

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

Axenizace fytoparazitických háďátek rodů *Ditylenchus* a *Meloidogyne* a jejich chov
v in vitro podmínkách (Metodika pro praxi)

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

Axenizace fytoparazitických háďátek rodů *Ditylenchus* a
Meloidogyne a jejich chov
v in vitro podmínkách (Metodika pro praxi)

Zouhar Miloslav, Douda Ondřej

© Miloslav Zouhar

ISBN: 978-80-213-1767-3

**Axenizace fytoparazitických háďátek rodů *Ditylenchus* a *Meloidogyne* a jejich chov
v in vitro podmínkách (Metodika pro praxi)**

-Obsah-

1.	Cíl metodiky a dedikace	- 2 -
2.	Vlastní popis metodiky	- 2 -
2.1.	Úvod	- 2 -
2.2.	Literární přehled	- 3 -
2.2.1.	Základní charakteristika fytoparazitických háďátek rodů <i>Ditylenchus</i> a <i>Meloidogyne</i>	- 3 -
2.2.2.	Axenické chovy fytoparazitických háďátek	- 6 -
2.2.3.	Extrakce háďátek z infikovaných pletiv a z půdy	- 7 -
2.2.4.	Axenizace háďátek	- 7 -
2.2.5.	Kvantifikace háďátek, stanovení koncentrace inokula	- 10 -
2.2.6.	Typy rostlinných in vitro kultur používaných pro reprodukci a uchování fytoparazitických háďátek	- 10 -
2.3.	Metodická část	- 12 -
2.3.1.	<i>Ditylenchus dipsaci</i> , chov v in vitro podmínkách	- 12 -
2.3.1.1.	Příprava kompatibilních hostitelských rostlin v in vitro kulturách	- 12 -
2.3.1.1.1.	Příprava živných médií	- 13 -
2.3.1.1.2.	Příprava hostitelských rostlin nebo jejich částí	- 14 -
2.3.1.2.	Extrakce, sterilizace háďátek a inokulace hostitelských rostlin	- 18 -
2.3.2.	<i>Meloidogyne hapla</i> chov v in vitro podmínkách	- 21 -
2.3.2.1.	Příprava kompatibilních hostitelských rostlin v in vitro kulturách	- 22 -
2.3.2.2.	Extrakce, sterilizace háďátek a inokulace hostitelských rostlin	- 22 -
3.	Srovnání „novosti postupů“	26
4.	Závěr	26
5.	Doplňující údaje dle vzoru NAZV	31

1. Cíl metodiky a dedikace

Cílem této metodiky je poskytnout pracovníkům řešícím v České republice problematiku týkající se výzkumu fytoparazitických nematod (hád'átek) základní informace o technikách kultivace těchto škodlivých organismů v axenických kulturách. Metodika vznikla za finanční podpory MZe a je výstupem řešení projektu NAZV **QG50087** „Vývoj a ověření alternativních prostředků ochrany zeleniny proti fytofágním hád'átkům v podmínkách ČR“.

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Úvod

Fytoparazitická hád'átka patří k těm škodlivým organismům, jejichž význam není v České republice v současné době příliš docenován. Tato skutečnost je dána zejména mikroskopickými rozměry těchto škůdců, jejich obtížnou diagnostikou a poměrně krátkou tradicí specializované rostlinolékařské nematologie v České republice. Problémem stále zůstává i malá informovanost široké pěstitelské veřejnosti o těchto škůdcích, navíc zaměřená často pouze na karanténní druhy způsobující škody na bramborách. Značná škodlivost některých druhů fytoparazitických hád'átek a většinou velmi obtížně realizovatelná, nebo neúčinná ochrana přitom opravňují k provádění zejména aplikovaného výzkumu v této oblasti.

Při realizaci experimentů zaměřených na vývoj diagnostických metod hád'átek, stanovení škodlivosti hád'átek a zejména pak vývoj metod ochrany proti fytoparazitickým hád'átkům se setkáváme se základním problémem proveditelnosti výzkumu na těchto úrovních, přičemž limitujícím faktorem je dostupnost dostatečného množství biologického materiálu. Použití přirozeně zamořených ploch za účelem reprodukce hád'átek pro experimentální účely není většinou vzhledem k typicky ohniskovitému výskytu možné. Naleznout vhodnou volnou plochu, na které je infestace půdy hád'átky v profilu a ploše rovnoměrná pro homogenní napadení reprodukčních hostitelských rostlin, je téměř nemožné. Do konfliktu se zde rovněž staví zájmy majitele pozemku či pěstitelů a zájmy výzkumného týmu. V případě karanténních organismů je situace dále komplikována nutností zahrnout mezi zainteresované organizace na problému i orgány státní správy uplatňující zákony a vyhlášky s ohledem na karanténní organismy. Tyto skutečnosti odůvodňují výzkum a vývoj jiných, alternativních metod pro reprodukci hád'átek v řízených podmínkách.

K reprodukci hád'átek pro potřebu dalšího zkoumání či udržení populace v životaschopném stavu je tedy možné zvolit v podstatě dva přístupy. První z nich a zároveň nejvíce používanou metodou je inokulace a pěstování příslušných hostitelských rostlin umístěných v řízených podmínkách či ve venkovním, ovšem do jisté míry vždy

ovlivňovaném prostředí (např. nádobové kultury ve venkovním prostředí nebo maloparcelky). Druhý přístup je založen na principech axenizace a in vitro reprodukce, tohoto přístupu se týká tato metodika a řeší některé problémy s ním spojené.

Každé vědecko-výzkumné pracoviště si musí zvolit vhodnou cestu pro získání a udržení populací háďátek v této metodice jsou nastíněny postupy, jejichž aplikací do praxe je možné pracovat s háďátkem *Ditylenchus dipsaci* a *Meloidogyne* sp. jenž patří bezesporu mezi velmi významné parazity v ČR pěstovaných polních plodin.

2.2. Literární přehled

2.2.1. Základní charakteristika fytoparazitických háďátek rodů *Ditylenchus* a *Meloidogyne*

V oblastech střední Evropy jsou mezi významné druhy atakující zeleninu řazena háďátka rodů *Meloidogyne* a *Ditylenchus*. Na území České republiky byl v minulých letech prokázán výskyt karanténního háďátka *Ditylenchus dipsaci* na cibulové zelenině a dále pak nekaranténního druhu *Meloidogyne hapla* způsobující škody na zelenině kořenové. Hospodářský význam těchto druhů v posledních pěti letech roste nebyvalým způsobem.

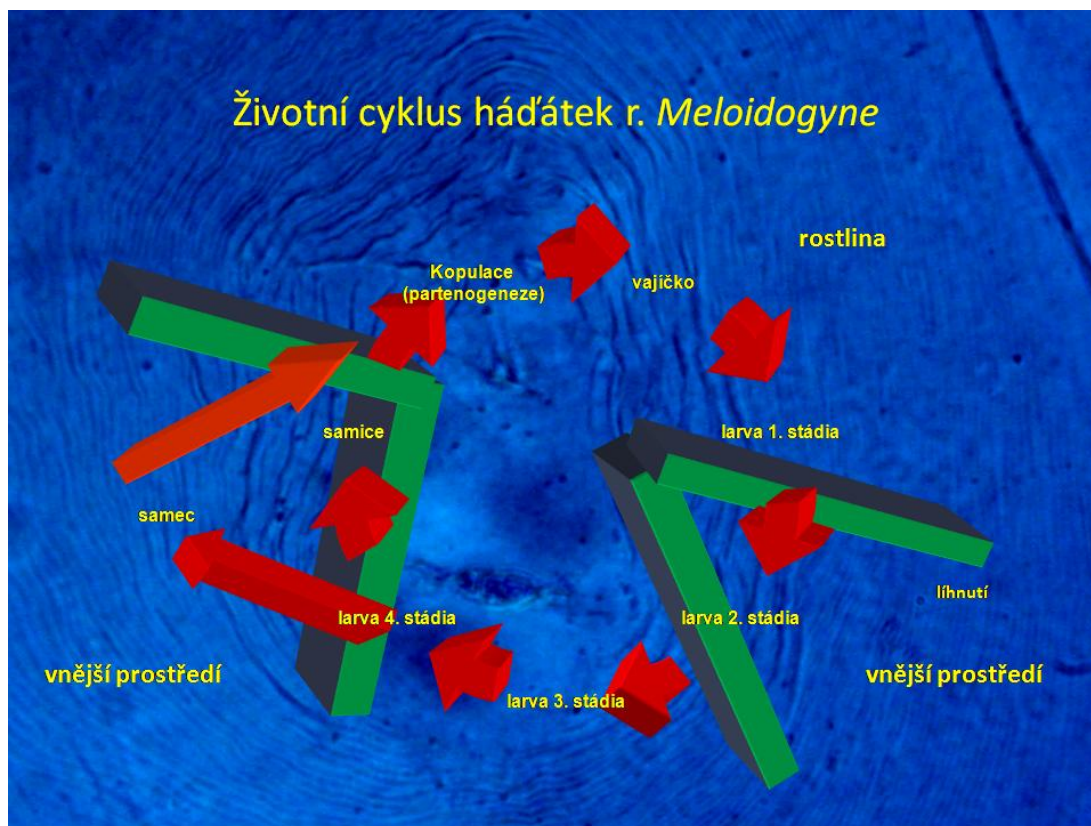
S nematologickou osvětou roste i tlak pěstitelů zeleniny na hledání způsobů ochrany pěstovaných plodin proti těmto parazitům. Háďátka rodu *Meloidogyne* jsou obligátní endoparazité rostlin. Jejich výskyt je jedním z limitujících faktorů pro pěstování plodin v tropických a subtropických oblastech. Některé druhy se však již dokázaly adaptovat i na podmínky mírného klimatického pásma (Siddiqui, 2000). Jejich životní cyklus probíhá sice částečně vně kořenů, ale hlavní část života tráví sedentérním způsobem (Taylor, 1971). Vývoj všech druhů háďátek rodu *Meloidogyne* prochází v podstatě stejnými vývojovými stadii. Jednotlivé druhy se však liší především vztahem k různým hostitelským rostlinám a v nárocích na teplotu. Ve vaječném vaku aktivní samičky jsou zastoupeny vajíčky různých vývojových stadií, od nediferencovaných až po larvy prvního vývojového stupně ve vaječných obalech. Líhnou se larvy druhého vývojového stupně, které aktivně hledají hostitelské rostliny. Kořen



pásma (Siddiqui, 2000). Jejich životní cyklus probíhá sice částečně vně kořenů, ale hlavní část života tráví sedentérním způsobem (Taylor, 1971). Vývoj všech druhů háďátek rodu *Meloidogyne* prochází v podstatě stejnými vývojovými stadii. Jednotlivé druhy se však liší především vztahem k různým hostitelským rostlinám a v nárocích na teplotu. Ve vaječném vaku aktivní samičky jsou zastoupeny vajíčky různých vývojových stadií, od nediferencovaných až po larvy prvního vývojového stupně ve vaječných obalech. Líhnou se larvy druhého vývojového stupně, které aktivně hledají hostitelské rostliny. Kořen



hostitelské rostliny atakují za kořenovou špičkou, po několikanásobném svlékání a diferenciaci pohlaví samičky duří a jejich ocasní část vyhřezává z kořene ven. Samečci opouštějí kořen a aktivně vyhledávají samičky. Po spáření samička produkuje vajíčka do vaječného želatinózního vaku, ze kterého se pak uvolňují do půdy. (Decker, 1969).



Mezi karanténní druhy, jejichž výskyt na území ČR nebyl dosud prokázán, patří *M. fallax* a *M. chitwoodi*. Tyto druhy můžeme nalézt v některých zemích EU (Holandsko, Belgie, Německo, Francie a Rakousko). Geografické umístění lokalit s prokázáním výskytu těchto karanténních háďátek v zemích střední Evropy a pohyb zemědělských komodit mezi státy EU poukazují na možnost jejich introdukce i do ČR (Zouhar et al., 2002).



Ditylenchus dipsaci napadá zejména osní a listové části rostlin, včetně cibulí a hlíz. V



menší míře mnohou být napadena i semena a kořeny. Do rostlin pronikají nejčastěji průduchy. V rostlinném pletivu se pak vyvíjejí a rozmnožují. Samičky začínají klást vajíčka třetí až sedmý den po poslední svlékání. V rostlinách se vyvíjí několik generací za sebou, kdy starší larvy často opouštějí rostliny a hledají nového hostitele.

V půdě mohou přežít až 18 měsíců bez potravy. Při pomalém vysychání mohou přejít do anabiózy, ve které mohou přežít několik let (Decker, 1969). Na toto háďátko se vztahuje ohlašovací povinnost v případě výskytu na rostlinách cibulovin (včetně cibulovin okrasných) určených k pěstování a na osivu vojtěšky. Při charakterizaci tohoto druhu nelze opominout ani fenomén bioras, který byl popsán již v 19. století. Skupina háďátek, která je schopna dokončit svůj vývoj na konkrétním druhu hostitelské rostliny a na jiné nikoli je souhrnně označována jako biorasa. U ras byly zjištěny rozdíly v karyotypu, počet chromozómů v diploidní sadě kolísá od 12 do 60 (Brzeski, 1998). Je nutné podotknout, že mezi jednotlivými biorasami (někteří autoři popisují až 30 bioras) nejsou zpravidla patrné morfologické rozdíly, proto existuje snaha o jejich diferenciaci na základě analýzy DNA

(Palmerová et al., 1991; Wendtová et al., 1993; Esquibet et al., 1998; Esquibet et al., 2003; Marek et al. 2005; Subbotin et al., 2005). Standardním postupem pro rozlišení ras zůstávají biologické testy prováděné jako nádobové pokusy, nebo formou explantátových kultur. Řada vědců vyslovila pochybnosti o existenci a účelnosti rozlišování bioras, nicméně toto koncepční schéma je stále užíváno (Janssen, 1994). Hostitelský okruh hád'átka *Ditylenchus dipsaci* je extrémně široký. Brzeski (1998) udává 400 hostitelských rostlin, Hooper (1973) uvádí, že je hád'átko *Ditylenchus dipsaci* schopno napadnout až 450 druhů rostlin. Wendtová et al. (1993) a Esquibet et al. (1998) udávají 500 druhů různých hostitelských rostlin a to jak kulturních druhů, tak plevelů. Greco et al. (2002) ovšem upozorňuje, že epidemiologie a okruh hostitelských rostlin druhu nebyl doposud dostatečně prozkoumán. Z výše uvedené polyfágnosti vyplývá vysoká míra škodlivosti tohoto druhu. Druh *Ditylenchus dipsaci* je zařazen v seznamech karanténních organismů Evropské unie, EPPO i České republiky.

2.2.2. Axenické chovy fytoparazitických hád'átek

V odborné literatuře se často setkáváme s nejrůznějšími označeními kultur hád'átek udržovaných v in vitro podmínkách. Dle Hoopera (1986) byla základní terminologie navržena, případně potvrzena Doughertym (1953, 1959). Podle ní se za agnotobiotické či xenické označují kultury s neznámým počtem asociovaných organismů (většinou mikrobiální flóry), gnotobiotické kultury jsou kultury se známým počtem asociovaných organismů (nemusí být nutně známo, o jaké druhy se přesně jedná), dále existují kultury monoxenické s jedním známým asociovaným organismem a nakonec kultury axenické, ve kterých žádné asociované organismy nejsou.

S chovem hád'átek v axenických kulturách jsou spojeny určité klady a zápory. Základní výhodou je možnost kontinuální produkce velkého počtu hád'átek na poměrně malém prostoru a to v optimálních podmínkách pro jejich vývoj (pokud jsou známy). Faulkner et al. (1974) byl schopen v in vitro kulturách vojtěšky vyprodukovat v průběhu tří let asi 300 miliónů jedinců hád'átka *Ditylenchus dipsaci*. Inokulum je navíc k dispozici kdykoliv bez ohledu na růstovou fázi hostitelské rostliny, což lze považovat vzhledem k podmínkám střední Evropy za velký klad. Dalším podstatným přínosem je i skutečnost, že v in vitro kulturách pracujeme s čistými populacemi hád'átek bez příměsi nežádoucích např. bakteriofágních či saprofágních druhů. In vitro kultury také umožňují poměrně snadné studium biologie chovaných druhů a to v takové míře detailů, která pomocí klasického způsobu přímé kultivace hád'átek na původních hostitelských rostlinách není dosažitelná (Supramana et al. 2001). Rovněž některé experimenty týkající se studia atraktivity rostlinných extraktů a kořenových exudátů pro fytoparazitická hád'átka (Spiegel et al., 2003), či experimenty zaměřené na výzkum reprodukce kříženců různých ras hád'átek by bez axenických kultur nebyly proveditelné. In vitro kultury hád'átek je možné použít i při

novošlechtění rezistentních odrůd (Fassuolitis & Bhatt, 1982). In vitro systémy chovu háďátek sebou nesou také některé nevýhody. Zavádění technologie in vitro kultur je spojeno s vysokými fixními náklady. Náklady na provoz takové technologie jsou rovněž nemalé. Nelze opominout ani vědomosti a dovednosti odborného personálu, které musí být na adekvátní úrovni. Z pohledu reprodukčních systémů háďátek a jejich vlivu na biologické vlastnosti populací chovaných háďátek lze aplikaci in vitro pěstovaných hostitelských rostlin hodnotit jako vhodnější způsob reprodukce než chov háďátek na nepřírodných zdrojích potravy jako jsou houby a bakterie. V případě utilizace nepřírozené potravy háďátky může dojít v průběhu několika dokončených vývojových cyklů ke změně základních biologických vlastností populací fytoparazitických háďátek jako jsou například agresivita nebo schopnost navázání kompatibilního vztahu s hostitelskou rostlinou (Maehara et al., 2005).

2.2.3. Extrakce háďátek z infikovaných pletiv a z půdy

Před vlastní axenizací je zapotřebí extrahovat životaschopná stadia háďátek (vajíčka, larvy, dospělce) z pletiv infikovaných rostlin nebo ze substrátu. K tomu je možné využít nejrůznějších extrakčních technik. Některé z nich jsou zcela jednoduché, jiné vyžadují, aby vědecký tým disponoval poměrně nákladným speciálním vybavením. U pohyblivých volně žijících druhů jakým je *Ditylenchus dipsaci* je zřejmě nejrozšířenější modifikovaná Baermannova nálevková extrakční technika. Často jsou používány i metody z této techniky odvozené, jako jsou např. postupy využívající maceraci rostlinných pletiv na plastových sítích umístěných na tácech (Southey, 1985). Pro získání vajíček sedenterních druhů háďátek r. *Meloidogyne* lze s menším či větším úspěchem využít centrifugační metodu (McClure et al., 1973), nebo v případě menší potřeby biologického materiálu manuální odběr vaječných vaků pod stereomikroskopem.

2.2.4. Axenizace háďátek

Klíčovým problémem je při zakládání axenických kultur fytoparazitických háďátek sterilizace počátečního inokula. Je zapotřebí zvolit metodu, která je dostatečně účinná a zároveň neovlivňuje negativním způsobem životaschopnost inokula. V průběhu uplynulých let byla testována řada metod využívajících nejčastěji aplikaci sterilní destilované vody, roztoků různých antibiotik, případně sloučenin rtuti či chlóru, malachitové zeleně, eventuálně kombinaci ošetření těmito látkami. Některé metody sterilizace vyžadují ruční manipulaci s háďátkem, takové postupy jsou vhodné pro menší počty sterilizovaných jedinců. Byly vyvinuty i metody pro velkoobjemovou axenizaci, které však často vyžadují použití speciálního přístrojového vybavení.

Nejjednodušším způsobem sterilizace je opakované promývání háďátek velkými objemy sterilní destilované vody. Tato metoda se v současnosti používá spíše v kombinaci

s ošetřením různými výše uvedenými látkami, nicméně je ji možné použít i samostatně. Hanounik & Osborne (1975) byli schopni tímto způsobem sterilizovat vajíčka háďátka *Meloidogyne incognita*. Otázkou ovšem zůstává použití této jednoduché metody na ostatní vývojová stadia háďátek. Druhé složení epifytní mikroflóry háďátek je ovlivněno prostředím, ve kterém se háďátka pohybovala. Při aplikaci sterilizační metody je tedy nutné brát ohled nejen na druh háďátka ale i na populaci a podmínky, ze kterých byla získána. Některé spory mikroskopických hub jsou vybaveny adhezivními útvary, které jim umožňují přilnout k povrchu těla háďátek a jejich odstranění je často komplikované.

Plowright et al. (2002) doporučuje pro sterilizaci menšího množství háďátek druhu *Ditylenchus dipsaci* přenášet individuálně háďátka pomocí tenkého entomologického špendlíku nebo řasy do kapky 0,1% roztoku malachitové zeleně, ponechat roztok působit 15 minut a potom rychle háďátka přenést do sterilní destilované vody. Podle stejného autora je možné větší objemy háďátek sterilizovat několikanásobným propláchnutím ve sterilní destilované vodě, po němž následuje máčení v 0,5 – 1,0 % roztoku Hibitanu (20% chlorhexidin glukonát) po dobu tří hodin při laboratorní teplotě (nebo přes noc při teplotě 2-5°C) a nakonec opět propláchnutí ve sterilní destilované vodě.

Poměrně komplexní způsob sterilizace háďátka *Ditylenchus dipsaci* zvolil Viglierchio et al. (1973). K axenizaci použil kombinaci penicilinu, síranu streptomycinu, síranu mycifradinu a aretanu. Háďátka byla dále koncentrována a napipetována do svrchní komory Lowsberyho přístroje (Lownsbery & Lownsbery, 1956), která obsahovala asi 20 ml roztoku aretanu (133 ppm). Háďátka byla ošetřována aretanem jemným probubláváním sterilním vzduchem po dobu 16 hodin. Pak byla háďátka přemístěna do druhé komory obsahující sterilní roztok penicilinu (5000 jednotek/ml) a síran streptomycinu (1,0 mg/ml). Po osmi hodinách v antibiotickém roztoku byla háďátka nakonec převedena do sběrné zkumavky. Do této nádoby bylo umístěno rovněž magnetické míchadlo, aby se zajistila vyrovnaná koncentrace háďátek pro inokulaci.

Pro háďátka *Ditylenchus dipsaci* bylo ke sterilizaci použito i jiných antibiotik. Kühnhold et al. (2006) doporučuje omývání háďátek v roztoku obsahujícím 0,1 % síran streptomycinu a 0,1 % amphotericin-B po dobu 30 minut. Faulkner et al. (1974) použil pro axenizaci háďátek druhu *Ditylenchus dipsaci* kombinaci ošetření chloridem rtuťnatým a roztoku antibiotik. Háďátka byla nejprve ošetřena po dobu 15 minut HgCl_2 (koncentrace 1:500), několikrát promyta sterilní destilovanou vodou a následně ošetřena roztokem obsahujícím směs trihydrát ampicilinu (250 mg) a furazolidon (100 mg) v 100 ml sterilní destilované vody, do této směsi byl dále vmíchán roztok hydrochloridu oxytetracyklinu, síranu streptomycinu a kaptanu (250 mg každého v 200 ml sterilní destilované vody) a objem výsledného činidla byl zvýšen na 500 ml a háďátka v tomto roztoku byla přímo inokulována na tkáňové kultury.

Obdobně využil kombinace organické sloučeniny rtuti a antibiotik k povrchové sterilizaci háďátek druhu *Bursaphelenchus cocophilus* Giblin-Davis et al. (1989). Háďátka byla nejprve ošetřována 1 h roztokem obsahujícím 6 mg/l penicilinu G, 1 mg/l chlortetracyklinu HCl, 1 mg/l síranu streptomycinu a 13mg/l síranu kanamycinu, pak byla háďátka třikrát 15 minut vystavena působení 0,1 % roztoku thiomersalu ($C_9H_9HgNaO_2S$) po němž vždy následovalo propláchnutí sterilní destilovanou vodou. Analogicky postupovali při kultivaci háďátka *Pratylenchus scribneri* Lawn a Noel (1986). Pro axenizaci použili roztoky $HgCl_2$ a síranu streptomycinu v koncentraci 100, respektive 1000 ppm, přičemž délka působení roztoků byla 2 minuty. Naopak dlouhé působení axenizačního roztoku využil při své metodě Nico et al. (1999). Háďátka druhu *Pratylenchus goodeyi* ošetřoval 0,1 % roztokem ethoxyethylchloridu rtuťného po dobu 2 hodin, následovalo ještě další působení 0,1 % roztokem síranu streptomycinu trvající 24 h.

Často používanou technikou axenizace háďátek je metoda dle Kusbergové & Sardanelliho (1984). Tento způsob využívá skleněný chromatografický válec obsahující 6 mm skleněné kuličky, válec je naplněn roztokem sterilní destilované vody s 20 ppm síranu streptomycinu a penicilinu G. Háďátka jsou nejprve tři až čtyřikrát propláchnuta tímto antibiotickým roztokem a pak přenesena na hladinu válce. Háďátka za 2 – 4 hodiny projdou válcem a jsou vespod odebrána a inokulována přímo v roztoku antibiotik.

Naproti tomu Aumann (1997) nepoužil při zakládání in vitro kultur háďátka *Xiphinema index* ke sterilizaci antibiotika, ale pouze ošetření 0,03 % roztokem azidu sodného trvající 20 minut v kombinaci s několika násobným promytím háďátek sterilní destilovanou vodou. Rovněž Mitkowski & Abawi (2002) použili pro povrchovou sterilizaci vaječných vaků háďátka *Meloidogyne hapla* promývání 0,5 % roztokem hypochloridu sodného ($NaOCl$) po dobu 15 minut a následné opakované promývání sterilní destilovanou vodou. Obdobně postupovali při axenizaci vajíček háďátka druhu *Meloidogyne incognita* Sudirman a Webster (1995), doba působení hypochloridu sodného však byla v tomto případě pouze 2 minuty. Možné je rovněž pouze použití samotného chloridu rtuťnatého. Von Mende (2007) použil s úspěchem tuto látku v koncentraci 0,01 % pro sterilizaci larev druhého vývojového stádia háďátka *Meloidogyne incognita*. U druhu *Meloidogyne javanica* tuto techniku použil Yue-Wu et al. (1998), v tomto případě byla koncentrace chloridu rtuťnatého 0,1 % a doba působení 2,5 minuty, po ošetření byla suspenze larev 2. vývojového stupně promývána pětkrát sterilní destilovanou vodou.

Zcela jiným přístupem k axenizaci háďátek je využití migrace inokulovaných jedinců přes speciální médium, při čemž dojde k odstranění kontaminantů z povrchu těla háďátek. Tuto metodu testoval s použitím gelujícího média Pluronic F127 (Ko et al., 1997; Ko a Van Gundy, 1988). Kontaminované části média byly vyřezávány a axenické napadené kořeny

přenášeny na nové sterilní misky. Pomocí této metody se podařilo založit axenické kultury fytoparazitických háďátek rodů *Meloidogyne*, *Rotylenchulus*, *Pratylenchus* a *Radopholus*, přičemž míra úspěšnosti založení se pohybovala od 60 po 100 %.

2.2.5. Kvantifikace háďátek, stanovení koncentrace inokula

Jako inokulum je možné použít jak pohyblivá vývojová stádia, tak vajíčka. Před vlastní inokulací je zapotřebí stanovit počet jedinců v inokulu. Počítání je možné provést několika způsoby, starší postupy využívají různých typů počítacích misek (Grise, 1963) a přímého počítání háďátek v suspenzi pod stereomikroskopem, novější metody jsou zpravidla založeny na dokumentaci suspenze fotografováním a počítání háďátek je prováděno pomocí digitální analýzy obrazu. Druhý způsob vyžaduje vlastnictví příslušného softwaru (jako je např. Olympus DP-soft, DiPs atd.).

Množství háďátek v inokulu a objem inokulační suspenze se u různých autorů liší. Lze konstatovat, že počet háďátek v inokulu je závislý na biologii daného druhu a na účelu pro který chceme založenou kulturu použít. Pro účely biologických studií jsou často chovy zakládány pouze z jedné oplozené samice (nebo neoplozené jedná-li se o druh rozmnožující se partenogeneticky). Tento postup zvolil Nico et al. (1999) u druhu *Pratylenchus goodeyi*, kultury založené tímto způsobem nejsou ovšem vhodné pro výzkum hostitelského okruhu nebo testování rezistence. Naproti tomu Aumann (1997) použil při zakládání axenického chovu háďátka *Xiphinema index* k inokulaci 10 – 15 jedinců, zatímco Lawn a Noel (1986) inokulovali řezu mrkve 100 jedinci háďátka druhu *Pratylenchus scribneri*, podobný počet (125 jedinců) použila k inokulaci rostlin podzemnice olejné háďátkem *Ditylenchus destructor* De Waeleová et al. (1990).

Velké množství háďátek se používá při testování rezistence, Yu et al. (1999) použil jako inokulum u řepy při testování rezistence vůči čtyřem druhům háďátka r. *Meloidogyne* 800 larev druhého vývojového stádia a po týdnu provedl reinokulaci dalšími 400 jedinci.

2.2.6. Typy rostlinných in vitro kultur používaných pro reprodukci a uchování fytoparazitických háďátek

V historii byla sledována možnost reprodukce a uchování životaschopných populací fytoparazitických háďátek z několika úhlů. Na straně jedné byl studován chov háďátek na celých diferenciovaných rostlinách a na straně druhé na částech rostlin.

První z možností je tedy pěstování hostitelských rostlin v hermeticky uzavřených lahvích v semisterilních podmínkách. Dle Rössnera (1971) se používá jako substrát pro rostliny vlhká písčitá půda ve vrstvě asi 8 cm. Nádoba s půdou se uzavře a autoklávuje 30 minut při 1,5 atm třikrát v intervalu 24 hodin. Po vychladnutí se do nádob vysejí při sterilních podmínkách předem vysterilizovaná semena. Vyklíčené semenáčky se inokulují háďátky, která jsou

povrchově sterilizovaná a takto připravená kultura se může umístit na měsíc do skleníku bez jakékoliv dalšího zásahu nebo péče.

Pro některé rody je oblíbeným způsobem chov háďátek na discích mrkve. Háďátka je možné chovat na discích mrkve (asi 2 g v čerstvém stavu) lze sterilizovat a umístit v Petriho misce o průměru 5 cm. Kapky se sterilní suspenzí háďátek lze po-té pipetovat do 1% vodního agaru na misky vedle čerstvého disku mrkve (Verdejo & Pinochet, 1992).

Kolečka mrkve na 1% agaru jsou vhodná pro chov *Pratylenchus brachyzeirus* a také *P. vulnus*. Přesunutím dvouměsíčních kultur do 15°C zpomaluje vývoj háďátek a prodlouží tím život kultury (Moody, 1973). Tato technika je vhodná pro *Ditylenchus sp.* a *Radopholus sp.* Po 1-2 týdnech nebo když jsou vidět bílé tečky kalusu na discích mrkve, inokulují se háďátky. Háďátka nemusejí být povrchově sterilizována, ale měla by být několikrát omyta ve sterilní vodě a inokulována v několika mililitrech suspenze.

Další z možností je chov háďátek na kulturách rostlinných explantátů. Explantátové kultury rostlin jsou založeny na aseptické kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek (Kováč, 1995). Např. háďátka rodu *Heterodera* byla kultivována monoxenicky na odříznutých kořenech cukrovky (*Beta vulgaris* L.) udržovaných v tekutém Whiteovu mediu, ačkoliv tekuté médium není vhodné pro pozorování pohybu háďátek, průnik do kořenů nebo pro oplodnění samic háďátek. Semena cukrovky (*Beta vulgaris* L.) byla sterilizována. Po přenesení semen na 0,8% vodní agar pro vyklíčení byla ponechána ve tmě při teplotě 25 °C. Když byly klíčky semen 4-5 cm dlouhé, odřízly se 3 cm konce klíčku a přenesly na agarové médium s živinami na Petriho miskách (Ruth & Viglierchio, 1969). Háďátka *Meloidogyne hapla* bylo s úspěchem chováno na kořenových kulturách rajčat (*Solanum lycopersicum*), cibule (*Allium cepa*) a pampelišky obecné (*Taraxacum officinale*) (Mitkowski & Abawi, 2002).

Nelze opominout ani možnost chovu háďátek na kalusech. Kalus představuje soubor nediferencovaných buněk (Kováč, 1995). Poškození rostlinného orgánu vyvolává reakci, kterou se snaží poraněnou část opravit. Tato odpovědní reakce spustí mechanismus dělení nepoškozených buněk sousedících s ránou, a tak neprodyšně uzavře zranění. Výsledkem je neustále se dělicí hmota obecně málo diferenciovanych a neorganizovaných agregátů rostlinných buněk nazývajících se kalus (Hall, 1995). Pak následuje zpevňování této vrstvy dalším navrstvením ligninu, suberinu, vosku v takovém pořadí, aby byla znovu nabyta celistvost ochranné vnější bariéry rostliny. Když se však způsobí zranění v aseptické kultuře na definovaném mediu, stimuluje se reakce počátečního buněčného dělení a způsobí pokračující dělení na neurčitou dobu prostřednictvím vnějšího vlivu chemického složení

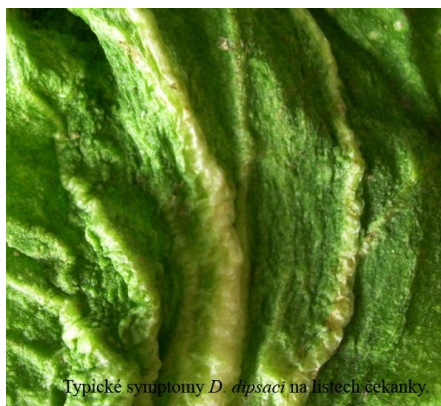
kultivačního média. Záměrná tvorba zranění nemusí být pro tvorbu kalusu *in vitro* nezbytně nutná, ačkoliv se vzhledem k rychlosti formování kalusu všeobecně používá. Kalus je často pro hád'átka lepší hostitel než diferencované pletivo, ze kterého je odvozeno; také pletivo z normálních rezistentních rostlin reprodukci hád'átek podporuje pokud se tvoří kalus. Kalus obvykle roste na agarovém médiu obsahující známé živiny. Tato technika je užitečná pro kultivaci velkého množství hád'átek a také pro stanovení účinků různých chemikálií a ostatních faktorů ovlivňující jejich vývoj (Hooper, 1986). Nebyl zaznamenán žádný náznak, že by hád'átka ztratila vitalitu, reprodukční a infekční schopnosti, hostitelskou specifitu, dokonce i po několika letech v kontinuální kultuře (Eriksson, 1965). Hád'átko *Bursaphelenchus lignicolus* žijící ve dřevě borovice bylo úspěšně chováno na kalusu vojtešky seté (*Medicago sativa* L.; Hirotada & Yasuharu, 1975). Na kalusu vojtešky bylo chováno také hád'átko *Pratylenchus vulnus* (Lownsbery et al., 1967). Cibulová rasa hád'átka zhoubného *Ditylenchus dipsaci* byla chována s úspěchem na kalusu cibule (*Allium cepa*) v monoxenické kultuře 8 týdnů při 23 °C (Riedel & Mai, 1971).

2.3. Metodická část

2.3.1. *Ditylenchus dipsaci*, chov v *in vitro* podmínkách

2.3.1.1. Příprava kompatibilních hostitelských rostlin v *in vitro* kulturách

Pro chov hád'átka zhoubného lze s úspěchem použít kalusové struktury a rovněž pak *in vitro* kultury celých rostlin. Při výběru druhu rostliny pro tuto aplikaci je nutné brát zřetel na příbuznost explantátové kultury s původní hostitelskou rostlinou. I přes fakt, že hostitelský okruh hád'átka je poměrně široký, je vhodné uplatnit jako *in vitro* hostitelskou rostlinu minimálně ze stejné čeledi jako je rostlina původní (zdrojová). Lze rovněž doporučit výběr takového druhu, který je nenáročný na kultivaci v podmínkách *in vitro*. Příkladně suknice cibule jsou mnohem vhodnější pro přípravu kalusových explantátů než stroužky česneku. Proto lze po zvolení technologie vybrat i vhodnou hostitelskou rostlinu k úspěšné a



Typické symptomy *D. dipsaci* na listech čekanky

bezproblémové kultivaci. Pro chov *Ditylenchus dipsaci* byly optimalizovány dva základní postupy a to chov na celých rostlinách v *in vitro* kulturách a chov na kalusech. Jako hostitelské rostliny byly vzhledem k podmínkám ČR vybrány cibule kuchyňská (*Allium cepa*) pro biorasu *D. dipsaci* z česneku a čekanka obecná (*Cichorium inthybus*) pro biorasu z čekanky.

V minulých letech byl prováděn monitoring ČR na výskyt *D. dipsaci* a výsledky ukazují rozšíření zejména česnekové biorasy tohoto hád'átka, proto i tato metodika sleduje tuto skutečnost.

2.3.1.1.1. Příprava živných médií



Při vypracování metodiky byly používány reagenty od firmy Duchefa (MS-M0221.0001, MS s vitamíny-M0222.0001, 2,4-D -D0911.0100, BAP-B0904.0001, myo inositol I0609.0100, agar pro explantáty-P1001.1000) a to zejména na základě praktického zhodnocení jejich kritérií dostupnosti a kvality. Lze hovořit o vhodném kompromisu mezi cenou a

kvalitou na českém trhu. Jako základ pro in vitro média bylo použito živné medium podle Murashige a Skooga (1962) (dále jen MS). Pro přípravu a uchování reagentů se osvědčily lahve z borosilikátového skla (Duran P-lab- L300250), zejména pak pro jejich mechanickou odolnost a snadnou sterilizovatelnost. Nedílnou součástí médií je voda, byla používána ddH₂O ošetřena germicidním zářením. Všechny manipulace po přípravě média probíhaly v standardním evaluovaném biohazard boxu Jouan 120.

Postup přípravy MS pro explantátové kultury celých rostlin:

1. Do 500 ml uzavíratelné skleněné nádoby (Duran) odměřit 250 ml redestilované vody.
2. Do vody přidat 220 mg směsi mikro a makroelementů dle Murashige a Skooga (tato směs obsahuje i vitamíny), 50 mg myo-inositolu, 10 g sacharózy.
3. V případě přípravy tuhého media přidat 6,3g agaru na jeden litr média. Do tekuté modifikace médi se agar nepřidává.
4. Dorovnat pH pomocí HCl případně NaOH na hodnotu pH 5,7.
5. Objem doplnit do 500 ml.
6. Autoklávovat 20 min v 120°C
7. Sterilované medium se ve flow-boxu rozlije do sterilních petriho misek (P-lab K300360.1). Pakliže je nutné připravit médium pro pěstování celých rostlin v adekvátních nádobách (Sigma aldrich - V8630-100EA, B8648-100EA, Duchefa De Wit W1607.0750) rozlijeme médium nejprve do nádob a ty potom podrobíme autoklávování. V případě tohoto způsobu lze označit medium pomocí značek přímo v mediu, které jsou autoklávovány společně s médiem.

F1 médium pro kultivaci kalusových struktur

1. Do 500 ml uzavíratelné skleněné nádoby (Duran) odměřit 250 ml redestilované vody.
2. Do vody přidat 220 mg směsi miro a makroelementů dle Murashige a Skooga (tato směs obsahuje i vitamíny), 50 mg myo-inositolu, 10g sacharózy, 3,15 g agarů.
3. Navážit 0,5 mg 2,4-D a 0,25 mg BAP, tyto fytohormony před přidáním do roztoku rozpustit v malém množství 1M NaOH.
4. Upravit hodnotu pH pomocí HCl případně NaOH na hodnotu pH 5,7.
5. Objem doplnit na 500 ml.
6. Autoklávovat 20 min v 120°C
7. Medium se ve flow-boxu rozlije do sterilních petriho misek.

Takto připravená média mohou být použita pro výsev semen hostitelských rostlin nebo pro pasážování již připraveného rostlinného materiálu. Není vhodné tato média dlouhodobě skladovat například ve 4 °C, v těchto podmínkách dochází k vysrážení fytohormonů a vitamínů v mediu a nelze tak zajistit homogenní vlastnosti média pro významné pro růst explantátové kultury.

2.3.1.1.2. Příprava hostitelských rostlin nebo jejich částí

V biologii *D. dipsaci* jsou všechna vývojová stadia schopna aktivního pohybu, snad jen s jednou výjimkou a tu tvoří vajíčka respektive embryony. V tomto ohledu byly optimalizovány podmínky chovu jak na celých rostlinách, tak na kalusech. S ohledem na výskyt *D. dipsaci* v ČR byly optimalizovány chovy na rostlinách cibule kuchyňské (*Allium cepa*) a čekanky obecné (*Cichorium inthybus*). Pro přípravu explantátových kultur je prvním krokem povrchová sterilizace použitého rostlinného materiálu. V tomto kroku jsou odstraněny na povrchu žijící organismy, které by v in vitro kultuře působily jako necílové a jejich přítomnost by znehodnotila přípravu axenické kultury. Zpravidla se jedná o houby, bakterie a případně kvasinky. Standardní postupy nejsou schopny zasáhnout endogenní mikroorganismy nacházející se v intercelulárních prostorech rostlinných pletiv. V tomto případě lze s úspěchem použít antibiotika aplikovaná na pletivo přímo, nebo do kultivačního média. Nejsnazším způsobem získání axenické kultury je použití semen pro sterilizaci a po vyklíčení sterilní rostliny její pasážování do axenických podmínek. Při sterilizaci rostlinného materiálu sledujeme nejen jejich povrchovou úpravu, ale je také vhodné sledovat jejich životaschopnost. Při nevhodném způsobu sterilizace se setkáváme se ztrátou životaschopnosti jak u semen, tak u rostlinných štěpů. Je tedy nutné s ohledem na připravovanou kulturu použít adekvátní sterilizační postup. Pro semena čekanky, pórku či cibule lze použít následující postup sterilizace:

1. Pro sterilizaci semen připravit gázový sáček (gáza 5x5 cm), do něho uzavřít semena tak, aby v průběhu promývání neopustila tento sáček.
2. Umístit sáček se semeny pod tekoucí vodu (běžná voda z vodovodního řádu) a promývat 20 minut, jsou tak odstraněny mechanické nečistoty a povrch semena je hydratován před sterilizací.
3. Do 400 ml kádinek připravit sterilizační roztoky v objemech 200 ml.
4. 2 minuty v 80 % etanolu a 80 % savo (10 minut).
5. Opláchnout sterilní destilovanou vodou a to minimálně 5x po dobu tří minut.



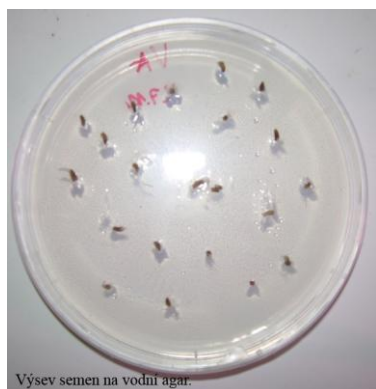
Šterilizace semen v gázovém sáčku.

Pro zachování klíčivosti semen je jedním z důležitých faktorů závěrečné omytí ve sterilní destilované vodě. Je tedy vhodné tento krok nepodceňovat a nijak neuspěchat. Všechny úkony od kroku 3. je nutné provádět ve flow boxu s dodržáním všech zásad sterilní práce.

Doporučit lze rovněž výsev sterilních semen na petriho misky s 1,5% vodním

agarem (destilovaná voda 100 ml agar pro kultivaci rostlin 1,5 g uvařit autoklárovat rozlít

sterilně na, petriho misky ve vrstvě cca 2-3 mm). Tímto postupem lze odfiltrvat určitý stupeň kontaminací a dále pak neklíčivých semen. Na kultivační médium poté pasážujeme již



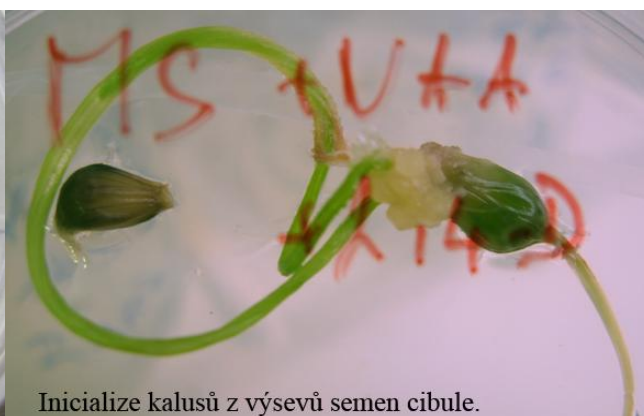
Výsev semen na vodní agar.



Kontaminace výsevu semen čekanky.

rostliny ve známém zdravotním stavu a to ve fázi děložních lístků. Tímto postupem rovněž šetříme prostor v kultivačních

boxech a také kultivační média. Děložní rostliny můžeme pasážovat jak pro přípravu celých rostlin (MS) nebo pro přípravu kalusových struktur (F1).



Explantátové kultury (kalusy i celé rostliny či jejich části) lze připravit i explantací části rostliny. Tyto postupy jsou založeny na sterilizaci rostlinného materiálu a jeho explantaci do in vitro podmínek. Rostlinné pletivo, které použijeme pro přípravu explantátů je zpravidla méně odolné vůči sterilizačním roztokům než semena a proto je nutné snížit koncentrace či doby působení jednotlivých reagentů. Na druhou stranu je možné do axenických kultur převést větší část rostliny (1 cm listu), kterou můžeme použít pro inokulaci hád'átky za poměrně kratší čas než v případě výsevu semen. Listy mladých rostlin pórků, česneku či srdéčka čekanky lze pro explantaci sterilizovat následujícím postupem.

1. Část rostliny určené k explantaci (např. list česneku) omýt pod tekoucí vodu (běžná voda z vodovodního řádu) cca 20 minut.
2. Připravit kousky pletiva určeného pro explantaci (nařezat skalpelem na vhodnou délku)
3. Do 400 ml kádinek připravit sterilizační roztoky v objemech 200 ml.
4. 30 sekund v 70 % etanolu a 70 % savo (10 minut).
5. Opláchnout sterilní destilovanou vodou a to minimálně 5x po dobu tří minut.



Takto sterilizované rostlinné pletivo lze vysévat na MS. Pro Kvalitní růst rostlinného materiálu je nutné zvolit vhodné osvětlení a rovněž pak teplotu. Pro růst celých rostlin či jejich zelených částí lze doporučit 23-25°C při délce dne 11 hodin. Pro kalusové struktury potom 22-27°C ve tmě. Po výsevu či pasážování je vhodné kultury kontrolovat a případně odstranit a



Kalus čekanky připravený pro inokulaci.

nahradit kontaminované vzorky. Není výjimkou, že při zavádění technologie axenických kultur se badatelé potýkají s řadou problémů a v tomto ohledu zejména s kontaminacemi nejrůznějšího původu. Ne všechna pracoviště disponují autonomní explantátovou laboratoří, nic méně i v takovýchto podmínkách se dá

dosáhnout úspěchu. Je nutné mít na zřeteli body v postupu axenizace, či nakládání s explantáty, ve kterých může dojít ke kontaminaci, respektive jaké jsou zdroje kontaminace. V tomto ohledu lze doporučit následující:

- vyplatí se investovat do kvalitního Flow boxu, nejlépe s vertikálním prouděním možností vlastní sterilizace a velkou plochou pro práci (minimum 120 cm)



Ve flow boxu ponecháváme jen to co k danému pracovnímu úkolu nezbytně potřebujeme.



Kultivace v nádobách s průduchem

- rozhodně nešetřit na kultivačních lahvích, těsnost víček, případně průduchové filtry umožňují snadnou manipulaci a pasážování.
- dodržovat pravidla sterilní práce a nevnášet kontaminanty na svém těle či na nástrojích



Kultivace rostlin v nádobách Sigma Aldrich.



Kultivace rostlin v de WIT nádobách.

určených pro axenizaci.

2.3.1.2. Extrakce, sterilizace háďátek a inokulace hostitelských rostlin

Pro úspěšné založení axenických kultur fytoparazitických háďátek musí být splněna dvě základní kritéria. Vlastnictví hostitelských rostlin v axenické kultuře a dále pak vlastnictví sterilního inokula háďátek v dostatečné koncentraci. Pro přípravu vhodného standardu inokula je tedy nutné převést háďátka z přirozeného prostředí (napadené rostliny) do prostředí explantátové kultury respektive. Pro extrakci háďátek *D. dipsaci* z rostlinného materiálu lze použít celou řadu metod, které byly v rámci přípravy této metodiky testovány tak, aby byla vybrána optimální varianta využitelná v širokém měřítku. Pro extrakci háďátek z rostlinného materiálu lze s úspěchem použít modifikovanou metodu dle Baermanna. Tato metoda je zejména vhodná pro extrakce z menšího množství materiálu (10-50g). Pro *D. dipsaci* je vhodné použít delší dobu pro uvolnění háďátek z rostlinného pletiva, neboť někteří jedinci se mohou nacházet v anhydrobióze, to se týká zejména několik dní starého či suchého materiálu. V případě použití Baermanovi nálevky se často setkáváme se snížením výtěžku životaschopných háďátek při prodloužené periodě extrakce, to souvisí se snižováním množství kyslíku ve vodě a vede k vysoké mortalitě extrahovaných háďátek. Postup byl tedy modifikován a to odstraněním koncové svěrky a jejím nahrazením zkumavkou a dále pak přidáním peroxidu vodíku do extrakčního roztoku. Postup je tedy následující.



1. Rostlinný materiál nakrájet na malé proužky (2-3 mm tenké).
2. Sestavit Baermanovu nálevku jako filtr použít jednu vrstvu kapesníčku ROTH (P-lab R008721) (nepouští drobné chloupky).
3. Připravit extrakční roztok peroxidu vodíku 0,1% ve vodě (běžná pitná voda z vodovodního řádu).
4. Nakrájený rostlinný materiál umístit do nálevky a pomalu zalít extrakčním roztokem.

Takto připravenou soustavu ponecháme v laboratorní teplotě po dobu 6-12 hodin. Háďátka hromadně opouštějí pletivo a sedimentují na dně zkumavky. Po ukončení inkubace

lze na dně zkumavky pouhým okem sledovat usazená hád'átka. Na silikonovou hadici nasuneme svěrku a zkumavku opatrně odstraníme. Hád'átka lze zakoncentrovat postupy popsány níže.

Pro větší množství rostlinného materiálu doporučujeme použít metodu plavicích misek v kombinaci se sítovou metodou separace. Materiál připravíme obdobným způsobem jako v případě použití Baermannovy nálevky, na připravenou misku materiál navrstvíme a zakryjeme dalším ubrouskem ROTH, zalijeme vodou (voda z vodovodního řádu) a ponecháme v laboratorní teplotě po dobu 6-12 hodin. V tomto případě není vysoká mortalita spojená s anoxidací suspenze hád'átek problémem, velká plocha vody je totiž dostatečně okysličována. Hád'átka separujeme ze suspenze pomocí síta s průměry otvorů 0,025 mm (VÚSH).



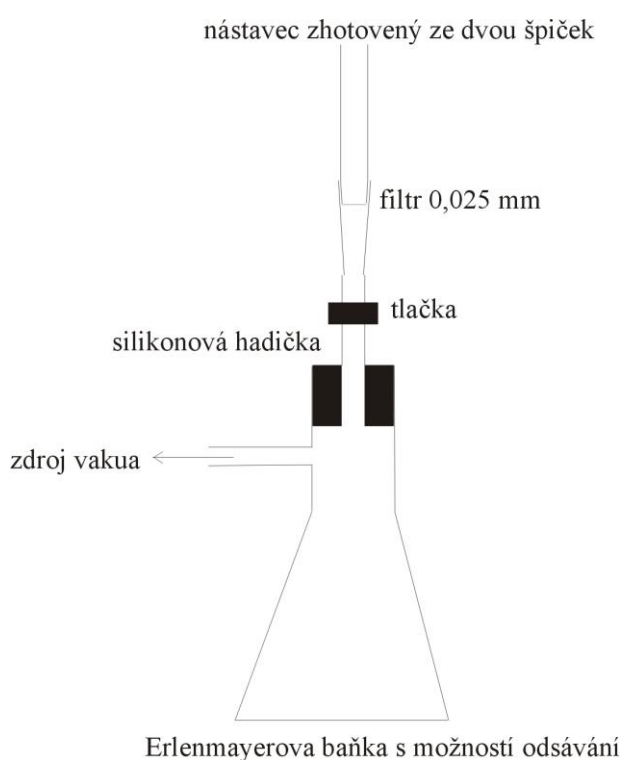
V průběhu sterilizačního procesu je nutné s hád'átkou v suspenzi šetrně manipulovat a to vždy s dodržением základních pravidel sterility prostředí, neboť cílem je sterilní suspenze hád'átek. Pro sterilizaci byly optimalizovány dva postupy. První z postupů je určen pro pracoviště vybavené centrifugou. Tento postup zaručuje snadnou a rychlou manipulaci s hád'átkou v procesu sterilizace. Prvním krokem je zvýšení koncentrace hád'átek v suspenzi a omezení tak vlivu vody jako ředidla sterilizačních roztoků. Suspenzi pipetujeme do 2 ml mikrozkupek centrifugujeme při 6000 g 5 minut. Hád'átka vytvoří dobře viditelný sediment na dne zkumavky. Supernatant je nutné šetrně odstranit a to bez rozrušení peletky. Při těchto hodnotách tíhového zrychlení se není nutné obávat poškození hád'átek. Dále pipetujeme vždy požadovaný sterilizační roztok a centrifugujeme ve stejných podmínkách. Při kalkulaci času na inkubaci v jednom ze sterilizačních roztoků je nutné inkorporovat i čas potřebný na centrifugaci. Všechny operace, kdy dochází k otevření mikrozkupek je nezbytné provádět ve sterilním prostředí a sterilními nástroji. Druhý postup je založen na principu filtrace suspenze hád'átek na připraveném mikrofiltru. Kolonku s filtrem lze snadno připravit z tkaniny s kalibrovanými otvory (0,025 mm silk&progres) a dvou seříznutých špiček pro

automatické pipety (1-5 ml). Filtr je opakovatelně použitelný a autoklávovatelný. Při této metodě odpadá krok zvýšení koncentrace hád'átek.

Sestavíme aparaturu odsávací erlenmaerovy baňky a filtru napojíme na zdroj vakua a při mírném vakuu odsáváme vždy když je dosaženo inkubačního času v daném sterilizačním roztoku. V posledním kroku je nutné homogenizovat suspenzi mícháním pomocí automatické pipety a to několikanásobným nasátím a vysátím obsahu filtru v jeho horní části. Suspenze hád'átek je pak odpipetována a použita pro inokulaci.

Sterilizace *D. dipsaci*:

1. Zvýšení koncentrace suspenze hád'átek.
2. 5x promýt ve sterilní destilované vodě po 5 minutách
3. 20 minut inkubovat v 0,01% HgCl_2 (Pozor pracovat dle pravidel práce uvedeném na bezpečnostním listu HgCl_2)
4. Propláchnout 3 x po 5 minutách v destilované vodě.



5. 20 minut streptomycin sulfát 1 % roztok
6. 1x propláchnou ve sterilní destilované vodě a ihned použít pro inokulaci.

Pro inokulaci lze použít suspenzi i v roztoku s streptomycin sulfátem. Pro stanovení vhodného počtu hád'átek v inokulu je vhodné po promíchání sterilní suspenze odebrat cca 20 μl a v tomto malém objemu hád'átka spočítat a přepočítat na celý objem. Inokulováno by mělo

být 80-150 jedinců na jednu rostlinu či kalus. Při inokulaci dodržujeme zásady sterilní práce. V případě inokulace celých rostlin lze doporučit stabilizaci suspenze hád'átek přidavkem cca 1% nasyceného sterilního roztoku dikarboxymethylcelulozy (P-lab K 37501). Suspenze je zahuštěna a je zajištěna její stabilita na listech rostliny.



Suspenze hád'átek *M. dipsaci*

Inokulované rostliny jsou umístěny zpět do růstového boxu. PO 10-20 dnech lze pozorovat příznaky na rostlinách ve formě tvarových změn a na kalusech pak odumírání napadených pletiv, která tmavnou. Takovéto kultury lze používat nejen jako rezervoár hád'átek, ale i pro studium jejich biologie a bionomie.



Příznaky *D. dipsaci* na rostlinách čekanky.



Příznaky *D. dipsaci* na rostlinách čekanky.



Kultivační box

2.3.2. *Meloidogyne hapla* chov v in vitro podmínkách

Hád'átka rodu *Meloidogyne* patří mezi kořenová, hálkotvorná hád'átka. Vytvořit in vitro systém pro jejich reprodukci tedy zohledňuje jejich biologických vlastností a to zejména princip navazování kompatibilního vztahu s hostitelskou rostlinou. V tomto případě lze za optimální variantu považovat kořenové explantáty, celých funkčních kořenů a nikoli

nediferenciované pletivo kalusu. Co se týče hostitelských rostlin a jejich výběru, v případě *M. hapla* lze doporučit rajče jedlé (*Lycopersicon esculentum*), je to celosvětově používaná, univerzální hostitelská rostlina pro hádátka rodu *Meloidogyne*. Při výběru odrůdy pro založení chovu je ovšem zapotřebí zohlednit aspekt případné rezistence zvolené odrůdy vůči hádátkům rodu *Meloidogyne*. Mezi takové rezistentní odrůdy patří např. odrůda Nema. Pro přípravu této metodiky byla zvolena odrůda Stupické polní rané.

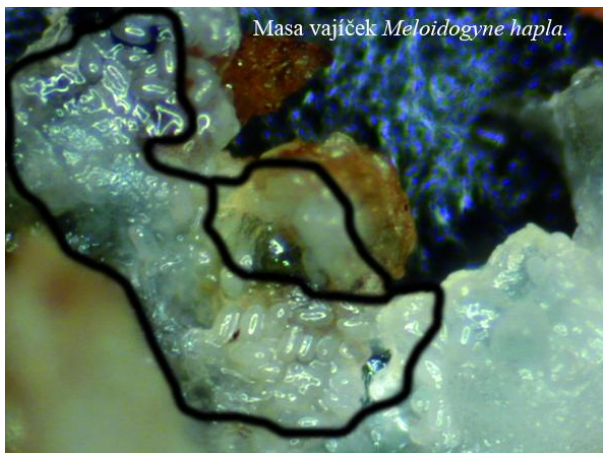
2.3.2.1. Příprava kompatibilních hostitelských rostlin v in vitro kulturách



Pro přípravu kořenových explantátů byla optimalizována následující technika. Sterilní semena hostitelské rostliny je vhodné vysévat přímo na iniciační médium (Gamborg Duchefa - G0209.0001) určené pro inicializaci a pěstování kořenových explantátů. Příprava je obdobná jako u MS. Doporučujeme použít malé (60 mm) petriho misky a cca 4-5 mm silnou vrstvu média, která zajistí dlouhodobou kultivaci bez nutnosti pasážování. Po vyklíčení jsou odstriženy základy nadzemních částí rostlin a hypokotylu, explantát kořenů je přesunut do tmy a inkubován jeden týden. V tomto stádiu jsou již vytvořeny postranní vlásečnicové kořínky a kultura je tedy připravená pro inokulaci. Výhodou rovněž zůstává schopnost přežívání kořenových explantátů po dlouhou dobu v upravených opodmínkách. Lze tedy připravit kořenové explantáty takříkajíc do zásoby. Po vytvoření postranních kořínků je možné snížit teplotu na 8-10 °C a uchovat tak připravené explantáty po dobu 2-3 měsíců ve fázi vhodné k inokulaci.

2.3.2.2. Extrakce, sterilizace hádátek a inokulace hostitelských rostlin

Na rozdíl od *D. dipsaci*, kde lze poměrně snadno získat pohyblivá stadia hádátek, je rod *Meloidogyne* kořenových bílkotvorných hádátek. V tomto případě je tedy nutné izolovat vajíčka či embryony. Za tímto účelem lze využít dvou technik. První z nich není rutinní, ale její zvládnutí zajišťuje dostatek kvalitního životaschopného inokula. Jedná se o sběr vaječných vaků přímo z kořenových hálek. Pod binokulární lupou hledáme vaječné vaky na suchých kořenových hálkách šetrně zbavených půdy. Očním skalpelem odstraňujeme části hálek společně s vaječnými vaky a umísťujeme je do mikrozkušavky s cca 20 µl vody. Takto připravené vaky vortexujeme 10 minut 1200 rpm.



Druhá metoda je rutinně zvládnutelná její aplikace ovšem vyžaduje centrifugaci poměrně velkých objemů (50-100 ml).

1. Infikované kořeny (hálky) 10 g umístíme do mixéru (běžný kuchyňský) a zalijeme 100 ml vody (voda z vodovodního řádu).
2. Mixujeme na maximální výkon 5 minut
3. Suspenzi pokud možno beze zbytku

převédeme do kádinky.

4. Do 50 ml uzavíratelných kyvet (falkonky- Orange Scientific) odměříme cca 5 ml kaolínu (Fluka-18672) a kyvetu doplníme připravenou suspenzí.
5. Intenzivně promícháme, tak aby došlo ke smísení kaolínu se suspenzí.
6. Centrifugujeme 2 minuty 2500g
7. supernatant odstraníme a do kyvety přidáme 40 ml 1M sacharózy
8. Peletu resuspendujeme lžičkou a intenzivním třepáním
9. Centrifugujeme 2 minuty 2500g
10. Supernatant obsahuje vajíčka, je nutné jej přefiltrovat přes síto o velikosti otvorů 0,025 mm.
11. Suspenze vajíček je připravena pro další použití.



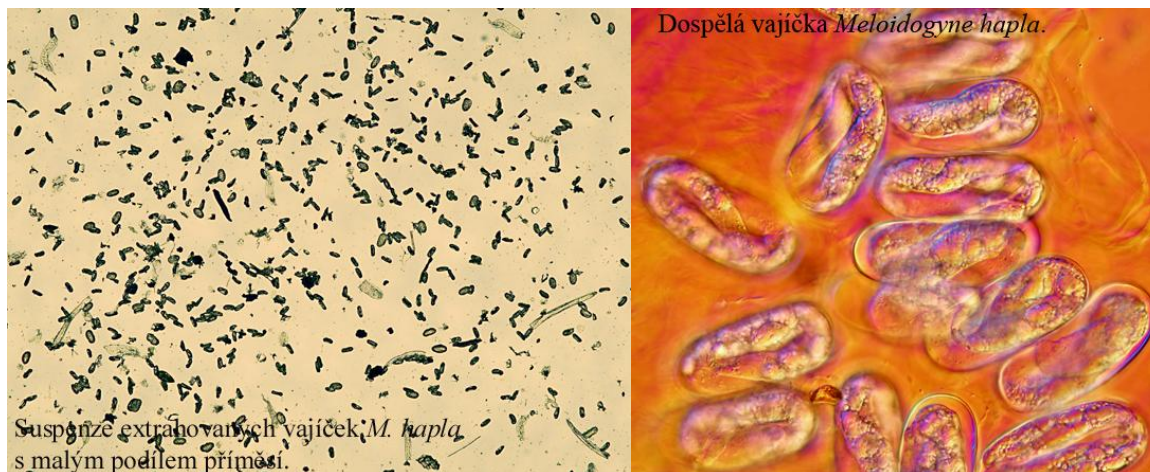
Homogenát kořenové hmoty pro izolaci vajíček *M. hapla*.



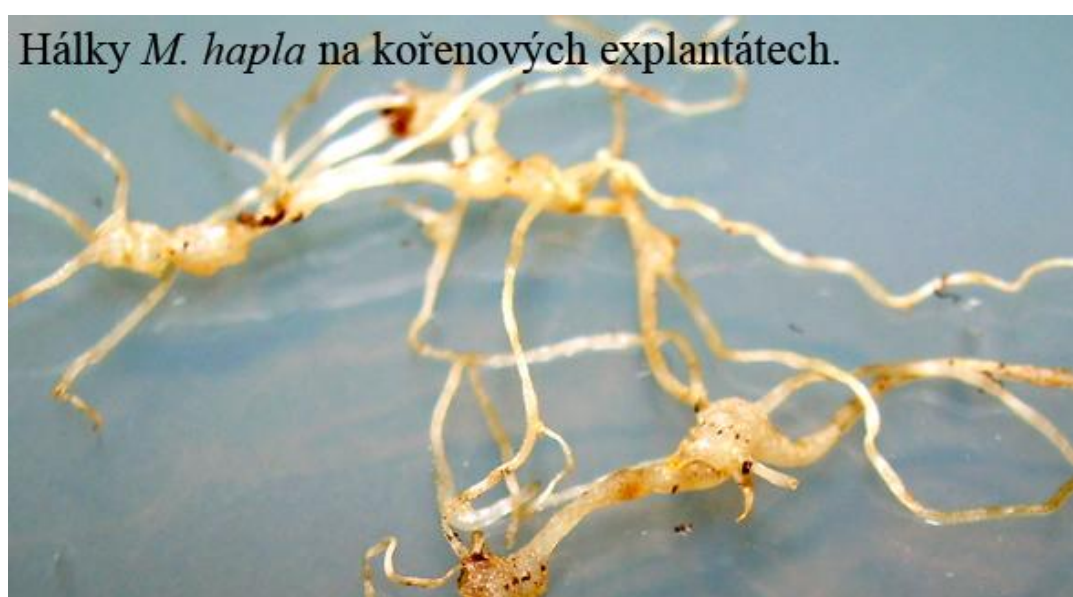
Homogenát resuspendovaný s kaolínem.



Suspenze po centrifugaci se sacharózou.



Izolovaná vajíčka jsou v různé fázi vývoje, je vhodné nechat vajíčka dospět a larvy vylíhnout. Pro tento postup je vhodné ponechat suspenzi vajíček při teplotě 25 °C po dobu 7-10 dní. Je ovšem nezbytné aerovat suspenzi a to minimálně jednou za dva dny přidavkem peroxidu vodíku a to do cílové koncentrace 0,1 %, za tímto účelem doporučujeme připravit 1% zásobní roztok H_2O_2 . Pro separaci larev druhého vývojového stadia a nedospělých vajíček je možné použít Baermannovu nálevku respektive její menší variantu, použitá nálevka pojme v tomto případě 10-20 ml suspenze, jako filtr je opět použita jedna vrstva ROTH ubrousku, na který je suspenze larev a vajíček opatrně nalita. Po 1-2 hodinách lze již bez potíží odpustit sedimentované larvy a použít je pro sterilizaci a inokulaci. Larvy háďátek rodu *Meloidogyne* lze sterilizovat obdobně jako *D. dipsaci*. I množství inokula lze volit v dimenzích 80-100 larev na jeden kořenový explantát. Inokulum je aplikováno ke kořenovým explantátům a ty jsou přemístěny zpět do růstového boxu. Za 2-3 týdny lze sledovat tvorbu hálek na koříncích a posléze i produkci nových vajíček. Tyto kultury lze používat nejen jako rezervoár háďátek, ale i pro studium jejich biologie a bionomie.



Vaječný vak na hálce v kořenoém explantátu.



Samička *Meloidogyne hapla* v kořenovém explantátu.

3. Srovnání „novosti postupů“

V předložené metodice jsou optimalizovány postupy přípravy rostlinných explantátů určených pro reprodukci výše uvedených druhů fytoparazitických hád'átek za účelem získání zdroje hád'átek pro další studium interakcí, biologie, bionomie. Jako novum lze označit funkční optimalizované metody extrakce nepohyblivých stadií hád'átek z kořenových hálek. Sterilizační postupy uváděné v této metodice jsou optimalizovány pro *D. dipsaci* a *Meloidogyne hapla*. Ve srovnání s publikovanými pracemi se jedná o postupy „de novo“. V neposlední řadě lze uvést, že v ČR se jedná o první práci tohoto druhu a rozsahu. Možnost přímé konzultace či získání praktických zkušeností na pracovišti poskytovatele je nejen možná, ale i žádoucí. Tato skutečnost dává dobré předpoklady pro využití metodiky v praxi.

4. Závěr

Tato metodika je určena pro organizace na území ČR zabývající se výzkumem či aplikací výsledků výzkumu do praxe a to na úrovni ochrany rostlin. Jedná se na prvním místě o Státní rostlinolékařskou správu, dále pak o Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví Průhonice. Metodika bude využita jako součást zavedených laboratorních postupů. V případě zájmu dalších organizací budou uzavřeny i další smlouvy o využití metodiky.

Poděkování

Autorský tým touto cestou děkuje studentům oboru rostlinolékařství, jmenovitě Janě Wenzlové a Janu Urbanovi za spolupráci při vývoji nových nematologických technik.

Seznam použité literatury

- Aumann J. (1997): Monoxenic Culture of *Xiphinema index* (Nematoda: Longidoridae) on *Ficus carica*. *Nematologia Mediterranea*, 25: 209-211.
- Brzeski M.W. (1998): Nematodes of *Tylenchina* in Poland and temperature Europe. Muzeum i Instytut Zoologii, Polska Akademia Nauk, Warszawa.
- Decker, H. (1969): Phytonematologie – Biologie und Bekämpfung Pflanzenparasität nematoden, VEB Detcher Landwirtschaftsverlag, Berlin, 526 p.
- Dougherty E.C. (1953): Problems of nomenclature for the growth of organisms of one species with and without associated organisms of other species. *Parasitology*, 42: 259-261.
- Dougherty, E.C. (1959): Introduction to axenic culture of invertebrate Metazoa: a goal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 77: 27-54.
- Erikson, K. B. (1965). Crossing experiments with races of *D. dipsaci* on callus tissue cultures. *Nematologica* 11: 244-248.
- Esquibet M., Bekal S., Castagnone-Sereno P., Gauthier J.P., Rivoal R., Caubel G. (1998): Differentiation of normal and giant *Vicia faba* populations of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: agreement between RAPD and phenotypic characteristics. *Heredity*, 81: 291–298.
- Esquibet M., Grenier E., Plantard O., Abbad Andaloussi F., Caubel G. (2003): DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: development of diagnostic markers for normal and giant races. *Genome*, 46: 1077–1083.
- Fassuliotis G., Bhatt D.P. (1982): Potential of Tissue Culture for Breeding Root-knot Nematode Resistance into Vegetables. *Journal of Nematology*, 14(1): 10-14.
- Faulkner L.R., Bower D.B., Evans D.W., Elgin JR. J.H. (1974): Mass Culturing of *Ditylenchus dipsaci* to Yield Large Quantities of Inoculum. *Journal of Nematology*, 6(3): 126-129.
- Giblin-Davis R.M., Gerber K., Griffith R.(1989): In Vivo and In Vitro Culture of the Red Ring Nematode, *Rhadinaphelenchus cocophilus*. *Nematropica*, 19(2): 135-142.
- Greco N., Brandonisio A., Boncoraglio P. (2002): Investigations on *Ditylenchus dipsaci* damaging carrot in Italy. *Nematologia Mediterranea*, 30: 139–146.
- Grisse de A. (1963): A counting dish for nematodes excluding border effect. *Nematologica*, 9: 162.
- Hall, R. D. (1995). The initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco. *Plant Tissue Culture Manual A2*. Kluwer Academic Publishers Netherlands. 55 p. ISBN 0-7923-2883-3.
- Hanounik S.B., Osborne W.W. (1975): Influence of *Meloidogyne incognita* on the content of Amino Acids and Nicotine in Tobacco Grown under Gnotobiotic Conditions. *Journal of Nematology*, 7(4): 332-336.
- Hiroda, T.; Yasuharu, M. (1975). Reproduction of *Bursaphelenchus lignicolus* on alfalfa callus tissues. *Nematologica* 21: 449-454.

- Hooper D.J. (1973): *Ditylenchus dipsaci*. Description of Plant – parasitic Nematodes Set 1, No. 14. Commonwealth Institute of Helminthology, 103 St. Peter's Street, St. Albans, Herts., England.
- Hooper D.J. (1986): Culturing nematodes and related experimental techniques. In: Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes, pp. 133-157. Ed. J.F. Southey. Her Majesty's Stationery Office, London.
- Janssen G.J.W. (1994): The relevance of races in *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev, the stem nematode. *Fundamental and applied Nematology*, 17(5): 469-473.
- Ko M.P., Schmitt D.P., Sipes B.S. (1996): Axenizing and Culturing Endomigratory Plant-Parasitic Nematodes using Pluronic F127, Including its Effects on Population Dynamics of *Pratylenchus penetrans*. *Journal of Nematology*, 28(1): 115-123.
- Ko M.P., Van Gundy S.D. (1988): An Alternative Gelling Agent for Culture and Studies of Nematodes, Bacteria, Fungi, and Plant Tissues. *Journal of Nematology*, 20(3): 478-485.
- Kováč, J. (1995). Explantátové kultury rostlin. Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc. 142 s.
- Krusberg L.R., Sardanelli S. (1984): Technique for Axenizing Nematodes. *Journal of Nematology*, 16(3): 348.
- Kühnhold V., Kiewnick S., Sikora R.A. (2006): Development of an in vivo bioassay to identify sugar beet resistance to the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Nematology*, 8(5): 641-645.
- Lawn L.A., Noel G.R. (1986): Gnotobiotic culture of *Pratylenchus scribneri* on carrot discs. *Nematropica*, 16(1): 45-51.
- Lowensbery, B. F.; Huang, C. S.; Johnson, R. N. (1967). Tissue culture and maintenance of the root-lesion nematode, *Pratylenchus vulnus*. *Nematologica* 13: 390-394.
- Lownsbury B.F., Lownsbury J.W. (1956): A procedure for testing the sterility of large numbers of nematodes after treatment with various sterilants. *Pl. Dis. Repr.*, 40: 989-990.
- Maehara, N., Hata, K., Futai, K. (2005): Effect of blue-stain fungi on the number of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) carried by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematology*, 2:161-167.
- Marek M., Zouhar M., Ryšánek P., Havránek P. (2005): Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. *Helminthologia*, 42: 49–56.
- McClure M.A., Kruk T.H., Misaghi I. (1973): A method for obtaining quantities of clean *Meloidogyne* eggs. *Journal of Nematology*, 5:230.
- Mende von N. (2000): Adventitious shoot formation induced by the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Plant Cell Reports*, 19: 497–499.

- Mitkowski N.A., Abawi G.S. (2002): Monoxenic maintenance and reproduction of root-knot nematode (*Meloidogyne hapla*) on multiple species in vitro root culture systems. *Plant Cell Rep.*, 21: 14-23.
- Moody, E. H.; Lowensbery, B. F. (1973). Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. *Journal of Nematology* 5(3): 225-226.
- Nico A.I., Vovlas N., Troccoli A., Castillo P. (1999): Reproduction of the Banana Root-Lesion Nematode, *Pratylenchus goodeyi*, in Monoxenic Cultures. *Nematologia Mediterranea*, 31(2): 265-270.
- Plowright R.A., Caubel G., Mizen K.A. (2002): *Ditylenchus* Species Plant Resistance to Parasitic Nematodes—CAB International.
- Riedel R.M., Foster J.G., Mai W.F. A Simplified Medium for Monoxenic Culture of *Pratylenchus penetrans* and *Ditylenchus dipsaci*. *Journal of Nematology*, 5(1): 71-72.
- Riedel, R. M.; Mai, W. F. (1971). A comparison of pectinases from *Ditylenchus dipsaci* and *Allium cepa* callus tissue. *Journal of Nematology* 3(2): 174-178.
- Rössner, J. (1971). Sterile culture of plant parasitic nematodes in a hermetically sealed glass container. *Nematologica* 17: 320.
- Siddiqi Mohammad Rafiq. Tylenchida Parasites of plants and insects. 2nd edition. Wallingford: CABI publishing, 2000. 833 p. ISBN 0-85199-202-1
- Southey, J.F. Laboratory Methods for Work with Plant Soil Nematodes. London: Her Majesty's Stationery Office, 1985. 202 p.
- Spiegel Y., Burrows P.M., Bar-Eyal M. (2003): A Chemo Attractant in Onion Root Exudates Recognized by *Ditylenchus dipsaci* in Laboratory Bioassay. *Phytopathology*, 93: 127-132.
- Subbotin S. A., Madani M., Krall E., Sturhan D., Moens M. (2005): Molecular Diagnostics, Taxonomy, and Phylogeny of the Stem Nematode *Ditylenchus dipsaci* Species Complex Based on the Sequences of the Internal Transcribed Spacer-rDNA. *Phytopathology*, 95: 1308–1315.
- Sudirman, Webster J.M. (1995): Effect of Ammonium Ions on Egg Hatching and Second-Stage Juveniles of *Meloidogyne incognita* in Axenic Tomato Root Culture. *Journal of Nematology*, 27(3): 346-352.
- Supramana S., Lewis S.A., Mueller J.D., Fortnum B.A, Ballard R.E. (2001): Biology of Columbia Lance Nematode (*Hoplolaimus Columbus*) on Soybean Excised Root Culture. *Nematropica*, 31(2): 281-288.
- Taylor, A. L. (1971): Introduction to research on plant nematology (An FAO guide to the study and control of plant parasitic nematodes), FAO, Rome, Italy, 134p.
- Vanfleteren J.R. (1978): Axenic Culture of Free-living, Plant-parasitic and Insect-parasitic Nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 16: 131-157.

- Verdejo, L. S.; Pinochet, J. (1992). Popular densities of five migratory endoparasitic nematodes in carrot disk culture. *Journal of Nematology* 24(1): 96-98.
- Viglierchio D.R., Siddiqui I.A., Croll N.A. (1973): Culturing and Population Studies of *Ditylenchus dipsaci* under Monoxenic Conditions. *Hilgardia*, vol. 42, no. 6.
- Wendtová K.R., Swartová A., Vrain T.C., Webster J.M. (1995): *Ditylenchus africanus* sp. n. from South Africa; a morphological and molecular characterization. *Fundam. appl. Nematol.*, 18 (3): 241–250.
- Yue Wu, Jenkins T., Blunden G., von Mende N., Hankins S. D. (1998): Suppression of fecundity of the rootknot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with an alkaline extract of *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology*, 10: 91–94.
- Zouhar M., Ryšánek P., Tesařová B., Marek M. (2002): Metodická příručka pro diagnostiku karanténních háďátek rodů *Globodera*, *Meloidogyne* a *Ditylenchus*. ČZU Praha.

5. Doplnující údaje dle vzoru NAZV

Identifikační kód výsledku a jeho název v českém a anglickém jazyce: S

Axenizace fytoparazitických háďátek rodů *Ditylenchus* a *Meloidogyne* a jejich chov v in vitro podmínkách (Metodika pro praxi). Axenization of the phytoparasitic nematodes of the genera *Ditylenchus* and *Meloidogyne* and their cultivation under in vitro conditions (Methods for praxis).

Identifikační kód projektu, jehož řešením výsledek vznikl: QG50087

Základní údaje podle § 2 odst. 1 písm. b):

Česká zemědělská univerzita se sídlem Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, zřízená vládním nařízením č. 30/1952 Sb., o změnách v organizaci vysokých škol a registrována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy podle § 36 odst. 2 zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), dne 16. února 2007 pod č.j. 4 991/2007-30. IČO: 60460709, DIČ: CZ60460709, www.czu.cz; hron@pef.czu.cz

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. se sídlem Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, zřízený Ministerstvem zemědělství ČR, v souladu se zákonem č. 341/2005 Sb., o veřejných výzkumných institucích, zřizovací listinou pod č.j.: 22968/2006-11000, ze dne 23. 6. 2006, IČ: 00027006, DIČ: CZ00027006, <http://www.vurv.cz/>; [cropscience@vurv.cz](mailto:cropsscience@vurv.cz)

Počet autorů, z toho počet tvůrců v pracovněprávním vztahu k příjemci: 2(2)

Jména, příjmení tvůrců: Miloslav Zouhar, Ondřej Douša

Výčet jmen tvůrců ve formě uvedené v publikaci: Miloslav Zouhar, Ondřej Douša

Druh výsledku: UM (uplatněná metodika) - S

Popis výsledku v českém a anglickém jazyce: Výsledek popisuje metody chovu fytoparazitických háďátek rodů *Ditylenchus* a *Meloidogyne* v in vitro podmínkách. The result depicts the methods of in vitro cultivation of phytoparasitic nematodes of the genera *Ditylenchus* and *Meloidogyne*.

Obor výzkumu a vývoje: GF

Údaje o uplatnění výsledku podle § 31 odst. 6 zákona: rok uplatnění 2007

Stupeň důvěrnosti údajů: S

**Název: Axenizace fytoparazitických háďátek rodů *Ditylenchus* a *Meloidogyne* a jejich chov v in vitro podmínkách
(Metodika pro praxi)**

Autoři: Zouhar M., Douda O.

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Povoleno: Děkanátem AF

Tisk: Edward Fencel - Logus, Matjuchinova 1218, Praha 5

Náklad: 30

Počet stran: 31

Doporučená cena: 150,- Kč

Vydání: první

Rok vydání: 2007

ISBN: 978-80-213-1767-3