ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH
A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ
KATEDRA OCHRANY ROSTLIN

Arthrobotrys oligospora jako alternativní bioagens proti Meloidogyne hapla (Certifikovaná metodika)

2011

Ondřej Douda, Miloslav Zouhar, Jana Mazáková, Jana Nováková

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

Arthrobotrys oligospora jako alternativní bioagens proti *Meloidogyne hapla*

(Certifikovaná metodika)

Ondřej Douda[2], Miloslav Zouhar[1], Jana Mazáková[1], Jana Nováková[1]

2011

[1]Česká zemědělská univerzita v Praze

[2]Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

© Ondřej Douda

ISBN:

1. CÍL METODIKY 4

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY 4

2.1. Literární přehled 4

2.1.1. Úvod 4

2.1.2. Ochrana pomocí nematofágních hub 5

2.1.3. Testování nematofágní aktivity půdních hub 7

2.1.4. Kultivace hub pro komerční využití 8

2.1.5. *Arthrobotrys oligospora* 9

2.2. Vlastní metodika 12

2.2.1. Získání izolátu *Arthrobotrys oligospora* 12

2.2.1.1. Příprava *Caenorhabditis elegans* 12

2.2.1.2. Příprava háďátek *Caenorhabditis elegans* 14

2.2.1.3. Izolace a kultivace *Arthrobotrys oligospora* z půdního vzorku 14

2.2.1.3.1. Složení a příprava pevných kultivačních médií 16

2.2.1.3.2. Složení a příprava tekutých kultivačních médií 18

2.2.2. Diagnostika *Arthrobotrys oligospora* 18

2.2.2.1. Diagnostika pomocí světelné mikroskopie 18

2.2.2.2. Diagnostika na úrovni nukleových kyselin 19

2.2.2.2.1. Izolace DNA 19

2.2.2.2.2. CAPs markery Arthrobotrys oligospora 20

2.2.3. Kultivace v tekutém médiu 22

2.2.4. Závěr 23

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“ 23

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY 23

5. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY 24

6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE 27

7. DEDIKACE 27

8. OPONENTI 27

9. PŘÍLOHY 28

9.1. Seznam použitého materiálu 28

9.2. Obrazová příloha 30

1. Cíl metodiky

Cílem této metodiky bylo vytvořit postupy pro získání, diagnostiku a namnožení nematofágní houby *Arthrobotrys oligospora* za účelem její aplikace jako bioagens proti fytoparazitickým háďátkům.

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Literární přehled

2.1.1. Úvod

Škodlivé organismy patří v řadě případů k faktorům výrazně limitujícím pěstování zemědělských plodin. Jak karanténní, tak nekaranténní škůdci mohou způsobovat ekonomicky významné ztráty, zejména pak při absenci aplikovatelných metod ochrany rostlin. Velmi problematickou skupinou jsou v tomto ohledu fytoparazitická háďátka. Tito mikroskopičtí škůdci jsou často schopni přežívat po dlouhý čas v půdě a dlouhodobě tak negativně ovlivňovat výnos a kvalitu pěstovaných plodin. Mezi nejvýznamnější háďátka patří zejména cystotvorné druhy, např. karanténní zástupci - háďátko bramborové (*Globodera rostochiensis*) a háďátko nažloutlé (*Globodera pallida*) nebo háďátka rodu *Heterodera* a z nich nejvýznamnější druhy háďátko řepné (*Heterodera schachtii*) a háďátko ovesné (*Heterodera avenae*). Značné škody mohou ovšem způsobovat i hálkotvorné či volně žijící druhy háďátek. V současnosti způsobuje na našem území nejzávažnější škody hálkotvorný druh *Meloidogyne hapla*. Škodlivost tohoto druhu je v současné době taková, že se přítomnost *Meloidogyne hapla* stává limitujícím faktorem pěstování zejména kořenové zeleniny na písčitých půdách v oblasti Polabí. Na těchto lokalitách byly rovněž zaznamenány překvapivě intenzivní příznaky způsobené *Meloidogyne hapla* na raných bramborách, což vypovídá o přítomnosti četné a velmi agresivní populace. Z volně žijících druhů háďátek vykazuje značnou odolnost k nepříznivým vnějším podmínkám např. háďátko zhoubné (*Ditylenchus dipsaci*). Tento karanténní druh škodící lokálně na porostech cibulovin je schopen přežívat v anabiotickém stavu v půdě řadu let (Decker, 1969).

Ochrana zemědělských plodin před fytoparazitickými háďátky je znesnadněna nemožností přesné lokalizace těchto škodlivých organismů v půdě. Distribuce jednotlivých druhů v půdním profilu se sice liší, obecně můžeme u druhů poškozujících polní a zahradní plodiny předpokládat přítomnost maximálního počtu jedinců do cca 25 cm hloubky ornice. Při snaze o účinný zásah pomocí příslušných chemických prostředků je na tuto skutečnost nutno brát ohled, proto je nezbytné použití maximálních přípustných dávek chemické látky a její kvalitní zapravení do půdy. Účinnou ochranu

proti fytoparazitickým háďátkům také znesnadňuje sortiment nematocidů v registru povolených přípravků na ochranu rostlin. Momentálně připadá v úvahu pouze použití Basamid granulátu (účinná látka dazomet), jehož aplikace s sebou nese riziko kontaminace spodních vod a jeho použití nepřichází v úvahu v systémech produkce biopotravin. Fyzikální metody jako např. propařování půdy, ozonizace jsou použitelné a rentabilní jen u malých ploch a objemů půdy, a jejich využitelnost pro polní porosty je z ekonomického hlediska nemyslitelná. Nepřímé ochranné postupy využívající speciálně navržené osevní sledy a pěstování rezistentních či tolerantních odrůd jsou využitelné pouze částečně. V tomto případě jsou komplikací často velmi široké okruhy hostitelských rostlin fytoparazitických háďátek a nedostatek vhodných rezistentních odrůd. Všechny tyto skutečnosti mají za následek momentální absenci účinných ochranných prostředků proti škodlivým fytoparazitickým háďátkům. Z tohoto důvodu je nutné hledat nové postupy, jež by se v této oblasti daly využít a byly zároveň využitelné v integrovaných systémech rostlinné výroby.

2.1.2. Ochrana pomocí nematofágních hub

Celosvětovým trendem je v posledních zhruba 25 letech vývoj biologických metod ochrany rostlin. V případě fytoparazitických háďátek se pozornost zaměřila na výzkum možností použití nematofágních půdních hub. Tyto organismy skýtají značný potenciál právě pro použití v integrovaných systémech produkce rostlin, což bylo potvrzeno vývojem v současnosti komerčně dostupného přípravku KlamiC® na bázi nematofágní houby druhu *Pochonia chlamydosporia* (Hernández a Hidalgo Díaz, 2008).

Vlastní mechanismus ataku háďátek houbami je značně rozmanitý. Vedle lapání dospělých háďátek pomocí zvláštních struktur existují i nematofágní houby infikující vajíčka háďátek. V této oblasti byla dosud značná pozornost věnována houbě druhu *Pochonia chlamydosporia*, která se vyskytuje v půdě a kolonizuje kořeny rostlin. Houba následně napadá vaječné vaky tvořené hálkotvornými fytoparazitickými háďátky r. *Meloidogyne*, vajíčka jsou zničena a životní cyklus háďátka je přerušen (Hirsch *et al*., 2001). Význam aplikace nematofágní houby nemusí spočívat pouze v eradikaci fytoparazitických háďátek. Pro pěstitele důležitým efektem může být i pouhé zpomalení nástupu napadení pěstované plodiny háďátky, čehož bylo dosaženo např. právě pomocí druhu *Pochonia chlamydosporia* (Van Damme *et al*., 2005).

Důležité je rovněž sledování schopnosti daného druhu nematofágní houby kolonizovat kořenový systém rostliny, která je předmětem ochrany. Některé houby jako např. *Arthrobotrys oligospora* jsou

schopny chemotropicky reagovat na přítomnost kořenů vhodných rostlin a tuto schopnost použít pro jejich kolonizaci (Bordallo *et al*., 2002).

Obecně platí, že vyšší výskyt háďátek r. *Meloidogyne* v půdě má za následek i jejich vyšší výskyt v kořenech hostitelských rostlin, což vede rovněž k vyššímu zastoupení nematofágních hub v rhizosféře. Bylo zjištěno, že růst nematofágní houby druhu *Pochonia chlamydosporia* na kořenech lze stimulovat přidáním háďátek, jejichž minimální potřebné množství je v případě rajčete a kapusty 500 jedinců. Schopnost zvyšovat kolonizaci kořenů myceliem nematofágní houby v přítomnosti fytoparazitických háďátek se nicméně liší v závislosti na druhu hostitelské rostliny (Bourne a Kerry, 1998).

Zastoupení nematofágních hub v půdě je ovlivněno řadou různých faktorů. Za nejvýznamnější je možné považovat teplotu a vlhkost půdy, dále potom i půdní druh a typ. V případě nematofágní houby *Hirsutella minnesotensis* bylo zjištěno, že tento druh preferuje chladnější, sušší a těžší půdy (Xiang *et al*., 2010). Výskyt nematofágních hub v půdě je možné ovlivnit přidáním organických látek. V případě druhu *Dactylellina haptotyla* mělo přidání sušených listů révy vinné za následek zvýšení zastoupení biomasy mycelia v půdě i zesílení nematofágní aktivity tohoto druhu, i když se účinek lišil v závislosti na ročníku. U nematofágních hub druhů *Arthrobotrys oligospora* a *Arthrobotrys eudermata* mělo stejné opatření za následek pouze nárůst biomasy, nematofágní aktivita zvýšena nebyla (Jafee, 2002).

Bylo zjištěno, že aktivita různých biotypů nematofágních hub se může lišit. Manzanilla-López *et al*. (2009) byli schopni pomocí PCR fingerprintingu různých izolátů nematofágní houby druhu *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* rozlišit 3 různé biotypy, přičemž biotypy označované jako A a B preferovaly hálkotvorné druhy háďátek, zatímco biotyp C napadal spíše druhy cystotvorné. Účinnost nematofágních hub se rovněž lišila v závislosti na kombinaci výskytu biotypů. Pokud byly v půdě přítomny všechny biotypy zároveň, byl nematocidní účinek nižší než v případě přítomnosti pouze jednoho biotypu.

Důležitým faktorem při snaze o využití nematofágních hub jako agens pro komerční biologickou ochranu je také perzistence a reprodukce daného druhu v půdě. Doba, po kterou je nematofágní houba v půdě schopna přežívat závisí na půdním druhu a obsahu organických látek. U nematofágní houby druhu *Paecilomyces lilacinus* bylo zjištěno, že doba kolonizace je delší na jílovitých půdách a přítomnost háďátek či jejich hostitelských rostlin na tuto dobu neměla žádný vliv (Rumbos *et al*., 2008). Výzkum nematofágních hub se zaměřil i na problematiku entomoparazitických háďátek rodů

Steinernema a *Heterorhabditis*. V případě nematofágní houby *Gamsylella gephyropaga* byla zjištěna redukce počtu háďátek těchto rodů až o 92 %, u houby druhu *Arthrobotrys oligospora* se počet háďátek snížil v průměru o 82 % (El-Borai *et al*., 2009). Skutečnost, že výskyt entomoparazitických háďátek může být přítomností nematofágních hub negativně ovlivněn, je nutno vzít v úvahu při návrhu integrovaných postupů ochrany rostlin.

2.1.3. Testování nematofágní aktivity půdních hub

Prvním krokem při testování nematofágní aktivity mikroskopických hub je zpravidla jejich izolace z půdních vzorků, hostitelských rostlin háďátek či samotných háďátek. Izolaci z půdy je možné realizovat rozetřením vodní suspenze půdních částic na pevné živné médium obsahující chloramfenikol (Gené *et al*., 2005). Při izolaci z hostitelských rostlin je možné např. umístit kořenové hálky na živné médium a po 7 - 30 dnech inkubace pozorovat a určit narostlé kolonie hub (Singh *et al*., 2007). Jiným přístupem je izolace hub ze samotných háďátek. Tímto způsobem lze např. získat izoláty výše uvedené houby druhu *Pochonia chlamydosporia* (Hidalgo-Diaz *et al*., 2000). Bylo zjištěno, že u hálkotvorných druhů háďátek se skladba přítomných druhů nematofágních druhů hub liší v závislosti na stáří hálek (Singh *et al*., 2007). Výše uvedenými způsoby je možné získat větší počet izolátů a postupně testovat jejich nematofágní aktivitu.

Primární screening probíhá většinou v *in vitro* podmínkách. Například je možné studovat nepřímé účinky filtrátů houby na životaschopnost háďátek. Tímto způsobem byla zjištěna toxicita filtrátů z nematofágních hub druhů *Paecilomyces lilacinus, Stagonospora heteroderae, Neocosmospora vasinfecta* a *Fusarium solani* vůči larvám druhého vývojového stupně háďátka *Heterodera glycines*, zatímco filtráty z *Exophiala pisciphila, Fusarium oxysporum, Gliocladium catenulatum, Pyrenochaeta terrestri* a *Pochonia chlamydosporia* nemají na vývoj *Heterodera glycines* negativní vliv (Chen *et al*., 2000). Přímé působení mycelia nematofágní houby se testuje rovněž. Testovaná houba je pěstována v Petriho misce na příslušném kultivačním médiu a následně je na narostlé mycelium napipetována suspenze sterilizovaných háďátek. Již po několika hodinách je zpravidla možné u houby mikroskopicky pozorovat tvorbu lapacích orgánů a určit počet jimi zachycených háďátek (Singh *et al*., 2007). Pro rychlý screening lze rovněž použít sklíčkové kultury (Zouhar *et al*., 2010).

Informace získané tímto způsobem mohou sloužit jako prvotní kritérium pro výběr druhů nematofágních hub pro další biologické testy. Tato fáze je zpravidla prováděna pomocí nádobových pokusů. Nejprve je zapotřebí získat dostatečné množství biologického materiálu, to znamená vyvinout postup kultivace vybraných druhů nematofágních hub ve větším objemu. Použitelných

metod existuje celá řada. Při snaze o využití již dříve popsaných postupů je však zapotřebí vždy je optimalizovat pro daný druh houby a podmínky pracoviště. Způsob optimální kultivace se navíc může lišit i v závislosti na daném izolátu nematofágní houby. Pro masovou kultivaci nematofágních hub je možné využít rostlinný materiál. Např. pro kultivaci houby druhu *Arthrobotrys dactyloides* byly testovány pěstební substráty vytvořené z hrachu, cizrny, pelušky, čočky, rýže, pšenice, ječmenu, kukuřice a čiroku, přičemž nejlepší výsledky byly zjištěny u substrátů z hrachu a ječmene (Kumar *et al*., 2005). Kultivaci nematofágních hub je také možné realizovat na médiu připraveném smícháním běžného kultivačního média a rostlinného materiálu. Al-Hazni *et al*. (1982) pro tento účel použili směs Czapkova média s kukuřičnou moukou. Další možností je např. použití kukuřičného agaru (Kumar a Singh, 2006).

2.1.4. Kultivace hub pro komerční využití

K velkoobjemové kultivaci hub lze přistoupit řadou různých způsobů. V tomto směru existují data týkající se zejména kultivace entomopatogenních hub, protože biologická ochrana proti hmyzu je komerčně dostupná již řadu let. Mnoho výsledků bylo získáno i u hub používaných jako ochranný prostředek proti napadení rostlin jinými patogenními houbami. V každém případě je vždy nezbytně nutné přesný postup kultivace optimalizovat s ohledem na konkrétní druh houby. Často se liší i postupy pro kultivaci různých druhů pocházejících ze stejného rodu. Tato skutečnost byla zjištěna např. v případě kultivace entomopatogenních hub druhů *Cordyceps militaris* a *Cordyceps sinensis* (Kim a Yun, 2005). V tomto ohledu je pak příprava funkční metodiky zcela nezastupitelná.

Pro velkoobjemovou kultivaci je možné použít kapalné, pevné, nebo dvoufázové produkční systémy. Např. pro produkci entomopatogenní houby druhu *Verticillium lecanii* je možné použít různá tekutá média obsahující extrakty z brambor a mrkve či melasy, jako pevné médium je možné použití obilek pšenice, ječmene, žita nebo rýže. Při použití tohoto druhu pevného média se k obilkám přidává malé množství uhličitanu vápenatého a síranu vápenatého, čímž se předejde slepování obilek a zmenšení celkového povrchu kultivačního média. V případě výše uvedeného druhu *Verticillium lecanii* však bylo nejlepších výsledků dosaženo u dvoufázového produkčního systému využívajícího kombinaci tekutého média obsahujícího kvasniční extrakt a pevnou fázi tvořenou rozdrcenými obilkami rýže (Derakhshan *et al*., 2008). Existují i snahy o návrhy komplexních technologií např. pro dřevozpracující průmysl, kde je produkce hub pro biologickou ochranu součástí využití odpadních produktů (Ramona a Line, 2002).

Nezbytnou součástí optimalizace velkoobjemové kultivace je samozřejmě nastavení podmínek. U kultivace nematofágních hub bylo např. zjištěno, že osvětlení značně omezuje růst druhů *Paecilomyces lilacinus*, *Lecanicillium lecanii* a *Metarhizium anisopliae*. Na druhou stranu kultivace za světla má u nematofágních hub druhů *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia* a *Lecanicillium lecanii* za následek zvýšenou sporulaci (Gao *et al*., 2009). Optimalizaci délky a intenzity osvětlení, teploty, vlhkosti a v případě kultivace v tekutých médiích amplitudy míchání suspenze je tak nutné u každého druhu houby věnovat značnou pozornost. Techniku optimalizovanou pomocí maloobjemové laboratorní kultivace je nutné ověřit v poloprovozních podmínkách. Tento postup je usnadněn použitím profesionálního kultivačního zařízení, protože moderní biofermentory umožňují snadné nastavení všech základních nezbytných parametrů a *in situ* sterilizaci kultivačního média.

2.1.5. *Arthrobotrys oligospora*

Arthrobotrys oligospora Fresen. 1850
říše: *Fungi*
oddělení: *Ascomycota*
podkmen: *Pezizomycotina*
třída: *Orbiliomycetes*
podtřída: *Orbiliomycetidae*
řád: *Orbiliales*
čeleď: *Orbiliaceae*
rod: *Arthrobotrys*
Kirk (2010).

Rod *Arthrobotrys* byl popsán Cordou v roce 1839 na základě typového zástupce *Arthrobotrys superba* Corda 1839. Tento početný rod zahrnuje saprofytické druhy, kteří jsou schopni za určitých podmínek formovat na saprofyticky žijícím myceliu lapací struktury a pomocí těchto struktur parazitovat jiné organismy. Nejznámějším a nejvíce prostudovaným druhem tohoto rodu je především *Arthrobotrys oligospora* . Tento druh byl poprvé popsán Freseniem v roce 1850. Nematofágní aktivity této houby si však povšimnul a zaznamenal Zopf v roce 1888 (Gray, 1987). *Arthrobotrys oligospora* patří mezi nejběžnější a kosmopolitně vyskytující se druhy nematofágních hub. Vyskytuje se v půdách různých typů lesů, v půdách lesostepí, v obdělávaných půdách, v půdách pastvin a trávníků. *Arthrobotrys oligospora* je součástí rhizosféry některých plodin jako je ječmen, fazol, cukrová řepa, sója atd. Běžným materiálem pro izolaci tohoto druhu je rozložený rostlinný materiál, listy, kořeny, kompost, rašelina a hnůj (Domsch *et al*., 1980).

Arthrobotrys oligospora patří do skupiny nematofágních hub, které vytvářejí lapací struktury, skupina tzv. „dravých“ hub. Kromě tvorby typických lepivých sítí formuje tento druh v rámci parazitismu další struktury sloužící k získávání živin - konidiové pasti, hyfové spirály a apresoria. Všechny tyto struktury jsou utvářeny v rámci morfologické adaptace houby jako odezva na okolní podmínky prostředí (Nordbring-Hertz *et al*., 2006; Rubner A. (1996).

Lepivé sítě jsou tvořeny komplexem trojrozměrných lepivých sítí. Evolučně se vyvinuly z lepivých větví. Sítě se formují ze vzpřímených postranních větví vyrůstajících z vegetativní hyfy, stáčejí se a spojují s nosnou hyfou. Další postranní hyfa se vytváří z nosné hyfy či smyčky (oka) a vytváří další smyčku, dokud se nevytvoří síť spojených ok mimo nosnou hyfu. Celá síť je pokryta tenkou vrstvou adhezivní látky, na níž se háďátko přichytí, zaplete do vláken a uvízne v síti (Gray, 1987). Na rozdíl od vegetativních hyf hyfy těchto sítí mají v cytosolu organely - energetická tělíska obsahující katalázu a oxidázu D-aminokyseliny. Tyto tělíska jsou translokovány po penetraci kutikulou háďátka do vyživovací hyfy a zřejmě sehrávají roli jako možný doplněk energie (Nordbring-Hertz, 2004). Morfogeneze lepivých sítí je indukována přítomností háďátek, nízkým obsahem živin v prostředí a chemickým působením látek tzv. neminů (Jansson a Nordbring-Hertz, 1980). V pevných a tekutých nutričně chudých živných médiích je tvorba sítí podpořena přidáním jednoduchých peptidů s vysokým podílem nepolárních a aromatických aminokyselin nebo přidáním aminokyselin těchto peptidů (Nordbring-Hertz *et al*., 2006).

Lapací pasti se mohou rovněž formovat bez předchozí tvorby vegetativní hyfy přímo na klíčící konidii, pak hovoříme o tzv. konidiových pastech. Tyto struktury byly pozorovány v kravském hnoji (Dackman a Nordbring-Hertz, 1992), rhizosféře (Persmark a Nordbring-Hertz, 1997), nikdy však v čisté kultuře bez přítomnosti přirozeného substrátu (hnůj, půda) (Dackman a Nordbring-Hertz, 1992). Tvorba konidiových pastí je indukována nízkým obsahem živin v prostředí a kompeticí o živiny s dalšími mikroorganismy. Tyto pasti se tedy vytvářejí, aby houba překonala nepříznivé fungistatické podmínky v půdě, a fungují rovněž jako přežívající struktury (Nordbring-Hertz, 2004).

Druh *Arthrobotrys oligospora* není hostitelsky specializován na určité druhy háďátek. Zachytává a jako zdroj výživy využívá volně žijící, fytoparazitické i zooparazitické druhy háďátek. Interakce houby s háďátkem je umožněna přítomností lektinu AOL, který se váže na sacharidové receptory (N-acetylgalactosamin) na povrchu těla háďátka. Trojrozměrné lepivé sítě jsou pokryty vrstvou mimobuněčných vlákének, které se po kontaktu s háďátkem orientují kolmo k hostiteli tak, aby usnadnily ukotvení a invazi háďátka. Po adhezi s háďátkem *Arthrobotrys oligospora* vytváří klíčící

vlákno, které penetruje kutikulu háďátka mechanickým tlakem a působením hydrolytických enzymů, především subsitilinu (PII) ze skupiny serinových proteáz. Subtilisin sehrává jako virulenční faktor řadu významných funkcí při procesu patogeneze. Imobilizuje háďátka, hydrolyzuje proteiny kutikuly a tkání, ovlivňuje diferenciaci lepivých sítí a má nematotoxický účinek (Åhman *et al*., 2002). Po penetraci kutikulou hostitele se klíční vlákno zvětšuje a vytváří infekční váček. Současně s tvorbou infekčního váčku a následně z něj formující se vyživovací hyfy dochází v houbě k rozsáhlým ultrastrukturálním a fyziologickým změnám. Energetická tělíska jsou degradována v buňkách sítě i infekčního váčku. V průběhu asimilace živin a tvorby jejich zásob jsou vytvářeny ve vyživovací hyfě tukové kapénky. V cytoplazmě houby se vytváří velké množství lektinu AOL, který se hromadí v rostoucí vyživovací hyfě. Posléze je tento zásobní protein transportován do dalších částí mycelia mimo tělo háďátka a slouží jako zdroj energie pro následný růst mycelia (Rosén *et al*., 1997, Nordbring-Hertz *et al*., 2006).

Arthrobotrys oligospora patří i mezi druhy schopné mykoparazitismu, k čemuž využívá hyfové spirály, které se vinou kolem hyf hostitelské houby, např. *Rhizoctonia solani*. Morfologie těchto spirál je podobná lepivým sítím. Spirály však neobsahují tělíska typická pro lepivé sítě, rovněž nepenetrují houbového hostitele. Ovinutím kolem hostitelovy hyfy způsobují proliferaci buněčné stěny a rozklad cytoplazmy (Persson *et al*., 1985). Podrobná mikro a makromorfologie viz podčást 2.2.2.1..

Ve vztahu k rostlinám, v jejichž rhizosféře *Arthrobotrys oligospora* žije, je tato houba endofytním druhem. Během penetrace je formováno apresorium a houba intercelulárně a intracelulárně kolonizuje rhizodermis a kůru kořene, neproniká ale do středního válce k svazkům cévním. *Arthrobotrys oligospora* rostlinu nepoškozuje, naopak indukuje obranné reakce rostliny a může podpořit rezistenci rostliny k háďátkům nebo patogenům, což dává možnost využít tuto houbu v biologické ochraně proti fytoparazitickým háďátkům (Bordallo *et al*., 2002).

2.2. Vlastní metodika

2.2.1. Získání izolátu *Arthrobotrys oligospora*

2.2.1.1. Příprava *Caenorhabditis elegans*

Pro hledání hub s nematofágní aktivitou je vhodné použít jako „návnadu“ háďátka druhu *Caenorhabditis elegans* v tomto ohledu je možné obrátit se na naše pracoviště, které poskytne kulturu tohoto háďátka (izolát izolát Kostr2009/1) pro další množení. Toto háďátko je možné kultivovat na bakteriálních kulturách.

Příprava bakterií pro výživu *Caenorhabditis elegans* dle práce - Stiernagle (1999).

Materiál:

- výchozí kultura *Escherichia coli* klon OP50
- LB agar (pH 7,5): 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 5 g NaCl, 15 g agaru, doplnit destilovanou vodou na 1 l; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- tekuté LB médium (pH 7,0): 10 g bakteriologického tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 5 g NaCl, doplnit destilovanou vodou na 1 l; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- sterilní Petriho misky (60, 90 mm)
- 50 ml sterilní centrifugační zkumavky s víčkem
- bakteriologické očko

Postup:

Výchozí kultury *Escherichia coli* klon OP50 přeočkujeme na sterilní LB agarové plotny. Tímto způsobem získáme jednotlivé kolonie bakterií, kterými sterilním způsobem inokulujeme 30 ml sterilního tekutého LB média v 50 ml zkumavkách. Bakterie inkubujeme na horizontální třepačce (250 rpm) přes noc při teplotě 37 °C. Petriho misky i tekuté médium obsahující bakterie *Escherichia coli* je možné skladovat při teplotě 4 °C po dobu tří měsíců. Tekuté kultury bakterií dále použijeme pro přípravu kultivačních médií pro množení *Caenorhabditis elegans*, přičemž pro tento účel doporučujeme použití NGM média.

Příprava NGM média (Nematode Growth Medium) pro *Caenorhabditis elegans..*

Materiál:

- namnožené bakterie *Escherichia coli* OP50 v tekutém médiu

- destilovaná voda
- NaCl
- agar
- bakteriologický pepton
- 1M $CaCl_2$; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- roztok cholesterolu v etanolu (5mg/ml); po přípravě sterilizovat filtrací filtrem Whatman 1,2 mikrometru GF/C
- 1M $MgSO_4$; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- pufr 1M KPO_4 (108,3 g KH_2PO_4, 35,6 g K_2HPO_4, rozpustit v 1 l vody, pH 6,0); sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- 2 l Erlenmeyerova baňka
- sterilní Petriho misky (60, 90 mm)
- mikropipety, sterilní polypropylenové špičky
- hliníková fólie
- parafilm
- nematologická jehla

Postup:

Smícháme 3 g NaCl, 17 g agaru a 2,5 g peptonu v Erlenmeyerově baňce a doplníme do 1 l destilovanou vodou. Živné médium sterilizujeme po dobu 40 min při teplotě 121 °C. Baňku ochladíme na teplotu cca 55 °C, přidáme 1 ml 1M roztoku $CaCl_2$, 1 ml cholesterolu v etanolu, 1 ml 1M roztoku $MgSO_4$ a 25 ml 1M roztoku pufru KPO_4 a důkladně promícháme. Připravené médium rozlijeme do Petriho misek přibližně do 2/3 jejich objemu. Před použitím ponecháme misky 2-3 dny stát při laboratorní teplotě z důvodu indikace případné kontaminace a odpaření přebytečné vlhkosti. Do středu Petriho misky pak pipetujeme 500 µl tekuté kultury bakterií. Takto připravené živné plotny lze skladovat v laboratorní teplotě po dobu tří týdnů a kontinuálně je používat pro množení *Caenorhabditis elegans..* Již druhý den je možné přidat k bakteriím pomocí nematologické jehly jednotlivě háďátka *Caenorhabditis elegans* (cca 20 ks gravidních samiček) předem promytá v destilované vodě. Misky zafixujeme parafilmem a inkubujeme při pokojové teplotě (cca 22°C) do namnožení dostatečného množství háďátek, což trvá zpravidla 1 týden.

2.2.1.2. Příprava háďátek *Caenorhabditis elegans*

Materiál:

- háďátka *Caenorhabditis elegans.*
- destilovaná voda
- sterilní destilovaná voda
- kádinka
- síto (25 µm)
- Baermannova metoda: stojan, nálevka s gumovou hadičkou, polyamidové sítko, svorka, třívrstevné kapesníčky
- 10 % vodný roztok tetracyklinu
- mikropipeta, sterilní polypropylenové špičky, skleněná špička
- mikrozkumavky
- mikroskopické podložní sklíčko

Postup:

Háďátka *Caenorhabditis elegans* axenicky kultivovaná na NGM médiu plavíme i s agarem Baermannovou metodou. Suspenzi háďátek odpustíme do kádinky a několikrát promyjeme přes síto (25 µm), abychom ze suspenze odstranili větší část bakterií *Escherichia coli*. Háďátka v malém množství destilované vody slijeme ze síta do kádinky, rozdělíme do 2 ml mikrozkumavek a centrifugujeme při 6500 × g po dobu 10 min. Skleněnou špičkou odpipetujeme většinu vody a k háďátkům přidáme tetracyklin, tak aby jeho výsledná koncentrace byla 0,01% (w/v). Suspenzi jemně promícháme, opět centrifugujeme při 6500 × g po dobu 10 min a roztok tetracyklinu odpipetujeme skleněnou špičkou. K háďátkům přidáme sterilní destilovanou vodu a suspenzi jemně promícháme. Následně opět centrifugujeme (6500 × g, 10 min) a odpipetujeme většiny vody. Tento krok opakujeme dvakrát. Ze zbytku sterilní ddH_2O odebereme 1 µl a v tomto objemu spočítáme množství háďátek. Výslednou koncentraci suspenze háďátek upravíme na 1000 háďátek/100 µl přidáním sterilní destilované vody.

2.2.1.3. Izolace a kultivace *Arthrobotrys oligospora* z půdního vzorku

Materiál:

- půdní vzorek
- háďátka *Caenorhabditis elegans.*

- váženky
- 1,5% vodní agar s přídavkem 0,05% (w/v) chloramfenikol (WA-CH)
- ovesný agar (OA)
- agar se sladovým extraktem (MEA)
- sterilní Petriho misky (90 mm)
- mikropipeta, sterilní polypropylenové špičky
- parafilm

Postup:

V případě *Arthrobotrys oligospora* se jedná o druh vyskytující se jako nematofág i saprofyt v různých typech půd a substrátů. Přesto, pro dosažení úspěšné izolace *Arthrobotrys oligospora* , půdní vzorek doporučujeme vybrat na základě hypotézy, že přítomnost nematofágní houby je podpořena přítomností jejího hostitele, tedy háďátka. Lopatkou odebereme z různých míst a hloubek zhruba 0,5 kg půdy, které je pro izolaci dostačujícím množstvím. Půdu promícháme, necháme prosušit v laboratorních podmínkách a odvážíme po 1 g půdy. V laminárním boxu toto množství půdy rovnoměrně rozprostřeme na vodní agar (WA-CH) v Petriho misce. K podpoření růstu nematofágních hub jako návnadu do každé Petriho misky přidáme sterilně pipetou 1000 ks háďátek *Caenorhabditis elegans*. Petriho misky zafixujeme parafilmem, inkubujeme ve tmě při pokojové teplotě (22 °C) a průběžně sledujeme pomocí stereomikroskopu, zda dochází k růstu konidioforů *Arthrobotrys* spp.. Jednotlivé konidie přeneseme na pevné živné médium (v testech se nejlépe osvědčily OA nebo MEA) pomocí injekční jehly. Jehlu ožehnutou nad plamenem ochladíme v živném médiu tak, aby na hrotu jehly ulpělo malé množství živného média, které by umožnilo zachycení konidie na špičku jehly. Toto malé množství agaru umístíme na živnou půdu do středu Petriho misky. Petriho misky zafixujeme parafilmem a inkubujeme v termostatu při teplotě 22 °C. Po nárůstu sporulující kolonie houby, připravíme mikroskopický preparát konidioforu a houby zařadíme do rodu a druhu dle klíče Cooke a Godfrey (1964), Domsch *et al*. (1980), Rubner (1996), De Hoog (1985). Druh *Arthrobotrys oligospora* také doporučujeme identifikovat pomocí CAPs (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) analýzy (viz. níže). Dle potřeby kultury *Arthrobotrys oligospora* přeočkováváme na nové živné médium (OA) přenesením mycelia sterilní očkovací jehlou.

Pro kultivaci *Arthrobotrys oligospora* byla kromě OA použita a testována i následující media - PDA, MEA, mMEA, YMA, SDA, CDA a CMA (Himedia) a byl sledován vliv média na tvorbu mycelia a sporulaci. Nejrychlejší růst mycelia *Arthrobotrys oligospora* byl pozorován na ovesném agaru (OA), dále na agaru se sladovým extraktem (MEA) a agaru s kvasničným a sladovým extraktem (YMA). Sporulace mycelia na těchto médiích byla patrná po delší době inkubace zhruba za 14 dnů od

naočkování houby na média. Nejlépe druh *Arthrobotrys oligospora* vytvářel konidiofory rostoucí přímo ze substrátu (média) na Czapkově dox agaru (CDA), kukuřičném agaru (CMA) a dále na modifikovaném agaru se sladovým extraktem (mMEA) po jednom týdnu inkubace.

Bramborovo-dextrózový agar (PDA) a Sabouraudův agar (SDA) nejsou příliš vhodné pro kultivaci *Arthrobotrys oligospora* z hlediska tvorby mycelia i tvorby konidií.

2.2.1.3.1. Složení a příprava pevných kultivačních médií

Materiál:

OA – ovesný agar (oat meal agar) (Himedia)

složení:	g/l
• ovesná mouka	60
• agar	12,5

PDA - bramboro-dextrózový agar (potato dextrose agar) (Himedia)

složení:	g/l
• bramborová infuse z 200 g	4
• dextróza	20
• agar	15

MEA – agar se sladovým extraktem (malt extract agar base) (Himedia)

složení:	g/l
• sladový extrakt	30
• mykologický pepton	5
• agar	15

mMEA – modifikovaný agar se sladovým extraktem (modified malt extract agar base) (Himedia)

složení:	g/l
• masový pepton	0,78
• maltóza	12,75
• dextrin	2,75
• agar	15

YMA – agar s kvasničným a sladovým extraktem (yeast malt agar) (Himedia)

složení:	g/l
• masový pepton	5
• kvasničný extrakt	3
• sladový extrakt	3
• dextróza	10
• agar	20

SDA – Sabouraudův agar (Sabouraud Dextrose Agar) (Himedia)

složení:	g/l
• mykologický pepton	10
• dextróza	40
• agar	15

CDA – Czapkův agar (Czapek dox agar) (Himedia)

složení:	g/l
• sacharóza	30
• dusičnan sodný	2
• hydrogenfosforečnan draselný	1
• síran hořečnatý	0,5
• chlorid draselný	0,5
• síran železnatý	0,01
• agar	15

CMA – kukuřičný agar (corn meal agar) (Himedia)

složení:	g/l
• kukuřičná infuze z 50g	3
• agar	15

Postup:

Použitá média připravíme z dehydratovaných kultivačních médií (Himedia). Přesně podle návodu uváděného výrobcem odvážíme potřebné množství dehydratovaného média do vhodné Erlenmeyerovy baňky a doplníme požadovaným množstvím ddH_2O. Média sterilizujeme v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut a rozlijeme do 90 mm Petriho misek.

2.2.1.3.2. Složení a příprava tekutých kultivačních médií

Optimální pro kultivaci *Arthrobotrys oligospora* v tekutých podmínkách bylo tekuté ME médium, které připravíme z jednotlivých látek (Himedia). Navážené látky nasypeme do Erlenmeyerovy baňky a doplníme potřebným množstvím ddH_2O. Médium sterilizujeme v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

ME – tekuté médium se sladovým extraktem (malt extract liquid medium)

složení:	g/l
sladový extrakt	30
mykologický pepton	5

2.2.2. Diagnostika *Arthrobotrys oligospora*

2.2.2.1. Diagnostika pomocí světelné mikroskopie

K determinaci jednotlivých druhů nematofágních hub je možné použít klíče, který sestavili Cooke a Godfrey, (1964) nebo zjednodušeného klíče dle Wang a Mc Sorley, (2003) či klíčů Rubner (1996) a De Hoog (1985), které podrobně popisují morfologii všech zástupců skupiny *Arthrobotrys*. Mycelium *Arthrobotrys oligospora* je hyalinní, tvořené hyfami s přehrádkami. Konidiofory jsou vzpřímené, nevětvené, vyrůstají ze substrátu nebo vzdušného mycelia. Délka konidioforu je závislá na počtu jednotlivých pater tvořených hroznem konidií. Délka k prvnímu patru konidií je 350-450 µm, šířka konidioforu na jeho bázi je 8-10 µm, postupně se zužuje pod prvním patrem konidií na 2-6,5 µm. Postupným prodlužováním osy konidioforu se mohou vytvářet posloupně další patra konidií a délka konidioforu může dosáhnout 800 µm. Konidie se v patře vytvářejí na krátkých tupých zoubkách v hroznu (přeslenu). Konidie jsou obráceně vejčitého až hruškovitého tvaru a jsou dvoubuněčné. Velikost konidií se pohybuje v rozmezí 18-41 x 8-16,5 µm v závislosti na druhu živného média. Bazální buňka konidií je menší, distální buňka konidie může být 1,5-2x delší než buňka bazální (Domsch *et al.*, 1980). Dostačující pro sledování mikromorfologických diagnostických znaků ve vodním nativním preparátu je 400 násobné zvětšení.

2.2.2.2. Diagnostika na úrovni nukleových kyselin

2.2.2.2.1. Izolace DNA

Pro izolaci DNA lze doporučit komerčně dodávaný kit firmy Qiagen (QIAamp DNAeasy plant mini kit). Tento kit svojí dostupnou cenou a jednoduchostí provedení umožňuje aplikaci metody izolace DNA pomocí hydroxyapatitové matrix i v laboratořích, kde tato technika není osvojena.

1. Petriho misku s narostlou kulturou izolátu houby určeného pro testování zalijeme tekutým dusíkem a mycelium z cca 4 cm^2 snadno seškrábeme pomocí vysterilizované nerezové laboratorní škrabky do předem vychlazené třecí misky a homogenizujeme s přidáváním dusíku až do vytvoření jemného bílého prášku.
2. Do připraveného prášku, který přemístíme do 2 ml mikrozkumavky připipetujeme 400 µl pufru AP1 (společně s RNAsou), necháme postupně rozpustit, krátce vortexujeme a inkubujeme při teplotě 65 °C po dobu 30 min.
3. Připipetujeme 130 µl pufru AP2, promícháme v ruce a ihned vložíme do ledu.
4. Centrifugujeme při 20 000 × g po dobu 5 minut a supernatant přepipetujeme do nové 2 ml mikrozkumavky (pozor na hrubé nečistoty v peletě).
5. Připipetujeme 1,5 násobné množství pufru AP3/E a zamícháme pozvolným pipetováním.
6. Do filtrační kolonky (DNeasy mini spin column) postupně převedeme celý objem z kroku 5, postupujeme po 650 µl, které centrifugujeme vždy po dobu 1 minuty při ≥ 6000 × g. V tomto kroku dochází k navázání DNA na hydroxyapatitové jádro kolonky. Filtr vždy vyjmeme a tekutinu ze zkumavky vylijeme.
7. Do kolonky nyní připipetujeme 500 µl promývacího pufru AW a centrifufujeme po dobu 2 minut při 20 000 × g, tento krok dvakrát opakujeme a pro odstranění veškerého promývacího pufru centrifugujeme ještě jednou po dobu 5 minut při 20 000 × g.
8. Filtr přemístíme do nové, sterilní mikrozkumavky a přímo na filtr napipetujeme 100 µl elučního pufru AE. Kolonku uzavřeme a inkubujeme v laboratorní teplotě po dobu nejméně 15 minut (v tomto kroku dojde k uvolnění navázané DNA z frity kolonky).
9. Pro uvolnění eluované DNA centrifugujeme po dobu 2 minuty při ≥ 6000 × g.
10. Takto izolovaná DNA je připravena pro amplifikaci pomocí PCR.

2.2.2.2.2. CAPs markery Arthrobotrys oligospora

Prvním krokem pro aplikaci CAPs markerů (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences - délkový polymorfismus restrikčně štěpené amplifikované DNA) je amplifikace cistronu rDNA na templátu izolované nukleové kyseliny. Pro poskytnutí referenčního materiálu pro diagnostiku *Arthrobotrys oligospora* lze oslovit pracoviště autorů této metodiky, či renomované sbírky mikroorganismů. Pozitivní kontrola by měla být nedílnou součástí každé detekce. Pro amplifikaci doporučujeme primery nasedající univerzálně na cistron ribozomální DNA obsahující mezerníky 1 a 2 a gen pro subjednotku ribozomu 5,8 S.

ITS1 5´- TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3´

ITS4 5´- TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3´

White *et al*. (1990)

Reakční podmínky:

1.	pufr pro *Taq* polymerázu (Fermentas)	2,5 µl (1x)
2.	$MgCl_2$	1,5µl (1,5 mM)
3.	*Taq* polymeráza (Fermentas)	0,5 µl (2,5 U)
4.	dNTP (Fermentas)	0,25 µl (0,4 mM každého nukleotidu)
5.	primer mix	0,4 µl (0,4 µM každého primeru)
6.	izolovaná DNA	1,0 - 10 µl
7.	ddH_2O	doplnit do 25 µl

Koncentraci DNA doporučujeme v případě neúspěšné amplifikace upravit. Ideální je postup s využitím koncentrační řady nukleové kyseliny. Pro následné restrikční štěpení využijeme 50 µl PCR produktu a je tedy nutné připravit u každého vzorku minimálně tři reakce pro amplifikaci DNA fragmentu.

Program pro termocyklér:

1. 94 °C 3 minuty
2. 94 °C 2 minuty
3. 60 °C 30 sekund
4. 72 °C 2 minuty
5. 30 × od kroku 2.
6. 72 °C 4 minuty
7. 4 °C

Program byl optimalizován v podmínkách naší laboratoře na termocykléru MJ Research PTC 200. Výsledky amplifikace DNA fragmentů zkontrolujeme pomocí horizontální agarózové elektroforézy (1% gel) (Obr. 1.) a poté přistoupíme k další analýze. PCR produkty připravíme pro nanášení do gelu. Do mikrozkumavek odpipetujeme 5 µl PCR produktu a přidáme 1 µl barviva pro elektroforetickou separaci (nanášecí barvivo – Loading dye). Barvivo kromě barev obsahuje i glycerol, který umožní nanášení produktu do jamek elektroforetického gelu.

Příprava 1% agarózového gelu:

Materiál:

- horizontální elektroforetická souprava
- elektrický zdroj
- Erlenmeyerova baňka
- váženky
- agaróza
- TBE pufr (5x) (TBE (1x) - 89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2,5 mM EDTA, pH 8)

Postup:

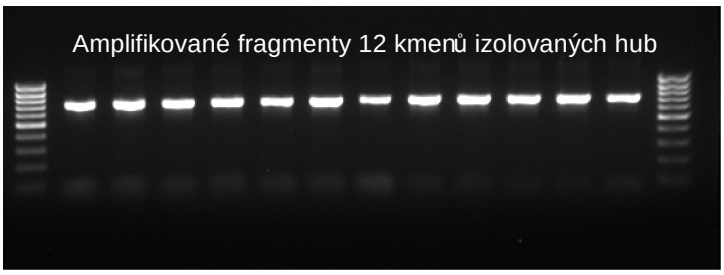
Navážíme agarózu dle požadovaného objemu gelu a přesypeme do Erlenmayerovy baňky. Agarózu promícháme s požadovaným množstvím TBE (1x) pufru a mírně povaříme v mikrovlnné troubě za průběžného promíchávání. Po úplném rozpuštění agarózy v pufru baňku ochladíme pod proudem vody na 50-60 °C. Připipetujeme ethidium bromid (0,5 µg/ml), opatrně zamícháme a nalijeme do předem připravené vaničky s hřebenem. Po ztuhnutí gelu vyjmeme hřeben, vaničku vložíme do elektroforetického aparátu a zalijeme ji připraveným elektroforetickým pufrem (TBE (1x)).

Pro determinaci *Arthrobotrys oligospora* je nezbytné podrobit amplifikovaný fragment restrikčnímu štěpení čtyři vybranými restrikčními endonukleázami (RE). Pro tento účel jsou etablované tyto restriktázy : *Alu*I, *Hinf*I, *Rsa*I, *Taq*I (Fermentas).

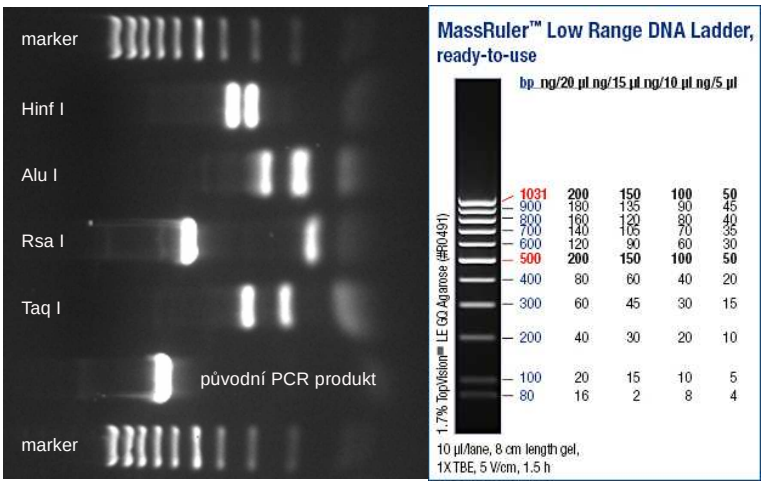
Do sterilní mikrozkumavky napipetujeme 10 µl PCR produktu. Přidáme 1,1 µl Y+/Tango pufru (10x), 0,8 µl restrikční endonukleázy a důkladně promícháme. Inkubujeme 9-12 h při teplotě (37 °C) vhodné pro danou RE ve vodní či suché lázni. Restrikčně štěpenou DNA lze ihned analyzovat na 1,5% agarózovém gelu, nebo skladovat při – 20 °C.

Po restrikčním štěpení porovnáme motivy vzniklých fragmentů s markery uvedenými v Obr. 2. V případě shody připraveného restrikčního profilu s markerem lze usuzovat na přítomnost *Arthrobotrys oligospora* . Jestliže se připravený profil liší, jedná se o jiný druh.

Obr. 1. Elektroforetická separace PCR produktů po amplifikaci s primery ITS1 a ITS4.



Obr. 2. Elektroforetická separace produktů restrikčního štěpení pro druh *Arthrobotrys oligospora* .



2.2.3. Kultivace v tekutém médiu

Kultivace v tekutém médiu byla vybrána pro svoji jednoduchost a v případě *Arthrobotrys oligospora* i vhodnost pro získání velkého množství biologického materiálu využitelného při ochraně proti *M. hapla.* Výchozím materiálem pro kultivaci je vždy nová sporulující kultura houby. Po získání kultury *Arthrobotrys oligospora* je tedy vhodné otestovat podmínky vašeho pracoviště pro kultivaci v tekutém médiu a to nejprve pomocí kultivace v třepané kultuře s využitím Erlenmayerových baněk vybavených disruptory. V této metodě si ověříte kultivovatelnost vašeho izolátu v tekutém médiu. ME médium připravíme dle návodu (viz. výše) a to v objemu 500 ml ve 2 l Erlenmayerově baňce vybavené disruptory a sterilizujeme v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 20 minut. Po vychladnutí média jej očkujeme stěrem spor narostlých na pevném mediu. Médium s *Arthrobotrys oligospora* kultivujeme při teplotě 22 °C ve tmě po dobu 7 dní. Kultivaci daného druhu prověříme pomocí světelné mikroskopie, případně vysetím 100 µl suspenze mycelia v médiu na pevný agar a následným

mikroskopickým pozorováním spor. Dbáme na sterilitu prostředí a zejména pak případné kontaminace.

Pokud kmen vámi izolované *Arthrobotrys oligospora* roste v tekutém médiu bez potíží, lze přistoupit k velkoobjemové kultivaci s využitím fermentoru. V této práci jsme použili 8 l standardní aerovaný bioreaktor firmy Chemap, nyní MBR, s vnitřní cirkulací a možností předběžné sterilizace média. Fermentace při teplotě 22 °C probíhala za tmy po dobu 305 hodin. K inokulaci 8 litrů média jsme použili spory narostlé na pevném agaru z jedné Petriho misky. Je možné použít i vyšší dávku, růst houby se tím urychlí. Pro konkrétní bioreaktor je nutné podmínky otestovat. Houbu lze poté filtrovat a sušit a životaschopnost výsledného produktu je nutné otestovat opětovnou kultivací na pevném médiu. V naší práci jsme prokázali nezměněnou životaschopnost *Arthrobotrys oligospora* po 60 dnech skladování v laboratorní teplotě.

2.2.4. Závěr

Tato metodika přispěje k dalšímu studiu metod ochrany za využití nematofágní houby *Arthrobotrys oligospora* , kterou je možné využít jako přirozený nepřátelský organismus v biologické ochraně rostlin proti háďátkům. V budoucnu by měl být výzkum zcela jistě zaměřen i na využití této nematofágní houby v biologické ochraně. Cílem dalšího výzkumu by měla být optimalizace dávky a způsobu aplikace i včlenění použití tohoto bioagens do systémů integrované ochrany rostlin.

3. Srovnání „novosti postupů“

Metodika shrnuje postupy izolace, detekce, determinace a kultivace *Arthrobotrys oligospora* za účelem využití tohoto organismu v praxi. Postupy uvedené v metodice nebyly v tomto rozsahu, formě a kontextu v České republice zveřejněny.

4. Popis uplatnění certifikované metodiky

Tato metodika je určena zejména pro privátní organizace činné v oboru vývoje biologických prostředků ochrany zemědělských plodin před škodlivými organismy. Uplatnění postupů navržených v metodice lze předpokládat při získávání, určování a kultivace *Arthrobotrys oligospora* při vývoji nových postupů ochrany rostlin před háďátkem *Meloidogyne hapla*.

5. Seznam použité související literatury

Åhman J., Johansson T., Olsson M., Punt P. J., van den Hondel C. A. M. J. J., Tunlid A. (2002): Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. Applied and Environmental Microbiology, 68: 3408-415.

Al-Hazmi A. S., Schmitt D. P., Sasser J. N. (1982): Population Dynamics of *Meloidogyne incognita* on corn grown in soil Infested with *Arthrobotrys conoides*. Journal of Nematology, 14: 44-50.

Bordallo J. J., Lopez-Llorca L. V., Jansson H. B., Salinas J., Persmark L., Asensio L. (2002): Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. New Phytologist, 154: 491-499.

Bourne J. M. a Kerry B. R. (1998): Effect of the host plant on the efficacy of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematode densities and fungal application rates. Soil Biology and Biochemistry, 31: 75-84.

Chen S. Y., Dickson D. W., Mitchell D. J. (2000): Viability of *Heterodera glycines* exposed to fungal filtrates. Journal of Nematology, 32: 190-197.

Cooke R. C., Godfrey B. E. S. (1964): A key to the nematode-destroying fungi. Transactions of the British Mycological Society, 47: 61-74.

Dackman C. a Nordbring-Hertz B. (1992): Conidial traps – a new survival structure of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* . Mycological Research, 96: 194-198.

De Hoog (1985): Taxonomy of the dactylaria complex, IV-VI. Studies in Mycology 26, 124p.

Decker H. (1969): Phytonematologie – Biologie und Bekämpfung Planzenparazität nematoden, VEB Detcher Landwirtschaftsverlag, Berlin, 171-176 p.

Derakhshan A., Rabindra R. J., Ramanujam B., Rahimi M. (2008): Evaluation of different media and methods of cultivation on the production of and viability of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 1506-1509.

Domsch K. H., Gams W., Anderson, T. (1980): Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press (London) LTD, 859 p.

El-Borai F. E., Bright D. B., Graham J. H., Stuart R. J., Cubero J., Duncan L. W. (2009): Differential susceptibility of entomopathogenic nematodes to nematophagous fungi from Florida citrus orchards. Nematology, 11: 231-241.

Gao L., Liu X. Z., Sun M. H., Li S. D., Wang J. L. (2009): Use of a novel two-stage cultivation method to determine the effects of environmental factors on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. Mycoscience, 50: 317-321.

Gené J., Verdejo-Lucas S., Stchigel A. M., Sorribas F. J., Guarro J. (2005): Microbial parasites associated with *Tylenchulus semipenetrans* in citrus orchards of Catalonia, Spain. Biocontrol Science and Technology, 15: 721-731.

Gray N. F. (1987): Nematophageous fungi with particular reference to their ecology. Biological revue, 62: 245-304.

Hernández M. A. a Hidalgo Díaz L. (2008): KlamiC®: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Revista de Protección Vegetal, 23: 131-134.

Hidalgo-Diaz L., Bourne J. M., Kerry B. R., Rodríguez M. G. (2000): Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. International Journal of Pest Management, 46: 277-284.

Hirsch P. R., Atkins S. D., Mauchline T. H., Morton C. O., Davies K. G., Kerry B. R. (2001): Methods for studying the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in the root environment. Plant and Soil, 232: 21-30.

Jaffee B. A. (2002): Soil cages for studying how organic amendments affect nematode-trapping fungi. Applied Soil Ecology, 21: 1-9.

Jansson H. B. a Nordbring-Hertz B. (1980): Interactions between nematophagous fungi and plant parasitic nematodes: attraction, induction of trap formation and capture. Nematologica, 26: 383-389.

Kim H. O. a Yun J. W. (2005): A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. Journal of Applied Microbiology, 99: 728-738.

Kirk, P. (2010). Arthrobotrys oligospora Fresen., 1850. In: Index Fungorum Partnership (2010) Index Fungorum. Accessed through: World Register of Marine Species at http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=437621 on 2012-01-05

Kumar D., Singh K. P., Jaiswal R. K. (2005): Screening of different media and substrates for cultural variability and mass culture of *Arthrobotrys dactyloides* Drechsler. Mycobiology 33: 215-222.

Kumar, D. a Singh K.P. (200): Assessment of predacity and efficacy of *Arthrobotrys dactyloides* for biological control of root-knot disease of tomato. Journal of Phytopathology, 154: 1-5.

Manzanilla-López R. H., Atkins S. D., Clark I. M., Kerry B. R., Hirsch P. R. (2009): Measuring abundance, diversity and parasitic ability in two populations of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. Biocontrol Science and Technology, 19: 391-406.

Nordbring-Hertz B. (2004): Morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* – an extensive plasticity of infection structures. Mycologist, 18:125-133.

Nordbring-Hertz B., Jansson H. B., Tunlid A. (2006): Nematophagous Fungi. In: Encyclopedia of Life Sciences. Wiley J. a sons, Ltd: Chichester. http://www.els.net/

Persmark L. a Nordbring-Hertz B. (1997): Conidial trap formation of nematode-trapping fungi in soil and soil extracts. FEMS Microbiology Ecology, 22: 313-323.

Persson Y., Veenhuis M., Nordbring-Hertz, B. (1985): Morphogenesis and significance of hyphal coiling by nematode-trapping fungi in mycoparasitic relationships. FEMS Microbiology Ecology, 31: 283-291.

Ramona Y. a Line M. A. (2002): Potential fot the large-scale production of a biocontrol fungus in raw and composted paper mill waste. Compost Science & Utilization, 10: 57-62.

Rosén S., Sjollema K., Veenhuis M., Tunlid A. (1997): A cytoplasmic lectin produced by the fungus *Arthrobotrys oligospora* functions as a storage protein during saprophytic and parasitic growth. Microbiology, 143: 2593-2604.

Rubner A. (1996): Revision of predaciious hyphomycetes in the Dactylella-Monacrosporium complex. Studies in Mycology 39, 134 p.

Rumbos C., Mendoza A., Sikora R., Sebastian K. (2008): Persistence of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* strain 251 in soil under controlled conditions. Biocontrol Science and Technology, 18: 1041-1050.

Singh K. P., Jaiswal R. K., Kumar N., Kumar D. (2007): Nematophagous fungi associated with root galls of rice caused by *Meloidogyne graminicola* and its control by *Arthrobotrys dactyloides* and *Dactylaria brochopaga*. Journal of Phytopathology, 155: 193-197.

Stiernagle T. (1999): Maintenance of *C. elegans*. In: Hope I. A. (ed.): *C. elegans*, a practical approach. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 51–67.

Van Damme V., Hoedekie A., Viaene N. (2005): Long-term efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for management of *Meloidogyne javanica* in glasshouse crops. Nematology, 7: 727-736.

Wang J. a McSorley L. (2003): Klíč určování nematofágních hub [online] [citace 26.2.2009] dostupné z: http:// agroecology.ifas.ufl.edu/nematophagous%20fungi/Key%20for%20NTF.htm

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Chapter 38. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. a White T. J. eds. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. pp 315-322. Academic Press, London.

Xiang M., Xiang P., Liu X., Zhang L. (2010): Effect of environment on the abundance and activity of the nematophagous fungus *Hirsutella minnesotensis* in soil. FEMS Microbiology Ecology, 71: 413-417.

Zouhar M., Douda O., Mazáková J., Nováková J., Uban J. (2010): Predikce nematofágní aktivity půdních hub, certifikovaná metodika. PowerPrint, 32 s. ISBN: 978-80-213-2152-6.

6. Seznam publikací, které předcházely metodice

Publikaci této metodiky předcházela metodika pro výběr a testování nematofágní aktivity půdních hub. Zouhar M., Douda O., Mazáková J., Nováková J., Uban J. (2010): Predikce nematofágní aktivity půdních hub, certifikovaná metodika. PowerPrint, 32 s. ISBN: 978-80-213-2152-6.

7. Dedikace

Metodika vznikla jako výstup řešení projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QH81163 „Vývoj biologických metod ochrany rostlin proti fytoparazitickým háďátkům uplatnitelných v integrovaných systémech rostlinné produkce“.

8. Oponenti

Ing. Vladimír Gaar, vedoucí diagnostické laboratoře SRS Praha

RNDr. David Novotný, Ph.D., oddělení mykologie, VÚRV, v.v.i. Praha

9. Přílohy

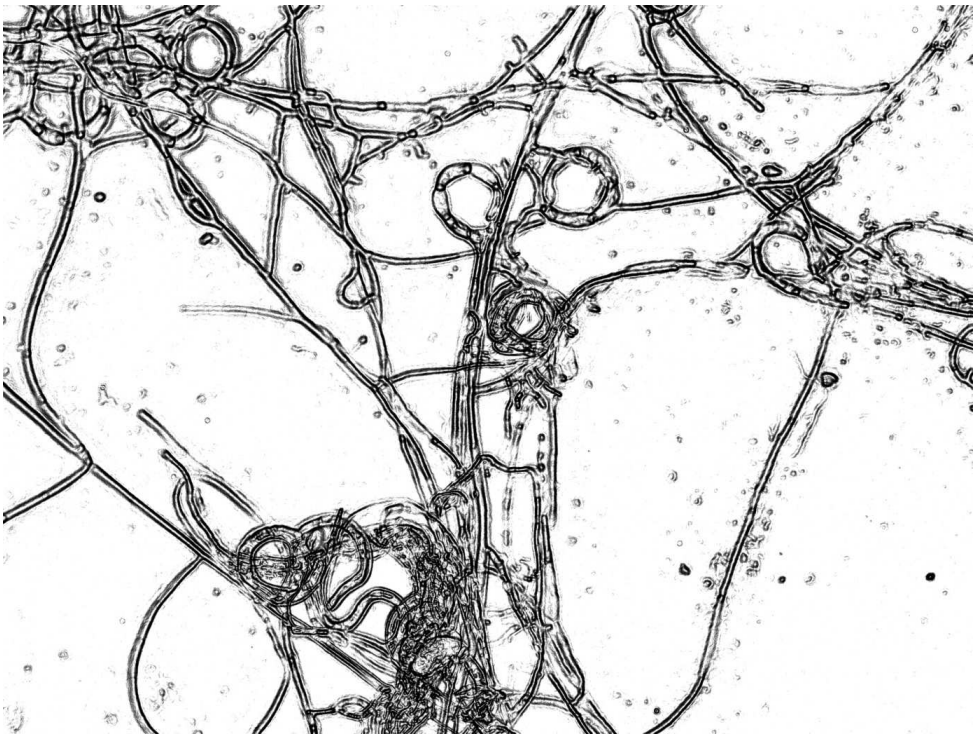
9.1. Seznam použitého materiálu

název	firma	katalogové číslo
Agar powder, Bacteriological	Himedia	RM026
Agar, powder	Himedia	CR301
Agaróza pro elktroforetickou separaci DNA	Serva	11404
***Alu*I**	Fermentas	ER0011
$CaCl_2$	Lach-ner	30097-AP0
Corn meal agar (CMA)	Himedia	M146
Czapek dox agar (CDA)	Himedia	M075
Czapek dox broth (CZB)	Himedia	M076
ddH_2O (deionizovaná voda)	-	-
dNTP	Fermentas	R1121
EDTA	Sigma aldrich	E5134
Etanol	Merck	603-002-00-5
Etidium bromid	Sigma Aldrich	E1510
***Hinf*I**	Fermentas	ER0801
Chloramfenikol	Kulich	3000281
Cholesterol	Sigma-Aldrich	C8503
K_2HPO_4	Lach-ner	30060-AP0
KH_2PO_4	Lach-ner	30016-AP0
Kyselina boritá	Sigma Aldrich	B7901
LB agar	Serva	48502
LB medium	Serva	48501
Loading dye	Fermentas	R0631
Malt extract agar base (MEA)	Himedia	M137
$MgSO_4$	Lach-ner	30175-AP0
Modified malt extract agar base (mMEA)	Himedia	M995
Molekulární marker	Fermentas	SM0383
NaCl	Lach-ner	30093-AP0
Oat meal agar (OA)	Himedia	M146
Potato dextrose agar (PDA)	Himedia	M096

Potato dextrose broth (PDB)	Himedia	M403
Primery	Sigma aldrich	konkrétní sekvence
QIAmp DNeasy plant mini kit	Qiagene	69104
***Rsa*I**	Fermentas	ER1121
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	Himedia	M063
***Taq*I**	Fermentas	ER0671
***Taq* polymeráza**	Fermentas	EP0402
Tetracycline hydrochloride	Sigma-Aldrich	T8032
TRIS	Sigma aldrich	T1503-500G
Yeast malt agar (YMA)	Himedia	M424

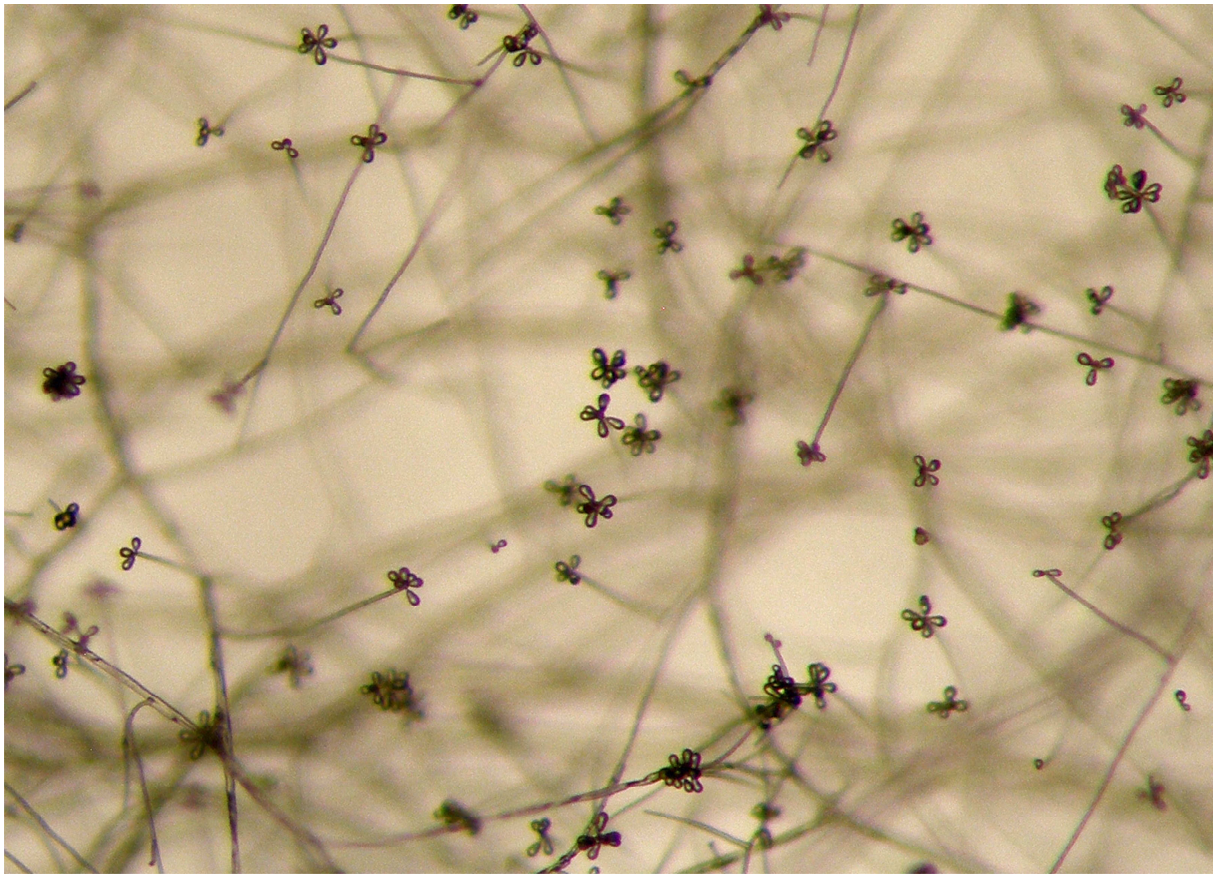
9.2. Obrazová příloha

Obr. 1. Lapací struktury houby *Arthrobotrys oligospora* .

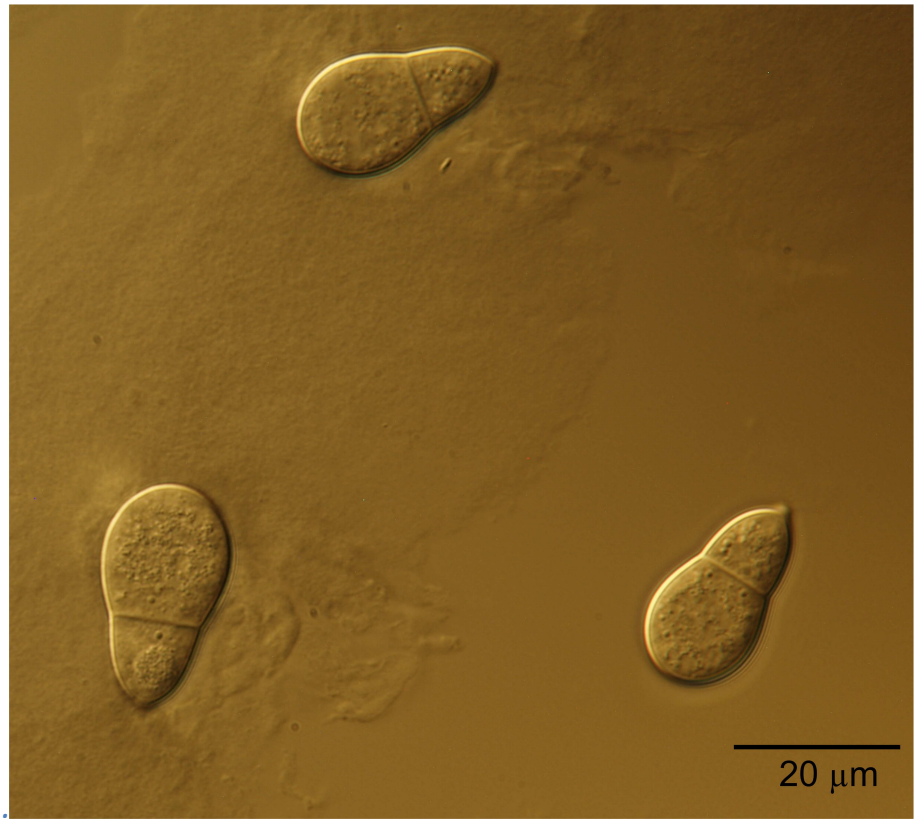


Obr. 2. Háďátko *Caenorhabditis elegans* zachyceno lapacími orgány houby *Arthrobotrys oligospora* .

Obr. 3. Konidiofory s konidiemi houby *Arthrobotrys oligospora* .

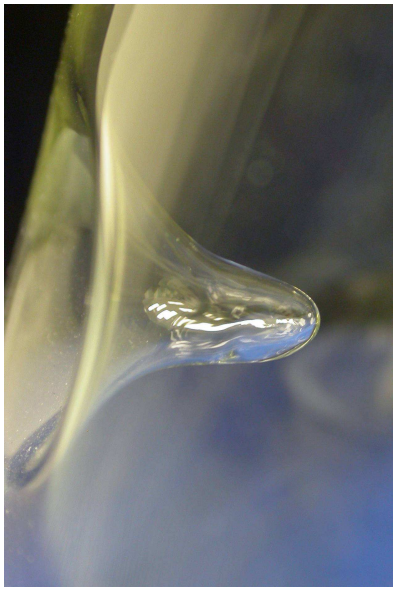
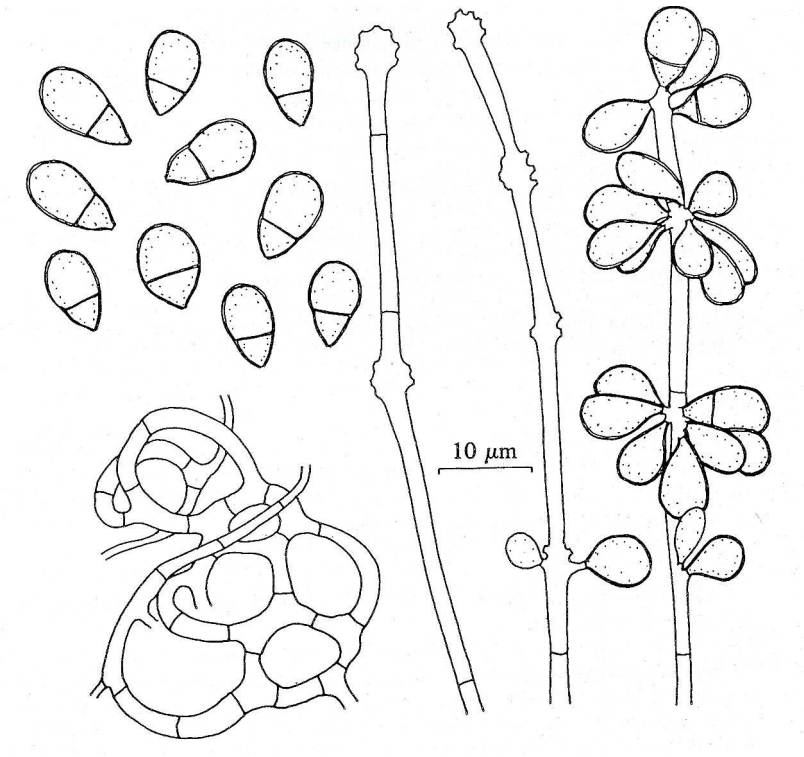


Obr. 4. Konidie houby *Arthrobotrys oligospora*



Obr. 5. Barmanova nálevka.

Obr. 6. Erlenmeyerova baňka vybavená disruptory.



Obr. 7. *Arthrobotrys oligospora* De Hoog 1985.