

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Vliv symbiotických bakterií na mezidruhovou kompetici  
vybraných druhů entomopatogenních hlístic  
(Steinernematidae: Nematoda).**

Bakalářská práce

**Diana Čápková**

Školitel: RNDr. Vladimír Půža, Ph.D.

České Budějovice 2014

Čápková D. (2014): Vliv symbiotických bakterií na mezidruhovou kompetici vybraných druhů entomopatogenních hlístic (Steinernematidae: Nematoda). [The effect of bacterial symbionts on the interspecific competition of selected entomopathogenic nematode species (Steinernematidae: Nematoda). Bc. Thesis, in Czech] – 36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:** The aim of the present study was to summarize present knowledge on the interspecific competition of entomopathogenic nematodes. In the experimental part the role of bacterial symbionts on the interspecific competition of the selected steinernematid species was investigated.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice 23.4.2014

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat mému školiteli Vladimíru Půžovi za cenné rady, ochotu, čas, poskytnutí odborné literatury a za jakoukoli jinou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat Jiřímu Nermuťovi za pomoc při měření délky těla a obsahu tuku hlístic, ale i jinou pomoc. Paní Lence Kropáčkové a Zdeňkovi Mráčkovi vděčím za pomoc v laboratoři. Na závěr bych chtěla poděkovat všem ostatním, kteří mě jakkoliv podpořili.

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>3</b>
2.1. Systematické zařazení skupiny .....	3
2.2. Morfologie .....	3
2.3. Biologie a životní cyklus .....	4
2.3.1. Adaptace hlístovek pro život v půdě a detekce hostitele .....	4
2.3.2. Lokalizace, průnik a usmrcení hostitele .....	4
2.3.3. Životní cyklus hlístovek .....	4
2.3.4. Strategie hlístovek při napadání hostitele .....	5
2.4. Hostitelské spektrum .....	6
2.4.1. Mezidruhové rozdíly .....	7
2.5. Symbiotické bakterie .....	8
2.5.1. Taxonomie .....	8
2.5.2. Symbióza s hlístovkami .....	8
2.6. Hlístovky v biologické kontrole .....	9
2.6.1. Význam .....	9
2.6.2. Aplikace .....	10
2.7. Kompetice .....	10
2.7.1. Obecné pojetí kompetice .....	10
2.8. Kompetice u EPN .....	12
2.8.1. Vnitrodruhová kompetice .....	12
2.8.2. Mezidruhová kompetice .....	12
<b>3. METODIKA</b> .....	<b>16</b>
3.1. Použité hlístice .....	16
3.1.1. Izolace bakterií .....	16
3.1.2. Příprava axenických hlístic .....	16
3.1.3. Izolace a sterilizace vajíček hlístic .....	16
3.1.4. Nanesení hlístic a bakterií na agarové plotny .....	17
3.1.5. Pozorování vývoje hlístic na agarových plotnách .....	17
3.1.6. Sklizení hlístic z agarových ploten .....	18
3.1.7. Měření velikosti hlístic a obsahu tuku .....	18
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>19</b>
4.1. Vliv bakterií na růst <i>S. feltiae</i> ENT a <i>S. affine</i> J006 .....	19

4.2. Vliv bakterie na kvalitu invazních larev .....	20
4.3. Kompetice <i>S. feltiae</i> ENT a <i>S. affine</i> V .....	21
<b>5. Diskuse .....</b>	<b>23</b>
5.1. Vliv bakterií na vývoj hlístovek .....	23
5.2. Vliv bakterií na kvalitu invazních larev .....	24
<b>6. Závěry .....</b>	<b>26</b>
<b>7. Použitá literatura:.....</b>	<b>27</b>

# 1. ÚVOD

Entomopatogenní hlístice čeledi Steinernematidae, takzvané hlístovky (Mráček a Weiser, 1988), jsou významní parazité hmyzu, kteří se vyskytují v půdních ekosystémech po celém světě (Stuart et al., 2005). Tito parazité jsou také významní tím, že dokáží žít v symbióze s bakterií (Akhurst a Boemare, 1988).

Hlístovky vynikají oproti jiným entomoparazitickým hlísticím svou jedinečnou životní strategií, a to střídáním parazitismu a saprofytismu. Jako parazité napadnou hostitele a poté ho pomocí symbiotických bakterií zabijí a jako saprofyty se na něm množí a vyvíjejí (Poinar, 1979). Díky této vlastnosti a mimo jiné díky jejich dlouhé životnosti, snadné, levné a bezpečné kultivaci (Lewis et al., 2005) jsou používány v biologické kontrole celé škály hmyzích škůdců (Weiser a Mráček, 1988). Jsou hromadně množeny a úspěšně používány na trhu jako komerční přípravky k ochraně rostlin (Weiser a Mráček, 1988). Vzhledem ke stále sílícímu zájmu o bezpečné a k prostředí šetrné produkty lze do budoucna očekávat další růst užívání hlístovek v ochraně rostlin.

Možnost využití hlístovek v biologické ochraně rostlin nastartovala v posledních třiceti letech intenzivní výzkum této skupiny. Stále však zůstává řada neprobádaných oblastí, z nichž jednou je mezidruhová kompetice hlístovek.

Jelikož se hlístovky v přírodě často vyskytují v druhových směsích (Amarasinghe et al., 1994; Stuart a Gaugler, 1994; Campbell et al., 1995; Sturhan, 1999) a patrně se nebrání směsným infekcím s jinými druhy (Bovien, 1937; Koppenhöfer et al., 1995; Koppenhöfer a Kaya, 1996a), dochází k mezidruhové kompetici pravděpodobně i v přirozeném prostředí. Vliv této kompetice na entomopatogenní hlístice není známý, patrně může hlístovky negativně ovlivňovat (Alatorre-Rosas a Kaya, 1990; Kaya a Koppenhöfer, 1996). Není přesně známo, co rozhoduje o výsledku mezidruhové kompetice, ale vliv má bakteriální symbiont (Půža a Mráček, 2009).

Poznání vlivu mezidruhové kompetice na entomopatogenní hlístice má význam jak z hlediska teoretického, kdy přináší mnoho obecných informací o vztazích mezi parazity i z hlediska ochrany přírody, kdy umožní hodnocení vlivu aplikací původních i nepůvodních druhů či kmenů hlístovek na jejich přírodní populace.

Cílem mé práce by mělo být shrnutí dostupných poznatků o mezidruhové kompetici hlístovek. Dalším cílem bude v experimentální části zjištění vlivu symbionta na kompetici vybraných druhů entomopatogenních hlístic.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Systematické zařazení skupiny

Entomopatogenní hlístice jsou dle Maggentiho (1981) řazeny do kmene hlístic (Nematoda), řádu háď'ata (Rhabditida). Skupinu entomopatogenních hlístic tvoří 2 čeledi, a to Heterorhabditidae a Steinernematidae. Obě čeledi se podobají průběhem invaze a rychlostí hynutí hostitele (Weiser a Mráček, 1988). Z fylogenetického hlediska netvoří tyto čeledi monofyletickou skupinu, ale tento styl života vznikl nejméně dvakrát (Blaxter et al., 1998). Čeleď Steinernematidae Chitwood a Chitwood, 1937 v současné době zahrnuje rod *Steinernema* Travassos, 1927 s cca 81 popsányými druhy a rod *Neosteinernema* Nguyen a Smart, 1994 s jediným druhem. Kromě těchto rodů Steiner, 1929 zavedl rod *Neoaplectana*. Uvedl, že se liší v povrchových částech hlavy od dříve popsaného rodu *Steinernema*. Avšak Mráček a Weiser (1979) a Mráček et al. (1981) provedli povrchovou studii hlavové části obou zástupců a zjistili, že neplatí dosavadní rozlišení rodů. Na základě stejného uspořádání papil Wouts et al. (1982) označili rod *Neoaplectana* jako mladší synonymum rodu *Steinernema*.

### 2.2. Morfologie

Hlístovky rodu *Steinernema* mají dlouhé, niťovité tělo bíle zbarvené. Velikostně se hlístovky v průběhu vývojového cyklu výrazně liší. Samice jsou větší než samci. Velikost těla dospělců se pohybuje zhruba mezi 0,5 – 8 mm, u samců mezi 0,5-2 mm a u samic mezi 2,3-8 mm. Invazní larvy měří kolem 0,5 – 1,5 mm (Mráček et al., 1981). Stavba těla hlístovek vykazuje poměrně jednoduchou bilaterální symetrii. Vnitřní uspořádání tělních orgánů a rozmístění papil na hlavě má však určitý stupeň radiální symetrie. Kutikula dospělců je mírně kroužkovaná, kdy směrem k hlavovému konci se kroužkování zhušťuje a terminální část je hladká. Oproti tomu kutikula invazních larev je pravidelně kroužkovaná (Weiser a Mráček, 1988).

Kopulačním orgánem samic je ventrální vulva, jejíž vyústění se nachází těsně za polovinou těla (Steiner, 1923). U samců jsou pomocným pářícím orgánem párové spikuly a nepárové gubernakulum (Chitwood a Chitwood, 1937).



## **2.3. Biologie a životní cyklus**

### **2.3.1. Adaptace hlístovek pro život v půdě a detekce hostitele**

Invazní larvy hlístovek (larvální stádia třetího instaru) jsou jediná stádia, která se vyskytují volně v půdním prostředí. Zde jsou ovlivňovány abiotickými faktory, chorobami a predátory. V půdním prostředí mohou přežít až několik měsíců a za tímto účelem mají různá přizpůsobení (Griffin et al., 2005). Dokážou si zachovat kutilu z druhého vývojového stádia, která slouží jako ochranná pochva proti vysychání a patogenním houbám (Timper a Kaya, 1989). Co se týče potravy, invazní larvy přežívají jen díky zásobám energie (Selvan et al., 1993b; Fitters et al., 1999). Potravu přijímat nemohou, protože mají uzavřený ústní otvor (Weiser a Mráček, 1988). Dalším ze způsobů adaptace proti nepříznivým podmínkám je agregace. Je to způsob chování, při kterém se hlístovky seskupují. Hlístovky při okrajích shluku obvykle zahynou a tím vytvoří bariéru (Ishibashi a Kondo, 1990), která chrání ostatní členy před vyschnutím a slunečním zářením (Wallace a Doncaster, 1964). Toto chování může být řízeno mechanickou či dotykovou citlivostí hlístovek (Croll a Matthews, 1977).

Invazní larvy jsou schopny detekovat hostitele za pomoci různých smyslových orgánů. Na jejich hlavě je umístěn pár senzoričkových orgánů, tzv. amphidů a papil, které dokážou zachytit CO<sub>2</sub> a další metabolity uvolňované hostitelem (Griffin et al., 2005).

### **2.3.2. Lokalizace, průnik a usmrcení hostitele**

Invazní larva lokalizuje vhodného hostitele dle látek, které vylučuje a pohybuje se po chemickém gradientu těchto látek směrem k hostiteli (Ishibashi a Kondo, 1990). Nalezne-li vhodného hostitele, může do jeho hemocoelu pronikat skrz ústa, řitní otvor nebo spirakula (Bedding a Molyneux, 1982; Peters a Ehlers, 1994). Do hemocoelu larva ze svého střeva uvolní bakteriálního symbionta, který se množí ve výživné hmyzí hemolymfě. Smrt hostitele nastává následkem bakteriální septikémie asi po 24-48 hodinách (Griffin et al., 2005).

### **2.3.3. Životní cyklus hlístovek**

Invazní larvy se po průniku do hostitele vyvíjejí v larvy čtvrtého instaru, které se živí na bakteriích a následně se přemění v první, tzv. obří generaci. Dospělci se spáří a z nakladených vajíček se v mrtvém hostiteli vyvinou larvy, které přes 4 instary dospějí v dospělce druhé, tzv. normální generace (Mráček a Weiser, 1988). Oplozené samice druhé generace kladou vajíčka a v případě dostatku živin se vyvíjí ještě jedna až dvě generace.

Pokud jsou živiny vyčerpány, tak se z larev druhého instaru vyvine invazní larva, která opouští hostitele (Poinar, 1979; Adams a Nguyen, 2002).

#### **2.3.4. Strategie hlístovek při napadání hostitele**

Podle toho jakým způsobem invazní larvy vyhledávají a napadají hostitele, byly čeledi Steinernematidae rozděleny do dvou skupin (Lewis et al., 1992). Tzv. cruiser se aktivně pohybuje a vyhledává spíše sedentární hostitele. Tento způsob chování je typický např. pro *S. glaseri*. Oproti tomu tzv. ambusher je nepohyblivý, čeká delší dobu blízko povrchu půdy a napadá zejména mobilní hostitele. Typický ambusher je *S. carpocapsae* (Lewis et al., 1992). Grewal et al. (1994) zjistili, že *S. feltiae* se chová jako cruiser i jako ambusher a takovou kombinaci strategií označili jako strategii „intermediate“, neboli přechodnou.

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.3.1., hlístovky jsou schopné detekovat hostitele dle různých faktorů. Určující faktor je oxid uhličitý a další metabolity vycházející z hostitele. Obě strategie hlístovek dokážou tyto stimuly vnímat, ale každá jiným způsobem. Ambusher má na tyto stimuly slabší odpověď a pohybuje se hlavně dle gradientu oxidu uhličitého, až když je hostitel v blízkosti (Lewis et al., 1993). Cruiser na tyto podněty reaguje mnohem silněji, a na větší vzdálenost.

V souvislosti s výše zmíněnými strategiemi lze rozlišit tři typy chování hlístovek, tzv. crawling, standing a jumping. Crawling je sinusoidní pohyb (Croll, 1970), který je používán k rozpoznávání chemických podnětů hostitelů a podnětů z prostředí (Bargman a Mori, 1997; Croll, 1970; Dusenberry, 1980; Huettel, 1986; Zuckerman a Jansson, 1984). Vyskytuje se u skupiny cruiser (Lewis et al., 2005). Standing a jumping jsou typické pro skupinu ambusher. Při standingu larvy dokáží pozvednout velkou část svého těla ze substrátu a balancují na svém ocasu (Campbell a Gaugler, 1993; Ishibashi a Kondo, 1990; Reed a Wallace, 1965). V této imobilní fázi čekají na procházející hostitele (Campbell a Kaya, 2002). Jumping funguje při detekci hostitele, kdy larva prudce vyskočí a atakuje hostitele (Campbell a Kaya, 1999a).

Avšak situace se strategií ambusher - cruiser se v posledních letech ukázala být mnohem složitější. Příkladem je hlístovka *S. carpocapsae*, která je obecně považována za typický druh se strategií ambusher. S touto teorií souhlasili i Hallem et al. (2011), avšak dle experimentů usoudili, že *S. carpocapsae* je schopna k vyhledávání hostitelů využívat i

strategii cruiser. Nejenže je *S. carpocapsae* schopna reagovat na podněty hostitele, obzvláště CO<sub>2</sub> (Hallem et al., 2011), ale dle Torr et al. (2004) také silně reaguje na vzdálené vibrační podněty v půdě. Dříve mnoho studií dokazovalo, že *S. carpocapsae* je jako ambusher nepohyblivá a napadá spíše mobilní hostitele. Tento názor však vyvrátili Jabbour a Barbercheck (2008), kteří zkoumali laterální pohyb této hlístice v kukuřičném poli. Zjistili, že se dokáže pohybovat maximální rychlostí 33.3 cm za den. Už tento fakt ukazoval, že se chová jako cruiser. Také mnoho experimentů dokázalo, že *S. carpocapsae* napadá kromě pohyblivých hostitelů i ty, kteří žijí hluboko v půdě, kryptické nebo nepohyblivé (Wilson et al., 2011). Jedním z mnoha příkladů je úspěšná likvidace významného evropského škůdce borovic klikoroha borového (*Hylobius abietis*) (Leather et al., 1999). Larva tohoto škůdce se vyvíjí a kuklí se v kořenech hynoucích a uhynulých borovic, 40-50 cm pod povrchem půdy (Pye a Claesson, 1981). Jako typický druh se strategií ambusher by *S. carpocapsae* neměla být schopna tohoto hostitele napadat. Úspěšné použití *S. carpocapsae* v biologické kontrole tohoto škůdce (Dillon et al., 2007; Torr et al., 2007) ukazuje, že tento druh za určitých podmínek vykazuje znaky chování, připisované pouze druhům strategie cruiser. Z těchto skutečností tedy plyne, že teorie ambusher a cruiser platí pouze za určitých podmínek. Podle Wilsona et al. (2011) jsou určité druhy strategie ambusher jako je *S. carpocapsae* adaptovány na život v prostředí jiném než je minerální půda. Žijí v organické vrstvě jako je rašelina, listový opad, kůra a dřevo stromů a zde se dokáží chovat jako druhy se strategií cruiser a regulovat zde sedentární a kryptické hmyzí škůdce (Wilson et al., 2011). Původní experimenty odlišující obě strategie byly ale prováděny pouze na minerálním substrátu, a představují tak spíše umělé rozdělení, bez skutečné ekologické relevance (Wilson et al., 2011).

## 2.4. Hostitelské spektrum

Hlístovky jsou vhodné pro použití v biologické kontrole, protože dokáží napadat široké spektrum hostitelů. Jsou považovány za druhově nespécifické, protože jsou schopny napadat nejen hmyz, ale i jiné bezobratlé (Izopoda, Symphyla, Chelicerata, Diplopoda) (Bathon, 1996). Jelikož jsou to živočichové vázaní na život v půdě, tak mohou za přirozených podmínek napadat pouze hostitele, kteří se v půdě, alespoň po určitý čas, vyskytují (Peters, 1996). Mezi takové hostitele patří hmyzí larvy z řádu Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera (Peters, 1996). Hlístovky jsou používány v biologickém boji s mnohými škůdci z těchto řádů.

Proti detekci a infekci hlísticemi se však někteří půdní živočichové (včetně půdních škůdců) dokážou bránit použitím různých strategií. Například čeled' vrubounovití snižují infekci zvýšenou rychlostí kálení, kukly motýlů minimalizují chemické podněty tím, že snižují produkci oxidu uhličitého nebo jej uvolňují v malých dávkách, bázlivec kukuřičný se zavrtává do kořenů, aby unikl před invazními larvami (Gaugler, 1988). Proti infekci si často vytváří morfologickou obranu či bariéru (např. larvy kovaříků (Elateridae) (Eidth a Thurston, 1995). Utváří si například hedvábné kokony, pevnou kutikulu, těsně uzavřená spirakula nebo síta, která pokrývají spirakula (Gaugler, 1988).

Kromě těchto obran mohou být hlístovky s bakteriemi vystaveny silné buněčné i humorální reakci hostitele. Může dojít například k enkapsulaci (Peters a Ehlers, 1997), což je schopnost hmyzích hemocytů (krevních buněk) shlukovat se kolem parazita a uzavřít ho do mnohvrstevné kapsule (Poinar 1974; Ratcliffe 1982) či fagocytóze bakteriálních buněk a jejich zničení pomocí antimikrobiální aktivity hmyzí hemolymfy (Wang a Gaugler, 1999). Hlístovky však spolupracují s bakteriemi a v součinnosti mohou překonat hmyzí imunitu (Wang a Gaugler, 1999).

Vhodným hostitelem pro hlístovky jsou hmyzí larvy, které nepoužívají zmíněné strategie a jsou vybaveny kousacím ústním ústrojím a mají hladkou kutikulu bez chlupů (Weiser a Mráček, 1988). Důležitá je i velikost hostitele. Hlístovky můžou napadat velmi malé hostitele, jako jsou např. mšice (Mráček a Růžička, 1990) nebo larvy blechy *Xenopsylla cheopsis* (Mráček a Weiser, 1983), ale všeobecně je známo, že čím větší je hostitel, tím větší je produkce potomstva hlístovek (Lindgren et al., 1993; Shapiro-Ilan a Gaugler, 2002).

#### **2.4.1. Mezidruhové rozdíly**

Dle Peterse (1996) jsou některé druhy hlístovek spíše generalisti se širším hostitelským spektrem (např. *S. feltiae*), kdežto jiné druhy (např. *S. glaseri*) jsou spíše specialisti s užším hostitelským spektrem. Například hlístovka *S. scapterisci* napadá v přirozených podmínkách zejména krtonožky rodu *Scapteriscus* (Nguyen a Smart, 1990). Druh hlístovky *S. scarabaei* je nejspíše specializován na infekci larev vrubounovitých brouků (Stock a Koppenhoefer, 2003). Většina druhů jsou převážně generalisti se širším hostitelským spektrem. Je zřejmé, že užší přirozené hostitelské spektrum je dáno spíše nedostatečnou nabídkou hmyzu, než schopností hlístovek infikovat pouze malou část

hostitelského spektra. Např. u již zmíněné *S. scapterisci* bylo v laboratoři zjištěno, že dokáže infikovat i velké množství jiného hmyzu (Grewal et al., 1993).

## 2.5. Symbiotické bakterie

### 2.5.1. Taxonomie

Čeď Steinernematidae žije v symbióze s bakterií rodu *Xenorhabdus* (čeď Heterorhabditidae žije v symbióze s bakterií rodu *Photorhabdus*). Rod *Xenorhabdus* a *Photorhabdus* řadíme ke skupině gramnegativních bakterií z čeledi Enterobacteriaceae patřící do tzv.  $\gamma$  - podtřídy Proteobakterií (Boemare, 2002). Některé druhy těchto bakterií se vyskytují pouze u jednoho druhu hlístovky, jako je například *X. nematophilus* u druhu *S. carpocapsae*, jiné jsou společné více druhům hlístovek např. *X. bovienii* u druhů *S. feltiae*, *S. affine*, *S. kraussei*, *S. intermedium* (Akhurst a Boemare, 1988).

### 2.5.2. Symbióza s hlístovkami

Bakterie jako symbionti hlístovek mají řadu vlastností, které zásadně ovlivňují jejich životní cyklus. Hlístovky slouží jako vektor, pomocí kterého jsou symbionti přeneseni do hemocoelu hostitele. Zde bakterie většinou zdolají imunitní systém a uvolněním toxinů zabijí hostitele (Boemare, 2002; Forst a Clarke, 2002). Bakteriální symbionti jsou schopni uvolňovat tzv. bakteriociny (Davis et al., 1968), které chrání mrtvé tělo hostitele proti napadení saprofytickými mikroorganismy i proti hmyzím mrchožroutům (Han a Ehlers, 1998; Poinar a Thomas, 1966; Poinar et al., 1977). Největší význam však mají v poskytnutí výživného média pro vývoj a reprodukci hlístovek (Griffin et al., 2005). Bakterie se bez hlístovek nevyskytují (výjimkou je *P. asymbiotica*, což je lidský patogen, který patrně nežije v symbióze s hlístovkami (Fischer-Le Saux et al., 1999), stejně tak se hlístovky nevyskytují v přirozených podmínkách bez svého symbionta. V experimentálních podmínkách mohou hlístovky konzumovat různé bakterie, důsledkem je však snížení jejich růstu a produkce potomstva (Aguillera a Smart, 1993).

Bakterie se vyskytuje ve dvou odlišných fázích. V první fázi (vegetativní) se vyskytuje v hostiteli, kde žije v nadbytku živin (Griffin et al., 2005) a ve druhé fázi (foretické) je uchována ve střevním váčku invazních larev, kde po dlouhou dobu nepřijímá žádné živiny (Bird a Akhurst, 1983).

Hlístovky si nejlépe udrží pouze svou vlastní symbiotickou bakterii, avšak dokážou konzumovat i nesymbiotickou bakterii (např. *E.coli*) nebo v některých případech i

bakteriálního symbionta jiného druhu hlístice (Sicard et al., 2003). To vede ovšem k pomalejšímu růstu a snížené reprodukci.

## **2.6. Hlístovky v biologické kontrole**

### **2.6.1. Význam**

Už někdy od roku 1970 mnoho zemí jeví zájem o výzkum entomopatogenních hlístic a jejich bakteriálních symbiontů. Zájem o hlístice se projevil z důvodu nedostatku efektivních a k přírodě šetrných prostředků, které by zlikvidovaly hmyzí škůdce (Klein, 1990). Důvodem je také možnost masové produkce hlístic (Friedman, 1990). Zde se mohou rozlišit dvě metody produkce, a to *in vivo* a *in vitro*. Metody *in vivo* jsou technicky jednodušší. Jsou založeny na kultivaci hlístovek na živém hostiteli. Metody *in vitro* jsou finančně nákladnější, co se týče vybavení, ale produkce larev je levnější (Ehlers a Shapiro-Ilan, 2005). Metody *in vitro* jsou rozděleny na množení v pevném a kapalném médiu.

Množení na pevném médiu bylo poprvé provedeno na dvourozměrných nádobách např. Petriho miskách s použitím různých medií (Hara et al., 1981; Wouts, 1981). Následně byl vynalezen trojrozměrný systém, který obsahoval kulturu nematodů na polyuretanové pěně (Bedding, 1981). Kapalně médium bylo smícháno s pěnou, autoklávováno, poté naočkováno bakterií a následně pokryto hlísticemi. Hlístice byly sklizeny během 2-3 týdnů (Bedding, 1981; Bedding, 1984). V tomto postupu bylo médium založeno na živočišných produktech (např. vepřové ledviny či drůbeží vnitřnosti), ale později byly použity různé ingredience např. pepton, kvasnicový extrakt, vajíčka, sójovou mouku a jiné (Han et al., 1992; 1993). Bedding (1981) tento postup rozšířil o provzdušněný autoklávný „vak“. Další pokrok se týkal zavedení automatického autoklávování, souběžné inokulace nematodů a bakterií, automatického sklizení přes centrifugační filtry (Gaugler a Han, 2002).

V metodách kapalného media jsou nejprve naneseny bakterie, poté hlístice (Buecher a Popiel, 1989; Surrey a Davies, 1996; Strauch a Ehlers, 2000). Jsou zde používány různé ingredience např. sójová mouka, extrakt z kvasnic, kukuřičný olej, vaječný žloutek, extrakt z jater a jiné (Surrey a Davies, 1996; Ehlers et al., 2000; Yoo et al., 2000). Doba kultivace se liší v závislosti na médiu a druzích, může trvat až 3 týdny (Surrey a Davies, 1996; Chavarria-Hernandez a de la Torre, 2001). Některé druhy mohou dosáhnout maxima produkce invazních larev ve 2 týdnech i méně (Friedman 1990; Ehlers et al., 2000; Neves et al., 2001;

Strauch and Ehlers, 2000; Yoo et al., 2000). Když je kultura zhotovena, hlístice mohou být sklizeny z media pomocí centrifugace (Surrey a Davies, 1996).

### 2.6.2. Aplikace

Hlístice jsou v biologické ochraně rostlin zatím používány méně než jiné biologické prostředky. Příčinou může být vysoká cena a relativně nesnadné použití. Je totiž důležité je aplikovat ve večerních hodinách, aby byly uchráněny před slunečním zářením. Někdy je nezbytností hlístice přímo vpravit do půdy či po aplikaci provést zálivku. V dnešní době je nejrozšířenější metodou plošný střík. V minulosti se uvažovalo i nad metodami ohniskové a pásové aplikace v bezprostřední blízkosti rostlin. Důvodem byla snaha o snížení spotřeby hlístic. Avšak hlístice mají v přirozeném prostředí mnoho nepřátel, kteří je napadají a jejich množství se může snížit až pod hranici repelentního účinku. A proto se musí dle potřeby ošetření opakovat každý rok.

V dnešní době jsou v biologické ochraně rostlin používány tyto druhy hlístic: *Steinernema carpocapsae*, *S. riobrave*, *S. feltiae*, *S. krausse*, *S. scapterisci*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis*, které jsou úspěšně používány k regulaci škůdců, jako jsou např. lalokonosec rýhovaný (*Otiorynchus sulcatus*) a listokaz zahradní (*Phyllopertha horticola*) napadaní převážně zástupci rodu *Heterorhabditis*. *S. feltiae* se používá v boji proti různým housenkám a larvám dvoukřídlých (obaleč jablečný (*Cydia pomonella*), osenice (*Agrostis* sp.), muchnicovití (Bibionidae) a *S. scapterisci* k redukování populace krtonožky obecné (*Gryllotalpa gryllotalpa*) (Nermuť et al., 2012).

## 2.7. Kompetice

### 2.7.1. Obecné pojetí kompetice

Kompetice je druh interakce, při které jeden organismus konzumuje zdroj, který mohl získat a spotřebovat jiný organismus (Begon et al., 1997). V důsledku toho má jiný organismus k dispozici nedostatek zdrojů a tím pádem pomaleji roste, produkuje méně potomstva a jeho život je v ohrožení (Grover, 1997). Obecně lze kompetici definovat jako přímou či nepřímou interakci organismů, která vede ke změně jejich fitness (Holomuzki et al., 2010). Přímou na sebe působí jednotlivci při tzv. interferenční kompetici, kdy se jeden druh chová agresivně, aby zabránil jinému druhu dostat se ke zdroji. Nepřímou se ovlivňují jedinci při tzv. exploatační kompetici. Zde se organismy snaží využívat stejný zdroj, který tím spotřebovávají (Lang a Benbow, 2013). Při tzv. aparentní kompetici na sebe jedinci

působí také nepřímo. Zde jedinci nesoutěží o zdroj, ale oba jsou kořistí či hostiteli stejného predátora či parazita (Hatcher et al., 2006). Kompetice je také jedním z mnoha na sebe působících abiotických a biotických faktorů, které ovlivňují strukturu společenstva (Sahney et al., 2010). Může nastat mezi příslušníky téhož druhu (vnitrodruhová) či jedinci druhů rozdílných (mezidruhová) (Chesson, 2000). Jedinci téhož druhu mají většinou stejné nároky na zdroje ve svém prostředí, kdežto příslušníci rozdílných druhů mají spíše odlišné požadavky (Begon et al., 1997).

Vnitrodruhová kompetice se týká jedinců téhož druhu, kteří mají podobné požadavky na to, aby mohli přežít, růst a rozmnožovat se, ale jejich společná potřeba nějakého zdroje může převýšit jeho stávající zásobu. V důsledku toho si jedinci konkurují a některému z nich je zdroj odepřen (Begon et al., 1997). Je to důležitá síla v ekologii a je zodpovědná za fenomén, jako je rozšíření a teritorialita. Je primární příčinou regulace populace, která nastane při zvýšení hustoty populace (Mackenzie et al., 1998).

Mezidruhová kompetice spočívá v tom, že délku života, plodnost či růst jedinců jednoho druhu omezují svou přítomností jedinci jiného druhu, kteří odčerpávají zdroje nebo působí jinou interferencí (Fedriani et al., 2000). Je vyjádřením překrývání ekologických nik (potravních, prostorových, úkrytových apod.). Nejintenzivnější kompetiční vztahy jsou v hraničních mezích překrývajících se nik (Rajchard et al., 2002). Mezidruhová kompetice může ovlivňovat populační dynamiku konkurujících druhů různými způsoby a tato dynamika může zase ovlivnit rozmístění druhů a v časovém hledisku nutně i jejich evoluci. Distribuce druhů a početnost jejich populací navíc určují i složení společenstev, ve kterých žijí. Evoluce pak pomocí mezidruhových interakcí ve společenstvech zpětně působí na rozmístění a dynamiku jednotlivých druhů (Townsend et al., 2010).

Mezidruhová kompetice může být utlumena různými mechanismy a rozdílné druhy organismů spolu mohou koexistovat. Pokud je nadbytek potravních zdrojů (Chesson a Huntley, 1989; Carton et al., 1991) či jejich rozdílné využití (Schlyter a Anderbrandt, 1993) pak mohou koexistovat. Vyšší náchylnost jednoho druhu organismu k predátorovi může vést také k potlačení kompetice (Norrdahl a Korpimäki, 1993).



## 2.8. Kompetice u EPN

### 2.8.1. Vnitrodruhová kompetice

Vnitrodruhová kompetice postihuje populaci hlístovek. Pokud do těla hostitele pronikne větší množství invazních larev než je optimální hodnota, nastává vnitrodruhová kompetice (Kaya a Koppenhöfer, 1996). Tato optimální hodnota ovšem závisí na velikosti a typu hostitele i na druhu hlístovky. Například u zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) se hodnota pohybuje v rozmezí 50 – 100 larvami na jednoho hostitele (Selvan et al., 1993; Koppenhöfer a Kaya, 1995). Pokud je optimální hodnota překročena, vzniklá vnitrodruhová kompetice má negativní dopad na růst a reprodukci hlístovek. Pokud do hostitele pronikne více larev, než je jejich kritické množství, hlístovky se nereprodukují a hynou. Kritické množství larev v hostiteli je taktéž závislé na druhu hlístovky a hostitele. U zavíječe voskového se tato hodnota pohybuje mezi 150 – 300 larvami na hostitele (Selvan et al., 1993; Koppenhöfer a Kaya, 1995).

Wouts (1980) uvedl, že pokud je populační hustota hlístic uvnitř hostitele velká, larva L1 se vyvíjí do larvy L2. Při nízké populační hustotě (při vhodných životních podmínkách) ihned do larvy L4.

S vnitrodruhovou kompeticí nejspíš souvisí uvolňování invazních larev z hostitele. Larvy se mohou uvolňovat dříve či později a dle toho se odlišují v určitých vlastnostech. Rané formy invazních larev jsou větší a mají větší poměr samců než pozdní formy (Lewis a Gaugler, 1994; Nguyen a Smart, 1995; Stuart et al., 1996). V rané formě má larva největší schopnost nalézt a infikovat hostitele a poté se v něm rozmnožit. Larvy, které se uvolní později, takovou možnost nemají. Musí se šířit dále, aby našly neinfikovaného hostitele. Mohou také napadnout hostitele, který byl již infikován ranými larvami, které se v něm vyvíjí a reprodukuje. Tím pádem mají pozdní larvy menší úspěch v reprodukci. Odlišnost mezi těmito formami se pravděpodobně netýká strategie ambusher (Kaya a Gaugler, 1993). Lze však předpokládat, že existují mechanismy, které mohou vnitrodruhové kompetici u obou strategií předcházet.

### 2.8.2. Mezidruhová kompetice

#### Vliv kompetice

Mezidruhová kompetice nastává, když do jednoho hostitele současně vnikne více druhů hlístovek. Výsledkem bývá nejčastěji převládnutí jednoho druhu hlístovky, méně

častým případem je úmrtí obou druhů hlístovek (Allatorre-Rosas a Kaya, 1990), nebo mohou přežít a rozmnožit se oba druhy (Akhurst, 1983). Hlístovky rodů *Heterorhabditis* a *Steinernema* mohou společně infikovat hostitele, ale společně se dál nemohou vyvíjet, a jedna hlístovka převládne (Alatorre-Rosas a Kaya, 1990). Oproti tomu různé druhy z čeledi Steinernematidae napadají hostitele a oba druhy jsou schopny se v něm dál vyvíjet (Kondo, 1989; Koppenhöfer et al., 1995). Kompetice má však do určité míry negativní dopad na hlístovky. Kondo (1989) pozoroval larvy můry (*Spodoptera litura*) koinfikované druhy *S. glaseri* a *S. feltiae*, které produkovaly smíšené potomstvo a druhy *S. carpocapsae* a *S. glaseri*, u kterých byla *S. carpocapsae* kompetitivně silnější. Zde bylo zpozorováno 80% snížení potomstva *S. glaseri*, zatímco *S. carpocapsae* nebyla ovlivněna. U zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) koinfikovaného stejnými druhy, byla zpozorována redukce potomstva obou druhů (Koppenhöfer et al., 1995). Půža a Mráček (2009) experimentálně infikovali zavíječe voskového druhy *S. affine* a *S. kraussei*. Dle této studie měla *S. kraussei* pozitivní vliv na *S. affine*. Zřejmě pomohla *S. affine* překročit imunitní systém hostitele a navýšit množství bakteriálního symbionta. V hostitelích infikovaných dříve *S. kraussei* byl výsledek podobný simultánní infekci a *S. affine* byla dominantní v hostitelích již zahubených druhým druhem. Dle San-Blas et al. (2008) některé druhy entomopatogenních hlístic preferují uhynulé hostitele před živými, nemusí tak překonávat obranné mechanismy hmyzího imunitního systému. Avšak hlístice, která infikuje hostitele nakaženého jinou hlísticí příliš pozdě, se může střetnout s dobře vyvinutým potomstvem tohoto druhu. Dle výzkumu Půži a Mráčka (2009) je patrně nejvhodnější, aby byl hostitel infikován *S. kraussei* 24 hod před aplikací *S. affine*. Při tomto postupu byla u *S. affine* zpozorována nejvyšší produkce potomstva. Navzdory pozivnímu vlivu *S. kraussei* na *S. affine*, měla dle Půži a Mráčka (2010) naopak *S. affine* negativní vliv na *S. kraussei*. Při smíšené infekci *Galleria mellonella* se *S. kraussei* vyhýbala koinfekci s *S. affine*, což je nejspíš klíčový faktor pro *S. kraussei*. Patrně díky lepší pohyblivosti v půdě, invazní larva *S. kraussei* se může rozšiřovat do míst neobsazených *S. affine*. Bylo prokázáno, že polovina míst s výskytem *S. kraussei* nebyla obsazena *S. affine* a *S. kraussei* se tak mohla rozmnožovat bez negativního působení *S. affine*. Za těchto okolností mohou hlístovky stejného druhu vytvářet shlukovité distribuce a koexistovat tak s jinými druhy hlístovek (Půža a Mráček, 2010).

## Mechanismy předcházení kompetici

Negativní vlivu, který převládá v mezidruhové kompetici, se hlístovky snaží určitými mechanismy předcházet. Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, hlístovky jsou v přirozeném prostředí shlukovitě rozmístěné (Spiridonov et al, 2007; McGraw a Koppenhöfer, 2009), což může redukovat jejich interakce a tím tak přispívat k jejich vzájemnému soužití (Kaya a Koppenhofer 1996; Stuart et al., 2006). Dalším faktorem, který napomáhá jejich koexistenci, mohou být rozdílné strategie v napadání hostitele (tzv. foraging strategy, zmíněné v kapitole 2.3.4.). Se strategií souvisí rozdílný výběr hostitelů a vertikální distribuce (Alatorre-Rosas a Kaya, 1990; Koppenhöfer a Kaya, 1996a). Avšak tyto foraging strategy jsou spíše kontinuum mezi dvěma extrémy (Campbell a Gaugler, 1997) a většina druhů má stejnou, tzv. intermediate strategy (Půža a Mráček, 2010).

## Vliv symbionta

Na mezidruhovou kompetici má patrně významný vliv bakteriální symbiont. Působením symbionta mohou být některé druhy hlístovek dominantní vůči jiným druhům (Koppenhöfer et al., 1995), což vede k rychlejšímu vývoji a rozmnožování. Vítězem se patrně stává ten druh hlístovky, jehož bakterie se dokáže na hostiteli nejrychleji namnožit (Kaya a Koppenhöfer, 1996). Akhurst (1982) usoudil, že antibiotika produkované bakteriemi jednoho druhu hlístovek rozdílně inhibují bakteriální symbionty jiných druhů hlístovek. Bylo ukázáno, že když je nedostatek inhibičních vlivů mezi bakteriemi odlišných druhů hlístic, hlístice mohou koexistovat na stejném hostiteli (Akhurst, 1982). Dva druhy hlístovek z rodu *Steinernema* mají velkou pravděpodobnost společného soužití, pokud se dokážou žít na bakteriálním symbiontu jiného druhu (Akhurst, 1983; Dunphy et al., 1985). Avšak *Photorhabdus* z čeledi Heterorhabditidae nedokáže žít s *Xenorhabdus* z čeledi Steinernematidae, jelikož produkuje bakteriociny, které *Photorhabdus* zabíjejí (Boemare, 2002). Půža et al. (2013) zkoumali vliv bakteriálních symbiontů na mezidruhovou kompetici druhů hlístovek *S. kraussei* a *S. affine*. Axenické larvy obou druhů byly kultivovány samostatně a ve směsi na jedné bakterii a na směsných bakteriích na Wouts agarových plotnách. Dle výsledků se *S. affine* byla schopna vyvíjet a produkovat životaschopné potomstvo na bakteriálním symbiontu *S. kraussei*. Nezpozorovala se ani žádná odlišnost v délce cyklu či reprodukci, ve velikosti larev a obsahu tuku *S. affine* v symbióze s vlastní bakterií. Avšak *S. kraussei* se byla schopna dobře vyvíjet a rozmnožovat jen na své symbiotické bakterii, růst na symbiontu *S. affine* byl zanedbatelný. Tyto experimenty mohly

vysvětlit předešlý výzkum, kdy byla pozorována výrazná dominance *S. affine* nad *S. kraussei* (Půža a Mráček, 2009). Tato fakta také mohou přispět k porozumění vztahu mezi hlístovkami a jejich bakteriálním symbiontem (Půža et al., 2013). Pro důkladnější porozumění roli bakteriálního symbionta v kompetici entomopatogenních hlístic je nutné tento výzkum opakovat s dalšími druhy.

## 3. METODIKA

### 3.1. Použité hlístice

V experimentech byly použity entomopatogenní hlístice *Steinernema affine*, kmen J006, pocházející z jabloňového sadu u Chelčic v Jižních Čechách (souřadnice 49 06.380N 14 09.320E), a *Steinernema feltiae*, komerční kmen ENTONEM (dále ENT) (Biocont laboratory). V některých experimentech byla pro srovnání použita *Steinernema affine*, kmen V, pocházející z lokality Vrbenské rybníky (48 59 38.391N, 14 26 14.534E).

Pro veškeré nákazy byly použity housenky posledního larválního instaru zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) z laboratorního chovu.

#### 3.1.1. Izolace bakterií

Nakažená housenka (cca 24 hodin od infekce) byla povrchově sterilizována po dobu 5 minut v 99 % etanolu. Poté byla ve flowboxu odstřížením panožky odebrána hemolymfa, která byla sterilní kličkou rozetřena na NBTA agarovou plotnu (skládající se z 37 g standardního výživného agaru (Merck), 25 mg bronthymolové modři (Sigma), 1 l destilované vody, 4 ml 2,3,5-Triphenyl-tetracolumchloridového roztoku (1%, sterilní filtrovaný) (Akhurst, 1980). Jednotlivé kolonie vykazující znaky bakterií rodu *Xenorhabdus* byly přeneseny do tekutého YS media a inkubovány na třepačce (180 rpm) v teplotě 22°C.

#### 3.1.2. Příprava axenických hlístic

Nákazy byly provedeny v Petriho miskách (průměr 9 cm) na filtračním papíru. Poté se nakažovalo dávkou přibližně 80-100 larev na housenku. Petriho misky byly uloženy v temné místnosti o teplotě cca 20°C.

#### 3.1.3. Izolace a sterilizace vajíček hlístic

Z housenek byly po 4-5 dnech od nákazy vypitvány oplodněné samice hlístic, které byly vloženy do zkumavek s nastříhanými žiletkami a následně vortexovány, než se uvolnila vajíčka. Výsledná suspenze s vajíčky byla přelita přes uhelonový filtr (velikost očka 40 µm) do mikrozukumavky (1,5 ml). Do mikrozukumavky byl přidán Ringerův roztok (1 ml), vše bylo zcentrifugováno po dobu 1 minuty při 2 tis. otáčkách a následně byl odstraněn přebytečný supernatant. Tento krok se opakoval ještě nejméně 2x. Dále byl už pokus prováděn ve sterilním flowboxu. Z mikrozukumavky byl do sterilní mikrozukumavky přenesen pelet (suspenze vajíček) a přidán sterilní Ringerův roztok (1 ml). Byla provedena

centrifugace po dobu 1 minuty při 2 tis. otáčkách. Všechny supernatant byl odsán a byl přidán 1 ml sterilizačního činidla. Následně byly mikrozkušavky protřepány v ruce po dobu 4 minut a centrifugovány 2 minuty při 4 tis. otáčkách. Všechno sterilizační činidlo bylo odstraněno a přidáno sterilní medium YS (yeast solution). Po dobu 1 minuty při 4 tis. otáčkách byla provedena centrifugace, poté byl odstraněn supernatant a opakování proběhlo ještě jednou. Poté byla suspenze s vajíčky nasána a přenesena po 350 µl do kultivační destičky (24 jamek). Pro kontrolu bylo nanášeno 350 µl sterilního YS. Následně byla plastová kultivační destička přelepena parafilmem a zanesena do temné místnosti. Čekalo se 2 dny pro kontrolu úspěšnosti sterilizace. Kontaminace by se projevila zakalením jinak čirého roztoku s vajíčky. Z vajíček se během této doby vylíhly larvy prvního instaru (L1).

#### **3.1.4. Nanášení hlístic a bakterií na agarové plotny**

Na agarových plotnách byl použit tzv. Woutsův agar (Wouts 1981) skládající se ze 16 g výživného bujónu (Difco), 12 g Bacto<sup>®</sup> agaru (Difco), 5 g slunečnicového oleje na 1 l destilované vody.

Ve flowboxu byla na každou Petriho misku ožehlou očkovací kličkou nanášena bakteriální kultura a poté cca 30 axenických L1. S Petriho miskami se řádně zatřepalo o podložku, aby se bakterie s hlísticemi rozprostřely po povrchu agaru. Následně byly jednotlivé Petriho misky přelepeny parafilmem a ponechány inkubaci v temné místnosti.

Zkoumané hlístovky byly jednotlivě a v kombinaci nanášeny se všemi kombinacemi bakterií. V Tab. 1 je uvedeno, jaké kombinace hlístovek a bakterií byly použity. Pro každou kombinaci hlístic a bakterií bylo založeno 10 Petriho misek a každá série měla dvě opakování.

#### **3.1.5. Pozorování vývoje hlístic na agarových plotnách**

V průběhu 2-3 týdnů byl pozorován vývoj hlístic (rostoucích na bakteriální kultuře). V případě druhové směsi byla sledována přítomnost obou druhů, konkrétně samců rozpoznatelných dle spikul.

**Tab. 1.** Testované kombinace hlístic a bakterií.

Hlístice	Bakterie
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> J006
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> ENT
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> J006 + <i>X. bovienii</i> ENT
<i>S. affine</i> J006	<i>X. bovienii</i> J006
<i>S. affine</i> J006	<i>X. bovienii</i> ENT
<i>S. affine</i> J006	<i>X. bovienii</i> J006 + <i>X. bovienii</i> ENT
<i>S. affine</i> J006 + <i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> ENT
<i>S. affine</i> J006 + <i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> J006
<i>S. affine</i> J006 + <i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> J006 + <i>X. bovienii</i> ENT
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> ENT
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> V
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> ENT + <i>X. bovienii</i> V
<i>S. feltiae</i> ENT + <i>S. affine</i> V	<i>X. bovienii</i> ENT
<i>S. feltiae</i> ENT + <i>S. affine</i> V	<i>X. bovienii</i> V

### 3.1.6. Sklizení hlístic z agarových ploten

Agarové plotny s hlísticemi byly prolity sterilní vodou, přelity do zkumavky a ponechány sedimentaci. Poté byl sediment přenesen na sítko, které bylo umístěné v Petriho misce a prolité sterilní vodou. Hlístice byly ponechány na sítku, dokud invazní larvy neprolezly. U druhových směsí bylo hodnoceno zastoupení obou druhů ve výsledném potomstvu.

### 3.1.7. Měření velikosti hlístic a obsahu tuku

Přibližně 2 ml roztoku hlístic byly umístěny do zkumavky, do které byl přidán 1 ml ethanolu a 1 ml olejové červeně, a byly ponechány inkubaci v 60°C po dobu 20 minut. Poté byly hlístice ponechány sedimentaci a s pomocí Pasteurovy pipety byl odsán přebytečný supernatant. Následně bylo přidáno 5 ml glycerolu a hlístice ponechány přes noc v místnosti o pokojové teplotě. Po uplynulé lhůtě byla pod mikroskopem u 30 jedinců změřena délka a obsah tuku. Obsah tuku, byl určen podle stupnice od 1 (bezbarvé) do 8 (nejvíce zbarvené) (Croll, 1972; Patel et al., 1977). V tomto experimentu byly použity studované hlístice *S. affine* J006 a *S. feltiae* ENT, *S. affine* V zde použita nebyla.

## 4. Výsledky

Výsledky z pozorování vývoje hlístic na agarových plotnách jsou uvedeny v Tab. 1., Tab. 2., Tab. 3. a Tab. 4. Výsledky z měření velikosti hlístic a obsahu tuku jsou uvedeny na Grafu 1 a Grafu 2.

### 4.1. Vliv bakterií na růst *S. feltiae* ENT a *S. affine* J006

Z tabulky 1 je patrné, že *S. feltiae* ENT dokáže růst na bakterii *X. bovienii* J006, i když je mírně negativně ovlivněna, jelikož na 30% misek k rozmnožení nedošlo. Je schopná růst na vlastní bakterii (*X. bovienii* ENT) a na kombinaci obou bakterií. *S. affine* J006 je schopna růst na obou bakteriích jednotlivě i v kombinaci bez známek negativního ovlivnění.

**Tab. 1.** Růst *S. feltiae* ENT a *S. affine* J006 na bakteriích *X. bovienii* ENT a *X. bovienii* J006.

Hlístice	Bakterie	Vývoj	Rozmnožování
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> J006	Ano	Ano (pouze 70% misek)
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> ENT	Ano	Ano
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> J006 + <i>X. bovienii</i> ENT	Ano	Ano
<i>S. affine</i> J006	<i>X. bovienii</i> J006	Ano	Ano
<i>S. affine</i> J006	<i>X. bovienii</i> ENT	Ano	Ano
<i>S. affine</i> J006	<i>X. bovienii</i> J006 + <i>X. bovienii</i> ENT	Ano	Ano

Z tabulky 2 je patrné, že *S. feltiae* ENT a *S. affine* J006 se jsou schopny při společné inokulaci na bakterii *X. bovienii* ENT vyvíjet a rozmnožovat, ve výsledném potomstvu *S. feltiae* ENT mírně převládla. Při růstu na bakterii *X. bovienii* J006 se *S. feltiae* ENT není schopna vyvíjet a produkovat potomstvo, na těchto miskách se tedy rozmnožila pouze *S. affine* J006. Při růstu na kombinaci obou bakterií se oba druhy hlístovek vyvíjí a reprodukuje, ale ve výsledném potomstvu převládá *S. affine*.



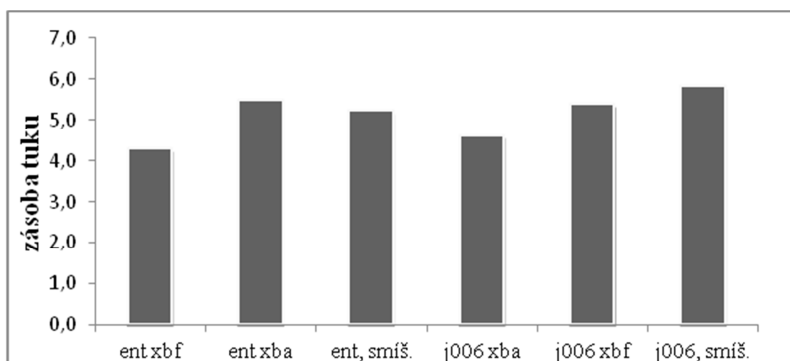
**Tab. 2.** Růst *S. affine* J006 a *S. feltiae* ENT při společné inokulaci na různých bakteriích a podíl obou druhů na výsledném potomstvu.

Hlístice	Bakterie	Vývoj	Reprodukce	Potomstvo
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> ENT	Ano	Ano	60%
<i>S. affine</i> J006		Ano	Ano	40%
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> J006	Ne	Ne	-
<i>S. affine</i> J006		Ano	Ano	100%
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> J006 + <i>X. bovienii</i> ENT	Ano	Ano	30%
<i>S. affine</i> J006		Ano	Ano	70%

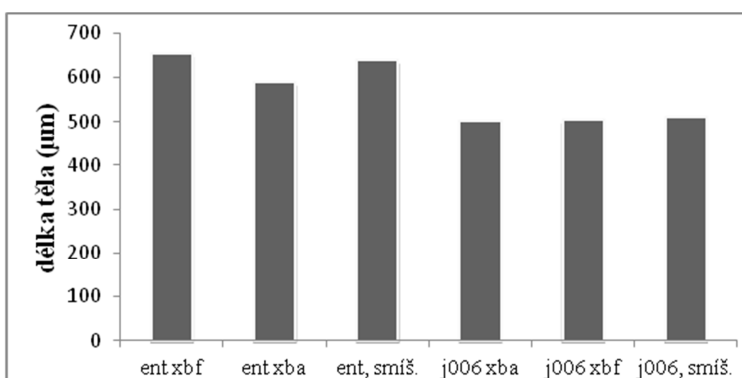
#### 4.2. Vliv bakterie na kvalitu invazních larev

Tuková zásoba druhů hlístovek *S. feltiae* ENT a *S. affine* J006 se lišila ( $F= 4.06$ ;  $p<<0.01$ ). Z grafu 1 je však patrné, že se lišila jen v určitých případech. Zásoba tuku *S. feltiae* ENT byla při růstu na vlastní bakterii průkazně nižší oproti růstu na bakterii *X. bovienii* J006 ( $p=0.03$ ) a v porovnání s růstem *S. affine* J006 na kombinaci obou bakterií byla také průkazně nižší ( $p=0.002$ ). Dále pak měla menší tukovou zásobu *S. affine* J006 rostoucí na vlastní bakterii oproti růstu na kombinaci obou bakterií ( $p=0.03$ ). Ostatní kombinace druhů hlístovek a bakterií se nelišily.

Délka těla hlístovek se průkazně lišila. ( $F = 35.88$ ;  $p<<0.01$ ). Z grafu 2 je patrné, že délka těla *S. feltiae* ENT byla při růstu na vlastní bakterii, na bakterii *X. bovienii* J006 a na kombinaci obou bakterií průkazně větší než délka těla *S. affine* J006 rostoucí na stejné kombinaci bakterií ( $p<<0.01$ ). Délka těla *S. feltiae* ENT byla při růstu na bakterii *X. bovienii* J006 menší než při růstu na vlastní ( $p=0.003$ ) a na kombinaci obou bakterií ( $p=0.02$ ). Délka těla *S. affine* J006 se při růstu na vlastní bakterii, na bakterii *X. bovienii* ENT a na kombinaci obou nelišila.



**Graf 1.** Tuková zásoba *S. feltiae* ENT a *S. affine* J006 při růstu na *X. bovienii* ENT (XbF) a *X. bovienii* J006 (XbA).



**Graf 2.** Délka těla *S. feltiae* ENT a *S. affine* J006 při růstu na *X. bovienii* ENT (XbF) a *X. bovienii* J006 (XbA).

#### 4.3. Kompetice *S. feltiae* ENT a *S. affine* V

Z tabulky 3 je zřejmé, že *S. feltiae*, jak již bylo výše zmíněno, je schopna růst na vlastní bakterii, ale nedokáže se vyvíjet a reprodukovat na bakterii *X. bovienii* V. Na kombinaci obou bakterií byla schopna vývoje a reprodukce na většině misek.

**Tab. 3.** Růst *S. feltiae* ENT na bakteriích *X. bovienii* ENT a *X. bovienii* V.

Hlístice	Bakterie	Vývoj	Rozmnožování
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> ENT	Ano	Ano
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> V	Ne	Ne
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> ENT + <i>X. bovienii</i> V	Ano	Ano*

\* na 80% misek

Z tabulky 4 je zřejmé, že při společné inokulaci *S. feltiae* ENT a *S. affine* V na bakteriích obou druhů byl růst *S. feltiae* ENT potlačen, ale *S. affine* V se vyvíjela a produkovala potomstvo.

**Tab. 4.** Růst *S. affine* V a *S. feltiae* ENT při společné inokulaci na různých bakteriích a podíl obou druhů na výsledném potomstvu.

Hlístice	Bakterie	Vývoj	Reprodukce	Potomstvo
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> ENT	Ano	Ne	-
<i>S. affine</i> V		Ano	Ano	100%
<i>S. feltiae</i> ENT	<i>X. bovienii</i> V	Ne	Ne	-
<i>S. affine</i> V		Ano	Ano	100%

## 5. Diskuse

### 5.1. Vliv bakterií na vývoj hlístovek

Bakteriální symbiont má v životním cyklu hlístovek velký význam. Dokáže překonat obranné mechanismy hostitelů a pomocí toxinů je zahubit (Boemare, 2002; Forst a Clarke, 2002). Vylučováním tzv. bakteriocinů (Davis et al., 1968) dokáže bránit mrtvé tělo proti napadení různými organismy (Han a Ehlers, 1998; Poinar a Thomas, 1966; Poinar et al., 1977). Zásadní význam má však v poskytnutí potravy pro hlístovky, které se tak mohou vyvíjet a rozmnožovat (Griffin et al., 2005). Vliv bakterie se ukázal být důležitý také v mezidruhové kompetici hlístovek *S. affine* a *S. kraussei* (Půža a Mráček, 2009). Další studium této problematiky bylo předmětem experimentální části této práce.

K pozorování růstu hlístovek na bakteriích byly použity agarové plotny, protože zde bylo možno lépe zachytit vývoj hlístovek. Hlístovky by bylo možno pozorovat i ve hmyzím hostiteli, ale vývoj hlístovek by se nepodařilo tak dobře zachytit a hrozilo by i větší riziko infekce hostitele jinými organismy, a tak možný úhyn hlístovek.

Pro experimenty byly vybrány hlístovky *S. feltiae* a *S. affine*. Oba druhy nesou symbiotickou bakterii *Xenorhabdus bovienii* (Campos-Herrera et al., 2012) a běžně se vyskytují v půdách České Republiky (Mráček et al., 2005). *S. affine*, kmen J006 se přirozeně vyskytuje na rybízové plantáži u Chelčic v Jižních Čechách. Na této lokalitě byl experimentálně aplikován komerční kmen *S. feltiae* ENTONEM (ENT) (Půža, osobní sdělení). Poznání interakcí těchto hlístic tak může napovědět, jaký vliv mohou mít komerčně aplikované kmény hlístovek na přirozeně se vyskytující populace. Pro srovnání byla použita *S. affine* kmen „V“, který byl studován ve výše zmíněné práci Půža a Mráček (2009).

Experimenty s růstem jednotlivých hlístovek na různých bakteriích ukázaly, že *S. affine* J006 je schopna dobře růst jak na vlastní bakterii, tak na bakterii *X. bovienii* ENT i na kombinaci obou. *S. feltiae* ENT také, ale při růstu na bakterii *X. bovienii* J006 se byla schopna rozmnožit pouze na 70% misek. Zdá se tedy, že *X. bovienii* J006 má na *S. feltiae* mírně negativní vliv. Půža et al. (2013) podobným způsobem testovali hlístovky *S. affine* V a *S. kraussei*. V jejich studii, byla *S. affine* V také schopna růst na bakterii *S. kraussei*. *S. kraussei* se však na bakterii *X. bovienii* nevyvíjela.

Některé druhy rodu *Xenorhabdus* dokáží vylučovat toxické látky, které hubí hlístovky spojené s jiným druhem rodu *Xenorhabdus* (Sicard et al., 2004). Například *X.*

*beddingi* a *X. bovienii* byly toxické pro *S. carpocapsae*, která je spojená s *X. nematophila*. Sicard et al. (2004) uvedl, že nepřírozené druhy rodu *Xenorhabdus* mohou mít negativní vliv na vývoj a reprodukci hlístovek. Má práce ukazuje, že i různé kmeny jednoho druhu bakterie mohou mít negativní vliv na růst hlístovek, asociovaných s jiným kmenem stejné bakterie.

Při použití bakterie *X. bovienii* V nebyla *S. feltiae* ENT schopna vývoje, podobně jako *S. kraussei* v práci Půža et al. (2013). Ukazuje se tak, že i blízkce příbuzné kmeny *X. bovienii* z různých kmenů stejného druhu hlístovky, se mohou lišit v produkci toxinů proti jiným hlístovkám. Podobného výsledku bylo dosaženo při výzkumu produkce tzv. bakteriocinů (látky hubící jiné kmeny bakterií) u bakterií rodu *Xenorhabdus*. Bylo pozorováno, že produkce těchto látek se také může lišit i u blízkce příbuzných kmenů druhu *X. bovienii* (Hawlena et al., 2010; Bashey et al., 2012).

Při společné inokulaci *S. affine* J006 a *S. feltiae* ENT na bakterii *S. feltiae* ENT oba druhy hlístovek rostly, ale *S. feltiae* ENT lépe. Na kombinaci obou bakterií rostla lépe *S. affine* J006. Na miskách s bakterií *X. bovienii* J006 se však rozmnožila pouze *S. affine* J006, zatímco *S. feltiae* ENT nikoli. Fakt, že samotná *S. feltiae* ENT na této bakterii rostla, napovídá, že ji v přímé kompetici negativně ovlivnila přímo přítomnost *S. affine*. Je možné, že *S. affine* svoji bakterii rychleji konzumuje a tak *S. feltiae* ENT na těchto miskách zahynula v důsledku nedostatku potravy. Role hlístovky při mezidruhové kompetici však zůstává nejasná, a měla by být předmětem dalšího výzkumu.

## 5.2. Vliv bakterií na kvalitu invazních larev

Obsah tuku a velikost jsou hlavními ukazateli kvality invazních larev (Yang et al. 1997), jelikož mají vliv na dobu přežívání larev ve vnějším prostředí a infektivitu. Překvapivě, obsah tuku *S. feltiae* ENT i *S. affine* J006 byl při růstu na vlastní bakterii nižší než při růstu na nepřírozené bakterii. Podobný výsledek pozorovali Půža et al. (2013), kdy tuková zásoba *S. affine* byla vyšší při růstu na bakterii *S. kraussei* než na vlastní bakterii. Vysvětlení této skutečnosti je složité. U bakterií *S. affine* lze předpokládat, že produkce látek toxických pro jiné hlístovky může být na úkor nutriční hodnoty. To však nevysvětluje vyšší obsah tuku u *S. feltiae* ENT rostoucí na *X. bovienii* J006.

U délky těla *S. feltiae* ENT byla při růstu na všech kombinacích bakterií větší, než u *S. affine* J006. To odpovídá obecně známému rozdílu ve velikosti mezi těmito dvěma druhy.

Rozdíly v délce těla v rámci druhu pozorovány nebyly. Podobné to bylo i u Půža et al. (2013) kde se délka larev *S. affine* V rostoucích na různých bakteriích také nelišila.

Obecně lze shrnout, že přes mírné rozdíly, obě bakterie podporují produkci kvalitního a životaschopného potomstva. To je překvapivé vzhledem k výše zmíněnému faktu, že *S. feltiae* ENT rostoucí na *X. bovienii* J006 byla patrně negativně ovlivněna, protože na některých miskách vůbec nedošlo k rozmnožení.

## 6. Závěry

1. Z dostupné literatury vyplývá, že role bakteriálního symbionta v kompetici hlístovek je významná.

2. *S. affine* J006 a *S. affine* V byly schopny růst na bakterii *X. bovienii* ENT. Negativní ovlivnění přírodní populace *S. affine* J006 komerčním kmenem *S. feltiae* ENTONEM je tak nepravděpodobné.

3. *S. feltiae* ENT roste na bakterii *X. bovienii* J006, ale na *X. bovienii* V nikoli. To ukazuje, že blízké příbuzné kmeny *X. bovienii* se mohou lišit v produkci toxinů proti nepřírodným hlístovkám.

4. *S. feltiae* ENT běžně dokázala růst na bakterii *X. bovienii* J006, ale při společné inokulaci se *S. affine* J006 nerostla. To naznačuje, že na přímé kompetici se nějakým, dosud neznámým způsobem podílí i hlístovka

## 7. Použitá literatura:

- ADAMS B. J., NGUYEN K. B. 2002: Taxonomy and systematics. In: R. GAUGLER, H. K. KAYA, (Eds.), Entomopathogenic nematodes in Biol. Control. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 357–372.
- AGUILLERA M. M., SMART G. C. 1993: Development, Reproduction, and Pathogenicity of *Steinernema scapterisci* in Monoxenic Culture with Different Species of bacteria. Journal of Invertebrate Pathology 62: 289-294.
- AKHURST R. J. 1980: Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. Journal of General Microbiology 121: 303-309.
- AKHURST R. J. 1982: Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. Journ. Of General Microbiol. 128: 3061-3065.
- AKHURST R. J. 1983: *Neoplectana* species: specificity of association with bacteria of the genus *Xenorhabdus*. Int. j. Syst. Bacteriol. 33: 38-45.
- AKHURST R. J., BOEMARE N. E. 1988: A numerical taxonomy study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. Nematophilus* to species. J. Gen. Microbiol. 134: 1835.
- ALATORRE-ROSAS R., KAYA H. K. 1990: Interspecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an insect host in sand. J. Invertebr. Pathol. 55: 179-188.
- BARGMAN C. I., MORI I. 1997: Chemotaxis and thermotaxis. In: RIDDLE D. L., BLUMENTHAL T., MEYER B. J, PRIESS J. R. (Eds.), C. Elegans II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, p. 717-739.
- BASHEY F., YOUNG S. K., HAWLENA H., LIVELY C. M. 2012: Spiteful interactions between sympatric natural isolates of *Xenorhabdus bovienii* benefit kin and reduce virulence. Journal of Evolutionary Biology 25: 431–437.
- BATHON H. 1996: Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. Biological Science and Technology 6: 421-434.
- BEDDING R. A. 1981: Low cost in vitro mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27: 109–114.



- BEDDING R. A. 1984: Large scale production, storage, and transport of the insect-parasitic nematode *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Annals of Applied Biology* 104: 117–120.
- BEDDING R. A., MOLYNEUX A. S. 1982: Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica* 28: 354-359.
- BEGON M., HARPER J. L., TOWNSEND C. R. 1997: *Ekologie - jedinci, populace a společenstva*, Univerzita Palackého, Olomouc, 949 pp.
- BIRD A. F., AKHURST R. J. 1983: The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *International Journal of Parasitology* 13: 599-606.
- BLAXTER M. L., DE LEY P., GAREY J. R., LIU L. X., SCHELDEMAN P., VIERSTRAETE A., VANFLETTERE J. R., MACKEY L.Y., DORRIS M., FRISSE L. M., VIDA J. T., THOMAS W. K. 1998: A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71–75.
- BOEMARE N. E. 2002: Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: GAUGLER R. (Ed.), *Entomopathogenic Nematology*, CAB International, Wallingford, UK, p. 35-56.
- BUECHER E. J., POPIEL I. 1989: Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. *Journal of Nematology* 21: 500–504.
- CAMPBELL J. F., GAUGLER R. 1993: Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour* 126: 155-170.
- CAMPBELL J. F., GAUGLER R. 1997: Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: Dichotomy or variation along continuum? *Fundam. Appl. Nematol.* 20: 393–398
- CAMPBELL J. F., KAYA H. K. 1999a: How and why parasitic nematode jump. *Nature* 397: 485-486.
- CAMPBELL J. F., KAYA H. K. 2002: Variation in entomopathogenic nematode (Steinernematidae and Heterorhabditidae) infective stage jumping behavior. *Nematology* 4: 471-481.
- CAMPOS-HERRERA R., BARBERCHECK M., HOY C. W., STOCK S. P. 2012: Entomopathogenic nematodes as a model system for advancing the frontiers of ecology. *J. Nematol.* 44: 162–176.

- CARTON Y., HAOUAS S., MARRAKCHI M., HOCHBERG M. 1991: Two competing parasitoid species coexist in sympatry. *Oikos* 60: 222-230.
- CROLL N. A. 1970: *The Behaviour of Nematodes: Their activity, Senses and Responses*. Edward Arnold Ltd., London, 117 pp.
- CROLL N. A. 1972: Energy utilization of infective *Ancylostoma tubaeforme* larvae. *Parasitol.* 64: 355-365.
- CROLL N. A., MATTHEWS B. E. 1977: *Biology of Nematodes*. Blackie, Glasgow, chap.4.
- DAVIS B. D., DULBECCO R., EISEN H. N., GINSBERG H. S., WOOD W. B. 1968: *Microbiology*, Harper & Row, New York, 853 pp.
- DILLON A. B., DOWNES M. J., WARD D., GRIFFIN C. T. 2007: Optimizing application of entomopathogenic nematodes to manage large pine weevil, *Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae) populations developing in pine stumps, *Pinus sylvestris*. *Biological Control* 40: 253-263.
- DUNPHY G. B., RUTHERFORD T. A., WEBSTER J. M. 1985: Growth and virulence of *Steinernema glaseri* influenced by different subspecies of *Xenorhabdus nematophilus*. *Journ. of Nematol.* 17: 476-482.
- DUSENBERRY D. B. 1980: Behavior of free-living nematodes. In: ZUCKERMAN B. M. (Ed.), *Nematodes as Biological Models, Volume 1*. Academic Press, New York, p. 127-196.
- EHLERS R.-U., NIEMANN I., HOLLMER S., STRAUCH O., JENDE D., SHANMUGASUNDARAM M., MEHTA U.-K., EASWARAMOORTHY S.-K., BURNELL A. 2000: Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica-Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol Science and Technology* 10: 607-616.
- EHLERS R.-U., SHAPIRO-ILAN D. I. (Eds), *Nematodes as Biocontrol Agents*, CAB International, Wallingford, UK, p. 65-78.
- EHLERS R.-U., SHAPIRO-ILAN D. I. 2005: Mass production. In: GREWAL P. S.,
- EIDT D. C., THURSTON G. S. 1995: Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworms (Coleoptera, Elateridae) and other soil insects. *Canadian Entomologist* 127: 423-429.
- FEDRIANI J. M., FULLER T. K., SAUVAJOT R. M., YORK E. C. 2000: Competition and intraguild predation among three sympatric carnivores. *Oecologia* 125: 258-270.
- FISCHER-LE SAUX M., VIALARD V., BRUNEL B., NORMAND P., BOEMARE N. 1999: Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P.*

*luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1645–56.

- FITTERS P. F. L., PATEL M. N., GRIFFIN C. T., WRIGHT D. J. 1999: Fatty acid composition of *Heterorhabditis* sp. during storage. Comparative Biochemistry and Physiology B 124: 81-88
- FORST S., CLARKE D., 2002: Bacteria-nematode symbiosis. In: GAUGLER, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology, CABI, New York, p. 57–77.
- FRIEDMAN M., 1990. Commercial production and development. In: GAUGLER R., KAYA H. K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 153–172.
- GAUGLER R. 1988: Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. Agric. Ecosys. Environ. 24: 351.
- GAUGLER R., HAN R. 2002: Production technology. In: R. Gaugler (Ed.), Entomopathogenic Nematology, CABI, Wallingford, UK, p. 289-310.
- GREWAL P. S., GAUGLER R., KAYA H. K., WUSATY M. 1993: Infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* (Nematoda, Steinernematidae). Journal of Invertebrate Pathology 62: 22–28.
- GREWAL P. S., SELVAN S., GAUGLER R. 1994: Thermal adaption of the entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment and reproduction. J. Therm. Biol. 19(4): 245-253.
- GRIFFIN C. T., BOEMARE N. E., LEWIS E. E. 2005: Biology and Behaviour. In: GREWAL P. S., EHLERS R.-U., SHAPIRO-ILAN D. I. (Eds), Nematodes as Biocontrol Agents, CAB International, Wallingford, UK, p. 47-64.
- GROVER J. P. 1997: Resource competition, Chapman & Hall, London, 332 pp.
- HALLEM E. A., DILLMAN A. R., HONG A. V., ZHANG Y., YANO J. M., DEMARCO S. F., STERNBERG P. W. 2011: A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. Current Biology 21: 377-383.
- HAN R., CAO L., LIU X. 1992: Relationship between medium composition, inoculum size, temperature and culture time in the yields of *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes. Fundamental and Applied Nematology 15: 223–229.
- HAN R., CAO L., LIU X. 1993: Effects of inoculum size, temperature, and time on in vitro production of *Steinernema carpocapsae* Agriotos. Nematologica 39: 366–375.

- HAN R., Ehlers R.-U. 1998: Cultivation of axenic *Heterorhabditis* spp. dauer juveniles and their response to non-specific *Photorhabdus luminescens* food signals. *Nematologica* 44: 425–435.
- HARA A. H., LINDEGREN J. E., KAYA H. K. 1981: Monoxenic mass production of the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae* Weiser on dog food/agar medium. *USDA Advances in Agriculture W-16*: 8.
- HATCHER M. J., DICK J. T. A., DUNN A. M. 2006: How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecology Letters* 9: 1253-1271.
- HAWLENA H., BASHEY F., MENDES-SOARES H., LIVELY C. M. 2010: Natural history note: spiteful interactions in a natural population of the bacterium *Xenorhabdus bovienii*. *American Naturalist* 175: 374–381.
- HOLOMUZKI J. R., FERMINELLA J. W., POWER M. E. 2010: Biotic Interactions in Freshwater Benthic Habitats. *Journal of the North American Benthological Society* 29: 220-244.
- HUETTEL R. N. 1986: Chemical communicators in nematodes. *J. Nematol.* 18: 3-8.
- CHAVARRIA-HERNANDEZ N., DE LA TORRE M. 2001: Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnol. Letters* 23: 311-315.
- CHESSON P. 2000: Mechanisms of Maintenance of Species Diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31: 343-366.
- CHESSON P. L., HUNTLEY N. 1989: Short-term instabilities and long-term community dynamics. *Trend Ecol. Evol.* 4: 293-298.
- ISHIBASHI N., KONDO E. 1990: Behavior of infective Juveniles. In: R. GAUGLER, H. K. KAYA (Eds), *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, p. 139-150.
- JABBOUR R., BARBERCHECK M. C. 2008: Soil and habitat complexity effects on movement of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in maize. *Biological Control* 47: 235-243.
- KAYA H. K., GAUGLER R. 1993: Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 181–206.
- KAYA H. K., KOPPENHÖFER A. M. 1996: Effect of Microbial and Other Antagonistic Organism and Competition on Entomopathogenic Nematodes. *Biocontrol Science and Technol.* 6: 357-371.

- KLEIN M. G. 1990: Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: GAUGLER R., KAYA H. K. (Eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 195-214.
- KONDO E. 1989: Studies on the infectivity and propagation of entomogenous nematodes,
- KOPPENHÖFER A. M., KAYA H. K. 1995: Density – dependent effects on *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) within an insect host. *J. Parasitol.* 81(5): 797-799.
- KOPPENHÖFER A. M., KAYA H. K. 1996a: Coexistence of two steinernematid nematode species (Rhabditida: Steinernematidae) in the presence of two host species. *Appl. Soil Ecol.* 4: 221–230.
- KOPPENHÖFER A. M., KAYA H. K., SHANMUGAN S., WOOD G. L. 1995: Interspecific competition between steinernematid nematodes within an insect host. *J. Invertebr. Pathol.* 66: 99–103.
- LANG J. M., Benbow M. E. 2013: Species Interactions and Competition. *Nature Education Knowledge* 4(4): 8.
- LEATHER S. R., DAY K. R., SALISBURY A. N. 1999: The biology and ecology of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae): A problem of dispersal? *Bulletin of Entomological Research* 89: 3-16.
- LEWIS E. E., CAMPBELL J., GROFFIN CH., KAYA H., PETERS A. 2006: Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control* 38: 66-79.
- LEWIS E. E., GAUGLER R. 1994: Entomopathogenic nematode (Rhabdita: Steinernematidae) sex ratio relates to foraging strategy. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 238–242.
- LEWIS E. E., GAUGLER R., HARISSON R. 1993: Response of cruiser and ambusher entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) to host volatile cues. *Can. J. Zool.* 71: 765-769.
- LEWIS E. E., GAUGLER R., HARRISON R. 1992: Entomopathogenic nematode host finding – response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology* 105: 309-315.
- LINDEGREN J. E., VALERO K. A., MACKEY B. E. 1993: Simple in vivo production and storage methods for *Steinernema carpocapsae* infective juveniles. *Journal of Nematology* 25: 193-197.
- litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bull. Fac. Agric. Saga Univ.* 67: 1–87.
- MACKENZIE A., BALL A. S., VIRDEE S. R. 1998: *Instant notes in ecology*, Bios Scientific Publishers, Oxford, 399 pp.
- MAGGENTI A. R. 1981: *General nematology*. Springer-Verlag, New York, 372 pp.

- MCGRAW B. A., KOPPENHÖFER A. M. 2009: Population dynamics and interactions between endemic entomopathogenic nematodes and annual bluegrass weevil populations in golf course turfgrass. *App. Soil Ecol.* 41: 77–89.
- MRÁČEK Z., BEČVÁŘ S., KINDLMANN P., JERSÁKOVÁ J. 2005: Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biological Control* 34: 27-37.
- MRÁČEK Z., RŮŽIČKA Z. 1990: Infectivity and development of *Steinernema* sp. strain *Hylobius* (Nematoda, Steinernematidae) in aphids and aphidophagous coccinellids. *J. Appl. Ent.* 110: 92–95.
- MRÁČEK Z., WEISER J. 1979: The head papillae of the Steinernematidae. *J. Invertebr. Pathol.* 34: 310-311.
- MRÁČEK Z., WEISER J. 1983: Pathogenicity of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda) for the flea, *Xenopsylla cheopis*. *J. Invertebr. Pathol.* 42: 133–134.
- MRÁČEK Z., WEISER J., GERDIN S. 1981: Head and cuticular structures of some species in the family Steinernematidae (Nematoda). *Nematologica* 27: 443-448.
- NERMUŤ J., PŮŽA V., MRÁČEK Z. 2012: Entomopatogenní a moluskoparazitické hlístice – neviditelní půdní zabijáci. *Živa* 1: 10-12.
- NEVES J.-M., TEIXEIRA J.-A., SIMONES N., MOTA M. 2001: Effect of airflow rate on yield of *Steinernema carpocapsae* Az 20 in liquid culture in an external-loop airlift bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 72: 369–373.
- NGUYEN K. B., SMART G. C. 1990: *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae). *J. Nematol.* 22: 187–199.
- NGUYEN K. B., SMART G. C., 1995: Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida). *J. Nematol.* 27: 206–212.
- NORRDAHL K., KORPIMÄKI E. 1993: Predation and interspecific competition in two *Microtus* voles. *Oikos* 67: 149-158.
- PATEL M. N., STOLINSKI M., WRIGHT D. J. 1997: Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. *Parasitol.* 114: 489-496.
- PETERS A. 1996: The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol. Sci. Techn.* 6: 389-402.

- PETERS A., EHLERS R.-U. 1994: Susceptibility of leather jackets (*Tipula paludosa* and *Tipula oleracea*; Tipulidae: Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltidae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 163-171.
- PETERS A., EHLERS R.-U. 1997: Encapsulation of entomopathogenic nematode *Steinernema feltidae* in *Tipula oleracea*. *J. Invertebr. Pathol.* 69: 218-222.
- POINAR G. O. 1974: Insect immunity to parasitic nematodes. In: COOPER E. L. (Ed.) *Contemporary topics in immunobiology* 4: 167-178.
- POINAR G. O., 1979: *Nematodes for Biological Control of insects*. CRC Press, Inc., Boca
- POINAR G. O., THOMAS G. M. 1966: Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae:Eubacteriales) in the development of the nematode DD-136 (*Neoplectana* sp. Steinernematidae). *Parasitology* 56: 385–390.
- POINAR G. O., THOMAS G. M., HESS R. 1977: Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae: Rhabditida). *Nematologica* 23: 97–102.
- PŮŽA V., MRÁČEK Z. 2009: Mixed infection of *Galleria mellonella* with two entomopathogenic nematode (Nematoda: Rhabditida) species: *Steinernema affine* benefits from the presence of *Steinernema kraussei*. *J. Invertebr. Pathol.* 102: 40–43.
- PŮŽA V., MRÁČEK Z. 2010: Mechanisms of coexistence of two sympatric entomopathogenic nematode, *Steinernema affine* and *S. kraussei* (Nematoda: Steinernematidae), in a central European oak woodland soil. *Applied Soil Ecology* 45: 65-70.
- PŮŽA V., NERMUŤ J., MRÁČEK Z. 2013: The role of bacterial symbionts in the competition of entomopathogenic nematode species IOBC-WPRS Bulletin 90: 273-276.
- PYE A. E., CLAEISSON R. 1981: Oviposition of the large pine weevil, *Hylobius abietis* (Coleoptera, Curculionidae), in relation to the soil surface. *Annales Entomologici Fennici* 47: 21-24.
- RACTLIFFE N. O. 1982: Cellular defense reactions of insects. In: *Immune reactions to parasites*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, p. 223-244.
- RAJCHARD J., KINDLMANN P., BALOUNOVÁ Z. 2002: *Ekologie II.*, Kopp, České Budějovice, 119 pp.
- Raton, Florida, 249 pp.
- REED E. E., WALLACE H. R. 1965: Leaping locomotion by an insect-parasitic nematode. *Nature* 206: 210-211.

- SAHNEY S., BENTON M. J., FERRY P. A. 2010: Links between taxonomic diversity, ecological diversity and the expansion of vertebrates on land. *Biology letters* 6(4): 544-547.
- SAN-BLAS E., GOWEN S. R., PEMBROKE B. 2008: Scavenging or infection? Possible host choosing by entomopathogenic nematodes. *Nematology* 10: 251–259.
- SELVAN S., CAMPBELL J. F., GAUGLER R. 1993: Density dependent effects on entomopathogenic nematode (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 278-284.
- SELVAN S., GAUGLER R., LEWIS E. E. 1993b: Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *Journal of Parasitology* 79: 167-172.
- SHAPIRO-ILAN D.I., GAUGLER R. 2002: Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 28: 137–146.
- SCHLYTER F., ANDERBRANDT O. 1993: Competition and niche separation between two bark beetles: existence and mechanisms. *Oikos* 68: 437-447.
- SICARD M., FERDY J. B., PAGES S., LE BRUN N., GODELLE B., BOEMARE N., MOULIA C. 2004: When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *Journal of Evolutionary Biology* 17: 985–993.
- SICARD M., HINSINGER J., LE BRUN N., PAGES S., BOEMARE N., MOULIA C. 2006: Interspecific competition between entomopathogenic nematodes *Steinernema* is modified by their bacterial symbionts *Xenorhabdus*. *BMC Evolutionary Biology* 6: 68.
- SICARD M., LE BRUN N., PAGÉS S., GODELLE B., BOEMARE N., MOULIA C. 2003: Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitology Research* 91: 520-524.
- SPIRIDINOV S. E., MOENS M., WILSON M. J. 2007: Fine scale spatial distributions of two entomopathogenic nematodes in a grassland soil. *App. Soil Ecol.* 37: 192–201.
- Steinernema* spp. (Rhabditida: Steinernematidae) in the common cutworm, *Spodoptera*
- STOCK S. P., KOPPENHOFER A. M. 2003: *Steinernema scarabaei* n. sp (Rhabditida: Steinernematidae), a natural pathogen of scarab beetle larvae (Coleoptera : Scarabaeidae) from New Jersey, USA. *Nematology* 5: 191–204.
- STRAUCH O., EHLERS R.-U. 2000: Influence of the aeration rate on the yields of the biocontrol nematode *Heterorhabditis megidis* in monoxenic liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 9–13.



- STUART R. J., BARBERCHECK M. E., GREWAL P. S., TAYLOR R. A. J., HOY C. W. 2006: Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues, and models. *Biol. Control* 38: 80–102.
- STUART R. J., LEWIS E. E., GAUGLER R. 1996: Selection alters the pattern of emergence from the host cadaver in the entomopathogenic nematode, *Steinernema glaseri*. *Parasitology* 113: 183–189.
- SURREY M. R., DAVIES R. J. 1996: Pilot scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode *Heterorhabditis*. *Fundamentals and Applied Nematology* 17: 575–582.
- TIMPER P., KAYA H. K. 1989: Role of second-stage cuticle of entomogenous nematodes in preventing infection by nematophagous fungi. *J. Invertebr. Pathol.* 54: 314-321
- TORR P., HERITAGE S., WILSON M. J. 2004: Vibrations as a novel signal for host location by parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology* 34: 997-999.
- TOWNSEND C. R., BEGON M., HARPER J. L. 2010: *Základy ekologie*, Univerzita Palackého, Olomouc, 505 pp.
- WALLACE H. R., DONCASTER C.C. 1964: A comparative study of the movement of some microphagous, plant parasitic and animal parasitic nematodes. *Parasitology* 54: 313
- WANG Y. I., GAUGLER R. 1999: *Steinernema glaseri* surface coat protein suppress immune response of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Biolog. Control* 14: 45-50.
- WEISER J., MRÁČEK Z. 1988: *Parazitické hlístice hmyzu*. Academia, Praha, 258 pp.
- WILSON M. J., EHLERS R.-U., GLAZER I. 2012: Entomopathogenic nematode foraging strategies – is *Steinernema carpocapsae* really an ambush forager? *Nematology* 14(4): 389-394.
- WOUTS W. M. 1980: Biology, life cycle and redescription of *Neoplectana bibionis* Bovien, 1937 (Nematoda, Steinernematidae). *J. Nematol.* 12: 62-67.
- WOUTS W. M. 1981: Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematode: Heterorhabditidae) on artificial media. *Journal of Nematology* 13: 467–469.
- WOUTS W. M., MRÁČEK Z., GERDIN S., BEDDING R. A. 1982: *Neoplectana* Steiner, 1929 a junior synonym of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda; Rhabditida). *Syst. Parasitol.* 4: 147-154.
- YANG H., JIAN H., ZHANG S. & ZHANG G. 1997: Quality of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* produced on different media. *Biological Control* 10: 193-198.

YOO S.-K., BROWN I., GAUGLER R. 2000: Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: Lipid source and concentration. Applied Microbiology and Biotechnology 54: 759-763.

ZUCKERMAN B. M., JANSSON H.-B. 1984: Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host / prey recognition. Ann. Rev. Phytopathol. 22: 95-11