

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské inženýrství - Rostlinolékařství

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv metabolitů entomopatogenních bakterií rodu *Xenorhabdus*
na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitických
a fytofágních hlístic**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Konzultant diplomové práce:

RNDr. Vladimír Půža, Ph.D.

Autor diplomové práce:

Bc. Hedvika Jakubíková

České Budějovice, 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Hedvika JAKUBÍKOVÁ
Osobní číslo: Z17083
Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Zemědělské inženýrství – Rostlinolékařství
Téma práce: Vliv metabolitů entomopatogenních bakterií rodu *Xenorhabdus* na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitických a fytofágních hlístic
Zadávací katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Zásady pro vypracování

Symbiotické bakterie entomopatogenních hlístic náležející do rodu *Xenorhabdus* produkují řadu metabolitů s velmi širokým spektrem biologických účinků, za účelem ochrany hmyzího kadáveru proti jiným organismům včetně fakultativně entomoparazitických hlístic. Tyto metabolity mohou být toxické nejen pro entomoparazitické, ale i jiné (např. fytofágní) hlístice. Cílem práce je otestovat vliv metabolitů bakterií různých druhů a kmenů na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitických a fytofágních hlístic a zhodnotit možnost jejich využití v ochraně rostlin.

1. Izolace a kultivace různých druhů a kmenů symbiotických bakterií rodu *Xenorhabdus*.
2. Testování vlivu bakteriálních kultur na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitických hlístic.
3. Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitických hlístic.
4. Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání fytofágních hlístic.

Rozsah pracovní zprávy: 40 – 50 stran
Rozsah grafických prací: 10 – 15 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

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.

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.

Campos-Herrera R., Půža V., Jaffuel G., Blanco-Pérez R., Čepulyte-Rakauskiene R., Turlings T. C. J. 2015: Unraveling the intraguild competition between *Osecheius* spp. nematodes and entomopathogenic nematodes: Implications for their natural distribution in Swiss agricultural soils. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 216-227.

Tobias, N.J., et al. 2017. Natural product diversity associated with the nematode symbionts *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *Nature microbiology*, 2: 1676.

Řada dalších článků ze zahraničních IF časopisů

Vedoucí diplomové práce: Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Konzultant diplomové práce: Mgr. Vladimír Půža, Ph.D.
Entomologický ústav AV ČR

Datum zadání diplomové práce: 6. února 2019
Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2019

V Českých Budějovicích dne 6. února 2019

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1868, 370 05 Česká Budějovice



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

L.S.



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

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce a to v nezkrácené podobě - v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou - 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.

V Českých Budějovicích 15. 4. 2019

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce Ing. Andree Bohaté, Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost. Dále mé velké poděkování patří RNDr. Vladimíru Půžovi, Ph.D. za odborné vedení, možnost získat spoustu zkušeností s prací v laboratoři a především za velkou ochotu a trpělivost. Děkuji také Ing. Jiřímu Nermuťovi, Ph.D. za pomoc s řešením zapeklitých otázek při zpracování praktické části práce. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat paní laborantce Lence Kropáčkové za pomoc s orientací v laboratorních sbírkách.

Abstrakt

Bakterie rodu *Xenorhabdus* žijí v přirozeném symbiotickém vztahu s entomopatogenními hlísticemi čeledi Steinernematidae. Produkují široké spektrum toxických sekundárních metabolitů rozdílné chemické podstaty i účinku. Syntéza konkrétních metabolických produktů je pro každý kmen bakterií specifická. Práce je zaměřena na zhodnocení vlivu bakteriálních metabolitů na fakultativně entomoparazitické hlístice druhu *Oscheius myriophila*, volně žijící hlístice *Caenorhabditis elegans* a fytofágní háďátka *Globodera rostochiensis*. Cílové druhy hlístic byly vystaveny působení 37 kmenů bakterií rodu *Xenorhabdus*, izolovaných z různých druhů hlístic čeledi Steinernematidae. Testování účinnosti metabolitů na *O. myriophila* a *C. elegans* bylo provedeno jak přímou kultivací cílových druhů na pevném médiu s živými bakteriálními kulturami, tak ve sterilizovaných tekutých kulturách jednotlivých bakteriálních kmenů. Vliv toxických látek na *G. rostochiensis* byl hodnocen pouze ve vybraných sterilních tekutých médiích.

Klíčová slova: entomopatogenní hlístice; *Steinernema*; *Xenorhabdus*; sekundární metabolity; toxicita; *Oscheius myriophila*; *Caenorhabditis elegans*; *Globodera rostochiensis*

Abstract

Bacteria of the genus *Xenorhabdus* live as the natural symbionts of the entomopathogenic nematodes of the family Steinernematidae. They produce a wide range of toxic secondary metabolites of different chemical structure and effect. The synthesis of particular products is specific for each strain of *Xenorhabdus*. The thesis is focused on evaluating the impact of bacterial metabolites on facultatively entomoparasitic nematodes *Oscheius myriophila*, the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* and the phytophagous potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Target species of nematodes were exposed to 37 strains of *Xenorhabdus* bacteria, isolated from various species of Steinernematidae. Testing the impact of bacterial metabolites on *O. myriophila* and *C. elegans* nematodes was performed both by direct cultivation of target species on solid medium with live bacterial cultures as well as in sterilized liquid bacteria cultures. The effect of toxic substances on *G. rostochiensis* was evaluated only in selected sterilized bacteria cultures.

Keywords: entomopathogenic nematodes; *Steinernema*; *Xenorhabdus*; secondary metabolites; toxicity; *Oscheius myriophila*; *Caenorhabditis elegans*; *Globodera rostochiensis*

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1 Entomopatogenní hlístice čeledi Steinernematidae	12
2.1.1 Systematické zařazení	12
2.1.2 Ekologie.....	12
2.1.3 Bionomie a životní cyklus	15
2.2 Symbiotické bakterie rodu <i>Xenorhabdus</i>	17
2.2.1 Systematické zařazení a charakteristika	17
2.2.2 Životní cyklus	18
2.2.3 Metabolismus.....	20
2.3 Využití hlístic v biologické ochraně rostlin	22
2.4 Cílové druhy hlístic	26
2.4.1 <i>Oscheius myriophila</i>	26
2.4.2 <i>Caenorhabditis elegans</i>	27
2.4.3 <i>Globodera rostochiensis</i>	30
3 CÍLE PRÁCE	33
4 MATERIÁL A METODIKA	34
4.1 Biologický materiál	34
4.1.1 Zavíječ voskový (<i>Galleria mellonella</i>)	34
4.1.2 Hlístice použité k pokusům	34
4.1.3 Použité kmeny bakterií.....	35
4.2 Izolace a kultivace různých druhů a kmenů symbiotických bakterií rodu <i>Xenorhabdus</i>	37
4.3 Testování vlivu bakteriálních kultur na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitických a volně žijících hlístic	38

4.4 Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitických, volně žijících a fytofágních hlístic	39
4.5 Statistická analýza	40
5 VÝSLEDKY	41
5.1 Testování vlivu bakteriálních kultur na přežívání a reprodukci <i>O. myriophila</i> a <i>C. elegans</i>	41
5.1.1 Produkce potomstva	41
5.1.2 Mortalita	43
5.2 Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání a reprodukci <i>O. myriophila</i> a <i>C. elegans</i>	46
5.2.1 Produkce potomstva	46
5.2.2 Mortalita	49
5.3 Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání <i>G. rostochiensis</i>	52
6 DISKUZE	54
7 ZÁVĚR	66
8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	67
9 PŘÍLOHY	82

1 ÚVOD

Pojmem symbióza rozumíme jakékoli úzké a dlouhotrvající soužití dvou či více organismů různých druhů. Koncept symbiotické asociace je nejčastěji chápán jako vzájemný vztah prospěšný pro oba zúčastněné. Nicméně sem mohou být zařazeny i interakce, které jednomu ze zúčastněných organismů žádnou výhodu nepřinášejí, ba jej dokonce poškozují. Takový vztah, kdy je jeden z partnerů druhému hrozbou, je označován jako parasitismus.

Významnými a velmi nebezpečnými parazity hmyzu jsou entomopatogenní hlístice (EPN). Jedná se o drobné půdní organismy, vyskytující se prakticky na celém světě, vyjma Antarktidy. Hlístice jako paraziti vynikají především svou schopností aktivně vyhledat a velmi rychle usmrtit hostitele, jehož mrtvé tělo jim pak slouží pro namnožení.

Skupina entomopatogenních hlístic zahrnuje zástupce čeledí Steinernematidae a Heterorhabditidae. Příslušníci obou žijí v symbióze s bakteriemi rodů *Xenorhabdus* a *Photorhabdus*. A právě tento obligátní symbiotický vztah je pro parazitický způsob života hlístic naprosto klíčový. Napadený hmyzí hostitel totiž neumírá následkem činnosti hlístic. Zodpovědnost za jeho smrt nesou z převážné části právě výše zmíněné bakterie. Důležitost soužití mezi hlísticí a bakterií již naznačuje samo slovo obligátní. Bakteriální rody *Xenorhabdus* a *Photorhabdus* totiž není možné, až na drobné výjimky, nalézt volně ve vnějším prostředí. Jako příklad oné výjimky zde lze uvést druh *Photorhabdus asymbiotica*, který ač je schopen žít v symbióze s hlísticemi *Heterorhabdus indica*, byl nejprve identifikován jako lidský patogen. Ostatní druhy symbiotických bakterií přežívají přímo uvnitř střeva či speciálního střevního váčku hlístic, čímž se stávají na hlísticích naprosto závislé. Hlístice je pak využívají k usmrcení vybraného hostitele a zároveň jim bakterie, množící se na mrtvém těle hmyzu, slouží jako potrava.

Své uplatnění na poli biologické ochrany rostlin našly hlístice nejen díky svým unikátním parazitickým schopnostem. Dalšími vlastnostmi, které z EPN činí vhodný prostředek pro tento systém kontroly škodlivých činitelů, jsou například dlouhá životnost, snadná nenákladná kultivace a jednoduchý způsob aplikace. Mimo jiné sebou hlístice jako agens v biologické ochraně nenesou žádná výrazná rizika pro životní prostředí. Právě z těchto důvodů začaly být hlístice běžně uváděny na trh jako komerční přípravky na ochranu rostlin.

Ačkoliv je využití komplexu hlístice-bakterie v boji s hmyzími škůdci známé jako vysoce efektivní, jeho účinnost může být snížena či potlačena přítomností jiných organismů, které významně ovlivňují jednoho z partnerů úzkého symbiotického vztahu. Takovými organismy, které mohou negativně působit na životaschopnost entomopatogenních hlístic, jsou například zástupci skupiny fakultativně entomoparazitických hlístic, mezi něž se řadí i hlístice rodu *Oscheius*. Tyto hlístice využívají mrtvá těla hmyzu, často již osídlená některým z druhů entomopatogenních hlístic, jako potravu. Jejich přítomnost se pak může v rozdílné míře odrážet na reprodukci entomopatogenních hlístic, na rychlosti jejich vývoje a produkci invazních larev. Proti škodlivému působení jiných organismů však nezůstávají EPN bez ochrany. Jejich bakteriální symbionti produkují řadu účinných metabolitů, které chrání tělo uhynulého hmyzího hostitele, tedy místo reprodukce EPN, před vniknutím a nepříznivým vlivem fakultativně entomoparazitických hlístic i dalších organismů. Znalost vlivu metabolitů bakteriálních symbiontů konkrétních druhů EPN na přežívání fakultativně entomoparazitických hlístic by mohla zvýšit efektivitu entomopatogenních hlístic jako bioagens v biologické ochraně rostlin. Zároveň pokud se bakteriální metabolity budou jevit jako účinné proti fakultativně entomoparazitickým hlísticím, bylo by možné zvážit jejich využití v ochraně rostlin i proti hlísticím fytofágním, které mnohdy způsobují závažné škody pěstovaných zemědělských plodin.

Předkládaná práce shrnuje současné poznatky o vlastnostech a způsobu života hlístic čeledi Steinernematidae, jejich symbiotickém vztahu s bakteriemi rodu *Xenorhabdus* a také krátce pojednává o využití hlístic v biologické ochraně rostlin. Praktická část práce je pak zaměřena na zkoumání vlivu bakterií rodu *Xenorhabdus* na přežívání a reprodukci tří druhů hlístic, s rozdílnou životní strategií, konkrétně fakultativně entomoparazitické hlístice *Oscheius myriophila*, volně žijící hlístice *Caenorhabditis elegans* a fytofágní hlístice *Globodera rostochiensis*

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Entomopatogenní hlístice čeledi Steinernematidae

2.1.1 Systematické zařazení

Čeď Steinernematidae Chitwood a Chitwood, 1937 patří do kmene hlístice (Nematoda) a řádu háďata (Rhabditida) (Tanada a Kaya, 1993). V současné době zahrnuje tato čeď dva rody. Zatímco první z nich, *Steinernema* Travassos, 1927 čítá více než 100 popsáných druhů, do druhého rodu *Neosteinernema* Nguyen a Smart, 1994 se řadí pouze druh jediný, *Neosteinernema longicurvicauda* (Hunt, 2007).

Determinace jednotlivých druhů entomopatogenních hlístic tradičně vycházela především z morfologických charakteristik zkoumaných jedinců. Stále více se však uplatňují moderní, molekulárně genetické metody, které určení a identifikaci konkrétního druhu značně usnadňují. Jako příklad lze uvést sekvenování určitých genů ribozomální (úsek ITS, 18 S rDNA) nebo mitochondriální (12 S rDNA) DNA (Nadler *et al.*, 2006).

2.1.2 Ekologie

Základním předpokladem úspěšného využití entomopatogenních hlístic v biologické ochraně rostlin je znalost jejich ekologie, tedy jejich vztahu k obývanému prostředí a dalším organismům vyskytujícím se v dané lokalitě. Zároveň je nutné přihlídnout k původnímu areálu výskytu konkrétního druhu hlístice, zejména kvůli abiotickým podmínkám prostředí, které by mohly být pro daný druh v nové lokalitě nevhodné. V neposlední řadě zde také hraje roli druhová diverzita oblasti, ve které má být hlístice použita. (Hussaini, 2017).

Rozšíření

Jak již bylo zmíněno v úvodní kapitole, osidlují hlístice čeledi Steinernematidae půdy prakticky všech kontinentů světa. Výjimku zde představuje Antarktida, kde nebyla přítomnost hlístic rodu *Steinernema* dosud prokázána (Griffin *et al.*, 1990). U většiny druhů tohoto rodu je areál výskytu do různé míry omezený (např. *Steinernema kushidai* - Japonsko), nicméně existují i druhy

kosmopolitní, jmenovitě *Steinernema feltiae* a *Steinernema carpocapsae* (Haziret *et al.*, 2003).

V souvislosti s omezeným rozšířením jednotlivých druhů je v literatuře také často zmiňována jejich vazba na konkrétní biotop. Výsledky těchto studií si však povětšinou odporují. V práci Mráčka a Bečváře (2000) je zmíněna závislost výskytu určitého druhu na přítomnosti konkrétního hmyzího hostitele. Například hlístice *S. krausse* byly izolovány zejména v lokalitách s vyšším výskytem zástupců čeledi pilatkovití (Tenthredinidae), která se řadí do řádu blanokřídlých (Hymenoptera) (77,8% vzorků s hlísticemi). Vazba na specifického hostitele, píďalku podzimní (*Operophtera brumata*) z čeledi píďalkovití (Geometridae) a řádu motýli (Lepidoptera) byla pozorována u *S. feltiae* (55,6% vzorků). S podobným závěrem o rozšíření hlístic v závislosti na vhodném hostiteli přichází i práce Hominicka *et al.* (1996).

Vliv biotických a abiotických faktorů na přežívání hlístic

Nejdůležitějším a pro život entomopatogenních hlístic v půdním prostředí klíčovým faktorem je vlhkost (Perry *et al.*, 2012). Bez přítomnosti vodního filmu na povrchu půdních částic nebo naopak při naprostém zahlcení půdních pórů vodou jsou totiž hlístice omezeny v pohybu a ztrácí tak schopnost aktivně vyhledávat hostitele (Koppenhöfer *et al.*, 1995).

Kritickým faktorem pro přežívání hlístic je také teplota. Teplotní optimum pro život hlístic se liší podle jednotlivých druhů. Obecně se však pohybuje v rozmezí 15 - 20 °C (Grewal *et al.*, 1994). Při nízkých teplotách (< 10 - 15 °C) je činnost hlístic podobně jako při nedostatečné vlhkosti pozastavena, následkem působení vysokých teplot (> 30 - 40 °C) je přímo inhibována. Působení vysokých teplot nad 30 °C může také negativně ovlivnit reprodukci a schopnost infikovat hostitele (Hazir *et al.*, 2003). Existují však i takové druhy hlístic, kterým vyšší teploty vyhovují. Jedná se například o druh *Steinernema riobrave*, jejíž teplotní optimum pro reprodukci dosahuje až 32 °C a schopnost infekce přetrvává do 39 °C (Griffin *et al.*, 2005). Obecně však platí, že dlouhodobé vystavení teplotám pod 0 °C a nad 40 °C je pro hlístice letální (Brown a Gaugler, 1996).

Z dalších abiotických faktorů, které také, ač ne tolik významně, ovlivňují život hlístic v půdě, lze uvést strukturu půdy a její provzdušnění, pH půdy, intenzitu světla a UV záření (Steinkraus *et al.*, 2007).

Hlístice jsou během života v půdním prostředí také vystaveny působení různých antagonistických organismů. Mezi přirozenými nepřáteli hlístic byla doposud největší pozornost věnována nematofágním houbám. Významným představitelem této skupiny je parazitická houba *Hirsutella rhossiliensis*, jejíž konidie s adhezivní schopností přilnou ke kutikule larev hlístic, proniknou do jejich těla a prostřednictvím hyf vytvoří husté mycelium, které hostitele usmrtí (Timper *et al.*, 1991).

K dalším nepřátelským organismům omezujícím vývoj a život hlístic patří i půdní bakterie, někteří draví bezobratlí (roztoči a chvostoskoci) a také například prvoci (Kaya, 1990).

Vzájemné antagonistické působení je však pozorovatelné i mezi jedinci jednoho druhu hlístic. Pokud do těla nového hostitele vnikne větší počet invazních larev, než jaký je pro infekci optimální, dojde mezi vyvíjejícími se jedinci ke kompetici o prostor a především o potravu. Logickým závěrem takového konkurenčního boje je pak snížená produkce potomstva. Podobná situace, která vyústí v úplné zastavení reprodukčního procesu, nastává tehdy, kdy vyvíjející se hlístice vyčerpají dostupné živiny dříve, než dojde k vyvinutí invazních larev (Kaya a Koppenhöffer, 1996).

Stejně tak může kompetice nastat i mezi různými druhy entomopatogenních hlístic. Děje se tak především v okamžiku, kdy se jedinci dvou nebo i více druhů snaží napadnout stejného hostitele. O tom, který druh v tomto boji zvítězí, rozhodují symbiotické bakterie, respektive látky jimi produkované (Boemare *et al.*, 1993). V některých případech jsou hlístice různých druhů schopny koexistence, jindy však mohou symbionti určitého druhu inhibovat aktivitu symbiontů druhu dalšího, čímž v podstatě ovlivní i životnost druhu samotného (Akhurst, 1982).

Hostitelské spektrum

V laboratorních podmínkách jsou hlístice čeledi Steinernematidae schopny infikovat velké množství druhů hmyzu. V běžných polních podmínkách je však okruh využívaných hostitelů již o poznání užší, neboť samotná druhová diverzita polních ekosystémů je ve srovnání s ekosystémy přirozenými podstatně nižší. Za pravé hostitelské spektrum můžeme tedy považovat pouze takové druhy hmyzu, na nichž jsou hlístice schopny se přirozeně množit i mimo řízené prostředí polního ekosystému či laboratoře. Nejběžněji napadané hmyzí druhy patří do řádů blanokřídlí

(Hymenoptera), dvoukřídli (Diptera), rovnokřídli (Orthoptera), brouci (Coleoptera) a motýli (Lepidoptera) (Peters, 1996). Na tomto místě je nutné zmínit fakt, že hlístice jakožto půdní organismy mohou přirozeně napadat zástupce výše uvedených taxonů hmyzu pouze v těch vývojových stádiích, která se vyskytují v půdním prostředí (Bathon, 1996).

Lewis (1992) ve své práci uvádí, že se skutečná šíře hostitelského okruhu hlístic odvíjí také od způsobu, kterým hlístice hostitele vyhledávají. Tato životní strategie hlístic byla popsána určitými způsoby chování, označovanými jako "ambusher", "cruiser" a také typem chování, který vykazuje směsné charakteristiky obou typů předchozích (Campbell a Gaugler, 1997). Hlístice skupiny "ambusher" s typickým představitelem *Steinernema carpocapsae* vyčkávají v půdě a napadají hostitele pohybující se kolem nich. Zároveň se vyskytují blíže povrchu půdy. Naproti tomu hlístice s typem chování "cruiser" jsou ve vyhledávání hostitele mnohem aktivnější a pohybují se spíše v hlubších půdních vrstvách. Jako typický zástupce této skupiny je uváděna *Steinernema glaseri* (Campbell a Gaugler, 1993).

Tento dlouhodobě uznávaný a zkoumaný koncept ve své práci zpochybnil Wilson *et al.* (2012). Podle něj totiž může *S. carpocapsae*, jakožto typický "ambusher" přejít i k aktivní, "cruiser" strategii vyhledávání hostitele. Děje se tak zejména v kypřejších a více pórovitých půdách s vyšším obsahem organické hmoty (rašelina, substrát tvořený tlejícím listím). V tomto prostředí se totiž hlístice mohou mnohem snadněji pohybovat. Možnost přechodu *S. carpocapsae* k chování typu "cruiser" také dokazují práce Ennise *et al.* (2010) a Martineze de Altube *et al.* (2008), kteří zaznamenali jedince *S. carpocapsae* aktivně napadající hmyzí hostitele i v hlubších vrstvách půdy.

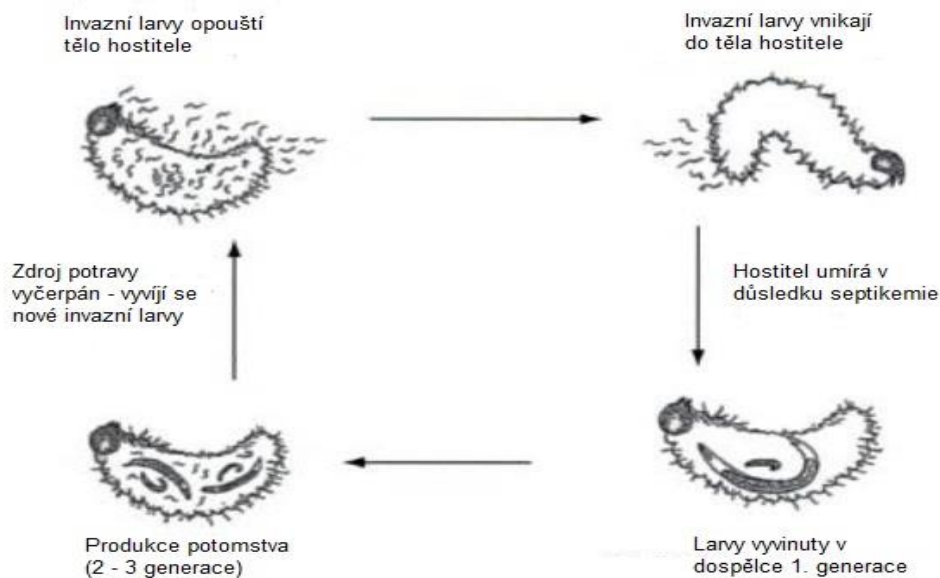
2.1.3 Bionomie a životní cyklus

Celý životní cyklus hlístic je bezpodmínečně vázán na mrtvé tělo hostitele. Jediným vývojovým stádiem hlístic pohybujícím se volně v půdě je invazní larva třetího instaru (IJ) (Banu *et al.*, 2017). Invazní larva nejprve pomocí citlivých smyslových orgánů, takzvaných papil a amfidů, nacházejících se v hlavové části, vyhledá vhodného hostitele. Amfidy a papily totiž reagují na přítomnost látek, které hmyz uvolňuje do půdního prostředí (Basyoni a Rizk, 2016). Může se jednat o různé zplodiny metabolismu, například CO₂ (Gaugler *et al.*, 1980) či různé dusíkaté sloučeniny, jako amoniak, kyselina močová a močovina. Invazní larva se pak

pohybuje po chemickém gradientu zmíněných látek až k potenciálnímu hostiteli (Schmidt *et al.*, 1979).

Jakmile se invazní larva přiblíží cílovému hostiteli, pronikne do jeho tělní dutiny přirozenými otvory (ústní otvor, řitní otvor, spirakula). Poté uvolní do hemolymfy hostitele symbiotické bakterie, které se zde velmi rychle rozmnoží a jsou hemolymfou rozptýleny ve vnitřním prostředí. Napadený hmyzí jedinec pak hyne během 24 - 48 hodin v důsledku septikémie. Bakterie pak slouží hlísticím jako potrava a zároveň produkují toxiny, které chrání mrtvé tělo hostitele, tedy místo pro množení hlístic, před rozkladem i nepříznivými vlivy vnějšího prostředí (Van Zyl a Malan, 2014). U axenických hlístic je rovněž snížena schopnost parazitace a efektivita reprodukce (Sicard *et al.*, 2003).

Invazní larvy třetího instaru se pak živí přítomnými bakteriemi a přechází do čtvrtého vývojového stadia, kde se již objevují dospělci obou pohlaví, tedy samci a samice první generace. V této fázi zároveň dochází ke kopulaci, po které se z nakladených vajíček líhnou larvy prvního instaru. Ty se dále vyvíjejí přes larvy druhého a třetího instaru až do čtvrtého vývojového stadia. Larvy čtvrtého instaru se pak vyvinou v dospělé druhé generace. Po kopulaci se z vajíček opět líhnou larvy prvního instaru, které se dále vyvíjejí. Celý tento cyklus probíhá uvnitř těla hostitele až do fáze vyčerpání zdroje potravy. Během tohoto cyklu, který je zároveň označován jako dlouhý životní cyklus, mohou být vytvořeny dvě až tři generace hlístic. Pokud je potravní zdroj z nějakého důvodu omezen, larvy vylíhlé z vajíček nakladených samicemi první generace se rychle vyvíjejí v invazní larvu třetího instaru, která ihned opouští tělo hostitele. Tento zkrácený průběh vývoje jednotlivých stadií larev hlístic bývá také nazýván krátký životní cyklus. Invazní larvy třetího instaru jsou pak schopny přežít v půdě bez jakéhokoli zdroje potravy až několik měsíců, samozřejmě v závislosti na podmínkách půdního prostředí a přítomnosti antagonistů (Adams a Nguyen, 2002). Příklady některých faktorů, které mohou ovlivnit přežívání IJ v půdě byly uvedeny v kapitole 2.1.2.2.



Obrázek 1: Zjednodušený vývojový cyklus hlístic čeledi Steinernematidae (upraveno podle Griffin *et al.*, 2005)

2.2 Symbiotické bakterie rodu *Xenorhabdus*

2.2.1 Systematické zařazení a charakteristika

Bakteriální rod *Xenorhabdus* se řadí do γ -podtřídy kmene Proteobacteria a čeledi Enterobacteriaceae. Všechny bakterie tohoto rodu jsou gram-negativní, fakultativně anaerobní a mají tyčinkovitý tvar (Kaya a Gaugler, 1993).

Jak je uvedeno v úvodní kapitole, bakterie rodu *Xenorhabdus* žijí v obligátně symbiotickém vztahu s hlísticemi čeledi Steinernematidae. Některé z výhod tohoto soužití, především z hlediska výhodnosti pro hlístice, již byly nastíněny v předchozích kapitolách (kapitola 2.1.3). Nejdůležitějším přínosem tohoto vztahu s hlísticemi je pro bakterie bezpochyby ochrana. Zástupci rodu *Xenorhabdus* totiž nejsou schopni sami volně přežít v půdním prostředí. Ve střevním váčku hostitelské hlístice jsou však chráněni před vnějšími nepříznivými vlivy a hlístice je zároveň transportuje k cílovému hmyzímu hostiteli. Hostitelská hlístice také přenáší bakterie přímo do těla cílového hostitele a poskytuje jim ochranu při započetí infekčního procesu (Götz *et al.*, 1981).

Přirozený symbiotický vztah mezi hlísticí a bakterií je velmi specifický. Každá hlístice čeledi Steinernematidae je totiž schopna žít v asociaci pouze s určitým druhem bakterie rodu *Xenorhabdus* (např. *S. carpocapsae* a *Xenorhabdus nematophila*). Jednotlivé druhy tohoto rodu však ve vazbě na konkrétní druh hlístice již tolik vyhraněné nejsou. Jeden druh totiž může žít v symbióze i s více druhy hlístic (např. *Xenohrabdus bovienii*, *Xenorhabdus poinarii*). V experimentálních podmínkách jsou hlístice schopny růst a vyvíjet se i na jiných druzích bakterií, které nejsou jejich přirozenými symbionty. V některých případech, jak uvádí Půža *et al.* (2013), mohou být takto naprosto bez problémů kultivovány (*S. affine* x symbiont *S. kraussei*), jindy však může být přítomnost symbionta jiného druhu hlístice limitujícím faktorem pro vývoj i přežití (*S. kraussei* x symbiont *S. affine*).

Patogenita bakterií rodu *Xenorhabdus* závisí na více faktorech. Nejvýznamnějším z nich je zcela jasně konkrétní kmen bakterie, neboť každý z kmenů bakterií rodu *Xenorhabdus* disponuje rozdílnou mírou patogenity vůči určitému hostiteli. Schopnost vyvolat onemocnění také závisí na druhu hostitele a jeho náchylnosti k napadení, aktivitě imunitního systému a zdravotním stavu v době započetí infekce (Forst a Neilson, 1996). V hemolymfě hostitele se pak bakterie musí vyrovnat s obrannou reakcí hostitele. V některých případech není vůbec imunitním systémem hostitele zaznamenána, jindy je však její činnost téměř ihned po vstupu do těla hostitele zastavena, například přímou nodulací bakteriálních buněk (Dunn, 1986). Tento proces může být potlačen uvolněním dalších bakterií stejného druhu, jinými bakteriemi, přítomnými v těle či na povrchu hostitelské hlístice nebo toxickými látkami, produkovanými přímo hlísticí (Akhurst a Boemare, 1990). Růst bakterií rodu *Xenorhabdus* je také doprovázen produkcí toxických látek různé povahy, obvykle specifických pro daný druh nebo i kmen bakterie, které potlačují imunitní reakci hostitele. Zmíněné toxické látky mohou být například lipopolysacharidy vnější bakteriální membrány (endotoxiny), které zabraňují aktivaci enzymu fenoloxidázy ale i další proteiny rozdílné chemické podstaty i účinku (Dreyer *et al.*, 2018).

2.2.2 Životní cyklus

V průběhu života prochází bakteriální buňky každého druhu rodu *Xenorhabdus* jistými morfologickými, fyziologickými i biologickými změnami. Tyto odlišnosti ve stavbě i činnosti bakteriálních buněk ve své práci poprvé popsal

Akhurst (1980), kde také rozlišil dvě základní formy existence buněk bakterií rodu *Xenorhabdus*, označované jako fenotypické varianty (či fáze) I a II. Základní odlišnost mezi oběma fenotypickými variantami vyplývá především z úlohy, kterou během své existence plní.

Invazní larvy hlístic, které se jako jediné vývojové stadium volně pohybují v půdě, obsahují ve svém střevním váčku vždy a pouze bakterie varianty I. Bakterie této fáze jsou tedy i iniciátory infekčního procesu hmyzího hostitele (Burnell a Stock, 2000). Pro adaptaci na uvedené skutečnosti byly u bakterií varianty I vyvinuty povrchové buněčné struktury zajišťující pohyblivost (bičíky), zvýšenou schopnost adheze (fimbrie) (Givaudan *et al.*, 1995) a také vyšší stupeň ochrany (mohutnější glykokalyx). Přítomnost těchto organel nebo jejich modifikací nebyla u varianty II zaznamenána (Brehélin *et al.*, 1993).

Další rozdíl mezi fenotypickými variantami rodu *Xenorhabdus* je nejlépe pozorovatelný při kultivaci buněk *in vitro*. Kolonie varianty I jsou ve srovnání s variantou II menší, u některých druhů mohou být i pigmentované. Nejvýraznější odlišností je zde však schopnost absorpce barviva (bromthymolová modř, neutrální červeně) z kultivačního média, pozorovatelná u buněk varianty I (Akhurst a Boemare, 2015). Bakteriální kolonie jsou pak zbarveny v odstínech tmavě modré s červeným středem, zatímco v kolonie varianty II zůstávají bezbarvé (Dreyer, 2018).

Patrně nejpodstatnější rozdíl mezi oběma fenotypickými fázemi bakterií spočívá v produkci odlišného množství i spektra toxických, především antibiotických, ale také enzymatických látek a dalších sloučenin. Úroveň celkové produkce toxických metabolitů a enzymů je u bakterií varianty I mnohonásobně vyšší než v případě varianty II. Zvýšená exkrece zmíněných látek je však u této fenotypické fáze bakterie zcela žádoucí. Nejprve z důvodu rychlého a účinného překonání obranných mechanismů hmyzího hostitele, následně pro ochranu místa množení své hostitelské hlístice před ostatními mikroorganismy v půdě a zamezení konkurenčního boje o vlastní zdroj potravy a poté pro efektivní enzymatický rozklad hmyzích tkání (Burnell a Stock, 2000). Zároveň se bakterie varianty I, zejména díky schopnosti tvorby a produkce krystalických proteinových inkluzí, jeví i jako vhodnější úživný substrát pro samotné hlístice než bakterie varianty II (Koppenhöffer a Gaugler, 2009). Přítomnost bakterií právě ve fázi I je tedy pro hlístice klíčová nejen z důvodu zajištění vhodného prostředí pro reprodukci, ale

také pro zabezpečení optimálních výživových podmínek k dokončení vývojového cyklu (Goodrich-Blair a Clarke, 2007).

V okamžiku, kdy se bakterie varianty I musí vyrovnat s nepříznivými podmínkami okolního prostředí, přechází do varianty II. Nevhodné podmínky jsou často reprezentovány nedostatkem potravy. Proto jsou bakterie varianty II schopny účinnějšího vstřebávání živin, jejich zabudování do organismu, a tím tedy rychlejšího růstu (Smigelsky *et al.*, 1994). Ani v této fázi však bakterie nepřichází o svoji schopnost produkce toxických látek. Na rozdíl od varianty I jich, jak už bylo řečeno výše, produkuje mnohem méně. Tvorba a exkrece některých metabolitů (např. určitých antimikrobiálních látek a proteáz) je zde však pozastavena úplně (Sicard *et al.*, 2005). I přesto jsou bakterie varianty II schopny infikovat náchylného hostitele, jak bylo dokázáno u housenek zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) infikovaných bakteriemi *X. nematophila* (Boucias a Pendlant, 1998).

V souvislosti s přechodem bakterií z jedné fáze do druhé je také třeba zmínit, že u některých druhů rodu *Xenorhabdus* je tento proces vratný a znovu libovolně opakovatelný (*X. nematophila*). U jiných druhů však schopnost přejít z varianty II do varianty I prokázána nebyla (*Xenorhabdus bovienii*). Náhodnost změny fenotypické varianty během života bakterií zcela jasně naznačuje, že existence těchto variant není podmíněna strukturálními změnami genomu bakteriální buňky (Akhurst *et al.*, 1992).

2.2.3 Metabolismus

Základním předpokladem pro přežití entomopatogenních bakterií rodu *Xenorhabdus* je vysoká přizpůsobivost rozdílným podmínkám obou typů prostředí, ve kterých se přirozeně vyskytují. Schopnost adaptace na život ve střevním váčku hlístice a následně v hemolymfě náchylného hmyzího hostitele je podmíněna přímo částí DNA bakterie, označovanou jako flexibilní genom. Geny sdružené ve flexibilním genomu pak hrají klíčovou roli v navazování symbiotického vztahu bakterií s hlísticemi a jsou také zodpovědné za jejich patogenitu (Ogier *et al.*, 2010). Termín flexibilita genomu znamená především rozdíl v přítomnosti určitých genů u jednotlivých druhů rodu *Xenorhabdus*. Od této skutečnosti se také odvíjí fakt, že spektrum a množství syntetizovaných metabolitů jsou pro každý druh i kmen bakterií specifické (Bode *et al.*, 2011). Součástí zmíněného flexibilního genomu jsou shluky genů kódujících například neribozomální peptidické syntetázy (non-ribosomal

peptide synthetases, NRPS) a polyketid-syntázy (polyketide synthase, PKS), ale i další enzymatické látky, od kterých je odvozena řada toxických sekundárních metabolitů produkovaných bakteriemi rodu *Xenorhabdus* (Tobias *et al.*, 2017).

Bakteriální metabolické produkty v rámci své biologické aktivity disponují rozdílnými antimikrobiálními, antifungálními, antiprotozoálními, nematocidními, insekticidními i cytotoxickými účinky (Brachmann a Bode, 2013). Na základě odlišnosti v působení a struktuře byly rozděleny do sedmnácti konkrétních a jedné dosud nejmenované třídy (Dreyer *et al.*, 2018). Příklady některých z nich budou uvedeny níže.

Antifungální i insekticidní aktivitu vykazují látky patřící do třídy derivátů dithiolopyrrolonu, xenorhabdiny a xenorxidy (McInerney *et al.*, 1991). Toxicita vůči hmyzu, konkrétně imunosupresivní působení bylo pozorováno i u rhabduscinů (*Xenorhabdus nematophila*) (Crawford *et al.*, 2012) a některých derivátů indolu (*Xenohrabdus bovienii*, *X. nematophila*) (Shrestha a Kim, 2007). Skupina sdružující indolové sloučeniny se vyznačuje také výraznými antibakteriálními účinky, které spočívají v potlačení aktivity jak Gram-negativních tak Gram-pozitivních bakterií (Sundar a Chang, 1993). Stejně inhibiční působení bylo zaznamenáno například i u třídy fabclavinů (*Xenorhabdus budapestensis*) (Fuchs *et al.*, 2014) a xenocoumacinů (*Xenorhabdus nematophila*, *Xenohrabdus kozodoii*) (Reimer *et al.*, 2009). Xenocoumaciny jsou bakterií syntetizovány ve více variantách. Změnou syntézy těchto jednotlivých subtypů předchází bakterie vlastnímu poškození (Park *et al.*, 2009).

Antibakteriální působení sekundárních metabolitů bakterií rodu *Xenorhabdus* však není striktně omezeno jen na zástupce jiných bakteriálních rodů. Jak totiž uvádí práce Fodora *et al.* (2010), může být vlivem toxických metabolitů jednoho druhu potlačena schopnost reprodukce i životaschopnost druhu dalšího.

Účinnost metabolických produktů také nemusí být nutně podmíněna přítomností "mateřské" bakteriální buňky. Některé sekundární metabolity, patřící například do skupiny bakteriocinů a xenocinů, které jsou zodpovědné za vzájemné škodlivé působení jednotlivých druhů, neztrácejí svoji toxicitu ani v tekutém médiu, které prošlo sterilizačním procesem v autoklávu (Fodor *et al.*, 2010). Stejný výsledek, tedy zachování aktivity metabolitů po sterilizačním procesu, přináší i práce Dreyera (2018), který zároveň poukazuje na vysokou toxicitu metabolických produktů *Xenorhabdus khoisanae* vůči bakteriím, houbám i kvasinkám.

2.3 Využití hlístic v biologické ochraně rostlin

V současné době je stále více kladen důraz na tzv. udržitelnost systému hospodaření na zemědělské půdě, s čímž také souvisí systém integrované ochrany zemědělských plodin. Hlavní zásadou tohoto systému je podpořit přirozené mechanismy regulace škodlivých činitelů, tedy upřednostnit využití alternativních způsobů ochrany rostlin před chemickými pesticidy a tím snížit jejich dopad na životní prostředí. Jedním takovým a prokazatelně účinným způsobem ochrany pěstovaných plodin je právě využití entomopatogenních hlístic (Coupland *et al.*, 2017).

Hlístice jakožto paraziti hmyzu jsou známy již několik století. První úvahy o jejich využití v biologické ochraně rostlin proti škodlivým druhům však vyvstaly až ve 30. letech minulého století. V roce 1929 Glaser a Fox (Glaser a Fox, 1930) objevili hlístici, napadající larvy listokaza japonského (*Popillia japonica*), která byla ještě v téže roce popsána Steinerem (1929) jako *Neoplectana glaseri* (mladší synonymum druhu *Steinernema glaseri*). Na základě těchto zjištění byla provedena řada polních pokusů potvrzujících vysokou efektivitu hlístic jako regulátorů populací škodlivých činitelů. Tyto pozitivní výsledky však byly v následujících letech částečně opomíjeny zejména kvůli expanzi poměrně levných a účinnějších insekticidních přípravků na ochranu rostlin. Opětovný zájem o využívání hlístic v biologické ochraně nastal až mezi lety 1960 - 1970, především z důvodu zjištění negativních dopadů běžně užívaných syntetických pesticidů na životní prostředí (Smart, 1995).

V současné době probíhá výzkum entomopatogenních hlístic na mnoha úrovních, od jejich genetiky, fylogeneze, symbiotických vztahů s bakteriemi, způsobu chování až po jejich konkrétní využití v ochraně rostlin (Spiridonov, 2017). V praktické aplikaci i komercializaci hlístic však vyvstává řada komplikací, souvisejících jak s jejich přirozenými biologickými vlastnostmi, tak s náročností jejich kultivace a uchování. Některé z benefitů a problémů zařazení hlístic do systému biologické ochrany rostlin shrnuje následující tabulka.

Tabulka 1: Výhody a nevýhody využití hlístic v biologické ochraně rostlin (převzato z Askary *et al.*, 2017)

Výhody	Nevýhody
✓ Široké hostitelské spektrum	✓ Vysoká nákladnost
✓ Schopnost velmi rychle usmrtit hostitele	✓ Omezená životnost hlístice a nutnost chladících skladovacích zařízení
✓ Schopnost aktivně vyhledat hostitele	✓ Omezení okolním prostředím: vlhkost (přežití a schopnost infekce), teplota (nad a pod optimem pro infekci), citlivost UV záření, letální efekt některých pesticidů (nematicidy, fumiganty), nepříznivý chemismus půdy (salinita, pH)
✓ Možnost <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> produkce	
✓ Využití stávající technologie pro aplikaci	
✓ Malý vliv na necílové organismy	
✓ Jednodušší systém registrace	✓ Omezené využití prostorových modelů (nelze předvídat perzistenci v prostředí)
✓ Bez nutnosti zvláštního vybavení pro produkci	✓ Obavy z bezpečnosti užití

Ze zástupců entomopatogenních hlístic čeledi Steinernematidae bylo doposud komercializováno sedm druhů, a to *Steinernema scapterisici*, *Steinernema longicaudum*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. glaseri*, *S. riobrave* a *S. kushidai* (Půža, 2015). V České republice byly doposud povoleny pouze přípravky s invazními larvami hlístice *S. feltiae*. Jejich seznam, včetně plodin, do kterých je jejich použití doporučeno, spektra účinnosti i dávkování je uvedeno v tabulkách 2 a 3.

Tabulka 2: Povolené přípravky na ochranu rostlin na bázi *Steinernema feltiae* (ÚKZÚZ, 2009 - 2019)

Obchodní název	Držitel povolení	Plodina	Škodlivý organismus
Entonem	BIOCONT LABORATORY, spol. s. r. o.	okrasné rostliny, pěstitelské substráty, skleníkové kultury, žampionárny	larvy smutnic (<i>Scicariidae</i>)
Nemaplus	BIOCONT LABORATORY, spol. s. r. o.	okrasné rostliny, pěstitelské substráty, květináče, skleníky	larvy smutnic (<i>Scicariidae</i>)
Nemaplus antfree	E-Nema gmbH	okrasné rostliny, trávník, zelenina, stromy, keře, zahrady, nezpevněné plochy	mravenci (<i>Formicidae</i>)
Steinernema- system	Biobest N. V.	okrasné rostliny, pěstitelské substráty, skleníkové kultury, žampionárny	larvy smutnic (<i>Scicariidae</i>)

Tabulka 3: Doporučené dávkování přípravků na ochranu rostlin na bázi *Steinernema feltiae* (ÚKZÚZ, 2009 - 2019)

Název přípravku	Dávkování
Entonem	0,5 mil. ks / m ²
Nemaplus	5 mil. ks; 2 - 5 l vody / 10 m ² 50 mil. ks; 20 - 50 l vody / 100 m ²
Nemaplus antfree	5 mil ks; 5 l vody / 5m ²
Steinernema-system	0,5 - 1 mil. ks / m ² (preventivně) 1 mil. ks / m ² (kurativně)

I přes omezené množství cílových organismů, proti kterým jsou hlístice čeledi Steinernematidae v současné době v biologické ochraně používány, se v našich podmínkách vyskytuje i řada dalších hmyzích škůdců, kteří mohou být touto skupinou hlístic regulováni. Jedná se například o zástupce čeledi muchnicovitých

(Bibionidae), larvy osenic (*Agrotis* sp.) nebo housenky obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) (Nermuť *et al.*, 2012).

Na rozdíl od České republiky, kde jsou entomopatogenní hlístice k ochraně rostlin využívány spíše v ekologických systémech hospodaření s redukováným způsobem zpracování půdy, u drobných pěstitelů a zahrádkářů (Půža a Nermuť, 2015), je v některých zemích světa aplikace hlístic ve větším měřítku poměrně rozšířena. K ochraně hospodářsky nejvýznamnějších plodin pěstovaných na větších plochách (bavlna, kukuřice), je vhodná aplikace larev hlístic ve vodní suspenzi na povrch půdy pomocí standardní aplikační techniky. Rozšířené je i využití entomopatogenních hlístic v sadech, jak ovocných tak například okrasných. Zde jsou však hlístice nejčastěji aplikovány přímo na larvy škodlivého hmyzu. Nejběžněji, a také mnohem více než u našich větších pěstitelů okrasných rostlin a zeleniny, jsou hlístice využívány k ochraně skleníkových kultur (Saleh, 2017).

Zajímavý způsob přirozené regulace škodlivých činitelů, který s entomopatogenními hlísticemi také souvisí, popsal ve své práci Böszörményi *et al.* (2009). Jedním z cílů jeho studie bylo otestovat efektivitu bezbuněčných extraktů některých symbiotických bakterií rodu *Xenorhabdus* proti původcům bakteriální spály růžovitých (*Erwinia amylovora*) a fytoftorové hniloby (*Phytophthora nicotianae*). Bakteriální extrakty byly aplikovány přímo na symptomy chorob na listech jabloní. V obou případech bylo za využití extraktu *X. budapestensis* pozorováno zastavení šíření a zmírnění příznaků onemocnění. Z pozitivních výsledků experimentu tedy vyplývá, že i přímé použití symbiotických bakterií entomopatogenních hlístic může mít vysoký potenciál pro využití v biologické ochraně rostlin.

Ze skupiny entomopatogenních hlístic je pro systém přirozené ochrany proti škodlivým organismům u nás významná také hlístice *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae), která je také dostupná jako biopreparát na ochranu proti larvám lalokonosce rýhovaného (*Otiorynchus sulcatus*). Dále je rovněž využívána moluskoparazitická hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae), prodávaná pod komerčním názvem Nemaslug, užívaná především k regulaci populací slimáčka síťkovaného (*Deroceras reticulatum*) (Askary *et al.*, 2017).

2.4 Cílové druhy hlístic

2.4.1 *Oscheius myriophila*

Oscheius myriophila (původně *Rhabditis myriophila*) byl objeven a poprvé popsán v roce 1986 jako parazit zahradních mnohonožek *Oxidis gracilis* (Polydesmida: Paradoxosomatidae). Zároveň byl tento nový druh zařazen do kmene hlístice (Nematoda), řádu háďata (Rhabditida) a čeledi háďovití (Rhabditidae) (Poinar, 1986).

Sudhaus (1976) rozdělil zástupce rodu *Oscheius* na dvě skupiny. První z nich, nazvaná Dolichura, zahrnuje druhy, které oproti skupině druhé, označované Insectivora, dosahují mnohem menších tělesných rozměrů (Flemming, 2000). Skupina Insectivora také navíc sdružuje mnohem více druhů, které mohou být potenciálními patogeny hmyzu (Jarošová *et al.*, 2016). Jednotlivé druhy rodu *Oscheius* se jak v rámci zmíněných skupin, tak mezi sebou, totiž ve svých vztazích k hmyzím hostitelům značně liší. Ze skupiny Insectivora, do které patří i *O. myriophila* (Tabassum *et al.*, 2016), jsou podle Dillmana *et al.* (2012) takzvanými "pravými" entomopatogenními druhy například *Oscheius chongmingensis* a *Oscheius carolinensis*, neboť jsou schopny aktivně vyhledávat hostitele a žít v asociaci s bakteriemi rodu *Serratia*, které využívají k usmrcení hostitelských druhů hmyzu. Naproti tomu je jako druh nepatogenní označován *Oscheius insectivora*, pravděpodobně z důvodu nesplnění klíčové podmínky pro entomopatogenitu, tedy kvůli nepřítomnosti symbiotické patogenní bakterie (Lephoto *et al.*, 2016).

O. myriophila byl pro svoji životní strategii zařazen mezi hlístice fakultativně entomoparazitické, či potenciálně entomopatogenní. Invazní larvy třetího instaru vnikají do tělní dutiny hostitele buď přirozenými otvory, nebo jsou jím pozřeny společně s potravou. V hemolymfě hmyzu se mohou dále vyvinout až v hermafroditické jedince čtvrtého instaru, kteří postupně z trávicího ústrojí pronikají i do dalších tělních orgánů, včetně rozmnožovací soustavy. Svůj vývoj v dospělce však ukončí až v okamžiku, kdy jimi kolonizovaný hostitel zemře a jeho tělo je osídleno různými druhy dekompozitních bakterií (Poinar, 1986). Životní cyklus *O. myriophila* je proto označován jako nekromenický (Sudhaus, 1989). Ačkoliv *O. myriophila* nežije v přímém symbiotickém vztahu s bakteriemi, může také nepřímo zapříčinit smrt hostitele. Děje se tak prostřednictvím různých

entomopatogenních bakterií, které mohou být přítomny na jeho kutikule (Dillman *et al.*, 2012).

Zástupci rodu *Oscheius* jsou, stejně jako entomopatogenní hlístice rodu *Steinernema* fakultativními nekrofágy. Konzumace rozkládajícího se těla hostitele je však pro zástupce čeledi Steinernematidae pouze alternativní strategií přežití (San-Blas a Goven, 2008). Pokud se zástupci obou výše uvedených taxonů pokoušejí o osídlení stejného mrtvého těla hostitele, dochází mezi nimi ke kompetici o prostor i živiny (Campos-Herrera *et al.*, 2015). Výsledek tohoto konkurenčního boje vždy závisí na konkrétních druzích, které do interakce vstupují. V některých případech je následkem působení entomopatogenních hlístic snížena životaschopnost a produkce potomstva hlístic rodu *Oscheius*, stejně negativně však mohou být činností hlístic rodu *Oscheius* ovlivněni zástupci rodu *Steinernema*. Nicméně byly popsány i takové situace, ve kterých si jedinci obou skupin hlístic kolonizující stejného hostitele navzájem vůbec nekonkurovali (Duncan *et al.*, 2003; Campos-Herrera *et al.*, 2012). Hlístice rodu *Steinernema* mohou mít v této mezidruhové kompetici jistou výhodu. Ta spočívá v přítomnosti jejich symbiotických bakterií produkujících antimikrobiální látky za účelem ochrany mrtvého těla hostitele před antagonistickými půdními organismy. Nicméně i některé volně žijící hlístice rodu *Oscheius*, například již zmíněný *O. chongmingensis*, mohou žít v symbióze s bakteriemi, jejichž metabolické produkty mohou být pro jiné organismy vysoce toxické (Deepa *et al.*, 2015). Na základě této skutečnosti lze usuzovat, že se konkurence mezi oběma skupinami hlístic odehrává spíše na úrovni mikroorganismů, se kterými jsou hlístice v asociaci. Jelikož *O. myriophila* nedisponuje žádnou, pevně vázanou symbiotickou bakterií, je možné předpokládat výraznou konkurenční převahu entomopatogenních hlístic čeledi Steinernematidae.

2.4.2 *Caenorhabditis elegans*

Hlístice *Caenorhabditis elegans* se stejně jako *O. myriophila* řadí do kmene hlístice (Nematoda), řádu háď'ata (Rhabditida) a čeledi háď'ovití (Rhabditidae) (Baldwin *et al.*, 1997). Ačkoliv byl tento druh, původně *Rhabditis elegans*, popsán již na začátku minulého století (Maupass, 1900), objevily se úvahy o využití volně žijících hlístic jako biologického modelového organismu až ve čtyřicátých letech. Nejpravděpodobnějším důvodem pro započetí tohoto výzkumu byla zcela jistě možnost pozorovat jejich kompletní životní cyklus i bez přítomnosti hostitelského

organismu, což nebylo u dříve zkoumaných obligátních parazitů možné (Nigon a Félix, 2017). I přesto byla *C. elegans* jako modelový organismus využita až v letech šedesátých. V současné době je součástí mnoha laboratorních experimentů, zejména díky nenákladné kultivaci, vysoké reprodukční schopnosti a transparentní kutikule, která umožňuje studium jednotlivých buněk i subcelulárních struktur bez nutnosti narušení celistvosti těla. Zároveň také nepředstavuje riziko pro člověka (Hunt, 2016).

Pro množení a vývoj vyžaduje *C. elegans* substráty s vysokým podílem organické složky a také vyšším obsahem živin. Zdrojem potravy jsou tedy například mikroskopické houby či jiné nesespecifické mikroorganismy, často doprovázející proces rozkladu rostlinných tkání. Proto je dnes *C. elegans* z hlediska přirozeného výskytu považována za druh osidlující taková stanoviště, která byla ovlivněna činností člověka (kompost, záhony obohacené o pěstební substráty). Jediným vývojovým stadiem, které bylo jen v několika málo případech nalezeno volně v půdě, je invazní larva třetího instaru. Ta však ve svém vývoji v dospělce v běžném půdním prostředí nepokračuje, a to z důvodu již zmíněné nedostatečné zásoby živin.

Ačkoliv není *C. elegans* entomopatogenní ani primárně parazitickou hlísticí, byla přítomnost invazních larev tohoto druhu zaznamenána v těle některých zástupců řádu stejnonožců (Isopoda), dvoukřídlých (Diptera: Psychodidae), roztočů a také mnohonožek (*Ommatoiulus moreletii*, *Glomeris* sp.). Interakce invazních larev *C. elegans* s hmyzími jedinci probíhá dvěma způsoby. Jednak může být hmyz larvami využit jen jako vektor pro transport k místu s vhodnějšími podmínkami pro dokončení vývojového cyklu (foretická asociace), nebo se larvy v dospělce vyvinou přímo v mrtvém těle hostitele. Uvnitř hmyzího těla však *C. elegans* dokončí svůj vývoj pouze v laboratorních podmínkách, tedy pokud je mrtvý hostitel s hlísticemi přenesen přímo do laboratoře, nebo odchycen živý a v laboratoři usmrcen. Tento typ asociace hlístic s hmyzem je označován jako fakultativní nekromenie (Kiontke a Sudhaus, 2006).

V laboratoři jsou hlístice *C. elegans* kultivovány na plotnách s vysoce výživným agarem (např. NGM) a jako zdroj potravy jim nejčastěji slouží nepatogenní kmen OP50 bakterie *Escherichia coli*. *C. elegans* je schopna růstu i za nepřítomnosti živné bakterie, neboť může čerpat živiny přímo z kultivačního média. Za těchto podmínek však nemůže dokončit svůj vývojový cyklus (Hwang *et*

al., 2018). Optimální teplota pro růst *C. elegans* se pohybuje mezi 12 - 25 °C, při teplotách nad 25 °C se hlístice stávají sterilními (Barrière and Félix, 2014).

Přirozeně se hlístice *C. elegans* vyskytují jako samci a hermafroditi schopní samooplození i kladení vajíček. Z nakladených hermafroditních vajíček se líhne larva prvního instaru, která se dále vyvíjí až do stadia čtvrtého. Jednotlivé instary jsou mezi sebou jen velmi obtížně rozlišitelné. Před přechodem do nového instaru se u larev objevuje zvláštní klidové stadium, označované jako lethargus, ve kterém se tvoří základy nové kutikuly. Svlečením staré kutikuly je toto stadium ukončeno a larva pokračuje v normálním vývoji. Larva čtvrtého instaru se tedy mění v hermafroditního dospělého svlečením kutikuly. Poté po dobu dvou až tří dní produkuje potomstvo. Jakmile je sperma uloženo ve spermatéce hermafroditního jedince vyčerpáno, mohou se hermafroditi pářit se samci a následně klást nová vajíčka. Pokud dojde v průběhu vývoje larev k vyčerpání zdroje potravy, nebo nemají hlístice dostatek prostoru k dalšímu růstu, přistoupí larva druhého instaru k alternativní vývojové strategii a přemění se v invazní larvu třetího instaru. Toto stadium je totiž schopné přežít i bez přísunu živin. Zároveň je vybaveno velmi silnou kutikulou, která mu poskytuje ochranu například před antagonistickými organismy, chemickými látkami a ostatními stresovými faktory prostředí. V okamžiku, kdy invazní larvu přemístíme z již nevyhovující agarové plotny na novou plotnu s bakteriemi, svlékne ochrannou kutikulu a vyvíjí se normálním způsobem v larvu čtvrtého instaru (Corsi *et al.*, 2015).

V souvislosti s kultivací *C. elegans* na agaru s *E. coli* OP50 stojí za zmínku, že tento kmen bakterie může být pro *C. elegans* svým způsobem toxický. Přirozeným místem výskytu *E. coli* je totiž trávicí trakt teplokrevných zvířat. Hlístice *C. elegans* s ní tak mohou ve volné přírodě přijít do kontaktu jen velmi sporadicky. Ke kontaktu těchto dvou organismů může tedy dojít pouze tehdy, pokud je *E. coli* přítomná ve výkalech živočichů. Garsin *et al.* (2001) testovali životaschopnost *C. elegans* za přítomnosti *E. coli* OP50 kultivované na běžně používaném NGM agaru a více výživném BHI médiu. Při interakci s *E. coli* OP50, jejíž kolonie rostly na BHI médiu, bylo pozorováno podstatně méně přeživších jedinců *C. elegans*, než při kontaktu tohoto druhu hlístic s *E. coli* OP50 z NGM agaru. Autoři se domnívají, že vyšší množství žádoucích živin na BHI médiu iniciovalo expresi určitých neznámých faktorů *E. coli* OP50, které mohou být pro *C. elegans* toxické. Stejně tak vykazují letální působení na *C. elegans* jiné kmeny *E. coli*, nebo jiné

druhy Gram-pozitivních bakterií (Darby, 2005). K zajímavým závěrům dospěli také Couillault a Ewbank (2003). Ve své práci totiž potvrzují vysokou toxicitu symbiotické bakterie entomopatogenních hlístic *X. nematophila* vůči *C. elegans*. Zároveň poukazují na fakt, že letální působení *X. nematophila* se nemění, ani pokud je *C. elegans* kultivována na tepelně usmrcených bakteriálních buňkách *X. nematophila*.

2.4.3 *Globodera rostochiensis*

Hád'átko bramborové (*Globodera rostochiensis*) patří do kmene hlístice (Nematoda), řádu hád'ata (Rhabditida), podřádu hád'átka (Tylenchina) a čeledi Heteroderidae (Handoo a Subottin, 2018). Do Evropy bylo introdukováno pravděpodobně společně s bramborami, tedy již v 16. století. Poprvé však bylo popsáno až Wollenweberem v roce 1923 (Oro *et al.*, 2014). Kromě brambor (*Solanum tuberosum*) může fytofágní *G. rostochiensis* napadat i další zástupce čeledi lilkovité (Solanaceae), například rajčata (*Solanum lycopersicum*) a lilek (*Solanum melongea*). Jeho přítomnost však byla zaznamenána i u některých planých lilkovitých rostlin. (Lima *et al.*, 2018).

G. rostochiensis je rozšířena prakticky ve všech kontinentech světa. V Evropě se vyskytuje v osmi patotypech, které jsou charakterizovány především rozdílnou mírou patogenity. Mohou však existovat i další, doposud neznámé patotypy (zejména v Jižní Americe), které nebyly do Evropy nebo jiných částí světa prozatím zavlečeny. Neznalost jejich biologie a škodlivosti by mohla způsobit značné komplikace v ochraně porostů brambor nebo i jiných plodin. Právě z těchto důvodů bylo *G. rostochiensis* zařazeno do seznamu A2 karanténních škodlivých organismů. Pro všechny pěstitele brambor tak platí při zjištění výskytu *G. rostochiensis* ohlašovací povinnost (EPPO Global Database, 2019).

Hád'átko přezimuje ve formě vajíček ukrytých v cystách tvořených tělem samice. Stimul pro líhnutí juvenilních larev druhého instaru přichází především přímo od hostitelské rostliny, tedy v podobě vylučovaných kořenových exudátů. Může jím však také být zvýšená teplota půdy (Ebrahimi *et al.*, 2014). Optimální rozpětí pro líhnutí juvenilních larev je uváděno mezi 9 - 21 °C (Renčo, 2007). Jakmile tedy larva zaznamená přítomnost exudátů v půdě, migruje směrem k hostiteli a proniká přímo do jeho kořenů. Uvnitř kořene se pak pohybuje až ke svrchní vrstvě pericyklu, kde začíná stylety nabodávat buňky. Pokud určitá buňka reaguje

adekvátním způsobem, stimuluje ji hád'átka prostřednictvím vylučovaných proteinů, enzymů a hormonů ke tvorbě mnohojaderného syncytia. Rostlina je také působením zmíněných látek manipulována k přednostnímu transportu živin do tohoto útvaru. V syncytiu tak mají larvy zajištěný stálý přísun potravy, proto zde dokončují svůj vývoj přes další dvě nebo tři juvenilní stadia až v dospělce obou pohlaví (Evans-van den Akker *et al.*, 2016). Dospělé samice pak zůstávají přimknuté k povrchu kořene, kde jsou oplodněny volně se pohybujícími samci. Ti však ihned po kopulaci umírají. Samice pak uchovávají oplozená vajíčka uvnitř těla, žijí přisedle u kořenů hostitelských rostlin a živí se sáním. Po určité době hynou, jejich kutikula tvrdne a zbarvuje se do tmavě hněda. Odumřelé tělo samice se zpevněnou kutikulou pak slouží vyvíjejícím se vajíčkům jako ochrana. Takto vytvořené cysty pak odpadávají od povrchu kořenů do půdy, kde mohou larvy ihned napadat nové hostitele. Cysty také mohou zůstat ve stavu dormance a přežít tak v půdě až několik desítek let (EPPO Global Database, 2019).

Infekce rostlin *G. rostochiensis* je jen velmi obtížně rozpoznatelná, neboť počáteční příznaky napadení se spíše podobají důsledkům působení abiotických stresových faktorů. Rostliny jsou totiž zakrslého vzrůstu, mají nažloutlé listy a okolo poledne mohou i povadat. Příčina těchto zjevných změn vzhledu a kondice rostlin však spočívá v poškození jejich podzemních částí, které nemohou zcela plnit svoji funkci. U brambor se infekce *G. rostochiensis* projevuje redukcí celého kořenového systému, zvýšenou tvorbou postranních kořenů a zmenšenou velikostí hlíz. Při silném napadení ke tvorbě hlíz často vůbec nedochází. Negativní působení *G. rostochiensis* se pak odráží především na výrazném snížení výnosů infikovaných plodin (Lima *et al.*, 2018).

Ochrana porostů brambor proti *G. rostochiensis* je dnes realizována spíše prostřednictvím preventivních opatření. Mezi ně patří například střídáním plodin či tzv. strategie "trap cropping", která spočívá v pěstování náchylných hostitelských rostlin, které hád'átku umožní vyvolat infekci, nicméně jsou před dokončením jeho vývojového cyklu zničeny. Další metody ochrany, včetně využití chemických pesticidů, nejsou příliš využívány, neboť jsou poměrně nákladné a také obtížně realizovatelné. Nejvhodnějším opatřením pro zamezení výskytu a šíření *G. rostochiensis* je zcela bezpochyby pěstování rezistentních odrůd brambor (Bairwa *et al.*, 2017).

Ačkoliv nejsou metody biologické ochrany rostlin proti *G. rostochiensis* příliš známé ani využívané, jako možnost, avšak prozatím více neprozkoumaná, se nabízí využití entomopatogenních hlístic čeledi Steinernematidae. Jejich efektivitu pro regulaci *G. rostochiensis* dokázali ve své práci Perry *et al.* (1998), kteří provedli experiment se dvěma zástupci této čeledi, *S. carpocapsae* a *S. feltiae*. Pokus probíhal ve skleníku a květináčích se sterilizovaným písčitém substrátem. V obou případech byla za přítomnosti uvedených druhů entomopatogenních hlístic pozorována snížená invaznost *G. rostochiensis*.

Z důvodu možného šíření nových patotypů *G. rostochiensis* do doposud nezasazených oblastí, velkých škod, které v současné době *G. rostochiensis* na porostech brambor působí a také kvůli nedostatku účinných pesticidních látek, je nezbytně nutné nalézt nový, vhodnější prostředek pro regulaci četnosti a aktivity hád'átek. Jistý potenciál je možné spatřovat právě v entomopatogenních bakteriích rodu *Xenorhabdus*, které jsou známy produkcí sekundárních metabolitů s antibiotickým účinkem.

3 CÍLE PRÁCE

1. Izolace a kultivace různých druhů a kmenů symbiotických bakterií rodu *Xenorhabdus*.
2. Testování vlivu bakteriálních kultur na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitické hlístice *O. myriophila* a modelové volně žijící hlístice *C. elegans*.
3. Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitické hlístice *O. myriophila* a modelové volně žijící hlístice *C. elegans*.
4. Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání fytofágní hlístice *G. rostochiensis*.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Zavíječ voskový (*Galleria mellonella*)

Pro izolaci bakterií a množení EPN byly použity larvy zavíječe voskového v posledním larválním stadiu. Housenky pocházejí přímo z laboratorního chovu. Jsou chovány na umělé dietě v termoboxu při teplotě 28 °C. Larvy byly před samotným nakažením EPN nejprve ošetřeny proti zapřádání. Před kuklením housenka vytváří zámotek z hedvábného vlákna, který má především ochrannou funkci. Omezením tvorby zámotku mají hlístice usnadněný přístup k novému hostiteli, což také urychluje žádoucí proces infekce. Vybrané larvy přibližně stejné velikosti byly na 8 - 10 s ponořeny do vodní lázně o teplotě 58 °C. Poté byly propláchnuty studenou vodou a po oschnutí uloženy do plastové krabičky s pilinami. V této formě byly skladovány před použitím v pokusech.

4.1.2 Hlístice použité k pokusům

Fakultativně entomoparazitické hlístice

Cílovým druhem ze skupiny fakultativně entomoparazitických hlístic, který byl použit pro zkoumání vlivu bakterií rodu *Xenorhabdus* je *Oscheius myriophila* (kmen JU1386).

K množení hlístic *O. myriophila* byly použity mrazem usmrčené housenky zavíječe voskového. Housenky byly umístěny do Petriho misek s filtračním papírem a poté byly infikovány dávkou 100 larev *O. myriophila* na 1 housenku. Po několika dnech byly takto připravené housenky přemístěny na tzv. vodní past. Vodní pastí se rozumí víčko malé Petriho misky obalené navlhčeným filtračním papírem a položené dnem vzhůru do větší Petriho misky s vodou, do které jsou odchyťovány invazní larvy. Takto získané larvy byly slity do skleněné zkumavky, několikrát promyty vodou a přemístěny do Petriho misek s vodou. Misky byly uchovávány v termoboxu při teplotě 13 °C.

Volně žijící hlístice

Působení bakterií rodu *Xenorhabdus* bylo také pozorováno na modelovém organismu, háďátku obecném (*Caenorhabditis elegans*), které se neřadí do skupiny entomoparazitických ani entomopatogenních hlístic.

Hlístice *C. elegans* byly uchovávány a množeny na Petriho miskách s kultivačním médiem NGM (Sulston a Hodgkin, 1988), sestávajícího z 975 ml destilované vody, 3 g NaCl, 17 g standardního výživného agarů, 2,5 g peptonu, 1 ml 1 M CaCl₂, 1 ml 5mg/cholesterolu v ethanolu, 1 ml 1 M MgSO₄ a 25 ml 1 M KPO₄.

Z Petriho misky s dostatkem jedinců *C. elegans* byl ožehnutým skalpelem vyříznut malý čtvereček agarů a přemístěn do nové misky. Po namnožení larev byla miska vypláchnuta vodou, obsah byl třikrát scezen přes sítko s průměrem otvorů 25 μl a to z důvodu odstranění vajíček a přítomných dospělců. Takto separované larvy byly přímo použity k pokusu, nebyly dále nijak uchovávány.

Fytofágní hlístice

Ze skupiny fytofágních hlístic bylo pro praktickou část práce vybráno háďátko bramborové (*Globodera rostochiensis*). Tato hlístice byla použita pouze pro testování vlivu supernatantu z vybraných bakteriálních kultur. Cysty háďátka bramborového, náležející k populaci Šluknov, byly získány z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze.

Na začátku pokusu byly cysty umístěny na ploché sítko, které bylo vloženo do Petriho misky s kořenovým exudátem z bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum*). Miska byla uchovávána při teplotě 28 °C, která byla vysledována a určena jako nejvhodnější pro líhnutí larev.

Vylíhlé larvy byly buď ihned použity pro založení pokusu, nebo ponechány v Petriho misce s kořenovým exudátem, avšak na místě s nižší teplotou (chladnička 5 °C).

4.1.3 Použité kmeny bakterií

Pro izolaci bakterií rodu *Xenorhabdus* byly využity EPN čeledi Steirnermatidae. Celkem bylo použito 23 druhů a 37 kmenů hlístic pocházejících především ze zahraničí, testovány však byly i druhy z České republiky. Všechny

druhy jsou trvale uloženy ve sbírkách Laboratoře entomopatogenních hlístic (Entomologický ústav, BC AV ČR).

Následující tabulka shrnuje použité bakterie. Pro každý bakteriální kmen bylo použito specifické označení užívané pro kmen hlístice (první sloupec tabulky), které bude reprezentovat daný bakteriální kmen i v další práci.

Tabulka 4: Bakteriální kmeny rodu *Xenorhabdus* vybrané pro testování účinnosti na hlístice *O. myriophila* a *C. elegans*.

Označení kmene	Druh bakterie	Hostitelská hlístice	Původ
CB. 1. B.	<i>X. bovienii</i>	<i>S. affine</i>	Česká republika
HOS 2	<i>X. bovienii</i>	<i>S. affine</i>	Česká republika
V af	<i>X. bovienii</i>	<i>S. affine</i>	Česká republika
JEGOR	<i>X. kozodoii</i>	<i>S. arenarium</i>	Ukrajina
SA	<i>X. kozodoii</i>	<i>S. arenarium</i>	Rusko
SLOV	<i>X. kozodoii</i>	<i>S. arenarium</i>	Slovensko
SGI 197	<i>X. khoisanae</i>	<i>S. beitlechemi</i>	Jižní Afrika
1298	<i>X. budapestensis</i>	<i>S. bicornutum</i>	Česká republika
PL 360	<i>X. budapestensis</i>	<i>S. bicornutum</i>	Polsko
W 06	<i>X. budapestensis</i>	<i>S. bicornutum</i>	Jugoslávie
CHIN	<i>X. budapestensis</i>	<i>S. ceratophorum</i>	Čína
SGI 246	<i>X. indica</i>	<i>S. biddulphi</i>	Jižní Afrika
1343	<i>X. nematophila</i>	<i>S. carpocapsae</i>	Česká republika
EGY 4	<i>X. nematophila</i>	<i>S. carpocapsae</i>	Egypt
NCR	<i>X. nematophila</i>	<i>S. carpocapsae</i>	Rusko
CHIN	<i>X. budapestensis</i>	<i>S. ceratophorum</i>	Čína
DIA	<i>X. doucetiae</i>	<i>S. diaprepesi</i>	USA
ALG 3	<i>X. bovienii</i>	<i>S. feltiae</i>	Alžírsko
JAKUT	<i>X. bovienii</i>	<i>S. feltiae</i>	Rusko
AZ 26	<i>X. poinarii</i>	<i>S. glaseri</i>	Azory
FL-10-2	<i>X. poinarii</i>	<i>S. glaseri</i>	USA
S Glas	<i>X. poinarii</i>	<i>S. glaseri</i>	původ neznámý
LPV 723	<i>X. sp.</i>	<i>S. goweni</i>	Venezuela

Označení kmene	Druh bakterie	Hostitelská hlístice	Původ
VIE 2	<i>X. stockiae</i>	<i>S. huense</i>	Vietnam
JOL	<i>X. bovienii</i>	<i>S. joillieti</i>	USA
AZU 3	<i>X. hominickii</i>	<i>S. kari</i>	Keňa
28MB12	<i>X. sp.</i>	<i>S. loci</i>	Vietnam
KUMA	<i>X. hominickii</i>	<i>S. monticolum</i>	Japonsko
CS 31	<i>X. indica</i>	<i>S. pakistanense</i>	Indie
1160	<i>X. bovienii</i>	<i>S. poinari</i>	Česká republika
1187	<i>X. bovienii</i>	<i>S. poinari</i>	Česká republika
MW8A	<i>X. khosiana</i>	<i>S. pwaniense</i>	Tanzanie
PAMELA	<i>X. cabanillasii</i>	<i>S. riobrave</i>	Mexiko
SER	<i>X. ehlersii</i>	<i>S. serratum</i>	Čína
CS 33	<i>X. stockiae</i>	<i>S. siamkayai</i>	Indie
QTR	<i>X. sp.</i>	<i>S. sp.</i>	Vietnam
CS 20	<i>X. stockiae</i>	<i>S. surkhetense</i>	Indie
1551 (Kal 2)	<i>X. bovienii</i>	<i>S. weiseri</i>	Česká republika

4.2 Izolace a kultivace různých druhů a kmenů symbiotických bakterií rodu *Xenorhabdus*

Izolace bakterií byla provedena pomocí již zmíněných larev zavíječe voskového. Živé housenky byly vloženy do Petriho misky s filtračním papírem a byly nakaženy příslušným kmenem EPN v dávce 120 larev EPN na 1 housenku.

Po 24 - 48 hod, kdy už housenky jevíly známky infekce, byla vždy jedna z nich vložena na 1 minutu do malé kádinky 70% roztokem ethanolu. Poté jí byla ve flow boxu ustřižena panožka a do plastové Petriho misky s NBTA kultivačním médiem (složeným z 1 l destilované vody, 37 g standardního výživného agaru, 25 mg bromthymolové modři a 4 ml 1% sterilního filtrovaného Triphenyl-tetracolumchloridového roztoku) (Akhurst, 1980) byla umístěna kapička hemolymfy. Hemolymfa byla po agarové plotně rozetřena ožehnutou kličkou.

Za dalších 24 - 48 hod byly jednotlivé bakteriální kolonie, které vykazovaly znaky rodu *Xenorhabdus*, opět ožehnutou kličkou přeneseny do 50 ml Erlenmeyerových baněk s tekutým kultivačním YS médiem (sestavajícím z 1 destilované vody, 5 g NaCl, 5 g kvasnicového extraktu, 0,5 g NH₄H₂PO₄, 0,5 g K₂HPO₄ a 0,2 MgSO₄ · 7 H₂O (Dye, 1968).

Erlenmeyerovy baňky s bakteriální suspenzí byly umístěny na třepačku (180 rpm) a ponechány inkubaci. Za 24 hod již byl na tekutině patrný zákal, značící rostoucí bakteriální kulturu. Izolát byl v závislosti na typu pokusu buď použit po 48 hodinové inkubaci, nebo byl po 96 hod vysterilizován v autoklávu (120 °C, 15 min) a uložen do chladničky (5 °C). Takto upravená bakteriální suspenze bývá obvykle označována jako "whole-cell extract". V celé práci však bude pro tuto formu bakteriálního extraktu, i přesto, že jeho jednotlivé složky nebyly odděleny centrifugací, použito označení "supernatant", které se zde jeví jako vhodnější.

4.3 Testování vlivu bakteriálních kultur na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitických a volně žijících hlístic

Testování vlivu bakteriální kultury na fakultativně entomoparazitické i nepatogenní hlístice probíhalo ve 12-jamkových miskách s kultivačním médiem označovaným jako Woutsův agar (Wouts, 1981) (skládá se z 1 l desilované vody, 16 g výživného bujónu, 12 g standardního výživného agaru a 5 g slunečnicového oleje).

Na agar v jamkách bylo postupně přidáno po 7 µl různých 48 hod inkubovaných bakteriálních kultur (izolovaných z 37 kmenů hlístic; tabulka 4). Kapka bakteriální suspenze byla vždy rozetřena ožehnutou skleněnou hokejkou. Misky byly uloženy k inkubaci na 48 hod.

Po uplynutí stanovené doby bylo na jednotlivé jamky přidáno po 20 larvách *O. myriophila* nebo *C. elegans* a za 7 dní bylo spočteno množství jedinců.

Kontrola byla provedena v misce s Woutsovým agarem bez přidané bakteriální suspenze. Pokus byl pro každý bakteriální izolát i pro oba cílové druhy hlístic proveden s opakováním.

4.4 Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání a reprodukci fakultativně entomoparazitických, volně žijících a fytofágních hlístic

Ke zhodnocení vlivu bakteriálního supernatantu na fakultativně entomoparazitické a volně žijící hlístice byly využity 24-jamkové misky, přičemž pro pozorování působení jednoho izolátu bakterií bylo využito 12 jamek.

Do jamek bylo postupně přidáno po 250 µl 96 hod inkubovaného a v autoklávu vysterilizovaného bakteriálního supernatantu. K supernatantu v každé jamce bylo přidáno také po 20 larvách *O. myriophila* nebo *C. elegans*. Počet jedinců v jednotlivých jamkách byl zaznamenán po 4 dnech. Kontrolní miska obsahovala pouze čisté YS medium. Pokus byl pro každý izolát bakterií a pro *O. myriophila* i *C. elegans* proveden s opakováním.

Hád'átka *G. rostochiensis* byla vystavena působení pouze takových bakteriálních supernatantů, které v předchozí fázi pokusu s *O. myriophila* a *C. elegans* působily vysokou mortalitu těchto druhů hlístic (tabulka 5).

Pro tento pokus byly také využity 24-jamkové misky, pozorování vlivu supernatantu se však uskutečnilo pouze v 8 jamkách. Larvy *G. rostochiensis* byly do jednotlivých jamek přidány v množství 10 larev/jamka. K larvám v každé jamce bylo následně přidáno 200 µl supernatantu. Počet jedinců v jednotlivých jamkách byl také zaznamenán po 4 dnech. Kontrola byla provedena vždy zvlášť pro každý supernatant, opět bylo použito pouze čisté YS medium. Opakování se u toho pokusu nepodařilo provést z důvodu vylíhnutí nedostatečného množství larev.

Tabulka 5: Bakteriální supernatanty vybrané pro testování účinnosti na hlístici *G. rostochiensis*

Označení kmene (supernatantu)	Druh bakterie
1187	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
KUMA	<i>Xenorhabdus hominickii</i>
W 06	<i>Xenorhabdus budapestensis</i>
PAMELA	<i>Xenorhabdus cabanillasii</i>

4.5 Statistická analýza

Zpracování a vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu STATISTICA CZ 10 (StatSoft, Inc. 2011). Data vyjádřená v procentech (mortalita) byla normalizována za využití arcsinové transformace. Hodnoty celkové produkce potomstva byly normalizovány pomocí logaritmické transformace $\log_{10}(x + 1)$. Výše uvedené zkoumané hodnoty byly podrobeny dvoucestné analýze variance (ANOVA) na hladině významnosti $\alpha = 0,05\%$. Rozdíly ve středních hodnotách byly porovnány prostřednictvím Tukeyho testu ($p < 0,05$).

5 VÝSLEDKY

5.1 Testování vlivu bakteriálních kultur na přežívání a reprodukci

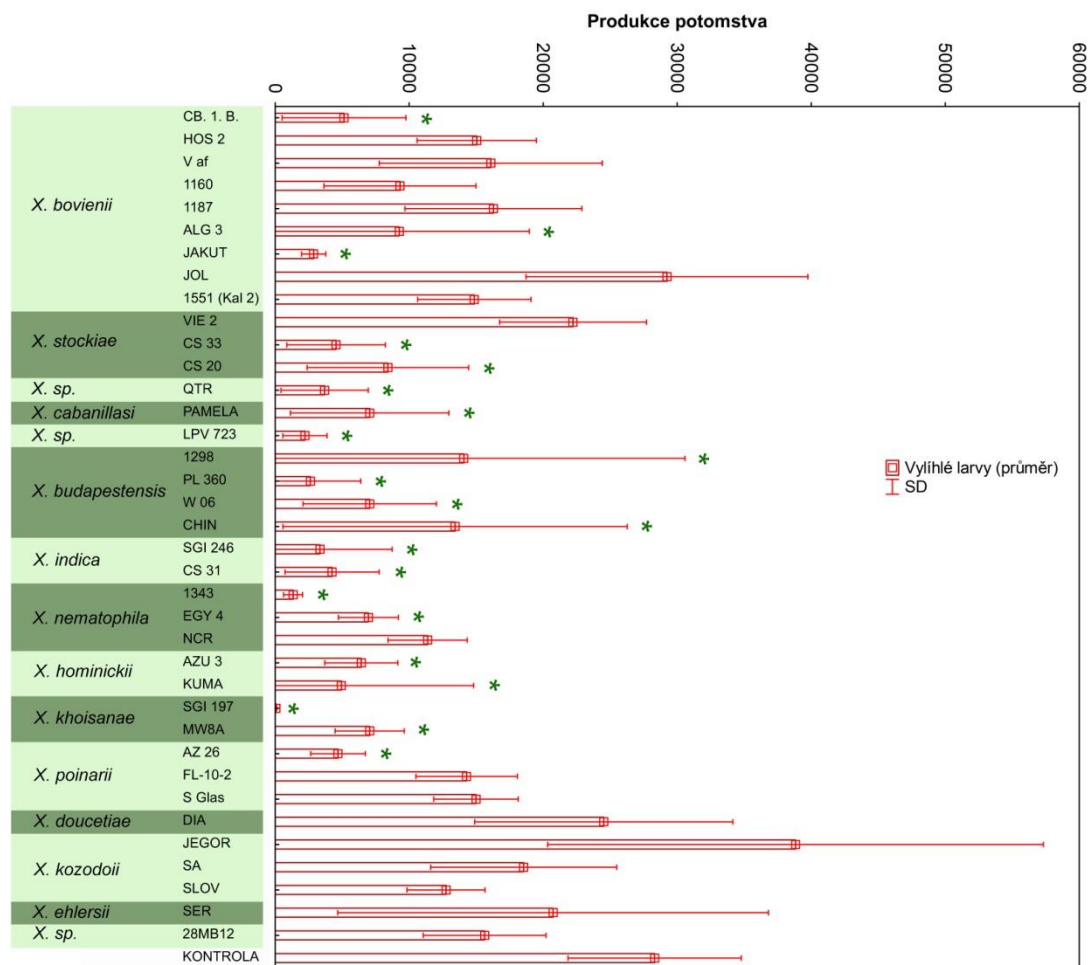
O. myriophila a *C. elegans*

5.1.1 Produkce potomstva

Na základě provedené analýzy variance byl pozorován statisticky významný rozdíl v produkci potomstva mezi oběma druhy hlístic ($F = 1922,09$; $p < 0,00$) kdy se výrazně více množily hlístice *O. myriophila* (graf 1 a 2). Počet hlístic se také průkazně lišil v závislosti na konkrétním kmenu symbiotické bakterie EPN, se kterými byli jedinci *O. myriophila* a *C. elegans* v interakci ($F = 32,65$; $p < 0,00$).

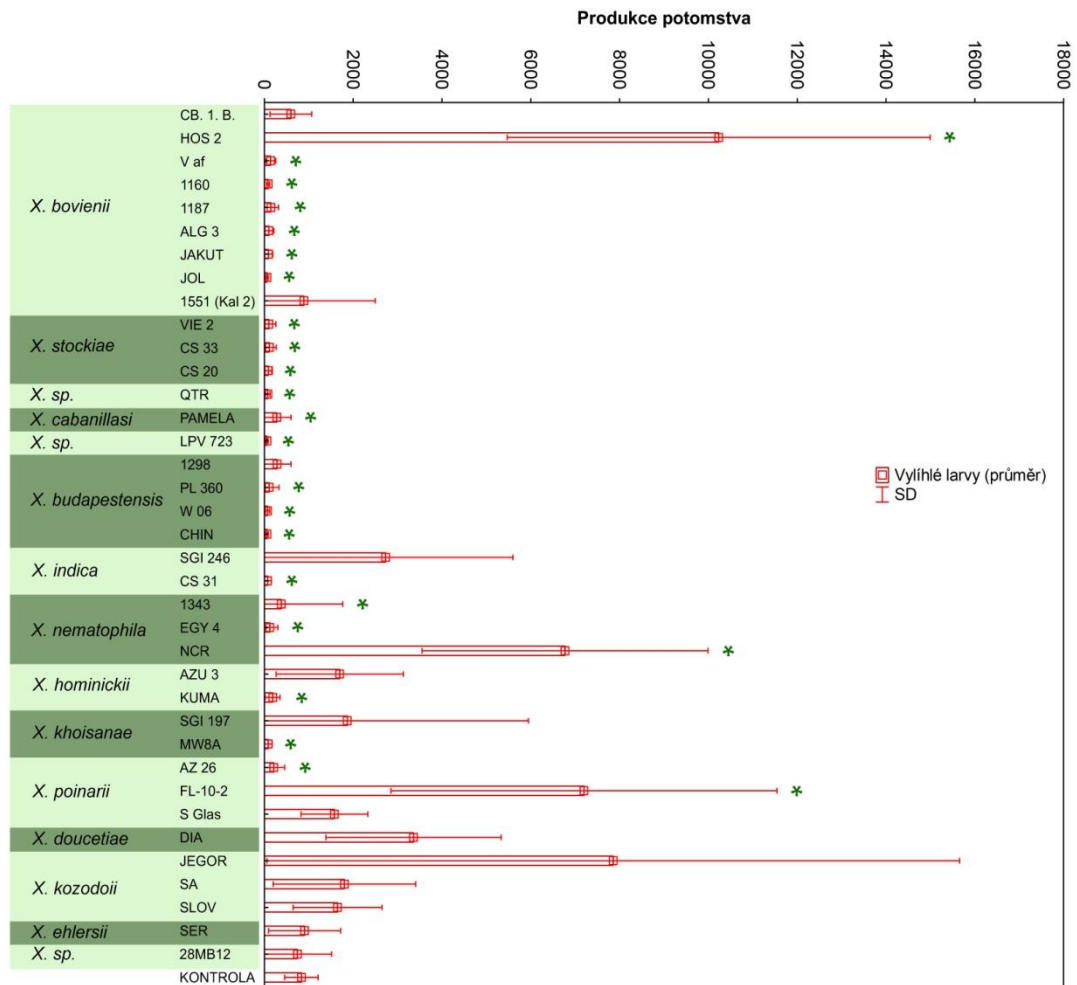
U všech statisticky významných pozorování byla produkce potomstva *O. myriophila* průkazně nižší než v kontrole. Průkazné snížení intenzity množení *O. myriophila* bylo zaznamenáno především u kmene *X. indica* SGI 197, *X. nematophila* 1343, *X. bovienii* JAKUT, *X. sp.* LPV 723, *X. sp.* QTR, *X. budapestensis* PL 360 a u obou kmenů druhu *X. indica* ($p = 0,000036$). Zároveň byl u některých druhů bakterií (*X. budapestensis*, *X. nematophila*, *X. stockiae*, *X. khoisanae*) pozorován rozdíl v míře působení jednotlivých kmenů (graf 1).

U většiny interakcí jedinců *C. elegans* s bakteriálními kmeny byla ve srovnání s kontrolou pozorována průkazně nižší produkce potomstva. Průkazné snížení množství nových jedinců *C. elegans* bylo pozorováno u kmenů *X. sp.* LPV 723 ($p = 0,000036$), *X. sp.* OTR ($p = 0,000036$) a *X. cabainllasii* PAMELA ($p = 0,0028$). V rámci druhu *X. budapestensis* byl u tří kmenů (PL 360, W06 a CHIN) pozorován průkazný negativní vliv na reprodukci *C. elegans* ($p = 0,000036$). Průkazný inhibiční vliv na množení *C. elegans* byl také pozorován u všech kmenů *X. stockiae* ($p = 0,000036$).



Graf 1: Průměrná produkce potomstva (\pm směrodatná odchylka) hlístic *O. myriophila* na Woutsově agaru při interakci s kmeny bakterií rodu *Xenorhabdus*. Pozn. Statisticky významná pozorování jsou označena hvězdičkou.

Nejvýraznější rozdíly v působení kmenů jednoho druhu byly zaznamenány u *X. bovienii*. Zatímco za přítomnosti kmenů *X. bovienii* Vaf, 1160, 1187, ALG3, JAKUT a JOL byla intenzita množení *C. elegans* průkazně snížena ($p = 0,000036$), působení bakterií kmene *X. bovienii* HOS 2 mělo za následek průkazně vyšší produkci nových jedinců ($p = 0,000036$). Obdobně variabilní působení kmenů určitého druhu bylo pozorováno i u *X. nematophila* (s průkazným zvýšením u *X. nematophila* NCR, $p = 0,000037$), *X. poinarii* (průkazně vyšší produkce u *X. poinarii* FL-10-2, $p = 0,000148$) a dále u druhů *X. indica*, *X. khoisanae* a *X. hominickii*



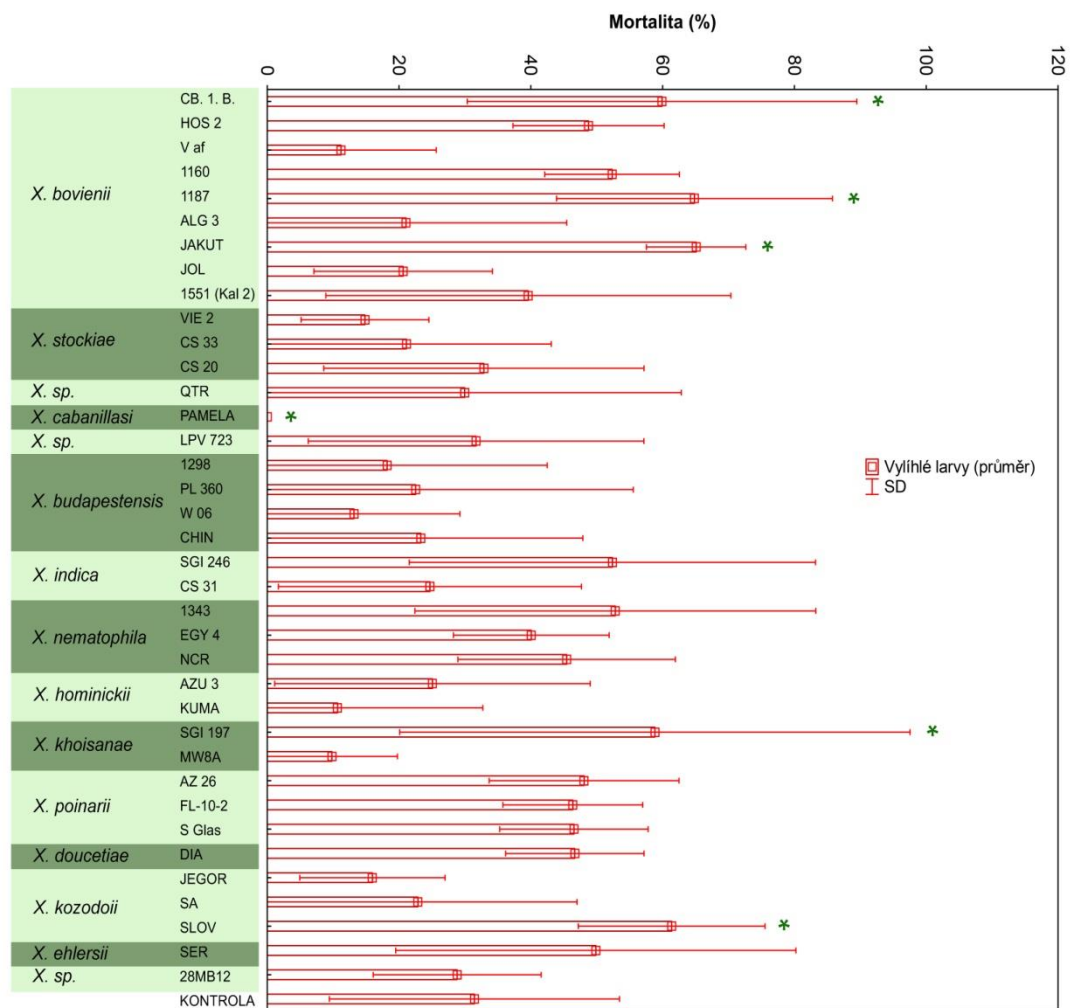
Graf 2: Průměrná produkce potomstva (\pm směrodatná odchylka) hlístic *C. elegans* na Woutsově agaru při interakci s kmeny bakterií rodu *Xenorhabdus*

Pozn. Statisticky významná pozorování jsou označena hvězdičkou.

5.1.2 Mortalita

Průměrná mortalita jedinců *O. myriophila* a *C. elegans* se průkazně lišila ($F = 181,480$; $p < 0,00$) v závislosti na konkrétním druhu symbiotické bakterie EPN ($F = 8,374$; $p < 0,00$). I přes to, že celkově průkazně vyšší úmrtnost byla pozorována u *C. elegans* (graf 3 a 4), dosahovala mortalita jedinců tohoto druhu v kontrole pouhých 5,8%. Naproti tomu byla úmrtnost hlístic *O. myriophila* v kontrole podstatně vyšší (29,9%).

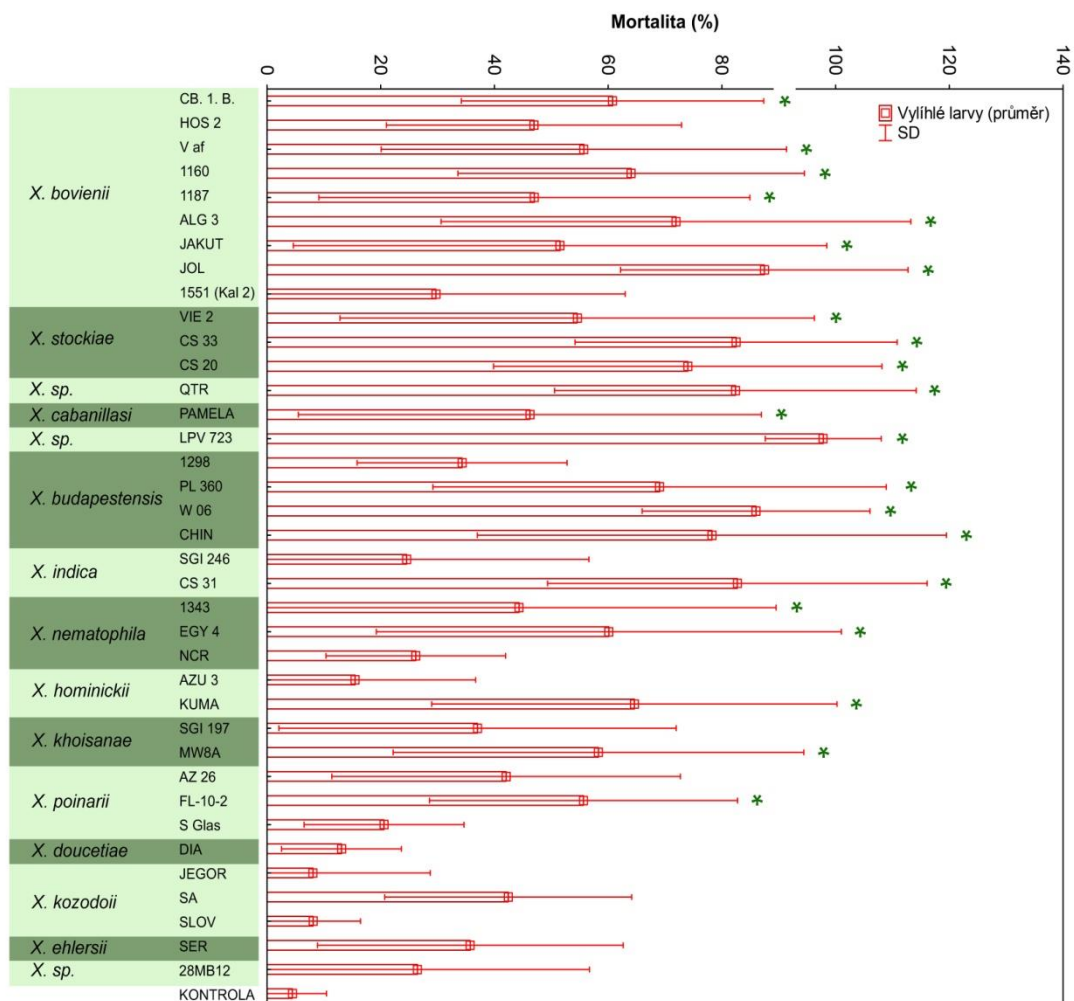
Míra úmrtnosti obou druhů hlístic se také průkazně lišila v závislosti na konkrétním kmeni symbiotické bakterie EPN ($F = 8,374$; $p < 0,00$).



Graf 3: Průměrná mortalita (\pm směrodatná odchylka) hlístic *O. myriophila* na Woutsově agaru při interakci s kmeny bakterií rodu *Xenorhabdus*
Pozn. Statisticky významná pozorování jsou označena hvězdičkou.

Mortalita *O. myriophila* se u většiny jejích interakcí s bakteriemi průkazně nelišila od kontroly. Průkazně vyšší míra úmrtnosti byla zaznamenána u kmenů bakterií *X. kozodoii* SLOV (61,5 %; $p = 0,018$) a *X. khoisanae* SGI 197 (58,7 %; $p = 0,000038$). Stejně tak byla průkazně vysoká mortalita *O. myriophila* pozorována u *X. bovienii* JAKUT (65,4 %; $p = 0,0019$), 1187 (63,1 %; $p = 0,00019$) a CB.1.B. (60,1 %; $p = 0,00069$).

Nejnižší úmrtnost *O. myriophila* byla zaznamenána u kmene *X. cabanillasii* PAMELA (15,7 %; $p = 0,023$).



Graf 4: Průměrná mortalita (\pm směrodatná odchylka) hlístic *C. elegans* na Woutsově agaru při interakci s kmeny bakterií rodu *Xenorhabdus*

Pozn. Statisticky významná pozorování jsou označena hvězdičkou.

U všech statisticky významných pozorování byla mortalita hlístic *C. elegans* vyšší než v kontrole. Průkazně vyšší úmrtnost *C. elegans* byla zjištěna u kmenů bakterií *X. sp.* LPV 723 (97,6 %; $p = 0,000036$), *X. bovienii* JOL (88,9 %; $p = 0,000036$), *X. indica* CS 31 (84,1 %; $p = 0,000036$) a *X. sp.* QTR (83,9 %; $p = 0,000036$) a také u tří kmenů druhu *X. budapestensis* (PL 360, W 06 86,8 % a CHIN, $p = 0,000036$). Podobné, průkazné zvýšení úmrtnosti *C. elegans* oproti kontrole, bylo taktéž zaznamenáno v případě působení všech kmenů *X. stockiae* (VIE 2 $p = 0,00016$; CS 33 a CS 20 $p = 0,000036$).

Průkazně vyšší mortalita *C. elegans*, ač ne tak vysoká jako v předchozích případech, byla zjištěna za přítomnosti bakterií kmene *X. nematophila* 1343 (44,3 %;

$p = 0,011$) *X. cabanillasii* PAMELA (46,1 %, $p = 0,001$) a *X. bovienii* 1187 (46,5 %; $p = 0,0159$).

5.2 Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání a reprodukci *O. myriophila* a *C. elegans*

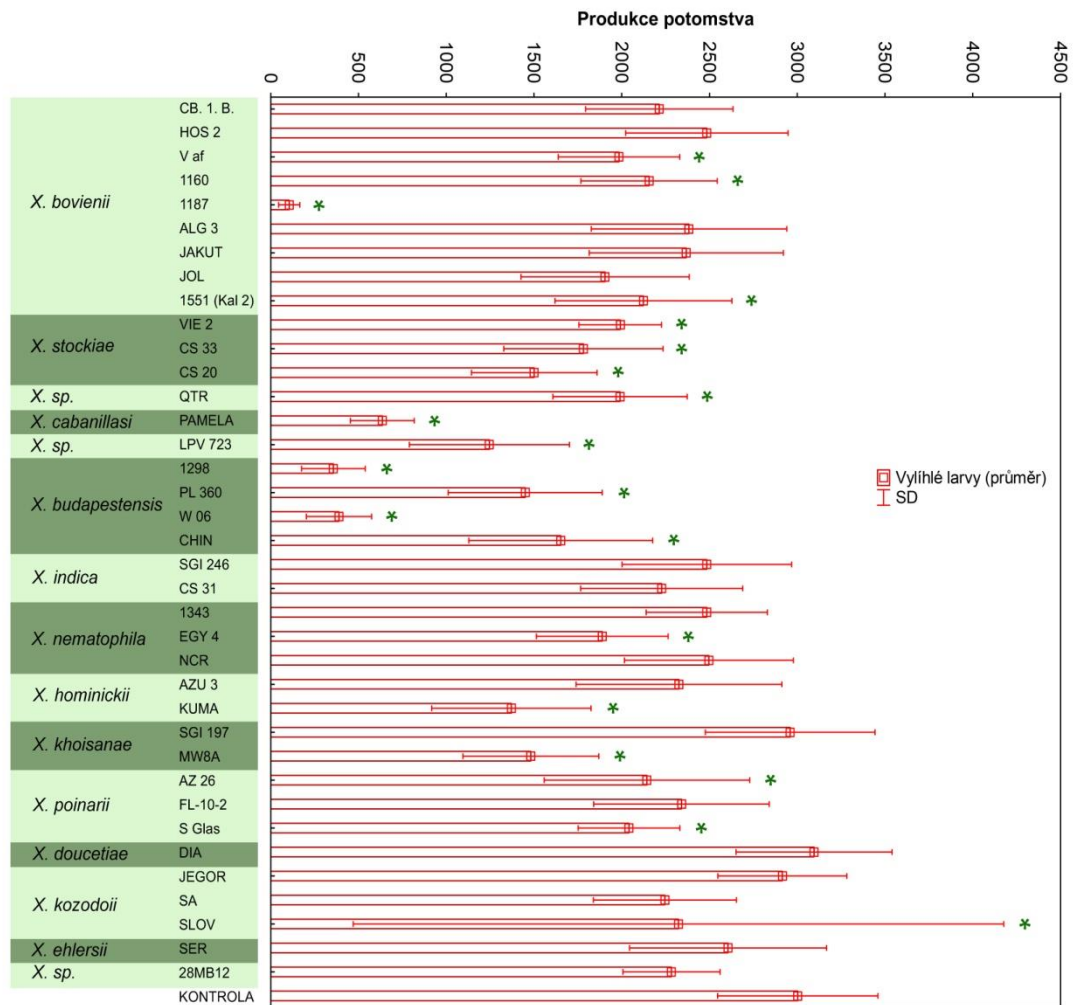
5.2.1 Produkce potomstva

Produkce potomstva *O. myriophila* a *C. elegans* se průkazně lišila v závislosti na druhu hlístice ($F = 1304,6$; $p < 0,00$) a také na kmeni bakterie, ze které byl supernatant získán ($F = 140,4$; $p < 0,00$). Celková průměrná produkce potomstva *C. elegans* byla ve srovnání s *O. myriophila* výrazně nižší (graf 5 a 6).

Množství nově vylíhlých larev *O. myriophila* se u většiny případů interakcí s bakteriálními supernatanty průkazně lišilo od kontroly, přičemž všechna tato statisticky významná pozorování byla nižší než kontrola. Nejméně nových jedinců *O. myriophila* bylo zaznamenáno v supernatantu *X. bovienii* 1187 ($p = 0,000036$). V supernatantech některých dalších kmenů tohoto druhu bakterií byla produkce potomstva *O. myriophila* oproti kontrole taktéž průkazně snížena, avšak ne tak výrazně jako v supernatantu *X. bovienii* 1187 (V af $p = 0,00032$; 1160 $p = 0,0248$; 1551 (Kal 2) $p = 0,0052$). Průkazně nižší intenzita množení *O. myriophila* byla dále zjištěna i u supernatantů *X. sp.* QTR ($p = 0,00028$) a *X. kozodoii* SLOV ($p = 0,0014$).

Výrazně nižší produkce potomstva *O. myriophila* byla zaznamenána u supernatantů všech kmenů *X. stockiae* (VIE 2 $p = 0,00058$; CS 33 a CS 20 $p = 0,000036$) a také u supernatantů *X. budapestensis* PL 360 a CHIN ($p = 0,000036$). Stejný účinek byl pozorován i u supernatantů dalších dvou kmenů *X. budapestensis*, odlišnost od kontroly zde však byla ještě výraznější (1298 a W 06 $p = 0,000036$).

Mírný inhibiční vliv na množení *O. myriophila* byl zaznamenán také u supernatantu kmene *X. sp.* LPV 723 ($p = 0,000036$). Výrazný průkazný účinek na snížení produkce potomstva *O. myriophila* byl pozorován u supernatantu kmene *X. cabanillasii* PAMELA ($p = 0,000036$).

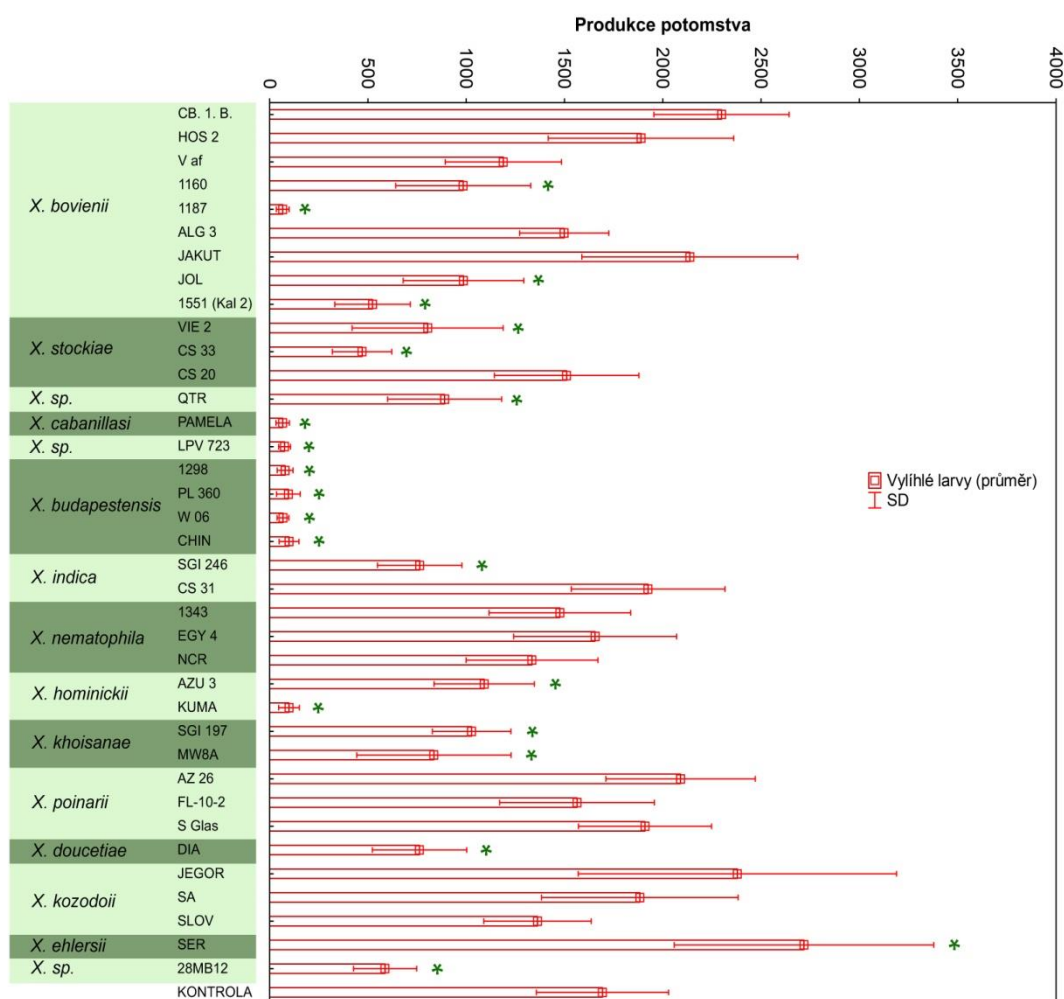


Graf 5: Průměrná produkce potomstva (\pm směrodatná odchylka) hlístic *O. myriophila* při interakci se supernatanty kmenů bakterií rodu *Xenorhabdus*. Pozn. Statisticky významná pozorování jsou označena hvězdičkou.

U všech statisticky významných interakcí bakteriálních supernatantů s hlísticemi *C. elegans* byla zaznamenána nižší intenzita množení tohoto druhu hlístic než v kontrole, vyjma supernatantu kmene *X. ehlersii* SER ($p = 0,0059$). Produkce potomstva *C. elegans* byla v tomto případě průkazně vyšší než v kontrole.

Nejnižší množství nových larev *C. elegans* bylo zjištěno u všech supernatantů kmenů *X. budapestensis*, *X. cabanillasii* PAMELA a *X. sp.* LPV 723 ($p = 0,000036$). Mírnější, ale stále průkazné snížení intenzity množení bylo zaznamenáno v případě supernatantů *X. sp.* 28MB12, *X. doucetiae* DIA, *X. sp.* QTR ($p = 0,000036$) a všech kmenů druhu *X. khoisanae* (SGI 197 $p = 0,0014$, MW8A $p = 0,000036$). V supernatantech obou kmenů druhu *X. hominickii* byla produkce potomstva *C. elegans* průkazně snížena (SGI 197 $p = 0,00143$; KUMA $p = 0,000036$). Průkazně

nižší intenzita množení *C. elegans* byla také zaznamenána u supernatantů kmenů *X. stockiae* CS 33 a VIE 2 ($p = 0,000036$). Průkazný inhibiční vliv na množení *C. elegans* byl pozorován i u supernatantů kmenů *X. bovienii* 1187 a 1551 (Kal 2) ($p = 0,000036$). Méně výrazné snížení produkce potomstva *C. elegans* oproti předchozím dvěma supernatantům bylo zaznamenáno u supernatantů *X. bovienii* 1160 ($p = 0,000066$), JOL ($p = 0,000071$) a také *X. indica* SGI 246 ($p = 0,000036$). Ve všech těchto případech však bylo množství nových larev *C. elegans* nižší než v kontrole.



Graf 6: Průměrná produkce potomstva (\pm směrodatná odchylka) hlístic *C. elegans* při interakci se supernatanty kmenů bakterií rodu *Xenorhabdus*
Pozn. Statisticky významná pozorování jsou označena hvězdičkou.

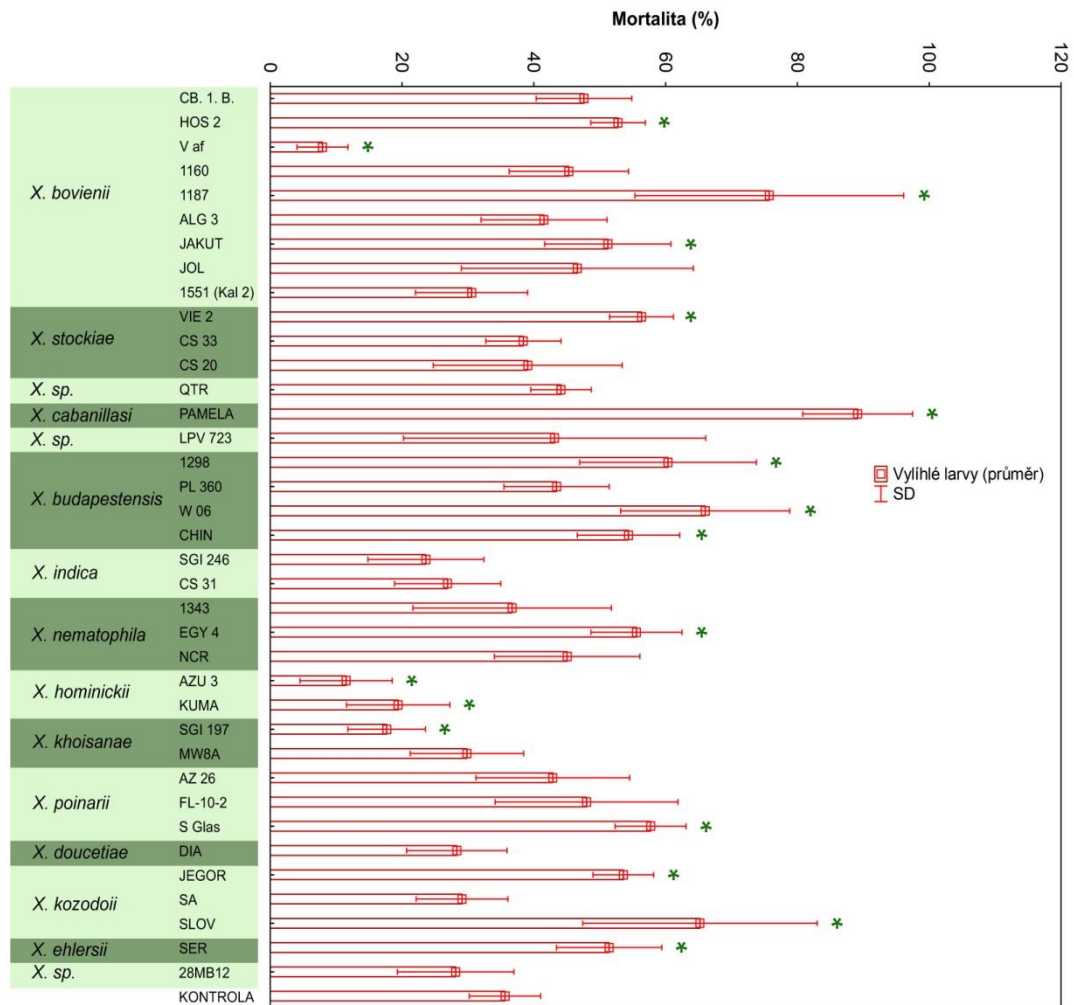
5.2.2 Mortalita

Mortalita hlístic *O. myriophila* a *C. elegans* se včetně kontroly (35,2% *O. myriophila*; 62,8% *C. elegans*) průkazně lišila ($F = 98,914$; $p < 0,00$), přičemž větší úmrtnost byla pozorována u *C. elegans* (graf 7 a 8). Mortalita obou druhů hlístic se také průkazně lišila v závislosti na kmeni symbiotických bakterií EPN, ze kterých byl konkrétní supernatant získán ($F = 54,098$; $p < 0,00$).

U většiny interakcí hlístic *O. myriophila* s bakteriálními supernatanty nebyl pozorován průkazný rozdíl oproti kontrole. U převážné části významně odlišných pozorování však byla mortalita ve srovnání s kontrolou podstatně vyšší.

Průkazně nejvyšší mortalita *O. myriophila* byla zaznamenána v supernatantu kmene *X. cabanillasii* PAMELA (89,3 %; $p = 0,000036$). Průkazná vysoká úmrtnost *O. myriophila* byla zjištěna i v supernatantech tří kmenů *X. budapestensis* (W 06 63,6 %, $p = 0,000036$; 1298 50,9 %, $p = 0,000036$ a CHIN $p = 0,0003$) a v supernatantu kmene *X. ehlersii* SER (51,5 %; $p = 0,123$). Průkazně vyšší úmrtnost hlístic byla pozorována také u supernatantů dvou kmenů druhu *X. kozodoii* (SLOV 60,2 %, $p = 0,000036$; JEGOR 53,5 %, $p = 0,001$) a dále u supernatantů kmenů *X. stockiae* VIE 2 ($p = 0,000049$), *X. nematophila* EGY 4 ($p = 0,000077$) a *X. poinarii* S Glas 58,4 %; $p = 0,000037$).

Průkazně rozdílné působení jednotlivých kmenů jednoho druhu bakterií na *O. myriophila* byl pozorován u *X. bovienii*, kde byla u supernatantů kmenů 1187 (76,8 %; $p = 0,000036$), HOS 2 ($p = 0,0029$) a JAKUT ($p = 0,143$) zaznamenána vyšší úmrtnost, u supernatantu *X. bovienii* V af však byla mortalita *O. myriophila* průkazně nejnižší (8,2 %; $p = 0,000036$). Průkazně nižší míra úmrtnosti byla zaznamenána i v supernatantu kmene *X. indica* SGI 197 (18,3 %; $p = 0,0051$) a u supernatantů obou kmenů druhu *X. hominickii* (AZU 3 11,2 %, $p = 0,000038$; KUMA 19,7 %, $p = 0,0296$).

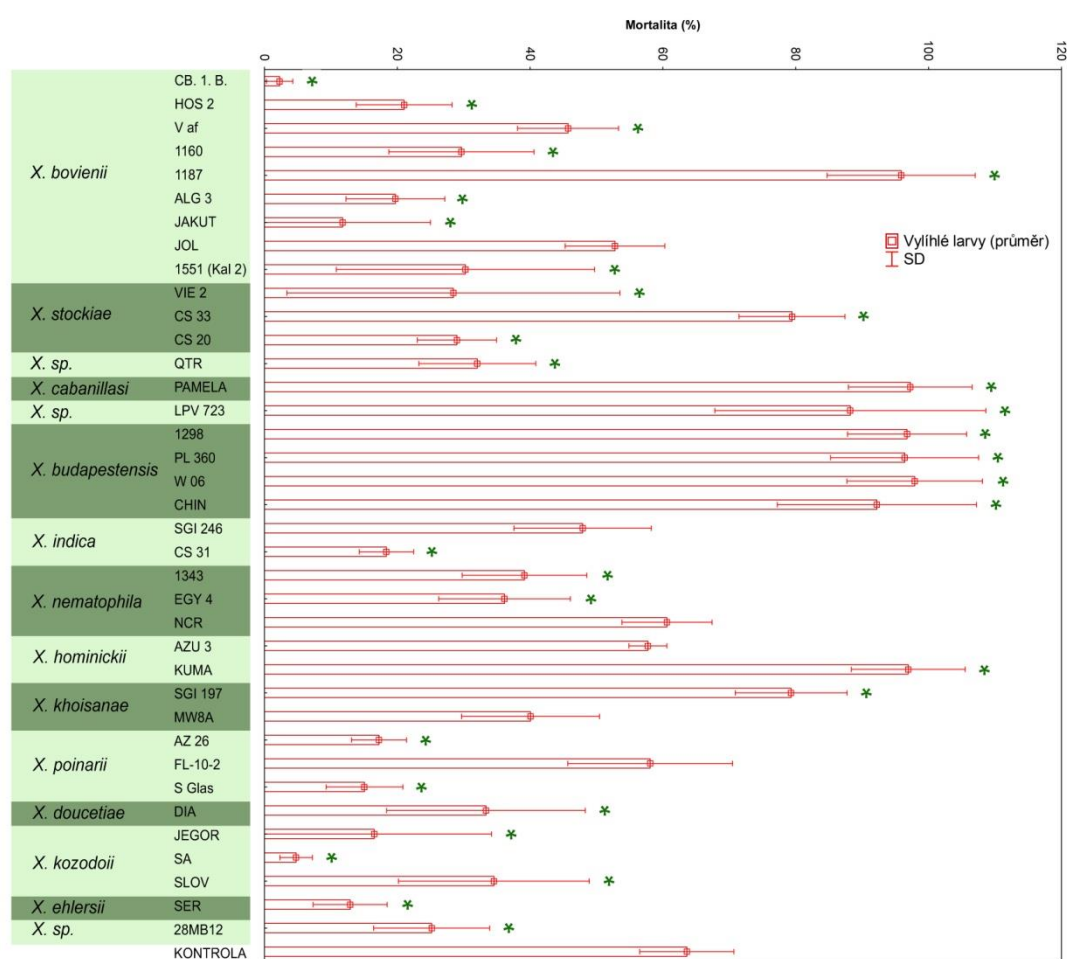


Graf 7: Průměrná mortalita (\pm směrodatná odchylka) hlístic *O. myriophila* při interakci se supernatanty kmenů bakterií rodu *Xenorhabdus*
Pozn. Statisticky významná pozorování jsou označena hvězdičkou.

U většiny případů působení bakteriálních supernatantů na hlístice *C. elegans* nebyla pozorována průkazná odlišnost od kontroly. Současně byla u převážné části statisticky významných zjištění zaznamenána nižší mortalita *C. elegans* než v kontrole.

Průkazně velmi vysoká mortalita hlístic *C. elegans* byla pozorována u supernatantů *X. cabanillasii* PAMELA (95,9 %; $p = 0,00036$), *X. sp.* LPV 723 (87,5 %, $p = 0,000036$) a supernatantů všech kmenů *X. budapestensis* (1298 96,3 %; PL 360 95,9 %; CHIN 92,2 %, $p = 0,000036$). Zde byla průkazně nejvyšší úmrtnost *C. elegans* pozorována v supernatantu *X. budapestensis* W 06 (97,9 %; $p = 0,000036$). Obdobě byla průkazně vysoká mortalita *C. elegans* zjištěna

u supernatantů kmenů *X. hominickii* KUMA (96,8 %; $p = 0,000036$) a *X. khoisanae* SGI 197 (78,8 %, $p = 0,000036$). Průkazně vyšší úmrtnost byla také zaznamenána při interakci *C. elegans* se supernatantem kmene *X. stockiae* CS 33 (79,7 %; $p = 0,0022$), zatímco v supernatantech ostatních kmenů tohoto druhu *X. stockiae* byla mortalita *C. elegans* průkazně nižší (VIE 2 a CS 20 $p = 0,000036$). Podobně byla průkazně značně vysoká úmrtnost *C. elegans* pozorována v supernatantu kmene *X. bovienii* 1187 (95,9 %; $p = 0,000036$) a průkazně velmi nízká mortalita v supernatantu CB.1.B (3,3 %; $p = 0,000036$).



Graf 8: Průměrná mortalita (\pm směrodatná odchylka) hlístic *C. elegans* při interakci se supernatanty kmenů bakterií rodu *Xenorhabdus*

Pozn. Statisticky významná pozorování jsou označena hvězdičkou.

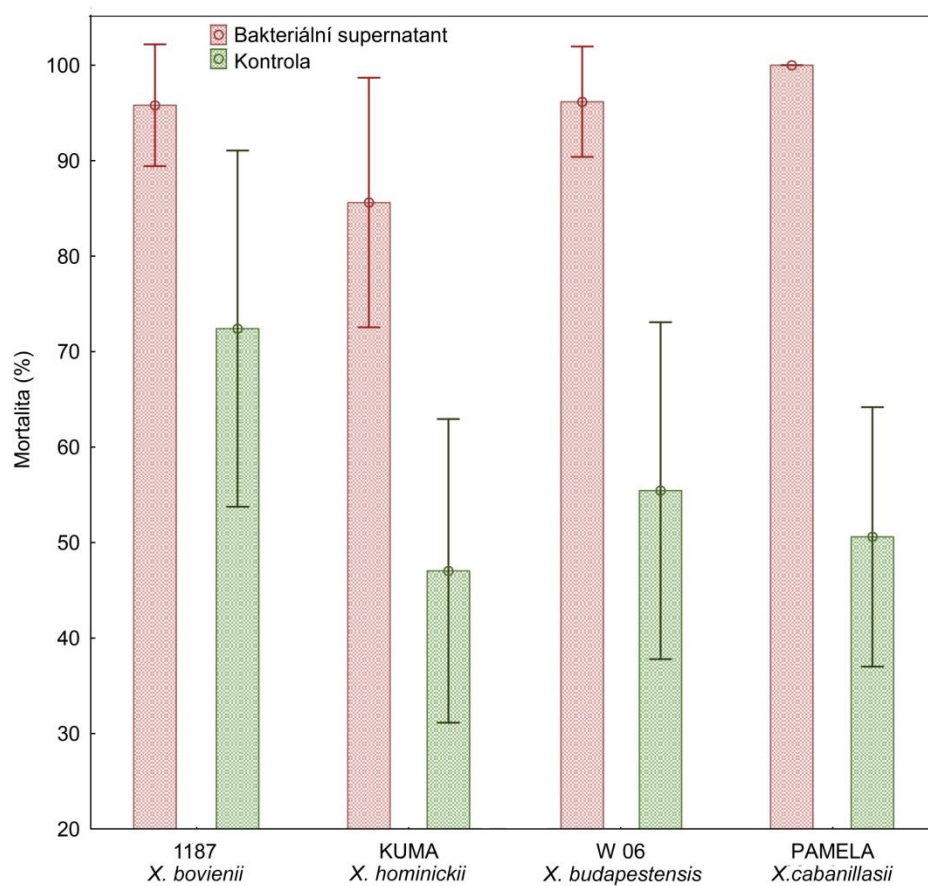
Průkazně nižší mortalita *C. elegans* byla také zjištěna u supernatantů kmenů *X. bovienii* JAKUT (11,2 %), *X. bovienii* ALG 3 (19,6 %) a *X. bovienii* HOS 2

(20,9 %) ($p = 0,000036$). Stejně tak byla průkazně nižší míra úmrtnosti *C. elegans* zaznamenána v supernatantech kmenů druhu *X. nematophila* (1343 $p = 0,000045$; EGY 4 $p = 0,000036$) a také v supernatantech *X. poinarii* S Glas (14,9 %), *X. poinarii* AZ 26 (17,1 %), *X. ehlersii* SER (13,2 %), *X. sp.* QTR, *X. doucetiae* DIA a *X. sp.* 28MB12 ($p = 0,000036$). Průkazná celkově nízká mortalita *C. elegans* byla zjištěna při interakci se supernatanty všech kmenů druhu *X. kozodoii* ($p = 0,000036$), kde byla průkazně nejnižší úmrtnost *C. elegans* pozorována u supernatantu kmene *X. kozodoii* SA (4,6 %).

5.3 Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání *G. rostochiensis*

Úmrtnost hlístic *G. rostochiensis* byla statisticky významně ovlivněna kmeny symbiotických bakterií EPN, ze kterých byly jednotlivé supernatanty získány ($F = 8,416$; $p < 0,00$). Ve všech případech byla mortalita *G. rostochiensis* vyšší než příslušná kontrola (graf 8).

Průkazně nejvyšší a zároveň absolutní mortalita *G. rostochiensis* byla pozorována u supernatantu *X. cabanillasii* PAMELA (100 %; $p = 0,000118$). Výrazná odlišnost od kontroly a také průkazně velmi vysoká úmrtnost *G. rostochiensis* byla zaznamenána i v supernatantu kmene *X. budapestensis* W 06 (96,5 %; $p = 0,000118$). Stejně tak byla průkazně vysoká mortalita pozorována u supernatantu kmene *X. bovienii* 1187 (95,8 %; $p = 0,00015$), u kterého však byl nejmenší průkazný rozdíl oproti kontrole (72,6 %). Mortalita *G. rostochiensis* byla v supernatantu *X. hominickii* KUMA také průkazně vyšší než v kontrole ($p = 0,000118$), oproti kmenům ostatním však byla jak v kontrole (48,2 %), tak v supernatantu (85,8 %) nižší (graf 8).



Graf 8: Průměrná mortalita (\pm směrodatná odchylka) hlístic *G. rostochiensis* při interakci s vybranými supernatanty kmenů bakterií rodu *Xenorhabdus*

6 DISKUZE

Schopnost entomopatogenních hlístic čeledi Steinernematidae velmi rychle usmrtit hostitele je dána přítomností symbiotických bakterií rodu *Xenorhabdus*, které produkují široké spektrum toxických látek s insekticidní a antibiotickou aktivitou (Forst a Neilson, 1996). Poprvé byla možná toxicita bakterií vůči hmyzu naznačena Dutkym (1959), samotnou chemickou podstatu a konkrétní působení některých metabolických produktů však popsali ve své práci až Paul *et al.* (1981). V průběhu dalších desetiletí bylo objeveno a charakterizováno velké množství dalších bakteriálních metabolitů, které jsou nyní na základě své struktury a konkrétních vlastností rozděleny do osmnácti tříd. Ve vztahu bakterií k hmyzu je patrně nejvýznamnější skupina metabolitů, obsahující ve svém řetězci indolovou skupinu. Tyto látky totiž v infikovaném jedinci blokuje produkci enzymů fosfolipáz, částečně regulujících produkci eikosanoidů, které jsou zodpovědné za vrozenou imunitní odpověď (Dreyer *et al.*, 2018). Existence eikosanoidů je však známá i u jiných bezobratlých organismů, hlístice nevyjímaje. Avšak na rozdíl od hmyzu zajišťují u hlístic tyto sloučeniny především reprodukční funkce, což také bylo dokázáno u *C. elegans* (Watts, 2014). Řada bakteriálních metabolitů ovšem disponuje i intenzivními antimikrobiálními a cytotoxickými účinky. Produkce konkrétních metabolitů se specifickým účinkem je však vždy vázána na určitý kmen bakterií rodu *Xenorhabdus* (Dreyer, 2018). Na základě této skutečnosti je tedy možné předpokládat rozdílné působení jednotlivých kmenů v rámci jednoho bakteriálního druhu na cílový organismus. Tato variabilita v účinku bakteriálních kmenů na testované druhy hlístic je jasně patrná již ze samotného grafického zpracování výsledků provedených experimentů, které je uvedeno v předchozí kapitole. Konkrétní metabolické produkty použitých kmenů bakterií však nebyly nijak blíže charakterizovány. Účel práce spíše spočíval v odhalení možného toxického působení jednotlivých kmenů bakterií, které jsou společně se svými symbiotickými hlísticemi uloženy ve sbírkách Laboratoře entomopatogenních hlístic (Entomologický ústav, BC AV ČR). Výsledky provedených pokusů tedy slouží zejména k výběru vhodných zástupců druhů bakterií rodu *Xenorhabdus* pro další výzkum.

Před použitím v provedených pokusech nebyly hlístice *O. myriophila* a *C. elegans* povrchově sterilizovány. Proces sterilizace by totiž mohl, jakožto stresový faktor, negativně ovlivnit životaschopnost cílových druhů hlístic a zároveň

by znemožnil srovnání jednotlivých interakcí hlístic a bakterií s kontrolou. Sterilizací hlístic použitých v kontrole by totiž byly odstraněny i bakterie, které jim při běžné kultivaci slouží jako potrava. V kontrolách prostých jakýchkoli bakterií by bylo množení obou druhů hlístic zcela znemožněno. Jedinci *O. myriophila* tak do experimentu vstupovaly i se směsí různých bakterií přirozeně přítomných na jejich kutikule, s hlísticemi *C. elegans* byla na pokusné misky přenesena i jejich živná bakterie *E. coli*. Tento fakt také naznačuje různé úrovně či cíle působení metabolitů bakterií rodu *Xenorhabdus*. Metabolické produkty tedy mohly mít buď přímo nematicidní účinek, nebo také mohly inhibovat aktivitu výše zmíněných přítomných bakterií a jejich prostřednictvím tak ovlivnit i cílovou hlístici. Samozřejmě nelze vyloučit ani smíšené působení bakterií a jejich toxinů, tedy přímý vliv jak na přenesené bakterie, tak na cílové druhy hlístic. Zároveň však nemusely být bakteriální metabolity toxické ani pro jeden z výše jmenovaných organismů. Přítomnost takových nepatogenních bakterií znamená pro hlístice další zdroj potravy a podpoří tedy jejich růst a vývoj.

Mortalita cílových druhů hlístic byla hodnocena pouze z hlediska odlišnosti od kontroly, ve které hlístice také přirozeně umíraly. Pro posouzení účinnosti použitých kmenů bakterií jsou tedy významná především taková pozorování, ve kterých mortalita cílových hlístic průkazně překročila hranici přirozené úmrtnosti. Snížená mortalita oproti kontrole tak může znamenat i pouhý fakt, že přítomný kmen bakterií rodu *Xenorhabdus* hlístice v růstu nijak nepodporuje. V případě bakteriálních supernatantů, ve kterých nebyly přítomny živé bakteriální buňky, můžeme možný podpůrný efekt bakterií rodu *Xenorhabdus* zcela vyloučit. Zároveň je zde možné ověřit stálost toxického účinku metabolických produktů, neboť všechny použité supernatanty prošly sterilizačním procesem v autoklávu. Účel tohoto experimentu tedy spočívá v odhalení čisté, bakteriální buňkou neovlivněné účinnosti metabolitů na cílové druhy hlístic a ověření jejich stability.

Testování vlivu bakteriálních kultur na přežívání a reprodukci O. myriophila a C. elegans

Z výsledků uvedených v předchozí kapitole je jasně patrný vliv některých kmenů bakterií rodu *Xenorhabdus* jak na *O. myriophila*, tak na *C. elegans*. Obecně však lze říci, že byli přítomností bakterií více ovlivněni jedinci *C. elegans*. U tohoto

druhu hlístic totiž byla pozorována podstatně vyšší mortalita, než u *O. myriophila*. Tento fakt může být vysvětlen obecně vyšší náchylností hlístic *C. elegans* k působení různých bakterií (Darby, 2005; Couillaut a Ewbank, 2012) a dále také jejich nižší přizpůsobivostí nepříznivým podmínkám jakožto laboratorního organismu.

Jasnou výjimku zde však představují kmeny *X. bovienii* HOS 2, *X. nematophila* NCR a *X. poinarii* FL-10-2, které na úmrtnost *C. elegans* nijak nepůsobily. Nicméně měly, na rozdíl od všech ostatních, statisticky významných pozorování, výrazný vliv na vyšší produkci potomstva této hlístice. Vysvětlení pro tuto skutečnost se zcela nejjasněji nabízí u *X. poinarii* FL-10-2. Druh *X. poinarii*, jak také naznačují výsledky práce Ogiera *et al.* (2014), totiž nevykazuje přílišnou toxicitu vůči jiným organismům. Obecně je totiž genom *X. poinarii*, oproti například vysoce toxickým druhům *X. bovienii* a *X. nematophila*, poměrně redukovaný. Nízká toxicita *X. poinarii* tedy může být zapříčiněna absencí některých genů, které kódují produkci látek s negativním účinkem na jiné organismy. Své výsledky Ogier *et al.* (2014) potvrzují testem patogenity, v jehož závěrech je *X. poinarii* AZ 26 uveden jako kmen striktně nepatogenní vůči hmyzu. Schopnost tohoto kmene produkovat jisté toxické látky však byla pozorovatelná v prvním pokusu praktické části mé práce, kde byla za přítomnosti bakterií *X. poinarii* AZ 26 snížena produkce potomstva *O. myriophila* (graf 1). Tvrzení Ogiera *et al.* (2014) však není možné zcela popřít. Kmeny bakterií rodu *Xenorhabdus* se totiž v produkci konkrétních látek se specifickým účinkem navzájem značně liší. Proto je možné u *X. poinarii* AZ 26 uvažovat o produkci nematicidních látek, zatímco syntéza látek insekticidních zde může být potlačena právě z důvodu již zmíněných změn v genomu bakterie. Blíže nespecifikované a pravděpodobně přítomné nematicidní látky by tedy mohly do jisté míry ovlivnit i produkci potomstva *O. myriophila*. Zvýšená produkce potomstva *C. elegans* za přítomnosti *X. bovienii* HOS 2 a *X. nematophila* NCR je však vysvětlitelná jedině nízkou nebo vůbec žádnou toxickou aktivitou metabolitů těchto kmenů. V podstatě je možné říci, že bakteriální buňky *X. bovienii* HOS 2 a *X. nematophila* NCR sloužily bakteriofágní hlístici *C. elegans* jako zdroj potravy.

Poměrně zvláštní bylo také působení bakteriálních kmenů *X. bovienii* 1160 a 1187 na *O. myriophila*. Ačkoliv oba kmeny nijak neovlivnily produkci potomstva tohoto druhu hlístic, mělo jejich působení za následek značné zvýšení mortality *O. myriophila*. Mezi jednotlivými kmeny druhu *X. bovienii* byla, oproti ostatním druhům zaznamenána naprosto největší variabilita v účinku na cílové druhy.

Značnou toxicitu lze přisoudit kmeni *X. bovienii* CB.1.B., který zapříčinil vysokou mortalitu obou cílových druhů hlístic a také nízkou produkci potomstva *O. myriophila*. Bakterie *X. bovienii* CB.1.B. byl pro účely této práce izolován z hlístice *S. affine*. Přítomnost tohoto konkrétního bakteriálního kmene jako symbionta *S. affine* by tak mohla zajistit konkurenční převahu této hlístice při vzájemné kompetici s *O. myriophila* o mrtvé tělo hostitele.

Ještě větší toxický účinek byl pozorován u kmene *X. bovienii* JAKUT, který svým působením inhiboval množení a zároveň způsobil vysokou mortalitu jak *O. myriophila*, tak i *C. elegans*. Symbiotickým vztahem s tímto kmenem bakterií by mohla hlístice *S. felitae*, podobně jako *S. affine* s *X. bovienii* CB.1.B, získat zcela jistou výhodu při kompetici s *O. myriophila*.

Naprosto nejvýrazněji byly hlístice *O. myriophila* i *C. elegans* ovlivněny přítomností kmene *X. cabanillasii* PAMELA. U obou druhů hlístic byla následkem působení tohoto kmene snížena produkce potomstva, u *C. elegans* bylo pozorováno i značné zvýšení mortality. Úmrtnost *O. myriophila* zde však byla velmi nízká, což nejspíše naznačuje opravdu velmi malé množství nově vylíhlých larev. Metabolity druhu *X. cabanillasii* jsou známy jako vysoce toxické sloučeniny. Všechny prozatím popsané látky, tedy cabanillasin, nemaucin i rhabdopeptidy disponují cytotoxickou i antimikrobiální aktivitou (Dreyer *et al.*, 2018). Cytotoxicita těchto metabolických produktů spočívá v přímém degradabilním působení na buňky hladké svaloviny. U rhabdopeptidů byl prokázán mírný negativní účinek dokonce i na svalové buňky krysy (Reimer *et al.*, 2013). Právě pro tuto skutečnost lze předpokládat naprosto destruktivní působení těchto látek na hladkou svalovinu hlístic. Poslední a pravděpodobně i nejtoxičtější nemaucin byl pro své stabilizační působení na Gram-negativní i Gram-pozitivní antibiotikům rezistentní bakterie (např. G- *E. coli*, G+ *Staphylococcus aureus*) a také kvůli inhibičnímu vlivu na nekontrolovatelné množení lidských rakovinných buněk v roce 2012 patentován (Gualtieri *et al.*, 2012). Na základě výsledků pokusu i výše uvedených skutečností lze vysokou toxicitu *X. cabanillasii* vůči hlísticím zcela bezpečně potvrdit.

Látky strukturně velmi podobné nemaucinu, takzvané fabclaviny, jsou produkovány zástupci druhu *X. budapestensis*. Z tohoto důvodu tedy bylo možné předpokládat vysoké negativní působení kmenů tohoto druhu bakterií na zkoumané druhy hlístic. Fabclaviny vykazují především antibakteriální účinek, a to jak proti Gram-negativním, tak Gram-pozitivním bakteriím. Stejná účinnost je přisuzována

také metabolitům ze skupiny bicornutinů (Dreyer *et al.*, 2018). Antibakteriální působení těchto látek by mohlo mít negativní dopad na bakterie *E. coli*, tedy zdroj potravy bakteriofágní *C. elegans*. Snížená vitalita tohoto druhu hlístic tak mohla být zapříčiněna právě usmrčením bakteriálních buněk *E. coli*, nebo pouhou nevhodností bakterií kmenů *X.budapestensis* jako substrátu pro množení a růst *C. elegans*.

Výjimku, související s již několikrát zmiňovanou variabilitou mezi kmeny bakterií rodu *Xenorhabdus* zde představuje kmen *X. budapestensis* 1298, který reprodukci ani mortalitu *C. elegans* nijak neovlivnil. Oproti rozdílnému vlivu jednotlivých kmenů *X. budapestensis* na *C. elegans* však bylo přežívání i úmrtnost *O. myriophila* ovlivněno všemi kmeny tohoto druhu bakterie. Nastalou situaci je možné odůvodnit například synergickým efektem fabclavinů s dalšími antibiotickými látkami (Fusch *et al.*, 2014), k jejichž kombinaci by mohly být hlístice *O. myriophila* více citlivé než *C. elegans*. Podobných vysvětlení by se zcela jistě mohlo najít více, a to například kvůli prozatímni nedostatečné znalosti metabolitů dočasně označených GP-19 a EP-20, u kterých byla v několika případech prokázána cytotoxická aktivita (Dreyer *et al.*, 2018).

Výrazné odlišnosti mezi jednotlivými kmeny byly pozorovány například také u *X. nematophila*. Naprosto netoxické působení zde totiž bylo zaznamenáno u *X. nematophila* NCR, zatímco další kmeny, tedy *X. nematophila* 1343 a EGY 4, prokázaly vyšší toxicitu zejména vůči *C. elegans*. Bakterie těchto kmenů totiž zapříčinily i vyšší mortalitu tohoto druhu hlístic. Úmrtnost *O. myriophila* však těmito kmeny ovlivněna nebyla. Tento fakt by mohl podobně jako u *X. budapestensis* souviset s větším zastoupením metabolitů s antibakteriálním účinkem v celkovém spektru toxických látek přirozeně produkovaných *X. nematophila*. Tyto metabolické produkty by tedy mohly mít inhibiční vliv na bakterie *E. coli*.

Podobné rozdíly v působení byly také zaznamenány u kmenů *X. indica*, *X. hominickii* a *X. khoisanae*. Park *et al.* (2017) ve své práci popisuje vysokou insekticidní aktivitu kmene *X. hominickii* ANU101. Toxické metabolity produkované tímto kmenem vykazují striktní cytotoxické působení, které spočívá v narušení turgoru a destrukci epiteliálních buněk hostitele. Tyto toxiny by tedy mohly být produkovány i jiným kmenem druhu *X. hominickii* a způsobit stejné poškození i na buňkách kutikuly hlístic. Látky s obdobně cytotoxickou aktivitou, označované jako taxlllaidy jsou tvořeny a vylučovány také bakteriemi *X. indica* (Dreyer *et al.*, 2018). Následkem působení všech kmenů *X. indica* a *X. hominickii* byla výrazně

snížena produkce potomstva *O. myriophila*, množení *C. elegans* však bylo inhibováno pouze v případě kmenů *X. indica* CS 31 a *X. hominickii* KUMA. Naproti tomu kmeny *X. indica* SGI 246 a *X. hominickii* AZU 3 reprodukci *C. elegans* vůbec neovlivnily. Vyšší vliv na produkci potomstva *O. myriophila* by mohl být spojen s větší labilitou kutikuly larev *O. myriophila*. Kutikula hlístic *C. elegans* je totiž silnější a členitější i v prvním larválním stadiu vývoje (Wolkow a Hall, 2011).

Jak je také patrné z výsledků experimentu, vysoká toxicita bakterií vůči oběma cílovým druhům hlístic byla prokázána pouze u kmenů *X. bovienii* JAKUT a *X. cabanillasii* PAMELA.

Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání a reprodukci O. myriophila a C. elegans

Pro zhodnocení celkové toxicity bakteriálních metabolitů, jejich uchovávání a případné další využití je bezpochyby velmi důležitá jejich stálost. Tvorba a exkrece zplodin metabolismu je totiž závislá na aktivní činnosti bakteriální buňky. Jejím usmrčením je produkce metabolitů zastavena. Toxicita dané látky se tak již neodvívá od její případné vysoké koncentrace, která je konstantním průběhem metabolického procesu bakterií neustále zvyšována, ale spíše od její chemické podstaty a vlastní reaktivity. Ověření stability toxického účinku testovaných kmenů bakterií rodu *Xenorhabdus* bylo zajištěno sterilizací bakteriální suspenze v autoklávu. Zároveň lze kvůli nepřítomnosti živých bakteriálních buněk vyloučit možnost, že by bakterie sloužily hlísticím jako potrava a podporovaly tak jejich růst. Celkově vyšší průměrná mortalita obou druhů hlístic může oproti předchozímu pokusu mít příčinu i v obecně nižší úživnosti YS media. Na rozdíl od Woutsova agaru, ve kterém je hlavní složkou výživný bujón, je hlavní komponentou YS media na organické živiny chudší kvasnicový extrakt. Složení obou kultivačních médií je uvedeno v kapitolách 4.2 a 4.3. Nižší mortalita hlístic na Woutsově agaru by zcela jistě mohla souviset i s faktem, že zde bylo přítomno mnohem více bakteriálních buněk. Pokud by tyto bakterie nevykazovaly žádné toxické působení vůči hlísticím, sloužily by jim jako potrava a tak by v podstatě mohly růst a vývoj hlístic do jisté míry podpořit.

Podstatný rozdíl oproti předchozímu pokusu je patrný při porovnání produkce potomstva a mortality *C. elegans*. Na Woutsově agaru vykazovaly jednotlivé kmeny bakterií spíše konzistentní působení na oba zkoumané znaky, tedy sníženou produkci

potomstva a zvýšenou mortalitu. V případě supernatantů však byla u některých kmenů, především těch, které nevykazovaly žádné toxické působení vůči *C. elegans* na Woutsově agaru, zaznamenána intenzita množení srovnatelná s kontrolou a velmi nízká úmrtnost. Jednalo se zejména o všechny kmeny druhu *X. kozodoii* a dále o kmeny *X. poinarii* AZ-26 a S Glas. Druh *X. kozodoii* je podobně jako *X. nematophila* znám produkcí indolových, velmi toxických látek skupiny xenocoumacinů (Reimer *et al.*, 2009). Na rozdíl od *X. nematophila* je jich u bakterií *X. kozodoii* syntetizováno mnohem méně a také v mnohem menší míře. Od této skutečnosti se tedy pravděpodobně odvíjí obecně nižší toxicita metabolitů *X. kozodoii*. Jako méně toxický druh bakterií bychom mohli z některých, již výše uvedených důvodů v kapitole 6. 1, označit i *X. poinarii*. Velmi nízká mortalita a poměrně stabilní produkce potomstva *C. elegans* (ve srovnání s kontrolou) i v živinami chudším YS mediu tedy dovoluje uvést domněnku, že bakteriální supernatanty podpořily růst *E. coli* a tím tedy i *C. elegans*.

Toto vysvětlení se zdá být platné i pro kmen *X. ehlersii* SER. Bakteriální suspenze *X. ehlersii* SER vysterilizovaná v autoklávu, vykazuje podle Fodora *et al.* (2010) jen velmi nízkou antibiotickou aktivitu. Vysoká teplota i tlak v autoklávu tedy mohly poškodit strukturu metabolických produktů tohoto kmene bakterií a tím také eliminovat jejich aktivitu. V supernatantu *X. ehlersii* SER tedy byla zaznamenána velmi vysoká produkce potomstva *C. elegans*. Výsledek studie Fodora *et al.* (2010) však nelze zcela zobecnit. Je nutné jej vztahovat pouze k jimi použitému kmenu druhu *X. ehlersii* (*X. ehlersii* DSM 16337), neboť supernatant *X. ehlersii* SER vykazuje i jisté toxické působení v podobě zvýšené mortality *O. myriophila*. Stejně tak je možné pozorovat zvýšenou toxicitu supernatantu *X. poinarii* S Glas a *X. kozodoii* SLOV vůči *O. myriophila*. Toto zjištění je ve vztahu k uváděné menší velikosti genomu (Ogier *et al.*, 2014; Tobias *et al.*, 2017) a snížené toxicitě *X. poinarii* i *X. kozodoii* zajímavé. Odůvodnění pro tuto skutečnost, která je tedy zcela v rozporu s působením zmiňovaných kmenů na *C. elegans*, se nabízí jedině v možné vyšší citlivosti *O. myriophila* na látky produkované výše zmíněnými kmeny bakterií.

Stejně zdůvodnění, tedy mrtvé bakteriální buňky sloužící jako zdroj potravy *C. elegans* a degradace metabolických látek, by mohlo být uvedeno i pro nízkou aktivitu supernatantů *X. bovienii* CB.1.B., ALG 3, V af a zejména pro *X. bovienii* HOS2, který na hlístice *C. elegans* působil velmi podobně i v pokusu na Woutsově

agaru. Obdobným způsobem by bylo možné vysvětlit i překvapivě velmi nízkou toxicitu *X. bovienii* JAKUT a *X. nematophila* EGY 4 vůči *C. elegans*. Oba tyto kmeny však vykazovaly poměrně podobnou toxicitu proti *O. myriophila* jako v předchozím pokusu. U těchto kmenů tedy nelze předpokládat absolutní degradaci toxických látek, spíše je zde možné uvažovat o možných změnách struktury a tím i toxicity za působení vysokých teplot či tlaku v autoklávu. Je však nutné zdůraznit, že oba jmenované kmeny vykazují stabilní negativní účinek na *O. myriophila* i po sterilizačním procesu. Ověřená vysoká stálost v působení metabolitů *X. bovienii* JAKUT a *X. nematophila* EGY 4 na *O. myriophila* by tedy mohla zajistit symbiotickým hlísticím těchto kmenů bakterií (*S. feltiae* a *S. carpocapsae*) konkurenční výhodu v kompetici s hlísticemi rodu *Oscheius*.

Stálost bakteriálních metabolitů po sterilizačním procesu v autoklávu a jejich toxické působení na oba druhy hlístic bylo zaznamenáno u *X. cabanillasii* PAMELA. Kmeny druhu *X. cabanillasii* jsou známy produkcí již zmíněného, vysoce toxického nemaucinu. Stabilita této látky pravděpodobně souvisí i s její cyklickou strukturou.

Podobně stabilní působení, hodnoceno z hlediska stejného působení bakterií na hlístice v agaru a supernatantu, bylo pozorováno i u kmenů *X. sp.* LPV 723 a *X. sp.* QTR. Oba kmeny se sice v případě působení na úmrtnost *O. myriophila* nelišily od kontroly, nicméně u nich byla pozorována výrazně snížená produkce potomstva tohoto druhu hlístic. Jelikož nebyl žádný z metabolitů těchto kmenů doposud blíže charakterizován a zároveň také není známá jejich příslušnost ke konkrétnímu druhu, nemůže zde být mechanismus jejich účinku ani blíže specifikován. Vzhledem k tomu, že oba kmeny neměly žádný vliv mortalitu, ale zapříčinily nižší produkci potomstva, je možné uvažovat o přítomnosti stabilnějších, cyklických indolových sloučenin, které mohou negativně ovlivňovat reprodukci hlístic (Watts, 2014). Ačkoliv se na životaschopnosti *C. elegans* negativně podepsalo působení obou výše uvedených druhů, vyšší toxicitu vůči tomuto druhu hlístic vykazoval kmen *X. sp.* QTR. V jeho přítomnosti totiž byla pozorována snížená produkce potomstva i mortalita tohoto druhu hlístic, a to v obou pokusech. Z výše uvedených skutečností vyplývá, že by další výzkum, týkající se zařazení těchto kmenů ke konkrétnímu druhu, včetně charakteristiky jejich metabolitů, jistě mohl být velmi přínosný.

Vysokou stálost toxicity metabolitů vůči oběma druhům hlístic bylo také možné pozorovat u kmenů *X. budapestensis* W 06 a CHIN. Stejný výsledek, tedy

zachování toxické aktivity metabolitů *X. budapestensis*, ve své práci dokládají i Böszörményi *et al.* (2009) a Fodor *et al.* (2010). Zajímavým zjištěním zde byl zcela jasný toxický účinek supernatantu kmene *X. budapestensis* 1298. V předchozím pokusu tento kmen bakterií totiž na oba cílové druhy hlístic nijak negativně nepůsobil. Vysvětlení pro tento jev se nejpravděpodobněji nabízí v antibakteriálním účinku metabolitů produkovaných *X. budapestensis* 1298. Na Woutsově agaru byly bakterie a tím i jimi produkované látky nepravidelně rozmístěny, proto zde mohly na bakteriemi nepokryté ploše lépe růst i bakteriální buňky *E. coli*. V supernatantu jsou však toxické látky rozptýleny v celém objemu, proto je zde možné předpokládat vyšší toxicitu metabolitů *X. budapestensis* 1298 vůči *E. coli* a tím i vůči *C. elegans*. Jelikož mají všechny doposud známé a popsané metabolické produkty *X. budapestensis* lineární strukturu, je možné zvýšení toxicity *X. budapestensis* 1298 přisoudit jiným metabolickým produktům, které prozatím nebyly objeveny, nebo látkám již známým, které však doposud nebyly blíže charakterizovány.

Poměrně překvapivé je i vysoce negativní působení supernatantu kmene *X. doucetiae* DIA na reprodukci i přežívání *C. elegans*. Podle Tobiase *et al.* (2017) má druh *X. doucetiae* podobně jako *X. poinarii* redukovanou délku genomu. Zkrácení určitých úseků a absence některých genů pro produkci toxických látek však nemusí být u *X. doucetiae* tolik výrazné jako u *X. poinarii*, což také potvrzují sami autoři této studie. Jako příklad pro odůvodnění této skutečnosti uvádějí kmen *X. doucetiae* FRM, který je i přes svou blízkou fylogenetickou příbuznost se zástupci druhu *X. poinarii* vysoce virulentní. Dreyer *et al.* (2018) druhu *X. doucetiae* přisuzují produkci toxických xenoamicinů a zároveň zmiňují, že ne všechny látky této skupiny vykazují stejnou toxickou aktivitu. Jedná se například o xenoamicin A, který nedisponuje téměř žádnými antimikrobiálními účinky a je poměrně slabý i ve svém cytotoxickém působení. Právě tato látka tedy může být přítomna u kmene *X. doucetiae* DIA, který na Woutsově agaru významně neovlivnil ani jeden cílový druh hlístic. Toxicita z něj získaného supernatantu však mohla být způsobena různými okolnostmi, například již zmiňovaným větším rozptýlením negativně působících látek.

Toxické působení na oba cílové druhy v supernatantu, nikoliv za přítomnosti živých bakteriálních buněk, bylo pozorováno také u *X. bovienii* 1551 (Kal 2). Bakterie *X. bovienii* jsou stejně jako některé jiné druhy rodu *Xenorhabdus* schopny produkce stabilních indolových sloučenin, takzvaných xenocycloinů. Proto se zde

znovu nabízí polemika nad rozdílným působením bakterií kmene *X. kozodoii* SLOV na *O. myriophila* a *C. elegans*. Jak totiž bylo naznačeno výše v textu, je tento kmen nejspíše také schopen tvorby indolových sloučenin. Jedním z možných závěrů je tedy vyšší náchylnost *O. myriophila* k působení indolových látek. Jako možné potvrzení této domněnky lze uvést i vyšší negativní vliv supernatantů *X. nematophila* EGY 4 a *X. khoisanae* MW8A na hlístice *O. myriophila*.

Nejpodstatnějším výsledkem tohoto pokusu je především odhalení stabilních metabolických produktů některých kmenů rodu *Xenorhabdus*. Shodný účinek toxických metabolitů jednotlivých kmenů tohoto rodu na oba cílové druhy hlístic byl však obou experimentů patrný pouze u *X. cabanillasii* PAMELA.

Zhodnocení vlivu supernatantu z kultur různých bakterií na přežívání

G. rostochiensis

Účinnost některých druhů entomopatogenních hlístic jako regulátorů četnosti populace *G. rostochiensis* již byla ověřena Perrym *et al.* (1998) i López-Roblesem a Haguem (2001). V obou pracích však nalezneme pouze využití hlístic *S. feltiae* a *S. carpocapsae*, ačkoliv byla pro regulaci například kořenového háďátka *Meloidogyne japonica* s úspěchem použita i hlístice *S. riobrave* (Gouge *et al.*, 1994). V případech využití entomopatogenních hlístic pro regulaci *G. rostochiensis* byly hlístice vždy aplikovány přímo do půdy nebo pokusného substrátu. Doposud však nebyly proti *G. rostochiensis* použity sterilizované bakteriální suspenze symbiontů hlístic čeledi Steinernematidae.

Pro tento pokus totiž byly využity pouze takové supernatanty, které v předchozím experimentu vykazovaly vysokou toxicitu vůči *O. myriophila* a *C. elegans*. U všech čtyř zkoumaných bakteriálních supernatantů získaných z kmenů bakterií *X. bovienii* 1187, *X. budapestiensis* W 06, *X. hominickii* KUMA a *X. cabanillasii* PAMELA tak byla zaznamenána vysoká mortalita háďátek *G. rostochiensis*. I přes obecně nevyhovující podmínky pro přežívání *G. rostochiensis* v tekutém YS mediu byla mortalita *G. rostochiensis* v kontrolách s čistým mediem podstatně nižší, než v bakteriálních supernatantech. Toto zjištění tedy jasně potvrzuje jejich značný toxický účinek.

Nejvýrazněji bylo přežívání *G. rostochiensis* ovlivněno supernatantem *X. cabanillasii* PAMELA. Vysoká toxicita látek produkovaných tímto kmenem

bakterií totiž zapříčinila absolutní mortalitu háďátek *G. rostochiensis*. Nejnižší mortalita *G. rostochiensis* byla pozorována v supernatantu *X. hominickii* KUMA. Tato skutečnost odpovídá i mírnějšímu negativnímu účinku tohoto kmene bakterií na hlístice *O. myriophila* a *C. elegans*.

V současnosti je ochrana porostů brambor před škodlivým působením *G. rostochiensis* realizována spíše na úrovni preventivních pěstitelských opatření. Pro regulaci četnosti i činnosti háďátek je rovněž doporučeno hnojení porostů brambor dusíkatým vápnem nebo granulovanou močovinou (EPPO Global Database, 2019). I přesto, že byly provedeny již výše zmíněné experimenty, potvrzující efektivitu využití entomopatogenních hlístic proti *G. rostochiensis* (Perry *et al.*, 1998, López-Robles a Hague 2001), nebyly jejich výsledky nijak převedeny do praktického zemědělství. Tato skutečnost má nejpravděpodobnější příčinu v poměrně nákladné aplikaci a nejistém přetrvání entomopatogenních hlístic v půdě. Problém s aplikací živých hlístic, jejich skladováním a dalšími nesnáze by mohlo alespoň do jisté míry vyřešit využití právě bakteriálních supernatantů. Jejich hlavní předností oproti živým larvám hlístic je bezpochyby snadné skladování, jednodušší aplikace a především mnohem větší stálost v účinku. Pro možné použití bakteriálních supernatantů v biologické ochraně porostů brambor proti *G. rostochiensis* je však nutné realizovat experiment, podobný zde popsanému, i v běžných polních podmínkách.

Rozmanité výsledky testování vlivu bakteriálních kultur a z nich získaných supernatantů na všechny cílové druhy hlístic by si zcela jistě zasloužily hlubší a podrobnější objasnění. Na základě schopnosti některých konkrétních druhů bakterií rodu *Xenorhabdus* produkovat velmi široké spektrum v současné době již popsaných toxických metabolitů je možné se domnívat, že i ostatní, doposud ne tolik prozkoumané druhy, disponují stejnou, ne-li ještě rozsáhlejší škálou syntetizovaných toxických látek. Nicméně ani u většiny již blíže charakterizovaných metabolických produktů není přesný mechanismus jejich účinku doposud zcela objasněn. Z těchto skutečností také vyplývá pouze hrubé naznačení možných příčin a důsledků působení jednotlivých skupin toxinů na všechny tři zkoumané druhy hlístic v této práci.

Rozvoj výzkumu metabolických produktů bakterií rodu *Xenorhabdus* by však mohl být přínosem nejen pro vědu jako takovou. Snadná kultivace bakterií, izolace žádaných látek i jejich uchovávání by mohly značně rozšířit nabídku a také

používání biologicky aktivních látek v praktickém zemědělství. Stejně tak by mohly toxické metabolity bakterií rodu *Xenorhabdus* najít své uplatnění například ve farmaceutickém průmyslu a pravděpodobně i v medicíně.

7 ZÁVĚR

- Izolace všech třiceti sedmi kmenů bakterií rodu *Xenorhabdus* i jejich kultivace v tekutém médiu byla úspěšná.
- Jednotlivé bakteriální kmeny se ve svém působení na *O. myriophila* a *C. elegans* navzájem značně lišily. Rozdíly v účinku byly pozorovány i mezi kmeny jednoho druhu.
- Hlístice *O. myriophila* a *C. elegans* reagovaly na přítomnost bakterií a jejich metabolitů rozdílně. Působením bakterií byly výrazně více ovlivněny hlístice *C. elegans* než hlístice *O. myriophila*.
- U některých testovaných kmenů bakterií byla zaznamenána vysoká toxicita vůči *O. myriophila*. Symbiotický vztah s bakteriemi těchto kmenů by pro hlístice čeledi Steinernematidae mohl znamenat jistou výhodu při kompetici s hlísticemi rodu *Oscheius*.
- Nejvýraznější negativní účinek na přežívání i reprodukci *O. myriophila* a *C. elegans* byl zaznamenán u kmenů *X. bovienii* JAKUT a *X. cabanillasii* PAMELA.
- U háďátek *G. rostochiensis* byla v prostředí všech vybraných supernatantů v důsledku toxicity bakteriálních metabolitů zaznamenána vysoká mortalita.
- Stabilní toxický vliv metabolitů na všechny tři cílové druhy hlístic byl zjištěn pouze u supernatantu *X. cabanillasii* PAMELA.

8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Adams B. J., Nguyen K. B. (2002). Taxonomy and systematics. In: Gaugler R. (ed): *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, CAB International, s. 2.
- 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. *Journal of General Microbiology*, 128: 3061 - 3065.
- Akhurst R. J., Boemare N. E. (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler R., Kaya H. K. (eds): *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, CRC Press, Inc., s. 75 - 87.
- Akhurst R. J., Smigeielski A. J., Mari J., Boemare N., Mourant R. G. (1992). Restriction analysis of phase variation in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), entomopathogenic bacteria associated with nematodes. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 469 - 473.
- Akhurst R. J., Boemare N. E. (2015). *Xenorhabdus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1 – 14. Dostupné on-line 19. 3. 2019: <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01173>
- Askary T. H., Mahfouz M. M. M., Coupland J. (2017). Beneficial nematodes in agroecosystems: a global perspection. In: Abd-Elgawad M. M. M., Askary T. H., Coupland J. (eds): *Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes*. Wallingford, CAB International, s. 3 - 25.
- Bairwa A., Venkatasalam E. P., Sudha R., Umamaheswari R., Singh B. P. (2017). Techniques for characterization and eradication of potato cyst nematode: a review. *Journal of Parasitic Diseases*, 41: 607 - 620.

- Baldwin J. G., Frisse L. M., Vida J. T., Eddelman C. D., Thomas W. K. (1997). An evolutionary framework for the study of developmental evolution in a set of nematodes related to *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8: 249 - 259.
- Banu J. G., Cannayane I., Meena K. S. (2017). Entomopathogenic nematodes: general biology and behaviour. In: Abd-Elgawad M. M., Askary T. H., Couple J. (eds): *Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes*. Wallingford, CAB International, s. 66.
- Bathon H. (1996). Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 421 - 434.
- Basyoni M. M. A., Rizk E. M. A. (2016). Nematodes ultrastructure: complex systems and processes. *Journal of Parasitic Diseases*, 40: 1130 - 1140.
- Barrière A., Félix M.-A. (2014). Isolation of *C. elegans* and related nematodes. In: WormBook (ed): *The C. elegans research community*, WormBook. Dostupné on-line 24. 3. 2019: doi/10.1895/wormbook.1.115.2, <http://www.wormbook.org>.
- Bioagens - parazitické hlístice*. (2009 - 2019). Registr přípravků na ochranu rostlin, ÚKZÚZ, Ministerstvo zemědělství. Dostupné on-line 18. 2. 2019: <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx>
- Bode E., Bode H. B., Brachmann A. O. (2011). Text S6: Secondary metabolites. In: Chatson et al.: *The entomopathogenic bacterial endosymbionts Xenorhabdus and Potorhabdus: convergent lifestyles form divergent genomes*. *PLoS One*, 6: e27909.
- Boemare N. E., Boyer-Giglio M.-H., Thaler J.-O., Akhurst R. J. (1993). The phages and bacteriocins of *Xenorhabdus* sp., symbiont of the nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. In: Bedding R., Akhurst R. J., Kaya H. K. (eds): *Nematodes and the biological control of insect pests*. Melbourne, CSIRO Publishing, s. 137 - 145.

- Boemare N. E. (2002). Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler R. (ed): *Entomopathogenic nematology*. Wallingford, CAB International, s. 42.
- Böszörményi E., Érsek T., Fodor A., Fodor A. M., Földes L. S., Hevesi M., Hogan J. S., Katona Z., Klein M. G., Kormány A., Pekár S., Szentirmai A., Sztaricskai F., Taylor R. A. J. (2009). Isolation and activity of *Xenorhabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae*. *Journal of Applied Microbiology*, 107: 746 - 759.
- Boucias D. G., Pendlant J. C. (1998). *Principles of insect pathology*. New York, Springer Science+Business Media, s. 187 - 188.
- Brachmann A. O., Bode H. B. (2013). Identification and bioanalysis of natural product from insect symbionts and pathogens. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 135: 123 - 155.
- Brehélin M., Cherqui A., Drif L., Luciani J., Akhurst R., Boemare N. (1993). Ultrastructural study of surface components of *Xenorhabdus* sp. in different cell phases and culture conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 6: 188 - 191.
- Brown I. M., Gaugler R. (1996). Cold tolerance of Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. *Journal of Thermal Biology*, 21: 115 - 121.
- Burnell A. M., Stock S. P. (2000). *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts - lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2: 31 - 42.
- Campbell J. F., Gaugler R. (1993). Nivation behaviour and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behaviour*, 126: 155 - 159.
- Campbell J. F., Gaugler R. (1997). Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: dichotomy or variation along continuum? *Fundamental and Applied Nematology*, 20: 393 - 398.

- 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. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111: 126 - 235.
- Campos-Herrera R., Půža V., Jaffuel G., Blanco-Pérez R., Čepulytė-Rakauskienė R., Turlings T. C. J. (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.
- Corsi A. K., Wightman B., Chalfe M. (2015). Transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. In: WormBook (ed): *The C. elegans research community*, WormBook. Dostupné on-line 24. 3. 2019: doi/10.1895/wormbook.1.177.1, <http://www.wormbook.org>.
- Couillault C., Ewbank J. J. (2002). Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, 70: 4705 - 4707.
- Coupland J., Abd-Elgawad M. M. M., Askary T. H. (2017). Beneficial nematodes and the changing scope of plant protection. In: Abd-Elgawad M. M. M., Askary T. H., Coupland J. (eds): *Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes*. Wallingford, CAB International, s. 26 - 42.
- Crawford J. M., Portmann C., Zhang X., Roeffaers M. B. J., Clardy J. (2012). Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 10821 - 10826.
- Darby, C. (2005). Interactions with microbial pathogens. In: Wormbook (ed): *The C. elegans research community*, WormBook. Dostupné on-line 24. 3. 2019: doi/10.1895/wormbook.1.21.1, <http://www.wormbook.org>.
- Data sheets on quarantine pests: *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* (2019). *EPPO Global database*. Dostupné on-line: 25. 3. 2019: <https://gd.eppo.int>

- Deepa I., Kumar S. N., Sreerag R. S., Nath V. S., Mohandas C. (2015). Purification and synergistic antibacterial activity of arginine derived cyclic dipeptides, from *Achromobacter* sp. associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major clinically relevant biofilm forming wound bacteria. Dostupné online 23. 3. 2019: *Frontiers in Microbiology*, 6: doi:10.3389/fmicb.2015.00876
- Dillman A. R., Chaston J. M., Adams B. J., Ciche T. A., Goodrich-Blair H., Stock S. P., Sternberg P. W. (2012). An entomopathogenic nematode by any other name. *PLoS Pathogens*, 8: e1002527.
- Dreyer J., Malan A. P., Dicks L. M. T. (2018). Bacteria of the genus *Xenorhabdus*, a novel source of bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*, 9: 3177.
- Dreyer J. (2018). Characterization of novel *Xenorhabdus-Steinernema* association of novel antimicrobial compounds produced by *Xenorhabdus khoisanae*. (Teze diplomové práce). Stellenbosch, Stellenboschská Univerzita, Přírodovědecká fakulta. Dostupné on-line 15. 2. 2019: <https://scholar.sun.ac.za>.
- 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*. *Journal of Nematology*, 35: 187 - 193.
- Dunn, P. E. (1986). Biochemical aspects of insect immunology. *Annual Review of Entomology*, 31: 321 - 329.
- Dutky S. R. (1959). Insect microbiology. *Advances in Applied Microbiology*, 1: 175 - 200.
- Dye D. W. (1968). A taxonomic study of the genus *Erwinia* I. The "amylovora" group. New Zealand. *Journal of Science*, 11: 590 - 607.
- Ebrahimi N., Demeulemeester K., Moens M., Viaene N. (2014). Observations on the life cycle of potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* on early potato cultivars. *Nematology*, 16: 937 - 952.

- Ennis D. E, Dillion A. B., Griffin C. T. (2010). Simulated roots and host feeding enhance infection of subterranean insects by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 140 - 143.
- Eves-van den Akker S., Laetsch D. R., Thorpe P., Lilley C. J., Danchin E. G. J., Da Rocha M., Rancurel C., Holroyd N. E., Cotton J. A., Szitenberg A., Grenier E., Montarry J., Mimee B., Duceppe M.-O., Boyes I., Marvin J. M. C., Jones L. M., Yusup H. B., Lafond-Lapalme J., Esquibet M., Sabeh M., Rott M., Overmars H., Finkers-Tomczak A., Smant G., Koutsovoulos G., Blok V., Mantelin S., Cock P. J. A., Phillips W., Henrissat B., Urwin P. E., Blaxter M., Jones J. T. (2016). The genome of the yellow potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, reveals insights into the basis of parasitism and virulence. *Genome Biology*, 17: 124.
- Flemming A. J., Shen Z. Z., Cunha A., Emmons S. W., Leroi A. M. (2000). Somatic polyploidization and cellular proliferation drive body size evolution in nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 5285 - 5290.
- Fodor A., Fodor A. M., Forst S., Hogan J. S., Klein M. G., Lengyel K., Sáringer G., Stackerbrandt E., Taylor R. A. J., Lehoczkzy É. (2010). Comparative analysis of antibacterial activities of *Xenorhabdus* species on related and non-related bacteria *in vivo*. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 2: 34 - 46.
- Forst S., Neelson K. (1996). Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiological Reviews*, 60: 21- 43.
- Fuchs S. W., Grundmann F., Kurz M., Kaiser M., Bode H. B. (2014). Fabclavines: bioactive peptide-polyketide-polyamino hybrids from *Xenorhabdus*. *ChemBioChem*, 15: 512 - 516.
- Garsin D. A., Sifri C. D., Mylonakis E., Qin X., Singh K. V., Murray B. E., Calderwood S. B., Ausubel F. M. (2001). A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 10892 - 10897.

- Gaugler R., LeBeck L., Nakagaki B., Boush G. M. (1980). Orientation of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae*, to carbon dioxide. *Environmental Entomology*, 9: 649 - 652.
- Givaudan A., Baghdiguian S., Lonois A., Boemare N. (1995). Swarming and swimming changes concomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1408 - 1413.
- Glaser R. W., Fox H. (1930). A nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). *Science*, 70: 16 - 17.
- Goodrich-Blair H., Clarke D. J. (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular Microbiology*, 64: 260 - 268.
- Götz P., Boman A., Boman H. G. (1981). Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 212: 333 - 350.
- Gouge D. H., Otto A. A., Schirocki A., Hague N. G. M. (1994). Effects of Steinernematids on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. Příloha. *Tests of Agrochemicals and Cultivars. Annals of Applied Biology*, 124: 134 - 135.
- Gualtieri M., Villain-Guillot P., Givaudan A., Pagès S. (2012). Nemaucin, an antibiotic produced by entomopathogenic *Xenorhabdus cabanillasii*. Patent: WO 2012/085177, A 1., s. 39.
- Grewal P. S., Selvan S., Gaugler R. (1994). Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment and reproduction. *Journal of Thermal Biology*, 19: 245 - 253.
- Griffin C. T., Downes M. J., Block W. (1990). Test of Antarctic soils for insect parasitic nematodes. *Antarctic Science* 2: 221 - 222.

- Griffin C. T., Boemare N. E., Lewis E. E. (2005). Entomopathogenic nematodes: Biology and behaviour. In: Grewal P. S., Ehlers R.-U., Shapiro-Ilan D. I. (eds): *Nematodes as biocontrol agents*. Wallingford, CAB International, s. 47 - 64.
- Handoo Z. A., Subbotin S. A. (2018). Taxonomy, identification and principal species. In: Perry R. N., Moens M., Jones J. T. (eds): *Cyst nematodes*. Wallingford, CAB International, s. 385 - 390.
- Hazir S., Kaya H. K., Stock S. P., Keskin N. (2003). Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*, 27: 181- 202.
- Hominick W. M., Reid A. P., Bohan D. A., Briscoe B. R. (1996). Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 317 - 331.
- Hunt D. J. (2007). Overview of taxonomy and systematics. In: Nguyen K. B. a Hunt D. J. (eds): *Entomopatgogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts*. Leiden - Boston, Brill, s. 27 - 57.
- Hunt P. R. (2016). The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology*, 37: 50 - 59.
- Hussaini S. S. (2017). Entomopatogenic nematodes: ecology, diversity and geographical dictribution. In: Abd-Elgawad M. M., Askary T. H., Couple J. (eds): *Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes*. Wallingford, CAB International, s. 88 - 142.
- Hwang S.-B., Choi J., Wei S., Park B.-J., Chelliah R., Oh D.-H. (2018). *In vivo* screening platform for shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) using *Caenorhabditis elegans* as a model. *PLos One*, 13: e0193277.
- Jarošová A., Půža V., Žurovcová M. (2016). The complete mitochondrial genome of the facultative entomopathogenic nematode *Oscheius chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing and Analysis*, 27: 3109 - 3110.

- Kaya H. K. (1990). Soil ecology. In: Gaugler R., Kaya H. K. (eds): *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, CRC Press, Inc., s. 103 - 105.
- Kaya H. K., Gaugler R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181 - 206.
- Kaya H. K., Koppenhöfer A. M. (1996). Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 357 - 371.
- Kiontke K., Sudhaus W. (2006). Ecology of *Caenorhabditis* species. In: WormBook (ed): *The C. elegans research community*, WormBook. Dostupné on-line 24. 3. 2019: doi/10.1895/wormbook.1.37.1, <http://www.wormbook.org>.
- Koppehnöfer A. M., Kaya H. K., Taormino S. P. (1995). Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. *Journal of invertebrate pathology*, 65: 193 - 199.
- Koppenhöffer H. S., Gaugler R. (2009). Entomopathogenic nematodes and bacteria mutualism. In: White J. F., Torres M. S. (eds): *Defensive mutualism in microbial symbionts*. Boca Raton, CRC Press, Inc., s. 106 - 107.
- Lephoto T. E., Mpangase P. T., Aron S., Gray W. M. (2016). Whole genome sequence of *Oscheius* sp. TEL-2014 entomopathogenic nematodes isolated from South Africa. *Genomics Data*, 7: 259 - 261.
- 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 - 319.
- Lima F. S. O., Mattos V. S., Silva E. S., Carvalho M. A. S., Teixeira R. A., Silva J. C., Correa V. R. (2018). Nematodes affecting potato and sustainable practices for their management. In: Yildiz M. (ed): *Potato: from Incas to all over the world*. IntechOpen. Dostupné on-line 25. 3. 2019: doi:105772/intechopen.73056.

- López-Robles J., Hague N. G. M. (2001). Evaluation of entomopathogenic nematodes against the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Test of Agrochemicals and Cultivars*, 22: 52 - 53.
- Martinez de Altube M. del M., Strauch O., De Castro G. F., Peña A. M. (2008). Control of the flatheaded root borer *Capnodis tenebrionis* (Linné) (Coleoptera: Buprestidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Nematoda: Steinernematidae) in a chitosan formulation in apricot orchards. *BioControl*, 53: 531 - 539.
- McInerney B. V., Gregson R. P., Lacey M. J., Akhurst R. J., Lyons G. R., Rhodes S., Smith D. R., Engelhardt L. M., White A. M. (1991). Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *Journal of Natural Products*, 54: 774 - 784.
- Mráček Z., Bečvář S. (2000). Insect aggregations and entomopathogenic nematode occurrence. *Nematology*, 2: 297 - 301.
- Nadler S. A., Bolotin E., Stock P. (2006). Phylogenetic relationships of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Systematic Parasitology*, 63: 161 - 181.
- Nermut' J., Půža V., Mráček Z. (2012). Entomopatogenní a moluskoparazitické hlístice - neviditelní půdní zabijáci. *Živa*, 1: 10 - 13.
- Nigon V. M., Félix M.-A. (2017). History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as a model organisms. In: WormBook. (ed): *The C. elegans research community*, WormBook. Dostupné on-line 24. 3. 2019: doi/10.1895/wormbook.1.181.1, <http://www.wormbook.org>.
- Ogier J.-C., Calteau A., Forst S., Goodrich-Blair H., Roche D., Rouy Z., Suen G., Zumbhil R., Givaudan A., Tailliez P., Médigue C., Gaudriault S. (2010). Units of plasticity in bacterial genomes: new insight from the comparative genomics of two bacteria interacting with invertebrates, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *BMC Genomics*, 11: 568.

- Ogier J.-C., Pagès S., Bisch G., Chiapellos H., Médigue C., Rouy Z., Teyssier C., Vincent S., Tailliez P., Givauda A., Gaudriault S. (2014). Attenuated virulence and genome reductive evolution in the entomopathogenic bacterial symbiont species, *Xenorhabdus poinarii*. *Genome Biology and Evolution*, 6: 1495 - 1513.
- Oro V., Nikolić B., Jošić D. (2014). The "potato road" and biogeographic history of potato cyst nematode populations from different contents. *Genetika*, 46: 895 - 904.
- Park D., Ciezki K., van der Hoeven R., Singh S., Reimer D., Bode H. B., Forst S. (2009). Genetic analysis of xenocumacin antibiotic production in the mutualistic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. *Molecular Microbiology*, 73: 938 - 949.
- Park Y., Kang S., Sadekuzzaman M., Kim H., Jung J.-K., Kim Y. (2017). Identification and bacterial characteristics of *Xenorhabdus hominickii* ANU101 from an entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 144: 74 - 87.
- Paul V. J., Frautschy S., Fenical W., Neilson K. H. (1981). Antibiotics in microbial ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 7: 589 - 597.
- Perry R. N., Hominick W. M., Beane J., Briscoe B. (1998). Effect of the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *S. carpocapsae*, on the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in pot trials. *Biocontrol Science and Technology*, 8: 175 - 180.
- Perry R. N., Ehlers R.-U., Glazer I. (2012). A realistic appraisal of methods to enhance desiccation tolerance of entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, 44: 185 - 190.
- Peters A. (1996). The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 389 - 402.

- Poinar, G. O. (1986). *Rhabditis myriophila* sp. n. (Rhabditidae: Rhabditida), associated with the milipede, *Oxidis gracilis* (Polydesmida: Diplopoda). *Proceedings of the Hemilnthological Society of Washington*, 53: 232 - 236.
- Půža V., Nermut J., Mráček Z. (2013). The role of bacterial symbionts in the competition of entomopathogenic nematode species. *IOBC-WPRS Bulletin*, 90: 273 - 276.
- Půža V. (2015). Control of insect pests by entomopathogenic nematodes. 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, s. 180.
- Půža V., Nermut 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, s. 421 - 430.
- Reimer D., Luxenburger E., Brachmann A. O., Bode H. B. (2009). A new type of pyrrolidine biosynthesis is involved in the late steps of xenocumanin production in *Xenorhabdus nematophila*. *ChemBioChem*, 10: 1997 - 2001.
- Reimer D., Cowles K. N., Proschak A., Nollmann F. I., Dowling A. J., Kaiser M., Constant R., Goodrich-Blair H., Bode H. B. (2013). Rhabdopeptides as insect-specific virulence factors from entomopathogenic bacteria. *ChemBioChem*, 14: 1991 - 1997.
- Renčo M. (2007). Comparison of the life cycle of potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*) pathotype Ro1 on selected potato cultivars. *Biologia, Bratislava*, 62: 195 - 200.
- Saleh M. M. E. (2017). Efficacy of entomopathogenic nematodes against lepidopteran insect pests. In: Abd-Elgawad M. M. M., Askary T. H., Coupland J. (eds): *Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes*. Wallingford, CAB International, s. 157 - 173.

- San-Blas E., Gowen S. R. (2008). Facultative scavenging as a survival strategy of entomopathogenic nematodes. *International Journal for Parasitology*, 38: 85 - 91.
- Shrestha S., Kim Y. (2007). An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits hemocyte phagocytosis of *Spodoptera exigua* by inhibiting phospholipase A2. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96: 64–70.
- Schmidt J., All J. N. (1979). Attraction of *Neoaplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) to common excretory products of insects. *Environmental Entomology*, 8: 55 - 61.
- Sicard M., Le Brun N., Pagès S., Godelle B., Boemare N., Moulia C. (2003). Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interactions. *Parasitology Research*, 91: 520 - 524.
- Sicard M., Tabart J., Boemare N. E., Thaler O., Moulia C. (2005). Effect of phenotypic variation in *Xenorhabdus nematophila* on its mutualistic relationship with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Parasitology*, 131: 687 - 694.
- Smart G. C. (1995). Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Journal of Nematology*, 27: 529 - 534.
- Smigelski A. J., Akhurst R. J., Boemare N. E. (1994). Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*: differences in respiratory activity and membrane energization. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 120 - 125.
- Spiridonov S. E. (2017). Entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae: morphology and taxonomy. In: In: Abd-Elgawad M. M. M., Askary T. H., Coupland J. (eds): *Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes*. Wallingford, CAB International, s. 45 - 62.

- Steiner, G. 1929. *Neoaplectana glaseri* n. g., n. sp. (Oxyuridae), a new nemic parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.) *Journal of the Washington Academy of Sciences* 19: 436 - 440.
- Steinkraus D. C., Young S. Y., Gouge D. H., Leland J. E. (2007). Microbial insecticide application and evaluation: Cotton. In: Lawrence L. A., Kaya H. K. (eds): *Field manual of techniques of invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests*. 2nd edition. Dordrecht, Springer, s. 439 - 444.
- Sudhaus W. (1976). Vergleichende Untersuchungen zur Phylogenie, Systematik, Oekologie, Biologie und Ethologie der Rhabditidae (Nematoda). *Zoologica*, 43: 1 - 229.
- Sudhaus W., Schutle F. (1989). *Rhabditis (Rhabditis) necromena* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae) from south australian diplopoda with notes on its siblings *R. myriophila* Poinar, 1986 and *R. caulleryi* Maupas, 1919. *Nematologica*, 35: 15 - 24.
- Sulstnon J., Hodgkin J. (1988). Methods. In: Wood W. B. (ed): *The nematode Caenorhabditis elegans*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, s. 587 - 606.
- Sundar L., Chang F. N. (1993). Antimicrobial activity and biosynthesis of indole antibiotics produced by *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of General Microbiology*, 139: 3139 - 3148.
- Tabassum K. A., Shanina F., Nasira K., Erum Y. I. (2016). Description of six new species of *Oscheius* Andrassy, 1976 (Nematoda: Rhabditida) from Pakistan with a key and diagnostic compendium to species of the genus. *Pakistan Journal of Nematology*, 34: 109 - 161.
- Tanada Y, Kaya H. K. (1993). Nematodes, Nematomorphs and Platyhelminthes. In: *Insect pathology*. San Diego, Academic Press, Inc., s. 462.

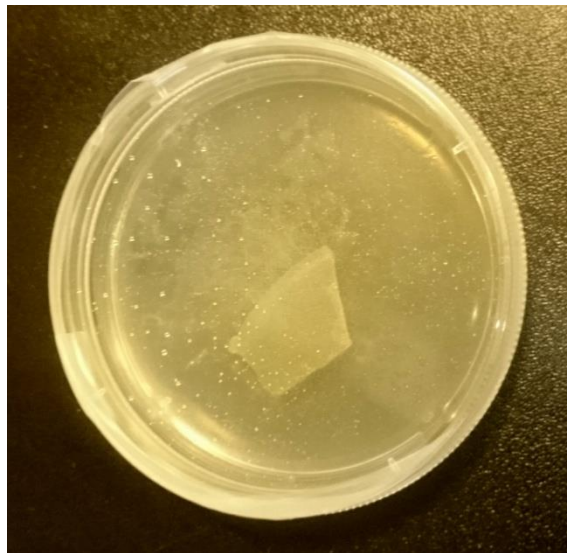
- Timper P., Kaya H. K., Jaffee B. A. (1991). Survival of entomogenous nematodes in soil infested with the nematode-parasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biological Control*, 1: 42 - 50.
- Tobias N. J., Wolff H., Djahanschiri B., Grudmann F., Kronenwert M., Shi Y.-M., Simonyi S., Grün P., Shapiro-Ilan D., Pidot S. J., Stinear T. P., Ebersberger I., Bode H. B. (2017). Natural product diversity associated with the nematode symbionts *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *Nature Microbiology*, 2: 1676 - 1685.
- Van Zyl C., Malan A. P. (2014). The role of entomopathogenic nematodes as biological control agents of insect pests, with emphasis on the history of their mass culturing and *in vivo* production. *African Entomology*, 22: 235 - 249.
- Watts J. L. (2014). *C. elegans* studies uncover roles for eicosanoids in development and stress. *ASBMB Today: The member magazine of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 13: 18 - 19.
- Wilson M. J., Ehlers R.-U., Glazer I. (2012). Entomopathogenic nematode foraging strategies - is *Steinernema carpocapsae* really an ambush forager? *Nematology*, 14: 389 - 394.
- Wolkow C. A., Hall D. H. (2011). The dauer cuticle. In: WormAtlas. (ed): *WormAtlas: a database featuring behavioral and structural anatomy of Caenorhabditis elegans*. Dostupné on-line 26. 3. 2019: doi:10.3908/wormatlas.3.1.
- Wouts W. M. (1981). Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematode: Heterorhabditidae) on artificial media. *Journal of Nematology*, 13: 467 - 469.

9 PŘÍLOHY



Obrázek 2:

Housenky *G. mellonella* nakažené hlísticemi *O. myriophila* (vlevo)
Vodní past s nakaženými housenkami (vpravo) (foto: H. Jakubíková)



Obrázek 3:

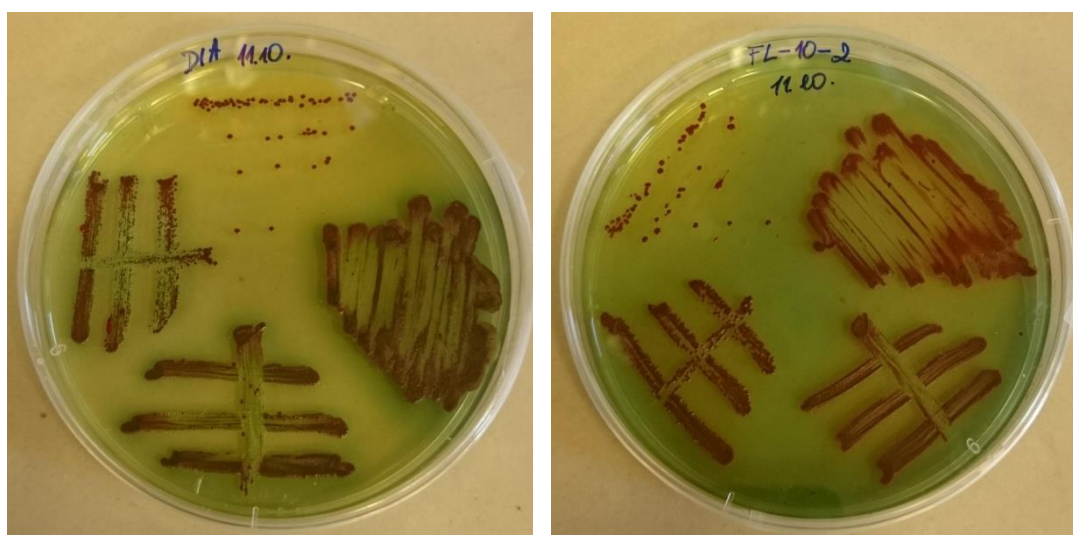
Množení hlístic *C. elegans* na miskách s NGM kultivačním médiem
(foto: H. Jakubíková)



Obrázek 4:

Nenakažené housenky *G. mellonella* (vlevo)

Infikované housenky připravené k izolaci bakterií (vpravo) (foto: H. Jakubíková)



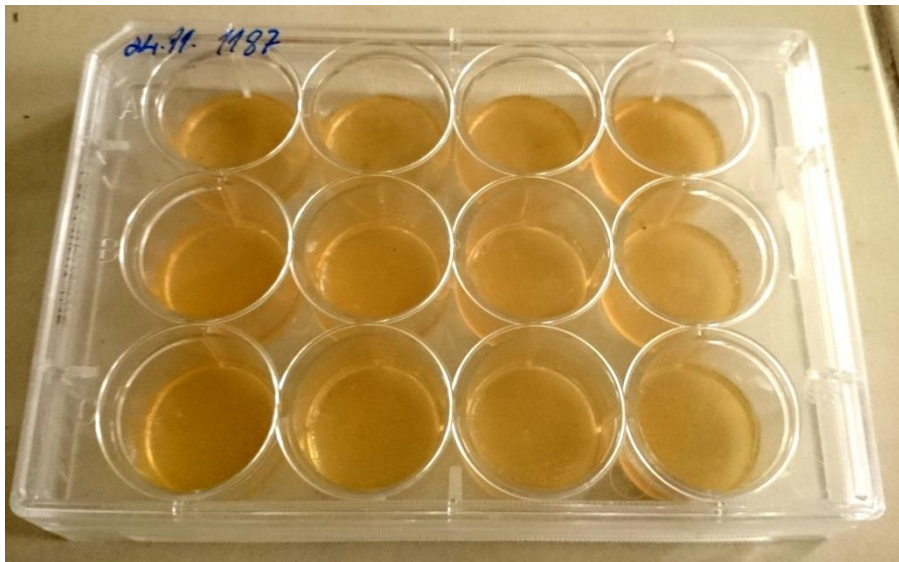
Obrázek 5:

Bakterie rodu *Xenorhabdus* izolované z hemolymfy housenek *G. mellonella* na NBTA agaru (foto: H. Jakubíková)



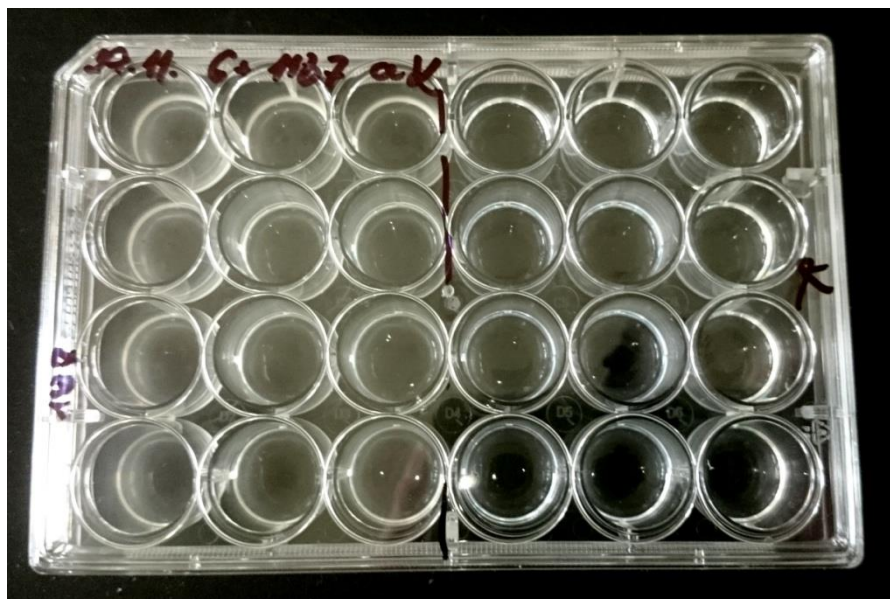
Obrázek 6:

Erlenmeyerova baňka s čistým YS médiem (vpravo)
YS meidium s bakteriálním zákalem vytvořeným po 24 hodinách (vlevo)
(foto: H. Jakubíková)



Obrázek 7:

12-jamkové miska s Woutsovým agarem ke zhodnocení vlivu bakteriálních kultur
na *O. myriophila* a *C. elegans* (foto: H. Jakubíková)



Obrázek 8:

24-jamková miska s bakteriálními supernatanty pro zhodnocení jejich vlivu na přežívání a reprodukci *G. rostochiensis* (foto: H. Jakubíková)