

**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

**EKOLOGIE HLÍSTIC RODU *PHASMARHABDITIS* A MOŽNOSTI
JEJICH VYUŽITÍ V OCHRANĚ ROSTLIN**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Andrea Bohatá, Ph.D.

Konzultant diplomové práce:

Ing. Jiří Nermut, Ph.D.

Autor diplomové práce:

Bc. Miroslav Holley

České Budějovice, 2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Miroslav HOLLEY, DiS.**
Osobní číslo: **Z17082**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské inženýrství - Rostlinolékařství**
Název tématu: **Ekologie hlístic rodu *Phasmarhabditis* a možnosti jejich využití v ochraně rostlin.**
Zadávací katedra: **Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cíl diplomové práce je zaměřen na vyhodnocení několika základních ekologických charakteristik třech vybraných druhů hlístic parazitujících na nahých plících, *Phasmarhabditis bohemica*, *P. bonaquaense* a *P. apuliae*, a možnosti jejich použití v ochraně rostlin před škodlivými plíži, zejména slimáčky rodu *Deroceras*.

1. Hodnocení schopnosti růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v polyxenické kultuře na různých přírodních substrátech a jejich vliv na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje.
2. Hodnocení schopnosti růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v monoxenické kultuře s bakterií *Moraxella osloensis* (nebo jinou bakterií izolovanou v rámci výzkumu) na různých přírodních substrátech a vliv těchto substrátů a bakterie na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje.
3. Zhodnocení schopnosti růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v pevném nebo tekutém médiu v monoxenické nebo polyxenické kultuře.
4. Testování vlivu aplikace polyxenických a monoxenických kultur hlístic rodu *Phasmarhabditis* na mortalitu slimáčků rodu *Deroceras*.

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

Seznam odborné literatury:

- Grewal, P. S., S. K. Grewal, L. Tan and B. J. Adams (2003). Parasitism of molluscs by nematodes: Types of associations and evolutionary trends. *Journal of Nematology* 35(2): 146-156.
- Morand, S., M. J. Wilson and D. M. Glen (2004). Nematodes (Nematoda) parasitic in terrestrial gastropods. In: G. M. Barker (Ed.) *Natural enemies of terrestrial molluscs*. CABI, Wallingford, UK: 525-557.
- Nermuť, J. and V. Půža (2017). Slug Parasitic Nematodes: Biology, Parasitism, Production and Application. In: M. M. M. Abd-Elgawad, T. H. Askary and J. Coupland (Eds) *Biocontrol Agents: Entomopathogenic and Slug Parasitic Nematodes*. CABI, Wallingford, UK: 533-547.
- Rae, R., C. Verdun, P. Grewal, J. F. Robertson and M. J. Wilson (2007). Biological control of terrestrial molluscs using *Phasmarhabditis hermaphrodita* - progress and prospects. *Pest Management Science* 63(12): 1153-1164.
- Wilson, M. J. (2012). Pathogens and parasites of terrestrial molluscs. In: L. A. Lacey (Ed.) *Manual of techniques in invertebrate pathology*, Academic Press: 427-439.
- Další články získané z bibliografické a citační databáze Web of Science nebo jiných databází.


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

Konzultant diplomové práce: Ing. Jiří Nermuť, Ph.D.

Datum zadání diplomové práce: 28. února 2018
Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2019


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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚLÉSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 1688, 370 05 České Budějovice


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

V Českých Budějovicích dne 28. února 2018

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

Rád bych poděkoval vedoucí své diplomové práce Ing. Andree Bohaté, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícnost, ochotu a věcné připomínky. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Jiřímu Nermuťovi, Ph.D. za odborný dohled a pomoc v laboratoři, cenné rady a trpělivost, se kterou mi pomáhal řešit veškeré překážky, které se v průběhu vypracovávání této diplomové práce vyskytly, a také za četné konzultace a připomínky. Poděkování patří také RNDr. Vladimíru Půžovi, Ph.D. za odborné rady při vykonávání pokusů.

Abstrakt

Hlístice rodu *Phasmarhabditis* jsou celosvětově rozšíření paraziti měkkýšů, z nichž jeden druh, *P. hermaphrodita*, byl formulován jako biologický přípravek proti škodlivým měkkýšům. Předkládaná práce je zaměřená na vyhodnocení několika základních ekologických charakteristik tří nově popsanych druhů rodu *Phasmarhabditis* (*P. bohémica*, *P. bonaquaense* a *P. apuliae*) v polyxenických a monoxenických kulturách. Pro monoxenické kultury byly vybrány tři bakteriální izoláty, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. a *Flavobacterium* sp. V rámci pokusů byla hodnocena schopnost růstu testovaných hlístic na různých přírodních substrátech (kompost, výkaly slimáčků rodu *Deroceras*, homogenizovaní slimáči, homogenizovaná housenka zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) a homogenizovaná prasečí ledvina) a vliv těchto substrátů na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje. Následně byl hodnocen růst hlístic v pevném a tekutém médiu. Poslední experiment byl zaměřen na testování vlivu polyxenických a monoxenických kultur hlístic na mortalitu a příjem potravy slimáčka sítkovaného (*Deroceras reticulatum*) a páskovky keřové (*Cepaea hortensis*). Z výsledků vyplývá, že všechny testované hlístice jsou letální fakultativní paraziti slimáčků, schopní růstu na širokém spektru organických substrátů a bakterií, jejichž vliv se projevuje spíše v produkci potomstva, zatímco kvalitativní ukazatele invazních larev zůstávají více méně nedotčené.

Klíčová slova: *Phasmarhabditis*, *Phasmarhabditis hermaphrodita*, Nemaslug, molusko-parazitické hlístice, *Deroceras reticulatum*, *Moraxella osloensis*, biologická ochrana rostlin.

Abstract

Nematodes of the genus *Phasmarhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) are world-wide distributed molluscs' parasites. Species *P. hermaphrodita* is the only commercially produced bio-agent for slug control. The aim of this thesis is to evaluate some ecologic characteristics of three newly described species of the genus *Phasmarhabditis* (*P. bohémica*, *P. bonaquaense* a *P. apuliae*) in polyxenic and monoxenic cultures. Three bacterial isolates, *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. and *Flavobacterium* sp. were chosen for testing the monoxenic cultures. The growing ability of tested nematodes, the effect on the quality of progeny and the rate of development were examined on various organic substrates (compost, faeces of *Deroceras* slugs, homogenized *Deroceras* slugs, homogenized larvae of *Galleria mellonella* and homogenized pig kidney). Subsequently, the growth of nematodes was tested in solid and liquid media. The last experiment was focused on evaluating the impact of polyxenic and monoxenic nematode cultures on the mortality and feeding activity of *Deroceras reticulatum* and *Cepaea hortensis*. As is assumed in the results chapter, all examined species of nematodes are lethal facultative parasites of *Deroceras* spp. They are able to grow in broad spectre of organic substrates and bacteria which influence the production of the progeny, but the qualitative parameters of dauer juveniles remain more or less unaffected.

Key Words: *Phasmarhabditis*, *Phasmarhabditis hermaphrodita*, Nemaslug, mollusc - parasitic nematode, *Deroceras reticulatum*, *Moraxella osloensis*, biological control.

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	12
2. 1 Hospodářsky významní měkkýši	12
2. 1. 1 Slimácci rodu <i>Deroceras</i>	13
2. 1. 1. 1 Bionomie	14
2. 1. 1. 2 Hospodářský význam.....	16
2. 1. 1. 3 Ochrana proti škodlivým plžům.....	17
2. 2 Molusko-parazitické hlístice	18
2. 2. 1 <i>Phasmarhabditis hermaphrodita</i>	22
2. 2. 1. 1 Historie.....	22
2. 2. 1. 2 Morfologie	23
2. 2. 1. 3 Bionomie	24
2. 2. 1. 4 Hostitelské spektrum.....	27
2. 2. 1. 5 Asociované bakterie	30
2. 2. 1. 6 Masové množení	32
2. 2. 1. 7 Metody aplikace	33
3 CÍLE PRÁCE.....	35
4 MATERIÁL A METODIKA.....	36
4. 1 Biologický materiál.....	36
4. 1. 1 Sběr slimáčků a páskovek	36
4. 1. 2 Hlístice použité pro experimenty	36
4. 1. 3 Příprava monoxenických kultur	37
4. 2 Hodnocení schopnosti růstu hlístic rodu <i>Phasmarhabditis</i> v polyxenické a monoxenické kultuře na různých přírodních substrátech a jejich vliv na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje.....	42
4. 3 Zhodnocení schopnosti růstu hlístic rodu <i>Phasmarhabditis</i> v pevném a tekutém médiu v polyxenické a monoxenické kultuře.....	45
4. 3. 1 Pevné médium.....	45
4. 3. 2 Tekuté médium.....	45
4. 4 Testování vlivu aplikace polyxenických a monoxenických kultur hlístic rodu <i>Phasmarhabditis</i> na mortalitu a příjem potravy slimáčka síťkovaného (<i>Deroceras reticulatum</i>) a páskovky keřové (<i>Cepaea hortensis</i>)	46

4. 4. 1 Mortalita a příjem potravy slimáčka síťkovaného	46
4. 4. 2 Mortalita a příjem potravy páskovky keřové	47
4. 5 Statistické vyhodnocení dat.....	48
5 VÝSLEDKY	49
5. 1 Hlístice použité pro experiment	49
5. 2 Schopnost růstu hlístic rodu <i>Phasmarhabditis</i> v polyxenické a monoxenické kultuře na různých přírodních substrátech a jejich vliv na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje.....	49
5. 2. 1 Rychlost vývoje dospělců	49
5. 2. 2 Délka těla dospělců	50
5. 2. 3 Rychlost vývoje larev.....	53
5. 2. 4 Produkce potomstva.....	55
5. 2. 5 Délka těla larev	57
5. 2. 6 Obsah tuku v těle larev.....	58
5. 3 Schopnost růstu hlístic rodu <i>Phasmarhabditis</i> v pevném a tekutém médiu v polyxenické a monoxenické kultuře.....	60
5. 3. 1 Délka těla larev	60
5. 3. 2 Obsah tuku larev	61
5. 3. 3 Produkce potomstva.....	63
5. 4 Testování vlivu aplikace polyxenických a monoxenických kultur hlístic rodu <i>Phasmarhabditis</i> na mortalitu a příjem potravy slimáčka síťkovaného (<i>Dereoceras reticulatum</i>) a páskovky keřové (<i>Cepaea hortensis</i>)	64
5. 4. 1 Mortalita páskovky keřové a slimáčka síťkovaného.....	64
5. 4. 2 Příjem potravy páskovky keřové a slimáčka síťkovaného.....	66
6 DISKUZE.....	68
7 ZÁVĚR	75
8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	77
9 OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA	92

1 ÚVOD

Suchozemští plži jsou široce rozšířenými škůdci. Způsobují významné škody na širokém spektru zemědělských a zahradních plodin, zejména ve vlhkých oblastech po celém světě. Škody na zemědělských plodinách v Evropě však způsobují především zástupci tří čeledí nahých plžů, a to plžákovití (Arionidae), slimákovití (Limacidae) a slimáčkovití (Agriolimacidae). Jedněmi z nejvýznamnějších škůdců s celosvětovým rozšířením jsou v temperátní zóně slimáček síťkovaný (*Deroceras reticulatum*) a plžák španělský (*Arion vulgaris*). Neméně významná je i v tropech a subtropích se vyskytující oblovka žravá (*Achatina fulica*), jenž patří mezi vůbec nejškodlivější invazní druhy na světě. Nicméně nesmíme zapomenout ani na mimořádně invazivní sladkovodní ampulárky *Pomacea canaliculata* a *P. maculata* z jižní Ameriky, které v mnoha zemích způsobují výrazné ekonomické škody na rýži a jiných plodinách.

V České republice, pomineme-li plžáka španělského, který škodí spíše na zahradních plodinách, jsou nejvýznamnějšími škůdci slimáček síťkovaný (*D. reticulatum*) a slimáček polní (*D. agreste*). V posledních letech se problémy se slimáčky stávají stále významnějšími. Rozšiřování slimáčků může souviset s mírnou zimou a chladným a vlhkým jarem. Nicméně zde působí i mnoho jiných faktorů, jako jsou zjednodušování osevních postupů, bezorebné technologie zpracování půdy, časnější výsev ozimů nebo nevhodné používání neselektivních insekticidů, které mimo jiných hubí i přirozené nepřátele slimáčků.

Chemické moluskocidní přípravky ve formě granulí jsou založené na bázi účinných látek metaldehyd nebo fosforečnan železitý. Tyto přípravky jsou komerčně snadno dostupné, relativně levné a mají brzký účinek. Nicméně ztrácejí rychle účinnost, zatěžují životní prostředí a působí negativně na necílové organismy, a proto nejsou využitelné v ekologickém zemědělství.

Biologická ochrana rostlin nevyužívá průmyslově vyráběné syntetické pesticidy. Tyto přípravky minimálně zatěžují životní prostředí a dají se využívat ve všech zemědělských i jiných kulturách. Takový typ ochrany proti slimáčkům a jiným menším druhům plžů je založen pouze na jediném bioagens. Jedná se o komerčně dostupnou molusko-parazitickou hlístici *Phasmarhabditis hermaphrodita* kultivovanou moxenicky

s bakterií *Moraxella osloensis*. Tato hlístice byla patentována roku 1994 ve Velké Británii pod obchodním názvem Nemaslug. Od té doby proběhla registrace skoro ve všech státech Evropy, nevyjímaje Českou republiku (Biocont Laboratory). Na našem území jsou registrovány dva identické přípravky na bázi hlístice *P. hermaphrodita*, a to Nemaslug a Phasmarhabditis-System. Toto bioagens nezatěžuje životní prostředí a nezanechává žádná zbytková rezidua, jako je tomu u chemických moluskocidů. Nicméně ochrana prostřednictvím hlístic je poměrně nákladná a její účinnost je omezena jen na slimáčky a juvenilní jedince plzáků. Proto v současnosti probíhá mnoho výzkumů různých parazitických hlístic a jejich symbiontů, které by bylo možné lépe využít v biologické ochraně rostlin před dosud rezistentními druhy, jako jsou plzák španělský nebo oblovka žravá.

Předkládaná diplomová práce shrnuje v jednotlivých kapitolách základní informace o hospodářsky významných měkkýších se zaměřením na slimáčky rodu *Deroceras* a také blíže charakterizuje jedinou komerčně dostupnou molusko-parazitickou hlístici *Phasmarhabditis hermaphrodita*. Praktická část je pak zaměřena na studium několika ekologických charakteristik třech vybraných druhů hlístic parazitujících na nahých plžích (*Phasmarhabditis bohémica*, *P. bonaquaense* a *P. apuliae*), které byly v předchozích letech izolovány a popsány z ČR a Itálie. Na základě dosažených výsledků se práce snaží o zhodnocení možnosti jejich využití v ochraně rostlin před škodlivými plži, zejména slimáčky rodu *Deroceras*.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Hospodářsky významní měkkýši

Plži (Mollusca: Gastropoda) jsou významnými škůdci zemědělských a zahradních plodin po celém světě (Tan a Grewal, 2001). Podle odhadů existuje přibližně 25 000 suchozemských druhů měkkýšů (Rosenberg, 2014). V Evropě, zejména v severozápadních zemích s mírným podnebím a větším množstvím srážek, škodí na plži hlavně na pšenici, řepce olejce, hlávkovém salátu a růžičkové kapustě (Glen a Moens 2002; Moens a Glen, 2002).

Na území České republiky bylo v přírodě nalezeno 221 druhů plžů, z toho 171 suchozemských (Horsák *et al.*, 2013). Škody na zemědělských plodinách ale způsobují především zástupci tří čeledí nahých plžů, a to plzákovití (Arionidae), slimákovití (Limacidae) a slimáčkovití (Agriolimacidae).

Nejvýznamnější z čeledi plzákovití je zajisté rod plzák (*Arion* Férussac, 1819). Do tohoto rodu patří např. plzák španělský (*Arion vulgaris* Moquin-Tandon, 1855). Tento invazní druh je polyfágní škůdce, který se dokáže živit na odumřelých rostlinách, okrasných rostlinách, houbách, výkalech, mršinách ale hlavně na zahradních a polních plodinách (řepka, brambory, zelí, petržel, fazole, jahody, salát, mrkev, červená řepa atd.) (Kozłowski a Kozłowska, 2004). Neméně významný je u nás i plzák zahradní (*Arion hortensis* Férussac, 1819), který se vyskytuje v lesních a travních ekosystémech. Škodí ale také na zahradních (jahody, zelí, mladé rostliny) a polních plodinách (McDonnell *et al.*, 2009).

Z čeledi slimákovití (Limacidae Lamarck, 1801) je významným rodem slimák (*Limax* Linnaeus, 1758), do kterého patří druh slimák největší (*Limax maximus* Linnaeus, 1758). Tento druh způsobuje škody na zemědělských a zahradních plodinách, ovoci, klíčících a mladých rostlinách a na uskladněném ovoci a zelenině (Morii a Nakano, 2017; Habib *et al.*, 2018). Jak uvádí Rollo a Wellington (1977, 1979), slimák největší má agresivní teritoriální chování a může být kanibalistický i masožravý. Může požírat menší druhy bezobratlých, jako jsou např. plzák španělský a podkornatka žíhaná (*Lehmannia marginata* Müller, 1774) nebo i vyvíjející se cikády (Norden a Williams, 2015).

Z celosvětového hlediska způsobuje velké škody také ulitnatý plž oblovka žravá (*Achatina fulica* Bowdich, 1822) patřící do čeledi achatinovití (Achatinidae). Tento obří africký plž patří mezi nejškodlivější invazní druhy na světě (Lowe *et al.*, 2000). Předpokládá se, že konzumuje více než 500 různých rostlinných druhů a může také působit jako potenciální vektor pro parazity *Angiostrongylus cantonensis* a *Angiostrongylus costaricensis* způsobující eozinofilní meningoencefalitidu (Raut a Barker, 2002). Další významné škody způsobují ampulárky *Pomacea canaliculata* Lamarck, 1822 a *Pomacea maculata* Perry, 1810. Tyto druhy patří mezi nejinvazivnější sladkovodní měkkýše a mají domovinu v jižní Americe. Do mnoha zemí po celém světě byly zavlečeny obchodem s akvarijními rybami a potravinami (Arfan *et al.*, 2015). V mnoha zemích způsobují výrazné ekonomické škody na rýži, zejména v jihovýchodní Asii (Nghiem *et al.*, 2013). Značné škody také způsobují u plodin jako je taro, vodní špenát, vodní kaštiny, divoká rýže nebo japonská petržel (Carlsson a Lacoursière, 2005; Carlsson, 2006; Horgan *et al.*, 2014).

2. 1. 1 Slimácci rodu *Deroceras*

Čeď slimáčkovití (Agriolimacidae) se skládá z 6 rodů (*Deroceras* Rafinesque, 1820; *Krynockillus* Kaleniczenko, 1851; *Furcopenis* Castillejo a Wiktor, 1983; *Lytopelte* Boettger, 1886; *Mesolimax* Pollonera, 1888 a *Megalopelte* Lindholm, 1914). Celkem zahrnuje 135 druhů. Z tohoto počtu patří 123 druhů do rodu *Deroceras* (Wiktor, 2000).

Druhy rodu *Deroceras* jsou primárně holarktické. Většina druhů se vyskytuje na severní polokouli v oblasti Eurasie a Severní Ameriky, nicméně mnoho druhů bylo zavlečeno např. do Austrálie, Etiopie, na Nový Zéland a do Severní Afriky (Reise, 2007; McDonnell *et al.*, 2009).

V České republice je známo 9 druhů slimáčků (*Deroceras laeve* Müller, 1774; *D. reticulatum* Müller, 1774; *D. agreste* Linné, 1758; *D. sturanyi* Simroth, 1894; *D. turcicum* Simroth, 1894; *D. rodnae* Grossu a Lupu, 1965; *D. praecox* Wiktor, 1966; *D. juranum* Wüthrich, 1993 a *D. invadens* Reise, Hutchinson, Schunack a Schlitt, 2011) (Horsák *et al.*, 2018).

D. reticulatum a *D. agreste* jsou nejvýznamnějšími škůdci polních a zahradních plodin (Horsák *et al.*, 2010). Vyskytují se v mírných oblastech Evropy, Asie, Severní

a Jižní Ameriky, Austrálie a Nového Zélandu (Kozłowski *et al.*, 2016). Proto následující kapitoly budou pojednávat o těchto dvou druzích.

2. 1. 1. 1 Bionomie

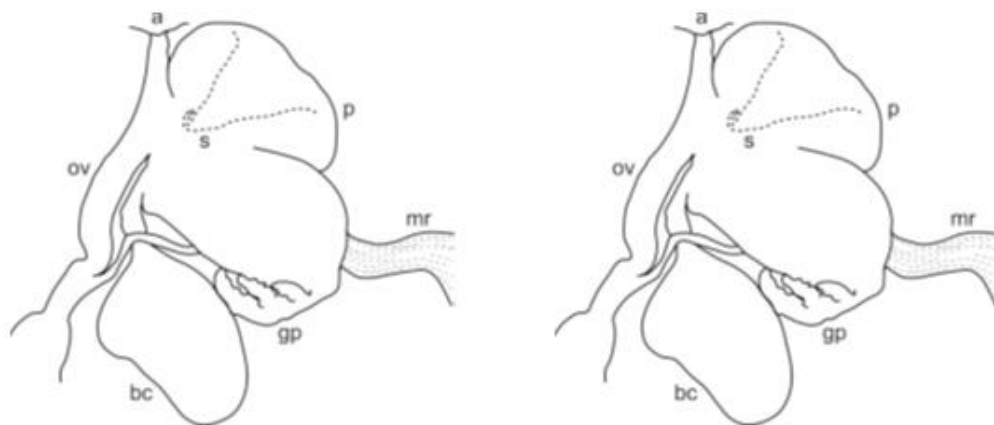
Identifikovat slimáčky rodu *Deroceras* je obtížné, neboť jsou si velmi podobní. S jistotou je můžeme určit pouze podle kopulačních orgánů (tvar penisu) a délky slepého střeva (Horsák *et al.*, 2013). Nicméně slimáček síťkovaný a polní patří mezi druhy, které můžeme od sebe snadno rozeznat podle barvy těla (Obrázek 1).



Obrázek 1: Slimáček síťkovaný (*D. reticulatum*) vlevo a slimáček polní (*D. agreste*) vpravo. (převzato od Horsák *et al.*, 2013)

Slimáček síťkovaný (*D. reticulatum*) je dlouhý 40–60 mm. Základní zbarvení dospělých jedinců je žlutošedé, někdy kávové nebo olivové, obvykle má zřetelnou síťovitou kresbu tvořenou načernalými nebo tmavohnědými skvrnami (Forsyth, 2004). Má široký penis s charakteristickým trsem přídatných žlázek, dráždicí těleso je výrazně kuželovité, na konci často s ohnutou špičkou. Slepé střevo má dlouhé, alespoň 2x delší než široké (Obrázek 2).

Slimáček polní (*D. agreste*) dosahuje délky 30–50 mm. Má smetanově šedobílé tělo s tmavším síťováním a přední část těla bývá tmavší až hnědočervená (South, 1992). Má široký penis s kratšoučkou přídatnou žlázkou (Obrázek 2). Jako slimáček síťkovaný má slepé střevo dlouhé, alespoň 2x delší než široké (Horsák *et al.*, 2010).



Obrázek 2: Znaky na pohlavní soustavě slimáčka síťkovaného (*D. reticulatum*) vlevo a slimáčka polního (*D. agreste*) vpravo: a – atrium, ap – appendix, bc – semenná schránka (bursa copulatrix), gp – glandula penis, mr – zatahovač penisu (musculus retractor penis), p – penis, s – stimulator. (převzato od Horsák *et al.*, 2010)

Slimáčci jsou hermafrodité (Wiktor, 2000). Dospělec klade 200–400 vajíček a podle Carrick (1938) může *D. reticulatum* naklást až 500 vajíček za rok. Vajíčka jsou kladena ve skupinách po 10–20 kusech, 5–10 cm hluboko do půdy. Letní generace klade vajíčka v květnu. V červnu a červenci se líhnou juvenilní jedinci, kteří v průběhu června až července dorůstají a od srpna do listopadu poškozují ozimé plodiny. Přezimují vajíčka, ojediněle také dospělí jedinci, kteří přežívají pouze ve vlhkých mírných zimách. V průběhu zimy a v předjaří se líhnou mláďata, která v únoru až dubnu poškozují jarní plodiny při vzcházení. V Evropě je životní cyklus slimáčků dokončen za méně než rok (Berlandier a Baker, 2007).

Příznivé pro výskyt slimáčků je teplé vlhké počasí v létě a na podzim. Mnoho laboratorních a polních testů prokázalo, že řada faktorů souvisejících s počasím (povětrnostní podmínky, teplota vzduchu a půdy, vlhkost vzduchu a půdy, dešťové srážky a rychlost větru) ovlivňuje aktivitu a hojnost slimáčků a tím pádem i potencionální poškození rostlin (Cook, 2001).

Podmínky pro aktivitu začínají při 5 °C, ale optimální teplota se pohybuje mezi 17 a 20 °C (Douglas a Tooker, 2012). Slimáčci jsou aktivní celou noc, zvláště po deštích a závlahách. Po dešti se zdržují na rostlinách i během dne. Žravost slimáčků je veliká, hmotnost těla se za 24 hodin zvyšuje o 30–40 %. V letech méně příznivých pro vývoj

nacházejí příznivé podmínky pro přežití na neobdělávaných vlhkých lokalitách s divoce rostoucími rostlinami. Jestliže panuje teplé a suché období, přežívají všechna stádia několik týdnů bez potravy v trhlinách půdy (South, 1982; Wiktor, 2000).

2. 1. 1. 2 Hospodářský význam

Slimácci rodu *Deroceras* jsou polyfágní škůdci (Kozłowski a Kozłowska, 2008). Živí se širokou škálou polních i zahradních plodin. Poškozuji pšenici, ječmen, oves, řepku, brambory, kukuřici, sóju, slunečnici, luštěniny, vojtěšku, jahody, fazole, cibuli, zelí, květák, hlávkový salát a mnoho dalších plodin (Mair a Port, 2002; Salvio *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2010; Santacruz *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2017).

Většinou lze poškození slimáčků klasifikovat jako dva typy. První je poškození semen, mladých a starších rostlin, které vede k přímé ztrátě porostu nebo omezení růstu. U ozimé pšenice je nejzranitelnější osivo a rané fáze růstu hned po výsevu. Slimácci vyžirají zárodek a část nebo celý endosperm, a tím zabraňují klíčení (Kaluski *et al.*, 2005). U brukvovitých rostlin nejsou semena poškozená. Mladé rostlinky jsou ale vystaveny velkému riziku poškození od okamžiku, kdy naklíčí, do doby, než se stanou dostatečně silnými, aby dokázaly konkurovat napadení (Glen, 2002). Velké množství brukvovitých plodin je velmi náchylných na poškození od slimáčků. Největší škody však způsobují na ozimé řepce. Po zasetí mohou poškodit klíčící semena v půdě a tím celou rostlinu zničí. Po vzejití se zpočátku na rostlinách projevuje nepravidelný žír na listech, hypokotylu a kořincích. Následně dokáží slimácci úplně sežrat malé i velké rostliny. Na listech bývá často slizovitá stopa, která se může po dešti smýt a my můžeme tato poškození zaměnit např. s žírem housenek (Kazda a Škeřík, 2008). Ve vlhkých letech mohou také slimácci poškodit nebo úplně zničit žírem vzcházející porosty slunečnice (Kazda *et al.*, 2018). Významné škody mohou také slimácci způsobovat u brambor, kde menší škody způsobují u klíčků a natě. Listy rostliny jsou nepravidelně vykousávány s typickými ohnutými okraji. U hlíz slimácci vykousávají vstupní otvory a vyhlubují v nich rozsáhlé dutiny. Tato poškození mohou často sloužit jako vstup pro bakteriální nebo houbové choroby (Wale *et al.*, 2008).

Druhý typ poškození je ztráta na kvalitě plodin. K tomuto poškození dochází obvykle před sklizní plodiny. Slimácci v této fázi většinou způsobují malou ztrátu na výnosech. Nicméně poškozuji rostliny výkaly a výkusy po krmení, a to má za

následek, že je plodina neprodejná nebo má malou tržní hodnotu (Glen, 2002). Například jahody, chřestové výhonky, růžičková kapusta, zelené a bílé zelí jsou často okusovány slimáčky, což je činí nevhodnými k prodeji. U bílého zelí může dojít k poškozování i během prvních týdnů skladování, takové zelí se stává neprodejným na trhu s čerstvými plodinami. Tato situace může nastat i u hlávkového salátu nebo špenátu, kdy slimáčci okusují listy a plodina se stává neprodejnou (Speiser *et al.*, 2001b).

V posledních letech se problémy se slimáčky, ale i obecně s plži stávají stále významnějšími. Pravděpodobně za to mohou omezené vstupy při přípravě půdy (minimalizace) nebo bezorebné obdělávání půdy. To má za následek zlepšení životních podmínek slimáčků, neboť orebné zpracování půdy narušuje jejich životní prostor a často velké množství z nich eliminuje. Důležité jsou také změny v osevních postupech, zejména se zvýšenými plochami s ozimou řepkou. Jak už bylo řečeno, tato plodina je vysoce náchylná na poškození slimáčky už od klíčící rostliny, ale také poskytuje slimákům dostatečný přísun potravy a úkryt. To má za následek podstatný nárůst populace, což představuje velké riziko pro následující plodinu, např. ozimou pšenici (Glen a Symondson, 2003; Glen *et al.*, 2004).

2. 1. 1. 3 Ochrana proti škodlivým plžům

Ochrana proti slimáčkům rodu *Deroceras* se odvíjí od prahu škodlivosti. Tento práh představuje 3 jedince na 1 past (50 x 50 cm) za den. V případě plzáka španělského není práh škodlivosti stanoven, ale orientačně se jedná o jednoho jedince pod nástrahou za den (Kazda, 2014).

Chemická ochrana rostlin granulovanými moluskocidy se může aplikovat na okraje pole, pásově nebo celoplošně v plodině. Aplikace se doporučuje buď při setí, nebo 2–3 dny před vzejitím. Granulované moluskocidy se doporučuje aplikovat ve večerních hodinách a hraniční teploty pro aplikaci by měly být v rozmezí 9–16 °C. Mezi povolené moluskocidy na bázi účinné látky metaldehyd patří např. přípravek Axcela, Medal, Slimet, Xiren a další. Tyto přípravky jsou však rizikové pro ptáky, savce anebo mají negativní vliv na vodní zdroje. Méně rizikové přípravky na bázi účinné látky fosforečnan železitý, které minimálně zatěžují životní prostředí a dají se využívat ve všech zemědělských kulturách, jsou např. Ironmax Pro a SLUXX HP. Tyto přípravky

nemají vliv na ptactvo ani zvěř a při správné aplikaci ani na vodní prostředí. Nicméně v případě účinné látky fosforečnan železitý, byl zjištěn negativní vliv na žížaly (Langan a Shaw, 2006).

Jedinými biologickými preparáty proti škodlivým plžům jsou Nemaslug a Phasmarhabditis-System (zcela identické produkty) na bázi hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita*. Toto bioagens nezatěžuje žádným způsobem životní prostředí a nezanechává žádná zbytková rezidua, jako je tomu u chemických moluskocidů.

V neposlední řadě, mezi biologickou ochranu rostlin je řazené také pivo. Tato přírodní látka je vhodná do všech typů kultur, nezatěžuje životní prostředí a nezanechává žádná rezidua (ÚKZÚZ, 2019).

2. 2 Molusko-parazitické hlístice

Celkově bylo popsáno více než 30 000 druhů hlístic, z nichž je 4 000 volně žijících mořských hlístic, 6 000 volně žijících suchozemských, 12 000 hlístic parazitujících na obratlovcích, 3 500 hlístic parazitujících na bezobratlých a přes 4 100 hlístic parazitujících na rostlinách (Poulin a Morand, 2000; Hugot *et al.*, 2001; Decraemer a Hunt, 2006).

Molusko-parazitické hlístice (MPNs z angl. mollusc-parasitic nematodes) jsou takové hlístice, které napadají nejrůznější druhy měkkýšů, a využívají je ve svůj prospěch. Hlístice se mohou do těla hostitele dostat nejčastěji tělními otvory a mohou se vyskytovat ve všech jeho orgánech. Měkkýš poté může sloužit jako paratenický hostitel, mezihostitel nebo definitivní hostitel parazitických hlístic (Anderson, 2000; Sudhaus, 2018).

Paratenický hostitel je organismus, který slouží k přenosu larválního stádia nebo stádií parazita z jednoho hostitele do druhého, ale ve kterém dochází k malému nebo žádnému vývoji (Anderson, 2000). Takovým hostitelem může být např. plovatka tmavá (*Stagnicola corvus* Gmelin, 1791), která slouží jako paratenický hostitel pro třetí larvální stádium parazitické hlístice krevnatka úhoří (*Anguillicola crassus* Kuwahara, Niimi, Hagaki, 1974), která má za definitivního hostitele úhoře říčního (*Anguilla Anguilla* Linnaeus, 1758) (Moravec, 1996).

Mezihostitel je takový měkkýš, ve kterém hlístice prodělává část svého vývoje, dokud se nedostane k definitivnímu hostiteli, kde dokončí svůj vývoj. Invazní larvy

(obvykle první larvální stádium) infikují měkkýše a vyvíjejí se uvnitř jeho těla do infekčního stádia. Poté je měkkýš obvykle spolknut definitivním hostitelem, což bývá obratlovec, ve kterém hlístice dokončí svůj cyklus. Opět je tato strategie, jako v předešlém případě, typická pro parazitické hlístice obratlovců. Takový parazit může být např. plicnivka ovčí (*Muellerius capillaris* Mueller, 1889), která parazituje v plicích ovcí a jako mezihostitele využívá různé plže. Tento typ asociace je také známý u čeledi Angiostomatidae, konkrétně u druhu (*Angiostoma limacis* Dujardin, 1845), který parazituje na mlocích a jako mezihostitele využívá např. plzáka černého (*Arion ater* Linnaeus, 1758) (Morand a Spiridonov, 1989).

Definitivní hostitel je pak takový měkkýš, ve kterém hlístice dokončí svůj životní cyklus. Z hlediska ochrany rostlin je tato asociace nejzajímavější, neboť měkkýš často na konci životního cyklu hlístice umírá. Takové soužití lze rozdělit na tři úrovně.

První úroveň představuje hlístice, které mají parazitické larvy, zatímco dospělci žijí volně. Příkladem této asociace jsou strunice *Mermis nigrescens* Dujardin, 1842 nebo *M. albicans* Siebold, 1853, které jsou schopny zabít hostitele při opuštění těla (Chitwood a Chitwood, 1937). Dalším příkladem může být *Alloionema appendiculatum* Schneider, 1859, jejíž parazitické larvy žijí v hostiteli a dospělci volně v půdě (Mengert, 1953).

Druhá úroveň představuje asociaci, při níž hlístice dokončí celý svůj životní cyklus uvnitř těla hostitele, ale nikdy ho nezabije. Do této skupiny patří např. *Agfa flexilis* Dujardin, 1845; *Rhabditis axei* Cobbold, 1884; *Hugotdiplogaster neozelandia* Morand, Barker, 1995; *Nemhelix bakeri* Morand, Petter 1986 a mnoho dalších (Morand a Faliex, 1994; Morand a Barker, 1995; Odaibo *et al.*, 2000).

Třetí úroveň tvoří hlístice, které celý životní cyklus dokončují v konečném hostiteli, kterého zároveň usmrcují. Typickými zástupci této skupiny jsou *Daubaylia potomaca* Chitwood, Chitwood, 1934; *Phasmarhabditis hermaphrodita* Schneider 1859; *P. papillosa* Schneider, 1866 nebo *P. neopapillosa* Mengert, 1953 (Wilson *et al.*, 1993a, Tan a Grewal, 2001a).

Jak bylo naznačeno výše, MPNs představují velkou skupinu tvořenou zástupci mnoha čeledí, z nichž nejvýznamnější jsou např. čeledi Agfidae, Alaninematidae, Alloionematidae, Angiostomatidae, Cosmocercidae, Diplogasteridae, Mermithidae a Rhabditidae (Půža *et al.*, 2016).

Čeled' Agfidae patří mezi vůbec nejčastější parazity měkkýšů. Na ty však zřejmě nemá zásadní negativní vliv. Nejvýznamnější druh z čeledi je *Agfa flexilis* žijící v reprodukčních orgánech svých hostitelů, mezi které patří např. plzáci (Arionidae), slimáci (Limacidae), slimáčci (Agriolimacidae) a mnoho dalších (Nermuť a Půža, 2016). Dosud žádná studie nezkoumala jejich potenciál pro využití v biologické ochraně rostlin proti měkkýšům.

Čeled' Alloionematidae se skládá pouze ze tří rodů, z nichž dva (*Alloionema* a *Neoalloionema*) parazitují na měkkýších. Běžným je v ČR jen druh *Alloionema appendiculatum* Schneider, 1859, který se vyskytuje obzvláště u nahých plžů (Nermuť a Půža, 2016). Tyto hlístice jsou sice parazité, nicméně jsou schopné růst i na tkáních mrtvého hostitele a různé jiné odumřelé organické hmotě volně v půdě. Parazitují hlavně na čeledi slimáčkovití (Agriolimacidae), plzákovití (Arionidae), hlemýžďovití (Helicidae), vlahovkovití (Hygromiidae) a jantarkovití (Succineidae) (Morand *et al.*, 2004).

Čeled' Cosmocercidae obsahuje dva významné druhy hlístic, které by mohly být hypoteticky zajímavé z hlediska ochrany rostlin (Nermuť a Půža, 2016). Hlístice této čeledi jsou obvykle paraziti plazů a obojživelníků ale druhy *Nemhelix bakeri* a *Cocmocercoides dukae* Holl, 1928 jsou parazity slimáků a hlemýžďů. *N. bakeri* žije a reprodukuje se v pohlavním traktu svého hostitele. Nového hostitele infikuje pouze během páření, když je hlístice přenesena spolu se spermatoforem (Morand, 1988). To znamená, že juvenilní měkkýši jsou vždy bez infekce. *N. bakeri* snižuje plodnost svého hostitele, ale její potenciál pro využití v ochraně rostlin není prozkoumán. U *C. dukae* parazitují larvy třetího stádia v plicní dutině některých suchozemských měkkýšů. Jsou ale také schopny proniknout do pohlavního traktu a infikovat vajíčka hlemýžďů. Díky této strategii jsou již mladí jedinci měkkýšů infikováni (Morand a Faliex, 1994). Podobně jako předchozí ovlivňuje především plodnost svého hostitele.

Strunice (Mermithidae) jsou obvykle paraziti hmyzu a jiných členovců (pavouci a koryši) ale bylo také prokázáno, že mohou napadat suchozemské plže. Nálezy strunic v měkkýších jsou docela obvyklé, ale zdá se, že tyto hlístice využívají měkkýše jen jako příležitostného hostitele. Je známo, že např. *Mermis nigrescens* infikuje slimáčka síťkovaného (*D. reticulatum*) a *M. albicans* infikuje slimáčka *Deroceras berytensis*

Bourguignat, 1852 a jantarku pobřežní (*Succinea pfeifferi* Rossmäessler, 1835) (Morand *et al.*, 2004). Jejich potenciál ve využití v biologické ochraně rostliny proti škodlivým měkkýšům nebyl dosud zkoumán.

Nejnámějšími zástupci MPNs v rámci čeledi háďovití (Rhabditidae Örley, 1880) jsou hlístice rodu *Phasmarhabditis* Andrassy, 1976. Tento rod aktuálně tvoří 11 platných druhů (*Phasmarhabditis neopapillosa* Mengert, 1953; *P. hermaphrodita* Schneider, 1859; *P. papillosa* Schneider, 1866; *P. tawfiki* Azzam, 2003; *P. safricana* Malan, Nguyen, De Waal, Tiedt 2008; *P. huizhouensis* Huang, Ye, Ren, Zhao, 2015; *P. californica* Tandingan De Ley, Holovachov, Mc Donnell, Bert, Paine, De Ley, 2016; *P. apuliae* Nermut, Půža, Mráček, 2016; *P. bonaquaense* Nermut, Půža, Mekete, Mráček, 2016; *P. bohémica* Nermut, Půža, Mekete, Mráček, 2017; *P. meridionalis* Ivanova, Spiridonov, 2017) (Jaffuel *et al.*, 2018).

V následujícím textu budou stručně popsány jen druhy použité v této studii a *P. hermaphrodita* jako nejvýznamnější druh v rámci rodu a v jistém smyslu modelový organismus dané skupiny.

P. apuliae (kmen BAR) byla izolována v roce 2012 z mladého jedince plžice sowerbyovy (*Milax sowerbyi* Férussac, 1823) ve městě Bari v Itálii. Samice jsou dlouhé $2\,623 \pm 163$ μm s dlouhým kónicky se zužujícím ocasem. Mají výrazné papiliformní phasmidy a vulvu umístěnou ve středu těla. Samci mají délku těla $2\,096 \pm 128$ μm . Mají peloderánní bursu s devíti páry paprsků (1+1+1+2+1+3), na každém paprsku je jedna papila. Další nepárová papila je umístěna na přívěsku kloakálního otvoru. Výrazné papilám podobné phasmidy jsou umístěny blízko konce ocasu. Invazní larvy (DJs z angl. *dauer juveniles*) jsou dlouhé 812 ± 53 μm a laterální linie mají tvořené ze dvou výrazných širokých hřebenů a tří rýh, středová rýha je velmi široká (Nermut *et al.*, 2016a).

P. bohémica (kmen CH1) byla izolována v roce 2012 z těla slimáčka síťkovaného (*Deroceras reticulatum*) nalezeného v obci Chelčice v České republice. Morfologické a molekulární výsledky ukázaly, že tento druh je blízký jiným druhům rodu *Phasmarhabditis*, zejména *P. californica* a *P. papillosa*. Samice mají tělo dlouhé $2\,079 \pm 126$ μm s dlouhým zužujícím se ocasem s výraznými papiliformními phasmidy umístěnými laterálně ve střední části ocasu. Samci mají délku těla $1\,683 \pm 91$ μm .

Mají peloderánní bursu s devíti páry paprsků v obvyklém uspořádání (viz *P. apuliae*). Invazní larvy jsou tenké, dlouhé $553 \pm 46 \mu\text{m}$ s výrazným laterálním polem složeným ze dvou širokých hřebenů a tři tenkých rýh (Nermut' *et al.*, 2017).

P. bonaquaense (kmen NDV) byla izolována v roce 2013 z těla slimáka žlutého (*Malacolimax tenellus* Müller, 1774) v blízkosti obce Dobrá Voda u Českých Budějovic. Samice jsou dlouhé $2\,349 \pm 186 \mu\text{m}$ a mají kulovité zakončení ocasu s dlouhým filiformním koncem. Papilám podobné phasmidy jsou extrémně výrazné. Samci dosahují délky $1\,829 \pm 224 \mu\text{m}$ a mají peloderánní bursu s devíti páry paprsků. Jedna nepárová papila se nachází v blízkosti ventrálního přívěsku kloakálního otvoru. Výrazné phasmidy jsou umístěny u konce ocasu. Invazní larvy mají tenké tělo dlouhé $902 \pm 77 \mu\text{m}$, mírně se zužující na obou koncích. Laterální pole je tvořeno dvěma výraznými hřebenů se širokou rýhou mezi nimi (Nermut' *et al.*, 2016b).

2. 2. 1 *Phasmarhabditis hermaphrodita*

2. 2. 1. 1 Historie

P. hermaphrodita byla poprvé objevena v roce 1859 v těle rozkládajícího se suchozemského měkkýše a byla pojmenována *Pelodytes hermaphroditus* (Schneider, 1859). Tato hlístice byla také izolována o něco později ze střeva plzáka černého (*Arion ater*) v Normandii a byla nazvána *Rhabditis caussaneli* (Maupas, 1900). Proto se původně uvádělo, že *P. hermaphrodita* není parazit, ale pouze ve stavu invazní larvy zůstává ve střevě, dokud plž nezemře (Maupas, 1900). Jeho mrtvé tělo pak hlísticím sloužilo jako zdroj potravy, ale také jako prostředí pro množení a vývoj. Po vyčerpání živin ve stádiu nových invazních larev hlístice tělo hostitele opustily. Podobný neparazitický životní cyklus jako u *P. hermaphrodita* byl později vypořizován i u příbuzných druhů *P. papillosa* a *P. neopapillosa*.

V roce 1987 ve Velké Británii, ve výzkumném centru Long Ashton Research Station, bylo zahájeno hledání biologických agens proti nahým plžům (Glen *et al.*, 1996). Podařilo se izolovat *P. hermaphrodita* z napadeného slimáčka síťkovaného (*Deroceras reticulatum*), na kterém se hlístice množily. V kontrastu k do té doby známým údajům, nový výzkum dospěl k závěru, že může *P. hermaphrodita* parazitovat na řadě různých plžů (Wilson *et al.*, 1993a).

Po prokázání, že je *P. hermaphrodita* nepochybně parazit, se další výzkumy zaměřily na produkci *in vitro* a účinnost v polních podmínkách (Wilson *et al.*, 1993b). Poté Wilson *et al.* (1993c) patentoval použití této hlístice jako biologického moluskocidu a následoval pětiletý výzkumný program financovaný společností MicroBio Ltd. (Becker Underwood, dnes BASF). Patent byl založen na schopnosti *P. hermaphrodita* parazitovat a zabíjet velké spektrum polních a zahradních plžů.

2. 2. 1. 2 Morfologie

Samice usmrcená teplem má tělo téměř rovné, robustní, protáhlé a postupně se zužující k zaoblenému konci hlavy. Ocas je kónický a asi tři anální šířky dlouhý a zužuje se do filiformního konce. Výrazně viditelné phasmidy se nachází na každé straně ocasu přibližně v polovině jeho délky. Konečník je krátký, zakřivený, s příčnou štěrbinou. Na kutikule jsou jemné příčné a podélné rýhy. Vulva se nachází v polovině délky těla na ventrální straně a má tvar protáhlé příčné štěrbiny. Pohlavní ústrojí je párové amphidelphické, vaječníky jsou reflexivní a dosahují téměř na úroveň vulvy. Spermie jsou často viditelné ve vejcovodu, i když samci chybí. U dospělých samic jsou zřetelné kulaté oocyty, které vyplňují většinu tělní dutiny. Oblast pysků je asi 18 μm široká, předně zploštělá a souvislá s přední konturou těla. Zaoblené pysky jsou uspořádané ve třech párech (jeden dorsální a dva subventrální). Každý pysk má výraznou vnitřní labiální papilu a méně výraznou vnější labiální papilu. Amphidy jsou viditelné na každém okraji laterálního pysku. Ústní otvor má v průřezu tvar zaobleného trojúhelníku a jeho délka je podobná šířce pysku. Jícen má válcovitý tvar, v polovině jeho délky je otok a poté se náhle zužuje do isthmu. Isthmus končí ve výrazném terminálním bulbu s obvyklou valvární strukturou, která je typická pro řád háďata (*Rhabditida*). Exkreční porus je obvykle před terminálním bulbem. Nervový prsteneček obklopuje přední část isthmu. Výrazný deirid je přítomný v laterálním poli naproti exkrečnímu póru.

Invazní larvy mají tělo kratší, štíhlejší než u dospělců a zužující se dopředu, kde jsou 11 μm široké pysky. Genitální primordium vypadá jako světlá protáhlá skvrna, která se nachází uprostřed těla. Zadní část těla se postupně zužuje k podlouhlému kónickému ocasu s filiformním koncem. Skoro po celém těle je vidět vnější kutikula druhého instaru. Na každé straně těla jsou výrazné laterální linie. Laterální pole začíná

přibližně 20 μm za zadní oblasti pysků a má čtyři výrazné linie (tři pásy), přičemž centrální pás je dvakrát tak široký jako vnější pruh ve střední části těla. Laterální pole se rozšiřuje ve čtyřech liniích ke střední části ocasu na úroveň vyčnívajícího phasmidu, poté směrem k ocasu slábne a zužuje se. Oblast pysků je plochá a mírně odsazená od kontury těla s mírně vroubkovanými vnějšími okraji. Ústní otvor je uzavřený. Z laterálního pohledu je ústní dutina užší a protáhlejší než u dospělců. Oblast jícnu je mnohem slabší než u dospělého a její lumen je po celé délce vlnitý. Jícen také nemá mediální bulbus, ale mírně se zužuje ve dvou třetinách od předního konce těla před rozšířením do terminálního bulbu. Exkrementní porus je obvykle naproti bazálnímu bulbu.

Samci u tohoto druhu nebyli popsáni (Hooper *et al.*, 1999).

2. 2. 1. 3 Bionomie

Hlístice rodu *Phasmarhabditis* tráví většinu svého životního cyklu v půdním prostředí. Proto potřebují mechanismus k nalezení vhodného hostitele, aby mohlo dojít k infekci. Pohyb potenciálních hostitelů je sice obvykle pomalý, nicméně pro hlístice je stále příliš rychlý. A tak se parazitické hlístice během vývoje musely přizpůsobit.

P. hermaphrodita a pravděpodobně i mnoho dalších hlístic snadno reaguje na podněty spojené s hostitelem. To může být například CO_2 nebo jiné látky produkované hostitelem, jako jsou výkaly nebo sliz. Hlístice reagují velmi silně na všechny tyto podněty, ne jenom na živého hostitele, neboť je známo, že *P. hermaphrodita* ale i jiné MPNs dokáží svůj životní cyklus dokončit na výkalech slimáčků nebo jiných organických látkách (Nermuť *et al.*, 2014).

Měkčíši využívají stejný úkryt každý den, a tak brzy své okolí pokryjí velkým množstvím slizu a výkalů. Tento typ chování poskytuje hlísticím velkou výhodu, neboť mohou reagovat na tyto silné podněty, a tím se zvyšuje jejich šance na vyhledání vhodného hostitele (Rae *et al.*, 2006; Půža *et al.*, 2016).

Životní cyklus hlístic rodu *Phasmarhabditis* je stále předmětem výzkumu. Nicméně z dostupných informací vyplývá, že životní cyklus hlístic je do jisté míry závislý na druhu plže, se kterým přijde hlístice do kontaktu. Popsány byly tři odlišné životní cykly, a to saprofytický, nekromenický a parazitický.

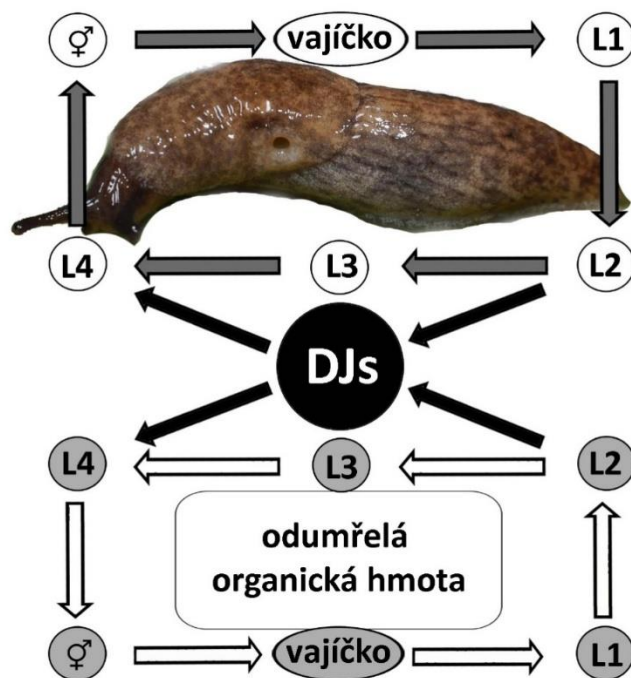
Saprofytický životní cyklus zkoumal Maupas (1900), kdy choval hlístice nepřetržitě po dobu dvou let na rozkládajícím se slimákově. Obdobně i Tan a Grewal

(2001a) byli schopni množit hlístice na homogenizovaném slimáčkovi a výkalech. Proto se Tan a Grewal (2001a) domnívají, že *P. hermaphrodita* může být využívána pro dlouhodobou ochranu proti slimáčkům, neboť může přetrvávat v prostředí bez živých hostitelů. Na rozdíl od entomopatogenních hlístic se *P. hermaphrodita* může rozmnožovat na širším spektru bakterií (Wilson *et al.*, 1995b) a zdá se pravděpodobné, že pokud se invazní larvy setkají například s mrtvým bezobratlým živočichem v půdě, mohou být schopné znovu růst a rozmnožovat se saprofytický.

Nekromenický životní cyklus poprvé pozoroval a zaznamenal Maupas (1900) a později Mengert (1953). Mengert (1953) uvádí, že invazní larvy *P. hermaphrodita* se mohou dostat do plže a zůstat uvnitř jeho těla bez dalšího vývoje, dokud hostitel nezemře. Poté se invazní larvy živí na mrtvém těle plže, vyvíjejí se a rozmnožují. Nakonec, když je potrava skoro vyčerpána, dochází k tvorbě nových invazních larev. Invazní larvy v nekromenickém stavu můžeme nalézt v dutině pláště, tělní dutině nebo v zažívacím traktu plže. Zdá se, že tento životní cyklus probíhá, když se hlístice dostanou do kontaktu s většími plži nebo s menšími druhy z čeledi plžákovití (Arionidae). Pro zjištění nekromenického životního cyklu testoval Mengert (1953) slimáka popelavého (*Limax cinereoniger*) a Maupas (1900) plzáka černého (*Arion ater*), kteří jsou mnohem větší než nejrozšířenější škůdce slimáček síťkovaný (*D. reticulatum*). Testování plži nevykazovali žádné známky infekce a po usmrcení a pitvě byly nalezeny živé invazní larvy *P. hermaphrodita*. Nicméně mechanismus, který reguluje, zda *P. hermaphrodita* přejde do nekromenického nebo parazitického cyklu není stále zcela pochopen (Wilson a Grewal, 2005).

Parazitický způsob života *P. hermaphrodita* (Obrázek 3) byl poprvé studován Wilsonem *et al.* (1993a) a Tanem a Grewalem (2001a) na slimáčku síťkovaném (*D. reticulatum*). Wilson *et al.* (1993a, d) prokázali, že *P. hermaphrodita* je parazit, schopný infikovat a zabít suchozemské plže. Tan a Grewal (2001a) prokázali, že při kontaktu invazních larev *P. hermaphrodita* se slimáčkem (*D. reticulatum*), dojde k proniknutí do jeho těla během 8–16 hodin. Wilson *et al.* (1993a) také zjistili, že tyto larvy uvolňují bakterie ze svého střevního váčku do hostitelovy hemolymfy. Následně se na těchto bakteriích živí a vyvíjí se v dospělce, kteří produkují nové larvy. Primárním místem vstupu invazních larev do slimáčka je dýchací otvor. Poté hlístice uvnitř

slimáčka rostou a rozmnožují se. Během infekce mívají slimáčky charakteristický otok na zadní polovině pláště, kde se hlístice rozmnožují. Pokud dojde k infekci velkým počtem hlístic, mohou se rozšířit i do jiných částí těla. V případech, kdy vstupují jen malé počty hlístic, jako je tomu v přírodě, je dutina pod pláštěm hlavním místem vývoje první generace. *P. hermaphrodita* produkuje přibližně 250–300 potomků. Druhá generace larev se poté šíří po celém těle slimáčka a rozvíjí se. Když slimáček umírá, obvykle se začíná vyvíjet třetí generace, která se živí na mrtvém těle hostitele a formuje se do invazních larev. Tyto larvy se poté dostanou do půdy a mohou infikovat nového hostitele. Úmrtí hostitele obvykle nastává mezi 4 až 21 dny od infekce, v závislosti na rychlosti vývoje a teplotě. Optimální teplota pro růst *P. hermaphrodita* je 17 °C, hlístice jsou ale schopny parazitovat i při teplotách okolo 5 °C (Wilson *et al.*, 1993b). Nicméně po velmi krátké době od infekce je inhibován příjem potravy slimáčků, takže když se *P. hermaphrodita* využívá jako bioagens, je ochrana rostlin rychlá, i když mortalita hostitele trvá déle (Glen *et al.*, 2000; Grewal *et al.*, 2001; Grewal *et al.*, 2003).



Obrázek 3: Životní cyklus hlístice *Phasmarhabditis hermaphrodita*: DJs (invazní larvy), L1 (první larvální stádium), L2 (druhé larvální stádium), L3 (třetí larvální stádium), L4 (čtvrté larvální stádium). (Převzato z Nermuť a Půža, 2016)

2. 2. 1. 4 Hostitelské spektrum

Phasmarhabditis hermaphrodita parazituje a inhibuje příjem potravy u mnoha suchozemských měkkýšů, ale přednostně napadá druhy z čeledí plzákovití (Arionidae), slimáčkovití (Agriolimacidae), slimákovití (Limacidae), plžicovití (Milacidae) a Veronicellidae. U ulitnatých plžů byla mortalita zaznamenána u čeledi hlemýžďovití (Helicidae) a plovatkovití (Lymnaeidae) (Rae *et al.*, 2007). Pro lepší přehled je v tabulce 1. uveden seznam měkkýšů citlivých na hlístici *P. hermaphrodita*.

Tabulka 1: Vnímavost plžů k *P. hermaphrodita*, podle Rae *et al.* (2007). Převzato a upraveno od Nermetů (2012).

	Čeď	Druh	Vnímavost	
Nazí plži	Slimáčkovití (Agriolimacidae)	<i>Deroceras agreste</i> (Linné, 1758)	Slimáček polní	ano
		<i>Deroceras reticulatum</i> (Müller, 1774)	Slimáček síťkovaný	ano
		<i>Deroceras panormitanum</i> (Lessona, 1882)	Slimáček středomořský	ano
		<i>Deroceras laeve</i> (Müller, 1774)	Slimáček hladký	ano
	Slimákovití (Limacidae)	<i>Limax maximus</i> (Linnaeus, 1758)	Slimák největší	ne
	Plzákovití (Arionidae)	<i>Arion ater</i> (Linnaeus, 1758)	Plzák černý	jen mladí jedinci
		<i>Arion silvaticus</i> (Lohmander, 1937)	Plzák hajní	ne
		<i>Arion intermedius</i> (Normand, 1852)	Plzák nejmenší	ne
		<i>Arion distinctus</i> (Mabille, 1868)	Plzák obecný	ne
		<i>Arion vulgaris</i> (Moquin-Tandon, 1855)	Plzák španělský	jen mladí jedinci
		<i>Arion subfuscus</i> (Draparnaud, 1805)	Plzák hnědý	ne
		<i>Arion hortensis</i> (Férussac, 1819)	Plzák zahradní	ne
	Plžicovití (Milacidae)	<i>Milax gagates</i> (Draparnaud, 1801)	Plžice tmavá	ano
		<i>Tandonia sowerbyi</i> (Férussac, 1823)	Plžice Sowerbyova	ano
		<i>Tandonia budapestensis</i> (Hazay, 1881)	Plžice štíhlá	ano
	Veronicellidae	<i>Leidyula floridana</i> (Leidy a Binney 1851)	-	ano

	Čeď	Druh	Vnímavost	
Ulítnatí plži	Hlemýžd'ovití (Helicidae)	<i>Helix aspersa</i> (Müller, 1774)	Hlemýžd' kropenatý	jen mladí jedinci
		<i>Monacha cantiana</i> (Montagu, 1803)	Tmavorečka kentská	ano
		<i>Cepaea hortensis</i> (Müller, 1774)	Páskovka keřová	ano
		<i>Cepaea nemoralis</i> (Linnaeus, 1758)	Páskovka hajní	ne
		<i>Theba pisana</i> (Müller, 1774)	Dunovka proměnlivá	ano
		<i>Cochlicella acuta</i> (Müller, 1774)	Suchomilka hrotitá	ano
		<i>Cerņuella virgata</i> (Da Costa, 1778)	Suchomilka	ano
	Plovatkovití (Lymnaeidae)	<i>Lymnaea stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)	Plovatka bahenní	ano
	Levatkovití (Physidae)	<i>Physa fontinalis</i> (Linnaeus, 1758)	Levatka říční	ne
	Pomatiasidae	<i>Pomatias elegans</i> (Müller, 1774)	Kruhoústka lesní	ne
	Zemounovití (Zonitidae)	<i>Oxychilus helveticus</i> (Blum, 1881)	Skelnatka lesní	ne
	Závornatkovití (Clausiliidae)	<i>Clausilia bidentata</i> (Ström, 1765)	Závornatka černavá	ne
Vrásenkovití (Endodontidae)	<i>Discus rotundatus</i> (Müller, 1774)	Vrásenka okrouhlá	ne	

Wilson *et al.* (1993a) prokázal, že jediná vysoká dávka hlístic *P. hermaphrodita* aplikovaná na některé druhy plžů (*Deroceras reticulatum*, *D. panormitanum*, *Arion silvaticus* Lohmander, 1937, *A. intermedius* Lohmander, 1937, *A. ater* (juvenilní stádium), *Tandonia budapestensis* Hazay, 1881 a *T. sowerbyi*) způsobuje významnou mortalitu. Tato dávka však byla extrémně vysoká (ve většině případů 19 000 invazních larev na plže). Grewal *et al.* (2003) prokázali, že *P. hermaphrodita* způsobuje významnou mortalitu u druhů *D. reticulatum*, *D. laeve* a *Leidyula floridana* Leidy a Binney, 1851 při dávce 300–2 700 invazních larev na jedince v laboratorních testech na filtračním papíru a v půdním testu. Existuje však celá řada druhů, které jsou proti hlístici *P. hermaphrodita* odolné, např. slimák největší (*Limax maximus*), plzák zahradní (*Arion hortensis*) a plzák tmavý (*Arion subfuscus* Draparnaud, 1805) (Grewal *et al.*, 2003). U některých druhů plžů bylo zjištěno, že juvenilní jedinci jsou náchylní na infekci, zatímco dospělci nejsou, jako je tomu například u plzáka černého (*Arion*

ater) a hlemýždě kropenatého (*Helix aspersa* Müller, 1774) (Wilson *et al.*, 1993a). *P. hermaphrodita* může také usmrtit juvenilní stádium plzáka španělského (*Arion vulgaris*), ale u jedinců vážících přes 1 g nezpůsobí mortalitu ani neinhibuje příjem potravy (Speiser *et al.*, 2001a; Grimm, 2002).

Coupland (1995) prokázal vysokou mortalitu ulitnatých plžů (*Theba pisana* Müller, 1774; *Cerņuella virgata* Da Costa, 1778; *Cochlicella acuta* Müller, 1774 a *Cochlicella barbara* Linnaeus, 1758) při dávce 300 invazních larev *P. hermaphrodita* na jedince v Petriho miskách na filtračním papíru. Na druhou stranu při zkoumání citlivosti necílových druhů hlemýždů, Wilson *et al.* (2000) prokázal, že půda ošetřená doporučenou polní dávkou *P. hermaphrodita* usmrtila pouze tmavoretku kentskou (*Monacha cantiana* Montagu, 1803), ale u dalších šesti běžných polních hlemýždů mortalita nebyla zaznamenána. Při ošetření půdy pětinasobkem doporučené polní dávky (300 000 DJs/m²) byla zaznamenána mortalita pouze u páskovky keřové (*Cepaea hortensis* Müller, 1774), ale u zbývajících pěti druhů nebyla opět zaznamenána žádná úmrtnost.

Zaborski *et al.* (2001) izolovali hlístice rodu *Phasmarhabditis* z těla žížaly obecné (*Lumbricus terrestris* Linnaeus, 1758), neboť se domnívali, že má hlístice vliv na mortalitu žížal. Tito vědci následně byli schopni tuto hlístici množit a dokázali, že je schopna usmrtit i několik dalších druhů žížal. Hlístice však nebyla formálně identifikována, její popis se ale nejvíce shodoval s druhem *P. neopapillosa*. Nicméně tato hlístice nebyla více zkoumána a testována na mortalitu různých druhů žížal. Předběžné zprávy od Wilson *et al.* (1993d) a podrobnější studie od Grewal a Grewal (2003) a DeNardo *et al.* (2003) ukázaly, že komerčně dostupný druh *P. hermaphrodita* nemá vliv na mortalitu žížaly obecné (*L. terrestris*) ani na žížalu hojní (*Eisenia fetida* Savigny, 1826).

Rae *et al.* (2006) například ve svém experimentu zjistili, že *P. hermaphrodita* byla více přitahována k mrtvému slimáčkovi (*D. reticulatum*) než k živému, což přineslo hypotézu, že je tato hlístice fakultativní parazit schopný růst a rozmnožovat se na rozkládajících se organických materiálech v půdě. Tuto hypotézu potvrdili například i Nermut *et al.* (2014) a MacMillan *et al.* (2009), kteří prokázali, že *P. hermaphrodita* může růst a rozmnožovat se i na jiných substrátech, než je živý plž, jako jsou

např. výkaly slimáčků, homogenizovaná housenka, mrtvé žížaly, mrtvý hmyz, kompost nebo rozkládající se listí.

2. 2. 1. 5 Asociované bakterie

Zatím je málo informací o asociaci bakterií s hlísticí *P. hermaphrodita* v přírodě. Dřívější výzkumy se spíše soustředily na úlohu bakterií v podpoře růstu hlístic a na patogenitu pro plže ve výsledné asociaci bakterie – hlístice (Wilson *et al.*, 1995a, b).

Počáteční studie ukázaly, že je možné množit hlístici *P. hermaphrodita in vitro* s polyxenickou kulturou (směs bakterií) (Wilson *et al.*, 1993b) a že hlístice produkované tímto způsobem jsou schopné způsobovat u plžů mortalitu (Wilson *et al.*, 1993a). Nicméně aby se zabránilo nebezpečí, že by mohly polyxenické kultury obsahovat škodlivé patogeny, bylo vhodnější pro komerční využití využívat pouze jednu bakteriální kulturu.

Wilson *et al.* (1995a) provedli počáteční studie s monoxenickými kulturami. Shromáždili více než sto bakteriálních izolátů z invazních larev *P. hermaphrodita*, polyxenických kultur *P. hermaphrodita* a z mrtvých jedinců slimáčka síťkovaného (*D. reticulatum*), který zemřel po infekci invazních larev *P. hermaphrodita*. Tyto bakterie byly odlišné pouze morfologií bakteriálních kolonií. Z této sbírky bylo pro další výzkum identifikováno 16 izolátů obsahujících 13 druhů bakterií. Výsledky ukázaly, že hlístice *P. hermaphrodita* dokáží růst a rozmnožovat se na většině bakteriálních izolátů. Mezi tyto izoláty patřil například *Bacillus cereus* Frankland a Frankland, 1887 (Bacillaceae); *Providencia rettgeri* Rettger, 1904 (Enterobacteriaceae); *Flavobacterium* sp. Bergey, Harrison, Breed, Hammer, Huntoon, 1932 (Flavobacteriaceae); *Aeromonas* sp. Stanier, 1943 (Aeromonadaceae); *Moraxella osloensis* Bovre a Henriksen, 1967 (Moraxellaceae) a *Pseudomonas fluorescens* Migula, 1985 (Pseudomonadaceae).

Nejvyšší výtěžky invazních larev byly získány s asociací bakterie *P. rettgeri*, *M. osloensis* a dvěma izoláty *P. fluorescens*. Kombinace bakterie – hlístice množené se všemi výše uvedenými bakteriemi byly testovány na mortalitu slimáčka síťkovaného. Pouze hlístice množené s bakterií *M. osloensis* a *P. fluorescens* vykazovaly konzistentní patogenitu (Wilson *et al.*, 1995b), i když *P. rettgeri* produkovala nejvyšší počet invazních larev (85 000 DJs / ml). Nicméně výzkum virulence hlístic *P. hermaphrodita* množených na různých bakteriálních izolátech odhalil nejen to, že v asociaci s bakterií

M. osloensis produkuje vysoké počty larev, ale že je také trvale patogenní pro slimáčka síťkovaného. Proto byla tato bakterie vybrána pro komerční produkci s *P. hermaphrodita* (Wilson *et al.*, 1995b).

Tan a Grewal (2001b) zjistili, že skutečnou mortalitu plžů způsobuje bakterie *M. osloensis* a hlístice *P. hermaphrodita* je pouze vektor, který pronikne do těla hostitele. Tan a Grewal (2002) také zjistili, že *M. osloensis* produkuje velmi silný endotoxin, který má za následek smrt hostitele. Experimenty Wilsona *et al.* (1995b, c) a Tana a Grewala (2001b) jasně dokazují, že existují komplexní interakce mezi hlísticí, bakterií a hostitelem. Nicméně i když je velmi dobře známo, že množení *P. hermaphrodita* v monoxenické kultuře s *M. osloensis* poskytuje vysoký výtěžek patogenních invazních larev pro komerční produkci, vztah mezi *P. hermaphrodita* a bakteriemi v přirozených populacích *P. hermaphrodita* není dobře znám.

Moraxella osloensis je gram-negativní aerobní bakterie, která má tvar koku nebo tyčinek, ale má tendenci být pleomorfní. Tato bakterie produkuje oxidázu a katalázu, ale ne indol a pigment. Je citlivá na penicilin a může růst v minerálních mediích s acetátovými a amonnými solemi (Bovre, 1984). *M. osloensis* je také oportunistický lidský patogen, neboť bylo zjištěno, že způsobuje onemocnění, jako je např. endokarditida (Stryker *et al.*, 1982), meningitida (Fijen *et al.*, 1994) nebo osteomyelitida (Sugarman a Clarridge, 1982).

Bylo prokázáno, že letální účinek na plže přímo koreluje s počtem buněk *M. osloensis*, které v sobě nesou invazní larvy *P. hermaphrodita*. Počet životaschopných buněk *M. osloensis* se mění s věkem infekčních larev, přičemž starší larvy nesou méně životaschopných buněk (Tan a Grewal, 2001b). Tan a Grewal (2001b) také demonstrovali, že 72 hodin staré kultury *M. osloensis* inokulované do dutiny pláště byly vysoce patogenní pro plže. Výzkumy toxinů produkovaných *M. osloensis* ukázaly, že bakterie produkuje tepelně stabilní endotoxin, který byl identifikovaný jako lipopolysacharid hrubého typu (LPS) s odhadovanou molární hmotností 5.300. Čistý LPS byl smrtící pro plže, když byl injektován do haemocoelu nebo do dutiny pláště s odhadovanou hodnotou LD₅₀ při 48 µg na plže (Tan a Grewal, 2002).

Bylo také zjištěno, že toxicita LPS spočívá v lipidové části A. Tato část byla kvantifikována tak, aby obsahovala přibližně 6×10^7 endotoxinových jednotek na mg.

Společná injekce LPS s galaktosaminem zvýšila toxicitu LPS vůči plži 2–4krát. Zvýšená senzitivita plže k LPS s galaktosaminem byla zcela potlačena uridinem, což naznačuje, že potenciálním místem působení LPS může být hepatopankreas plže (Tan a Grewal, 2003).

Také byly provedeny pokusy s 24hodinovou kulturou *M. osloensis*. Tato kultura byla injektována do haemocoelu slimáčka síťkovaného, ale nezpůsobila žádnou mortalitu. Bylo však prokázáno, že 60hodinové kultury *M. osloensis* způsobují významnou mortalitu u tohoto slimáčka (Wilson *et al.*, 1995b; Tan a Grewal, 2001b). Nicméně velké množství LPS potřebné k mortalitě plžů naznačuje, že interakce mezi bakterií, hlísticí a plžem zahrnuje další faktory. Je tedy možné, že s dalším výzkumem by mohly být vyvinuty kombinace hlístice – bakterie se zvýšenou patogenitou pro širší řadu škodlivých plžů.

2. 2. 1. 6 Masové množení

Různé metody na bázi *in vitro* množení hlístice *P. hermaphrodita* byly vyvinuty v 90. letech Wilsonem (Wilson *et al.*, 1993a). Wilson prokázal, že *P. hermaphrodita* může růst a reprodukovat se v polyxenických kulturách na pevném a tekutém médiu podle Beddinga (1984).

Hlístice mohla být uvedena na trh poměrně rychle z důvodu použití technologie pro masovou produkci entomopatogenních hlístic. Za použití mírné modifikace této techniky se dala tato metodika přenést na množení *P. hermaphrodita* (Lunau *et al.*, 1993).

Výzkumy byly zaměřeny na množení hlístic *in vitro* za použití polyxenických nebo monoxenických kultur. Monoxenické kultury byly nakonec upřednostňovány, neboť vykazovaly předvídatelnější výsledky, než tomu bylo u polyxenických kultur. Eliminováno to také riziko, že v růstovém médiu nebo konečném produktu budou přítomny další patogenní bakterie nebo bakterie produkující toxiny (Ehlers a Shapiro, 2005). A také u nich byla zajištěna vysoká produkce invazních larev s konzistentní infekčností (Wilson *et al.*, 1995a). Následně byla zkoumána asociace hlístice s mnoha druhy různých bakterií. Výsledky odhalily, že *Moraxella osloensis* produkovala vysoké množství invazních larev, ale také že byla konzistentně patogenní pro *D. reticulatum*. Proto tedy byla vybrána jako bakterie pro komerční produkci s *P. hermaphrodita* (Wilson

et al., 1995a). Wilson *et al.* (1995b) později v monoxenických kulturách dosahoval výtěžku blízcímu se 100 000 invazních larev na 1 ml média.

Dodnes je *P. hermaphrodita* masově produkována ve velkoobjemových fermentorech o objemu 20 000 litrů i více za použití kapalných médií s monoxenickou kulturou *M. osloensis*. Po namnožení maximálního počtu invazních larev, jsou hlístice centrifugovány a opakovaně promývány vodou (Young *et al.*, 2002).

Invazní larvy se poté smísí s inertním nosičem, jako je vápenatý montmorillonitový jíl nebo jemný práškový vermikulit, čímž vzniká formulace rozpustná ve vodě. Obsah vody je v nosiči upraven tak, aby byly invazní larvy částečně dehydratované a imobilní, čímž dochází k šetření energie a prodloužení jejich životnosti. Takto připravená formulace je balena buď po 12 nebo 30 mil. larev pro zahrádkáře nebo po 30 a 250 mil. larev pro polní využití do polyethylenových sáčků, které umožňují výměnu vzduchu, ale zadržují vodu. Takto zabalené hlístice přežijí až 6 měsíců, pokud jsou uchovány v chladničce (Glen *et al.*, 1994; Morand *et al.*, 2004; Pieterse *et al.*, 2017).

2. 2. 1. 7 Metody aplikace

Nemaslug a Phasmarhabditis-System jsou jediné (zcela identické) komerčně vyráběné bioagens na ochranu rostlin, proti škodlivým plžům na bázi molusko-parazitických hlístic (Nermuť a Půža, 2017). Nemaslug je účinný v boji proti měkkýšům u mnoha polních, zahradních a skleníkových plodin, jako je ozimá pšenice, řepka olejka, jahody, růžičková kapusta, cukrová řepa, zelí, chřest, salát, celer a mnoho dalších (Rae *et al.*, 2007; Pieterse *et al.*, 2017).

Pro použití se obsah sáčku smíchá s vodou, aby se hlístice stala aktivní. Výsledná suspenze se poté může aplikovat pomocí klasické zahradní konve, hydraulických postřikovačů, zavlažovacích systémů nebo pomocí speciálního aplikačního zařízení navrženého tak, aby se hlístice injektovala do půdy za stálého míchání a provzdušňování (Glen a Wilson, 1997; Brown *et al.*, 2011).

V mnoha pokusech bylo prokázáno, že efektivnější ochranou rostlin proti škodlivým plžům je nízká dávka s opakovanou aplikací než aplikace jedné vysoké dávky hlístic. To koresponduje se skutečností, že mnoho zemědělských plodin potřebuje chránit před škodlivými organismy po celý rok, a ne pouze při založení porostu. Zároveň

je toto zjištění v souladu se standardní zemědělskou praxí, kdy se používají opakované aplikace moluskocidních pelet. Jak již bylo zmíněno, Nemaslug se prodává pro zemědělské využití po 30 a 250 mil. DJs/balení. Toto množství se může aplikovat na 100 až 5 000 m² v závislosti na dávce a aplikaci. Výrobek lze aplikovat jako jednu vysokou dávku 300 000 DJs/m² anebo ve více nižších dávkách a to buď 50 000 DJs/m² nebo 150 000 DJs/m². Doporučují se dvě až tři aplikace v intervalu dvou až šesti týdnů v závislosti na plodině a tlaku škůdce (Wilson a Rae, 2015). Doporučuje se také přípravek aplikovat na vlhkou půdu a krátce po aplikaci povrch půdy mírně zavlažit, neboť jsou hlístice náchylné na vysychání. Pokud to není možné, může být zvýšena účinnost pomocí kultivace půdy bezprostředně po aplikaci hlístic (Wilson *et al.*, 1996; Hass *et al.*, 1999b). Nejvhodnější doba aplikace je večer, kdy je teplota půdy přibližně 15 °C (Hass *et al.*, 1999a). Za takových podmínek jsou hlístice chráněny před UV zářením a vysušením. Trysky a filtry by měly mít otvory široké aspoň 1 mm a tlak by neměl překročit 5 barů. Dobré je také neaplikovat hlístice v oblastech, které byly ošetřeny některými toxickými látkami, jako je například methiokarb (v EU zakázán), který se používá jako moluskocid proti škodlivým plžům (Nermuť a Mráček, 2010). Na druhou stranu bylo prokázáno, že *P. hermaphrodita* může být aplikována v kombinaci s moluskocidními peletami obsahujícími metaldehyd, a to i při vysoké koncentraci (Wilson *et al.*, 2000).

Vysoké výrobní a pořizovací náklady však znamenají, že není možné aplikovat hlístici *P. hermaphrodita* ve velkém měřítku. Nicméně používáním nových aplikačních metod, jako je např. pásová aplikace kolem okrajů pole, pásová aplikace kolem jednotlivých plodin nebo opakované aplikace v menších dávkách mohou snížit náklady, čímž se může využívání hlístic jako bioagens stát zajímavějším, než tomu bylo v minulosti. Ačkoliv bylo zaznamenáno hodně úspěchů s využitím *P. hermaphrodita*, bylo také i mnoho neúspěchů (Glen *et al.*, 2000b). Nicméně na tyto neúspěchy mohla mít vliv špatná manipulace s hlísticí, environmentální podmínky nebo přítomnost odolných druhů plžů (Rae *et al.*, 2007).

3 CÍLE PRÁCE

1. Hodnocení schopnosti růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v polyxenické kultuře na různých přírodních substrátech a jejich vliv na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje.
2. Hodnocení schopnosti růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v monoxenické kultuře s bakterií *Moraxella osloensis* (nebo jinou bakterií izolovanou v rámci výzkumu) na různých přírodních substrátech a vliv těchto substrátů a bakterie na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje.
3. Zhodnocení schopnosti růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v pevném nebo tekutém médiu v monoxenické nebo polyxenické kultuře.
4. Testování vlivu aplikace polyxenických a monoxenických kultur hlístic rodu *Phasmarhabditis* na mortalitu slimáčků rodu *Deroceras*.

4 MATERIÁL A METODIKA

4. 1 Biologický materiál

4. 1. 1 Sběr slimáčků a páskovek

Slimáčci síťkovaní (*Deroceras reticulatum* Müller, 1774) a páskovky keřové (*Cepaea hortensis* Müller, 1774) byli sbíráni v jarních a podzimních měsících v letech 2017–2018 v jižních Čechách. Hlavními lokalitami pro sběr byly zatravněné plochy u rybízové plantáže u obce Chelčice v okrese Strakonice (GPS 49.1287944N, 14.1720206E) a dendrologická zahrada Biologického centra AV ČR (BC AV ČR) v Českých Budějovicích (GPS 48.9761447N, 14.4460508E).

Všichni jedinci byli chováni po cca 20 ks v transparentních plastových krabičkách (180 x 130 x 60 mm) na vrstvě vlhkého zahradního substrátu (Zahradnický substrát BAUHAUS) a krmeni psími granulami (PROPESKO, zeleninové granule). Skladování byli v termoboxu při 15 °C.

4. 1. 2 Hlístice použité pro experimenty

V pokusech byly používány tři druhy hlístic rodu *Phasmarhabditis* (Tabulka 2) ze sbírky Laboratoře entomopatogenních hlístic, které poskytl Ing. Jiří Nermuť, Ph.D. (Entomologický ústav, BC AV ČR). Jednalo se o druhy *Phasmarhabditis bohemica* Nermuť, Půža, Mekete, Mráček, 2017 (kmen CH1), *P. apuliae* Nermuť, Půža, Mráček, 2016 (kmen BAR) a *P. bonaquaense* Nermuť, Půža, Mekete, Mráček, 2016 (kmen NDV).

Tabulka 2: Vybrané druhy experimentálních hlístic

Druh	Označení kmene	Lokalita
<i>Phasmarhabditis bohemica</i>	CH1	Chelčice, ČR (GPS 49°07'46.4"N 14°10'16.0"E)
<i>Phasmarhabditis apuliae</i>	BAR	Bari, Itálie (GPS 41°07'31"N 16°52'0"E)
<i>Phasmarhabditis bonaquaense</i>	NDV	Dobrá Voda, ČR (GPS 48°57'43.6"N 14°32'16.4"E)

Polyxenické kultury hlístic byly množeny na tzv. vodních pastech. Do velké Petriho misky (90 mm) bylo umístěno dnem vzhůru víčko malé Petriho misky (55 mm). Na malou Petriho misku byl položen vlhký filtrační papír, přidán kousek homogenizované prasečí ledviny a na ní napipetováno 50–100 invazních larev (DJs). Po dokončení životního cyklu a vytvoření nových DJs byla okolo misky přidána voda, do které byly zachyceny putující DJs. Zachycené invazní larvy byly slévány do zkumavek. Po sedimentaci ve zkumavce 15 ml byly larvy opakovaně propláchnuty sterilní vodou. Takto vyčištěná a připravená kultura byla uchována ve ventilovaných lahvičkách pro kultivaci tkáňových kultur (25 cm²) v chladicím boxu při 5 °C.

Postup přípravy a množení monoxenické kultury bude podrobně rozebrán v následující kapitole.

4. 1. 3 Příprava monoxenických kultur

Kultivace bakterií

Nejprve byly připraveny agarové plotny (3,7% standardní živný agar č. I.) pro kultivaci bakterií. Sterilní agary byly ve flowboxu rozlity do sterilních Petriho misek (90 mm) a ponechány pod UV zářením k zatuhnutí.

Hlístice (CH1, BAR a NDV) namnožené na vodní pasti na homogenizované prasečí ledvině, byly přeneseny do 1,5 ml zkumavek. Do zkumavek bylo z důvodu povrchové sterilizace přidáno po 1 ml 0,5% roztoku chlornanu sodného (420 ml sterilní vody a 50 ml Savo), obsah byl promíchán na vortexu. Po sedimentaci byly hlístice 3x promyty sterilní vodou.

Následně byly hlístice přepipetovány do ručního homogenizátoru, kde byly 5–10 min. homogenizovány. Na připravené agarové plotny byl vyžíhanými kličkami proveden křížový roztěr homogenizovaných hlístic. Petriho misky byly uzavřeny parafilmem a ponechány v temnu při pokojové teplotě.

Po nárůstu kolonií na agaru byly jednotlivé kolonie pomocí vyžíhané kličky přeneseny do předem připraveného sterilního YS média podle Dye (1968) složeného z 2,5 g kvasničného extraktu, 2,5 g NaCl, 0,25 g NH₄H₂PO₄, 0,25 g K₂HPO₄, 0,1 g MgSO₄ * 7 H₂O a 500 ml vody a ponechány na třepačce 24–48 hod. do zakalení.

Poté byly ve flowboxu do 2 ml zkumavek odpipetovány 2 ml YS média s bakteriemi. Tyto zkumavky byly centrifugovány 2 min. při 2 300x g. Poté byl odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno po 2 ml sterilní vody, pak opět proběhla centrifugace 2 min. při 2 300x g. Po odebrání supernatantu zůstal pouze pelet, který byl použit pro izolaci DNA a diagnostiku bakterií.

Izolace genomové DNA

Pro izolaci genomové DNA byl použit Top – Bio DNA Lego kit. V 1,5 ml zkumavce bylo smícháno 300 μ l DNA vazebného pufru se 100 μ l předem připraveného bakteriálního peletu (viz Kultivace bakterií).

Směs byla inkubována 10 min. při pokojové teplotě a každé 2 min byla jemně promíchána. Vzorek byl centrifugován 30 sec. při 6 000x g. Supernatant (< 800 μ l) byl převeden do kolonky na sběrné zkumavce. Tento set byl umístěn do centrifugy a centrifugován při 13 000x g po dobu 1 min. Jestliže roztok neprošel filtrem, byl celý proces opakován. Roztok, který prošel filtrem kolonky, byl odstraněn a kolonka byla znovu umístěna na stejnou sběrnou zkumavku. Poté bylo přidáno 700 μ l Wash bufferu a set byl centrifugován při 13 000x g 1 min. Přefiltrovaný roztok byl znovu odstraněn, bylo přidáno 500 μ l Wash bufferu a set byl znovu centrifugován při 13 000x g 1 min. Roztok prošlý filtrem byl z kolonky odstraněn a pro odstranění zbytkového Wash bufferu byla kolonka centrifugována při 13 000x g 1 min. Kolonka s navázanou DNA byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky a do kolonky byl vpraven Elution buffer (50 μ l). Po dvou minutách byl kolonkový set centrifugován při 13 000x g 1 min., aby došlo k vymytí DNA a její kumulaci ve sběrné zkumavce.

Získaná čistá DNA ve zkumavce byla dále podrobena testu na nanodropu. Zde byla zjišťována koncentrace nukleové kyseliny. Vzorky s dostatečnou koncentrací nukleové kyseliny byly dále používány při PCR.

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pomocí PCR byl amplifikován úsek 16S rRNA genu. Pro reakční směs (Master mix) PCR byly použity specifické primery převzaté od Sandström (2001) (Tabulka 3) o velikosti amplikonu 1 497 bp.

Tabulka 3: Použité primery

Primer (1 497 bp)	Reverse/Forward	Sekvence primeru (5' - 3')
10F	f	AGTTTGATCATGGCTCAGATTG
1 507R	r	TACCTTGTTACGACTTCACCCCAG

Do jedné mikrozkušavky pro PCR byly napipetovány všechny složky Master mixu (Tabulka 4) a vše bylo dobře promícháno. Do nové mikrozkušavky bylo napipetováno předem vypočítané množství již hotového Master mixu podle množství vzorků a byl přidán 1 μ l DNA.

Tabulka 4: Složení Master mixu

Master mix	Množství (μ l)
ddH ₂ O	7,25
dNTPs	1
10 x PCR buffer	1,25
f primer	0,75
r primer	0,75
Taq polymeráza	0,1
DNA	1

Připravené zkumavky obsahující směs Master mixu a DNA byly vloženy do termocykleru. Pro amplifikaci 16S rRNA genu byl zvolen profil dle Sandströma (2001) uvedený v Tabulce 5. Po dokončení PCR byly vzorky použity pro agarózovou elektroforézu.

Tabulka 5: Profil PCR reakce

Symbiotické bakterie			
primární denaturace		94 °C	60 s
35 x	Denaturace	94 °C	60 s
	Annealing	55 °C	60 s
	Elongace	72 °C	2 min.
závěrečná elongace		72 °C	3 min.

Agarózová elektroforéza

1% agarózový gel byl připraven zahřátím 75 ml 1x koncentrovaného TAE pufru s 0,75 g agarózy. Agarózový gel byl nalit do formy s hřebínky a ponechán k zatuhnutí. Po ztuhnutí byly z formy vyndány hřebínky a vanička s gelem byla ponořena do elektroforetické vany s 1 x TAE puftrem (SERVA). Do první jamky gelu bylo napipetováno 5 µl velikostního markeru (Ladder 200 – 1 500 bp, TopBio), který sloužil pro porovnání velikosti separovaných DNA fragmentů. Dále byly napipetovány 2 µl vzorku, respektive kontroly se 2 µl loading dye (zrnko bromfenolové modři v 30% glycerinu).

Elektroforéza probíhala 45 minut při napětí 120 V. Po ukončení elektroforézy byl gel ponořen na 10 minut do roztoku 1 x TAE pufru s obsahem ethidium bromidu. Následně byl gel vložen do UV – transluminátoru a fotografie výsledného gelu byla zaznamenána pomocí kamery. Při kladném výsledku elektroforézy byla DNA použita jako templát pro sekvenační reakci.

Sekvenování

Z výsledků agarózové elektroforézy byly vybrány pozitivní vzorky. Tyto vzorky byly zaslány do laboratoře (GATC) ke zpracování. Z obdržených sekvencí byla od každého ze tří druhů hlístic vybrána jedna bakterie (Tabulka 6). Tyto 3 bakterie byly kultivovány v tekutém YS mediu a byly dále používány pro množení monoxenických kultur.

Tabulka 6: Bakterie izolované z hlístic

Druh hlístice	Označení druhu	Bakterie	Označení bakterie
<i>Phasmarhabditis bohemica</i>	CH1	<i>Pseudomonas</i> sp.	CH1 (1) L
<i>Phasmarhabditis apuliae</i>	BAR	<i>Acinetobacter</i> sp.	BAR 1 (1) S
<i>Phasmarhabditis bonaquaense</i>	NDV	<i>Flavobacterium</i> sp.	NDV 1 (1)

Izolace vajíček hlístic pro založení monoxenické kultury

Pro izolaci vajíček hlístic byla využita modifikace metodiky podle Lunau *et al.* (1993). Ze založené vodní pasti bylo po 3–4 dnech přendáno 100–150 oplodněných samic do Ringerova roztoku (Woodring a Kaya, 1988). Odtud byly samice přemístěny do zkumavky, do které bylo přidáno 6–8 nastříhaných kousků žiletky.

Pomocí vortexu byly samice homogenizovány 5–10 minut. Po uplynuté době a dokonalém rozmělnění jedinců byl obsah přelit přes sítko z uhelonu 90T (velikost očka 67 μm , tloušťka vlákna 44 μm) do 1,5 ml zkumavky. Zkumavka byla vložena do centrifugy na 1 min. při 0,3x g. Dále byl ze zkumavky odsát supernatant tak, aby zůstal na dně jen pelet. K peletu byl přidán 1 ml sterilizačního roztoku (10 ml sterilní voda, 1,5 ml 4 M NaOH, 0,5 ml NaOCl (12 %)). Zkumavka byla inkubována 4 min. při pokojové teplotě a poté centrifugována 2 min při 0,3x g.

Zkumavka byla přenesena do flowboxu, kde byl odebrán supernatant a přidán 1 ml čistého sterilního YS media. Poté byla zkumavka znovu dána do centrifugy na 2 min. při 0,3x g. Pak byl znovu ve flowboxu odebrán supernatant a přidán 1 ml YS media. Po opětovné centrifugaci byl ve flowboxu odebrán supernatant do objemu 0,1 ml a do zkumavky bylo přidáno 100 μl čistého sterilního YS media.

Do sterilního multiwellu o 24 jamkách bylo do 4 jamek napipetováno po 300 μl YS media. Pomocí sterilní skleněné Pasteurovy pipety bylo z připravené zkumavky do každé ze 4 jamek napipetováno po 50 μl YS média s vajíčky.

Multiwell byl uzavřen parafilmem a uložen v termoboxu při 15 °C po dobu 2–3 dnů. Každý den probíhala kontrola vajíček. Při vylíhnutí sterilních hlístic prvního stádia (L1) byly hlístice přeneseny do kultury čisté bakterie.

Množení monoxenické kultury hlístic

Množení monoxenických kultur probíhalo na pevném kultivačním ledvinovém médiu (viz kapitola 4.3.1). Ve flowboxu bylo nejdříve připraveno inokulum bakterií. Do 1,5 ml zkumavky byl napipetován 1 ml čistého YS média a 50 μl namnožené bakteriální kultury (Tabulka 6). Na jednu polovinu agarové plotny bylo napipetováno 25 μl inokula bakterie a vyžíhanou skleněnou hokejkou bylo inokulum rozetřeno po půlce misky. Na druhou půlku misky byly za pomoci sterilní Pasteurovy pipety z multiwellu přepipetovány vylíhlé larvy (L1).

Takto připravené misky byly vloženy do uzavíratelného sáčku a uloženy v termoboxu při 15 °C. Po 3–4 týdnech byly monoxenické kultury hlístic připravené k pokusům. Monoxenické larvy byly z Petriho misek opláchnuty sterilní vodou ve sterilním prostředí. Po několikrát opakované sedimentaci a promývání sterilní vodou byly dokonale čisté DJs, krátkodobě uskladněny, podobně jako polyxenické kultury.

Z 9 množných kombinací (hlístice x bakterie) se podařilo namnožit pouze 6 kombinací (Tabulka 7), které byly používány při všech pokusech s monoxenickou kulturou.

Tabulka 7: Kombinace množných monoxenických kultur

Druh hlístice	Označení kmene	Bakterie	Označení bakterie	Výsledek
<i>Phasmarhabditis bohemica</i>	CH1	<i>Pseudomonas</i> sp.	CH1 (1) L	Úspěšná kultivace
<i>Phasmarhabditis bohemica</i>	CH1	<i>Acinetobacter</i> sp.	BAR 1 (1) S	Úspěšná kultivace
<i>Phasmarhabditis bohemica</i>	CH1	<i>Flavobacterium</i> sp.	NDV 1 (1)	Úspěšná kultivace
<i>Phasmarhabditis apuliae</i>	BAR	<i>Pseudomonas</i> sp.	CH1 (1) L	Neúspěšná kultivace
<i>Phasmarhabditis apuliae</i>	BAR	<i>Acinetobacter</i> sp.	BAR 1 (1) S	Neúspěšná kultivace
<i>Phasmarhabditis apuliae</i>	BAR	<i>Flavobacterium</i> sp.	NDV 1 (1)	Úspěšná kultivace
<i>Phasmarhabditis bonaquaense</i>	NDV	<i>Pseudomonas</i> sp.	CH1 (1) L	Neúspěšná kultivace
<i>Phasmarhabditis bonaquaense</i>	NDV	<i>Acinetobacter</i> sp.	BAR 1 (1) S	Úspěšná kultivace
<i>Phasmarhabditis bonaquaense</i>	NDV	<i>Flavobacterium</i> sp.	NDV 1 (1)	Úspěšná kultivace

4.2 Hodnocení schopnosti růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v polyxenické a monoxenické kultuře na různých přírodních substrátech a jejich vliv na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje

V tomto pokusu bylo testováno 5 přírodních substrátů. Byl použit kompost, výkaly slimáčků rodu *Deroceras*, homogenizovaní slimáčci (*Deroceras* spp.), homogenizovaná housenka zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) a homogenizovaná

prasečí ledvina. Pro pokus byla použita modifikovaná metodika podle Nermut' *et al.* (2014).

Pro každý substrát bylo použito 5 Petriho misek, přičemž všechny 3 druhy polyxenických hlístic (*P. apuliae*, *P. bohemica* a *P. bonaquaense*) a 6 monoxenických kombinací hlístice x bakterie (Tabulka 7) byly testovány na každém substrátu. Pokus proběhl ve dvou opakováních, celkem tedy bylo využito 150 Petriho misek (55 mm) pro polyxenické a 300 Petriho misek (55 mm) pro monoxenické kultury.

Zmražení jedinci slimáčků, housenek a kousky prasečí ledviny byly nejprve sterilizovány v autoklávu, poté homogenizovány a smíchány s vodou (1 g homogenizované tkáně + 3 ml sterilní vody). Následně byly opět sterilizovány. Výkaly byly nasbírány z chovu slimáčků do skleněné Petriho misky a stejně jako kompost také vysterilizovány.

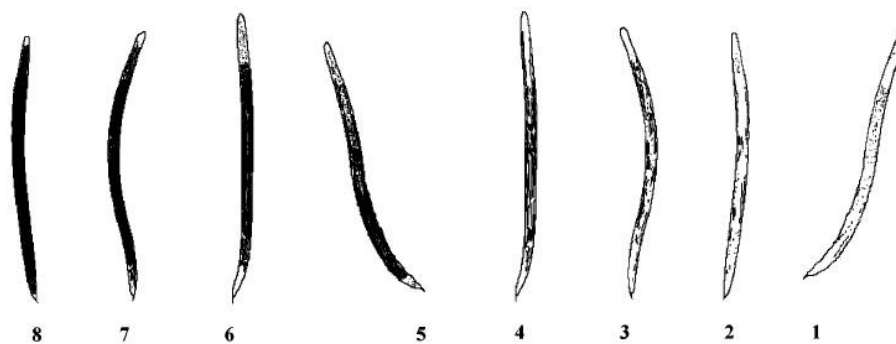
Do sterilních misek byl nalit sterilní 2% čistý agar. Po vychladnutí agaru bylo do misky na analytických vahách naváženo 0,02 g substrátu. Pevný substrát byl přidáván na agarovou plotnu pinzetou a homogenizovaný substrát byl nanášen pipetou s ustříhnutým koncem špičky. Na takto připravenou misku bylo napipetováno cca 20 DJs ve 20 μ l sterilní vody. V případě monoxenických kultury probíhal celý proces založení ve sterilních podmínkách flowboxu.

Misky byly skladovány na plastových tácech s vlhkým filtračním papírem, zabaleny do plastového sáčku proti vysychání. Pokus probíhal při teplotě 15 °C.

Po založení pokusu bylo zahájeno každodenní sledování výskytu prvních dospělců a DJs. Při objevení se prvních dospělců byla vždy jedna miska pro každou kombinaci hlístice/substrát, případně hlístice/bakterie/substrát vypláchnuta stříčkou a přelita do zkumavky. Po sedimentaci byla odsáta přebytečná voda. Zkumavka byla vložena do zahřáté vodní lázně (60 °C) na 30–60 sec. Poté byli usmrcení dospělci napipetováni na podložní sklíčko. Za pomoci mikroskopické techniky (Carl Zeiss Jena) byla u 5–10 samců a 5–10 samic změřena délka těla.

Jakmile se na miskách objevily první DJs, byl ukončen vývoj hlístic na substrátu. Následně byl hodnocen celkový počet DJs a jejich kvalita (délka těla a obsah tuku v těle).

Celkový počet DJs byl stanoven na základě průměrného počtu larev v 10 μ l vody. Pro výpočet průměru byly na podložní sklíčko napipetovány 3 kapky po 10 μ l vody s DJs, následně bylo pod binokulární lupou (Olympus SZH10) sečteno celkové množství larev a stanoven průměr v 10 μ l. Celkový počet DJs pro daný objem tekutiny ve zkumavce byl dopočítán pomocí trojčlenky. Pro zjištění obsahu tuku byla použita standardní metodika podle Patel *et al.* (1997). Jedinci byli stříčkou spláchnuti do zkumavky a po sedimentaci byla odsáta přebytečná voda tak, aby ve zkumavce zůstalo cca méně než 0,5 ml tekutiny. Zkumavka byla vložena do vodní lázně (60 °C) na 5 min. Po uplynutí stanovené doby bylo do zkumavky přidáno 1,5 ml olejové červeně (70 ml 96% ethanolu, 26 ml vody a 0,5 g olejové červeně O) a byla opět vložena do vodní lázně na 20 min. Nakonec byla ze zkumavky odpipetována přebytečná olejová červeně a bylo přidáno 1,5 ml 50% glycerinu (50 ml vody a 50 ml bezvodého glycerinu). Obarvené hlístice byly skladovány přes noc při laboratorní teplotě. U 10 larev byla na mikroskopu (Carl Zeiss Jena) se speciálním okulárem s měřítkem změřena délka těla. Obsah tuku v těle byl hodnocen vizuálně podle standardní tabulky (Obrázek 4).



Obrázek 4: Standardní tabulka pro hodnocení obsahu tuku v těle hlístice. (převzato z Patel *et al.*, 1997)

4.3 Zhodnocení schopnosti růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v pevném a tekutém médiu v polyxenické a monoxenické kultuře

Při tomto pokusu byly použity pro každou polyxenickou kulturu hlístic (CH1, NDV, BAR) a monoxenickou kombinaci hlístice/bakterie (Tabulka 7) 3 Petriho misky (90 mm) a 3 skleničky od přesnídávky HELLO (210 ml). Pokus byl navíc pro každé médium dvakrát opakován v čase, celkem tedy bylo použito 18 Petriho misek a 18 skleniček pro polyxenické kultury a 36 Petriho misek a 36 skleniček pro monoxenické kultury.

4.3.1 Pevné médium

Pro pokus bylo použito tzv. ledvinové médium (Wilson, 2012). Do 500 ml sterilizační lahve bylo přidáno 400 ml vody a naváženo 14 g prasečí ledviny, 10 g kvasničného extraktu a 12 g slunečnicového oleje. Lahev s pootevřeným víčkem byla sterilizována v autoklávu 20 minut při 121 °C. Sterilizovaný obsah byl přes sítko z dvojité vrstvy monofilu přecezen do nové lahve. Poté bylo přidáno 8 g čistého agaru (Duchefa) a lahev byla znovu vložena do autoklávu na 20 min. při 121 °C. Takto připravené médium bylo ve flowboxu rozlito do sterilních Petriho misek a po vychladnutí agaru bylo do každé misky přidáno po 250 DJs příslušné kultury.

Misky byly podle druhů a kombinací vloženy do uzavíratelných sáčků a skladovány v temnu v termoboxu při 15 °C.

Misky byly průběžně kontrolovány, při vytvoření DJs byla 1 miska z pokusu odebrána a podle postupu v kapitole 4.2 byly hlístice obarveny a byl vyhodnocen celkový počet a kvalita jedinců (délka těla a obsah tuku v těle).

4.3.2 Tekuté médium

Jako tekuté médium bylo použito čisté ledvinové médium (bez přídavku agaru, viz pevné médium). Do skleničky bylo naváženo 2,5 g kousků molitanu a odměrným válcem bylo přidáno 25 ml ledvinového média. Zavřená sklenička byla sterilizována 20 min. při 121 °C. Po vychladnutí bylo do každé skleničky přidáno 500 DJs. Sklenička byla poté nechána lehce pootevřena a její víčko bylo překryto alobalem.

Skleničky byly umístěny na ták s vlhkým filtračním papírem a zabaleny do plastového sáčku. Následně byly skleničky uloženy do termoboxu s teplotou 15 °C.

Po 60 dnech byl pokus ukončen. Na dno skleněné Petriho misky (165 mm) byly vloženy dvě špejle a na ně bylo umístěno monofilové sítko, na které byl vysypán celý obsah skleničky. Do misky bylo přidáno takové množství vody, aby bylo dno sítka potopené. Invazní larvy tak samy opustily molitan a koncentrovaly se ve vodě. Po 24 hodinách bylo sítko vyndáno a molitan vymačkán. Celý obsah misky byl přelit do zkumavky. Podle postupu v kapitole 4.2 byly hlístice obarveny a byl hodnocen celkový počet a kvalita jedinců (délka těla a obsah tuku v těle).

4. 4 Testování vlivu aplikace polyxenických a monoxenických kultur hlístic rodu *Phasmarhabditis* na mortalitu a příjem potravy slimáčka síťkovaného (*Dereoceras reticulatum*) a páskovky keřové (*Cepaea hortensis*)

4. 4. 1 Mortalita a příjem potravy slimáčka síťkovaného

Testování vlivu hlístic rodu *Phasmarhabditis* na mortalitu a příjem potravy slimáčků bylo provedeno na velkých (136 mm) a malých (90 mm) Petriho miskách. Doba trvání jednoho pokusu činila 18 dní a pokus byl zopakován dvakrát v čase. Pro testování byly použity polyxenické kultury *P. bohemica*, *P. bonaquaense* a *P. apuliae* a 6 monoxenických kombinací těchto hlístic (Tabulka 7) a slimáčci síťkovaní (*D. reticulatum*). Ke krmení slimáčků byly využity velké (1,265 g, n = 100) a malé (0,078 g, n = 100) psí granule (PROPESKO, drůbeží granule).

V první fázi pokusu byla sledována mortalita slimáčků metodou podle Wilsona (2012). Použito bylo 18 velkých Petriho misek (136 mm) pro polyxenické kultury a 36 stejných Petriho misek pro monoxenické kultury. Pro každou kulturu bylo založeno 5 misek a jedna kontrola, celkem tedy 54 misek.

Do misek bylo naváženo 100 gramů suché hlinité půdy, přidáno 29 ml sterilní vody a celá takto připravená miska byla zahřáta v mikrovlnné troubě. Tímto postupem byla zajištěna spolehlivá likvidace všech jiných živých hlístic, které by se mohly v půdě vyskytovat. Po vychladnutí bylo do misek vloženo 10, respektive 7 (monoxenické kultury) slimáčků síťkovaných a napipetováno 13 000 invazních larev příslušné kultury v 1 mililitru sterilní vody. Celkový objem přidané tekutiny v misce tedy činil 30 ml. Kontrolní misky byly připraveny stejným způsobem, nebyly do nich však přidány invazní larvy hlístic, pouze sterilní voda o celkovém objemu 30 ml.

Následně byla do každé misky vložena jedna velká granule, která byla každý 4. den obměňována. Petriho misky byly uzavřeny parafilmem a uloženy v chladicím boxu při teplotě 15 °C. Po třech dnech bylo ze souboru 54 misek odděleno 9 misek (pro každou kulturu jedna), které sloužily pro druhou část pokusu.

Ve druhé fázi byl sledován vliv aplikace hlístic na příjem potravy slimáčků. Pro každou polyxenickou kulturu bylo založeno 10 misek (opakování) a 5 misek kontrolních, celkem tedy 35 Petriho misek (90 mm). Pro monoxenické kultury bylo použito celkem 47 Petriho misek (90 mm), přičemž pro každou kombinaci hlístice x bakterie bylo založeno 7 opakování. Dále bylo připraveno 5 kontrolních misek, které představovaly kontrolu pro všechny kombinace.

Do všech Petriho misek byl vložen filtrační papír, napipetováno 750 µl sterilní vody a přidána malá granule, která byla každý druhý den vyměňována za novou. Do každé takto připravené misky byl jednotlivě vložen slimáček odebraný z velké Petriho misky (první fáze pokusu). Pro kontrolu bylo použito 5 hlísticemi neinfikovaných slimáčků z laboratorního chovu. Všechny misky byly vloženy do mikrotenového sáčku a ponechány v chladicím boxu při teplotě 15 °C. Mortalita slimáčků byla zaznamenávána každý den. Odebrané granule byly vysušeny (5 hod. při 60 °C) a následně zváženy. Příjem potravy byl vyhodnocen jako úbytek váhy granule.

4. 4. 2 Mortalita a příjem potravy páskovky keřové

Páskovka keřová (*Cepaea hortensis*) byla vybrána jako necílový organismus. Pro obě kultury hlístic (monoxenické i polyxenické) byla použita totožná metodika zakládání pokusu. K experimentu byly využívány 12jamkové multiwelly. Pro polyxenické kultury byly založeny 3 multiwelly plus 1 kontrola a pro monoxenické kultury 6 multiwellů plus 1 kontrola.

Do každé jamky multiwellu bylo přidáno 11 g křemičitého akvarijního písku (0,8 mm). Následně bylo do každé jamky napipetováno 1 000 DJs v 1 ml sterilní vody a 200 µl čisté vody tak, aby výsledný objem činil 1,2 ml. Poté byla do každé jamky vložena páskovka a přidána malá psí granule (0,078 g, n = 100), která byla vyměňována každý třetí den.

Takto připravené a zavřené multiwelly byly uchovávány v chladicím boxu při teplotě 15 °C. Každý den byla zaznamenávána mortalita páskovek. Odebrané granule

byly vysušeny (5 hod. při 60 °C) a následně zváženy. Příjem potravy byl vyhodnocen jako úbytek hmotnosti granule oproti průměrné hmotnosti.

4. 5 Statistické vyhodnocení dat

Základní zpracování dat proběhlo v tabulkovém editoru Microsoft Office Excel 2013, kde byly vytvořeny všechny prvotní datové soubory. Ty byly následně statisticky vyhodnoceny v programu STATISTICA 10 (StatSoft, Inc.). Pro statistické hodnocení dat byla použita analýza variancí (ANOVA) a následný Tukeyho HSD test. Za účelem dosažení normality dat byla provedena logaritmická transformace všech závislých proměnných.

Výsledky analýzy byly graficky zobrazeny pomocí kategorizovaných boxplot grafů, kde středový čtvereček zobrazuje hodnotu průměru, box okolo něj střední chybu průměru (tedy přesnost odhadu průměru) a paprsky (tzv. fousy) směrodatnou odchylku (tedy údaj o variabilitě dat). Pro konstrukci grafu byla použita surová (netransformovaná) data.

5 VÝSLEDKY

5.1 Hlístice použité pro experiment

Pro následující experimenty bylo zamýšleno 9 monoxenických kombinací (3 druhy hlístic se třemi druhy bakterií). Ve třech případech však kultura příslušné bakterie nepodporovala růst hlístice (Tabulka 7). Z toho důvodu nemohly být tyto kombinace použity v následujících experimentech.

5.2 Schopnost růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v polyxenické a monoxenické kultuře na různých přírodních substrátech a jejich vliv na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje

5.2.1 Rychlost vývoje dospělců

Na rychlost vývoje dospělců měl prokazatelný vliv druh hlístic ($df = 2$, $F = 4,4$, $p < 0,05$), asociovaná bakteriální kultura ($df = 3$, $F = 62,9$, $p < 0,001$) a také substrát, na kterém se hlístice vyvíjely ($df = 4$, $F = 206,7$, $p < 0,001$). Mezi samci a samicemi nebyl zaznamenán žádný rozdíl v rychlosti vývoje.

Dospělci polyxenických kultur se vyvíjely v průměru 6 ± 1 dní a nebyl zde zaznamenán větší rozdíl mezi druhy hlístic. Oproti polyxenickým kulturám se monoxenické kultury vyvíjely mírně rychleji, v průměru 5 ± 1 den, ale také zde nebyl větší rozdíl mezi druhy.

V rámci jednotlivých druhů byla rychlost vývoje značně vyrovnaná a pohybovala se mezi 5–6 dny.

I mezi substráty byl čas potřebný pro vývoj dospělců značně vyrovnaný. Nicméně celkově u sedmi z devíti kombinací (druh x bakterie) bylo patrné, že vývoj dospělců na živočišných substrátech (homogenizovaná ledvina, slimáček a housenka) byl rychlejší nežli na kompostu a výkalech slimáčků. Z živočišných substrátů se dospělci nejrychleji vyvíjeli na homogenizovaném slimáčkově (4 ± 1 dní).

5. 2. 2 Délka těla dospělců

Samice

Na délku těla samic (Graf 1) měl prokazatelný vliv druh hlístice ($df = 2$, $F = 16$, $p < 0,001$), asociovaná bakteriální kultura ($df = 3$, $F = 99$, $p < 0,001$) a substrát, na kterém se samice vyvíjely ($df = 4$, $F = 3$, $p < 0,05$).

Polyxenické samice dorůstaly průměrné délky $1\,534 \pm 161 \mu\text{m}$. Nejdelší z nich byl druh *Phasmarhabditis apuliae*, jehož samice dorůstaly průměrné délky $1\,583 \pm 156 \mu\text{m}$, samice *P. bonaquaense* byly mírně kratší $1\,534 \pm 157 \mu\text{m}$ a samice *P. bohémica* pak dorůstaly pouhých $1\,485 \pm 157 \mu\text{m}$. Největších rozměrů dorůstaly samice na homogenizovaném slimáčkovi, v průměru $1\,594 \pm 152 \mu\text{m}$, zatímco na výkalech byla průměrná délka samic jen $1\,442 \pm 138 \mu\text{m}$. V kombinaci druhu a substrátu byl nejvýraznější rozdíl ($p < 0,001$) v délkách u samic mezi druhy *P. apuliae* na homogenizovaném slimáčkovi ($1\,720 \pm 125 \mu\text{m}$) a *P. bohémica* na kompostu ($1\,367 \pm 102 \mu\text{m}$), kde samice dorůstaly celkově nejmenších délek.

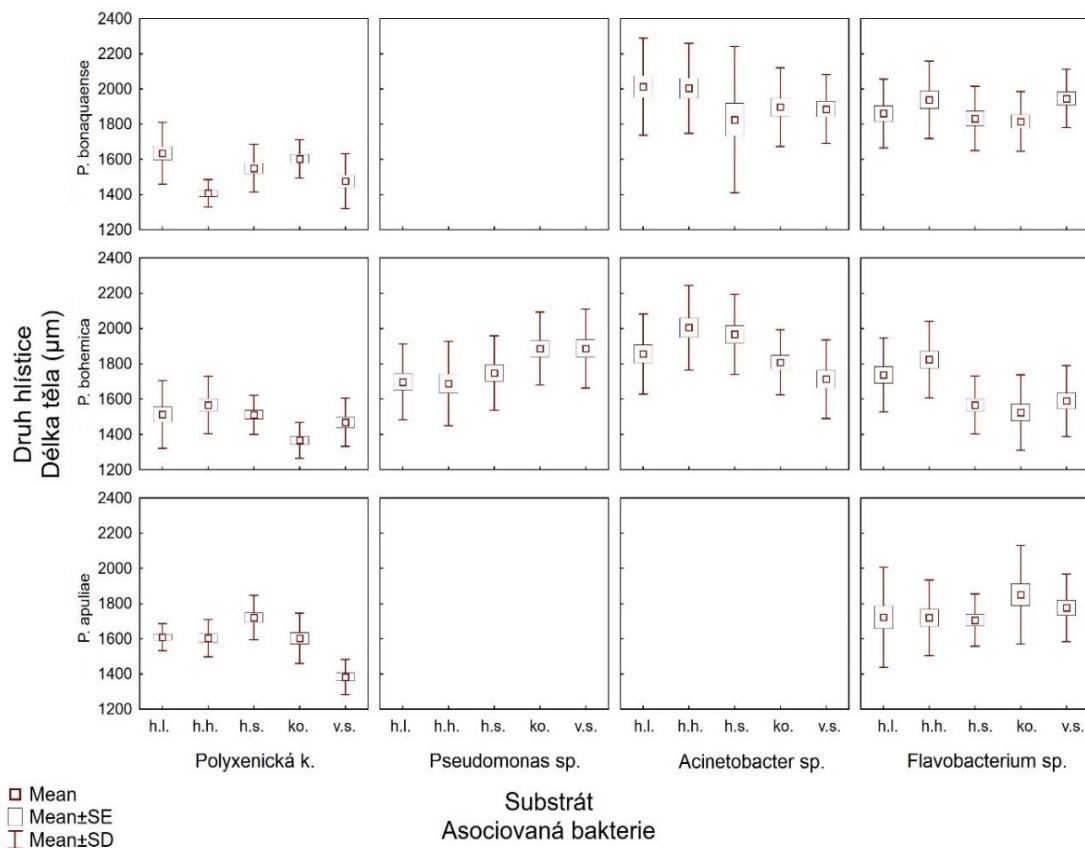
V monoxenických kulturách dorůstaly samice v průměru délky $1\,809 \pm 254 \mu\text{m}$. Z nich nejvýraznější statistický rozdíl ($p < 0,001$) byl mezi druhem *P. bonaquaense* s asociovanou bakterií *Acinetobacter* sp. ($1\,925 \pm 288 \mu\text{m}$) a druhem *P. bohémica* s bakterií *Flavobacterium* sp. ($1\,648 \pm 228 \mu\text{m}$). V průměru dorůstaly samice největších délek v kultuře s bakterií *Acinetobacter* sp. ($1\,897 \pm 266 \mu\text{m}$) a nejmenších velikostí naopak na bakterii *Flavobacterium* sp. ($1\,760 \pm 237 \mu\text{m}$). Absolutně největší délky dorůstaly samice druhu *P. bonaquaense* ($1\,924 \pm 288 \mu\text{m}$) a *P. bohémica* ($1\,870 \pm 241 \mu\text{m}$) v kultuře s bakterií *Acinetobacter* sp. na homogenizované housence, zatímco u druhu *P. bohémica* s bakterií *Pseudomonas* sp. na homogenizované ledvině byly samice nejmenší ($1\,698 \pm 214 \mu\text{m}$) (Graf 1).

Samice druhu *P. bonaquaense* ($1\,779 \pm 280 \mu\text{m}$) byly bez ohledu na bakteriální kulturu a substrát oproti ostatním druhům hlístic větší. Na rozdíl od druhu *P. bohémica* ($1\,696 \pm 261 \mu\text{m}$) a *P. apuliae* ($1\,669 \pm 215 \mu\text{m}$) které dorůstaly menších délek.

Statisticky významně ($p < 0,001$) větší samice produkovaly monoxenické kultury ($1\,809 \pm 254 \mu\text{m}$) na rozdíl od polyxenických kultur ($1\,534 \pm 161 \mu\text{m}$), kde byly samice menší.

V rámci substrátů byly délky samic poměrně vyrovnané a pohybovaly se v rozmezí cca 1 680–1 751 μm . Nicméně větších délek průkazně ($p < 0,05$) dorůstaly samice na živočišných substrátech. Konkrétně nejdelší samice byly na homogenizované housence (1 751 \pm 279 μm), o něco menších délek dorůstaly na homogenizované ledvině (1 738 \pm 253 μm) a homogenizovaném slimáčkovi (1 713 \pm 250 μm). O něco menších délek nežli na živočišných substrátech dorůstaly samice na kompostu (1 706 \pm 256 μm) a úplně nejmenších délek dosahovaly samice na výkalech slimáčků (1 680 \pm 266 μm).

Zaznamenány byly také některé překvapivé výjimky, kdy samice byly větší na výkalech a kompostu nežli na živočišných substrátech. Tento jev byl pozorován u druhu *P. bohemica* s bakterií *Pseudomonas* sp. a druhu *P. apuliae* s bakterií *Flavobacterium* sp. (Graf 1).



Graf 1: Délka těla samic tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na různých substrátech v kombinaci s různými bakteriemi. h.l. – homogenizovaná prasečí ledvina, h.h. – homogenizovaná housenka zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), h.s. - homogenizovaný slimáček (*Deroceras* spp.), ko. – kompost, v.s. - výkaly slimáčků rodu *Deroceras*.

Samci

Podobně jako u samic i na délku samců (Graf 2) měl statisticky významný vliv druh hlístice ($df = 2$, $F = 50$, $p < 0,001$), kultura asociované bakterie ($df = 3$, $F = 228$, $p < 0,001$) a substrát, na kterém dospělci vyrůstali ($df = 4$, $F = 28$, $p < 0,001$).

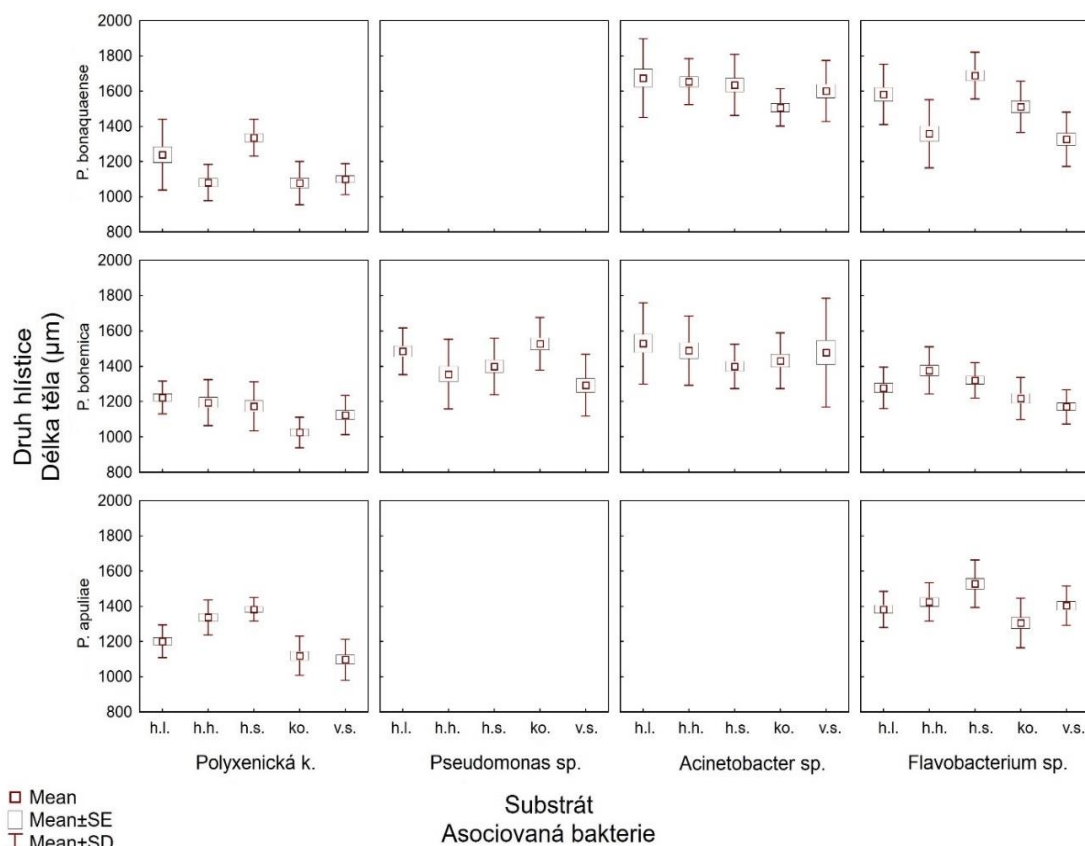
Polyxeničtí samci dorůstaly průměrné délky $1\,181 \pm 153 \mu\text{m}$. Nejdelší samci z polyxenických kultur byli u druhu *P. apuliae* ($1\,227 \pm 150 \mu\text{m}$), zatímco nejmenší druh byl *P. bohemica* ($1\,148 \pm 132 \mu\text{m}$). Z pohledu substrátů byl zaznamenán největší rozdíl v délkách ($p < 0,001$) mezi homogenizovaným slimáčkem ($1\,297 \pm 139 \mu\text{m}$) a výkaly slimáčků ($1\,107 \pm 105 \mu\text{m}$). V kombinaci substrátu a druhu byl nejvýraznější rozdíl ($p < 0,001$) mezi druhem *P. apuliae* na homogenizovaném slimáčkovi ($1\,383 \pm 67 \mu\text{m}$) a druhem *P. bohemica* na kompostu ($1\,025 \pm 87 \mu\text{m}$), kde byli samci zřetelně nejmenší.

Monoxeničtí samci dorůstali v průměru $1\,444 \pm 205 \mu\text{m}$. Největší samci byli zaznamenáni u druhu *P. bonaquaense* s bakterií *Acinetobacter* sp. ($1\,614 \pm 173 \mu\text{m}$), zatímco nejmenších délek dosahoval druh *P. bohemica* s bakterií *Flavobacterium* sp. ($1\,273 \pm 134 \mu\text{m}$). U ostatních kombinací byly délky poměrně vyrovnané v rozmezí cca $1\,408$ – $1\,493 \mu\text{m}$. Všeobecně největších délek dorůstali samci v kombinaci s bakterií *Acinetobacter* sp. ($1\,539 \pm 208 \mu\text{m}$), zatímco nejmenších délek dorůstali samci s bakterií *Flavobacterium* sp. ($1\,391 \pm 187 \mu\text{m}$). Z pohledu substrátů byly největší rozdíly ($p < 0,001$) mezi samci hlístic v kombinaci s bakterií *Acinetobacter* sp. na homogenizované ledvině ($1\,539 \pm 208 \mu\text{m}$) a samci s bakterií *Pseudomonas* sp. na výkalech ($1\,292 \pm 208 \mu\text{m}$).

Prokazatelně ($p < 0,001$) delší samci byli u monoxenických kultur ($1\,444 \pm 205 \mu\text{m}$) než u polyxenických kultur ($1\,181 \pm 153 \mu\text{m}$). Mezi druhy byly jasně největší samci u druhu *P. bonaquaense* ($1\,424 \pm 263 \mu\text{m}$), zatímco u druhu *P. bohemica* ($1\,324 \pm 209 \mu\text{m}$) a *P. apuliae* ($1\,318 \pm 170 \mu\text{m}$) byla délka značně menší a vyrovnaná.

Samci dorůstali průkazně ($p < 0,001$) větších délek na živočišných substrátech. Největší z nich byli na homogenizovaném slimáčkovi ($1\,429 \pm 199 \mu\text{m}$), o něco menší délky dorůstali na homogenizované ledvině ($1\,399 \pm 228 \mu\text{m}$) a homogenizované housence ($1\,363 \pm 212 \mu\text{m}$). Stejně jako tomu bylo u samic, tak i zde zřetelně menších délek dorůstali samci na kompostu ($1\,302 \pm 227 \mu\text{m}$) a výkalech ($1\,288 \pm 233 \mu\text{m}$).

I zde byla zaznamenána jedna výjimka, kdy samci druhu *P. bohémica* s bakterií *Pseudomonas* sp. dosahovali větších délek na kompostu nežli na ostatních substrátech.



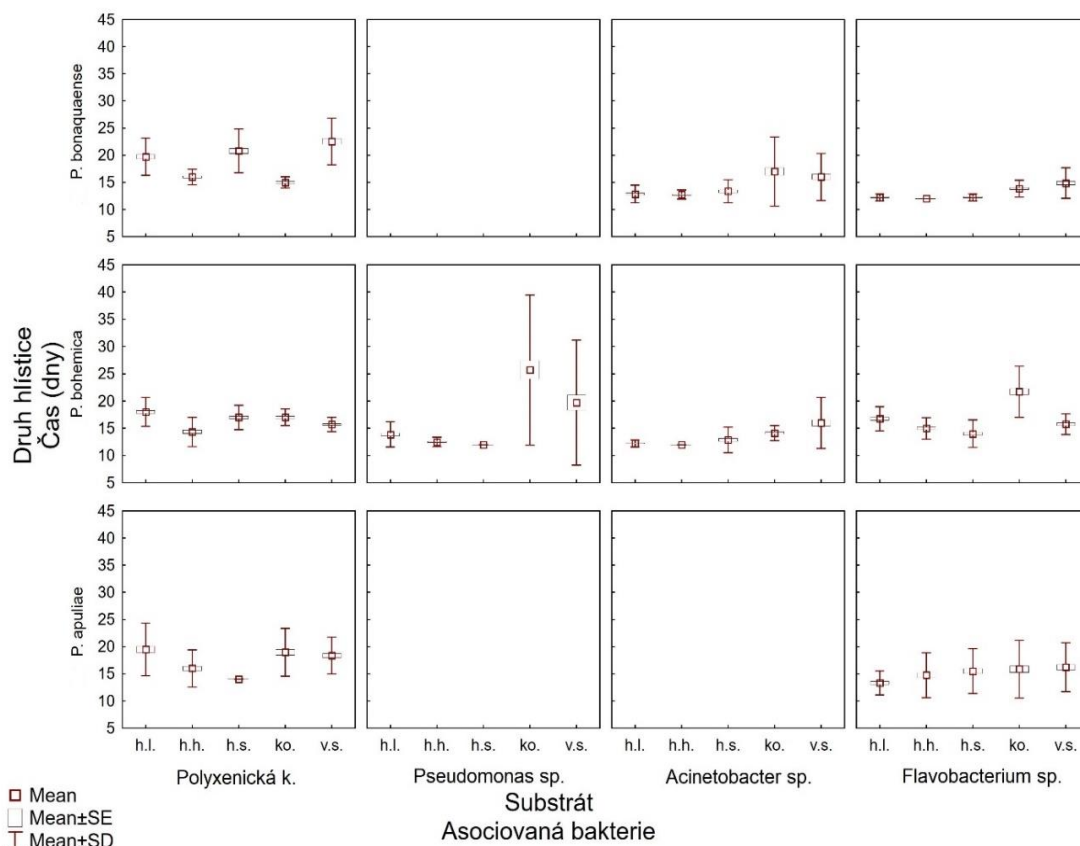
Graf 2: Délka těla samců tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na různých substrátech v kombinaci s různými bakteriemi. h.l. – homogenizovaná prasečí ledvina, h.h. – homogenizovaná housenka zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), h.s. - homogenizování slimáčky (*Deroceras* spp.), ko. – kompost, v.s. - výkaly slimáčků rodu *Deroceras*.

5. 2. 3 Rychlost vývoje larev

Rychlost vývoje larev (Graf 3) byla významně ovlivněna asociovanou bakterií (df = 3, F = 202,9, p < 0,001) a také použitým substrátem (df = 4, F = 116,3, p < 0,001). Naopak u druhu hlístice efekt na rychlost vývoje larev prokázán nebyl (df = 2, F = 0,4, p = 0,686). Průměrná doba vývoje se pohybovala relativně vyrovnaně okolo 16 ± 5 dní.

Délka vývoje polyxenických kultur bez ohledu na druh hlístice, bakterii či substrát trvala v průměru 18 ± 4 dní. Průkazně (p < 0,001) nejrychlejší vývoj larev byl zaznamenán u druhu *P. bohémica* (16 ± 3 dní), zatímco nejpomaleji se vyvíjely larvy druhu *P. bonaquaense* (19 ± 4). V nejkratším čase se vyvinuly larvy na homogenizované

houseince (15 ± 3 dní) dní. Na ostatních substrátech probíhal vývoj poměrně vyrovnaně. Nejvýraznější rozdíl v rychlosti vývoje larev ($p < 0,001$) byl zaznamenán mezi druhem *P. apuliae* na homogenizovaném slimáčkovi (14 ± 0 dní) a druhem *P. bonaquaense* na výkalech (23 ± 4 dní).



Graf 3: Rychlost vývoje invazních larev tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na různých substrátech. h.l. – homogenizovaná prasečí ledvina, h.h. – homogenizovaná housenka zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), h.s. - homogenizovaní slimáčci (*Deroceras* spp.), ko. – kompost, v.s. - výkaly slimáčků rodu *Deroceras*.

U monoxenických kultur trval vývoj v průměru 15 ± 5 dní. Prokazatelně rychlejší vývoj larev ($p < 0,001$) byl zaznamenán u druhů hlístic s bakterií *Acinetobacter* sp. (14 ± 4 dní), zatímco nejpomalejší vývoj byl u hlístic asociovaných s bakterií *Pseudomonas* sp. (17 ± 10 dní). Nejrychleji (13 ± 2 dní) se vyvinuly larvy druhů *P. bohemica* s bakterií *Acinetobacter* sp. a *P. bonaquaense* s bakterií *Flavobacterium* sp., na rozdíl od druhu *P. bohemica* s bakterií *Pseudomonas* sp. a s bakterií *Flavobacterium* sp., kde vývoj trval přibližně 17 ± 7 dní (Graf 3). Nejvýraznější rozdíly

ve vývoji larev ($p < 0,001$) byly zaznamenány mezi *P. bohemica* s bakterií *Pseudomonas* sp. na kompostu (26 ± 14 dní) a výkalech (20 ± 11 dní) a *P. bohemica* s bakterií *Flavobacterium* sp. na kompostu (22 ± 5 dní), kde byly časy potřebné pro vývoj nejdelší a *P. bohemica* s bakterií *Pseudomonas* sp. na homogenizovaném slimáčku (12 ± 0 dní) a s bakterií *Acinetobacter* sp. na homogenizované housence (12 ± 1 dní), kde byly časy vývoje naopak nejkratší.

Larvy monoxenických kultur se vyvíjely průkazně ($p < 0,001$) rychleji (15 ± 5 dní) než larvy kultur polyxenických (18 ± 4 dní). V rámci všech tří druhů hlístic byla délka vývoje značně vyrovnaná, neboť se průměrné doby vývoje pohybovaly v rozmezí $15-16 \pm 4$ dní.

Z pohledu substrátů byl statisticky významně ($p < 0,001$) nejkratší časový interval vývoje zaznamenán u živočišných substrátů. Z těchto substrátů se nejrychleji vyvíjely larvy na homogenizované housence (14 ± 3 dní), poté na homogenizovaném slimáčkovi (15 ± 4 dní) a o něco pomaleji na homogenizované ledvině (16 ± 4 dní). Celkově nejpomaleji probíhal vývoj na kompostu (18 ± 7 dní) a výkalu (17 ± 5 dní).

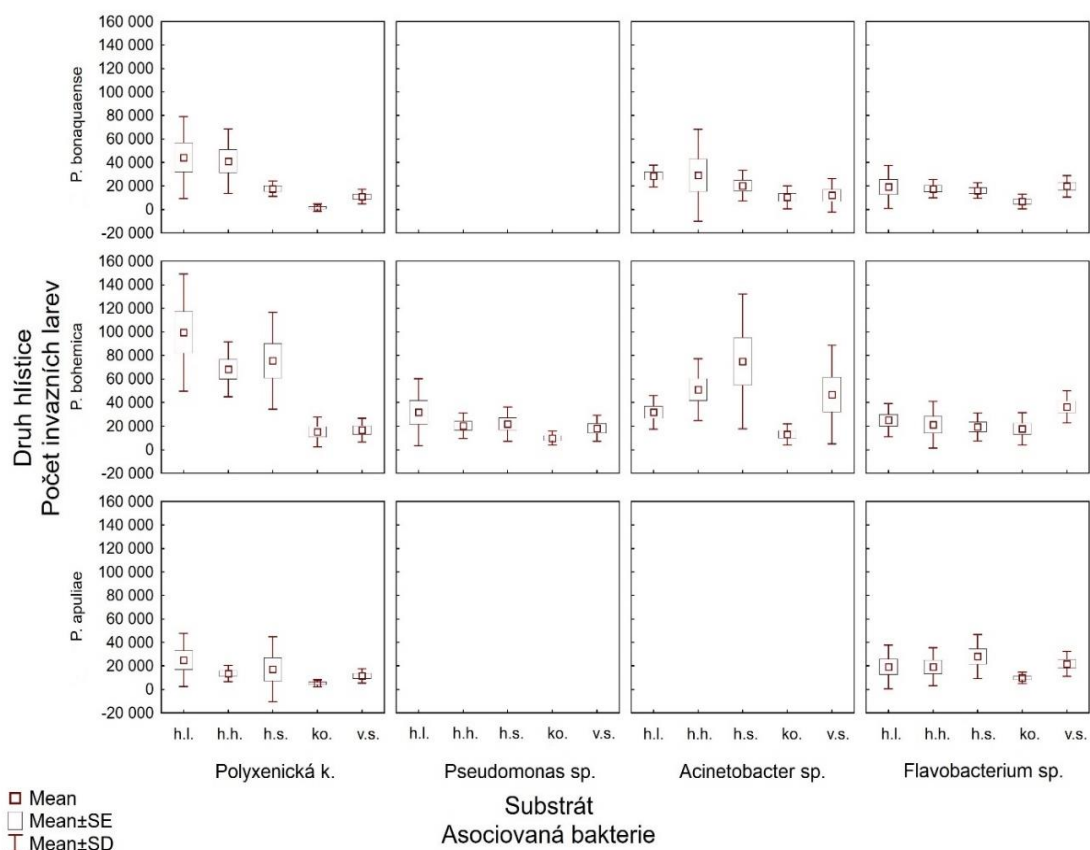
5. 2. 4 Produkce potomstva

Produkce potomstva (Graf 4) byla statisticky významně ovlivněna druhem hlístice ($df = 2$, $F = 6,211$, $p < 0,001$), asociovanou bakterií ($df = 3$, $F = 3,232$, $p < 0,05$) a substrátem ($df = 4$, $F = 12,396$, $p < 0,001$). I když měly všechny sledované parametry statisticky významný vliv na produkci potomstva, je nezbytné zmínit, že hodnocená data vykazují značnou variabilitu.

Polyxenické kultury vyprodukovaly v průměru $30\,852 \pm 35\,894$ DJs/g. Prokazatelně ($p < 0,001$) nejvíce larev vyprodukoval druh *P. bohemica* ($54\,986 \pm 45\,245$ DJs/g), zatímco druh *P. apuliae* vyprodukoval průměrných $14\,463 \pm 17\,033$ DJs/g. Nejvíce se polyxenickým druhům dařilo produkovat larvy na homogenizovaném slimáčkovi ($56\,238 \pm 48\,141$ DJs/g), naproti tomu na kompostu byla produkce potomstva nejnižší ($7\,279 \pm 9\,376$ DJs/g).

Monoxenické kultury vyprodukovaly průměrně $23\,923 \pm 23\,366$ DJs/g. Nejvíce larev produkoval druh *P. bohemica* s bakterií *Acinetobacter* sp. ($43\,524 \pm 38\,937$ DJs/g), zatímco nejméně larev vyprodukoval druh *P. bonaquaense* s bakterií *Flavobacterium* sp. ($15\,916 \pm 11\,158$ DJs/g) (Graf 4). Z pohledu asociované bakterie byly největší produkce

larev zaznamenány u druhů s bakterií *Acinetobacter* sp. ($31\,804 \pm 33\,223$ DJs/g), kdežto nejméně potomstva vyprodukovaly druhy s bakterií *Flavobacterium* sp. ($19\,843 \pm 14\,420$ DJs/g). Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) v rámci kombinace druhů a substrátů v produkci potomstva byl vyzorován u hlístic s bakterií *Acinetobacter* sp. na homogenizovaném slimáčkovi ($47\,637 \pm 49\,114$ DJs/g), kde byla produkce zcela nejvyšší, a *P. bohémica* s bakterií *Pseudomonas* sp. na kompostu ($9\,881 \pm 5\,866$ DJs/g), kde byla produkce larev nejnižší.



Graf 4: Množství vyprodukovaného potomstva tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na 1 gram substrátu. h.l. – homogenizovaná prasečí ledvina, h.h. – homogenizovaná housenka zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), h.s. - homogenizovaní slimáčki (*Deroceras* spp.), ko. – kompost, v.s. - výkaly slimáčků rodu *Deroceras*.

Z celkového hlediska byl zaznamenán statisticky výrazný rozdíl ($p < 0,05$) mezi oběma typy kultur. Polyxenické kultury produkovaly prokazatelně více larev ($30\,852 \pm 35\,894$ DJs/g) nežli monoxenické kultury ($23\,923 \pm 23\,366$ DJs/g). Druh *P. bohémica* produkoval celkově nejvíce ($35\,713 \pm 34\,728$ DJs/g) larev na rozdíl

od druhu *P. bonaquaense* ($19\,203 \pm 20\,231$ DJs/g) a *P. apuliae* ($17\,065 \pm 16\,273$ DJs/g). Absolutně největší produkce larev byla zaznamenána v polyxenické kultuře u druhu *P. bohémica* na homogenizované ledvině ($99\,469 \pm 49\,727$ DJs/g), zatímco nejmenší produkce larev byla také na polyxenické kultuře ale u druhu *P. apuliae* na kompostu ($5\,188 \pm 2\,934$ DJs/g).

Větší produkce potomstva byla jasně zřetelná na živočišných substrátech (Graf 4). Z nich nejvíce larev bylo na homogenizované ledvině ($36\,037 \pm 34\,227$ DJs/g) a poté na homogenizovaném slimáčkovi ($32\,331 \pm 34\,709$ DJs/g) a homogenizované housence ($31\,291 \pm 27\,193$ DJs/g). Výrazně menší produkce nežli na živočišných substrátech byla u výkalů ($21\,567 \pm 19\,932$ DJs/g), ale absolutně nejmenší počet larev byl vyprodukován na kompostu ($9\,938 \pm 9\,238$ DJs/g).

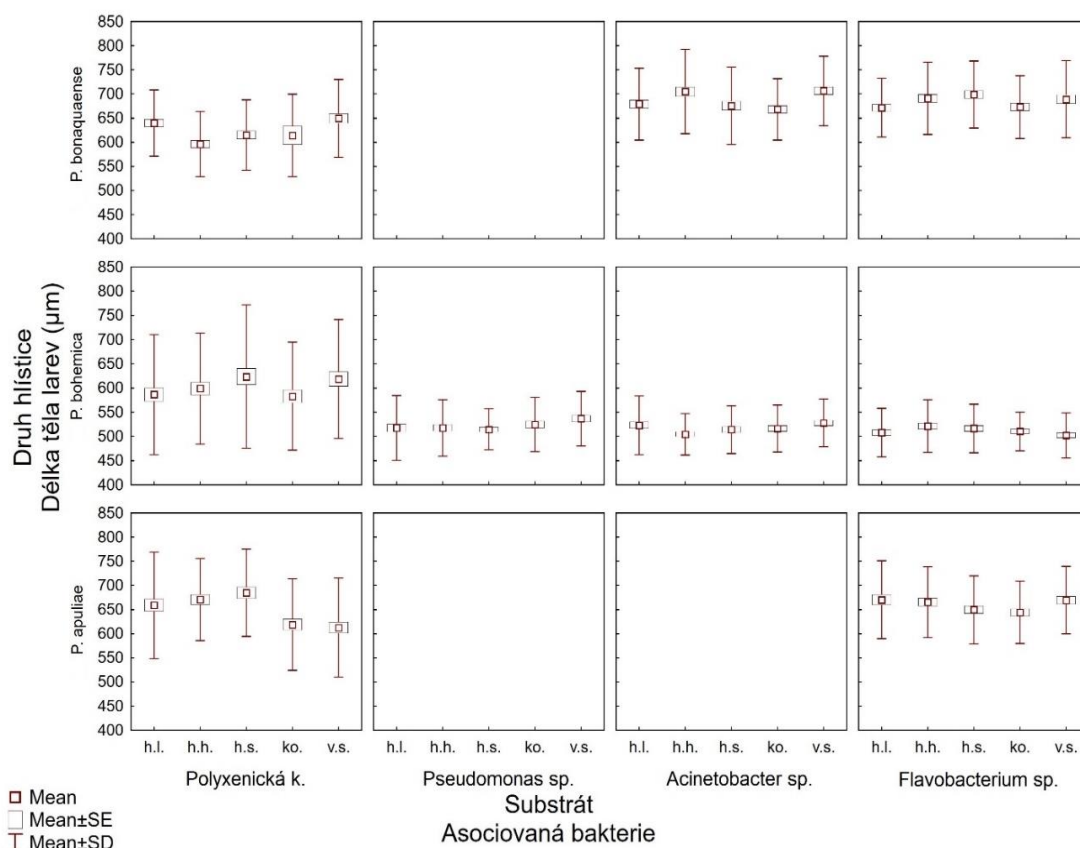
5. 2. 5 Délka těla larev

Délka těla invazních larev (Graf 5) byla statisticky významně ovlivněna druhem hlístice ($df = 2$, $F = 793$, $p < 0,001$) a asociovanou bakterií ($df = 3$, $F = 8$, $p < 0,001$), nikoliv však substrátem ($df = 4$, $F = 2$, $p = 0,113$).

Polyxenické druhy dorůstaly na substrátech průměrné délky 624 ± 106 μm . Průkazně ($p < 0,001$) nejdelší polyxenický druh byl *P. apuliae* (647 ± 101 μm), zatímco nejmenší (602 ± 126 μm) druh byl *P. bohémica*. Prokazatelně ($p < 0,05$) největších délek dorůstaly larvy na homogenizovaném slimáčkovi (637 ± 114 μm) na rozdíl od kompostu (602 ± 102 μm), kde byly larvy nejmenší. Druh *P. apuliae* produkoval největší larvy (685 ± 90 μm) na homogenizovaném slimáčkovi, zatímco nejmenší larvy produkoval druh *P. bohémica* (582 ± 112 μm) na kompostu .

Monoxenické druhy dorůstaly průměrné délky (597 ± 103 μm). Druh *P. bonaquaense* s bakterií *Acinetobacter* sp. (686 ± 77 μm) produkoval největší larvy. Nejmenší larvy byly u druhu *P. bohémica* s bakterií *Flavobacterium* sp. (512 ± 49 μm). Z pohledu asociované bakterie dorůstaly největších délek druhy hlístic s bakterií *Flavobacterium* sp. (618 ± 100 μm), zatímco nejmenší larvy byly u druhů s bakterií *Pseudomonas* sp. (522 ± 57 μm). Prokazatelně ($p < 0,001$) největší larvy byly u druhů s bakterií *Flavobacterium* sp. na homogenizované housence (626 ± 101 μm), zatímco nejmenší larvy byly na homogenizovaném slimáčkovi (515 ± 42 μm) u hlístic s bakterií *Pseudomonas* sp. (Graf 5).

Na rozdíl od monoxenických kultur ($597 \pm 103 \mu\text{m}$), největší larvy produkovaly polyxenické kultury ($624 \pm 106 \mu\text{m}$). V rámci druhů a substrátů byly největší larvy u druhu *P. bonaquaense* ($667 \pm 80 \mu\text{m}$) a na výkalech ($613 \pm 106 \mu\text{m}$), zatímco nejmenší larvy byly na kompostu ($595 \pm 95 \mu\text{m}$) a u druhu *P. bohémica* ($537 \pm 87 \mu\text{m}$).



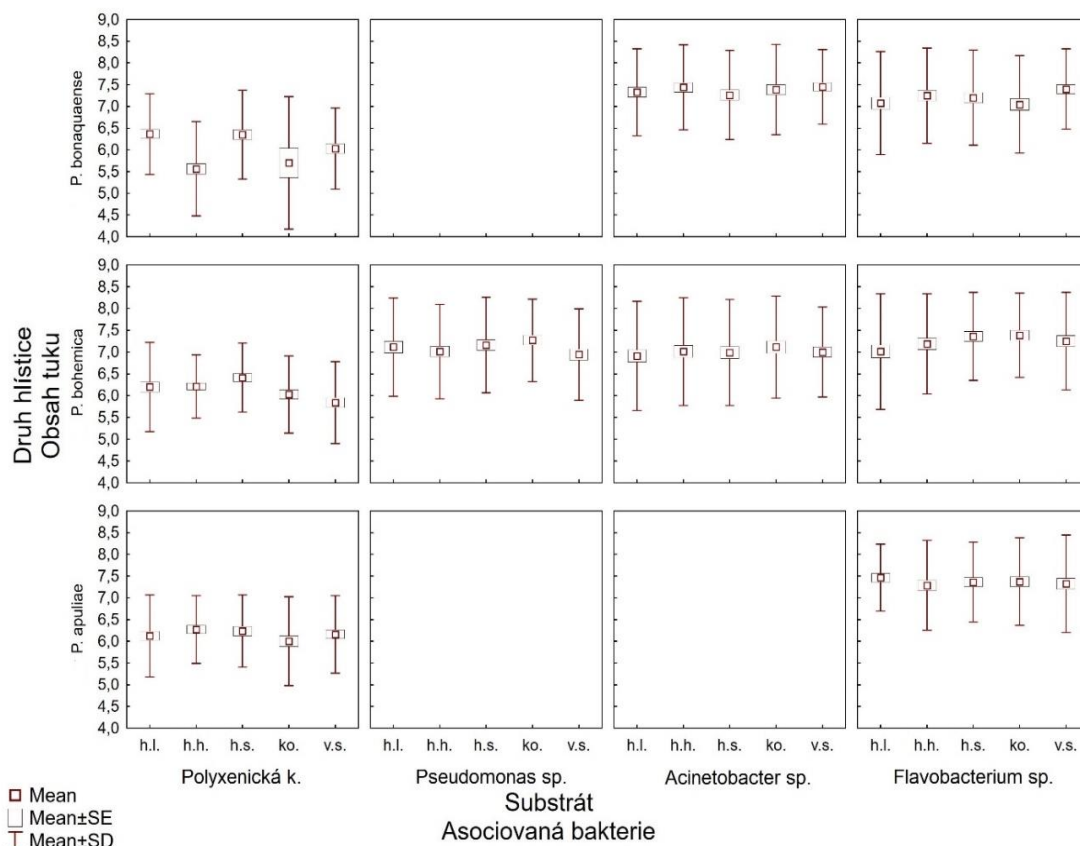
Graf 5: Délka těla invazních larev tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na různých substrátech. h.l. – homogenizovaná prasečí ledvina, h.h. – homogenizovaná housenka zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), h.s. - homogenizovaní slimáčkovi (*Deroceras* spp.), ko. – kompost, v.s. - výkaly slimáčků rodu *Deroceras*.

5. 2. 6 Obsah tuku v těle larev

Obsah tuku v těle invazních larev (Graf 6) byl významně ovlivněn druhem hlístice ($df = 2$, $F = 2,9$, $p < 0,05$) a asociovanou bakterií ($df = 3$, $F = 234$, $p < 0,001$). Neprůkazný byl vliv substrátu ($df = 4$, $F = 1,6$, $p = 0,183$).

Polyxenické hlístice měly na jednotlivých substrátech poměrně vyrovnaný obsah tuku. Nejvyšší obsah tuku ($6,3 \pm 1$) byl zaznamenán u polyxenických larev na homogenizovaném slimáčkově, ale u ostatních substrátů dosahovaly larvy velmi podobného indexu ($6,1 \pm 1$). Nejvyšší index obsahu tuku ($6,4 \pm 1$) byl zaznamenán

u larev druhu *P. bonaquaense* na homogenizované ledvině a slimáčkovi a u druhu *P. bohémica* na homogenizovaném slimáčkovi. Nejnižší index tuku ($5,6 \pm 1$, respektive $5,7 \pm 1$) byl pozorován u druhu *P. bonaquaense* na homogenizované housence a kompostu.



Graf 6: Obsah tuku v těle invazních larev tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na různých substrátech. h.l. – homogenizovaná prasečí ledvina, h.h. – homogenizovaná housenka zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), h.s. - homogenizovaní slimáčci (*Deroceras* spp.), ko. – kompost, v.s. - výkaly slimáčků rodu *Deroceras*.

U monoxenických hlístic byl průměrný index tuku $7,2 \pm 1,1$. Významný rozdíl v indexu tuku v rámci použitých bakterií ($p < 0,05$) byl mezi bakterií *Flavobacterium* sp. ($7,3 \pm 1$) a *Pseudomonas* sp. ($7,1 \pm 1$). Absolutně nejvyšší index tuku ($7,4 \pm 1$) byl zaznamenán u druhu *P. bonaquaense* s bakterií *Acinetobacter* sp. a taktéž u druhu *P. apuliae* s bakterií *Flavobacterium* sp. (Graf 6). U ostatních kombinací (hlístice x bakterie) byl index tuku značně vyrovnaný. Obsah tuku larev z pohledu

použitých substrátů byl taktéž bez významnějších rozdílů. V rámci všech substrátů dosahoval v průměru index tuku $7,2 \pm 1$.

Prokazatelně ($p < 0,001$) larvy monoxenických kultur ($7,2 \pm 1$) obsahovaly více tuku než larvy polyxenických kultur ($6,1 \pm 1$).

V rámci substrátů byl celkově nejvyšší obsah tuku zaznamenáván u larev na homogenizovaném slimáčkovi (7 ± 1) a kompostu (7 ± 1). Nejnižší index tuku ($6,8 \pm 1$) byl u všech třech zbývajících substrátů (homogenizovaná housenka, homogenizovaná ledvina a výkaly slimáčků) vyrovnaný.

5. 3 Schopnost růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v pevném a tekutém médiu v polyxenické a monoxenické kultuře

5. 3. 1 Délka těla larev

Délka těla invazních larev (Graf 7) byla u polyxenických i monoxenických kultur prokazatelně ovlivněna druhem hlístice ($df = 2$, $F = 657$, $p < 0,001$). Statisticky významný vliv na délku larev mělo také použité kultivační médium ($df = 1$, $F = 102$, $p < 0,001$) i bakterie ($df = 3$, $F = 9$, $p < 0,001$), která byla asociovaná s příslušnou hlísticí.

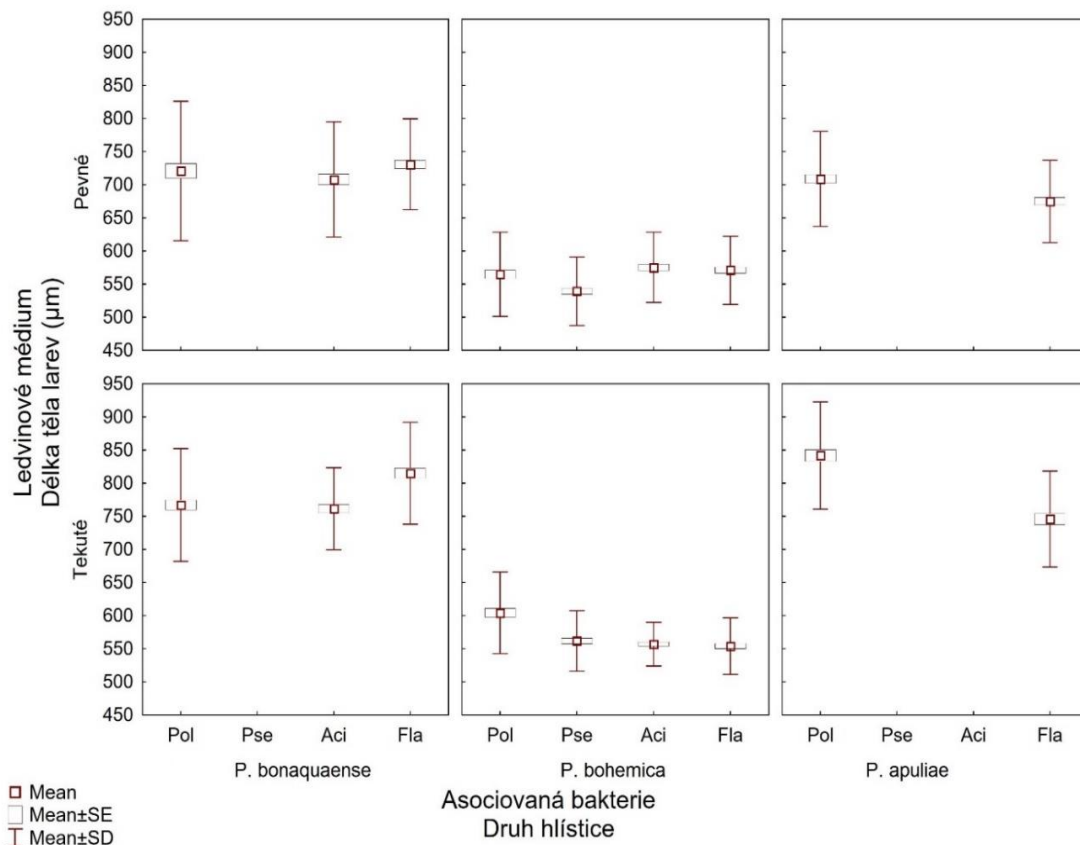
Larvy polyxenických kultur dorůstaly průměrné délky $699 \pm 120 \mu\text{m}$. Z nich největší průměrné délky dosahoval druh *P. apuliae* ($762 \pm 100 \mu\text{m}$) oproti druhu *P. bohemica*, který dosáhl nejmenší průměrné délky ($582 \pm 66 \mu\text{m}$). Největší statisticky významný rozdíl v délkách ($p < 0,001$) byl zaznamenán u druhu *P. apuliae* mezi pevným ($708 \pm 72 \mu\text{m}$) a tekutým ($841 \pm 81 \mu\text{m}$) médiem.

U monoxenických kultur dosahovaly v průměru největších délek larvy asociované s bakterií *Flavobacterium* sp. ($680 \pm 114 \mu\text{m}$). Rozdíly délek larev hlístice *P. bohemica* se pohybovaly mezi asociovanými bakteriemi v rozmezí $20 \mu\text{m}$. Největší statisticky významný ($p < 0,001$) rozdíl v délkách těla byl zjištěn u druhu *P. bonaquaense* s bakterií *Flavobacterium* sp. na pevném ($730 \pm 69 \mu\text{m}$) a tekutém ($813 \pm 75 \mu\text{m}$) médiu (Graf 7). Další významný rozdíl ($p < 0,001$) byl zaznamenán u druhu *P. apuliae* s bakterií *Flavobacterium* sp. mezi pevným ($674 \pm 62 \mu\text{m}$) a tekutým ($751 \pm 76 \mu\text{m}$) médiem.

V průměru větší larvy produkovaly polyxenické kultury ($699 \pm 120 \mu\text{m}$) na rozdíl od monoxenických kultur ($663 \pm 88 \mu\text{m}$). Prokazatelně ($p < 0,001$) delší larvy

($685 \pm 128 \mu\text{m}$) byly produkovány na tekutém médiu nežli na pevném médiu ($643 \pm 102 \mu\text{m}$). Celkově největších délek dorůstaly larvy druhu *P. bonaquaense* ($751 \pm 88 \mu\text{m}$) a *P. apuliae* ($734 \pm 93 \mu\text{m}$) oproti druhu *P. bohemica* ($564 \pm 53 \mu\text{m}$).

Absolutně největších délek ($841 \pm 81 \mu\text{m}$) dorůstal polyxenický druh *P. apuliae* na tekutém médiu, zatímco nejkratší larvy ($539 \pm 52 \mu\text{m}$) byly u druhu *P. bohemica* s bakterií *Pseudomonas* sp. na pevném médiu.



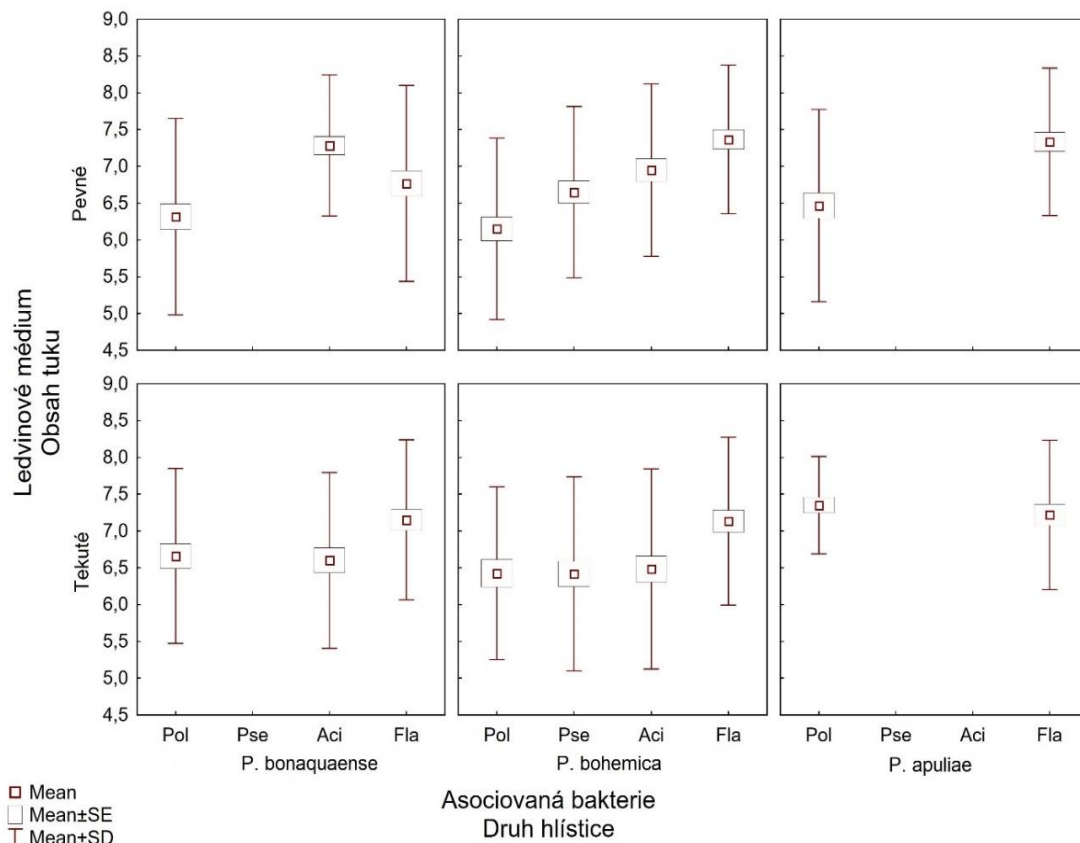
Graf 7: Délka těla invazních larev tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na pevném a tekutém médiu. Pol – Polyxenická kultura, Pse – *Pseudomonas* sp., Aci – *Acinetobacter* sp., Fla – *Flavobacterium* sp.

5. 3. 2 Obsah tuku larev

Obsah tuku v těle invazních larev (Graf 8) byl u polyxenických i monoxenických kultur prokazatelně ovlivněn druhem hlístice ($df = 2, F = 4,9, p < 0,05$) a bakterií asociovanou s příslušnou hlísticí ($df = 3, F = 16,2, p < 0,001$). Jedině kultivační médium ($df = 1, F = 0, p = 0,955$) nemělo statisticky významný vliv na obsah tuku v těle.

Polyxenické kultury dosahovaly průměrného obsahu tuku $6,5 \pm 1$. Nejvyšší obsah tuku byl u druhu *P. apuliae* ($6,8 \pm 1,2$) oproti druhu *P. bohemica*, kde byl index

tuku nejmenší ($6,3 \pm 1$). Největší obsah tuku z polyxenických kultur byl zaznamenán u druhu *P. apuliae* na tekutém médiu ($7,4 \pm 1$), zatímco nejmenší obsah tuku byl u druhu *P. bohemica* na pevném médiu ($6,1 \pm 1$).



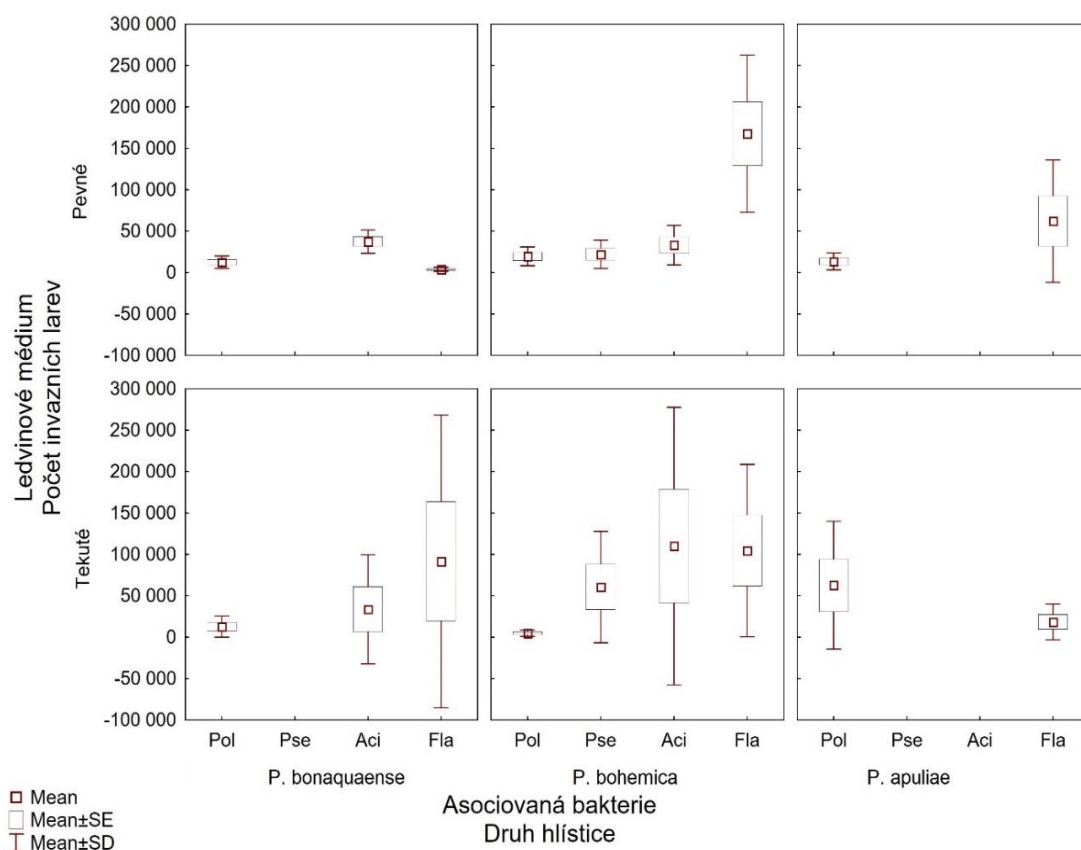
Graf 8: Obsah tuku v těle invazních larev tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na pevném a tekutém médiu. Pol – Polyxenická kultura, Pse – *Pseudomonas* sp., Aci – *Acinetobacter* sp., Fla – *Flavobacterium* sp.

U monoxenických kultur dosahovaly největšího indexu tuku larvy kultivované s bakterií *Flavobacterium* sp. ($7,2 \pm 1$), zatímco nejmenšího indexu larvy s bakterií *Pseudomonas* sp. ($6,5 \pm 1,2$). U druhu *P. bonaquaense* byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ($p < 0,001$) mezi larvami s bakterií *Acinetobacter* sp. na pevném ($7,3 \pm 1$) a tekutém médiu ($6,6 \pm 1,2$). Další významný rozdíl ($p < 0,05$) byl pozorován u druhu *P. bohemica*, kde byl značný rozdíl mezi larvami s bakterií *Acinetobacter* sp. na pevném ($7 \pm 1,2$) a tekutému médiu ($6,5 \pm 1$). Nejvyšší obsah tuku u monoxenických kultur byl u druhu *P. bohemica* s bakterií *Flavobacterium* sp. na pevném médiu ($7,4 \pm 1$) na rozdíl od druhu *P. bohemica* s bakterií *Pseudomonas* sp. na tekutém médiu ($6,4 \pm 1$).

Index obsahu tuku byl bez ohledu na druh hlístice, bakterii nebo médium dosti vyrovnaný. Ale přesto lze říci, že monoxenické kultury dosahovaly vyššího obsahu tuku ($6,8 \pm 1$) než kultury polyxenické ($6,5 \pm 1$).

5. 3. 3 Produkce potomstva

Produkce potomstva (Graf 9) u polyxenické i monoxenické kultury byla prokazatelně ovlivněna kultivačním médiem ($df = 1, F = 6,486, p < 0,05$). Jako statisticky neprůkazný byl vyhodnocen druh hlístice ($df = 2, F = 1,633, p = 0,200$) a bakterie asociované s hlísticí ($df = 3, F = 2,446, p = 0,068$).



Graf 9: Množství vyprodukovaného potomstva tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na pevném a tekutém médiu. Pol – Polyxenická kultura, Pse – *Pseudomonas* sp., Aci – *Acinetobacter* sp., Fla – *Flavobacterium* sp.

Hodnocená data vykazovala značnou variabilitu. Z grafu 9 ale jasně vyplývá, že se monoxenickým kulturám dařilo o poznání lépe než polyxenickým. Prokazatelně ($p < 0,05$) vyšší produkce potomstva je spatřována na tekutém ($55\,474 \pm 97\,753$ DJs) nežli na pevném ($41\,271 \pm 61\,651$ DJs) médiu.

Nejvyššího průměrného počtu potomstva ($136\,194 \pm 100\,714$ DJs) dosahoval druh *P. bohemica* s asociovanou bakterií *Flavobacterium* sp., zatímco u polyxenické kultury byl nejvyšší počet larev u druhu *P. apuliae* ($37\,999 \pm 58\,512$ DJs).

Z hlediska použité bakterie bylo nejvyšší průměrné produkce dosahováno u hlístic asociovaných s bakterií *Flavobacterium* sp. ($74\,712 \pm 106\,156$ DJs), zatímco nejmenšího počtu dosahoval polyxenický druh *P. bohemica* ($12\,111 \pm 11\,171$ DJs).

V rámci všech tří druhů dosáhnul jednoznačně nejvyšší produkce potomstva druh *P. bohemica* ($65\,305 \pm 92\,736$ DJs), následoval druh *P. apuliae* ($39\,125 \pm 56\,335$ DJs) a nejnižší produkce byla u druhu *P. bonaquaense* ($31\,963 \pm 77\,577$ DJs).

5. 4 Testování vlivu aplikace polyxenických a monoxenických kultur hlístic rodu *Phasmarhabditis* na mortalitu a příjem potravy slimáčka síťkovaného (*Dereoceras reticulatum*) a páskovky keřové (*Cepaea hortensis*)

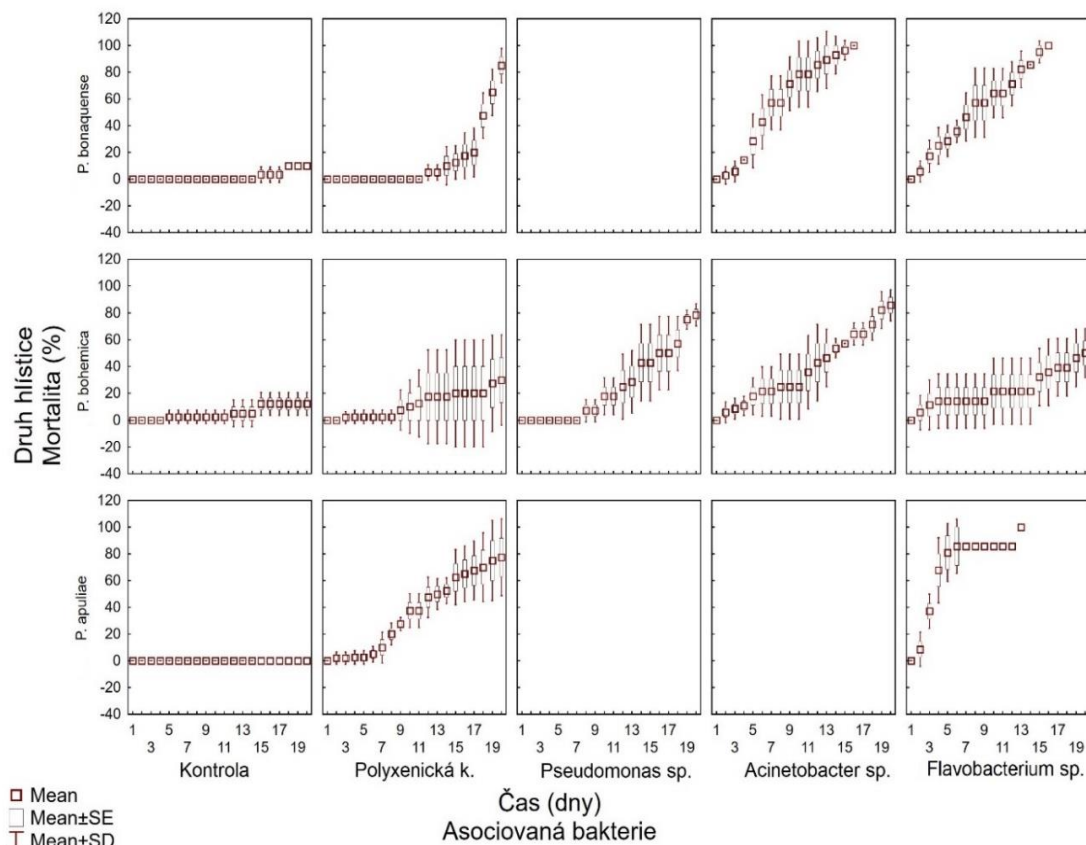
5. 4. 1 Mortalita páskovky keřové a slimáčka síťkovaného

Na mortalitu páskovky keřové neměl vliv žádný druh hlístice ani použitá bakteriální kultura, neboť byla bez výjimky zaznamenána nulová mortalita. Statisticky významný vliv na mortalitu slimáčků (Graf 10) měl použitý druh hlístice ($df = 2$, $F = 45,621$, $p < 0,001$). Mortalitu také významně ovlivnila bakterie ($df = 4$, $F = 142,722$, $p < 0,001$) a čas od založení pokusu ($df = 19$, $F = 32,252$, $p < 0,001$).

V kontrolách dosahovala mortalita slimáčků cca 10–15 %. Úmrtí bylo zapříčiněno zejména stresem nebo kanibalismem. V kontrolních miskách nebyl zjištěn žádný výskyt hlístic.

Statisticky významné rozdíly mortality slimáčků byly zaznamenány u druhu *P. apuliae* ($p < 0,001$) a *P. bonaquaense* ($p < 0,05$) oproti druhu *P. bohemica*.

Celkově nejvyšší mortalita byla u druhu *P. bonaquaense* (95 %), o něco menší mortalita byla u druhu *P. apuliae* (92 %) a nejmenší celková mortalita byla u druhu *P. bohemica* (74 %).



Graf 10: Vliv tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na mortalitu slimáčků síťkovaných (*Deroceras reticulatum*).

Ošetření slimáčků polyxenickými kulturami zapříčinilo statisticky významně ($p < 0,001$) větší mortalitu (82 %) nežli byla zaznamenaná u kontroly (16 %) ale menší než u monoxenické kultury (90 %).

U monoxenických kultur za použití hlístic s asociovanou bakterií *Flavobacterium* sp. byla ve dvou případech zaznamenána 100 % mortalita (Graf 10). Této mortality bylo dosaženo u druhu *P. apuliae* do 14 dní a *P. bonaquaense* do 16 dní. U druhé monoxenické kultury, kde byly hlístice druhu *P. bonaquaense* asociované s bakterií *Acinetobacter* sp. byla taktéž zaznamenána 100 % mortalita a to do 16 dní od založení pokusu.

Z celkového pohledu byl nejúčinnější druh *P. apuliae* s asociovanou bakterií *Flavobacterium* sp, kde byla dosažena 100 % mortalita do 14 dní (Graf 10). Další velmi dobré kombinace, kde byla dosahována 100 % mortalita, byly *P. bonaquaense* s bakterií

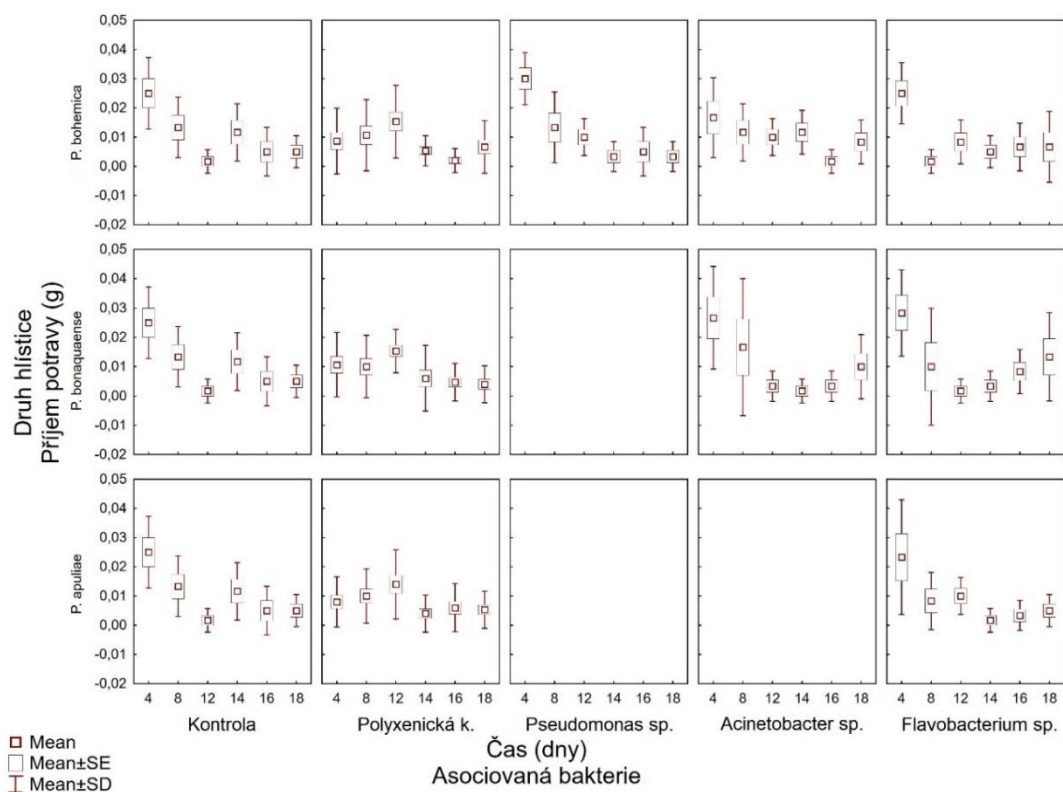
Acinetobacter sp. a *Flavobacterium* sp, nicméně tyto byly nepatrně méně účinné, protože této mortality bylo dosaženo v obou případech do 16 dní.

5. 4. 2 Příjem potravy páskovky keřové a slimáčka síťkovaného

Na příjem potravy neměl statisticky významný vliv druh měkkýše (df = 1, F = 1,327, p = 0,249) ani druh použité hlístice (df = 2, F = 2,740, p = 0,065). Statisticky průkazný vliv na příjem potravy měla pouze asociovaná bakterie (df = 4, F = 6,014, p < 0,001) a počet dní od založení experimentu (df = 7, F = 26,967, p < 0,001).

Páskovka keřová

U páskovek nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi polyxenickými a monoxenickými kulturami. Ani mezi jednotlivými bakteriemi a neošetřenou kontrolou nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl. Z grafu 11 je ale možné vypožorovat efekt prvního dne, kdy je zřetelný velký úbytek váhy granule. V dalších dnech příjem potravy viditelně poklesl a následně se držel na nižších hodnotách.

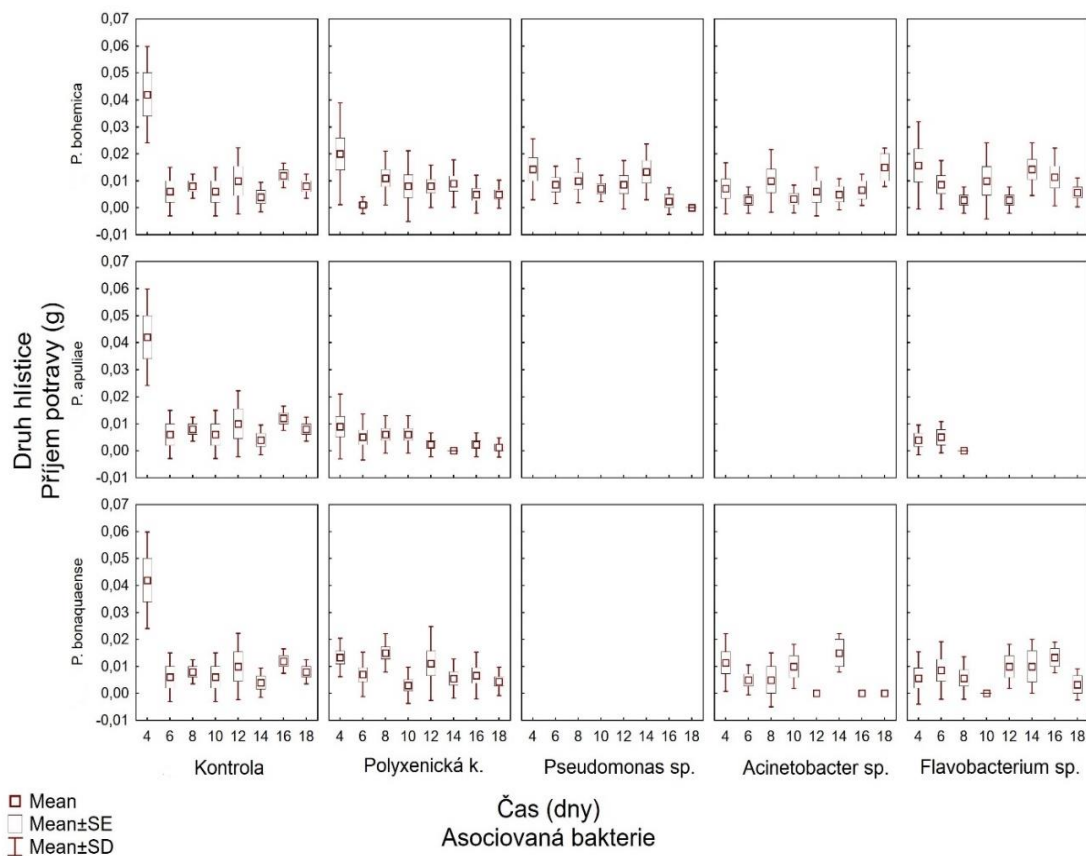


Graf 11: Vliv tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na příjem potravy páskovky keřové (*Cepaea hortensis*).

Slimáček síťkovaný

Z monoxenických kultur byl nejvýraznější vliv na příjem potravy zaznamenán u hlístic s bakterií *Acinetobacter sp.* a *Flavobacterium sp.*

U kontroly, tedy u hlísticemi neošetřených slimáčků, můžeme zaznamenat výrazný příjem potravy v prvních 4 dnech pokusu (Graf 12). Poté nastal značný pokles a stagnace v úbytku váhy granule (tj. příjmu potravy), podobně jako v případě páskovek. U jedinců ošetřených polyxenickými i monoxenickými kulturami hlístic se tento jev velkého úbytku váhy granule v prvních dnech vytratil. Ošetření slimáčci tedy přijímali méně potravy již od počátku pokusu.



Graf 12: Vliv tří druhů hlístic rodu *Phasmarhabditis* na příjem potravy slimáčků síťkovaných (*Deroceras reticulatum*).

6 DISKUZE

Schopnost růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v polyxenické a monoxenické kultuře na různých přírodních substrátech a jejich vliv na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje.

Všechny testované druhy hlístic (*P. bohemica*, *P. bonaquaense* a *P. apuliae*) byly schopné růstu a reprodukce na různých přírodních substrátech, podobně jako *P. hermaphrodita* (Tan a Grewal, 2001a; Nermuť *et al.*, 2014). Potvrzuje se tak hypotéza Rae *et al.* (2006), že nejen *P. hermaphrodita* ale i námi studované druhy hlístic jsou fakultativní paraziti schopní růstu a reprodukce na rozkládajících se organických materiálech. Na rozdíl od kompostu a výkalů živočišný substrát pozitivně ovlivňoval rychlost vývoje larev a produkci potomstva. Délka larev, obsah tuku v jejich těle (tedy kvalitativní parametry) a rychlost vývoje, ale také délka dospělců byly bez výraznějších rozdílů způsobených rozdíly mezi substráty. V podobné studii s hlísticí *P. hermaphrodita* Nermuť *et al.* (2014) prokázali, že (podobně jako v případě námi testovaných druhů hlístic) kvalitativní parametry invazních larev nebyly ovlivněny substrátem.

Množství vyprodukovaného potomstva bylo jasně ovlivněno druhem substrátu. Stejně jako ve studii Nermuť *et al.* (2014) s hlísticí *P. hermaphrodita*, i naše druhy hlístic produkovaly výrazně více potomstva na živočišných substrátech (homogenizovaná housenka, prasečí ledvina a slimáček). Největší výtěžek potomstva produkovaly polyxenické kultury, ale také bakterie *Acinetobacter* sp. produkovala množství larev téměř totožné s polyxenickými kulturami. Toto zjištění společně s tím, že kvalita larev není výrazně ovlivněna substrátem, podporuje tvrzení, že i *P. bohemica*, *P. bonaquaense* a *P. apuliae* jsou stejně jako *P. hermaphrodita* nepochybně fakultativní paraziti schopní vytvářet stejně kvalitní invazní larvy na širokém spektru substrátů, jejichž vliv se projeví jen v množství potomstva (Nermuť *et al.*, 2014).

Délky všech tří druhů hlístic byly až na jednu výjimku (*P. bohemica*) výrazně kratší oproti studiím Nermuť *et al.* (2016a, 2016b, 2017), kteří tyto tři druhy popsali. Nicméně při množení těchto druhů Nermuť *et al.* (2016a, 2016b, 2017) využili vodní pasti se zmraženým slimáčkem síťkovaným a plzákem španělským. Je tedy

pravděpodobné, že celý plž je pro hlístice více výživné médium. Tento rozdíl ukazuje na fakt, že jsou hlístice rodu *Phasmarhabditis* v parazitické asociaci s měkkýši, kteří pro ně představují ideální zdroj živin (Hooper *et al.*, 1999). Zároveň by mohla být příčinou rozdílných délek vnitrodruhová konkurence. V naší studii bylo použito jen malé množství substrátu, které pravděpodobně vyústilo v konkurenci o zdroj potravy, která jak známo má negativní vliv na velikost hlístic (Selvan *et al.*, 1993; Kaya a Koppenhöfer 1996; Nermuť *et al.*, 2012).

Abu Hatab a Gaugler (1999) prokázali, že se obsah tuku v larvách entomopatogenních hlístic liší s kvalitou substrátu. V našem experimentu jsme však vypožorovali pouze malé rozdíly v obsahu tuku mezi substráty a druhy hlístic. Na rozdíl od entomopatogenních hlístic jsou naše hlístice fakultativní parazité, kteří vzhledem ke způsobu svého života musí být přizpůsobeni přežití v nejrůznějších prostředích. Proto ani na nutričně horších substrátech nedochází k významnému snížení kvality DJs (Nermuť *et al.*, 2014). Nicméně můžeme říci, že larvy v monoxenické kultuře dosahovaly o poznání většího obsahu tuku než kultury polyxenické. Tento výsledek prokázali i Nermuť *et al.* (2014) při testování hlístice *P. hermaphrodita* na různých substrátech, kde většího obsahu tuku dosahovaly invazní larvy v monoxenické kultuře. To znamená, že naše testované druhy mohou produkovat stejně kvalitní larvy jako komerční kmen *P. hermaphrodita*, a to také podporuje studii MacMillana *et al.* (2009) o saprofytickém životním cyklu hlístic.

Vývoj dospělců byl u všech testovaných druhů vyrovnaný. Na rychlost vývoje neměl významný vliv ani druh substrátu, i když nepatrně rychlejší vývoj byl zaznamenán na homogenizovaném slimáčkovi. Významný nebyl ani vliv polyxenických a monoxenických kultur podobně jako ve studii Nermutě *et al.* (2014). Důvodem by mohla být schopnost všech námi testovaných bakterií poskytnout hlísticím dostatečně kvalitní potravu i na nutričně horších substrátech. Vývoj invazních larev byl mezi druhy poměrně vyrovnaný. Na rozdíl od dospělců, významnější vliv měl použitý substrát a také bakteriální kultura na vývoj invazních larev. Nejrychlejšího vývoje dosáhly larvy na živočišných substrátech a v monoxenických kulturách s bakteriemi *Acinetobacter* sp. a *Flavobacterium* sp. Zřejmým důvodem rychlejšího vývoje invazních larev

na živočišných substrátech je nutričně bohatší prostředí, které hlísticím i bakteriím poskytuje lepší podmínky pro růst (Nermet' *et al.*, 2014).

V tomto výzkumu jsme prokázali, že námi testované druhy hlístic jsou schopny růst a rozmnožovat se na různých živočišných a jiných organických substrátech podobně jako *P. hermaphrodita*. Prokázali jsme také významný vliv substrátu a bakteriální kultury na produkci potomstva. Zdá se ale, že i přes mnohé podobnosti mezi jednotlivými bakteriemi, jsou to právě monoxenické kultury, které mají z našeho pohledu pozitivní vliv na sledované parametry. Je tak zřejmé, že bakterie asociována s hlísticí opravdu hraje důležitou roli. Příkladem je bakterie *Flavobacterium* sp., která dosahuje brzkého vývoje invazních larev, podporuje vývoj kvalitních larev, a i když nedosahovala nejvyšších výtěžků DJs, byla produkce potomstva na různých substrátech celkem konzistentní, což nás přivádí ke konstatování, že právě tato bakterie se zdá z testované trojice nejslibnější.

Schopnost růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v pevném a tekutém médiu v polyxenické a monoxenické kultuře.

Všechny testované druhy hlístic (*P. bohemica*, *P. bonaquaense* a *P. apuliae*) byly, podobně jako *P. hermaphrodita* (Wilson *et al.*, 1995a) schopné růstu na pevném a tekutém ledvinovém médiu. Hlístice byly schopné růst na těchto médiích v polyxenické i monoxenické kultuře, která v průměru dosahovala vyšších výnosů invazních larev, obzvláště v tekutém médiu, podobně jako v případě studie Wilsona *et al.* (1995a). Zatímco v případě naší studie nejvyššího průměrného výnosu DJs dosáhla bakterie *Flavobacterium* sp. (75 000 DJs/5 ml), nejlepší výsledné bakterie Wilsona *et al.* (1995a) byly *Providencia rettgeri* a *Moraxella osloensis* (> 85 000 DJs/ml). Avšak *Flavobacterium* sp. vykazovala velkou variabilitu v produkci potomstva. Vysoká variabilita v produkci potomstva navzdory standardizovaným podmínkám byla více méně obecným jevem platným pro všechny testované bakterie zvláště v tekutém médiu. Zdá se tedy, že pevné médium poskytuje pro růst vybraných bakterií a hlístic stabilnější podmínky, byť je zde dosahováno nižších výnosů larev. Příčinou by mohl být experimentální design, který v případě tekutého média nezajistil dokonalé rozložení kultivačního média. To sice samovolně vzlíná molitanem, nicméně ve spodní části

nádoby může docházet k hromadění většího množství jedinců hlístic i bakteriálních buněk. Výsledkem je pak zhoršení podmínek v části kultivační nádoby a následně i nestabilní výsledky. Jako řešení tohoto problému se nabízí zajištění pomalé rotace nádob, neboť Buecher a Popiel (1989), zjistili, že růst hlístic může být zlepšen rotačním protřepáváním. Toto tvrzení potvrdil i Wilson (1993b) při experimentech s množением hlístice *P. hermaphrodita* v tekutém médiu. V případě, že by takový zásah problém nevyřešil, bude nutné hledat příčinu jinde, nejspíše na straně vlastností hlístic nebo bakterií.

Wilson *et al.* (1995a) na pevném ledvinovém médiu testoval růst hlístice *P. hermaphrodita* s bakteriemi *Flavobacterium odoratum* a *Pseudomonas fluorescens*, které dosahovaly srovnatelně vysokých výtěžků. Naproti tomu v naší studii dosahovaly hlístice s bakterií *Flavobacterium sp.* na pevném ledvinovém médiu výrazně větších výtěžků DJs než s *Pseudomonas sp.* V dalším pokusu na pevném ledvinovém médiu Wilson *et al.* (1995a) potvrdil vyrovnané výtěžky DJs u bakterií *Flavobacterium breve*, *Acinetobacter calcoaceticus* a *Pseudomonas paucimobilis*. U naší studie na pevném médiu dosahovaly poměrně nízkých vyrovnaných výtěžků bakterie *Pseudomonas sp.* a *Acinetobacter sp.*, zatímco bakterie *Flavobacterium sp.* dosahovala výrazně vyšších výnosů DJs, avšak s poměrně velkou variabilitou.

Námi testované druhy hlístic jsou schopné růstu v přítomnosti různých bakterií, ale produkce potomstva hlístic se mezi bakteriemi lišila, podobně jako u studie Wilsona *et al.* (1995) s hlísticí *P. hermaphrodita*. Kvalita produkovaných invazních larev však podobně jako v předchozím pokusu, nejspíše ze stejných důvodů, příliš ovlivněna nebyla.

Zajímavé je, že ze zamýšlených 9 monoxenických kombinací (3 druhy hlístic se třemi druhy bakterií) ve třech případech kultura příslušné bakterie nepodporovala růst hlístice. Zatímco hlístice *P. bohemica* byla schopná růst a rozmnožovat se na všech třech izolovaných bakteriích (*Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.* a *Flavobacterium sp.*), *P. bonaquaense* nerostla na *Pseudomonas sp.* a *P. apuliae* byla dokonce schopná růstu pouze na bakterii *Flavobacterium sp.* Jako vysvětlení tohoto jevu se nabízí schopnost *P. bohemica* přijímat širší spektrum potravy než *P. bonaquaense* nebo *P. apuliae*. Bakterie produkují celé spektrum metabolitů a některé druhy hlístic mohou být vůči

určítým metabolitům citlivější než jiné. Ostatně i Poinar a Hansen (1986) uvádí, že některé bakterie produkují toxické metabolity, které inhibují růst hlístic. Například *Escherichia coli* je schopná podporovat růst *Rhabditis maupasi* na Nigonově agaru, ale ne na živném agaru (Sohlenius, 1698). Je tedy možné, že i v tomto případě příslušná bakterie na ledvinovém agaru produkuje látky, které danému druhu hlístice vadí, nebo naopak neprodukuje nějakou pro růst nezbytnou látku. O přesném důvodu však můžeme jen spekulovat.

Testování vlivu aplikace polyxenických a monoxenických kultur hlístic rodu *Phasmarhabditis* na mortalitu a příjem potravy slimáčka síťkovaného (*Dereoceras reticulatum*) a páskovky keřové (*Cepaea hortensis*).

Hlístice *P. bohemica*, *P. bonaquaense* a *P. apuliae* byly popsány v nedávné době a nebyly dosud testovány na mortalitu a příjem potravy škodlivých plžů, ani necílových měkkýšů. Vycházeli jsme tedy z předpokladu Wilsona *et al.* (1993a), že budou mít tyto hlístice na mortalitu měkkýšů podobný efekt jako *P. hermaphrodita* (Wilson *et al.*, 1993a) a budou inhibovat příjem potravy (Glen *et al.*, 2000a). Tato domněnka byla potvrzena, neboť u všech tří polyxenických i monoxenických kultur hlístic byla zaznamenána mortalita slimáčka síťkovaného, a tedy i prokázán parazitický způsob života, zároveň hlístice měly inhibiční účinek na příjem potravy. I když byl tedy prokázán vliv na mortalitu a příjem potravy jak monoxenickými, tak polyxenickými kulturami, výraznější účinky byly zaznamenány u monoxenických kultur podobně jako v případě dřívější studie od Wilsona *et al.* (1995b). Zároveň se tak potvrzuje zásadní role bakterií pro mortalitu a inhibici příjmu potravy slimáčků (Wilson *et al.*, 1995b).

V rámci naší studie jsme izolovali z invazních larev výše zmíněných hlístic celou řadu kmenů bakterií, z nichž jsem si pro další práci vybrali tři kultury, které byly determinovány jako *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. a *Flavobacterium* sp. Kromě těchto bakterií však hlístice rodu *Phasmarhabditis* dokáží žít i na jiných bakteriích, například *Aeromonas* sp., *Bacillus cereus*, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas fluorescens* nebo *Providencia rettgeri* (Wilson *et al.*, 1995a).

Všechny námi izolované bakterie jsou gram-negativní, a jak uvádí Wang a Quinn (2010) většina těchto bakterií vytváří různé endotoxiny (lipopolysacharidy). Tan

a Grewal (2002) toto tvrzení potvrdili, neboť zjistili, že *Moraxella osloensis* (také gram-negativní) produkuje velmi silný endotoxin, který má letální účinek na plže a byl identifikován jako lipopolysacharid. Proto je pravděpodobné, že námi izolované bakterie mohou takové toxiny produkovat též, což by mohlo vysvětlovat zvýšený letální účinek monoxenických kultur. Je tedy možné souhlasit s Tan a Grewal (2001b), že bakterie zapříčiňují mortalitu a zároveň snižují příjem potravy slimáčků a že hlístice je pouze vektor, který pronikne do těla hostitele a dále se vyvíjí na množící se bakterii.

Rae *et al.* (2008) a Grewal *et al.* (2003) využili ve svých pokusech podobný dvoustupňový test na mortalitu a příjem potravy slimáčka síťkovaného, jaký byl použit i v naší studii. V obou pokusech byl využit stejný komerční kmen *P. hermaphrodita*, přičemž se lišila pouze aplikovaná dávka. Obě studie však dosáhly výsledků srovnatelných s naší prací.

Speiser *et al.* (2001) během šesti týdnů zaznamenávali příjem potravy a mortalitu slimáčka síťkovaného rozděleného na čtyři váhové kategorie (31 mg, 92 mg, 574 mg, 801 mg) při dávkách 0, 2 000, 5 000, 12 600, 32 000 a 80 000 DJs/ 5 jedinců za použití přípravku Nemaslug. Vyšší úmrtnost byla zaznamenána u dospělých jedinců slimáčka síťkovaného (> 250 mg) než u juvenilních jedinců a bylo potvrzeno, že se zvyšující se dávkou hlístic se snižuje příjem potravy. V našem případě nebyli slimáčci rozděleni podle váhové kategorie a používali jsme jednu dávku s cílem prokázat nebo vyvrátit vliv na slimáčky. Navzdory tomu se nám ale jasně podařilo prokázat negativní efekt na příjem potravy a vliv na mortalitu. Nicméně je ale možné, že odlišná věková a váhová struktura založených misek mohla ovlivnit množství přijímané potravy a mortalitu a že takový experimentální design by mohl přinést lepší výsledky především v případě vlivu na příjem potravy. Z těchto pokusů je jasně viditelné, že naše tři testované hlístice, ať v polyxenické nebo monoxenické kultuře, mají podobný účinek na slimáčka, jako komerčně produkovaná hlístice *P. hermaphrodita*. V našem pokusu byla ovšem aplikována dávka 13 000 DJs/misku, což je ekvivalent trojnásobku doporučené polní dávky. Není tedy možné říci s naprostou jistotou, zda by měly tyto hlístice stejný účinek i v polních pokusech při použití doporučené dávky. V tomto bodě je třeba navázat na naše výsledky dalšími maloparcelními pokusy pro ověření účinnosti v terénních podmínkách.

Monoxenické ani polyxenické kultury *P. bonaquaense*, *P. apuliae* a *P. bohemica* neměly významný vliv na příjem potravy a mortalitu páskovky keřové (*Cepaea hortensis*), která v naší studii reprezentovala běžně se vyskytující necílový druh. Tento výsledek koresponduje s výsledkem Rae *et al.* (2009), kteří zjistili, že je páskovka keřová odolná proti komerčně produkované hlístici *P. hermaphrodita* při dávce 150 a 300 DJs/cm². Scheil *et al.* (2014) také prokázali, že doporučená polní dávka hlístice *P. hermaphrodita* nemá vliv na mortalitu páskovky keřové. Nicméně Wilson *et al.* (2000) prokázali v polním testu, že při využití doporučené polní dávky nemá *P. hermaphrodita* vliv na mortalitu páskovek. Avšak při použití pětinasobku doporučené dávky byla u páskovek mortalita zaznamenána. Odolnost páskovek může spočívat nejspíše v jejich ulitě. Tuto hypotézu potvrdili Williams a Rae (2016), kteří zjistili, že se páskovky dokáží aktivně bránit hlístici *P. hermaphrodita*. Hlístice totiž byly zachyceny neznámým mechanismem v ulitě a následně usmrceny a kalcifikovány tak, že se staly součástí ulity (Rae, 2017).

Vzhledem k tomu, že testované hlístice způsobovaly značnou mortalitu u slimáčka síťkovaného, ale ukázaly se bezpečné pro necílové měkkýše, bylo by vhodné pokračovat v dalších laboratorních i polních pokusech, které by zejména stanovily optimální dávku a ověřily účinnost v terénu. S ohledem na lepší výsledky monoxenických kultur by se další výzkum měl zaměřit právě na ně. Zároveň bude nezbytné provést obdobné testy i s jinými škodlivými plži, jako je např. plzák španělský. Důraz by se měl také klást na bližší specifikaci životních cyklů a bionomie jako takové.

7 ZÁVĚR

Schopnost růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v polyxenické a monoxenické kultuře na různých přírodních substrátech a jejich vliv na kvalitu produkovaného potomstva a rychlost vývoje

- Samci i samice se vyvíjeli ve stejných časových intervalech. Rychlejší vývoj obou pohlaví byl zaznamenán na živočišných substrátech, kde také dospělci dosahovali největších délek.
- Ve srovnání s kompostem a výkaly, živočišné substráty pozitivně ovlivnily rychlost vývoje a produkci potomstva (kvantitu), zatímco délka larev a obsah tuku v jejich těle (kvalita) zůstaly bez výraznějších rozdílů.
- Rychlejší vývoj larev a vyšší obsah tuku v jejich tělech byl pozorován u hlístic v monoxenických kulturách, zatímco u kultur polyxenických byla zaznamenána větší délka larev a také vyšší množství vyprodukovaného potomstva.
- Mezi testovanými druhy hlístic nebyly významnější rozdíly v rychlosti vývoje, produkci potomstva, délce těla nebo obsahu tuku s jedinou výjimkou. Druh *P. bohemica* produkoval nejmenší larvy a významně více potomstva.

Schopnost růstu hlístic rodu *Phasmarhabditis* v pevném a tekutém médiu v polyxenické a monoxenické kultuře

- Z 9 zamýšlených monoxenických kombinací (3 druhy hlístic se třemi druhy bakterií) se podařilo namnožit pouze 6 kombinací, neboť u ostatních kombinací bakterie nepodporovala růst hlístic.
- Testované druhy hlístic byly schopné růstu a reprodukce na pevném i tekutém médiu.
- Vyšší produkce potomstva i větší délka larev hlístic byla zaznamenána v tekutém médiu, zatímco obsah tuku byl na obou mediích vyrovnaný.
- Monoxenické kultury produkovaly více potomstva s většími tukovými rezervami, ale větších délek dorůstaly larvy polyxenických kultur.

- Nejvíce potomstva vyprodukoval druh *P. bohemica*, ve srovnání s druhy ostatními však jeho larvy byly nejmenší a obsahovaly nejméně tukových rezerv.
- Celkově největší délky, obsahu tuku i produkce potomstva dosahovaly hlístice asociované s bakterií *Flavobacterium* sp.

Testování vlivu aplikace polyxenických a monoxenických kultur hlístic rodu *Phasmarhabditis* na mortalitu a příjem potravy slimáčka síťkovaného (*Dereoceras reticulatum*) a páskovky keřové (*Cepaea hortensis*)

- Testované druhy hlístic rodu *Phasmarhabditis* neměly významný vliv na příjem potravy a mortalitu páskovky keřové.
- Aplikace polyxenických a monoxenických kultur hlístic rodu *Phasmarhabditis* měla negativní vliv na příjem potravy slimáčka síťkovaného již od prvních dnů pokusu.
- V průměru nejvyšší mortalita slimáčků mezi testovanými druhy hlístic byla zaznamenána u druhu *P. bonaquaense*.
- Monoxenické kultury hlístic způsobovaly prokazatelně větší mortalitu než polyxenické kultury.
- Z monoxenických kultur hlístic měly největší vliv na úmrtnost slimáčků hlístice asociované s bakterií *Flavobacterium* sp.

8 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Abu Hatab M., Gaugler R. (1999). Lipids of in vivo and in vitro cultured *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biological Control* 15: 133 - 188.

Afran A. G., Muhamad R., Omar D., Nor Azwady A. A., Manjeri G. (2015). Comparative life cycle studies of *Pomacea maculata* and *Pomacea canaliculata* on rice (*Oryza sativa*). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 52: 1079 - 1083.

Anderson R. C. (2000). Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. Wallingford, 2nd edition. CAB International, 651 s.

Araiza-Gómez V., Naranjo-García E., Zúñiga G. (2017). The exotic slugs of the genus *Deroceras* (Agriolimacidae) in Mexico: morphological and molecular characterization, and new data on their distribution. *American Malacological Bulletin*, 35: 126 - 133.

Bedding R. A. (1984). Large scale production, storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Annals of Applied Biology*, 104: 117 - 120.

Berlandier F. A., Baker G. J. (2007). Winter oilseeds. In: Bailey P. (ed): *Pests of field crops and pastures: identification and control*. Victoria, Collingwood, CSIRO Publishing, s. 137.

Bernardet J.-F., Segers P., Vancanneyt M., Berthe F., Kersters K., Vandamme P. (1996). Cutting a gordian Knot: Emended classification and description of the genus *Flavobacteriou*, emended description of the family Flavobacteriaceae, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 128 - 148.

Bøvre K. (1984). Genus II: *Moraxella* Lwoff 1939, 173 emend. Henriksen and Bøvre 1938, 391^{AL}. In: Krieg N. R., Holt J. G. (eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Baltimore, Williams and Wilkins, s. 296 - 303.

Carlsson N. O. L., Lacoursière J. O. (2005). Herbivory on aquatic vascular plants by the introduced golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in Lao PDR. *Biological Invasions*, 7: 233 - 241.

Carlsson N. O. L. (2006). Invasive golden apple snails are threatening natural ecosystems in Southeast Asia. In: Joshi R. C., Sebastian L. S. (eds): *Global advances in ecology and management of golden apple snails*. The City of Tarlac, Maligaya, Philippine Rice Research Institute, s. 61 - 72.

Carrick R. (1938). The life history and development of *Agriolimax agrestis* L. the grey field slug. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 59: 563 - 597.

Cook A. (2001). Behavioural ecology: od doing the right thing, in the right place at the right time. In: Barker G. M. (ed): *The biology of terrestrial molluscs*. Wallingford, CAB International, s. 447 - 487.

Coupland J. B. (1995). Susceptibility of helicid snails to isolates of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* from southern France. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66: 207 - 208.

Decraemer W., Hunt D. J. (2006). Structure and classification. In: Perry R. N., Moens M. (eds): *Plant nematology*. Wallingford, CAB International, s. 3 - 32.

De Nardo E. A. B., Grewal S. K., Sinderman A., Grewal P. S. (2003). Non-susceptibility of three earth worm *Eisenia fetida* to slug-parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*. *Biocontrol Science and Tehcnology*, 14: 93 - 98.

Douglas M. R., Tooker J. F. (2012). Slug (Mollusca: Agriolimacidae, Arionidae) ecology and management in no-till field crops, with and emphasis on the mid-Atlantic region. *Journal of Integrated Pest Management*, 3: C1 - C9.

Dye D. W. (1968). A taxonomic study of the genus *Erwinia* I. The "amylovora" group. New Zealand. *Journal of Science*, 11: 590 - 607.

Ehlers R.-U., Shapiro-Ilan D. I. (2005). Mass production. In: Grewal P. S., Ehlers R.-U., Shapiro-Ilan D. I. (eds): *Nematodes as biocontrol agents*. Wallingford, CAB International, s. 65 - 78.

Fijen C. A. P., Kuijper E. J., Tjia H. G., Daha M. R., Dankert J. (1994). Complement deficiency predisposes for meningitis due to non groupable meningococci and *Neisseria*-related bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 18: 780 - 784.

Forsyth R. G. (2004). Land snails of British Columbia. Victoria, Royal British Columbia Museum, 188 s.

Glen D. M., Wilson M. J., Pearce J. D., Rodgers P. B. (1994). Discovery and investigation of a novel nematode parasite for biological control of slugs. In: *The BPCP Conference: Pests and diseases*, vol 2. Brighton, British Crop Protection Council, s. 617 - 624.

Glen D. M., Wilson M. J., Hughes L., Cargeeg P., Hajjar A. (1996). Exploring and exploiting the potential of the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* as a biocontrol agent for slugs, in slugs and snails. In: Henderson I. F. (ed): *BPC Symposium proceedings: Agricultural, veterinary and environmental perspectives*. Alton, British Crop Protection Council, s. 270 - 280.

Glen D. M., Wilson M. J. (1997). Slug-parasitic nematodes as biocontrol agents for slugs. *AgroFOOD Industry Hi-tech*, 8: 23 - 27.

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

Glen D. M., Wiltshire C. W., Hughes L., Ester A., VanRozen K., Castillejo J., Iglesias J., Speiser B., Coupland J., Gwynn R. (2000b). The use of slug-parasitic nematodes and other techniques for control of slug and snail damage in horticultural crops. In: *The BCPC Conference: Pest and diseases*, vol. 1. Brighton, British Crop Protection Council, s. 345 - 350.

Glen D. (2002). Integrated control of slug damage. *Pesticide Outlook*, 13: 137 - 141.

Glen D. M., Moens R. (2002). Agriolimacidae, Arionidae and Milaciade as pests in West European cereals. In: Barker G. M. (ed): *Molluscs as crop pests*. Wallingford, CAB International, s. 271 - 300.

Glen D., Symondson W. O. C. (2003). Influence of soil tillage on slugs and their natural enemies. In: El Titi A. (ed): *Soil tillage in agroecosystems*. Boca Raton, CRC Press LLC, s. 207 - 228.

Glen D. M., Glen M., Green D., Oakley J., Wiltshire C. W., Bohan D. A., Port G. R. (2004). Opportunities for integrated slug control. In: *HGCA Conference 2004: Managing soil and roots for profitable production*, s. 14.1 - 14.14.

Grimm B. (2002). Effect of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* on young stages of the pest slug *Arion lusitanicus*. *Journal of Molluscan Studies*, 68: 25 - 28.

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

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

Grewal S. K., Grewal P. S., Hammond R. B. (2003). Susceptibility of north American native and non-native slugs (Mollusca: Gastropoda) to *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae). *Biocontrol Science and Technology*, 13: 119 - 125.

Habib U. N. T., Abdel-Haleem A. A., Mustafa O. M., Ismail E. H. (2018). Histological and ultrastructural alternations in the digestive gland of the Egyptian slug, *Limax maximus* (Linnaeus, 1758) treated with botanic molluscicidal thymol, with reference to biological studies. *Egyptian Journal of Aquatic Biology*, 22: 137 - 148.

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

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

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

Horgan F. G., Stuart A. M., Kudavidanage E. P. (2014) Impact of invasive apple snails on the functioning and services of natural and managed wetlands. *Acta Oecologica*, 54: 90 - 100.

Horsák M., Juříčková L., Beran L., Čejka T., Dvořák L. (2010). Komentovaný seznam měkkýšů zjištěných ve volné přírodě České a Slovenské republiky. Dodatek. *Malacologica Bohemoslovaca*, 1: 1 - 37.

Horsák M., Juříčková L., Picka J. (2013). Měkkýši České a Slovenské republiky: molluscs of the Czech and Slovak Republic. Zlín, Kabourek, 256 s.

Horsák M., Čejka T., Juříčková L., Beran L., Horáčková J., Hlaváč J. Č., Dvořák L., Hájek O., Divíšek J., Maňas M., Ložek V. (2018). Check-list and distribution maps of the molluscs of the Czech and Slovak Republics. – Online at <http://mollusca.sav.sk/malacology/checklist.htm>, updated December 15, 2018.

Hugot J. P., Baujard P., Morand S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3: 1 - 10.

Chitwood B. B., Chitwood M. B. (1937). Snails as hosts and carriers of nematodes and Nematomorpha. *The Nautilus*, 50: 130 - 135.

Jaffuel G., Půža V., Hug A.-S., Meuli R. G., Nermut J., Turlings T. C. J., Desurmont G. A., Campos-Herrera R. (2018). Molecular detection and quantification of slug parasitic nematodes from the soil and their hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 160: 1 - 28.

Kałużski T., Kozłowski J., Kozłowska M. (2005). Evaluation of damage to seeds and seedlings of different winter wheat cultivars caused by *Deroceras reticulatum* (O. F. Müller, 1774) and *Arion lusitanicus* Mabille, 1868 in laboratory conditions. *Folia Malacologica*, 13: 189 - 195.

Kaya H. K., Koppenhöfer A. M. (1996). Effects of microbial and other antagonistic organisms and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 357 - 371.

Kazda J., Škeřík J. (2008). Metodika integrované ochrany řepky. Praha, SPZO s. r. o., s. 78.

Kazda J. (2014). Škůdci polních plodin. Praha, Profi Press, s. 112.

Kazda J., Říha K., Stejskalová M., Spitzer T. (2018). Ochrana slunečnice roční (*Helianthus annuus*) proti chorobám a živočišným škůdcům podle zásad IOR: uplatněná certifikovaná metodika pro praxi. Praha, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, s. 57.

Kozłowski J., Kozłowska M. (2008). Differences in acceptability of herb plants and oilseed rape for slugs (*A. lusitanicus*, *A. rufus* and *D. reticulatum*) in food choice tests. *Journal of Plant Protection Research*, 48: 461 - 474.

Kozłowski J., Kozłowski R. J. (2011). Expansion of the invasive slug species *Arion lusitanicus* Mabille, 1868 (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) and dangers to garden crops. *Folia Malacologica*, 19: 249 - 258.

Kozłowski J., Strażyński P., Jaskulska M., Kozłowska M. (2016). Relationships between aphids (Insecta: Homoptera: Aphididae) and slugs (Gastropoda: Stylommatophora: Agriolimacidae) pests of legumes (Fabaceae: *Lupinus*). *Journal of Insect Science*, 16: 1 - 7.

- Langan A. M., Shaw E. M. (2006). Responses of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.) to iron phosphate and metaldehyde slug pellet formulations. *Applied Soil Ecology*, 34: 184 - 189.
- Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Auckland, The IUCN Invasive Species Specialist Group (ISSG), s. 10.
- Lunau S., Stoessel S. Schmidt-Peisker A. J., Ehlers R.-U. (1993). Establishment of monoxenic inocula for scaling up *in vitro* cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Nematologica*, 39: 385 - 399.
- MacMillan K., Haukeland S., Rae R., Young I., Crawford J., Hapca S., Wilson M. (2009). Dispersal patterns and behaviour of the nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* in mineral soils and organic media. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1483 - 1490.
- Mair J., Port G. R. (2002). The influence of mucus production by the slug, *Deroceras reticulatum*, on predation by *Pterostichus madidus* and *Nebria brevicollis* (Coleoptera: Carabidae). *Biocontrol Science and Technology*, 12: 325 - 335.
- Maupas E. (1900). Modes et formes de reproduction des nématodes. *Archives de Zoologie*, 8: 464 - 642.
- McDonnell R. J., Paine T. D., Gormally M. J. (2009). Slugs: a guide to the invasive and native fauna of California. Publication 8336. Oakland, The Regents of the University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 21 s.
- Mengert H. (1953). Nematoden und Schnecken. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 4: 311 - 349.
- Metodika IOR: slimáček síťkovaný (*Deroceras reticulatum*). (2014 - 2019). Rostlinolékařský portál, ÚKZÚZ. Dostupné on-line 18. 2. 2019: <http://eagri.cz>

Moens R., Glen D. M. (2002). Agriolimacidae, Arionidae and Milacidae as pests in West European oilseed rape. In: Barker G. M. (ed): *Molluscs as crop pests*. Wallingford, CAB International, s. 425 - 440.

Morand S. (1988). Cycle évolutif de *Nemhelix bakeri* Morand et Petter (Nematoda: Cosmocercidae) parasite de l'appareil génital de *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). *Canadian Journal of Zoology*, 66: 1796 - 1802.

Morand S., Faliex E. (1994). Study on the life cycle of a sexually transmitted nematode parasite of a terrestrial snail. *Journal of Parasitology*, 80: 1049 - 1052.

Morand S., Barker G. M. (1995). *Hugotdiplogaster neozelandia* n. gen., n. sp. (Nematoda: Diplogasteridae), a parasite of the New Zealand endemic slug, *Athoracophorus bitentaculatus* (Quoy and Gaimard, 1832) (Gastropoda: Athoracophoridae). *The New Zealand Journal of Zoology*, 22: 109 - 113.

Morand S., Wilson M. J., Glen D. M. (2004). Nematodes (Nematoda) parasitic in terrestrial gastropods. In: Baker G. M. (ed): *Natural enemies of terrestrial molluscs*. Wallingford, CAB International, s. 525 - 557.

Moravec F. (1996). Aquatic invertebrates (snails) as new paratenichosts of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea) and the role of paratenic hosts in the life cycle of this parasite. *Diseases of Aquatic Organisms*, 27: 237 - 239.

Morii Y., Nakano T. (2017). Citizen science reveals the present range and a potential native predator of the invasive slug *Limax maximus* Linnaeus, 1758 in Hokkaido, Japan. *Bioinvasion Records*, 6: 181 - 186.

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

Nermuť J. (2012). Komplexní charakteristika hlístic *Phasmarhabditis hermaphrodita*. (Disertační práce). České Budějovice, s. 40. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta.

Nermuť J., Půža V., Mráček Z. (2012). The effect of intraspecific competition on the development and quality of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae). *Biocontrol Science and Technology*, 22: 1389 - 1397.

Nermuť J., Půža V., Mráček Z. (2014). The effect of different growing substrates on the development and quality of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae). *Biocontrol Science and Technology*, 24: 1026 - 1038.

Nermuť J., Půža V. (2016). Parazitické hlístice plžů. *Živa*, 2: 81 - 83.

Nermuť J., Půža V., Mráček Z. (2016a). *Phasmarhabditis apuliae* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a new rhabditid nematode from milacid slugs. *Nematology*, 118: 1095 - 1112.

Nermuť J., Půža V., Mekete T., Mráček Z. (2016b). *Phasmarhabditis bonaquaense* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a new slug-parasitic nematode from the Czech Republic. *Zootaxa*, 4179: 530 - 546.

Nermuť J., Půža V. (2017). Slug parasitic nematodes: biology, parasitism, production and application. In: Abd-Elgawad M. M. M., Askary T. H., Coupland J. (eds): *Biocontrol agents: entomopathogenic and slug-parasitic nematodes*. Wallingford, CAB International, s. 533 - 547.

Nermuť J., Půža V., Mekete T., Mráček Z. (2017). *Phasmarhabditis bohémica* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a slug-parasitic nematode from the Czech Republic. *Nematology*, 19: 93 - 107.

Nghiem L. T. P., Soliman T., Yeo D. C. J., Tan H. T. W., Evans T. A., Mumford J. D., Keller R. P., Baker R. H. A., Corlett R. T., Carrasco L. R. (2013). Economic and environmental impacts of harmful non-indigenous species in Southeast Asia. *PLoS One*, 8: e71255.

Norden A., Williams G. (2015). *Limax maximus* (Gastropoda: Limacidae) predation on *Magicicada septendecim* (Hemiptera: Cicadidae) in Prince George's County, Maryland. *The Maryland Naturalist*, 53: 52 - 54.

Odaibo, A. B., Dehinbo A. J., Olofintoye L. K., Falode O. A. (2000). Occurrence and distribution of *Rhabditis axei* (Rhabditida: Rhabditidae) in African giant snails in southwestern Nigeria. *Helminthologia*, 37: 233 - 235.

Osche G. (1952). Systematik und Phylogenie der Gattung *Rhabditis* (Nematoda). *Zoologische Jahrbücher für Systematik Ökologie und Geographie der Tierre*, 81: 190 - 280.

Patel M. N., Stolinski M., Wright D. J. (1997). Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. *Parasitology*, 114: 489 - 496.

Pieterse A., Malan A. P., Ross J. L. (2017). Nematodes that associate with terrestrial molluscs as definitive hosts, including *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Rhabditida: Rhabditidae) and its development as a biological molluscicide. *Journal of Helminthology*, 91: 517 - 527.

Poinar G. O., Hansen E. L. (1986). Associations between nematodes and bacteria. *Heminthological Abstracts (Series B)*, 55: 61 - 68.

Poulin R., Morand S. (2000). The diversity of parasites. *Quarterly Review of Biology*, 75: 277 - 293.

Půža V., Mráček Z., Nermuť J. (2016). Novelty in pest control by entomopathogenic and molluscparasitic nematodes. In: Harsimran G. (ed): *Integrated pest management (IPM): environmentally sound pest management*. InTech, s. 71 - 102.

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

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

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

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

Rae R. (2017). The gastropod shell has been co-opted to kill parasitic nematodes. *Scientific Reports* 7: 4745. Dostupné on-line 20. 3. 2019: doi:10.1038/s41598-017-04695-5, <https://www.nature.com/articles/s41598-017-04695-5>.

Raut S. K., Barker G. M. (2002). *Achatina fulica* Bowdich and other Achatinidae as pests in tropical agriculture. In: Barker G. M. (ed): *Molluscs as crop pests*. Wallingford, CAB International, s. 55-114.

Reise H. (2007). A review of mating behavior in slugs of the genus *Deroceras* (Pulmonata: Agriolimacidae). *American Malacological Bulletin*, 23: 137 - 156.

Rollo C. D., Wellington W. G. (1977). Why slugs squabble. *Natural History*, 86: 46 - 51.

Rollo C. D., Wellington W. G. (1979). Intra- and inter-specific behavior among terrestrial slugs (Pulmonata: Stylommatophora). *Canadian Journal of Zoology*, 57: 846 - 855.

Rosenberg G. (2014). A new critical estimate of named species-level diversity of the recent Mollusca. *American Malacological Bulletin*, 32: 308 - 322.

Salvio C., Faberi A. J., López A. N., Manetti P. L., Clemente N. L. (2008). The efficacy of three metaldehyde pellets marketed in Argentina on the control of *Deroceras reticulatum* (Müller) (Pulmonata: Stylommatophora). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6: 70 - 77.

Sandström J. P., Russell J. A., White J. P., Moran N. A. (2001). Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Molecular Ecology*, 10: 217 - 228.

Santacruz A., Toro P. M., Salazar G. C. (2011). Slugs control methods (*Deroceras* sp. Müller) in lettuce and broccoli crops. *Agronomía Colombiana*, 29: 241 - 247.

Selvan S., Campbell J. F., Gaugler R. (1993). Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62: 278 - 284.

Scheil A. E., Hilsmann S., Tribskorn R., Köhler H.-R. (2014). Shell colouration and parasite tolerance in two helicoid snail species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 117: 1-8.

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

Sohlenius B. (1968). Influence of microorganisms and temperature upon some rhabditid nematodes. *Pedobiologia*, 8: 137 - 145.

South A. (1982). A comparison of the life cycles of *Deroceras reticulatum* (Müller) and *Arion intermedius* Normand (Pulmonata: Stylommatophora) at different temperatures under laboratory condition. *Journal of Molluscan Studies*, 48: 233 - 244.

South A. (1992). Terrestrial slugs: biology, ecology and control. London, Chapman and Hall, s. 428.

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

Speiser B., Gled D., Piggott S., Ester A., Davies K., Castillejo J., Coupland J. (2001b). Slug damage and control of slugs in horticultural crops. Frick, Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), s. 8.

Stryker T. D., Stone W. J., Savage A. M. (1982). Renal failure secondary to *Moraxella osloensis* endocarditis. *The Johns Hopkins Medical Journal*, 151: 217 - 219.

Sudhaus W. (2018). Various evolutionary avenues of Nematoda to parasitism in Gastropoda. *Soil Organisms*, 90: 115 - 122.

Sugarman B., Clarridge J. (1982). Osteomyelitis caused by *Moraxella osloensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 15: 1148 - 1149.

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

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

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

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

Thomas A., McDonnell R., Paine T., D., Harwood J. D. (2010). A field guide to the slugs of Kentucky. Lexington, University of Kentucky, College of Agriculture, s. 34.

Towner K. J. (1997). Clinical importance and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. Proceedings of a symposium held on 4-5 November 1966 at Eliat, Israel. *Journal of Medical Microbiology*, 46: 721 - 746.

Wale S. J., Platt H. W., Cattlin N. D. (2008). Diseases, pests and disorders of potatoes: a colour handbook. London, Manson Publishing, s. 105.

Wang X., Quinn P. J. (2010). Endotoxin: lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. In: Wang X., Quinn P. J. (eds): *Endotoxins: structure, function and recognition*. Dordrecht, Springer, s. 3 - 25.

Wiktor A. (2000). Agriolimacidae (Gastropoda: Pulmonata) a systematic monograph. *Annales Zoologici*, 49: 347 - 590.

Williams A., Rae R. (2016). *Cepaea nemoralis* (Linnaeus, 1758) uses its shell as a defence mechanism to trap and kill parasitic nematodes. *Journal of Molluscan Studies*, 82 349 - 350.

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

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

Wilson M. J., Glen J. D., Pearce J. D. (1993c). Biological control of mollusc. Patent: WO 93/00816, 38 s.

Wilson M. J., George S. K., Glen D. M., Pearce J. D., Rodgers P. B. (1993d). Biological control of slug and snail pests with a novel parasitic nematode. In: *A.N.P. P. Third international conference on pests in agriculture*. Montpellier, s. 425 - 432.

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

Wilson M. J., Glen D. M., George S. K., Pearce J. D. (1995b). Selection of a bacterium for the mass-production of *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Nematoda: Rhabditidae) as a biocontrol agent for slugs. *Fundamental and Applied Nematology*, 18: 419 - 425.

Wilson M. J., Hughes L. A., Hamacher G. M., Barahona L. D., Glen D. M. (1996). Effects of soil incorporation on the efficacy of the rhabditid nematode, *Phasmarhabditis hermaphrodita*, as a biological control agent for slugs. *Annals of Applied Biology*, 128: 117 - 126.

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

Wilson M. J., Grewal P. S. (2005). Biology, production and formulation of slug-parasitic nematodes. In: Grewal P. S., Ehlers R.-U., Shapiro-Ilan D. I. (eds): *Nematodes as biocontrol agents*. Wallingford, CAB International, s. 421 - 499.

Wilson M. J. (2012). Pathogens and parasites of terrestrial molluscs. In: Lacey L. A. (ed): *Manual of techniques in invertebrates pathology*. 2nd edition. San Diego, CA: Academic Press, s. 427 - 439.

Wilson M., Rae R. (2015). *Phasmarhabditis hermaphrodita* as a control agent for slugs. 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. 509 - 521.

Woodring J. L., Kaya H. K. (1988). Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. Series 331. Fayetteville, Arkansas Agricultural Experiment Station, 30 s.

Young J. M., Dunhill P., Pearce J. D. (2002). Separation characteristics of liquid nematode culture and the design of recovery operations. *Biotechnology Progress*, 18: 29 - 35.

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

9 OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA



Obrázek 5: Kontrolní miska se slimáčkem síťkovaným pro sledování příjmu potravy.
(Foto: M. Holley)



Obrázek 6: Velká miska pro sledování mortality slimáčků síťkovaných.
(Foto: M. Holley)



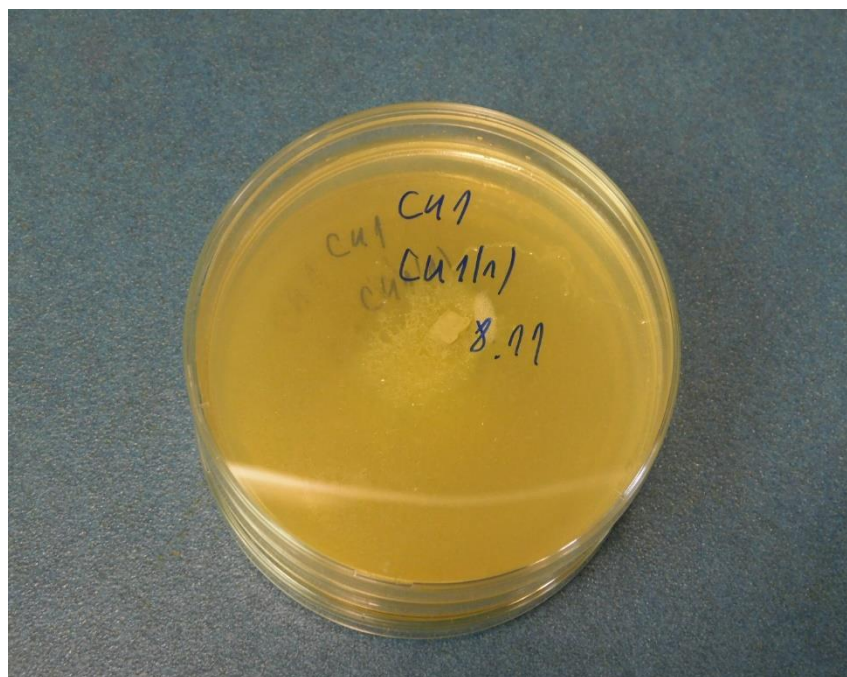
Obrázek 7: Slimáček sítkovaný usmrcený hlísticemi.
(Foto: M. Holley)



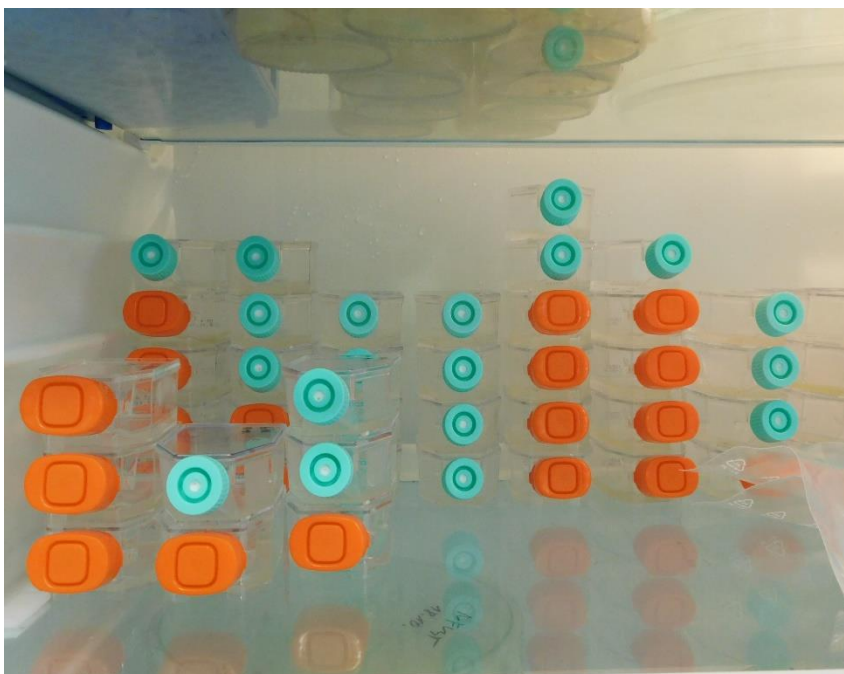
Obrázek 8: Detailní pohled na množící se hlístice na plášti slimáčka sítkovaného.
(Foto: M. Holley)



Obrázek 9: Skleničky s tekutým ledvinovým médiem.
(Foto: M. Holley)



Obrázek 10: Množení monoxenické kultury hlístic.
(Foto: M. Holley)



Obrázek 11: Uchování invazních larev v chladicím boxu.
(Foto: M. Holley)



Obrázek 12: Bakteriální kultura v YS médiu.
(Foto: M. Holley)