

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Nekrofágie u entomopatogenních hlístic (EPN)

Diplomová práce

Diana Čáková

Školitel: RNDr. Vladimír Půža, Ph.D.

České Budějovice 2017

Čápková D. (2017): Nekrofágie u entomopatogenních hlístic (EPN). [Scavenging by entomopathogenic nematodes (EPN). Mgr. Thesis, in Czech] – 37 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: The aim of the present study was to study the occurrence of scavenging behavior among different species and strains of entomopathogenic nematodes. Another part of the study was focused on scavenging of the selected entomopathogenic nematodes in insects killed by various non-native strains of *Xenorhabdus bovienii*. Further aim was to investigate the interspecific competition of the selected entomopathogenic nematodes with the nematode *Oscheius myriophila* for dead hosts. The final aim was the search for possible toxicity of the selected *X. bovienii* strains against nematode *Oscheius myriophila*.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě 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 17.4.2017

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat především mému školiteli Vladimíru Půžovi za cenné rady, ochotu, čas, poskytnutí odborné literatury a za jakoukoli jinou pomoc. Dále bych chtěla poděkovat Jiřímu Nermuťovi, paní Lence Kropáčkové a panu doktoru Mráčkovi za pomoc v laboratoři. Na závěr bych chtěla poděkovat všem ostatním, kteří mě jakkoliv podpořili.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	3
2.1. Systematické zařazení skupiny.....	3
2.2. Morfologie.....	3
2.3 Biologie a životní cyklus.....	3
2.3.1. Adaptace hlístovek pro život v půdě, lokalizace a usmrcení hostitele.....	3
2.3.2. Životní cyklus hlístovek.....	4
2.4. Hostitelské spektrum.....	4
2.5. Hlístovky v biologické kontrole.....	5
2.5.1. Význam a aplikace.....	5
2.6. Bakteriální symbionti.....	6
2.6.1. Taxonomie.....	6
2.6.2. Symbiotický vztah s hlístovkami.....	6
2.6.3 Symbiotické bakterie v mezidruhové kompetici.....	7
2.7. Nekrofágie-obecné pojetí.....	7
2.7.1. Nekrofágie hlístovek.....	8
2.7.2. Využití kadáveru kolonizovaného jinou EPN.....	9
2.8. Kompetice s fakultativně parazitickými hlísticemi.....	9
3. Metodika.....	11
3.1. Typy pokusů.....	11
3.2. Použité hlístice a bakterie.....	11
3.3. Přípravy k pokusům.....	12
3.3.1. Množení EPN a <i>O. myriophila</i>	12
3.3.2. Izolace bakterií.....	12
3.4. Schopnost nekrofágie u různých druhů a kmenů hlístovek.....	13
3.5. Kolonizace hostitelů nakažených různými kmeny <i>X. bovienii</i>	13
3.6. Kompetice s <i>O. myriophila</i> při infekci a kolonizaci hmyzu.....	14
3.7. Test toxicity bakterií.....	14
3.8. Statistické zpracování.....	15
4. Výsledky.....	16
4.1. Schopnost nekrofágie u různých druhů a kmenů hlístovek.....	16
4.2. Kolonizace hostitelů nakažených různými kmeny <i>X. bovienii</i>	18
4.3. Kompetice EPN s <i>Oscheius myriophila</i> při infekci a kolonizaci hmyzu.....	20
4.4. Toxicita bakterií vůči <i>O. myriophila</i>	23

5. Diskuse.....	25
5.1. Schopnost nekrofágie u různých druhů a kmenů hlistovek.....	25
5.2. Kolonizace hostitelů nakažených různými kmeny <i>X. bovienii</i>	26
5.3. Kompetice EPN s <i>Oscheius myriophila</i> při infekci a kolonizaci hmyzu	28
5.4. Toxicita bakterií vůči <i>O. myriophila</i>	29
6. Závěry	30

1. Úvod

Entomopatogenní hlístice (EPN) čeledi Steinernematidae jsou obligátní parazité hmyzu obývající půdy celého světa (Poinar, 1979). Tito parazité dokáží žít v mutualistickém vztahu s bakterií rodu *Xenorhabdus* (Akhurst a Boemare, 1988).

Hlístovky vynikají oproti jiným entomoparazitickým hlísticím svou jedinečnou životní strategií, a to střídáním parazitismu a saprofytismu. Hlístovky jako parazité napadají hmyzí hostitele a s pomocí symbionta jej zahubí a následně se na něm i na bakterii jako saprofyte živí a množí (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.

Entomopatogenní hlístice byly dlouhou dobu považovány za obligátní parazity, ale ukázalo se, že alternativním způsobem přežití může být i kolonizování mrtvého těla hostitele, tedy nekrofágie (San-Blas a Gowen, 2008). Tímto způsobem chování se hlístovky mohou vyhnout imunitnímu systému živých hostitelů (San-Blas a Gowen, 2008). Kolonizováním těla hostitele si hlístovky mimo jiné pravděpodobně rozšíří hostitelské spektrum o hostitele, kteří jsou za normálních podmínek resistantní (Půža a Mráček, 2010).

Schopnost nekrofágie byla dosud popsána u šesti druhů hlístovek rodu *Steinernema*. Lze však předpokládat, že rozšíření tohoto chování v rámci čeledi Steinernematidae bude větší.

Nedávná práce Bisch et al. (2016) ukázala, že bakteriální symbiont má vliv na životní strategii hlístovky a tento vliv se může lišit mezi bakteriemi stejného druhu, asociovanými s jedním druhem hlístovky. Je tedy možné, že schopnost nekrofágie se bude lišit u různých kmenů hlístovek v rámci jednotlivých druhů. Pro jakékoli závěry v tomto ohledu však dosud není dostatek dat.

Speciálním typem nekrofágie je využití hostitele již napadeného jinou EPN. Takové chování bylo dosud pozorováno pouze u hlístovky *Steinernema affine* která takto profitovala

z přítomnosti *S. kraussei* (Půža a Mráček, 2009). Skutečný rozsah a význam tohoto fenoménu je dosud neprozkoumaný. Obecně lze konstatovat, že přestože nekrofágní chování může mít značný význam pro přežívání EPN v prostředí, existuje zde stále řada nejasností.

Nedávné práce naznačily, že entomopatogenní hlístice mohou být negativně ovlivněny kompeticí s fakultativně parazitickými hlísticemi rodu *Oscheius* (Campos-Herrera et al., 2015a, 2015b). Lze čekat, že by mohly významně ovlivnit také nekrofágnii EPN. Tento aspekt však dosud nebyl v žádné práci hodnocen. Bakterie rodu *Xenorhabdus* jsou schopny produkovat toxické látky proti jiným mikroorganismům i proti jiným hlístovkám (Půža et al. 2013). Je tedy možné, že podobně by mohly některé symbiotické bakterie reagovat na přítomnost hlístic rodu *Oscheius*.

Kompetice mezi EPN a fakultativně parazitickou hlísticí může mít možné důsledky v biologické kontrole, kdy by jejich efektivita mohla být snížena kompeticí s hlísticemi rodu *Oscheius*. Bližší poznání tohoto fenoménu tak může být zajímavé nejen z teoretického, ale i z praktického hlediska.

Cílem mé práce bylo zjistit rozšíření nekrofágního chování u různých druhů a kmenů hlístovek. Dalším cílem bylo pozorování nekrofágnie na hmyzu nakaženém různými nepřírozenými bakteriemi rodu *Xenorhabdus*. Jiným cílem bylo prozkoumat mezidruhovou kompetici vybraných hlístovek s hlísticí *Oscheius myriophila* o živého a uhynulého hostitele. Posledním cílem bylo prozkoumat toxicitu bakterií vůči hlístici *Oscheius myriophila*.

2. Literární přehled

2.1. Systematické zařazení skupiny

Entomopatogenní hlístice (EPN) patří do kmene hlístic (Nematoda), řádu háďata (Rhabditida) (Maggenti, 1981). Jsou složeny se ze 2 čeledí, a to Steinernematidae a Heterorhabditidae, které jsou si průběhem invaze a rychlostí úhynu hostitele podobné (Weiser a Mráček, 1988). Obě čeledi netvoří monofyletickou skupinu, ale tento styl života vznikl nejméně dvakrát (Blaxter et al., 1998). Čeleď Steinernematidae Chitwood a Chitwood 1937 v současnosti obsahuje rod *Steinernema* Travassos, 1927 s cca 100 popsanými druhy a rod *Neosteinernema* Nguyen a Smart, 1994 s druhem jediným.

2.2. Morfologie

Tělo hlístovek rodu *Steinernema* je dlouhé, nit'ovité s bílým zabarvením. V průběhu vývojového cyklu se samice velikostně liší od samců. Samice mohou být 2,3 - 8 mm velké zatímco samci jen 0,5 – 2 mm. Invazní larvy mohou měřit 0,5 – 1,5 mm (Mráček et al., 1981). Tělo hlístovek je bilaterálně souměrné, zatímco rozložení hlavových papil a vnitřní uspořádání tělních orgánů je radiálně symetrické (Weiser a Mráček, 1988).

Pářicím orgánem samic je ventrální vulva vyúst'ující těsně za polovinou těla (Steiner, 1923). Kopulačním orgánem samců jsou párové spikuly a nepárové gubernakulum (Chitwood a Chitwood, 1937).

2.3 Biologie a životní cyklus

2.3.1. Adaptace hlístovek pro život v půdě, lokalizace a usmrcení hostitele

Jediná stádia volně žijící v půdě jsou invazní larvy hlístovek. Díky různým uzpůsobením jsou schopné přežít v půdě až několik měsíců (Griffin et al., 2005). Jedním z přizpůsobení je zachování kutikuly z druhého vývojového stádia, která chrání tělo před vysycháním a patogeny (Timper a Kaya, 1989). Larvy se také mohou chránit agregací, tedy hromadným seskupováním, kdy při okrajích shluku hlístovky většinou uhynou a vytvoří tak bariéru chránící ostatní larvy před vysycháním a slunečním zářením (Wallace a Doncaster, 1964; Ishibashi a Kondo, 1990). Larvy nemohou díky uzavřenému ústnímu otvoru přijímat

potravu (Weiser a Mráček, 1988), a tak přežívají pouze zásluhou energetických zásob (Selvan et al., 1993b; Fitters et al., 1999).

Invazní larvy mají schopnost lokalizovat hostitele díky smyslovým orgánům umístěným na hlavě. Tzv. amphidy a papily dokáží zachytit oxid uhličitý a jiné metabolity uvolňované hostitelem a pohybovat se dle gradientu těchto látek k hostiteli (Ishibashi a Kondo, 1990; Griffin et al., 2005). Po nalezení vhodného hostitele mohou larvy pronikat do hemocoelu skrz ústa, řitní otvor či spirakula (Bedding a Molyneux, 1982; Peters a Ehlers, 1994). Larva ze svého střevního váčku do hemocoelu hostitele uvolní symbiotickou bakterii, která se množí v hemolymfě hostitele. Ten následkem bakteriální infekce hyne během 24 – 48 hod (Griffin et al., 2005).

2.3.2. Životní cyklus hlístovek

Po průniku do hostitele se larvy vyvíjejí v larvy čtvrtého instaru a ty se poté vyvíjejí v první, tzv. obří generaci. Po spáření dospělců se z nakladených vajíček vyvíjejí larvy, které přes 4 instary dospívají v dospělé druhé generace, tzv. normální (Mráček a Weiser, 1988). V normální generaci samice kladou vajíčka a při dostatku živin se vyvíjí ještě jedna až dvě generace. Při nedostatku živin se z druhého stádia larev vyvíjí invazní larva, která opustí hostitele (Poinar, 1979; Adams a Nguyen, 2002).

2.4. Hostitelské spektrum

Hlístovky dokáží napadat široké spektrum hostitelů, a proto hrají významnou roli v biologické kontrole. Jsou schopné napadat nejen hmyz, ale i jiné bezobratlé např. stonožky (Symphyla), stejnonožce (Isopoda), či mnohonožky (Diplopoda) (Bathon, 1996). V přirozených podmínkách jsou však schopny napadat pouze hostitele, kteří se vyskytují alespoň nějaký čas v půdě, např. larvy z řádů Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera (Peters, 1996).

Někteří hostitelé však mohou být za určitých podmínek rezistentní nebo méně náchylní k hlístovkám, např. larvy kovaříků čeledi Elateridae (Eidth a Thurston, 1995), různé druhy švábů čeledi Blattellidae a Blattidae (Koehler et al., 1992), moucha květilka zelná (*Delia radicum*) (Bracken, 1990; Leietal., 1992) či rané instary muchničky (*Simulium vittatum*) (Gaugler & Molloy, 1981). Mohou si vytvářet morfologickou bariéru (např. larvy kovaříků čeledi Elateriadae) (Eidth a Thurston, 1995), jako je např. pevná kutikula, hedvábné kokony

či uzavíratelná spirakula. Jiní hostitelé např. scarabaeoidní larvy snižují množství vylučovaného oxidu uhličitého, aby minimalizovali chemické podněty (Gaugler, 1988). Někteří hostitelé jsou také schopni se přemísťovat v prostoru za účelem vyhnutí se hlístovkám (Morris et al., 1990; Jouvenaz a Martin, 1992).

Existuje také obrana v podobě buněčné a humorální odpovědi hostitele. Hostitel dokáže fagocytovat buňky a zničit je pomocí hemolymfy. Je také schopný enkapsulace (Peters a Ehlers, 1997), tedy shluku krevních buněk kolem parazita, které jej uzavrou do kapsule (Poinar 1974; Ratcliffe 1982). Ve spolupráci se symbionty jsou hlístovky často schopné překonat imunitní systém hostitele (Wang a Gaugler, 1999).

2.5. Hlístovky v biologické kontrole

2.5.1. Význam a aplikace

Zvýšený zájem o výzkum hlístovek od 70. let se objevil z důvodu nedostatku šetrných a efektivních prostředků k přírodě, které by redukovaly hmyzí škůdce (Klein, 1990). Jiným důvodem je také možnost masové produkce hlístovek (Friedman, 1990). Rozlišují se dvě metody produkce, a to in vivo a in vitro. Metody in vivo jsou založeny na množení hlístovek na živém hostiteli a jsou tedy technicky jednodušší. Metody in vitro jsou z hlediska vybavení finančně nákladnější, ale v produkci larev levnější (Ehlers a Shapiro-Ilan, 2005).

Entomopatogenní hlístice jsou jako biologické prostředky v ochraně rostlin zatím méně využívané z důvodu vysoké ceny a poměrně nesnadného použití. Pokud hrozí poškození slunečním zářením, tak je nutností aplikace ve večerních hodinách. Jindy je potřeba přímé vpravení do půdy či provedení závlaky po aplikaci. Nejčastější metodou je v dnešní době plošný střík. V minulosti se naopak zvažovaly metody pásové a ohniskové aplikace v těsné blízkosti rostlin, které se snažily snížit spotřebu hlístic. Je však potřeba aplikaci opakovat každý rok, jelikož mají hlístovky v přirozeném prostředí řadu nepřátel, kteří je mohou zahubit, a tak redukovat jejich množství.

K regulaci škůdců jsou v dnešní době používané druhy hlístic, jako jsou *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. kraussei*, *S. riobrave*, *S. scapterisci*, *Heterorhabditis megidis*, *H. bacteriophora*. Proti larvám brouků, např. listokaz zahradní (*Phyllopertha horticola*) či lalokonosec rýhovaný (*Otiorhynchus sulcatus*) se využívají převážně zástupci rodu *Heterorhabditis*. Hlístovka *S. feltiae* je využívána ke kontrole housenek osenice (*Agrostis* sp.),

obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) a larev dvoukřídlých (Nermuť et al., 2012). V České Republice jsou na trhu v současné době k dispozici *S. feltiae* ve formě biologických přípravků Entonem, Nemaplus a Steinernema System a *H. bacteriophora* v přípravcích Larvanem a Nematop (Půža a Nermuť, 2015).

2.6. Bakteriální symbionti

2.6.1. Taxonomie

Čeď Steinernematidae žije v symbióze s bakterií rodu *Xenorhabdus* (čeď Heterorhabditidae s bakterií rodu *Photorhabdus*). Oba rody bakterií patří ke skupině gramnegativních bakterií z čeledi Enterobacteriaceae spadající do γ - podtřídy Proteobakterií (Boemare, 2002). Některé druhy těchto bakterií jsou přítomny pouze u jednoho druhu hlístovky, jedná se např. o *X. nematophilus* u druhu *S. carpocapsae*, jiné bakterie se nachází u více druhů hlístovek, např. *X. bovienii* u druhů *S. affine*, *S. feltiae*, *S. kraussei*, *S. intermedium* (Akhurst a Boemare, 1988), *S. weiseri*, *S. silvaticum* (Tailliez et al., 2010), *S. litorale*, *S. poinari*, *S. xinbinense* a *S. xueshanense* (Faktorová, 2016).

2.6.2. Symbiotický vztah s hlístovkami

Symbiotické bakterie nesou řadu vlastností, které mohou mít zásadní dopad na vývoj hlístovek. Hlístovky, jakožto vektor přenesou symbionta do hemocoelu hostitele, kde bakterie většinou přemohou imunitní systém hostitele a zahubí jej uvolněním toxinů (Boemare, 2002; Forst a Clarke, 2002). Bakterie také dokáží uvolňovat tzv. bakteriociny (Davis et al., 1968), které chrání uhynulé tělo hostitele před různými saprofytickými organismy (Han a Ehlers, 1998; Poinar a Thomas, 1966; Poinar et al., 1977), ale chrání i před konkurenčními bakteriemi rodu *Xenorhabdus* (Hawlena et al., 2010; Bashey et al., 2012). Zásadní význam představují v poskytnutí potravy pro vývoj a rozmnožování hlístovek (Griffin et al., 2005). V přirozeném prostředí se bakterie obecně bez hlístovek nevyskytují a stejně tak i naopak; v experimentálních podmínkách jsou hlístovky schopné žít se na jiných bakteriích, což ovšem může mít negativní dopad na jejich růst, reprodukci a vývoj potomstva (Aguillera a Smart, 1993)

Symbiotické bakterie se nachází ve dvou rozdílných formách. V první fázi tzv. vegetativní je přítomna v hostiteli v nadbytku živin (Griffin et al., 2005). Ve druhé tzv. foretické formě se nachází ve středním váčku invazní larvy a mají snížený metabolismus (Bird a Akhurst, 1983).

2.6.3 Symbiotické bakterie v mezidruhové kompetici

Dle Sicard et al. (2004) se bakterie dle působení na hlístovku mohou dělit na 3 skupiny, a to mutualistické, neutrální a patogenní. Ve svých pokusech studovali konkrétně *S. carpocapsae*, která v interakci se svou přirozenou bakterií lépe infikovala hostitele a produkovala potomstvo. Neutrální bakterie (např. *X. poinarii*) měla nepatrný či žádný vliv na fitness hlístovky. Patogenní bakterie (např. *Photorhabdus* sp., *X. bovienii*) redukovala či potlačovala produkci potomstva hlístovky. To naznačuje vztah mezi fitness hlístovky a genetickou vzdáleností použité bakterie od jejího přirozeného symbionta. S tímto faktem souvisí také produkce toxinů bakterií. Dle Sicard et al. (2004) bude druh hlístovky odolný vůči toxinům své vlastní bakterie či blízkce příbuzných bakterií, naopak fylogeneticky vzdálené druhy bakterií budou mít na hlístovky patogenní vliv (Sicard et al., 2004).

Sicard et al (2006) zkoumali 2 odlišné druhy rodu *Steinernema*, a to *S. carpocapsae* (se symbiontem *X. nematophilus*) a *S. scapterisci* (se symbiontem *X. innexi*). I když oba druhy vykazovaly zvýšenou fitness při parazitaci hostitele s jejich vlastním symbiontem, u *S. scapterisci* nebyl tento rozdíl tak výrazný. S nižší vazbou na přirozeného symbionta patrně souvisí fakt, že jedna invazní larva *S. scapterisci* v průměru obsahuje pouze 0.07 buněk bakterií, oproti 50 buňkám u larvy *S. carpocapsae* (Sicard et al., 2003). Dále pak skutečnost, že *S. scapterisci* byla schopna reprodukce na různých nepřirozených bakteriích, zatímco *S. carpocapsae* se nemnožila s většinou z nich (Sicard et al., 2004; 2005).

2.7. Nekrofágie-obecné pojetí

Nekrofágie je důležitý proces v ekosystému, při němž jsou mrtvá těla organismů konzumována různými živočichy. Typičtí mrchožrouti jsou např. hyeny, supi, orli, hrobařiči, řada hmyzích larev, jako chrobáků, kozojedů, molů, much (Losos et al., 1984). Existují dva typy, a to obligátní a fakultativní nekrofágie. Obligátní nekrofágové mohou přežít konzumací pouze mrtvého těla organismu. Tato strategie je v přírodě poměrně vzácná z důvodu obtížného a energeticky náročného hledání potravy. Z obratlovců jsou typickým příkladem supi, z bezobratlých hrobařiči a masařky. Fakultativní nekrofágové získávají převážnou část potravy hlavně predací a jako příklad mohou posloužit hyeny či vlci (Wilson a Wolkovich, 2011).

Mezi nekrofágy patří i hlístice. Za obligátního nekrofága se může považovat např. mořská hlístice (*Oncholaimus campylocercoides*) žijící v hydrotermálních průduších a živící

se pouze na mrtvém těle živočichů, kteří uhynou kvůli vysoké koncentraci sirovodíku (Thiermann et al., 1997). Některé bentické hlístice jako jsou *Axonolaimus* a *Daptonema* (Urban-Malinga et al., 2006) či *Enoploides longispiculosus* (Moens et al., 1999, 2005) se mohou také chovat jako nekrofágové. Jiným příkladem je mořská hlístice (*Pontonema vulgare*), která je nalákána na tělo ryby uhynulé v důsledku nedostatku kyslíku ve vodě (Prein, 1988). Za predátory i nekrofágy jsou považovány larvy čeledi Oncholaimidae a Enchelidiidae (Jensen, 1987; 1988). Například *Adoncholaimus thalassophygas* (Oncholaimidae) kromě konzumace rozložené organické hmoty kolonizuje mrtvá těla živočichů (Lopéz et al., 1979). Některé hlístice z čeledi Diplogasteridae mohou být vábeni mrtvolami hmyzu, které konzumují (Poinar, 1979).

2.7.1. Nekrofágie hlístovek

Entomopatogenní hlístice byly dlouhou dobu považovány za obligátní parazity či patogeny hmyzu (Poinar, 1979). Ukázalo se však, že alternativním způsobem přežití může být také nekrofágie (San-Blas a Gowen, 2008), tedy kolonizování mrtvého těla hostitele. Tímto způsobem chování jsou schopné se vyhnout imunitnímu systému živých hostitelů (San-Blas a Gowen, 2008). Kolonizováním těla hostitele si hlístovky mimo jiné pravděpodobně rozšíří hostitelské spektrum o hostitele, kteří jsou za normálních podmínek resistantní (Půža a Mráček, 2010). V přirozeném prostředí však mohou znesnadňovat nekrofágui entomopatogenních hlístic saprofytické mikroorganismy a mrchožrouti (Půža a Mráček, 2010).

Schopnost kolonizace se dle San-Blas et al. (2008) liší u různých druhů hlístic. San-Blas & Gowen (2008) uvedli, že hlístice *H. megidis* byla spíše schopna infikovat živého hostitele zavíječe voskového než kolonizovat mrtvé tělo.

Půža a Mráček (2010) ve svých pokusech na živých a mrtvých larvách hostitelů nepozorovali žádné výrazné rozdíly v kolonizaci hlístovkami *S. affine* a *S. kraussei*. Oba druhy ve vysoké míře invadovaly živé a mrtvé larvy zavíječe voskového, avšak v pokusech na živých a mrtvých tělech švábů (*Blatella germanica*) byla pozorována silná kolonizace pouze u mrtvých těl (Půža a Mráček, 2010). U střevlíků a larev drátovců byli kolonizováni pouze mrazem zabíjenými hostiteli. Tento hmyz je za normálních podmínek resistantní k infekci hlístovkami (Georgis et al., 1991; Eidt a Thurston, 1995), a tak kolonizováním jejich mrtvých těl si hlístovky rozšiřují hostitelské spektrum.

Autoři pozorovali, že studované hlístice obecně produkovaly méně potomstva při kolonizaci mrtvého těla jakéhokoliv hostitele než při nákaze. Příčinou mohla být kompetice s jinými mikroorganismy, kteří se vyskytují ve střevě hostitele (Kaya a Koppenhöfer, 1996).

To ukazují např. pokusy Bisch et al. (2014, 2016), ve kterých byly infikovány můry blýskavky (*Spodoptera littoralis*) a zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) různými druhy hlístovek. *S. weiseri* se svým symbiontem *Xenorhabdus bovienii* CSO3 vykazovala sníženou virulenci a fitness ve srovnání se 4 dalšími druhy rodu *Steinernema* a jejich symbionty. Injekční testy také ukázaly, že symbiont *X. bovienii* CSO3 není oproti ostatním testovaným kmenům virulentní vůči testovaným hostitelům. Na základě těchto dat autoři usoudili, že by pár *S. weiseri* s bakterií *X. bovienii* CSO3 mohl být specializován na nekrofágií. Teoreticky by bylo možné, že *S. weiseri* - *X. bovienii* CSO3 může profitovat z interakce s jinou hlístovkou. Příkladem je práce Půži a Mráčka (2009), kde *S. affine* v přítomnosti *S. kraussei* vykazovala lepší reprodukci. Ve světle těchto faktů by bylo možné usuzovat, že schopnost nekrofágie se bude lišit u různých druhů a kmenů hlístovek.

2.7.2. Využití kadáveru kolonizovaného jinou EPN

Speciálním případem nekrofágie může být využití kadáveru kolonizovaného jinou EPN. To dokazuje výzkum Půži a Mráčka (2009), ve kterém infikovali hostitele hlístovkou *S. kraussei* a po určité době přidali dávku *S. affine*. Výsledek byl podobný jako při směsné infekci, *S. affine* dominovala i v již zahubeném hostiteli. Produkce potomstva *S. kraussei* byla velmi nízká.

Dle San-Blas et al. (2008) některé hlístovky by mohly preferovat mrtvé hostitele před živými. Půža a Mráček (2009) uvedli, že imunitní systém již infikovaných hostitelů je buď oslaben, nebo zdolán a tělo hostitelů již má plně vyvinutou bakteriální populaci. Avšak pokud druhý kolonizátor invaduje tělo již infikovaného hostitele příliš pozdě, může se střetnout s dobře vyvinutou populací první hlístovky. Výsledky Půži a Mráčka (2009) ukazují, že pro *S. affine* jsou nejvhodnější hostitelé, kteří byli infikováni hlístovkou *S. kraussei* cca 24 h před její aplikací. Skutečný rozsah tohoto chování a možný význam pro přírodní populace EPN nejsou známy.

2.8. Kompetice s fakultativně parazitickými hlísticemi

Hlístovky se při kolonizaci mrtvého těla hostitele patrně často potýkají s jinými nekrofágy, včetně hlístic. Může se jednat např. o bakteriovorní hlístice, které se vyznačují

krátkým životním cyklem a vysokou reprodukční schopností. Příkladem je výzkum interakce *S. riobrave* s hlísticí *Pellioiditis* sp., která vykazovala sníženou produkci potomstva (Duncan et al., 2003), zatímco v přítomnosti *Acrobeloides maximum* a *Rhabditis rainai* nebyla *S. riobrave* ovlivněna (Campos-Herrera et al., 2012). Teoreticky je možné, že pro některé fakultativně parazitické hlístice může být přítomnost hlístovek výhodná. Výzkumy Ali et al. (2013) totiž naznačily, že hlístice patřící do skupiny *Acrobeloides* jsou schopny pomocí chemických podnětů najít uhynulého hostitele již napadeného hlístovkou.

Hlístice rodu *Oscheius* patří mezi živočichy žijící fakultativně parazitickým způsobem života, kteří dle výzkumů v laboratoři a v přírodě mohou konkurovat hlístovkám o uhynulé hmyzí hostitele (Duncan et al., 2003, 2007; Campos-Herrera et al., 2012). Campos-Herrera et al. (2015a) uvedli, že v Galleriových pastech vložených do vzorků zemědělských půd ve Švýcarsku byli uhynulí hostitelé ve více než 80% kolonizováni jak hlístovkami tak hlísticemi rodu *Oscheius*.

Dle hypotézy Campos-Herrera et al. (2015b) by byl *Oscheius* sp. schopný spíše kolonizace než infekce a přítomnost malého množství hlístovek (s počátečním inokulem 3 larev/housenku) v mrtvole by byla prospěšná pro jeho reprodukci, čímž by vytlačil potomstvo hlístovek. V experimentech se pak druhy *O. tipulae* a *O. onirici* skutečně chovali spíše jako nekrofágové. Nízká koncentrace (3 larvy/housenku) hlístovky konkrétně *S. kraussei* pak podle očekávání vedla ke snížené reprodukci, a tedy ku prospěchu hlístice *Oscheius* spp; naopak zvýšená dávka larev (20 larev/housenku) vedla *S. kraussei* k překročení kompetice a tak zvýšení produkce potomstva.

Na základě dostupných údajů tak lze usuzovat, že pokud jsou hlístice rodu *Oscheius* schopné konkurovat s EPN o živého hostitele, tím spíše by mohly být schopné o mrtvé tělo hostitele. Je také možné, že různé druhy hlístovek budou různě náchylné k ovlivnění kompeticí s hlísticemi *Oscheius* sp. Některé kmeny bakterií rodu *Xenorhabdus* produkují patrně toxiny proti jiným hlístovkám (Půža et al. 2013). Je tedy možné, že podobné látky by mohly být produkovány i proti hlísticím *Oscheius* sp.

Obecně vzato by mezidruhová kompetice mezi hlísticemi rodu *Oscheius* sp. a EPN mohla mít důsledky v biologické ochraně rostlin, kde by přítomnost těchto hlístic mohla snižovat efektivitu aplikovaných hlístovek. Pro jakékoli závěry v tomto ohledu však dosud není k dispozici dostatek dat.

3. Metodika

3.1. Typy pokusů

V rámci této práce byly provedeny 4 typy pokusů. V prvním z pokusů byla studována schopnost nekrofágie u různých druhů a kmenů hlístovek. V druhém pokusu byla zkoumána kolonizace hostitelů nakažených různými kmeny *X. bovienii*. Třetí pokus byl zaměřen na kompetici vybraných hlístovek s fakultativně parazitickou hlísticí *O. myriophila* při infekci a kolonizaci hmyzu. V posledním pokusu byla studována toxicita vybraných bakterií vůči *O. myriophila*.

3.2. Použité hlístice a bakterie

Pro první pokus byly použity entomopatogenní hlístice (EPN) čeledi Steinernematidae různých druhů (celkem 12) a kmenů (celkem 29) (Tabulka 1). Tyto kmeny pocházely nejen z oblastí České republiky, ale i ze zahraničí. Ve druhém a ve třetím pokusu bylo použito 5 druhů hlístic s jejich bakteriálními symbionty (v tabulce 1 tučně vyznačené). V posledním pokusu bylo použito 13 kmenů bakterií šesti druhů rodu *Xenorhabdus* (v tabulce 2) a hlístice *O. myriophila*.

Tabulka 1: Přehled použitých hlístic v 1. pokusu a ve 2. a ve 3. pokusu (tučně vyznačené).

Druh	Kmen	Původ
<i>S. affine</i>	1309	Česká republika
<i>S. affine</i>	CAK-01	Česká republika
<i>S. affine</i>	CB-1B	Česká republika
<i>S. affine</i>	HOS 2	Česká republika
<i>S. affine</i>	LON	Francie
<i>S. affine</i>	PARIS 4	Francie
<i>S. akhursti</i>	AKH	Čína
<i>S. arenarium</i>	GEL	Rusko
<i>S. bicornutum</i>	1298	Česká republika
<i>S. boemarei</i>	GT	Francie
<i>S. feltiae</i>	181	Česká republika
<i>S. feltiae</i>	626	Česká republika
<i>S. feltiae</i>	JAK	Rusko
<i>S. feltiae</i>	NF UST	Rusko
<i>S. feltiae</i>	SF SN	Francie
<i>S. glaseri</i>	GLAS	USA
<i>S. intermedium</i>	MÜNSTER	Německo
<i>S. kraussei</i>	KR	Česká republika
<i>S. kraussei</i>	VA 6.1	Bulharsko

Druh	Kmen	Původ
<i>S. intermedium</i>	USA	USA
<i>S. krausseii</i>	VA 7.2	Bulharsko
<i>S. litorale</i>	AICHI	Japonsko
<i>S. litorale</i>	IBAR	Japonsko
<i>S. riobrave</i>	RIO	USA
<i>S. weiseri</i>	1158	Česká republika
<i>S. weiseri</i>	DUB04	Česká republika
<i>S. weiseri</i>	KAL 2	Česká republika
<i>S. weiseri</i>	TUR	Turecko

3.3. Přípravy k pokusům

3.3.1. Množení EPN a *O. myriophila*

K množení hlístic byly používány housenky zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) posledního instaru z laboratorního chovu. Housenky byly umístěny na Petriho miskách s vlhkým filtračním papírem a nakaženy dávkou 20 larev (EPN) / housenku. Hlístice *O. myriophila* je aplikována o dávce 500 larev / mrtvou housenku (v laboratoři je však dlouhodobě množena na NGM agaru (Sulston a Hodgkin, 1988). Uhybnulé housenky jsou uloženy na vodní pasti (malé Petriho misky obalené vlhkým filtračním papírem, které jsou umístěny dnem vzhůru ve velkých Petriho miskách), kolem kterých je voda. Do této vody pak slézají invazní larvy. Ty jsou poté slity do zkumavek, ponechány sedimentaci a několikrát je odsáta voda, aby byl roztok čistý. Hlístice jsou uchovávány v Petriho miskách či v lahvičkách s molitanem.

3.3.2. Izolace bakterií

Nakažená housenka (cca 24 hodin od infekce) byla povrchově sterilizována po dobu 5 minut v 99 % etanolu. Poté byla ve flowboxu odříznutím panožky odebrána hemolymfa, která byla sterilní kličkou rozetřena na NBTA agarovou plotnu (složená z 1 l destilované vody, z 37 g standardního výživného agaru (Merck), 25 mg bronthymolové modři (Sigma), 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 (složeného z 1 l destilované vody, 5 g kvasnicového extraktu, 5 g soli, 0,5 g dihydrogenfosforečnanu amonného, 0,5 g hydrogenfosforečnanu draselného, 0,2 g

heptahydrátu síranu měďnatého (Dye, 1968) a inkubovány na třepačce (180 rpm) v teplotě 22°C.

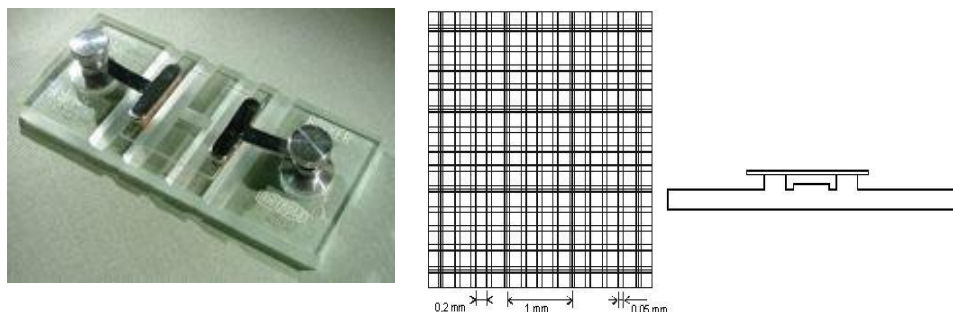
3.4. Schopnost nekrofágie u různých druhů a kmenů hlístovek

Nákazy s 29 kmeny hlístovek byly provedeny v dvanáctijamkových destičkách na filtračním papíru. Celkově bylo použito 30 živých a 30 mrtvých (zmrazených) housenek k nákaze. Bylo nakažováno dávkou 20 larev na housenku. Destičky byly uloženy do místnosti o teplotě kolem 20 °C.

Po 5 dnech byla provedena pitva patnácti živých a mrtvých housenek a spočítán počet dospělců. Zbylá polovina byla jednotlivě uložena na vodní pasti a zhruba po 3 týdnech byly spočteny invazní larvy. Pro tento pokus bylo provedeno opakování.

3.5. Kolonizace hostitelů nakažených různými kmeny *X. bovienii*

Namnožené bakteriální kultury (2-3 dny staré) byly Pasteurovou pipetou přeneseny pod Bürkerovu počítací komůrku, kde byla spočtena jejich koncentrace dle vzorce uvedeného níže. Dané množství bakterií (200 b/housenku) bylo inzulinovou stříkačkou injikováno pod kutikulu narkotizované housenky, kdy 1 kmen bakterie (v tabulce 1 tučně vyznačené) byl injikován do 20 housenek. Vybrané hlístovky byly aplikovány na uhynulé housenky, tak aby byly ve všech kombinacích s bakteriemi a naopak. Byla sledována kolonizace a reprodukce hlístovek v hostitelích nakažených různými kmeny bakterie. Opět byla polovina housenek vypitvána a zbylá polovina uložena na vodní pasti.



Obr. 1: Bürkerova komůrka; pole počítací komůrky (www.optingservice.cz)

Výpočet množství buněk na 1 mm³:

$$P = N / H * S$$

$$1 \text{ ml} = 1000 \text{ mm}^3$$

N – celkový počet buněk

výsledek * 1000 = b/ml

H – hloubka komůrky

S – plocha čtverců

3.6. Kompetice s *O. myriophila* při infekci a kolonizaci hmyzu

V tomto pokusu byly housenky infikovány dávkou 20 larev / housenku pro EPN a dávkou 500 larev / housenku pro *O. myriophila*. Vždy jeden druh EPN (v tabulce tučně označené) byl současně s *O. myriophila* inokulován na živou či mrtvou housenku. A opět byla polovina vypitvána a zbylá polovina uložena na vodní pasti.

3.7. Test toxicity bakterií

Pro pokusy byl použit tzv. Woutsův agar (Wouts, 1981) skládající se z 16 g výživného bujónu (Difco), 12 g Bacto® agaru (Difco), 5 g slunečnicového oleje na 1 l destilované vody.

Na dvanáctijamkové destičky s agarem bylo naočkováno 13 kmenů bakterií (na 1 destičku 1 kmen bakterie, uvedené v tabulce 2). Do každé jamky bylo pipetou přeneseno 7 μ l příslušné bakteriální kultury a kapka byla rozetřena ožehnutou skleněnou hokejkou. Po 2 dnech byla na destičky s jednotlivým bakteriálním druhem nanesena dávka 20 larev *O. myriophila*. Po týdnu bylo spočteno množství larev.

Tabulka 2: Přehled použitých bakterií *X. bovienii* pro testování toxicity vůči *O. myriophila*

druh hlístovky	kmen hlístovky	původ
<i>S. affine</i>	CAK-01	Česká republika
<i>S. affine</i>	LON	Francie
<i>S. affine</i>	V	Česká republika
<i>S. feltiae</i>	181	Česká republika
<i>S. feltiae</i>	JAK	Rusko
<i>S. feltiae</i>	USTINOV	Rusko
<i>S. intermedium</i>	MÜNSTER	Německo
<i>S. intermedium</i>	USA	USA
<i>S. kraussei</i>	KR	Česká republika

druh hlístovky	kmen hlístovky	původ
<i>S. kraussei</i>	VA 6.1	Bulharsko
<i>S. litorale</i>	AICHI	Japonsko
<i>S. litorale</i>	IBAR	Japonsko
<i>S. weiseri</i>	KAL 2	Česká republika

3.8. Statistické zpracování

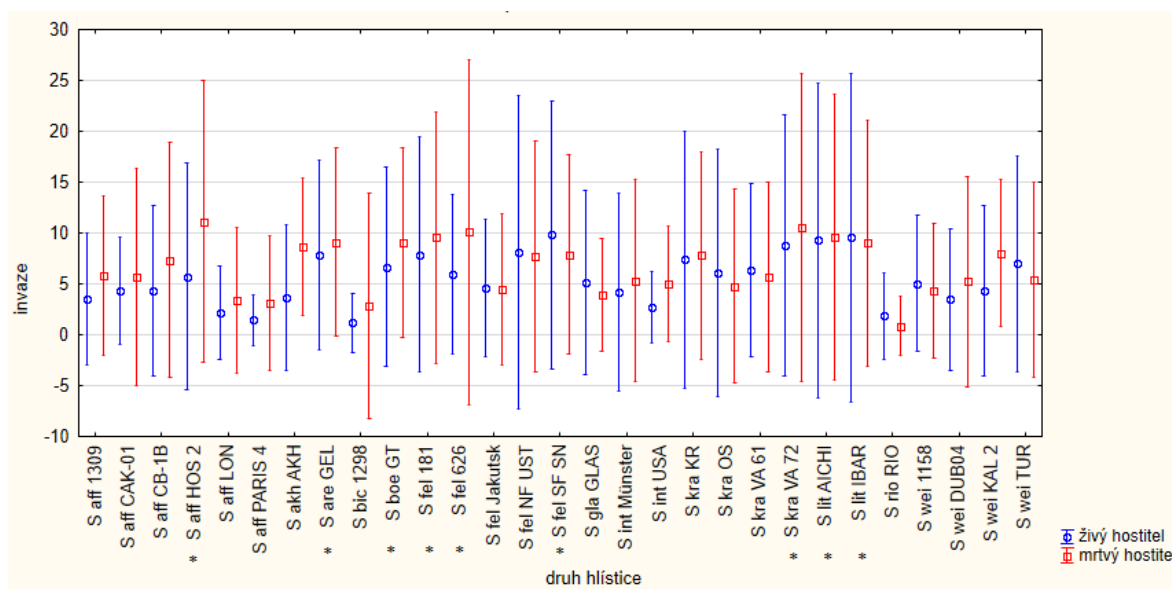
Výsledky z daných pokusů byly zpracovány s použitím dvoucestné či jednocestné analýzy variance (ANOVY) na 0,05 % hladině významnosti. Data u hodnocení množství potomstva byla $\log x + 1$ transformována, a v pokusu 4.1. při srovnání proporce využitých hostitelů byla procenta transformována pomocí funkce \arcsin . Pro statistická porovnání byla použita Tukeyova metoda mnohonásobného porovnávání.

4. Výsledky

Výsledky mohou být viděny na grafech 1-9.

4.1. Schopnost nekrofágie u různých druhů a kmenů hlístovek

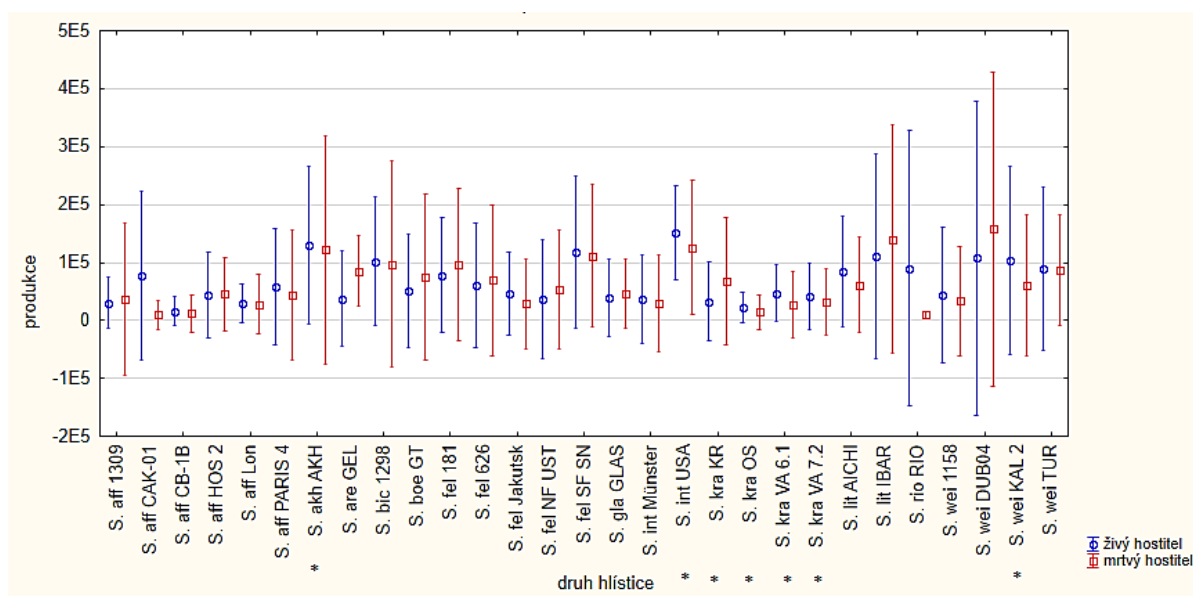
Obecně se invaze všech testovaných kmenů hlístovek lišila ($F= 16.57$; $p< 0.001$). Lišila se i invaze do živých a mrtvých hostitelů ($F= 27.48$; $p< 0.001$), kdy invaze do mrtvých hostitelů byla obecně vyšší než do živých. Invaze do živých a mrtvých hostitelů se lišila také mezi kmeny hlístovek ($F= 2.79$; $p< 0.001$). Invaze kmenů hlístovek do mrtvých hostitelů byla vyšší než do živých např. u všech kmenů *S. affine*. Průkazné ($p< 0.001$) to bylo u *S. affine* HOS 2, *S. arenarium* GEL, *S. boemarei* GT a *S. feltiae* 181 a 626. Průkazně invadovala více živé jak mrtvé hostitele *S. feltiae* SF SN ($p< 0.001$). Při invazi do živých a mrtvých hostitelů se lišily *S. kraussei* VA 7.2 ($p< 0.001$), *S. litorale* AICHI ($p< 0.001$), *S. litorale* IBAR ($p< 0.001$).



Graf 1: Průměrný počet dospělců hlístovek (\pm směrodatná odchylka) při infekci a kolonizaci živého a mrtvého hmyzu (1.+2.opakování), kmeny, kde se průkazně liší hodnoty ze živých a mrtvých hostitelů jsou označeny hvězdičkou, druhy hlístic: S. aff = S. affine, S. akh = S. akhursti, S. arenarium, S. bic = S. bicornutum, S. boe = S. boemarei, S. fel = S. feltiae, S. gla = S. glaseri, S. int = S. intermedium, S. kra = S. kraussei, S. lit = S. litorale, S. rio = S. riobrave, S. wei = S. weiseri

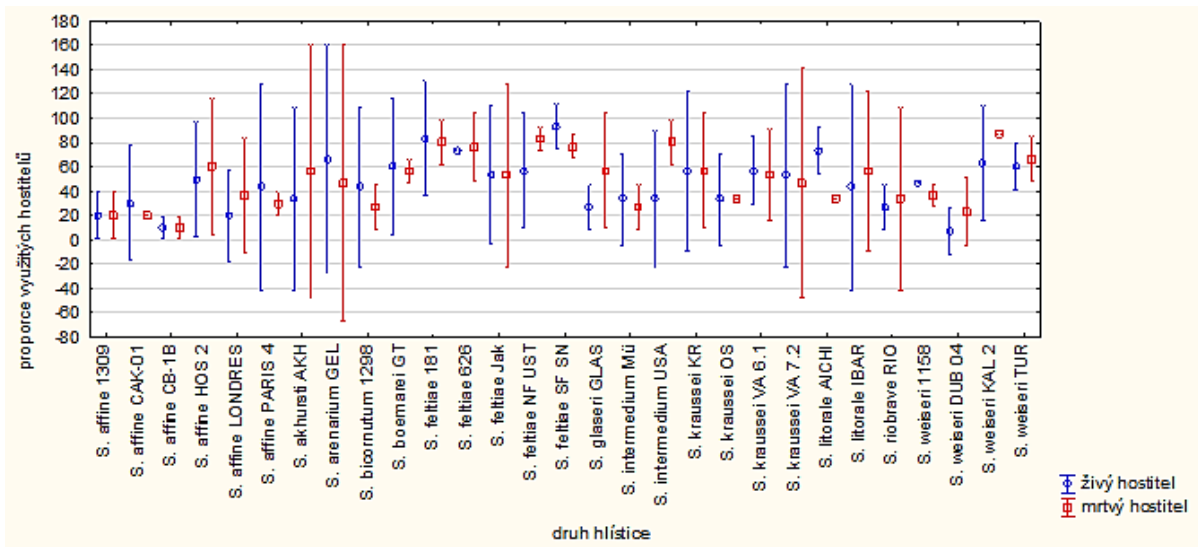
Obecně se všechny sledované kmeny hlístovek byly schopné množit jak na živých, tak na mrtvých hostitelích. Celkově byla v živých hostitelích pozorována vyšší produkce

potomstva hlístovek, než u mrtvých hostitelů ($F= 7.52$; $p< 0.001$). Průkazný rozdíl byl však pozorován pouze u některých kmenů, to bylo např. u *S. intermedium* USA, *S. weiseri* KAL 2 či *S. akhursti* AKH ($p<0.001$). Vyšší množení na mrtvých hostitelích oproti živým bylo pozorováno např. u všech kmenů *S. kraussei*.



Graf 2: Průměrný počet invazních larev (\pm směrodatná odchylka) produkovaných mrtvými a živými hostiteli (1.+2. opakování), kmeny, kde se průkazně liší hodnoty ze živých a mrtvých hostitelů jsou označeny hvězdičkou, druhy hlístic: S. aff = *S. affine*, S. akh = *S. akhursti*, S. arenarium, S. bic = *S. bicornutum*, S. boe = *S. boemarei*, S. fel = *S. feltiae*, S. gla = *S. glaseri*, S. int = *S. intermedium*, S. kra = *S. kraussei*, S. lit = *S. litorale*, S. rio = *S. riobrave*, S. wei = *S. weiseri*

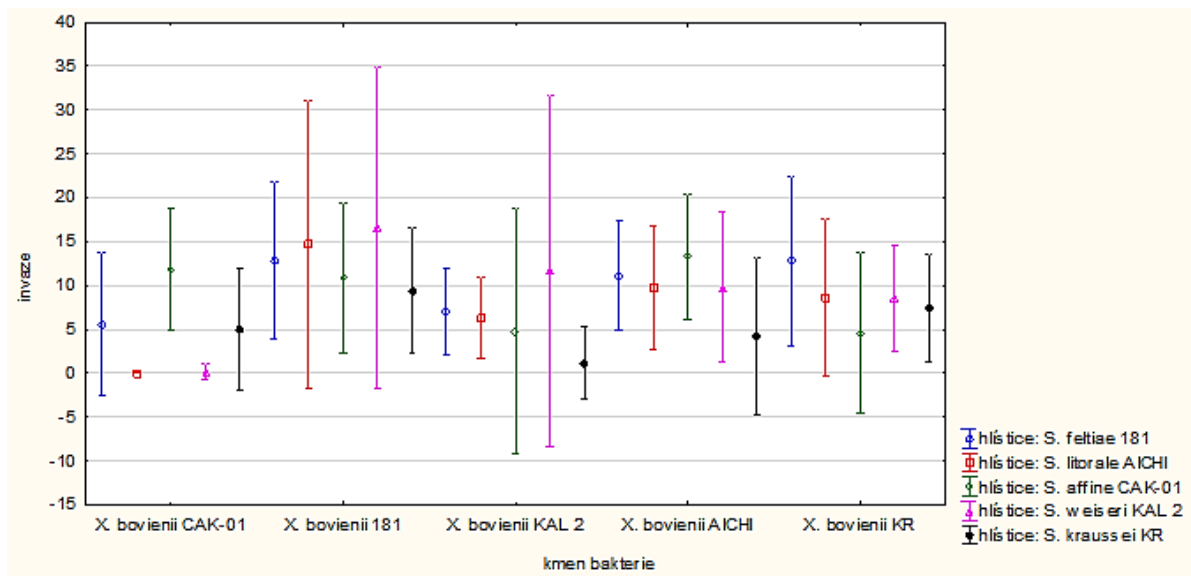
Proporce mrtvých a živých hostitelů využitých různými druhy hlístovek se nelišila ($F=0.61$; $p= 0.9$). U některých mrtvých těl hostitelů byla proporce vyšší než u živých těl. Patrné to bylo např. u *S. intermedium* USA, kde bylo využito 80% mrtvých housenek oproti 40% živých, u *S. glaseri* GLAS z 60% mrtvých oproti 30% z živých či u *S. weiseri* KAL 2 z 90% mrtvých oproti 60% z živých. Proporce využitých živých těl hostitelů byla vyšší než u mrtvých např. u *S. litorale* AICHI, kde z 80% byla produkce z živých a ze 40% z mrtvých. Tyto rozdíly však nebyly průkazné. Ve většině případů však byla proporce využitých mrtvých a živých hostitelů srovnatelná.



Graf 3: Průměrné procento mrtvých a živých hostitelů (\pm směrodatná odchylka) produkujících potomstvo

4.2. Kolonizace hostitelů nakažených různými kmeny *X. bovienii*

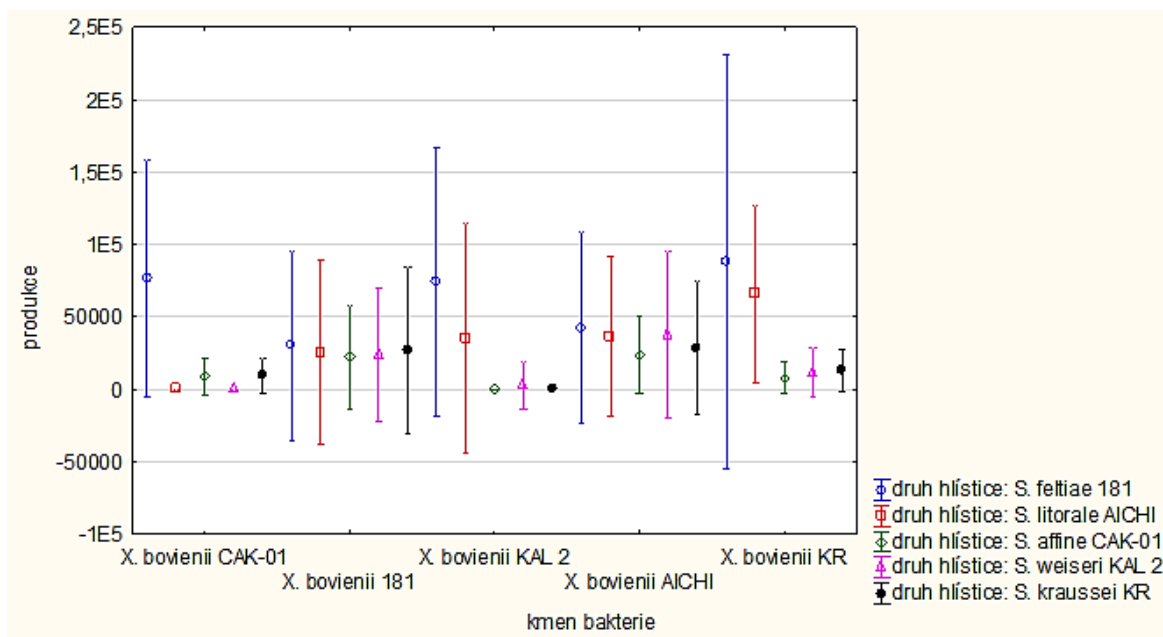
Míra kolonizace hmyzu usmrceného různými bakteriemi se lišila u různých druhů hlístovek ($F= 5.6$; $p < 0.001$). Nejmenší invaze byla obecně pozorována u hmyzu usmrceného bakterií hlístovky *S. affine* CAK-01 ($p < 0.001$). Nejpatrnější to bylo u invaze hlístovek *S. litorale* AICHI a *S. weiseri* KAL 2, které nebyli schopné žádné kolonizace těchto hostitelů. U mrtvol nakažených bakterií hlístovky *S. weiseri* KAL 2 byla pozorována také nižší míra kolonizace ostatními hlístovkami, nejpatrnější to bylo u *S. kraussei* KR. Na bakteriích *S. kraussei* KR a *S. litorale* AICHI bylo pozorována větší míra kolonizace. Na obou bakteriích dobře invadovaly *S. feltiae* 181 či *S. affine* CAK-01 na bakterii *S. litorale* AICHI. Nejvyšší invaze byla obecně pozorována u hmyzu usmrceného bakterií *S. feltiae* 181.



Graf 4: Míra kolonizace hmyzu (\pm směrodatná odchylka) usmrceného různými bakteriemi *X. bovienii*

Produkce potomstva v hmyzu usmrceném různými bakteriemi se lišila u různých druhů hlístovek ($F= 56.69$; $p < 0.001$). Nejméně potomstva bylo produkováno v hmyzu usmrceném bakterií *S. affine* CAK-01. Patrné to bylo u všech druhů až na *S. feltiae* 181 ($p < 0.001$), která na této bakterii vyprodukovala více potomstva. Na hmyzu usmrceném bakterií *S. weiseri* KAL 2 to bylo podobné, zde neprodukovaly potomstvo *S. affine* CAK-01 ($p < 0.001$) a *S. kraussei* KR ($p < 0.001$), ale *S. feltiae* 181 ano. Všechny hlístovky podobně produkovaly potomstvo v hmyzu usmrceném bakteriemi *S. feltiae* 181 a *S. litorale* AICHI. Na hmyzu usmrceném bakterií *S. kraussei* KR velmi dobře produkovala potomstvo *S. feltiae* 181 a *S. litorale* AICHI, hůře zbývající druhy hlístovek.

V hmyzu usmrceném různými bakteriemi obecně nejvíce potomstva vyprodukovala *S. feltiae* 181, dále *S. litorale* AICHI, *S. kraussei* KR, *S. weiseri* KAL 2 a nejméně *S. affine* CAK-01.

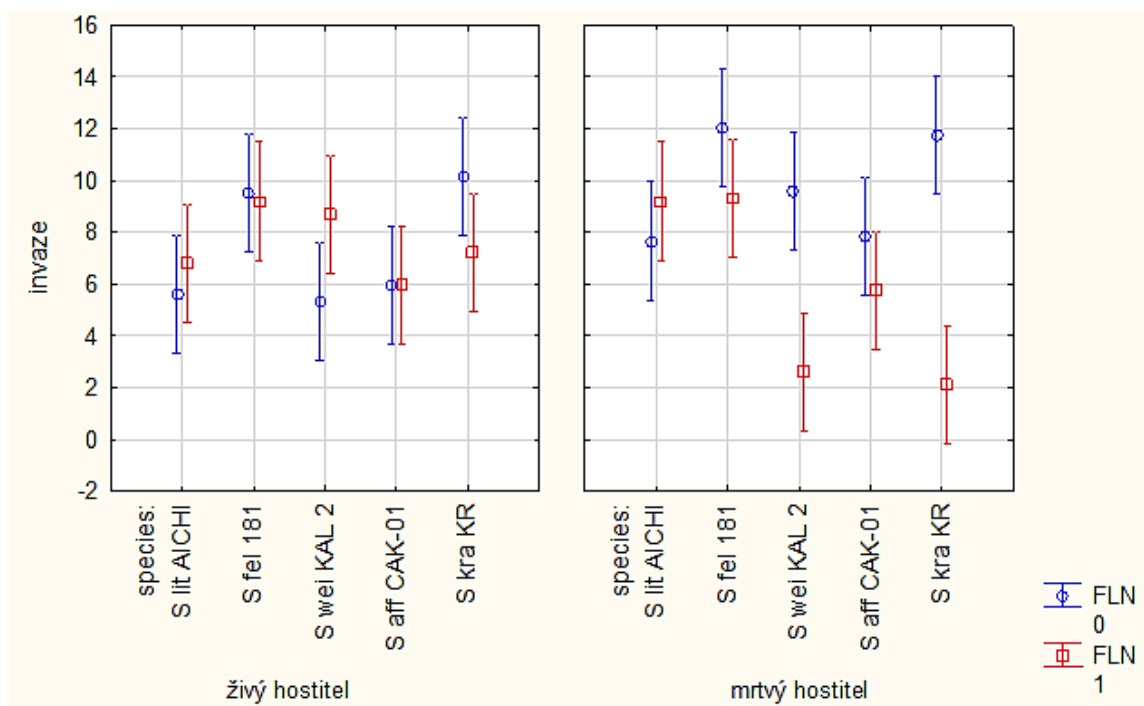


Graf 5: Průměrná produkce potomstva EPN (\pm směrodatná odchylka) na hostiteli usmrčeném různými bakteriemi

4.3. Kompetice EPN s *Oscheius myriophila* při infekci a kolonizaci hmyzu

Invaze a produkce potomstva EPN v přítomnosti hlístice Oscheius

Celkově se invaze hlístovek lišila mezi druhy hlístovek ($F=6.49$; $p<0.001$), ale nelišila se v závislosti na typu hostitele ($F=0.49$; $p=0.49$). Invaze hlístovek se ale lišila celkově v závislosti na přítomnosti hlístice *Oscheius* ($F=13.05$; $p<0.001$), kdy obecně bez její přítomnosti hlístovky více invadovaly hostitele. Invaze se také lišila mezi druhy hlístovek v reakci na přítomnost hlístice *Oscheius* ($F=5.72$; $p<0.001$), největší rozdíl byl zaznamenán u *S. kraussei* (Graf 6). Invaze se také lišila v reakci na typ hostitele ($F=16.83$; $p<0.001$), tedy v přítomnosti hlístice *Oscheius* hlístovky méně invadovaly mrtvého hostitele, ale invaze do živého se nelišila.

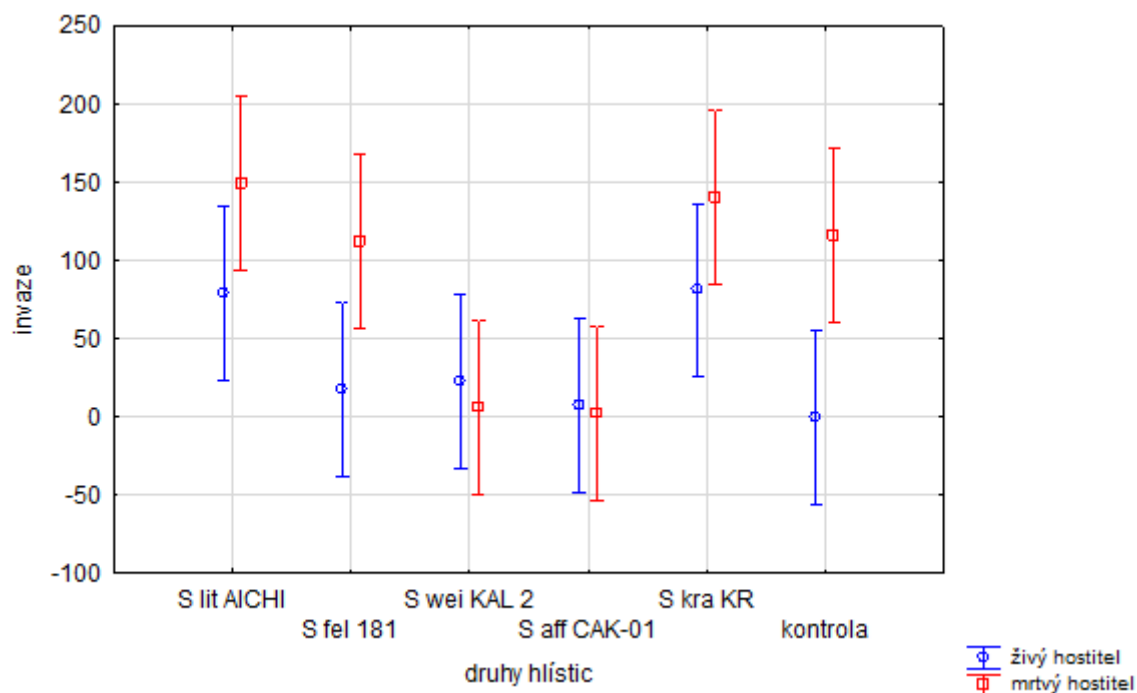


Graf 6: Invaze EPN v přítomnosti a nepřítomnosti hlístice *Oscheius* do živých a mrtvých hostitelů, druhy hlístic: S. lit = *S. litorale*, S. fel = *S. feltiae*, S. wei = *S. weiseri*, S. aff = *S. affine*, S. kra = *S. kraussei*

Celkově se produkce potomstva lišila v závislosti na přítomnosti hlístice *Oscheius* ($F=14.2$; $p<0.001$), tedy hlístovky produkovaly více potomstva bez této hlístice. Reakce druhů hlístovek na přítomnost hlístice se lišila ($F= 5.44$; $p< 0.001$). Byla různá (různě silná), u většiny byla mírně nižší, ale u *S. kraussei* byla silně nižší ($p<0.001$) (Graf 7). Dále nebyla průkazná interakce přítomnosti hlístice *Oscheius* a typu hostitele ($F=0.02$; $p= 0.9$), tedy že přítomnost *Oscheius* stejně snižoval produkci potomstva hlístovek v živých i mrtvých hostitelích.

Invaze a produkce potomstva hlístic Oscheius v přítomnosti hlístovek

Celkově si invaze hlístice *Oscheius* do mrtvých a živých hostitelů v přítomnosti hlístovek lišila ($F= 17.1$; $p< 0.001$), obecně *Oscheius* invadoval více mrtvé hostitele. V přítomnosti různých druhů hlístovek invadoval hostitele různě ($F= 16.75$; $p< 0.001$). Nejméně invadoval hostitele v přítomnosti *S. weiseri* KAL 2 a *S. affine* CAK-01, nejvíce v přítomnosti *S. litorale* AICHI a *S. kraussei* KR, a to více než v kontrole (Graf 7).

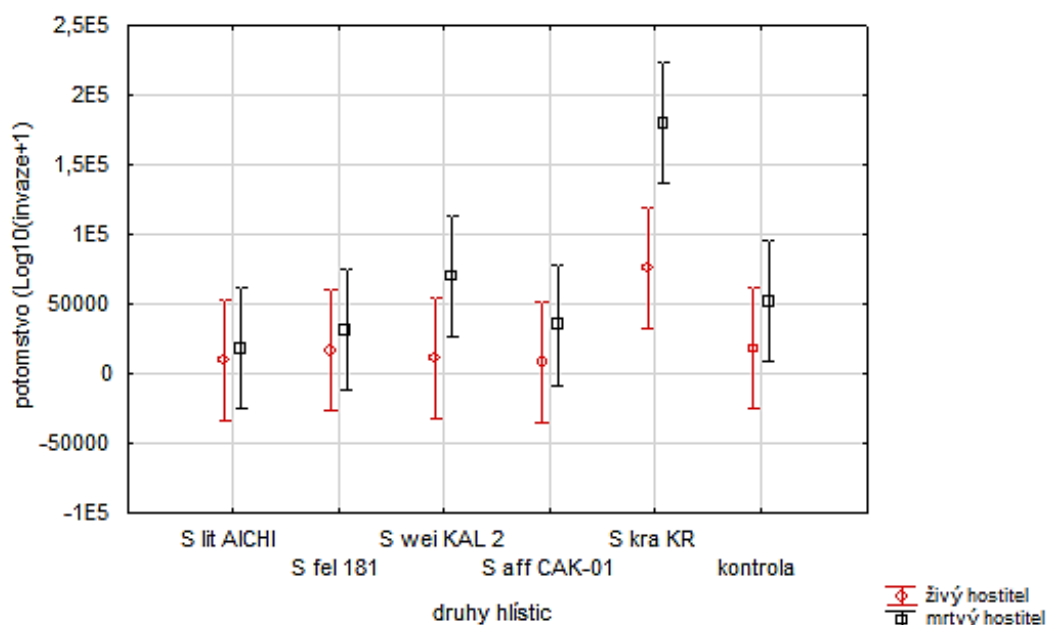


Graf 7: Invaze hlístice *Oscheius* do mrtvých a živých hostitelů v přítomnosti různých hlístovek, druhy hlístic: S. lit = S. litorale, S. fel = S. feltiae, S. wei = S. weiseri, S. aff = S. affine, S. kra = S. kraussei

Produkce potomstva hlístic Oscheius v přítomnosti hlístovek

Produkce potomstva hlístice *Oscheius* se v přítomnosti různých hlístovek lišila ($F=3.74$; $p<0.001$). Nejvíce potomstva bylo obecně produkováno v přítomnosti *S. kraussei* KR (Graf 8).

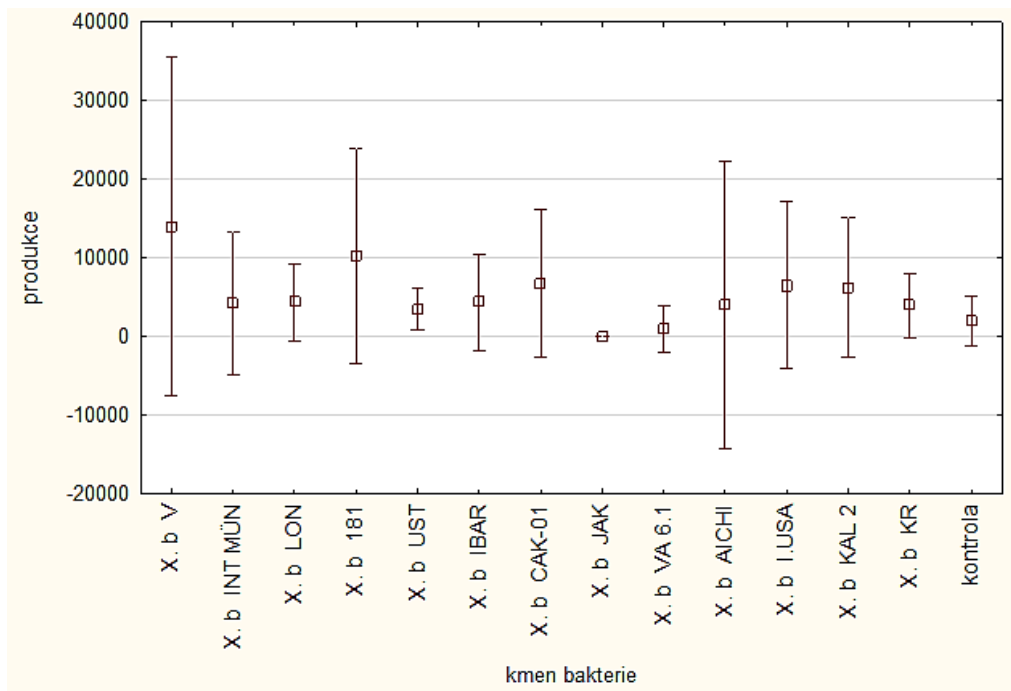
Produkce potomstva hlístice v různých hostitelích se lišila ($F=4.64$; $p=0.03$). Celkově byla větší produkce v mrtvých hostitelích. V přítomnosti různých hlístovek se produkce potomstva na živých a mrtvých hostitelích nelišila ($F=0.89$; $p=0.49$). Lze to pozorovat v následujícím grafu.



Graf 8: Produkce potomstva hlístice v mrtvých a živých hostitelích v přítomnosti různých hlístovek, druhy hlístic: S. lit = S. litorale, S. fel = S. feltiae, S. wei = S. weiseri, S. aff = S. affine, S. kra = S. kraussei

4.4. Toxicita bakterií vůči *O. myriophila*

Hlístice byla s jednotlivými bakteriemi množena na agarech v dvanáctijamkových destičkách. Produkce potomstva *O. myriophila* se lišila při množení na jednotlivých kmenech bakterie *Xenorhabdus bovienii* ($F= 14.13$; $p< 0.001$). V kontrole, kde byla hlístice přítomná bez entomopatogenní bakterie, se hlístice celkově množila méně než v přítomnosti některých kmenů *X. bovienii*. Hlístice se vůbec nemnožila v přítomnosti symbionta hlístovky *S. feltiae* JAK a velmi málo se symbiontem *S. kraussei* VA 6.1, jinak se namnožila na všech agarech se zbývajícími bakteriemi (Graf 9).



Graf 9: Průměrná produkce potomstva *O. myriophila* (\pm směrodatná odchylka) na agaru s jednotlivými kmeny *Xenorhabdus bovienii*.

5. Diskuse

5.1. Schopnost nekrofágie u různých druhů a kmenů hlístovek

Entomopatogenní hlístice jsou považovány za obligátní parazity či patogeny hmyzu, tedy živočichy hubící hostitele pomocí symbiotické bakterie (Poinar, 1979). Alternativním způsobem přežití však může být také nekrofágie, tedy kolonizování mrtvého těla hostitele (San-Blas a Gowen, 2008, Půža a Mráček, 2010).

San-Blas a Gowen (2008) pozorovali schopnost nekrofágie u 6 druhů rodu *Steinernema*. Experimenty v rámci mé práce ukázaly schopnost nekrofágie u 29 kmenů entomopatogenních hlístovek, představujících 12 druhů. Na tomto základě lze usuzovat, že schopnost nekrofágie je u entomopatogenních hlístic velmi široce rozšířená.

Pozorovaná celkově vyšší invaze do mrtvých hostitelů odpovídá výsledkům San-Blas et al. (2008), kde autoři pozorovali větší počet kolonizovaných mrtvých hostitelů oproti živým. Moje výsledky naznačují, že tento trend je u hlístovek obecně rozšířený. U většiny kmenů hlístovek byl tento rozdíl patrný (Graf 1), byť statisticky neprůkazný z důvodu vysoké variability dat. Vyšší invaze do mrtvých hostitelů byla takto pozorována např. u všech kmenů *S. affine* a u části kmenů *S. feltiae*. Celkově může důvodem značné atraktivity mrtvého hostitele být fakt, že v takovém hostiteli nemusí hlístovky čelit imunitní odpovědi (Půža a Mráček, 2010).

U žádného kmenu hlístovky nebyla pozorovaná výrazně vyšší invaze do živého hostitele oproti mrtvému. To bylo naopak pozorováno u hlístovky *Heterorhabditis megidis* (San-Blas et. al., 2008). Příčinou nižší atraktivity mrtvého hostitele by mohlo být hromadění saprofytických mikroorganismů (bakterií, hub) na mrtvole hmyzu. Je možné, že hlístivky rodu *Steinernema* jsou oproti rodu *Heterorhabditis* lépe adaptovány.

Skutečnost, že všechny sledované kmeny hlístovek byly schopné množit se jak na živých, tak na mrtvých hostitelích dále potvrzuje schopnost hlístovek provozovat nekrofágiu. Celkově vyšší produkce potomstva v živých hostitelích odpovídá výsledkům Půži a Mráčka (2010), kteří tento jev zaznamenali u *S. kraussei* a *S. affine*. Příčinou zde může být zvýšená kompetice s jinými mikroorganismy, o které je známo, že snižuje reprodukci hlístovek (Kaya a Koppenhöfer, 1996). Lze usuzovat, že tyto mikroorganismy se v případě invaze hlístovek do mrtvých těl vyskytují ve zvýšené míře.

Fakt, že proporce využitých hostitelů, která je také důležitým aspektem „fitness“ hlístovky se celkově nelišila mezi živými a mrtvými hostiteli ukazuje, že negativní ovlivnění hlístovek při nekrofáгии není výrazné.

Na základě mých experimentů se nezdá, že by některý druh či kmen hlístovky mohl vykazovat vyšší adaptaci k nekrofágnímu chování. Bisch et al. (2014) infikovali můry blýskavky a zavíječe voskového hlístovkou *S. weiseri* CSO3 a zjistili, že její symbiont vykazoval nejnižší virulenci ze 4 testovaných hlístovek rodu *Steinernema*. Podle hypotézy autorů by tento kmen *S. weiseri* mohl být adaptován na nekrofáгии. V mojí práci byly všechny testované kmene *S. weiseri*, včetně kmene KAL 2 izolovaného na stejné lokalitě jako *S. weiseri* CSO3 (Půža, osobní sdělení) schopné jak invadovat, tak využít živé i mrtvé hostitele. Tyto výsledky tak výše zmíněnou hypotézu nepodporují. Nelze však vyloučit, že na jedné lokalitě mohlo být s lokální populací *S. weiseri* přítomno více různých kmenů *X. bovienii*.

5.2. Kolonizace hostitelů nakažených různými kmeny *X. bovienii*

Půža a Mráček (2009) pozorovali, že *S. affine* v přítomnosti *S. kraussei* vykazovala lepší reprodukci oproti kontrole, zatímco reprodukce *S. kraussei* byla silně potlačena. Příčinou byla patrně symbiotická bakterie *Xenorhabdus bovienii* kmen V, asociovaný s hlístovkou *S. affine*, který je, dle autorů, adaptovaný na kompetici s jinou hlístovkou. Obecně je známo, že bakterie rodu *Xenorhabdus* také dokáží uvolňovat tzv. bakteriociny (Davis et al., 1968), které chrání uhynulé tělo hostitele před různými saprofytickými organismy (Poinar a Thomas, 1966; Poinar et al., 1977; Han a Ehlers, 1998), ale např. některé kmene *X. bovienii* produkují látky i proti konkurenčním kmenům a druhům rodu *Xenorhabdus* (Hawlena et al., 2010; Bashey et al., 2012).

Využití hostitele napadeného jiným párem hlístovky a bakterie může představovat další typ nekrofágie. Pro tyto pokusy bylo v rámci mé práce použito 5 druhů hlístovek s jejich izolovanými symbiotickými bakteriemi *X. bovienii* a byla zjišťována kolonizace hostitelů nakažených různými kmeny tohoto druhu bakterie. Důvody nakažování pouze bakterií byly dva. Při nakažování párem hlístovka a bakterie by bylo nemožné, rozlišit dospělce a larvy některých druhů. Dalším důvodem pak byl předpoklad, že pro výsledek interakce je podstatná role bakteriálního symbionta, jak bylo ukázáno v práci Půža a Mráček (2009).

Experimenty ukazují, že atraktivita hostitelů nakažených různou bakterií je různá. Nejméně atraktivní byli hostitelé usmrcení bakterií hlístovky *S. affine* CAK-01, do kterých dokonce některé hlístovky (*S. litorale* AICHI a *S. weiseri* KAL 2) vůbec nepronikaly. Obecně

byla také produkce potomstva hlístovek z těchto hostitelů nejnižší. To odpovídá zjištění Půži a Mráčka (2009), kteří pozorovali sníženou invazi a produkci potomstva hlístovky *S. kraussei* v přítomnosti *S. affine*. Podobný výsledek byl pozorován při použití agarových ploten místo hostitele, v bakalářské práci Čákové (2014) při množení *S. feltiae* ENT na bakterii *S. affine* V či v práci Půži et al. (2013) při množení *S. kraussei* na stejnou bakterii. Je tedy pravděpodobné, že bakterie asociované se *S. affine* obecně produkují látky, které jsou toxické proti jiným hlístovkám. Výjimkou byla *S. feltiae* 181, která v hostitelích usmrcených bakterií hlístovky *S. affine* CAK-01 produkovala normální množství potomstva. Pro tento fakt se nabízí dvě možná vysvětlení. Jak bylo uvedeno výše, některé kmeny *X. bovienii* produkují látky potlačující konkurenční kmeny a druhy rodu *Xenorhabdus* (Hawlena et al., 2010; Bashey et al., 2012). Bylo by tedy možné, že při invazi *S. feltiae* 181 její symbiont potlačil přítomnou bakterii hlístovky *S. affine* CAK-01 a tím i efekt jí produkovaných toxických látek. Tato možnost ale není příliš pravděpodobná vzhledem k faktu, hlístice byly aplikovány 48 hodin po bakterii, a tudíž by potlačení již dobře rozrostlé populace přítomné bakterie bylo obtížné. Pravděpodobnějším se tak jeví fakt, že *S. feltiae* 181 je k toxinům produkovaným bakterií *X. bovienii* CAK-01 tolerantní.

V práci Čákové (2014) byl pozorován snížený růst *S. feltiae* ENT na bakterii hlístovky *S. affine* V, ale jak bylo zmíněno výše, *S. feltiae* 181 se dobře množila v přítomnosti bakterie hlístovky *S. affine* CAK-01. Zdá se tedy, že různé kmeny stejných druhů hlístovek spolu interagují různým způsobem.

Snížená produkce potomstva byla pozorována také u housenek usmrcených bakterií hlístovky *S. weiseri* KAL 2, kde byla minimální produkce pozorovaná u *S. affine* CAK-01, *S. kraussei* KR. Překvapivě se tu velmi málo množila i hlístovka *S. weiseri* KAL 2, ale bez provedení dalších experimentů je vysvětlení této skutečnosti obtížné.

Na těchto housenkách se dobře množila opět *S. feltiae* 181, která se tak jeví jako univerzálně tolerantní kmen, ale také *S. litorale* AICHI, která se nemnožila s bakterií CAK-01. Tyto výsledky ukazují, že interakce různých kmenů hlístovek, tedy v podstatě interakce čtyř různých organismů, jsou velmi komplexním fenoménem, a v současné době je obtížné formulovat jakákoli zobecnění. Je ale zjevné, že existují páry hlístovka-bakterie specializované na potlačení kompetitora, stejně jako páry specializované na toleranci kompetice.

Je známo, že některé druhy rodu *Xenorhabdus* jsou totiž schopny 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* s jejím symbiontem *X. nematophila*. Sicard et al. (2004) uvedli, že nepřírozené druhy rodu *Xenorhabdus* mohou mít negativní vliv na vývoj a rozmnožování hlístovek. Má práce ukazuje, že i různé kmeny jednoho druhu bakterie mohou mít negativní vliv na růst hlístovek, asociovaných s jiným kmenem stejné bakterie.

5.3. Kompetice EPN s *Oscheius myriophila* při infekci a kolonizaci hmyzu

Hlístice rodu *Oscheius* patří mezi živočichy žijící fakultativně parazitickým způsobem života, kteří dle výzkumů v laboratoři a v přírodě mohou patrně konkurovat hlístovkám o uhynulé hostitele (Duncan et al., 2003, 2007; Campos-Herrera et al., 2012). Pro výzkum tohoto jevu bylo v rámci mé práce použito 5 druhů hlístovek a hlístice *O. myriophila*. Bylo sledováno, jak na sebe tyto hlístice působí při vzájemné interakci.

Z výsledků je patrné, že přítomnost *O. myriophila* snižuje invazi hlístovek do hostitele, a to zejména v případě hostitele mrtvého. Produkce potomstva hlístovek ale byla snížena, u obou typů hostitelů. Nepotvrdil se tak předpoklad, že by kompetice s *O. myriophila* byla pro hlístovky vážnější v případě nekrofágie. Negativní efekt hlístice *O. myriophila* však není stejně silný u všech hlístovek a nejvíce se zdá ovlivněna *S. kraussei*.

Dostupných literárních údajů pro srovnání není mnoho. Nedávný výzkum Campos-Herrera et al. (2015) ukázal, že *S. kraussei* při stejných dávkách jako byly použity v mé práci dokázala hlístice *Oscheius* sp. vykompetovat. Tito autoři však použili jiné druhy rodu *Oscheius*, konkrétně *O. tipulae* a *O. onirici*, které jsou patrně kompetitivně slabší ve srovnání s *O. myriophila*.

Invaze a reprodukce hlístice *O. myriophila* byla podle očekávání celkově vyšší v mrtvých hostitelích. V případě živých hostitelů pak hlístice *O. myriophila* jednoznačně profitovala z přítomnosti hlístovek, neboť bez nich byla schopná usmrtit pouze minimum hostitelů. Přítomnost hlístovek je tak pro *O. myriophila* v tomto případě prospěšná.

Obecně mají různé hlístovky různý efekt na *O. myriophila*. Nejmenší invaze a reprodukce byla zaznamenána s hlístovkami *S. affine* CAK-01 a *S. weiseri* KAL2. Příčinou by mohly být jejich symbiotické bakterie, které v předchozích experimentech snižovaly růst některých hlístovek. Na kompetici by se však teoreticky mohly podílet i samotné hlístovky. U

hlístovky *Steinernema longicaudum* bylo u samců pozorováno zabíjení dospělců jiných hlístovek pomocí kopulačních přívěšků zvaných spikuly (O'Callaghan et al., 2014). Podobné chování by však mohlo být více rozšířené, a teoreticky použitelné proti jiným hlísticím. Pro jednoznačnou odpověď by však byl nutné provést další experimenty.

5.4. Toxicita bakterií vůči *O. myriophila*

Na základě předchozích experimentů je zjevné, že některé kmeny *X. bovienii* mohou působit i na hlístici *Oscheius myriophila*. Z toho důvodu byl na závěr sledován růst této hlístice v přítomnosti 13 různých kmenů bakterie *X. bovienii*.

Skutečně, různé kmeny *X. bovienii* měly na růst *O. myriophila* různý efekt. U většiny kmenů to byl efekt pozitivní, kdy se *O. myriophila* namnožil více než v kontrole. To může být vysvětleno skutečností, že v kontrole byly na agar vloženy pouze nesterilizované larvy *O. myriophila*, a jako potrava sloužily pouze bakterie nanesené na agar na kutikule hlístic. Toto inokulum však bylo oproti dávkám *X. bovienii* (7 μ l tekuté kultury) malé. Rozdíly pozorované v růstu na různých kmenech *X. bovienii* však skutečně ukazují různou vhodnost těchto bakterií pro růst *O. myriophila*. Překvapivě byl nejvyšší růst této hlístice pozorován v přítomnosti bakterie z hlístovky *S. affine* V, která je patrně toxická pro různé hlístovky (Půža a Mráček, 2009; Půža et al., 2013; Čápková, 2014) i s bakterií *S. affine* CAK-01, v jejíž přítomnosti předchozím pokusu nerostlo několik kmenů hlístovek. Zdá se tedy, že tyto toxiny mohou být poměrně selektivní – specializované na hlístovky.

Zajímavým zjištěním byl také fakt, že růst *O. myriophila* byl silně potlačen na bakterii hlístovky *S. kraussei* VA. 6.1 a zcela na bakterii hlístovky *S. feltiae* JAK. Tyto bakterie tedy zjevně produkují toxiny proti této hlístici. Otázkou je, jak by tyto bakterie působily na jiné hlístovky. Je však možné usuzovat, že některé kmeny *X. bovienii* by mohly být specializované na kompetici s fakultativně parazitickými hlísticemi. Vzhledem k vysoké četnosti koinfekce EPN a těchto hlístic (Campos-Herrera et al., 2015a) by to mohlo představovat výhodnou strategii.

Celkově lze shrnout, že *O. myriophila* reaguje na jednotlivé bakterie jinak než hlístovky. Bakterie, které byly pro hlístovky toxické často nebyly toxické pro tuto hlístici, a naopak.

6. Závěry

1. Schopnost nekrofágie byla pozorována u všech druhů a kmenů hlístovek a zjevně se jedná o široce rozšířenou alternativní životní strategii v rámci čeledi.
2. Různé kmeny jednoho druhu bakterie mohou mít negativní vliv na růst hlístovek, asociovaných s jiným kmenem stejné bakterie.
3. V kompetici o živého i mrtvého hostitele zaujímají hlístovky s bakteriemi různé strategie - od produkce či tolerance toxinů, po snížení invaze.
4. Přítomnost *Oscheius myriophila* snižuje invazi hlístovek do mrtvých hostitelů, ale reprodukce hlístovek je mírně snížena u živých i mrtvých hostitelů.
5. V případě živých hostitelů profituje *Oscheius myriophila* z přítomnosti hlístovek
6. Některé kmeny *X. bovienii* jsou vůči hlístici *Oscheius myriophila* toxické.

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., 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

ALI J. G., CAMPOS-HERRERA R., ALBORN H. T., DUNCAN L. W., STELINSKI L. L., 2013: Sending mixed messages: A trophic cascade produced by a belowground herbivore – induced cue. *J. Chem. Ecol.* 39: 1140–1147.

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.

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., MOLYNEUX A. S. 1982: Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica* 28: 354-359.

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.

BISCH G.^{a,b}, PAGÉS S.^{a,b}, McMULLEN II J. G.^{c,d}, STOCK S. P.^c, DUVIC B.^{a,b}, GIVAUDAN A.^{a,b}, GAUDRIAULT S.^{a,b} 2014: *Xenorhabdus bovienii* CS03, the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri*, is a non-virulent strain against lepidopteran insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 124: 15–22.

BISCH G., OGIER J. C., MÉDIGUE C., ROUY Z., VINCENT S., TAILLIEZ P., GAUDRIAULT S. 2016: Comparative Genomics between Two *Xenorhabdus bovienii* Strains Highlights Differential Evolutionary Scenarios within an Entomopathogenic Bacterial Species. *Genome biology and evolution*, 8(1): 148-160.

BLANCO-PERÉZ R., BUENO-PALLERO F., NETO L., CAMPOS-HERRERA R. 2016: Cadavers as a resource: competition between entomopathogenic nematodes and free-living

nematodes in the genus *Oscheius* acting as scavengers. 32nd Symposium of the European Society of Nematologists.

BLAXTER M. L., DE LEY P., GAREY J. R., LIU L. X., SCHELDEMAN P., VIERSTRAETE A., VANFLETERE 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.

BRACKEN, G. K. 1990: Susceptibility of first-instar cabbage maggot, *Delia radicum* (L.) (Anthomyiidae: Diptera), to strains of entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* Filipjev, *S. bibionis* (Bovien), *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, and *H. heliothidis* (Khan, Brooks and Hirschmann). *The Canadian Entomologist* 122: 633-639.

CAMPOS-HERRERA R. ^a, PŮŽA V. ^{a, b}, JAFFUEL G. ^a, BLANCO-PÉREZ R. ^a, ČEPULYTE-RAKAUSKIENE R. ^c, TURLINGS T. C. J. ^a 2015: Unraveling the intraguild competition between *Oscheius* spp. nematodes and entomopathogenic nematodes: Implications for their natural distribution in Swiss agricultural soils. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 216–227.

CAMPOS-HERRERA R., EL-BORAI F. E., DUNCAN L. W., 2012: Wide interguild relationships among entomopathogenic and free-living nematodes in soil as measured by real time qPCR. *J. Invertebr. Pathol.* 111: 126–135.

CAMPOS-HERRERA R., EL-BORAI F.E., DUNCAN L.W. 2015a: “Modifying soil to enhance biological control of belowground dwelling insects in citrus groves under organic agriculture in Florida.”

CAMPOS-HERRERA R., JAFFUEL G., CHIRIBOGA X., BLANCO-PÉREZ R., FESSELET M., PUZA V., MASCHER F., TURLINGS T.C. J., 2015: Traditional and molecular detection methods reveal intense interguild competition and other multitrophic interactions associated with native entomopathogenic nematodes in Swiss tillage soils. *Plant Soil* 389: 237–255.

ČÁPOVÁ D. 2014: Vliv symbiotických bakterií na mezidruhovou kompetici vybraných druhů entomopatogenních hlístic (Steinernematidae: Nematoda). Bakalářská práce, přírodovědecká fakulta v Českých Budějovicích.

DAVIS B. D., DULBECCO R., EISEN H. N., GINSBERG H. S., WOOD W. B. 1968: *Microbiology*, Harper & Row, New York, 853 pp.

DUNCAN L. W., DUNN D. C., BAGUE G., NGUYEN K., 2003: Competition between entomopathogenic and free-living bacterivorous nematodes in larvae of the weevil *Diaprepes abbreviatus*. *J. Nematol.* 35: 187–193.

DUNCAN L. W., GRAHAM J. H., ZELLERS J., BRIGHT D., DUNN D.C., EL-BORAI F. E., PORAZINSKA D. L. 2007: Food web responses to augmenting the entomopathogenic nematodes in bare and animal manure-mulched soil. *J. Nematol.* 39: 176–189.

DYE D. W. 1968: A taxonomic study of the genus *Erwinia*. 1. The "amylovora" Group. N.Z. Journal of Science 11: 590-607.

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.

Faktorová L. 2016: Multilokusová charakteristika symbiontů entomopatogenních hlístovek rodu *Steinernema*. Diplomová práce, přírodovědecká fakulta v Českých Budějovicích.

FITTERS P. F. L., PATEL M. N., GRIFFIN C. T., WRIGHT D. J. 1999: Fatty acid composition of *Heterorhadtis* 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., MOLLOY D. 1981: Instar susceptibility of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae*. Journal of Nematology 13: 1-5.

GEORGIS R., KAYA H. K., GAUGLER R., 1991: Effect of steinernematid and heterorhabditid nematodes (Rhabditida, Steinernematidae and Heterorhabditidae) on nontarget arthropods. Environ. Entomol. 20: 815-822.

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.

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.

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.

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.

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.

- 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.
- JENSEN P. 1987: Feeding ecology of free-living aquatic nematodes. Mar. Ecol. Prog. Ser. 35: 187–196.
- JENSEN P. 1988: Nematode assemblages in the deep-Sea benthos of the Norwegian Sea. Deep-Sea Res. 35: 1079–1222.
- JOUVENAZ D.P., MARTIN W.R. 1992: Evaluation of the nematode *Steinernema carpocapsae* to control fire ants in nursery stock. Florida Entomologist 75: 148-151.
- KAYA H. K., KOPPENHÖFER A. M., 1996: Effects of microbial and other antagonistic organisms and competition on entomopathogenic nematodes. Biocontrol. Sci. 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.
- KOEHLER P. G., PATTERSON R. S., MARTIN W. R. 1992: Susceptibility of cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae, Blattidae) to infection of *Steinernema carpocapsae*. Journal of Economic Entomology 85: 1184-1187.
- LEI Z., RUTHERFORD T. A., WEBSTER J.M. 1992: Heterorhabditid behavior in the presence of the cabbage maggot, *Delia radicum*, and its host plants. Journal of Nematology 24: 9-15.
- LEWIS E. E., CAMPBELL J., GROFFIN CH., KAYA H., PETERS A. 2006: Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. Biological Control 38: 66-79.
- LOPEZ G., RIEMANN F., SCHRAGE M., 1979: Feeding biology of the brackish-water oncholaimid nematode *Adoncholaimus thalassophygas*. Mar. Biol. 54: 311–318.
- LOSOS B., GULIČKA J., LELLÁK J., PELIKÁN J. 1984: Ekologie živočichů. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 316 p.
- MAGGENTI A. R. 1981: General nematology. Springer-Verlag, New York, 372 pp.
- MOENS T., BOUILLON S., GALLUCCI F., 2005: Dual stable isotope abundances unravel trophic position of estuarine nematodes. J. Mar. Biol. Assoc. UK 85: 1401–1407.
- MOENS T., VERBEECK L., VINEX M., 1999: Feeding biology of a predatory and a facultatively predatory nematode (*Enoplodes longispiculosus* and *Adoncholaimus fuscus*). Mar. Biol. 134, 585–593.
- MORRIS J.R., STEWART K.W., HASSAGE R.L. 1990: Use of the nematode *Steinernema carpocapsae* for control of red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). Florida Entomologist 73: 675-677.
- 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.
- O'CALLAGHAN K.M, ZENNER A. N. R. L., HARTLEY C. J., GRIFFIN CH. T. 2014: Interference competition in entomopathogenic nematodes: male *Steinernema* kill members of their own and other species. *International Journal for Parasitology*.
- 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 feltiae*. *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.
- PREIN M. 1988: Evidence for scavenging lifestyle in the free-living nematode *Potonema vulgare* (Enoplida, Oncholaimidae). *Kieler Meeresforsch* 6: 389–394.
- 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. 2015: Entomopathogenic nematodes in the Czech Republic: diversity, occurrence and habitat preferences. In: Campos-Herrera R. (ed.) *Nematode pathogenesis of insects and other pests - ecology and applied technologies for sustainable plant and crop protection*, Springer International Publishing Switzerland, 419-429
- 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
- RATCLIFFE N. O. 1982: Cellular defense reactions of insects. In: *Immune reactions to parasites*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, p. 223-244.
- SAN-BLAS E., GOWEN S. R., and PEMBROKE B. 2007: Scavenging or infection? Possible host choosing by entomopathogenic nematodes. *Nematology*, Vol. 10(2): 251-259.

SAN-BLAS E., GOWEN S. R., PEMBROKE B. 2008: Scavenging or infection? Possible host choosing by entomopathogenic nematodes. *Nematology* 10: 251–259.

SELVAN S., GAUGLER R., LEWIS E. E. 1993b: Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *Journal of Parasitology* 79: 167-172.

SICARD M., BRUN N. LE, PAGES S., GODELLE B., BOEMARE N., MOULIA C. 2003: Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitol Res* 91 (6): 520-524.

SICARD M., FERDY J-B., PAGES S., BRUN N. LE, GODELLE B., BOEMARE N., MOULIA C. 2004: When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *J. EVOL. BIOL.* 17: 985–993.

SICARD M., RAMONE H., BRUN N. LE, PAGES S., MOULIA C. 2005: Specialization of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* with its mutualistic *Xenorhabdus* symbiont. *Naturwissenschaften* 92 (10): 472-476.

SICARD M.^{1,2}, HINSINGER J.¹, BRUN N. L.¹, PAGES S.³, BOEMARE N.³, MOULIA C.¹ 2006: Interspecific competition between entomopathogenic nematodes (*Steinernema*) is modified by their bacterial symbionts (*Xenorhabdus*). *BMC Evolutionary Biology* 6: 68.

SULSTON J., HODGKIN J. 1988: „Methods“ in the nematode *Caenorhabditis*, ed. W. B. Wood (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), 587-606.

TAILLIEZ P., LAROUI C., GINIBRE N., PAULE A., PAGE'S S., Boemare N. 2010: Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. Temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 1921–1937.

THIERMANN F., AKOUMIANAKI I., HUGHES J. A., GIÈRE O., 1997: Benthic fauna of a shallow-water gaseohydrothermal vent area in the Aegean Sea (Milos, Greece). *Mar. Biol.* 128: 149–159.

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

URBAN-MALINGA B., HEDTKAMP S. I. C., van BEUSEKOM J. E. E., WIKTOR J., WESLAWSKI J.M., 2006: Comparison of nematode communities in 90 E. San-Blas, S.R. Gowen / *International Journal for Parasitology* 38 (2008) :85–91. Baltic and North Sea sublittoral, permeable sands – diversity and environmental control. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 70: 224–238

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 E. E., WOLKOVICH E. M. 2011: Scavenging: how carnivores and carrion structure communities. *Trends in Ecology and Evolution*, 26(3): 129–135.

WOUTS W. M. 1981: Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematode: Heterorhabditidae) on artificial media. *Journal of Nematology* 13: 467–469.

www.optingservis.cz (laboratory and medical equipment)