

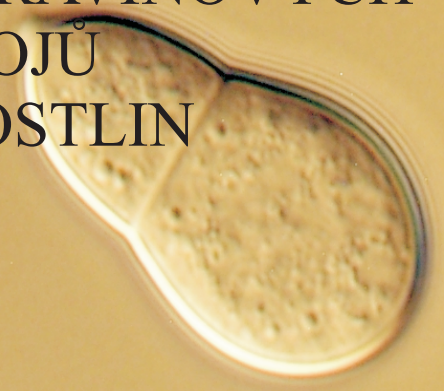


ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH
A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ
KATEDRA OCHRANY ROSTLIN



Predikce nematofágní aktivity půdních hub
(Certifikovaná metodika)

2010

Miloslav Zouhar, Ondřej Douša, Jana Mazáková, Jana Nováková, Jan Urban

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

**FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH
A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ**

Predikce nematofágní aktivity půdních hub

Certifikovaná metodika

Miloslav Zouhar¹, Ondřej Douda², Jana Mazáková¹, Jana Nováková¹, Jan Urban¹

2010

¹Česká zemědělská univerzita v Praze

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

© Miloslav Zouhar

ISBN: 978-80-213-2152-6

Obsah:

1. CÍL METODIKY	4
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
2.1. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	4
2.1.1. Nematofágní houby.....	4
2.1.2. Lapací struktury nematofágních hub.....	6
2.1.3. Typy lapacích struktur.....	6
2.2. POPIS NĚKOLIKA VYBRANÝCH DRUHŮ HUB S NEMATOFÁGNÍ AKTIVITOU	9
2.3. METODIKA	11
2.3.1. Odběr vzorků půdy.....	11
2.3.2. Izolace hub z půdních vzorků	11
2.3.3. Postup přípravy použitých živných medií	12
2.3.4. Pozitivní kontrola pro testování nematofágní aktivity hub	13
2.3.5. Hádátka pro testování nematofágní aktivity.....	14
2.3.6. Příprava testovacích živých preparátů.....	19
2.4. URČOVÁNÍ NEMATOFÁGNÍCH HUB.....	21
2.5. ZÁVĚR	21
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	21
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY.....	21
5. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	22
6. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	24
7. DEDIKACE	24
8. Oponenti	24
9. PŘÍLOHY	25

1. Cíl metodiky

Cílem této metodiky bylo vytvořit postupy pro získávání, určování a testování nematofágní aktivity hub a poskytnout je organizacím aktivním v oblasti zemědělského výzkumu a vývoje.

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Literární přehled

2.1.1. Nematofágní houby

Využití antagonistických vztahů mezi organismy za účelem udržení jednoho z nich pod ekonomickým prahem škodlivosti je základním principem biologických metod ochrany rostlin. Používání biologických prostředků ochrany rostlin v integrovaných systémech produkce komodit v posledních letech celosvětově vzrůstá. Důvodů pro tento rozvoj je hned několik. Požadavky společnosti na kvalitu potravin jsou stále přísnější a tlak kladený na výrobu biopotravin roste. Obliba konzumace potravin pocházejících z produkce bez využití komerčních pesticidů mezi spotřebiteli nepochybně vzrůstá. Ekologická kritéria jsou rovněž významným aspektem, který hovoří pro využití bioagens v ochraně rostlin. V případě fytoparazitických hádátek je využití pesticidů (nematocidů) zpravidla vázáno na neselektivní sterilizaci půdního profilu. Užívání těchto prostředků ochrany se legislativně upravuje již řadu let a trend, kterým se tato opatření ubírají je jasný - používání vysoce toxických pesticidů se omezuje. Hledání nových alternativních způsobů ochrany na úrovni bioagens je jednou z cest, která by mohla vést k řešení neutěšené situace v ochraně rostlin před fytoparazitickými hádátky.

Taxonomicky rozmanitou skupinou organismů, která využívá hádátka jako zdroj výživy, je skupina nematofágní hub skýtající celou řadu rodů a druhů, jejichž nematofágní aktivita již byla popsána v řadě vědeckých prací.

Pravděpodobně prvním popsáným druhem, i když bez znalosti jeho potenciální nematofágní aktivity, je druh *Dactylium candidum* Nees (1816), dnes známý jako *Dactyllelina candidum* (Nees) Yan Li (2006). Lohde v roce 1874 popsal houbu parazitující na hlístici rodu *Anguillula* a nazval ji

Harposporium anguillulae. Nejběžněji vyskytujícím se druhem nematofágní houby je *Arthrobotrys oligospora* izolovaný a popsáný Freseniem v roce 1850, jehož nematofágní aktivitu však pozoroval až Zopf v roce 1888.

Skupina nematofágních hub je tvořena celou řadou různorodých druhů, fakultativních či obligátních parazitů, kteří využívají jako zdroj příjmu živin vajíčka či jiná vývojová stádia háďátek (MORTON *et al.*, 2004). Je známo okolo 200 druhů nematofágních hub. Většina tzv. „dravých“ hub je řazena do oddělení *Fungi imperfecti* a *Ascomycota*, zatímco endoparazitické druhy bychom našli v odděleních *Zygomycota*, *Basidiomycota* a *Chytridiomycota* (WALLER & LAARSEN, 1993).

Endoparazitické druhy hub parazitují háďátka pomocí spor nebo zoospor. Zástupci skupiny „dravých“ hub, háďátka zachytávají, a k tomuto účelu používají modifikované lapací struktury. Existují i některé druhy hub ležící na hranici obou skupin (GRAY, 1987).

Podle ekologického hlediska nematofágní druhy hub můžeme členit do čtyř kategorií: endoparazitické houby, houby vytvářející různé lapací struktury („dravé“ houby), houby parazitující vajíčka (případně samičky cystotvorných a hálkotvorných háďátek) a houby produkující toxiny (BARRON & THORN, 1987). Endoparazitické houby jsou většinou obligátní parazité nutričně závislí na hostitelském háďátku, jehož infikují pomocí encystujících zoospor aktivně lákaných chemickým gradientem exsudátů háďátka, pasivních adhesivních spor, které se zachytávají na těle hostitele či spor, které se dostávají do těla háďátka spolu s potravou (BARRON, 1977, GRAY, 1987). Houby lapající háďátka pomocí různých hyfální struktur tvořících se na rozsáhlé síti hyf vně hostitele, jsou méně hostitelsky specifické, mohou napadat různé druhy háďátek a jsou schopni žít i saprofytickým způsobem života (GRAY, 1987, DACKMAN *et al.*, 1992). Nematofágní houby tak mohou využívat zdroje uhlíku ze svého hostitele jako obligátní, fakultativní nebo oportunističtí parazité (PERRY & MOENS, 2006). V půdě se nematofágní houby podílejí na recyklaci uhlíku, dusíku a dalších důležitých prvků pocházejících z těl háďátek a v přírodě tak sehrávají významnou úlohu v koloběhu těchto prvků (MANKAU, 1980).

Nematofágní houby jsou rozšířeny především v dostatečně provzdušněných půdách bohatých na humus a rozkládající se organické zbytky. Požadavky týkající se vlhkosti půdy, pH půdy, obsah prvků a přítomnosti háďátek se odvíjejí v závislosti na daném druhu nematofágní houby (GRAY, 1987).

2.1.2. Lapací struktury nematofágních hub

Lapací struktury „dravých“ hub sehrávají velmi významnou roli při získávání živin a konkurenčně tak zvýhodňují tyto organismy před ostatními druhy hub.

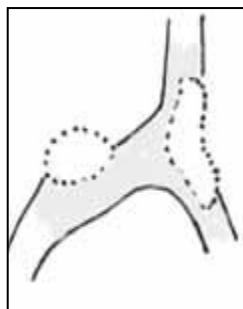
RUBNER (1996) se domnívá, že „dravé“ houby se vyvinuly z „nedravých“ předchůdců, přičemž lepivé uzlíky představují evolučně nejstarší typ lapacích útvarů. LI *et al.*, (2000) jsou však přesvědčeni, že původnějšími lapacími strukturami jsou lepivé sítě.

Jansson & Nordbring-Hertz (1980) rozdělují nematofágní houby vytvářející lapací struktury podle převládajícího způsobu získávání živin. První skupina hub je zastoupena druhy, u nichž převažuje saprofytický způsob života. Houby této skupiny se vyznačují rychlým růstem mycelia a tvorbou lepivých sítí, která je indukována přítomností háďátek nebo chemickým působením látek tzv. neminů. Druhá skupina hub, u nichž převažuje parazitismus, je tvořena druhy pomalu rostoucími, ale spontánně vytvářejícími lepivé knoflíky, lepivé větve a stahující oka. Lapání háďátek těmito lapacími strukturami je mnohem efektivnější než u lepivých sítí.

Lapací struktury některých druhů uvolňují do prostředí látky lákající háďátka, jiné struktury vylučují toxiny znehybňující chycená háďátka nebo háďátka vyskytující se v okolí dané houby, které nebyli v bezprostředním kontaktu s myceliem houby (MANKAU, 1980).

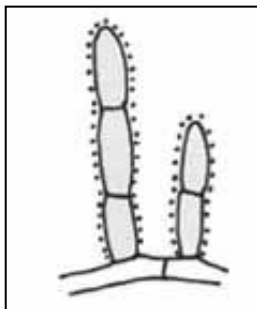
2.1.3. Typy lapacích struktur

Na tomto místě uvádíme popis základních typů lapacích struktur, které jsou zpravidla tvořeny na myceliu hub s nematofágní aktivitou.

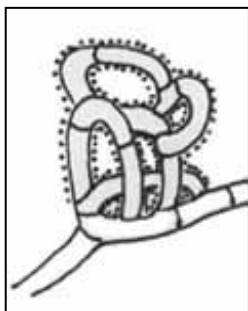


Nemodifikované lepivé hyfy jsou typické především pro zástupce třídy *Zygomycetes*, kteří nemají přehrádkované mycelium, proto nemohou vytvářet speciální lapací útvary jak je tomu u hub tvořících přehrádky. Háďátka jsou zachycována na lepivých hyfách a přilnutí houby k tělu hostitele je tak pevné, že stačí kontakt hyfy v jediném bodě kutikuly háďátka. Přichycení háďátek je možné díky adhezivní látce, která je vylučována na celém povrchu hyf nebo je tvořena po kontaktu s háďátkem v místě spojení a dále při jeho pohybu. V literatuře jsou nejvíce

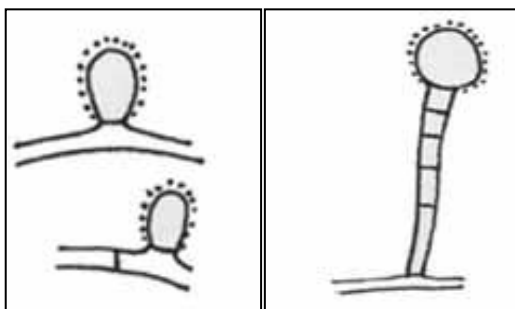
zmiňovány představitelé dvou rodů používající tento mechanismus zachytávání háďátek, a to rody *Cystopage* a *Stylopaga*. Dalšími druhy využívající lepidivé hyfy jsou *Arthrobotrys botryospora*, *A. superba* (třída *Orbiliomycetes*), *Dactylaria psychrophila* (třída *Leotimycetes*) (GRAY, 1987).



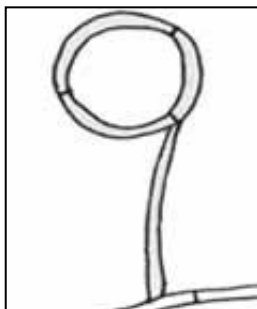
Lepivé větve (výběžky) jsou nejjednodušší morfologickou lapací strukturou zastupující nemodifikované lepidivé hyfy. Tyto výběžky tvořené 1-3 buňkami se spojují, tvoří jednoduché lepidivé oblouky nebo dvojrozměrné sítě. Celá větev je pokryta tenkou vrstvou adhezivní látky, která umožňuje zachycení háďátka s jakoukoli částí výběžku (GRAY, 1987). Tyto útvary se vyskytují u některých druhů rodu *Monacrosporium* (JAFFEE, 2004). GRAY (1987) uvádí, že nejčastějším izolovaným druhem, který vytváří tyto struktury je *Dactylellina cionopaga*.



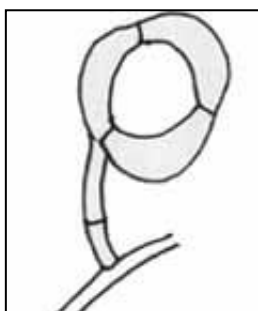
Lepivé sítě jsou tvořeny komplexem trojrozměrných lepidivých sítí. Evolučně se vyvinuly z lepidivých větví. Síť se formují ze vzpřímených postranních větví vyrůstajících z vegetativní hyfy, stáčejí se a spojují s nosnou hyfou. Další postranní hyfa se vytváří z nosné hyfy či smyčky (oka) a vytváří další smyčku, dokud se nevytvoří síť spojených ok mimo nosnou hyfu. Celá síť je pokryta tenkou vrstvou adhezivní látky. Háďátka se přichytí, zaplete do vláken a uvízne v síti. Neznámějším představitelem s tímto typem lapacích struktur je *Arthrobotrys oligospora* (GRAY, 1987).



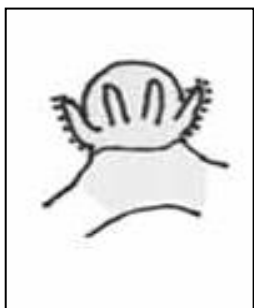
Lepivé uzlíky jsou kulovité buňky pokryté adhezivní látkou. Tvoří se přímo na vegetativním myceliu či konidii nebo na krátkém nelepivém přehrádkovaném vlákně (stopce) vegetativní hyfy. Tyto lepidivé buňky mohou pokračovat v růstu a vytvářet krátké řetězce buněk, které se spojují do lepidivých prstenců. Po zachycení háďátka se v místě spojení uzlíku a kutikuly háďátka vytváří silná vrstva lepidivé látky, která zajišťuje pevnou vazbu s tělem háďátka. Lepivé uzlíky se rovněž mohou při pokusu háďátka uniknout oddělit od hyfy, aniž by byla narušena jejich funkce. Houba proniká do těla háďátka jednak aktivní penetrací, tak i pomocí působení různých enzymů. Tento typ lapací struktury je velmi rozšířený, běžný je např. u *Monacrosporium phymatophagum* a *Dactylaria candida* (GRAY, 1987, ESSER & SCHUBERT, 1982). Lepkavý výběžek specifického zaškrbeného tvaru můžeme najít i u některých druhů rodu *Nematoctonus* (GRAY, 1987).



Fixní oka patří mezi nejméně vyskytující se lapací mechanismy. Oka jsou tvořena vzpřímenými laterálními větvemi vyrůstajícími z vegetativní hyfy. Z počátku velmi tenká hyfální větev tloustne, zakřivuje se a vytváří tři až čtyř buněčný prstenec. Hádátka jsou zachycena pasivně vstoupením do oka, které se zaklíní kolem jejich těla (GRAY, 1987). Uvnitř prstence rovněž byla pozorována lepkavá vrstva, podobná u lepkavých sítí a knoflíků (DOWSETT & REID, 1979). Tyto lapací struktury vytváří pouze několik druhů, jako například *Dactylella leptospora* formující rovněž lepkavé knoflíky (SAIKAWA & TAKAHASHI, 2002) nebo *Dactylaria candida* (ESSER & SCHUBERT, 1983).



Stahující (škrťící) oka jsou nelepivé, mechanické lapací útvary tvořené třemi buňkami obloukovitého tvaru, které se spojují do prstencovitého útvaru. Prstenec je spojen s nosnou hyfou krátkým několika buněčným vláknem (stopkou). Hádátka svým dotykem a pohybem při vstoupení do oka stimulují vnitřní stěnu buněk, které se během několika sekund stáhnou kolem těla hádátka, které je tak přidrženo uvnitř prstence. Stahující se oka se mohou oddělit od původní hyfy bez ztráty jejich funkce. Tento typ lapací struktury se vyskytuje například u druhu *Arthrobotrys brochopaga* a *Arthrobotrys dactyloides* (GRAY, 1987).



Stefanocysty jsou specifické struktury popsány u třídy *Basidiomycetes* především u rodu *Hyphoderma*. Stefanocysta je dvoubuněčný útvar tvořený bazální buňkou připomínající pohárek a terminální kulovitou buňkou. V místě spojení obou buněk vyrůstají výrůstky tvořící obvodový lem pokrytý adhezivní vrstvou. LIOU & TZEAN (1992) pozorovali, že stefanocysty také fungují jako lapací struktury háďátek. Dvoubuněčné stefanocysty se mohou přichytit k háďátku, zatímco jsou připojené nebo oddělené od mateřského vlákna. Jakmile zachytí háďátko, v krátké době vytvoří infekční hyfu a atakují háďátko, které prorostou myceliem.

Akantocyty jsou velké ostnaté buňky hvězdicovitého tvaru charakteristické pro rod *Stropharia*. Akantocyty nebo jejich ostny jsou schopny probodnout tělo háďátka. V závislosti na rozsahu poranění kutikuly může z rány vytékat vnitřní obsah háďátka, které je tímto způsobem znehybněno (LUO *et al.*, 2006).

Perokresby byly převzaty ze zdroje – GRAY (1987).

2.2. Popis několika vybraných druhů hub s nematofágní aktivitou

Arthrobotrys oligospora Fresen. (1850) je nejčastějším, nejrozšířenějším a doposud nejvíce prostudovaným druhem ze skupiny nematofágních hub (DOMSCH *et al.*, 1980). Tato kosmopolitní houba byla izolována z mnoha různých substrátů, kompostů, tlejícího dřeva a živočišných výkalů. Její růst a tvar lepivých trojrozměrných sítí je podobný houbě *A. superba* (DRECHSLER, 1937). Konidiofory vyrůstající ze substrátu či vzdušného mycelia jsou nevětvené, 350-450 μm dlouhé, nesoucí několik skupin sympodiálně tvořených vejčitých či hruškovitých konidií (22-27 μm \times 8-15 μm) (Obr. 7-11) (DOMSCH *et al.*, 1980).

Arthrobotrys dactyloides Drechsler (1937) zachycuje háďátka pomocí škrťících ok. Oproti podobným druhům (např. *A. superba* a *A. oligospora*) vykazuje pomalejší růst hyf. Nevětvený 200-400 μm dlouhý konidiofor nese skupinu 4-10 dvoubuněčných, podlouhlých, elipsoidních konidií (35-45 μm \times 6-10 μm) vyrůstajících na 5 μm dlouhých sterigmatech (DRECHSLER, 1937).

Endoparazitická houba *Hirsutella rhossiliensis* Minter & B. L. Brady (1980) byla poprvé izolována a popsána v roce 1980 ve vzorku půdy ve Walesu (MINTER & BRADY, 1980). STURHAN & SCHNEIDER (1980) izolovali totožný druh houby ve stejném roce v Německu z háďátka chmelového (*Heterodera humuli*) a pojmenovali jej *Hirsutella heteroderae*. Houba má široký okruh hostitelů včetně rostlinných parazitických háďátek, volně žijících háďátek a roztočů. Různé izoláty tohoto druhu mají rozmanité hostitelské preference (CHEN *et al.*, 2004). Houba vytváří nepohyblivé konidie, které se přichycují na kutikulu háďátek. Klíčící hyfa houby penetruje kutikulu háďátka a v hostiteli se vytváří infekční bulbus, z něhož vyrůstají hyfy asimilující živiny z hostitele a prorůstající tělní dutinu háďátka. Hyfy vyrůstající z usmrčeného těla háďátka vytvářejí fialidy, na nichž se formují nové spory (TEDFORD *et al.*, 1995). V případě *H. rhossiliensis* se jedná o antagonistický organismus, jehož integrace do současných strategií ochrany rostlin by mohla být poměrně snadná (LIU & CHEN, 2005).

Pochonia chlamydosporia (Goddard) Zare & W. Gams (2001) (syn. *Verticillium chlamydosporium* Goddard 1913) je fakultativní parazit vajíček cystotvorných a hálkotvorných háďátek, který zároveň kolonizuje rhizosféru rostlin (KERRY *et al.*, 1993). WILLCOX & TRIBE (1974) zaznamenali nematofágní aktivitu této houby na vajíčkách háďátek rodu *Heterodera*. Izoláty této nematofágní houby kolonizují zejména vaječné vaky háďátek rodu *Meloidogyne* (KERRY & CRUMP, 1998). Různé izoláty tohoto druhu jsou známé různou mírou agresivity k různým druhům fytoparazitických háďátek (BOURNE *et al.*, 1994).

Dactylellina candida (Nees) Yan Li (2005) je další houbou vykazující nematofágní aktivitu. Rychlost růstu a hustota mycelia *D. candida* je srovnatelná s *Arthrobotrys dactyloides*, ale její mycelium je znatelně jemnější. 150-300 μm dlouhé konidiofory *D. candida* nesou na svém konci skupinu 3-10 vřetenovitých spor (35-50 \times 8-9.5 μm) rozdělených čtyřmi přehrádkami. *D. candida* tvoří dva druhy lapacích struktur: fixní oka (15-23 μm) nesená na 10-35 μm dlouhých stopkách a lepicí knoflíky (4-7 \times 3,8-6 μm) na 4-15 μm dlouhých stopkách (DRECHSLER, 1937).

Dactylella lysipaga Drechsler (1937) parazituje na saprofytických nebo parazitických háďátkách (BARNETT & HUNTER, 1999). Vytváří vzpřímené, přehrádkované 125-250 μm dlouhé konidiofory nesoucí většinou jedinou na konci zaoblenou konidii (28-55 \times 9-14 μm) se čtyřmi přepážkami. *D. lysipaga* zachycuje háďátka pomocí fixních ok a lepicích knoflíků (DRECHSLER, 1937).

Monacrosporium phymatopagum (Drechsler) Subram. (1964) vytváří 250-325 μm dlouhé konidiofory nesoucí na apikálním konci jedinou vřetenovitou konidii. Konidie (40-49.2-60 \times 11-14.4-18 μm) jsou většinou rozděleny čtyřmi přepážkami, na bázi zúžené a na distálním konci zaoblené. Háďátka tato houba zachycuje pomocí lepicích knoflíků. *M. phymatopagum* je saprofytickým druhem žijícím v půdě, na dřevě nebo parazituje na háďátkách (BARNETT & HUNTER, 1999).

Monacrosporium ellipsosporum (Preuss) R. C. Cooke & C. H. Dickinson (1965) vytváří lepicí knoflíky. Konidiofory *M. ellipsosporum* jsou 150-300 μm dlouhé nesoucí jedinou vřetenovitou na distálním konci zaoblenou konidii (24-65 \times 7.5-19 μm) rozdělenou čtyřmi přepážkami (DRECHSLER, 1937).

2.3. Metodika

2.3.1. Odběr vzorků půdy

Pro hledání zdrojů bioagens využitelných v boji s háďátkou je vhodné se zaměřit na organismy vyskytující se v prostředí, v němž se vyskytují i fytoparazitická háďátka, tedy na půdní organismy. Půdní vzorky odebíráme pomocí lopatky či půdní sondy. Konečný vzorek vzniká smícháním vzorků dílčích, jejichž počet se řídí rozlohou daného pozemku. Odebrané půdní vzorky je nezbytně nutné v co nejkratší době zpracovat, při dlouhém skladování je zpravidla výsledek izolace půdních hub komplikován posunem poměru běžných saprofytických hub a hledaných druhů ve prospěch druhů saprofytických.

2.3.2. Izolace hub z půdních vzorků

Materiál:

- půdní vzorek
- sterilní destilovaná voda
- živná média
- antibiotikum (tetracyklin)
- 250 ml Erlenmeyerovy baňky
- sterilní Petriho misky (90 mm)
- bakteriologická hokejka
- hliníková fólie
- parafilm

Postup:

Vzorek půdy promísíme intenzivním promícháním a to zejména v případě, pokud se jedná o náhodné směsné vzorky půdy odebrané z různých míst či hloubky. Jako výchozí množství pro izolaci půdních hub použijeme 10 g půdy, kterou resuspendujeme v 50 ml sterilní destilované vody v 250 ml Erlenmeyerových baňkách. Rovnoměrné rozmístění propagulí hub v suspenzi a následnou optimální izolaci hub podpoříme mícháním směsi v Erlenmeyerových baňkách na horizontální třepačce (Ika vibrax OS 10 Basic) po dobu 20 min při rychlosti 150 rpm. Dalším krokem je sedimentace hrubých půdních částic po dobu deseti minut.

Takto připravenou půdní suspenzi rozetřeme na agarovou plotnu s živným médiem – 1,5 % vodní agar (water agar) – WA, bramborovo-dextrózový agar (potato dextrose agar) - PDA, agar s bengálskou červení (rose bengal agar) – BRA a ovesný agar (oat meal agar) – OMA. Při nanášení suspenze dodržujeme zásady aseptické práce ve sterilním prostředí (práce v laminárním boxu) tak, abychom eliminovali případnou kontaminaci dalšími mikroorganismy.

Množství či koncentraci půdního výluhu není možné kvantifikovat *sensu lato* vzhledem k neznámému zastoupení životaschopných hub a proto doporučujeme připravit ředící řadu půdního výluhu v rozmezí od 10^{-1} do 10^{-10} . Do Petriho misky aplikujeme 0,5-1 ml půdního výluhu, který rozetřeme bakteriologickou hokejkou. Takto nainokulovaná média v Petriho miskách inkubujeme v termostatu při teplotě 23 °C. Po objevení se růstu mycelia hub kontrolujeme Petriho misky každý den, aby nedošlo ke spojení růstových zón jednotlivých rozrůstajících se kolonií hub. Tyto kolonie hub pak izolujeme do čisté kultury izolátu na některém ze zmíněných médií a použijeme je pro testování nematofágní aktivity. Majoritní podíl hub v půdním výluhu je většinou zastoupen běžně se vyskytujícími druhy hub v půdním prostředí.

2.3.3. Postup přípravy použitých živných medií

Pro přípravu uvedených živných medií byla využita kompletní média (Čaderský-Envitek). Pro úplnost uvádíme i složení použitých medií. Všechna média byla sterilizována při 121°C po dobu 20 min a po ochlazení na teplotu cca 50 °C bylo přidáno širokospektrální antibiotikum (0,02 % (w/v) tetracyklin) k zamezení růstu bakterií.

Predikce nematofágní aktivity půdních hub - certifikovaná metodika

RBA - Rose bengal agar:

složení:	g/l
dextrosa	10
dihydrogenfosforečnan draselný	1
sojový pepton	5
bengálská červeň	0,05
síran hořečnatý	0,5
agar	15

PDA - Potato dextrose agar:

složení:	g/l
bramborová infuze	200
dextrosa	20
agar	15

OMA - Oat meal agar:

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

2.3.4. Pozitivní kontrola pro testování nematofágní aktivity hub

Jako modelové organismy pro predikci nematofágní aktivity hub byly použity izoláty známých nematofágních druhů hub (*Arthrobotrys dactyloides* CBS 300.87, *A. conoides* CBS 575.91, *A. brochopaga* CBS 597.92, *A. candida* CBS 546.63, *A. oligospora* CBS 115.81, *Dactylella oviparasitica*

CBS 347.85, *Monacrosporium thaumasium* CBS 320.94, *M. phymatopagum* CBS 450.93, *Dactylellina lysipaga* CBS 581.91, *Paecilomyces lilacinus* CBS 100379) získané z banky Centraalbureau voor Schimmelcultures se sídlem v Utrechtu v Holandsku.

2.3.5. Hádátka pro testování nematofágní aktivity

Pro predikci nematofágní aktivity izolovaných hub jsme s úspěchem použili snadno dostupné saprofytické modelové hádátka *Caenorhabditis elegans* (Obr 5 a 6). Pro použití tohoto organismu hovoří snadná technologie chovu velkého množství hádátek na malém prostoru v krátkém čase. Testovali jsme i podobnost reakce nematofágní houby při využití *C. elegans* a fytoparazitických hádátek (*Ditylenchus dipsaci*, *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *Meloidogyne hapla*), jejichž získání ve velkém počtu a kondici vhodné pro testy s sebou často nese celou řadu problémů. Výsledky hovoří o mírně vyšší reaktivitě nematofágních hub na přítomnost *C. elegans*, což je vhodné pro screening nematofágní aktivity testovaného druhu houby. Hádátka *C. elegans* je možné chovat na pevném či v tekutém živném médiu a jako potravu použít bakterie *E. coli* OP50 dle níže uvedeného postupu. Tento druh je možné uchovat po řadu let ve zmrazeném stavu při teplotě -80 °C za použití metody kryoprezervace. V případě potřeby je možné během několika dní hádátka revitalizovat a opět použít.

Příprava bakterií pro výživu *C. elegans* dle práce - STIERNAGLE (1999).

Materiál:

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

Postup:

Výchozí kultury *E. coli* 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 přes noc při teplotě 37 °C. Petriho misky i tekuté médium obsahující bakterie *E. coli* je možné skladovat při teplotě 4 °C po dobu několika měsíců. Tekuté kultury bakterií dále použijeme pro přípravu kultivačních médií pro množení *C. elegans*.

Příprava pevného kultivačního média pro *C. elegans*.

Materiál:

- namnožené bakterie *E. coli* OP50 v tekutém médiu
- destilovaná voda
- NaCl
- agar
- bakteriologický pepton
- 1M CaCl₂ ; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- roztok cholesterolu v etanolu (5mg/ml)
- 1M MgSO₄; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- pufr 1M KPO₄ (108,3 g KH₂PO₄, 35,6 g K₂HPO₄, 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
- hliníková fólie
- parafilm
- nematologická jehla

Postup:

Smícháme 3 g NaCl, 17 g agaru a 2,5 g peptonu v Erlenmeyerově baňce a doplníme 975 ml destilované vody. Živné médium sterilizujeme po dobu 40 min při teplotě 121 °C. Baňku ochladíme na teplotu cca 55 °C, přidáme 1 ml 1M roztoku CaCl₂, 1 ml cholesterolu v etanolu, 1 ml 1M roztoku MgSO₄ a 25 ml 1M roztoku pufru KPO₄ 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, které inkubujeme přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den přidáme k bakteriím jednotlivě háďátka (cca 20 ks gravidních samiček) předem promytá v destilované vodě pomocí nematologické jehly.

Příprava tekutého média pro *C. elegans*.

Materiál:

- základní roztok pro S médium: 5,85 g NaCl, 1 g K₂PO₄, 6 g KH₂PO₄, 1 ml roztoku cholesterolu v etanolu (5mg/ml), doplnit na 1 l destilovanou vodou; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- 1M citronan sodný (pH 6,0), 20 g monohydrátu kyseliny citronové, 293,5 g monohydrátu citronanu sodného, doplnit vodou na 1 l; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- roztok stopových prvků: 1,86 g disodné soli EDTA, 0,69 g FeSO₄·7H₂O, 0,2 g MnCl₂·4H₂O, 0,29 g ZnSO₄·7H₂O, 0,025 g CuSO₄·5H₂O, doplnit vodou na 1 l; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min), uchovávání ve tmě
- 1M roztok MgSO₄; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- S médium: 1 l sterilního základního roztoku, 10 ml 1M roztoku citronanu sodného (pH 6,0), 10 ml roztoku stopových prvků, 3 ml 1M CaCl₂, 3 ml 1M MgSO₄
- 4 Petriho misky obsahující *C. elegans*
- koncentrovaná suspenze *E. coli* OP50
- 1 l sterilní láhev se šroubovacím uzávěrem
- 50 ml sterilní centrifugační zkumavky s víčkem

Postup:

250 ml sterilního S média v 1 l láhvi inokulujeme koncentrovanou peletou *E. coli*, kterou připravíme centrifugací 2 - 3 l tekuté kultury *E. coli* v LB médiu při 3000 × g po dobu 10 min. Do Petriho misek s pevným živným médiem obsahující *C. elegans* přidáme 5 ml S média a obsah přelijeme do láhve k S médiu inokulovaného bakteriemi. Láhev třepeme na třepače při teplotě 20 °C. Intenzita kmitů by měla být taková, aby byla kultura dobře provzdušněna. Kulturu kontrolujeme odebráním kapky suspenze a prohlédnutím pod mikroskopem. Jestliže jsou bakterie háďátky spotřebovány (roztok už není kalný), je zapotřebí přidat další bakterie do S média. Kultivaci ukončíme většinou po 4 - 5 dnech. Láhev umístíme na led po dobu 15 min, aby došlo k usazení háďátek. Odsajeme většinu tekutiny z láhve a zbytek převedeme do 50 ml sterilní centrifugační zkumavky. Centrifugujeme po dobu 2 min při 1150 × g, abychom získali peletu háďátek, a odsajeme zbytek přebytečné tekutiny. U juvenilních jedinců trvá vytvoření pelety déle než 2 min.

Zamrazování *C. elegans* pomocí tekutého média.

Materiál:

- S pufr (pH 6,0): 129 ml 0,05M K₂HPO₄, 871 ml 0,05M KH₂PO₄, 5,85 g NaCl; sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- S pufr + 30% glycerol (v/v); sterilizace v autoklávu (121 °C, 20 min)
- Petriho misky s pevným kultivačním médiem pro *C. elegans* obsahující larvy 1. a 2. vývojového stupně bez bakterií
- 50 ml sterilní centrifugační zkumavky s víčkem
- 1,5 ml sterilní mikrozkušavky

Postup zamrazování:

Do Petriho misek (5-6 ks) s *C. elegans* přidáme S pufr v takovém množství, které budeme zamrazovat. S pufr s háďátka přelijeme do centrifugační zkumavky. Přidáme stejný objem S pufru s 30% glycerolem a důkladně promícháme. Směs rozdělíme po 1 ml do mikrozkušavek, které umístíme uzavřené v polystyrénovém boxu přes noc nebo nejméně po dobu 12 h do mrazicího boxu (-80 °C). Mikrozkušavky přemístíme následující den do mrazicího boxu (-80 °C), ve kterém budou trvale uchovány. Ověříme, zda háďátka přežila proces zamrazování.

Postup rozmrazování:

Mikrozkumavku s háďátkou necháme roztát při laboratorní teplotě. Obsah přelijeme do Petriho misky s pevným kultivačním médiem pro *C. elegans* inokulovaným bakteriemi *E. coli*. Pohybující se háďátka by měla být pozorovatelná za několik minut. Po 2-3 dnech přeneseme jednotlivě 10-15 jedinců na další Petriho misky s médiem. Háďátka necháme množit se po 1 generaci a sledujeme, zda se potomstvo správně vyvíjí a zda samičky v pravidelných třídenních intervalech kladou vajíčka a nedochází k vývojovým abnormalitám.

Pro použití háďátek v provokačním testu nematofágní aktivity nejprve háďátka zbavíme případných kontaminantů, v tomto případě se jedná o bakterie *E. coli*, které byly použity jako potrava. Pro tento případ byla ověřena následující metoda.

Materiál:

- sterilní destilovaná voda
- ampicilin
- mikropipeta
- Petriho misky s 1% vodním agarem
- kádinka
- 1,5 ml mikrozkumavky
- 10 ml polypropylenové špičky
- parafilm

Postup:

Háďátka z pevného kultivačního média smyjeme sterilní destilovanou vodou do kádinky a pak převedeme obsah do mikrozkušavky. K háďátkům připipetujeme ampicilin tak, aby cílová koncentrace byla 1 μ g/ml a necháme inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Centrifugací při 6000 \times g po dobu 4 min shromáždíme háďátka na dně mikrozkušavky. Mikropipetou odebereme supernatant a připipetujeme sterilní destilovanou vodu. Inverzně promícháme a opět centrifugujeme. Dále následuje čištění háďátek autonomním pohybem v agaru, při kterém dojde během 24 hodin ke sterilizaci nejen povrchu háďátek, ale i jejich zažívacího traktu. Nejprve připravíme „dráhu“ pro pohyb háďátek pomocí 10 ml polypropylenové špičky k automatické pipetě.

Sterilní jednorázovou špičku nejprve utěsníme několika vrstvami parafilmu na jejím zúženém konci. Poté ve sterilních podmínkách naplníme 5 ml sterilního média (1% vodní agar) a zakryjeme parafilmem. Při nalévání musí mít médium nižší teplotu (cca 40°C), aby nedošlo k roztavení parafilmu. Do mikrozkušavky napipetujeme 300 μ l sterilní destilované vody. Ze zúženého konce špičky po ztuhnutí agaru odstraníme parafilm a špičku vnoříme do této mikrozkušavky tak, aby se nedotýkala dna, a fixujeme parafilmem (Obr. 1). Do vrchní části špičky napipetujeme připravenou suspenzi háďátek. Suspenze musí být napipetována přímo do agaru. Po 24 hodinách se háďátka nacházejí již v mikrozkušavce, odkud je možné je přímo aplikovat do testovacích preparátů.

2.3.6. Příprava testovacích živých preparátů

Úspěšné testování nematofágní aktivity izolátů hub s sebou nese jeden zásadní problém a to je validace a vyhodnocení testu tak, aby bylo možné vypočítat mortalitu háďátek vlivem nematofágní aktivity houby. Tuto komplikaci vyřešil náš tým uspořádáním experimentu v živých mikroskopických preparátech, kdy je možné po celou dobu experimentu provádět případná hodnocení mortality pomocí světelné mikroskopie a zároveň nenarušit uzavřený systém háďátka - houba. Navržený funkční systém rovněž sleduje nutriční požadavky jednotlivých druhů nematofágních hub. Složení média bylo upraveno v případě hub vytvářející lapací struktury tak, aby daný druh houby rostl a zároveň vytvářel lapací struktury v důsledku nedostatečného množství živin.

Materiál:

- RBA (rose bengal agar)
- sterilní destilovaná voda
- sterilní mikroskopická podložní a krycí sklíčka
- sterilní Petriho misky (90 mm)
- sterilní filtrační papír
- sterilní skleněné tyčinky
- inokulační jehla
- parafilm

Postup:

Pro pěstování hub na sklíčku použijeme 20% RBA. Médium sterilizujeme po dobu 20 minut při 121 °C. Do Petriho misek vložíme kulatý filtrační papír navlhčený vodou a vysterilizovaný pod UV zářením v laminárním boxu po dobu 30 minut. Podložní sklíčka vložíme sterilně dovnitř Petriho misky (Obr. 2). Skleněnou tyčinkou nanese na sklíčko kapku agarů a jehlou vysterilizovanou nad plamenem do kapky agarů přeneseme mycelium testovaného izolátu houby. Poté agarů přikryjeme krycím sklíčkem. Množství agarů musí být takové, aby po přiklopení krycího sklíčka nebyla celá plocha pod krycím sklíčkem pokryta agarem. Je vhodné na okrajích sklíčka ponechat volný prostor pro pozdější aplikaci háďátek (Obr. 3). Petriho misky zafixujeme parafilmem a inkubujeme v termostatu při teplotě 22 °C. V závislosti na růstu testovaného druhu houby aplikujeme definovaný počet háďátek vždy do mezery mezi krycím a podložním sklíčkem. Takto připravené živé preparáty inkubujeme při teplotě 22 °C a kontrolujeme dle potřeby.

V průběhu experimentu zaznamenáváme celkový počet háďátek a mrtvé jedince očividně usmrčené působením nematofágního druhu houby. Získaná data přepočítáme na % mortality a transformujeme pomocí goniometrické funkce arcsin ($x = \sin y$; $\{-1 \leq x \leq 1\}$). Transformované hodnoty testování vyhodnocujeme například pomocí analýzy rozptylu a provedeme závěrečné zhodnocení nematofágní aktivity testovaných druhů hub.

2.4. Určování nematofágních hub

K determinaci jednotlivých druhů nematofágních hub je možné použít klíče, který sestavili COOKE & GODFREY (1964) nebo zjednodušeného klíče dle WANG & MC SORLEY (2003).

2.5. Závěr

Tato metodika přispěje k dalšímu studiu nematofágních hub, které by bylo možné využít jako přirozený nepřátelský organismus v biologické ochraně rostlin proti háďátkům. V budoucnu by měl být výzkum zcela jistě zaměřen i na využití nematofágních hub v biologické ochraně a jejího včlenění do integrované ochrany rostlin.

3. Srovnání „novosti postupů“

Metodika shrnuje postupy pro výzkum budoucího využití nematofágních hub. Postupy uvedené v metodice nebyly v tomto rozsahu, formě a kontextu v České republice zveřejněny. Konkrétně se jedná o původní metodu testování aktivity nematofágních hub s možností kontinuálního sledování a vyhodnocování.

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 primárním testování nematofágních hub s cílem využít je pro ochranu rostlin před fytoparazitickými háďátky.

5. Seznam použité související literatury

- Barnett H. L., Hunter B. B. (1999): Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. APS Press. Second printing. St. Paul, Minnesota, USA, 218 p.
- Barron G. L. (1977): The Nematode-destroying Fungi. Topics in Mycobiology No. 1. Canadian Biological Publications Ltd., Guelph.
- Barron G. L., Thorn R. G. (1987): Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. Canadian Journal of Botany 65, 774-778.
- Bourne J. M., Kerry B. R., de Leij F. A. A. M. (1994): Methods for the study of *Verticillium chlamydosporium* in the rhizosphere. Workshop: Organisms and Methods for Biological Control of Nematodes. Supplement of Journal of Nematology, 26: 587-591.
- Cooke R. C., Godfrey B. E. S. (1964): A key to the nematode-destroying fungi. Transactions of the British Mycological Society, 47(1): 61-74.
- Dackman C., Jansson H. B., Nordbring-Hertz B. (1992): Nematophagous fungi and their activities in soil. In: Stotzky G., Bollag J. M. (eds): Soil Biochemistry vol. 7, Marcel Dekker, New York (1992), pp. 95-130.
- Domsch K. H., Gams W., Anderson, T. (1980): Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press (London) LTD, 859 p.
- Dowsett J. A., Reid J. (1979): Observation on the trapping of nematodes by *Dactylaria scaphoides* using optical, transmission and scanning-electron-microscopic techniques. Mycologia, 71: 379-391.
- Drechsler C. (1937): New *Zoopagaceae* destructive to soil rhizopods. Mycologia 29:229-249.
- Esser R. P., Schubert T. S. (1982): Fungi employing mucilaginous hyphal, sessile, or stalked globose cells to entrap nematodes. Nematology circular No. 94. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville.
- Esser R. P., Schubert T. S. (1983): Fungi that entrap nematodes utilizing nonconstricting rings. Nematology circular No. 103. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville.
- Gray N. F. (1987): Nematophageous fungi with particular reference to their ecology. Biological revue, 62: 245-304.
- Chen Z. X., Chen S. Y., Dickson D. W. (2004): Nematology advances a perspectives. Nematode Management and Utilization. CAB International. Tsinghua University Press, 1234 p.
- Jaffee B. A. (2004): Wood, nematodes, and the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. Soil Biology & Biochemistry, 36: 1171-1178.
- Jansson H. B., Nordbring-Hertz B. (1980): Interactions between nematophagous fungi and plant parasitic nematodes: attraction, induction of trap formation and capture. Nematologica, 26: 383-389.
- Kerry B. R., Crump D. H. (1998): The dynamics of the decline of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, in four soils under intensive cereal production. Fundamental and Applied Nematology, 21: 617-626.
- Kerry B. R., Kirkwood I. A., de Leij F. A. A. M., Barba J., Leidjens M. B., Brookes P. C. (1993): Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. Biocontrol Science Technology, 3:355-365.
- Li T. F., Zhang K. Q., Liu X. Z. (2000): Taxonomy of Nematophagous Fungi. Chinese Scientific and Technological Publications, Beijing.
- Liou J. Y., Tzean S. S. (1992): Staphanocystys as nematode-trapping and infecting propagules. Mycologia, 84(5): 786-790.
- Liu S., Chen S. (2005): Efficacy of the fungi *Hirsutella minnesotensis* and *H. rhossiliensis* from liquid culture for control of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. Nematology, 7(1): 149-157.
- Lohde, G. (1874): Einige neue parasitische Pilze. Tageblatt der 47. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Breslau. p. 203. In: Shepherad M. (1955): *Harposporium crassum* sp. nov. Transactions of the British Mycological Society, 38: 47-48.
- Luo H., Li X., Pan Y. B., Li G. H., Zhang K. Q. (2006): Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* function as a nematode-attacking device. Applied Environmental Microbiology, 72: 2982-2987.
- Mankau R. (1980): Biological control of nematode pests by natural enemies. Annual Review of Phytopathology, 18:415-440.

- Minter D. W., Brady B. L. (1980): Mononematous species of *Hirsutella*. Transactions of the British Mycological Society, 74: 271-282.
- Morton C. O., Hirsch P. R., Kerry B. R. (2004): Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi – a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. Nematology, 6(2): 161-170.
- Perry R. N., Moens M. (2006): Plant Nematology. CABI North American Office, 447 p.
- Rubner A. (1996): Revision of predacious hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. Studies in Mycology, 39: 1-134.
- Saikawa M., Takahashi A. (2002): Nonconstricting-ring formation in two species of nematode-capturing hyphomycetes. Mycoscience, 43:417-419.
- 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.
- Sturhan D., Schneider R. (1980): *Hirsutella heteroderae*, ein neuen nematodenparasitärer Pilz. Phytopathologische zeitschrift, 99: 105-115.
- Tedford E. C., Jaffee B. A., Muldoon A. E. (1995): Effect of temperature on infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* by the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. Journal Invertebrate Pathology, 66: 6–10.
- Waller P. J., Larsen M. (1993): The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. International Journal for Parasitology, 23: 539–546.
- 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>
- Willcox J., Tribe H. T. (1974): Fungal parasitism of cysts of *Heterodera*. I. Preliminary investigations. Transactions British Mycological Society, 62: 585–594.

6. Seznam publikací, které předcházely metodice

Této metodice nepředcházely žádné publikace.

7. Dedikace

Metodika vznikla jako výstup řešení projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QH81163 „Vývoj biologických metod ochrany rostlin proti fytoparazitickým hádčátkům uplatnitelných v integrovaných systémech rostlinné produkce“. Autoři metodiky děkují MUDr. Martě Kostrouchové za poskytnutí hádčátek *Ceanorhabditis elegans*.

8. Oponenti

Ing. Vladimír Gaar, vedoucí diagnostické laboratoře SRS Praha

Mgr. Alena Hanzalová, oddělení genetiky, šlechtitelských metod a kvality produkce, VÚRV,
v.v.i. Praha

9. Přílohy

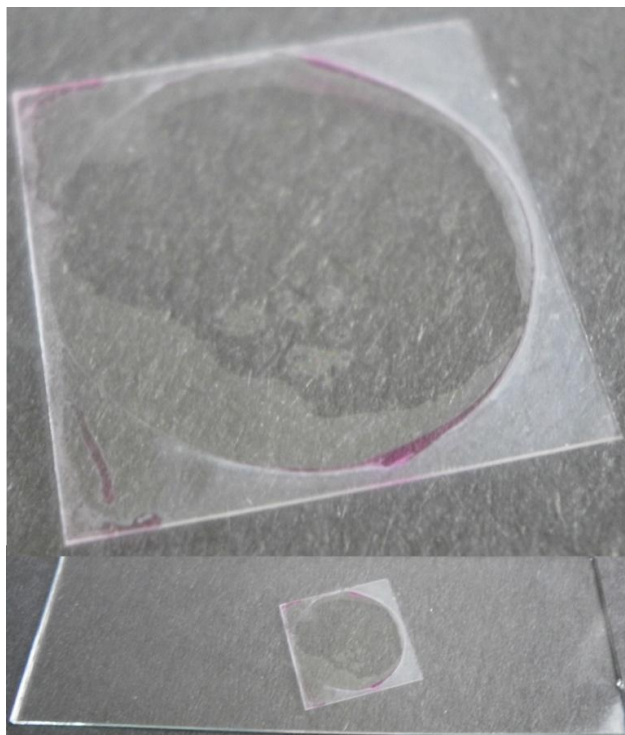
Obr. 1: Sterilizace háďátek pomocí pevného média.



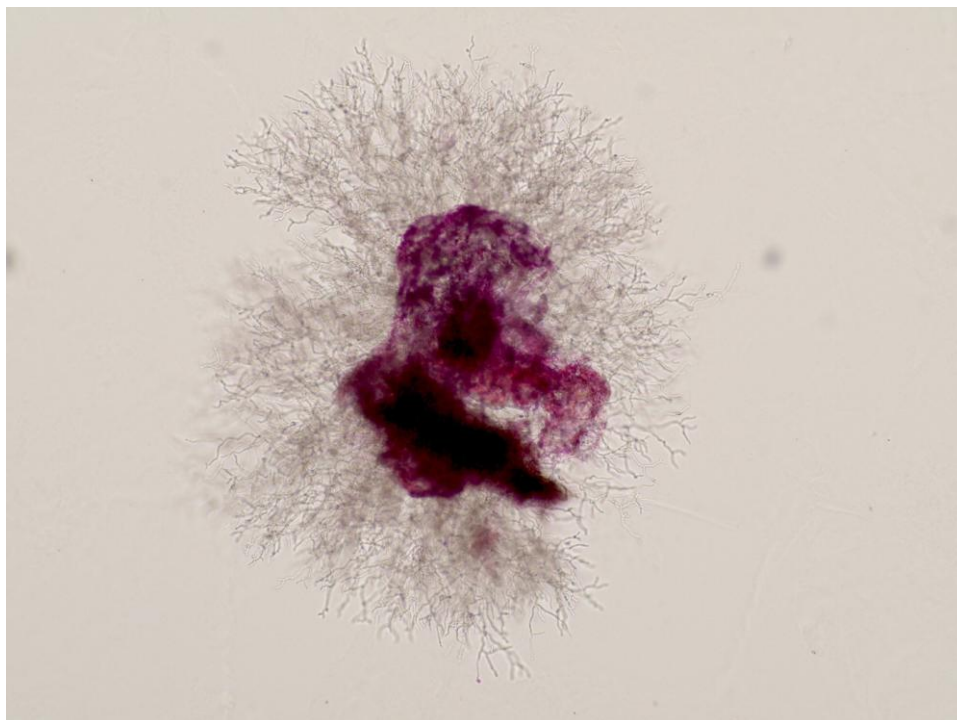
Obr. 2: Design sklíčkové kultury - uspořádání živého preparátu.



Obr. 3: Nativní preparát s volnou mezerou pro pozdější aplikaci háďátek.



Obr. 4: Rozrůstající se mycelium v podmínkách nativního preparátu.



Obr. 5: Gravidní samička *C. elegans*.



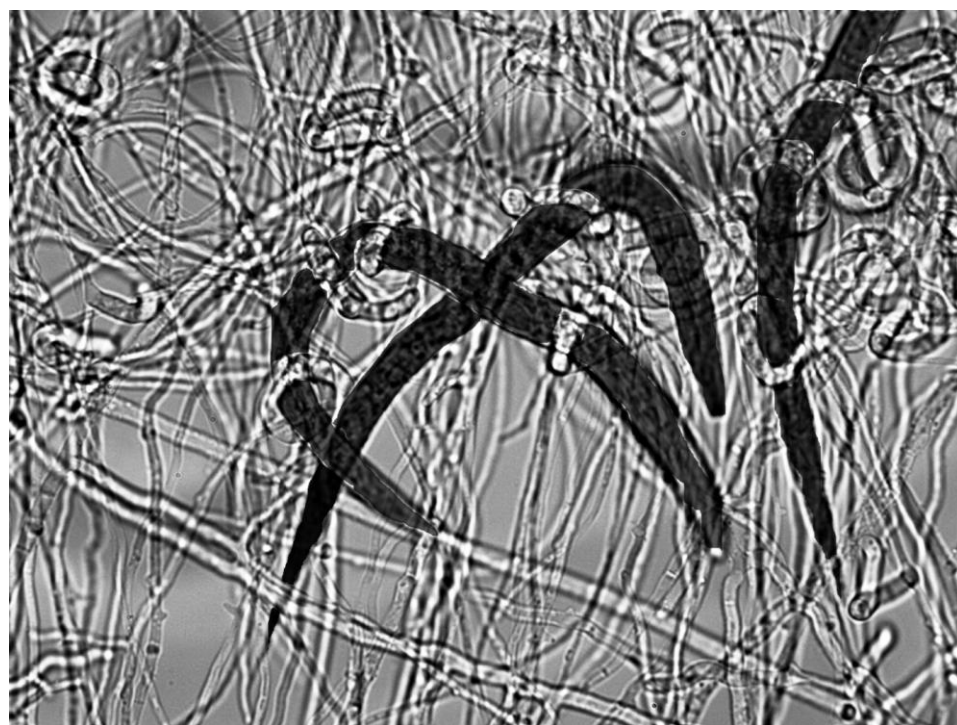
Obr. 6: Larva *C. elegans*.



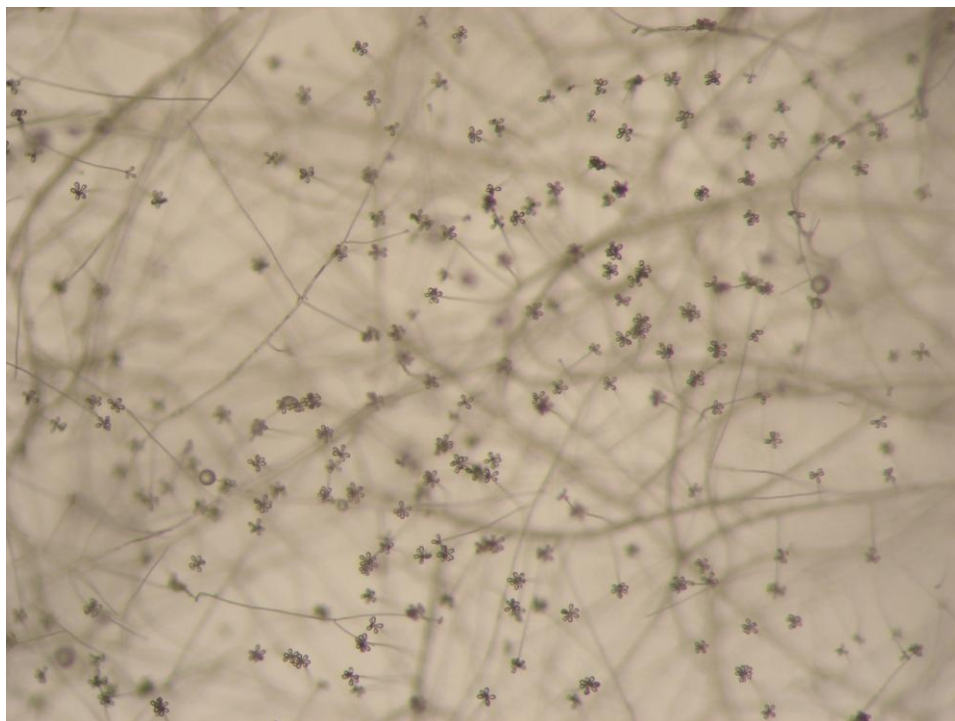
Obr. 7: Lapací struktury houby *Arthrobotrys oligospora*.



Obr. 8: Hádátka druhu *C. elegans* zachycená lapacími orgány houby *Arthrobotrys oligospora*.



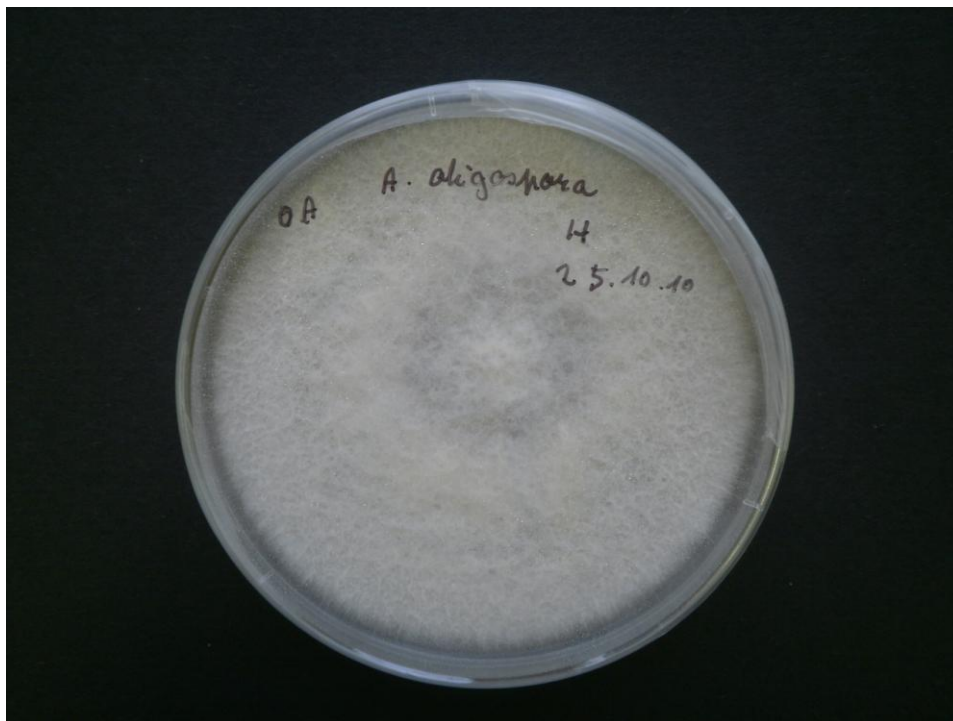
Obr. 9: Konidiofory s konidiemi houby *Arthrobotrys oligospora*.



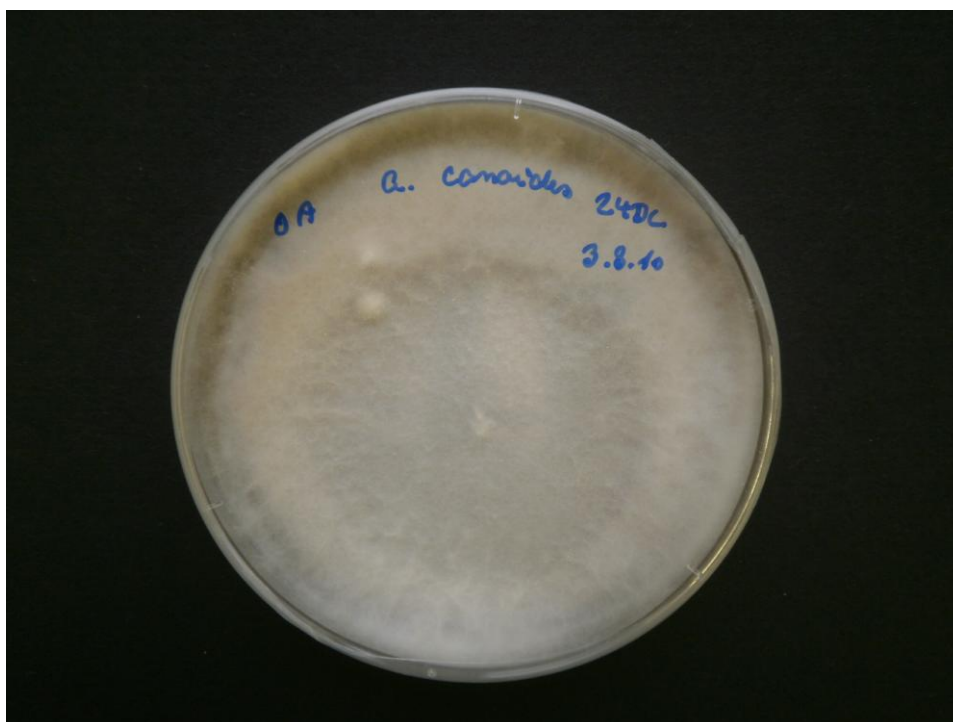
Obr. 10: Konidie houby *Arthrobotrys oligospora*.



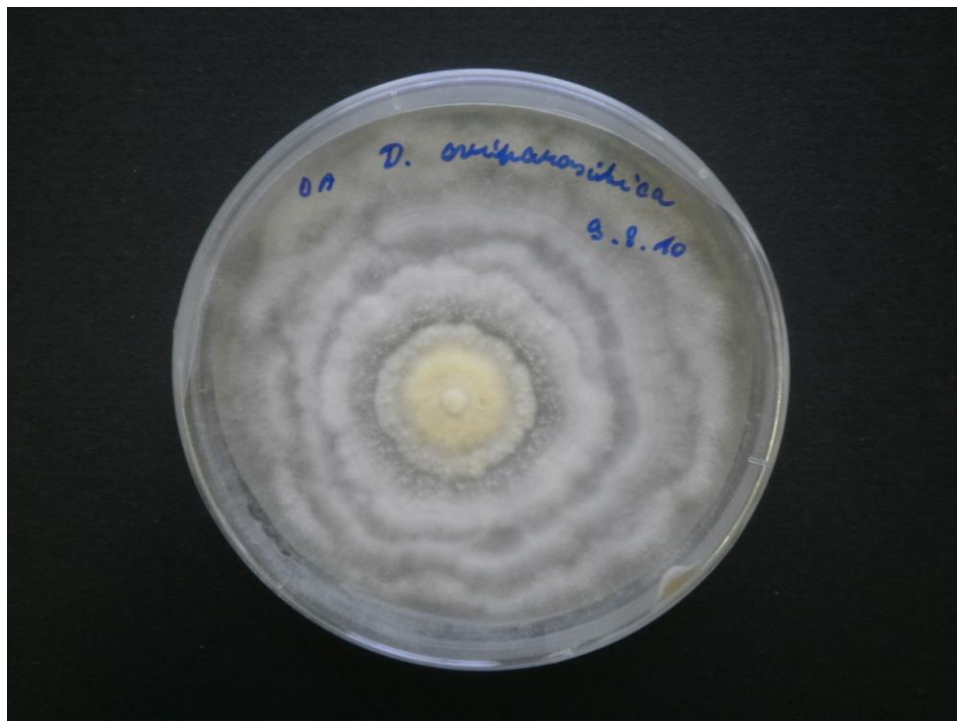
Obr. 11 *Arthrobotrys oligospora* – OA.



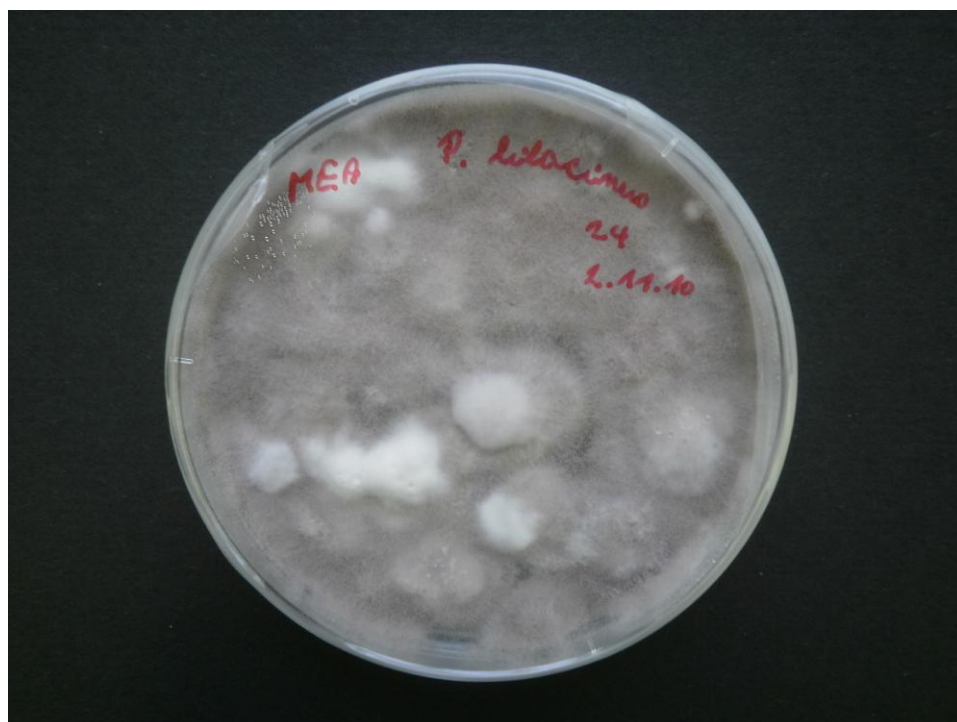
Obr. 12 *Arthrobotrys conoides* – OA.



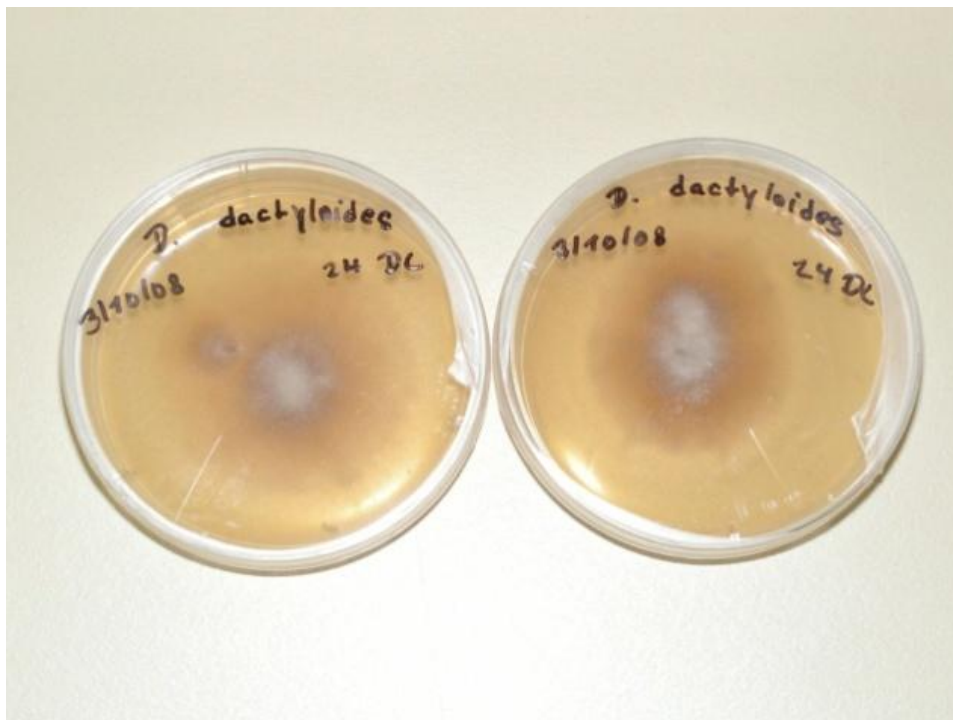
Obr. 139 *Dactylella oviparasitica* – OA.



Obr. 10 *Paecilomyces lilacinus* – MEA (malt extract agar).



Obr 15: *Dactyllaria dactyloides* – PDA.



Obr. 16: *Pochonia chlamydosporia* – RBA.

