmrčených bakterií samotnou a bakterií s z háďat by jednoznačně manipulaci prokázal. V opačném případě (bakterie i hlístice by měly na chování hostitele stejný účinek) by se výsledky nedaly interpretovat jako prokázaná manipulace. Stejně tak by se ale manipulativní hypotéza nedala zavrhnout.

6. Literatura

- Barker G.M. 2002: Molluscs as Crop Pests. Wallingford, CABI Publishing, 558 pp
- Bestelmeyer B.T., Wiens J.A. 2003: Scavenging ant foraging behavior and variation in the scale of nutrient redistribution among semi-arid grasslands. *Journal of Arid Environments* 53, 373-386
- Brown S.P. 2005: Do all parasites manipulate their host? *Behavioural Processes* 68, 237-240
- Coupland J.B. 1995: Susceptibility of helioid snails to isolates of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* from southern France. *Journal of Invertebrate Pathology* 66, 207-208
- Calder C.R., Harwood J.D., Symondson W.O.C. 2005: Detection of scavenged material in the guts of predators using monoclonal antibodies: a significant source of error in measurement of predation? *Bulletin of Entomological Research* 95, 57-62
- De Vault L.T., Rhodes O.E., Shivik J.A. 2003: Scavenging by vertebrates: behavioral, ecological and evolutionary perspectives on an important energy transfer pathway in terrestrial ecosystems. *Oikos*, 102, 225-234
- Fellers G.M., Fellers J.M. 1982: Scavenging rates of invertebrates in an eastern deciduous forest. *American Midland Naturalist*, 107, 389-392
- Foltan P., Sheppard S., Konvicka M., Symondson W.O.C. 2005: The significance of facultative scavenging in generalist predator nutrition: detecting decayed prey in the guts of predators using PCR. *Molecular Ecology*, 14, 4147-4158
- Foltan P., Půža V.: Living in the host which does not exist: Two different pathogenic nematodes defend their host cadaver from being scavenged (in press)
- Glen D.M., Wilson M.J. 1997: Slug-parasitic nematodes as biocontrol agents for slugs. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 8, 23-27
- Glen D.M., Wilson M.J., Brain P., Stroud G. 2000: 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
- Godan D. 1983: Pest slugs and snails: Biology and control. Springer-Verlag, Berlin, 445 pp
- 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

- Han X.Y., Tarrand J.J. 2004: *Moraxella osloensis* blood and catheter infections during anticancer chemotherapy: clinical and microbiologic studies of 10 cases. *American Journal of Clinical Pathology*, 121, 581–187
- Hommay G., Lorvelec O., Jacky F. 1998: Daily activity rhythm and use of shelters in the slugs *Deroceras reticulatum* and *Arion distinctus* under laboratory conditions. *Annals of Applied Biology*, 132, 167-185
- 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
- Klein S.L. 2004: Parasite manipulation of host behavior: mechanisms, ecology, and future directions. *Behavioural Processes*, 68, 219-221
- Langan A.M., Pilkington G., Wheeler C.P. 2001: Feeding preferences of a predatory beetle (*Pterostichus maditus*) for slugs exposed to lethal and sub-lethal dosages of metaldehyde. *Entomologica Experimentalis et Applicata*, 98, 245-248
- Langan A.M., Taylor A., Wheeler C.P. 2004: Effects of metaldehyde and methiocarb on feeding preferences and survival of a slug predator (*Pterostichus melanarius* (F.): Carabidae, Pterostichini), *Journal of Applied Entomology*, 128, 51-55
- Lang A., Gsödl S. 2001: Prey vulnerability and active predator choice as determinants of prey selection: a carabid beetle and its aphid prey. *Journal of Applied Entomology*, 125, 53- 61
- Pfleger V. 1988: Měkkýši. *Artia*, 96 pp
- Port C.M., Port G.R. 1986: The biology and behaviour of slugs in relation to crop damage. *Agricultural Zoology Reviews*, 1, 253-299
- Poulin R. 1995: „Adaptive“ Changes in the Behaviour of Parasitized Animals: A Critical Review. *International Journal of Parasitology*, 25, 12, 1371-1383
- Poulin R. 2005.: Manipulation of host behavior by parasites: a weakening paradigm? *Behavioural Processes*, 68, 205-210
- Purvis G. 1996: The hazard posed by methiocarb slug pellets to carabid beetles understanding population effects in the field. 1996 BCPC Symposium: Proceedings No. 66, Slugs and Snail Pests in Agriculture, Ed. by Henderson I. F. Thornton Heath: British Crop Protection Council, 189-196
- Retana J., Cerdá X., Espadaler X. 1991: Arthropod corpses in a temperate grassland: a limited supply? *Holarctic Ecology*, 14, 63-67

Rollo C.D., Wellington W.G. 1981: Environmental orientation by terrestrial Mollusca with particular reference to homing behaviour, *Canadian Journal of Zoology*, 59, 225-239

van Rozen K.E.A., Molendijk L.P.G. 2003: Field experiments using the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* or salt as control measures against slugs in green asparagus. *Crop Protection*, 22, 5, 689-695 (7)

Seastedt T.R., Mameli L., Gridley K. 1981: Arthropod use of invertebrate carrion. *The American Midland Naturalist*, 105, 124-129

Schley D., Bees M.A. 2003: Delay dynamics of the slug *Deroceras reticulatum*, an agricultural pest. *Ecological Modelling*, 162 (3), 177-198

South A. 1992: *Terrestrial Slugs, biology, ecology and control*. Chapman & Hall, London, UK

Symondson W.O.C. 2002a: Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 11, 627-641

Symondson W.O.C. 2002b: Diagnostic techniques for determining carabid diets. *The Agroecology of Carabid Beetles*, 137-164

Symondson W.O.C., Liddell J.E. 1993: Differential antigen decay-rates during digestion of molluscan prey by carabid predators. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 69, 277-287

Tan L., Grewal S. 2001: Infection behavior of the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* to grey garden slug *Deroceras reticulatum*. *Journal of Parasitology*, 87 (6), 1349-1354

Tan L., Grewal S. 2002: Endotoxin activity of *Moraxella osloensis* against the Grey Garden slug, *Deroceras reticulatum*, *Applied and environmental microbiology*, 68 (8), 3943-3947

Thomas F., Adamo S., Moore J. 2005: Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behavioural Processes*, 68, 185-199

Taylor J.W. 1902- 1907: *Monograph of the Land Freshwater Mollusca of the British Isles (Testacellidae, Limacidae, Arionidae)*, Taylor Brothers, Leeds, 8- 13

Wilson M.J., Glen D.M., George S.K. 1993: 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., Hughes L.A., Pearce J.D., Rodgers P.B. 1994a: 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., 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., George S.K., Hughes L.A. 1995: Biocontrol of slugs in protected lettuce using the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*, *Biocontrol Science and Technology* 5 (2), 233-242
- Wilson M.J., Hughes L.A., Jefferies D., Glen D.M. 1999: Slugs (*Deroceras reticulatum* and *Arion ater* agg.) Avoid Soil Treated with the Rhabditid Nematode *Phasmarhabditis Hermaphrodita*. *Biological Control*, 16, 170-176
- Wilson M. J., Huges L.A, Hamacher G.M., Glen D.M. 2000: Effects of *Phasmarhabditis hermaphrodita* on non-target molluscs. *Pest Management Science*, 56, 711-716
- Wilson M., Gaugler R. 2000: *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae), *Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America* (Cornell University)
- Wilson M.J., Glen D.M., Hamacher G.M., Hamacher G.M. 2004: A model to optimise biological control of slugs using nematode parasites. *Applied Soil Ecology*, 26 (3), 179-191
- Wheater C.P. 1898: Prey detection by some predatory Coleoptera (Carabidae and Staphylinidae). *Coleopterists Bulletin*, 45, 371- 378
- Young O.P. 1984: Utilization of dead insects on the soil surface in row crop situations. *Environmental Entomology*, 13, 1346-1351
- Young A.G., Port G.R. 1991: The influence of soil-moisture content on the activity of *Deroceras reticulatum* (Müller), *Journal of Molluscan Studies*, 57, 138-140
- Zimmer K. 2005: Vládce parazit, Paseka, Litomyšl, 262pp.

7. Přílohy

7.1. Materiál:

Moluskocidy:

FERRAMOL- účinná látka: fosforečnan železitý (10 g/ kg)

-výrobce: W. Neuedorff GmbH KG, Postfach 1209, D- 31857 Emmerthal,
Německo

-distributor pro ČR: AGRO CS a.s., 55203 Česká Skalice

MESUROL Schneckenkorn- účinná látka: methiocarb (2 %)

- výrobce: Bayer AG, Leverkusen, Německo

- distributor pro ČR: AgroBio Opava s.r.o

VANISH SLUG PELLETS- účinná látka: metaldehyd (4 %)

- výrobce: Agrochema družstvo Studenec

(- držitel povolení: TransChem Professional BV, Amsterdam,
Holandsko)

NEMASLUG- účinná látka Phasmarhabditis hermaphrodita

- výrobce: Biocont laboratory s. r. o., Šmahova 66, 62700 Brno- Slatina

Obilí:

AROS, Osiva s.r.o., Klášterec nad Ohří

7.2. Abstrakt

Infekční stádia moluskicidní hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita* nesou symbiotickou bakterii, která způsobuje smrt plžiho hostitele.

Hlístice se následně živí na množících se bakteriích a hostitelské tkáni, vyvíjejí se a opakovaně se množí. Jakmile je zdroj potravy spotřebován, nová infekční juvenilní stádia se symbiotickou bakterií opouštějí mrtvolu a hledají nového hostitele.

Mrtvoly bezobratlých živočichů umístěné na povrchu půdy jsou rychle (během několika minut až hodin), odstraněny bezobratlými mrchožrouty. Parazitické hlístice však potřebují několik dní k dokončení svého vývoje uvnitř mrtvoly.

Ze srovnání pozic slimáků usmrčených šesti různými způsoby je zřejmé, že *P. hermaphrodita* je schopno ovlivňovat chování svého hostitele tak, aby se snížila pravděpodobnost, že tento bude sežrán dřív, než parazit dokončí svůj životní cyklus.