

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Diagnosticke významných hád'átek rodu
Bursaphelenchus
(metodika pro potřebu praxe)

Kolektiv autorů

2007

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Diagnostika významných háďátek rodu *Bursaphelenchus*

(metodika pro potřebu praxe)

Kolektiv autorů:

Miloslav Zouhar

Vladimír Gaar

Jana Mazáková

Pavel Ryšánek

Martin Marek

2007

Tato metodika vznikla s podporou prostředků grantu NAZV QF 4156 a výzkumného záměru
ČZU v Praze MSM 6046070901.

Recenzoval: Ing. Ondřej Douša

ISBN:978-80-213-1613-3

Obsah

1.	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	2
2.	TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ.....	3
3.	HISTORIE	4
4.	BIOLOGIE A BIONOMIE.....	4
5.	PŘENOS HÁĐÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i>	6
6.	HOSTITELSKÝ OKRUH	8
7.	PŘÍZNAKY NAPADENÍ.....	8
8.	ROZŠÍŘENÍ.....	10
9.	HOSPODÁŘSKÝ VÝZNAM	11
10.	OCHRANA ROSTLIN PROTI <i>B. XYLOPHILUS</i>	12
11.	MONITORING VÝSKYTU	13
11.1.	ODBĚR VZORKŮ DŘEVA	13
11.2.	SBĚR BROUKŮ	15
11.3.	EXTRAKCE HÁĐÁTEK.....	17
12.	METODY DIAGNOSTIKY NA ÚROVNI MORFOLOGICKÝCH A ANATOMICKÝCH CHARAKTERISTIK.....	18
12.1.	ZÁKLADNÍ MORFOLOGICKO-ANATOMICKÉ CHARAKTERISTIKY HÁĐÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i>	20
13.	METODY DIAGNOSTIKY NA ÚROVNI NUKLEOVÝCH KYSELIN	31
13.1.	ZÁKLADNÍ INFORMACE O METODÁCH IZOLACE DNA.....	31
13.2.	ZÁKLADNÍ INFORMACE O ANALÝZE NUKLEOVÝCH KYSELIN POMOCÍ PCR.....	32
13.3.	RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ	34
13.4.	AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA A VIZUALIZACE PRODUKTŮ PCR.....	35
13.5.	DETEKCE A DETERMINACE <i>BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS</i> , <i>B. VALLESIANUS</i> A <i>B.</i> <i>MUCRONATUS</i>	36
13.5.1.	IZOLACE DNA	36
13.5.2.	ROZLIŠENÍ <i>B. XYLOPHILUS</i> , <i>B. MUCRONATUS</i> A <i>B. VALLESIANUS</i> NA ÚROVNI RDNA POMOCÍ PCR RFLP	38
	ZÁVĚR.....	42
	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY.....	43

1. Úvod do problematiky

Diagnostika organismů, jejichž životní cyklus je úzce propojen s dalšími vyššími organismy a jejichž velikost často dosahuje jen několik desetin milimetru, je bezesporu obtížným úkolem. Mezi takovéto organismy patří i fytoparazitická hád'átka. Hád'átka, která mají schopnost přetrvat na pozemku několik let, způsobují svojí přítomností ekonomické ztráty a přímý zásah proti nim není z ekologických či ekonomických důvodů možný. Pak je včasná a přesná diagnostika a následná karanténa jedinou možností, jak zamezit rozšíření karanténního organismu do jiných lokalit.

Klasické způsoby diagnostikování hád'átek vycházejí z morfologické stavby. Měření různých tělesných rozměrů pomocí světelného mikroskopu je tedy jednou nikoliv však jedinou možností jak diagnostikovat hád'átka. Lze použít morfologických znaků stejně tak, jako různých biochemických charakteristik. Každá změna v morfologii by měla mít nějaký základ v genomu. Nukleové kyseliny jsou bezesporu základem pro exprimované proteiny a další makromolekuly, které se podílejí na stavbě těla hád'átka. Genom organismu je bohatou studnicí informací o jeho evoluci i o jeho současném stavu. Složitost struktury genomu dává podnět ke hledání sekvencí vhodných pro diagnostiku a tedy sekvencí charakterizujících určitou taxonomickou jednotku.

V této práci jsou popsány některé metody, které lze použít pro diagnostiku hád'átek rodu *Bursaphelenchus*. Důraz byl kladen zejména na několik základních druhů jejichž přítomnost v ČR je z geografického rozšíření nejen možná, ale v některých případech i potvrzená.

V posledních letech dochází v porostech borovic na území ČR k poměrně častému a náhlému vadnutí a usychání stromů. Spektrum činitelů, které se mohou podílet na tomto jevu je poměrně široké. Častý nedostatek vláhy, s ním spojené oslabení stromů, nejrozličnější mykózy, poškození stromů dřevokaznými brouky a v neposlední řadě globální znečištění ovzduší a s ním související kyselé deště, to vše může a bezesporu má vliv na odumírání porostů borovic v ČR. Nelze vyloučit ani dalšího z důležitých činitelů, který v posledních letech ovlivňuje mínění široké odborné i vědecké veřejnosti v zemích nejen EU. *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer, 1934) Nickle, 1970, česky nazývané hád'átka borovicové, je podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č.330/2004 Sb., v platném znění, řazeno mezi škodlivé (karanténní) organismy. Toto hád'átka je zakázáno zavlékat do České republiky a šířit na tomto území.

B. xylophilus poškozuje pletiva v dřevních částech borovic a většiny dalších druhů jehličnanů. Současným působením obrovského množství jedinců hád'átka se drasticky mění evapotranspirační režim rostliny, což se navenek projevuje usycháním jehlic a celkovým vadnutím stromu vedoucím často k jeho rychlému odumření (řádově v několika měsících). Tento soubor symptomů je celosvětově označován jako PWD (Pine Wilt Disease), chřadnutí borovic. Ještě jedna skutečnost patří za zmínku a tou je přenos hád'átek. Životní cyklus hád'átek rodu *Bursaphelenchus* je úzce spjat s jejich vektory, jedná se o některé druhy brouků z podčeledi Lamiinae. Kombinace nebezpečného fytoparazita s dokonalým vektorem, schopným přenášet ho na velké vzdálenosti a připravit optimální podmínky pro navázání kompatibilního vztahu s hostitelem, nemůže zůstat bez povšimnutí. V ČR předpokládáme výskyt *B. mucronatus* a byl zde potvrzen i výskyt *B. vallesianus*. Biologie a bionomie těchto dvou druhů je velmi podobná a v mnoha aspektech stejná jako u *B. xylophilus*. Tento fakt hraje důležitou roli v diagnostice, neboť v rámci monitoringu můžeme narazit i na tyto nekaranténní druhy. V této práci je kladen důraz na rozlišení těchto dvou druhů od karanténního druhu *B. xylophilus*, jejichž záměna by měla z hlediska eradikačních postupů fatální důsledky pro porosty borovic ČR.

2. Taxonomické zařazení

Hád'átka rodu *Bursaphelenchus* jsou řazena do taxonomického systému takto:

- Třída: SECERNENTEA
- Podtřída: DIPLOGASSTERIA
- Řád: APHELENCHIDA
- Podřád: APHELENCHINA
- Čeleď: PARASITAPHELENCHIDAE
- Podčeleď: BURSAPHELENCHINAE
- Rod: *Bursaphelenchus*
- Druh:
 - *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer, 1934) Nickle, 1970
 - *Bursaphelenchus mucronatus* Mamya and Enda, 1979
 - *Bursaphelenchus vallesianus*

(Hunt, 1993)

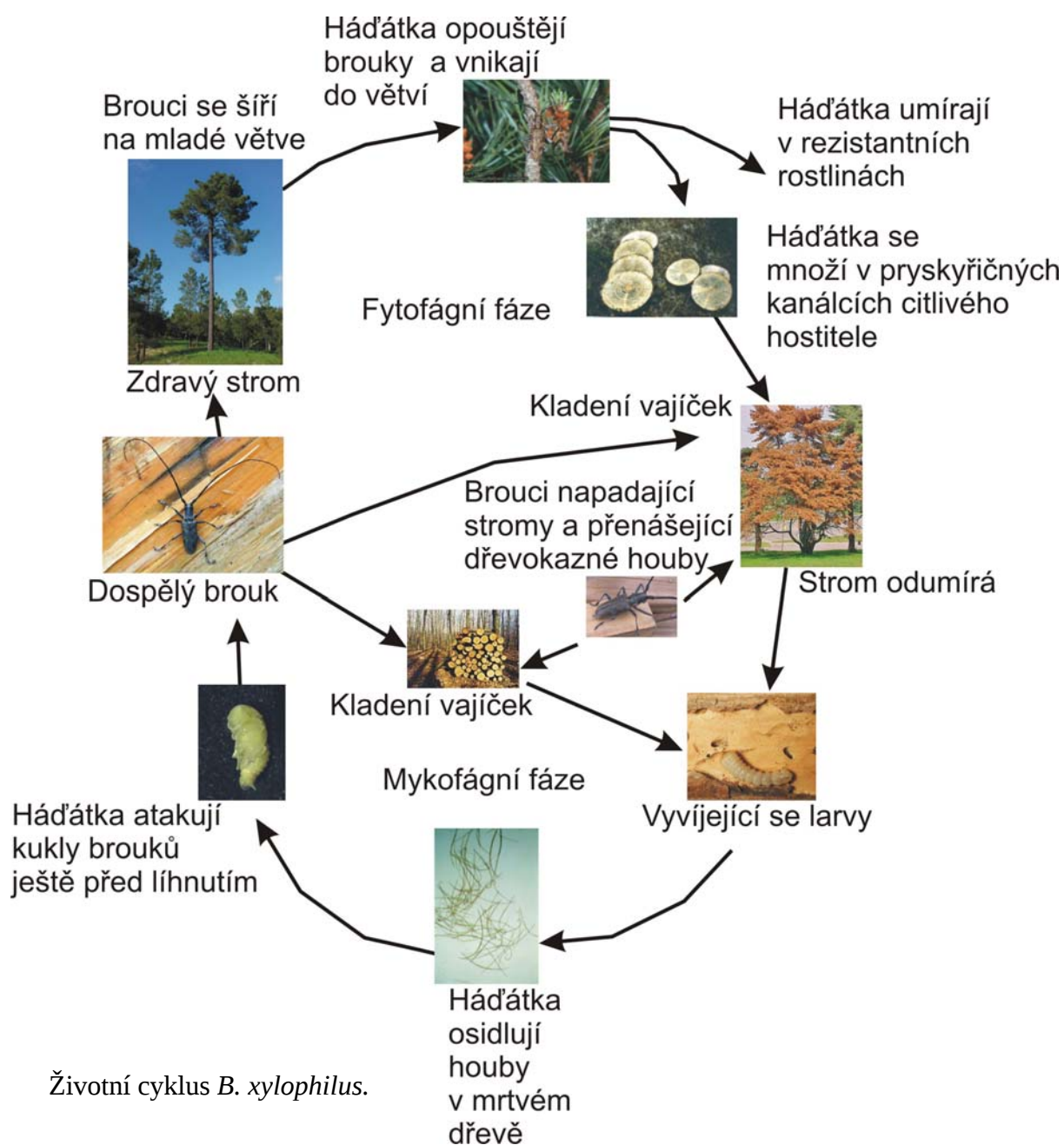
3. Historie

Odumírání borovic bylo poprvé popsáno v Japonsku v roce 1905. Jakmile se háďátka způsobující PWD dostala do Japonska, došlo k rozsáhlému epidemickému šíření a pochopitelně ničení borovicových porostů (*P. densiflora*, *P. thunbergii*) pro Japonsko tak typických. Jako agens podílející se majoritně na vzniku tohoto onemocnění byla háďátka identifikována až roku 1971. (Mamiya and Kiyohara 1972). Postupem času bylo zjištěno, že druh *B. xylophilus* pochází ze Severní Ameriky. Předpokládaný zdroj *B. xylophilus* pro Japonsko jsou Spojené státy americké, kde bylo toto háďátko popsáno poprvé v roce 1934 jako jeden z mnoha parazitů dřeva borovic (Steiner and Buhrer 1934). V polovině 80. let jsou již známy další asijské země, v nichž je výskyt *B. xylophilus* prokázán (Taiwan 1985, Čína a Jižní Korea 1989) (Li at al., 1983). V roce 1999 byl zaznamenán výskyt i v Portugalsku (Mota et al., 1999), což byl jeden z impulsů pro EPPO, které se vyslovilo pro zavedení *B. xylophilus* jako karanténního objektu do standardů EPPO.

4. Biologie a bionomie

Háďátka *B. xylophilus* má dva různé typy životního cyklu – mykofágní a fytofágní. V obou případech jsou háďátka přenášena z jednoho hostitele na druhého hmyzími vektory z podčeledi Lamiinae. V mykofágním (propagativním) životním cyklu jsou přenášeny larvy 4. stádia háďátka na nedávno odumřelé nebo odumírající stromy během kladení vajíček samicemi vektora. Háďátka opouštějí vektora a vstupují do hostitele otvory v kůře a lýku, vykoušanými vektorem pro kladení vajíček. Uvnitř stromu se háďátka živí dřevem nebo hyfami přítomných hub. Po svlékání se mění v dospělce a samičky po spáření začínají klást vajíčka. Populační dynamika tohoto druhu je úžasná. Dochází k rychlé multiplikaci háďátek, vzniká směs všech vývojových stádií. Háďátka zaplňují veškerý životní prostor, který jim dřevo poskytuje. Těsně před dobou výletu brouků (vektorů) se háďátka vyvynou ve zvláštní typ larvy čtvrtého stádia, nazývaný dauerlarva (typ semiklidového stádia známý zejména u střevních parazitů drobných přežvýkavců, např. rod *Trichostrongylus*) a shromažďují se na vrcholcích perithécií hub, jež pronikají do komůrek s kuklami brouků. Když se mladý brouk vylíhne a o tyto plodnice otře, nabere na sebe kromě nich i háďátka. Ta se postupně usadí pod jeho krovkami a částečně i ve vzdušnicích. Brouk i s háďátkou nakonec dřevo opouští. Ve fytofágním (disperzním) životním cyklu jsou háďátka přenášena mladými dospělci brouka na

mladé výhonky borovic. Háďátka vstupují do výhonků ranami po žíru. V mladých borovicových výhoncích se *B. xylophilus* množí ve smolných kanálcích. Asi po 3 týdnech se začnou na stromě projevovat první příznaky (usychání), způsobené úbytkem produkce pryskyřice a strom se stává atraktivním pro dospělé brouky. V této době lze pozorovat počátek intenzivního vadnutí a žloutnutí jehlic. V teplejších oblastech strom odumírá již 30-40 dní po infekci a může obsahovat až milióny háďátek. Zbytek tohoto životního cyklu je podobný výše popsanému mykofágárnímu způsobu tím, že háďátka vyhledávají okolí kukly těsně před výletem dospělého brouka. Během podzimu přestává být *B. xylophilus* aktivní. Zimu přežívá v živém i odumřelém dřevě. Vývojový cyklus háďátka je poměrně rychlý. V závislosti na teplotě trvá při 15 °C 12 dnů, při 20 °C 6 dnů a při 30 °C pouhé 3 dny. Samice



začínají klást vajíčka od čtvrtého dne. Líhnutí larev nastává při 25 °C za 26-32 hodin. Spodní teplotní hranice vývoje je 9,5 °C. Poměrně komplikovaný životní cyklus je zárukou dobrého přežívání háďátek v různých biotopech a snadného přemístění na další neexponované lokality.

5. Přenos háďátek rodu *Bursaphelenchus*

V pletivech dřeva se mohou háďátka aktivně pohybovat a dostávají se z jedné části dřeva do druhé. Byl prokázán jak vstup háďátek ze zamořeného do nezamořeného bezprostředně sousedícího hranolu dřeva, tak i proniknutí z kořenů stromu napadeného do kořenů zdravého stromu přímým kontaktem kořenů.

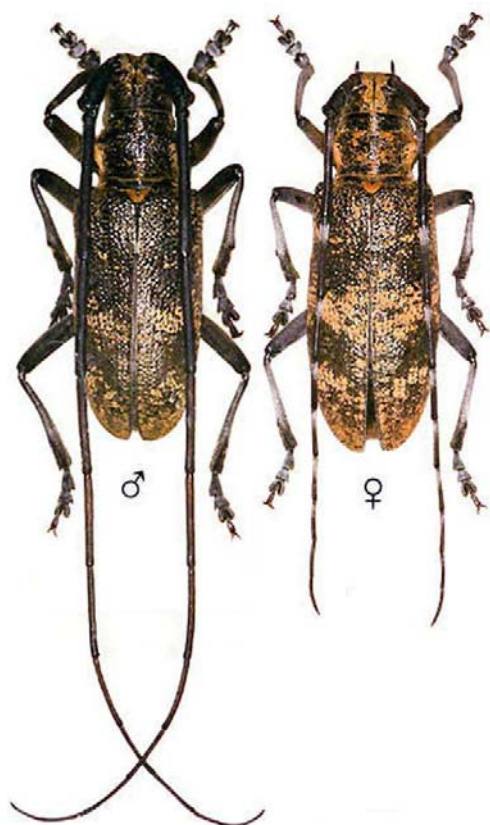
Podstatný pro šíření háďátek je ale pasivní způsob. Foretický vztah háďátka - brouk byl zjištěn celkem u 21 druhů z čeledi *Cerambycidae*, 2 druhů z čeledi *Curculionidae* a jednoho druhu z čeledi *Buprestidae*. Nejvýznamnější z přenašečů patří do rodu *Monochamus*. V Severní Americe byl přenos háďátek prokázán u druhů *Monochamus carolinensis*, *M. marmorator*, *M. mutator*, *M. obtusus*, *M. scutellatus* ssp. *scutellatus*, *M. tittillator*, v palearktické oblasti *M. alternatus*, *M. galloprovincialis*, *M. nitens*, *M. saltuarius*, *M. sutor*.

V ČR bylo zjištěno celkem 5 druhů rodu *Monochamus*, tři z nich patří mezi druhy, u kterých byl přenos háďátka prokázán (*M. galloprovincialis*, *M. saltuarius* a *M. sutor*). Dále pak byla potvrzena schopnost přenosu háďátka broukem *Acanthocinus griseus*, jehož výskyt na celém území Evropy a části Asie dává dobrý předpoklad pro zavlečení tohoto háďátka na další neexponované lokality.

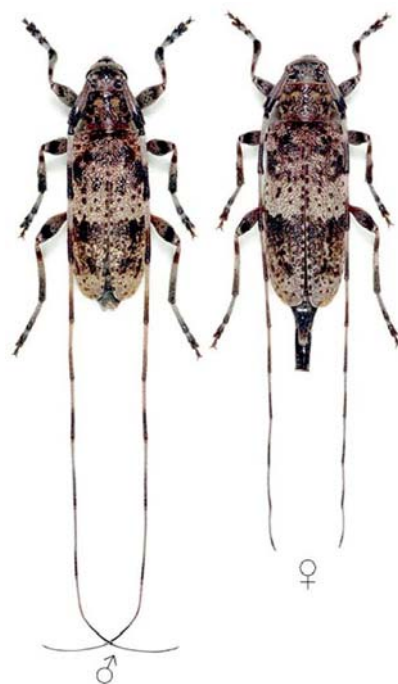


Monochamus sutor (Linnaeus, 1758)

Photo © M.Hoskovec



Monochamus galloprovincialis pistor
(Germar, 1818)
Photo © M.Hoskovec



Acanthocinus griseus (Fabricius, 1792)
Photo © M.Hoskovec

Bez přenašečů nejsou až na zanedbatelné výjimky háďátka schopna dostat se z jednoho hostitelského stromu na druhý. Dospělci brouků-vektorů mohou aktivně létat a vrcholu své letové aktivity dosahují asi 5 dní po opuštění stromu. Bylo zjištěno, že brouci jsou schopni s pomocí větru překonat vzdálenost až tři a výjimečně i více kilometrů. Ve většině případů se ale rozlétnou jen do okruhu několika stovek metrů (Davis et al., 2003).

Mezinárodní doprava napadeného dřeva je nejpravděpodobnějším zdrojem šíření háďátka *B. xylophilus*. Tento druh byl zachycen v řadě případů v řezivu, kulatině a hoblinách dovážených do Evropy z USA, Kanady a řady asijských států. Háďátka přicházejí do kontaktu s přirozeným vektorem nejspíš, tak že se dostávají do dřeva, které larvy či kukly přenašeče již obsahuje. Háďátka mohou poměrně velmi rychle opustit hobliny či piliny a pokud tento materiál přijde do styku se zbytky stromů či nařezanými poleny, může dojít ke spojení s vektorem. Vysoce rizikový zdroj zavlečení představují dřevěné palety a podkladové dřevo při přepravě jakéhokoli materiálu.

Jedním z možných způsobů zavlečení hád'átka borovicového je jeho import společně s hmyzími přenašeči. Čím větší jsou kusy dřeva, tím větší je pravděpodobnost, že hmyz přežije, a proto kulatina a řezivo představují větší riziko než např. dřevěné drtiny. Ty sice mohou mít vysoký obsah vlhkosti, dovolující hád'átku přežít například mykofágním způsobem, ale jejich zpracování možnost přežití vektorů snižuje.

6. Hostitelský okruh

Hlavní hostitelskou rostlinou hád'átka je rod borovice (*Pinus* spp.). Mezi zvlášť náchylné druhy patří *P. sylvestris*, *P. nigra*, *P. thunbergii*, *P. densiflora*, *P. pinaster*, *P. luchuensis*, *P. radiata*, *P. lambertiana*, *P. echinata*. Přestože jako hostitelé mohou kromě druhu *Thuja plicata* sloužit prakticky veškeré jehličnany, zprávy o jejich poškození jsou vzácné. V podmínkách Evropy je nejohroženějším druhem *P. sylvestris* na severu a *P. pinaster* na jihu kontinentu. Borovice jsou hlavními hostiteli i pro druhy tesaříků rodu *Monochamus*, kteří mohou být i v podmínkách ČR vektory těchto hád'átek (Evans et al. 1996).

7. Příznaky napadení

Primárním příznakem napadení stromu hád'átky je pokles produkce pryskyřice. Transpirace v jehlicích klesá a později ustává úplně. Brzy se dostavují první vnější příznaky, jako jsou žloutnutí a vadnutí jehlic, které vedou až k úplnému odumření stromu. Vadnutí se může zpočátku objevit jen na jedné větvi (tzv. „praporec“), poté postupně zachvátí celou korunu stromu. Lokalizace příznaků je závislá na napadení vektory. Při vzniku viditelných příznaků zpravidla v koruně stromu nemůžeme počítat s výskytem hád'átek v kmeni stromu, je tedy nutné přizpůsobit metodu monitoringu vzhledem k intenzitě a lokalizaci příznaků. Podle pozorování v Portugalsku stromy napadené hád'átky zpravidla odumírají během jediné sezóny. Lze tedy předpokládat, že i v ostatních regionech EU bude nástup a průběh infekce podobný. Brouci rodu *Monochamus* napadají zejména poražené nebo oslabené stromy. Jejich larvy vytvářejí v bělovém dřevě pod kůrou rýhy a provrtávají ve dřevě chodby. Přítomnost vektorů na lokalitě a příznaky jejich žíru mohou být rovněž nepřímým důkazem přežívání hád'átek rodu *Bursaphelenchus*.



Příznaky postupného chřadnutí borovic v ČR.

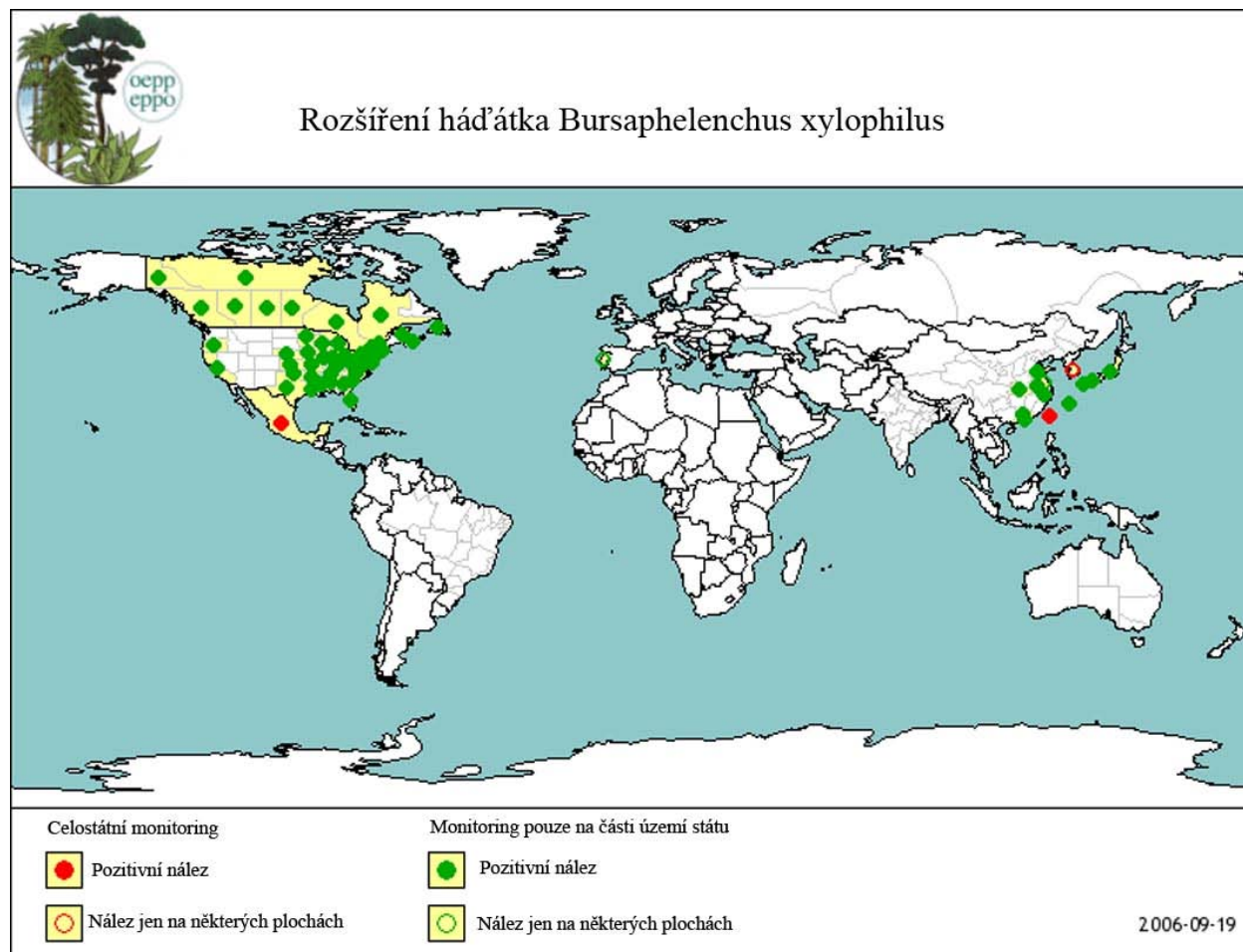


Příznaky postupného chřadnutí borovice napadené *B. vallesianus* v ČR.

8. Rozšíření

Háďátko borovicové *B. xylophilus* (PWN –Pine Wood Nematode) pochází ze Severní Ameriky, odkud bylo počátkem 20. století zavlečeno spolu s napadeným dřevem na japonský ostrov Kjúšú. Z Japonska se háďátko rozšířilo do dalších asijských zemí (Čína, Hong Kong, Jižní Korea, Tchaj-wan). V Evropě se háďátko vyskytuje na omezeném území v Portugalsku (oblast poloostrova Setúbal), kde bylo jeho zavlečení zjištěno v r. 1999. PWN bylo rovněž několikrát zachyceno v dovážených zásilkách, pocházejících zejména z Číny, popř. Severní Ameriky (Kanada, USA). Zpravidla šlo o přepravní palety či podkladové dřevo. S ohledem na přítomnost hostitelů, vektora i oblastí s vhodným klimatem je introdukce a další rozšiřování háďátka borovicového v rozmanitých podmínkách Evropy možné. Šíření háďátka podporují též horká léta, nejvíce jsou proto ohroženy jižní oblasti kontinentu. Usychání borovic vlivem

nedostatku vláhy či poškození mykózami má za důsledek atrakci vektorů, kteří mohou zavléci na nové lokality i háďátka rodu *Bursaphelenchus*.



9. Hospodářský význam

Odumírání borovic bylo poprvé popsáno v Japonsku již v r. 1905. V té době byl pozorován neobvykle silný výskyt brouků *Monochamus alternatus* a odumírání borovic bylo přičítáno na jejich vrub. Poznání, že hlavním původcem odumírání je háďátko, se datuje až od roku 1971. Po introdukci se háďátko začalo šířit z oblasti Nagasaki na sever a působit na tamních druhích borovic značné ztráty. Na konci 40. let dvacátého století bylo zničeno více než 10 miliónů kubických metrů dřeva ročně, v 90. letech byly ztráty v Japonsku dokonce dvojnásobné. Kromě nejsevernějšího ostrova Hokkaidó je dnes háďátkem postiženo celé Japonsko (Mehara et al., 2005). V USA je toto háďátko významné zejména na druhu *P. sylvestris* a na dalších, pro tuto oblast exotických, druhích jehličnanů. V přirozených jehličnatých lesích je háďátko *B. xylophilus* široce rozšířeno, ale významné ztráty nezpůsobuje. Larvy brouků rodu *Monochamus* mohou způsobit ekonomické ztráty na

poražených stromech vytvářením chodbiček ve dřevě. To je však běžný příznak u dřeva ponechaného v lese dlouhou dobu po poražení stromu a brouci tohoto rodu nejsou sami o sobě v dnešní době obecně považováni za vážné škůdce. Jejich hlavní ekonomický význam spočívá ve schopnosti přenášet hád'átka *B. xylophilus*. K velkému hospodářskému významu v oblastech EU hovoří i údaje o eradikaci tohoto hád'átka na území Portugalska z posledních let (Suzuki 2002, Penas et al., 2004). I přes velkou snahu o ohraničení území s výskytem PWD každoročně dochází k rozšiřování napadeného území. Tato skutečnost úzce souvisí i s ekonomickými důsledky gradace populace PWN, eradikace tohoto druhu není samozřejmě možná bez likvidace porostů borovic.

10. Ochrana rostlin proti *B. xylophilus*

Účinná a jednoduchá ochrana proti hád'átku *B. xylophilus*, již jednou přítomném ve dřevě, dosud neexistuje. Ochrana proti vadnutí borovic v Japonsku se proto soustřeďuje na kombinaci kultivačních praktik, důsledné a včasné odstraňování odumřelých či odumírajících stromů z lesa a na boj proti broukům–přenašečům pomocí insekticidů. Pokračuje hledání způsobů biologického boje proti oběma škůdcům. Slibné výsledky a vysokou účinnost vykazuje vyšlechtění rezistentních klonů rodu *Pinus*, popř. získání indukované rezistence inokulací stromů nepatogenními kmeny hád'átka *B. xylophilus* (Matsunaga and Togashi 2003, Togashi and Matsunaga 2003, Kosaka et al., 2001). Jako preventivní opatření se doporučuje úplný zákaz dovozu všech forem dřeva prakticky všech druhů jehličnanů ze zemí s výskytem tohoto hád'átka. Lze však připustit dovozy, uskutečněné po umělém dosušení dřeva, kdy všechny jeho části byly podle mezinárodního standardu ISPM 15 vystaveny teplotě alespoň 56 °C po dobu nejméně 30 minut. Veškerý dřevěný obalový materiál sloužící k přepravě zboží všeho druhu a dovážený do členských států EU ze třetích zemí s výjimkou Švýcarska musí být podle tohoto standardu ošetřen a označen. V některých státech je dosud povolena fumigace metylbromidem nebo metylizothiokyanátem. Ve stádiu zkoušek je ošetření dřeva mikrovlnným zářením. Pro členské státy Evropské unie představuje kromě možnosti zavlečení hád'átka v dovezeném dřevěném obalovém materiálu největší hrozbu ohnisko výskytu hád'átka v Portugalsku. V této zemi proto probíhá z rozhodnutí Evropské komise program cílený k úplnému vyhubení hád'átka. V rámci Evropské unie probíhají na téma hád'átka borovicového výzkumné úkoly za účasti špičkových odborníků z celé Evropy (např. projekt PHRAME) a jsou pořádána školení a semináře. Členské státy Evropské unie každoročně provádějí na svém území cílený průzkum výskytu hád'átka v porostech borovic i v podnicích,

kteřé dřevo dovážejí a zpracovávají (Schrader and Unger (2003)). Státní rostlinolékařská správa provádí takovýto průzkum ve spolupráci s Českou zemědělskou univerzitou v Praze-Suchdole na území České republiky již od roku 2002. Druh *Bursaphelenchus xylophilus* nebyl během průzkumu na území ČR doposud zjištěn.

11. Monitoring výskytu

Monitoring háďátek rodu *Bursaphelenchus* je směřován ke hledání lokalit, které druhovým složením porostů kopírují výskyt hostitelských rostlin a dále pak na dřevozpracující podniky v jejich blízkosti. Pohraniční oblasti geograficky blízké hlášenému výskytu v okolních státech dávají rovněž dobrý předpoklad pro zachycení případného výskytu háďátka. Je nutné se zaměřit na sledování symptomů odumírání a chřadnutí borovic. V neposlední řadě je nutné podrobit kontrole veškerý dřevní materiál importovaný na území ČR a to i v případě, že se jedná o dřevo ve formě europalet. Jako další vodítko při výběru lokality lze použít i nepřímý monitoring a to na základě přítomnosti vektorů háďátka. Brouci podčeledi Lamiinae zanechávají za sebou nezaměnitelné příznaky v podobě výletových otvorů ve dřevě a to jak na stromech živých tak na řezivu.

11.1. Odběr vzorků dřeva

Pro monitoring háďátek rodu *Bursaphelenchus* lze odebírat vzorky dřeva a to několika doporučenými způsoby. Ze stromů vykazujících příznaky odumírání je vhodné odebírat vzorky dřeva a to ve výšce cca 150 cm nad zemí pomocí vrtačky a 20 mm vrtáku. Je vhodné odstranit kůru a lýko v místě odběru vzorku, neboť tuto část mohou obývat jiná mykofágní či saprofágní háďátka, která při rozboru vzorku znesnadňují detekci PWN. Pro živé stromy je také vhodné použít odběr pomocí dláta. Tento způsob odběru je bezesporu šetrnější k háďátkům a umožňuje i delší skladování vzorků. Odebíráme vždy čisté dřevo a to kousky dlouhé cca 5-10 cm. Jestliže jsou příznaky velmi rané a háďátka zřejmě ještě nedosáhla kmene stromu, je vhodné strom porazit a odebrat příznakové větve či jehlice. Všechny způsoby odběru dřeva lze použít i pro řezivo, nebo pro další typy dřeva. Jak již bylo řečeno, část vývojového cyklu háďátek je mykofágní. *Bursaphelenchus xylophilus* je háďátkem, jehož potravou je zpravidla komplex dřevokazných hub zapříčiňující modré zabarvení dřeva. Tohoto fenoménu lze využít při výběru stromů (řeziva) vhodného pro odběr vzorků. Modré zabarvení dřeva dává větší šanci pro získání háďátek.



Skládka vytěženého dřeva.



Výletové otvory tesaříků.



Výletové otvory tesaříků.



Hoblíny produkované larvami.



Odběr dřeva pomocí vrtačky.



Tzv. Modré dřevo (vhodné pro život háďátek).



Odběr dřeva pomocí dláta.



Označené místo odběru.

11.2. Sběr brouků

Pro monitoring PWN lze použít i nepřímý monitoring brouků. Samičky tesaříků rodu *Monochamus* kladou do jamek v kůře hostitelského stromu vajíčka, ze kterých se v závislosti na teplotě během 4-12 dnů líhnou larvy. Larva prvního stádia se začíná živit na floémové a kambiové části v podkorní oblasti. Ve třetím instaru se larva začíná zavrtávat do bělového dřeva a vytváří chodbičku ve tvaru ležatého „S“, kolmou k ose stromu. Pozdější larvální stádia dokončují chodbičku vybudováním široké svislé kukelní komůrky. Larvy posledního stádia ucpávají vstupní otvor chodbičky hrubými dřevitými drtinami a začínají se kuklit. Stádium kukly trvá až 19 dnů. Potom se mladí dospělci začnou prokousávat xylémem ven. Mezi vylíhnutím a opuštěním dřeva může uplynout doba 6-8 dnů. Přezimovat mohou různá vývojová stádia (s výjimkou kukly), obvykle je to poslední larvální stádium. Pokud k přezimování nedojde, kompletní vývoj od kladení vajíček až po výlet dospělců trvá 8-12 týdnů. Čerstvě vylíhlí dospělci lezou vzhůru po větvích nebo kmenech, ve kterých se kuklili, a z jejich konců pak odlétají hledat vhodné větvičky, na jejichž kůře se živí. Počáteční úživný žír trvající asi 10 dnů (u některých druhů však až 3 týdny) je nezbytný pro pohlavní vyžrání brouků. Dospělí jedinci, přivábeni oslabenými stromy či poraženými kmeny (látky, které brouky vábí k vhodnému hostiteli, jsou monoterpeny a ethanol), se páří a samice začínají klást. Vykusují v kůře jamky kónického tvaru a kladou do nich vajíčka pomocí kladélka. Obvykle to bývá jedno vajíčko na jednu jamku. Samičky se dožívají až 83 dnů a jsou schopné klást až do konce svého života. Celkový počet nakladených vajíček bývá 40-215.

Doba vývoje *M. galloprovincialis* je obvykle jednoletá, méně často dvouletá, u druhu *M. sutor* je obvykle dvouletá, méně často jedno- a tříletá. V našich podmínkách se imága druhu *M. galloprovincialis* vyskytují od poloviny května do září (převážně v červenci a srpnu), dospělci *M. sutor* jen od června do srpna. Jako základní průzkum lze zvolit hledání výletových otvorů a žíru larev pod kůrou.



Larvy tesaříků.



Hnízdo larvy tesaříka.



Hnízdo larvy tesaříka v umělém chovu.

Na takto vytipovaných lokalitách se doporučuje technika individuálního sběru. Vhodné je rovněž nastražení pastí. V čistém lese je možné nastražit přirozené pasti v podobě hromad nařezaného čerstvého borovicového dřeva, které působí jako atraktant na brouky rodu *Monochamus*. Je také možné využít aplikaci terpentýnového oleje či extraktu z borovicových jehlic. Za teplého slunečného dne lze tímto způsobem nalákat brouky a ty pak individuálně sbírat.

11.3. Extrakce háďátek

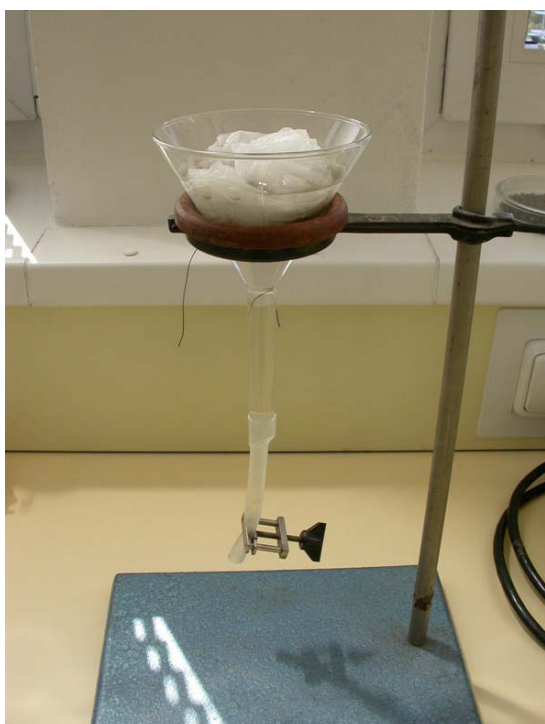
Odebrané vzorky dřeva uložené v polyethylenových sáčkách (tak aby nevyschly) je nutné rozdělit na tři části, první část bude podrobena izolaci háďátek ihned a další dvě je vhodné umístit do laboratorní teploty na 7-10 dní. Jestliže se v odebraném dřevním materiálu vyskytují nepohyblivá vývojová stadia hledaných háďátek, v průběhu několika dní dojde k dokončení jejich vývoje a usnadní se tak jejich extrakce ze dřeva. Odebrané dřevní vzorky je vhodné homogenizovat na třísky a to podélně pomocí nůžek na prořezávání větví. Tento tvar zajistí minimum poškozených háďátek ve vzorku. Množství dřeva po izolaci je závislé na množství odebraného vzorku. Homogenizovaný materiál lze extrahovat pomocí Baermannovy nálevky nebo pomocí plavících misek a následnou purifikací pomocí sít. Pro háďátka rodu *Bursaphelenchus* lze ovšem doporučit metodu plavících misek, neboť množství vzduchu ve vodě použité pro extrakci háďátek je limitujícím faktorem pro jejich pohyb a přežití. V Baermanově nálevce se setkáváme s problémem vyčerpání zásob kyslíku háďátky či jinými mikroorganismy, výměna vody je pak problematická. V případě využití plavících misek a sít tento problém nenastává. Zařízení se skládá ze dvou do sebe zapadajících misek (10 x 35 x 20 cm), jedna z misek má perforované dno. Do perforované misky se umístí jedna vrstva buničiny a na ní pak homogenizované dřevo, které přikryjeme ještě druhou vrstvou buničiny. Do spodní misky s pevným dnem se nalije voda a do ní se pak umístí miska s materiálem určeným pro izolaci. Hladina vody by neměla dřevo zaplavit. Háďátka budou přirozeně migrovat ze dřeva a shromažďovat se ve spodní misce. Každých 24 hodin by měla být provedena výměna vody a to tak, že suspenze háďátek ze spodní misky se přefiltruje pomocí síta s velikostí ok 0,02 mm a koncentrovanou suspenzi pak převedeme pomocí stříčky do kádinky (50 ml). Do spodní misky opět nalijeme vodu a čekáme dalších 24 hodin. Tento proces lze opakovat až 4 dny. Suspenzi háďátek lze skladovat bez poškození i několik dní při 4 °C.



Homogenizované dřevo pro extrakci háďátek.



Extrakce háďátek ze dřeva pomocí plavící misky.



Baermannova nálevka.



Síta 0,02 mm pro koncentrování suspenze háďátek.

12. Metody diagnostiky na úrovni morfologických a anatomických charakteristik

Pro detekci a determinaci háďátek rodu *Bursaphelenchus* na úrovni morfologických a anatomických znaků je vhodné použít jak nativních preparátů, tak preparátů fixovaných. Po několikaletých zkušenostech s fixací lze doporučit metodu fixace pomocí roztoku TAF (Courtney et al., (1955): 7 ml 40% formalínu, 2 ml Trietanolaminu, 91 ml destilované vody.. TAF vykazuje velmi dobré výsledky co do zřetelnosti detailu a vysoké stability sloučeniny. Obsažený trietanolamin neutralizuje volnou kyselinu mravenčí a svými hygroskopickými

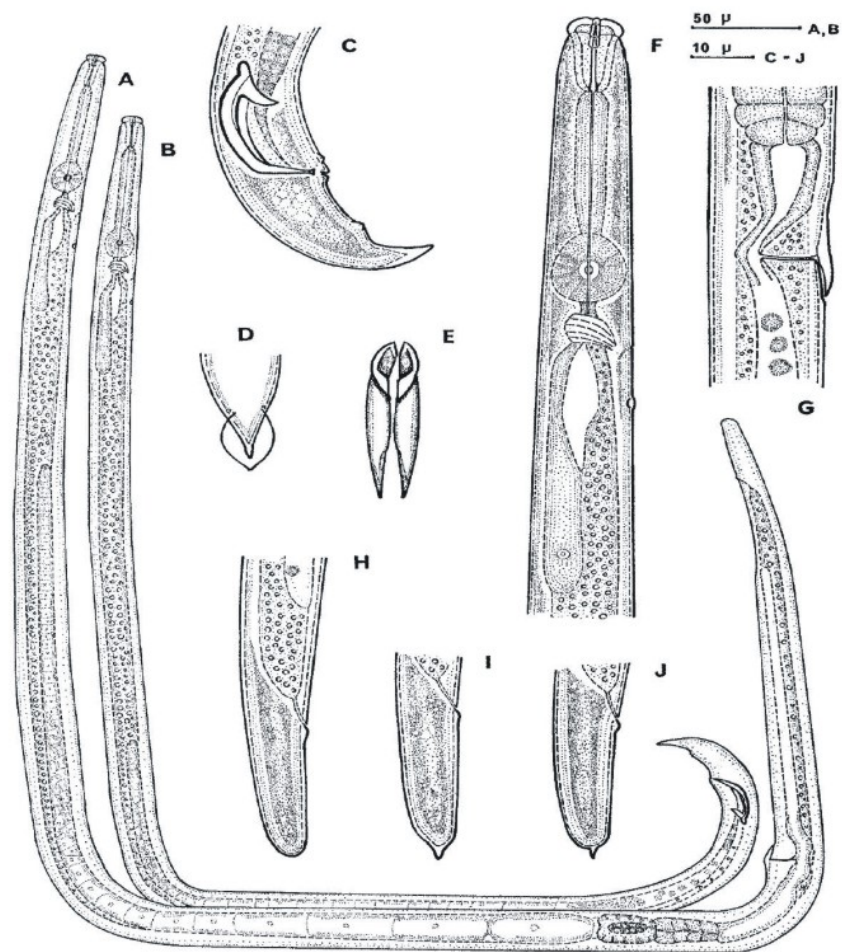
vlastnostmi zabraňuje háďátkům vyschnout během výparu fixativu. Háďátka pomocí nematologické jehly přemístíme do 20 μ l vody (cca 20 ks), 2 ml fixativu zahřejeme na 80 °C a pak pomocí Pausterovy pipety rychle přepipetujeme do mikrozskumavky s háďátký. Takto připravená háďátka uložíme v laboratorní teplotě minimálně na 10 dnů. Tímto způsobem lze fixovaná háďátka skladovat i po několik let. Takto fixovaná háďátka lze použít pro přípravu permanentních glycerolových preparátů. Na podložní sklíčko s jamkou napipetujeme 10% glycerol a do něj přemístíme háďátka, klademe důraz na to, aby všechna háďátka byla pod hladinou glycerolu. Podložní sklíčka inkubujeme při 60 °C až do doby odpaření maximálního množství vody, tento fakt ověříme vizuálně (glycerol zhoustne na koncentraci 99% glycerolu). V průběhu odpařování je nezbytné ověřovat množství glycerolu v jamce a případně jej doplnit, tak aby nedošlo ke zničení háďátek. Připravíme si podložní sklíčka pro permanentní preparáty, napipetujeme na ně cca 5 μ l 99% glycerolu a inkubujeme při 80 °C 15 minut. Do těchto kapek přemístíme 2 ks háďátek z glycerolu po stranách umístíme přiměřené množství směsi parafínu a včelího vosku (1:4), přiložíme krycí sklíčko a přeneseme do 80 °C. Počkáme až se směs parafínu a včelího vosku dokonale rozpustí a krycí sklíčko zcela zakryje háďátka. Preparát je připraven pro mikroskopii a uložení do sbírky. Glycerolové preparáty skladujeme vždy vodorovně a bez přístupu světla.



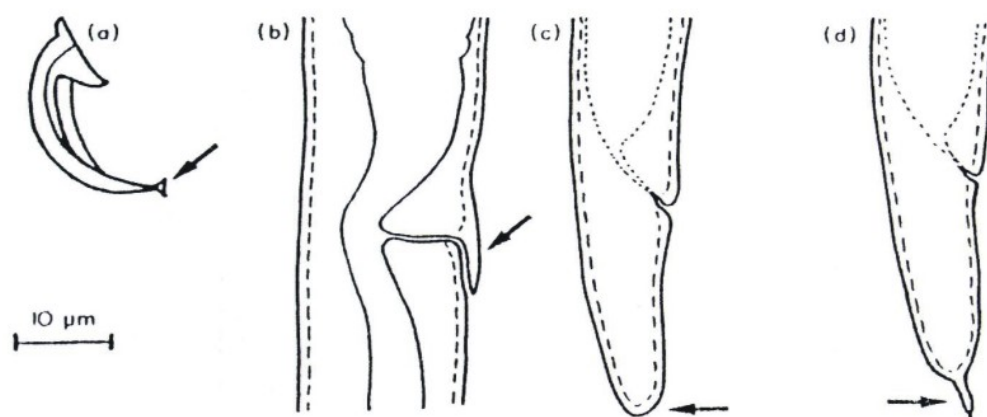
Souprava pro práci s háďátky.

12.1. Základní morfologicko-anatomické charakteristiky háďátek rodu *Bursaphelenchus*

Háďátka rodu *Bursaphelenchus* jsou drobné, průsvitné, necelý milimetr dlouhé hlístice typicky červovitého tvaru. Jsou to poměrně malá subtilní háďátka (0,4-1,5 mm). Při zahřátí dochází zejména u samečků k výraznému stáčení ocasu ventrálně směrem k tělu. Počet laterálních rýh je variabilní a to od žádné po čtyři. Hlavová část se v oblasti cefalických papil poměrně robustní s typickým zaškrcením. Stylet je dobře vyvinut o velikosti 12-20 μm , ale může dosahovat délky až 26 μm . Kužel styletu se zužuje a násadec styletu je robustní na bázi zduřelý. Prokorpus je cylindrický a přechází v střední bulbus, který je obvykle vejčitého tvaru a v mnoha případech antero-posteriárně protažen. Laloky jícnových žláz se překrývají. Nervový prstenec se nachází ve vzdálenosti jedné šířky těla háďátka od středního bulbu. Exkrekční póry se nacházejí zpravidla v blízkosti nervového prstence, často pak anteriárně k střednímu bulbu. Vulva je umístěna posteriárně a to v 70-80 % délky těla, ale její přesné umístění je závislé na studovaném druhu. Vulvální pysky nepatrně vyčnívají, u několika druhů anteriární pysk překrývá vulvu kaudálním směrem a vytváří tak záklopku kryjící vulvu. Vagina je umístěna v pravém úhlu k ose těla. Genitálie jsou uspořádány monoprodelticky. Vyvíjející se oocyty jsou uspořádány ve dvou nebo třech řadách častěji než v řadě jedné. Děložní váček je obvykle dlouhý 3-6 šířek těla háďátka. Ocas je variabilní, často středně kónický, zakončený oválně či špičkou. Ocas samce je ventrálně stočen, zakončení je závislé na studovaném druhu. Na konci ocasu lze pozorovat kutikulární strukturu ve formě malé plachetky. V okolí řitního otvoru lze sledovat dva nebo tři páry kaudálních papil. Spikula je párová obvykle dělená, u některých druhů mohou být obě části spojené. Délka měřená po obvodu zakřivení spikuly je 10-30 μm , u většiny druhů pak kolem 14-20 μm . Zakřivení spikuly je závislé na druhu háďátka. U *B. xylophilus* a *B. mucronatus* je spikula velmi silně zakřivena. Rostrum je výrazné a zakončené, zatímco špička je dobře vyvinuta a často tupě oválná. Distální konec spikuly je u některých druhů (*B. xylophilus*, *B. mucronatus*) zduřelý a vytváří se zde struktura, kterou nazýváme cucullus (Hunt, 1993). Přesnou determinaci háďátka lze provést nejlépe porovnáním zjištěných morfometrických údajů se standardními hodnotami.

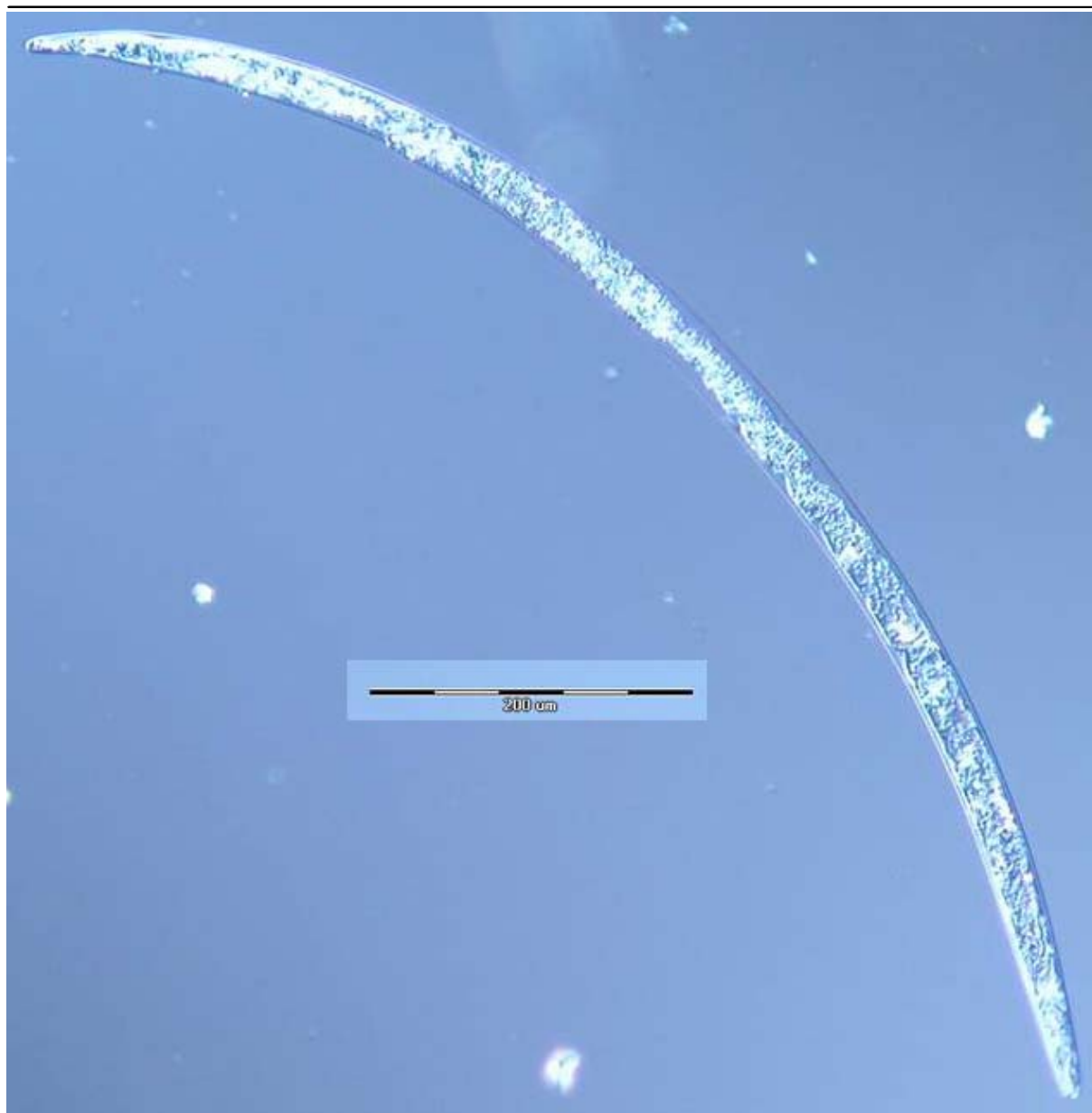


Bursaphelenchus xylophilus: A. samička, B. samec, C. ocas samce, D. ventrální pohled na samčí ocas s plachetkou, E. Ventrální pohled na spikulu, F. samička hlava, G. vulva, H.-J. ocas samičky.



Základní rozlišovací znaky *B. xylophilus* a *B. mucronatus*

A. spikula, B. vulva obou druhů, C. ocas *B. xylophilus*, D. ocas *B. mucronatus*.



B. xylophilus
celkový tvar těla.



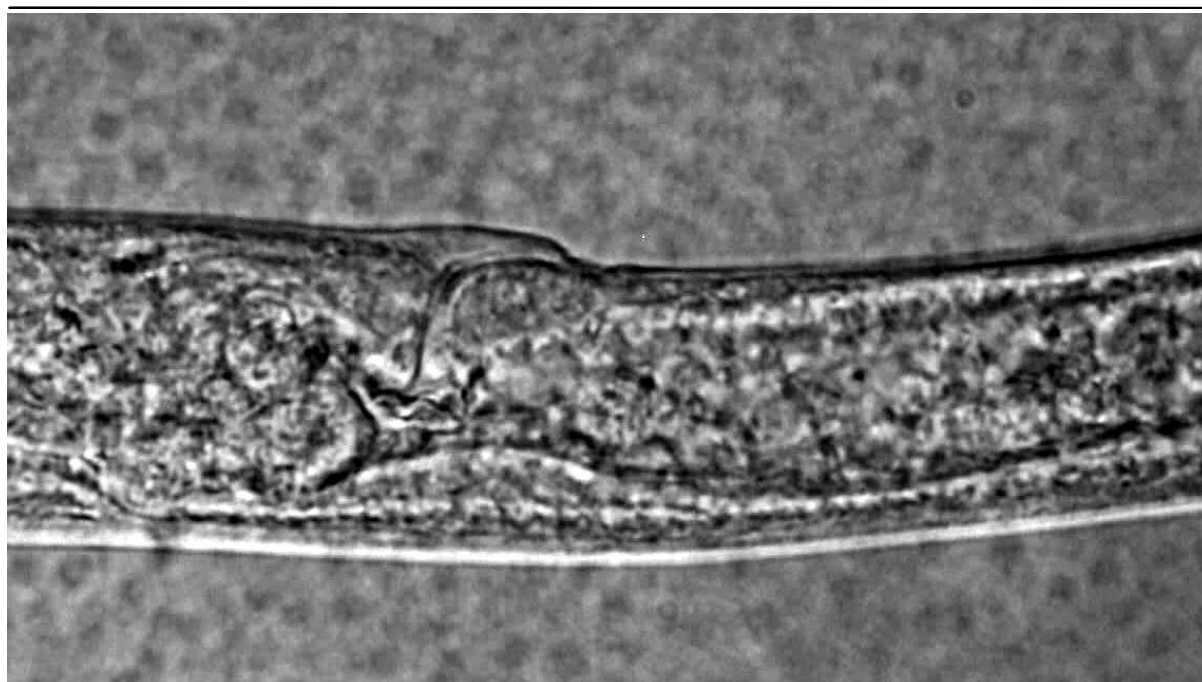
B. xylophilus ocas
samička.



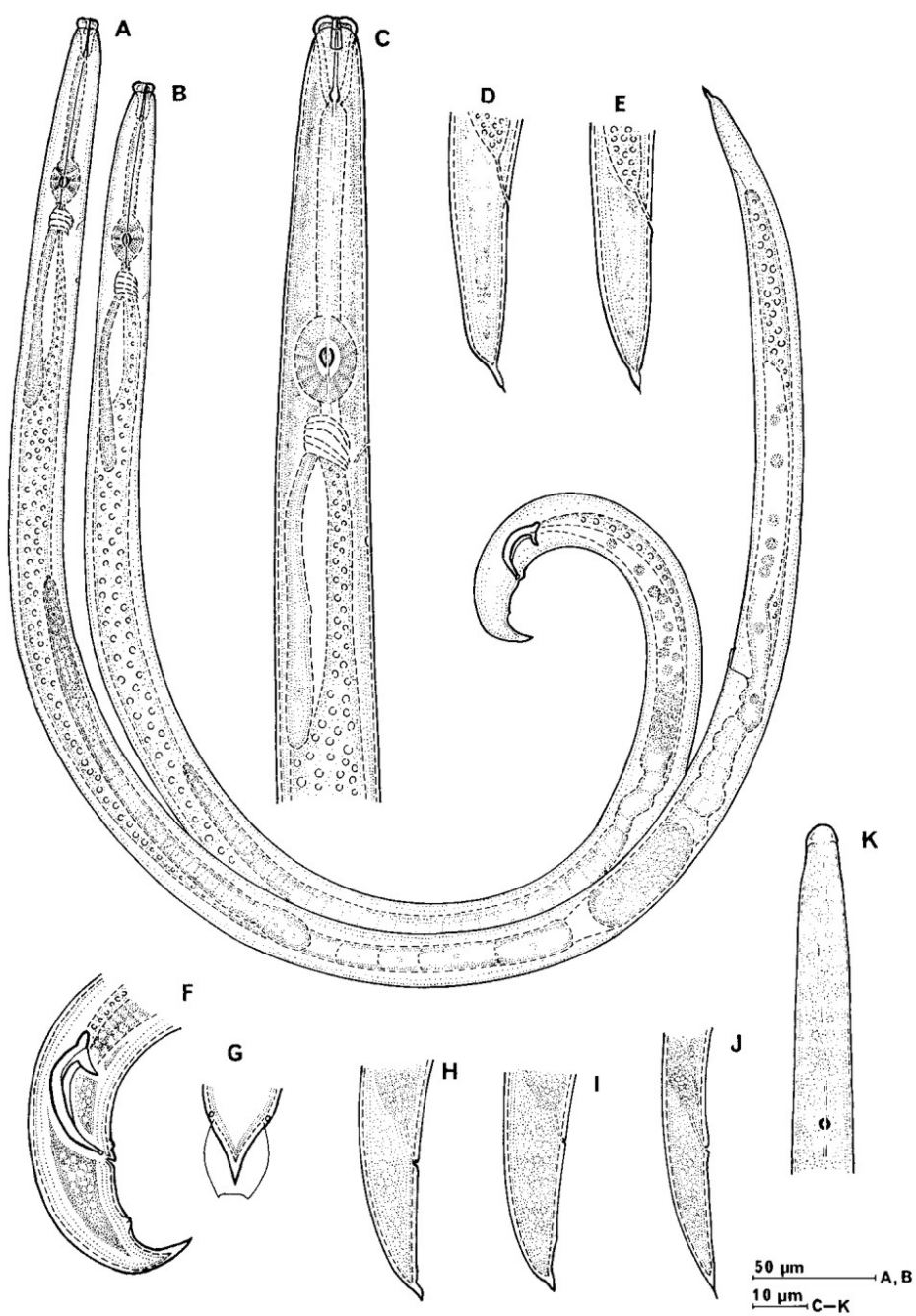
B. xylophilus ocas
sameček.



B. xylophilus
hlavová část.



B. xylophilus vulva.



Bursaphelenchus mucronatus: A. samička, B. samec, C. samička, hlavová část, D., E. samička ocas, F. samec ocas, G. ventrální pohled na ocas samečka, špička s ocasní plachetkou, H., I. ocas larvy 3. stupně, J. ocas dauerlarvy, K. dauerlarva hlava.



B. mucronatus celkový tvar těla.



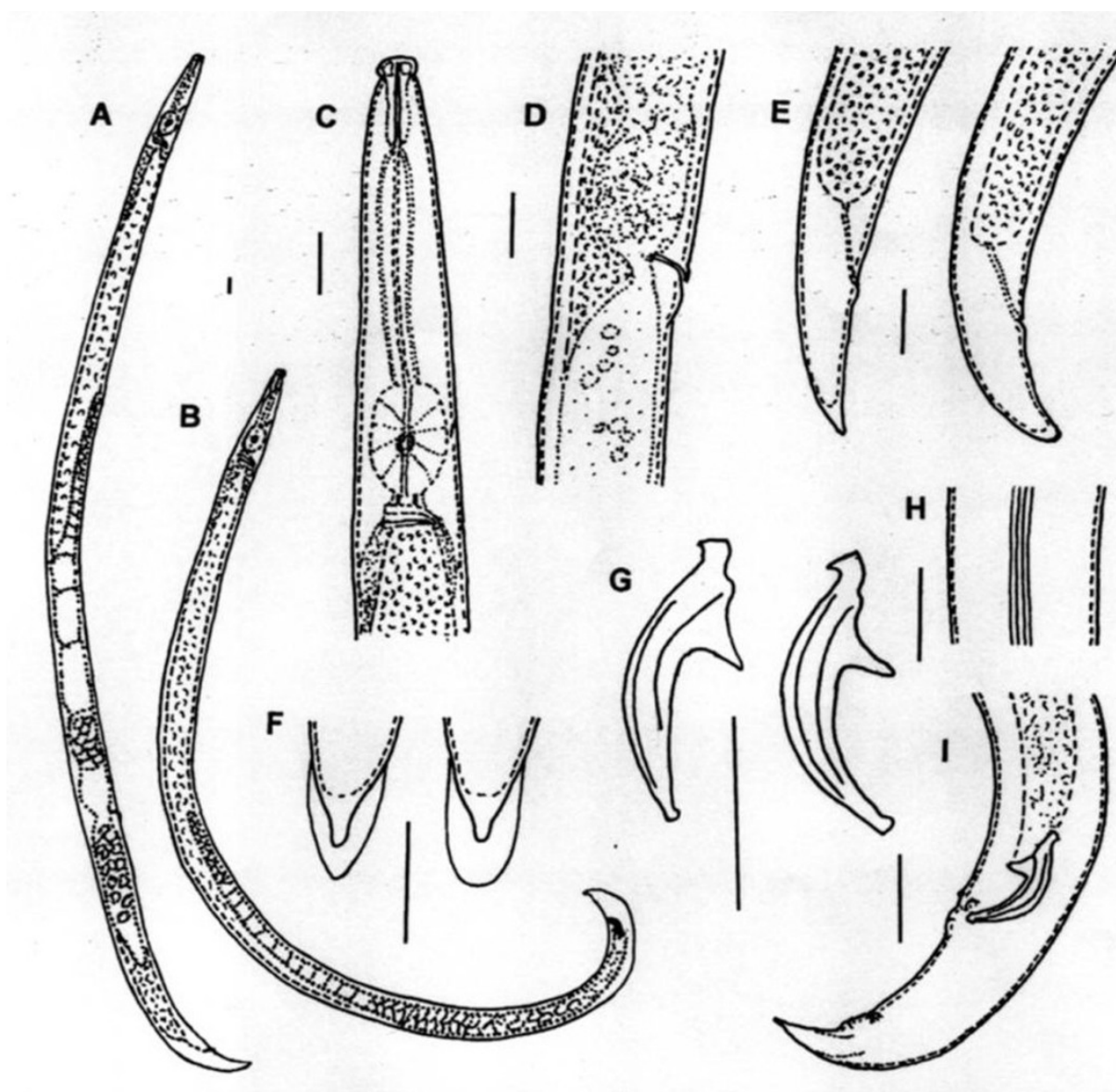
B. mucronatus ocas samička.



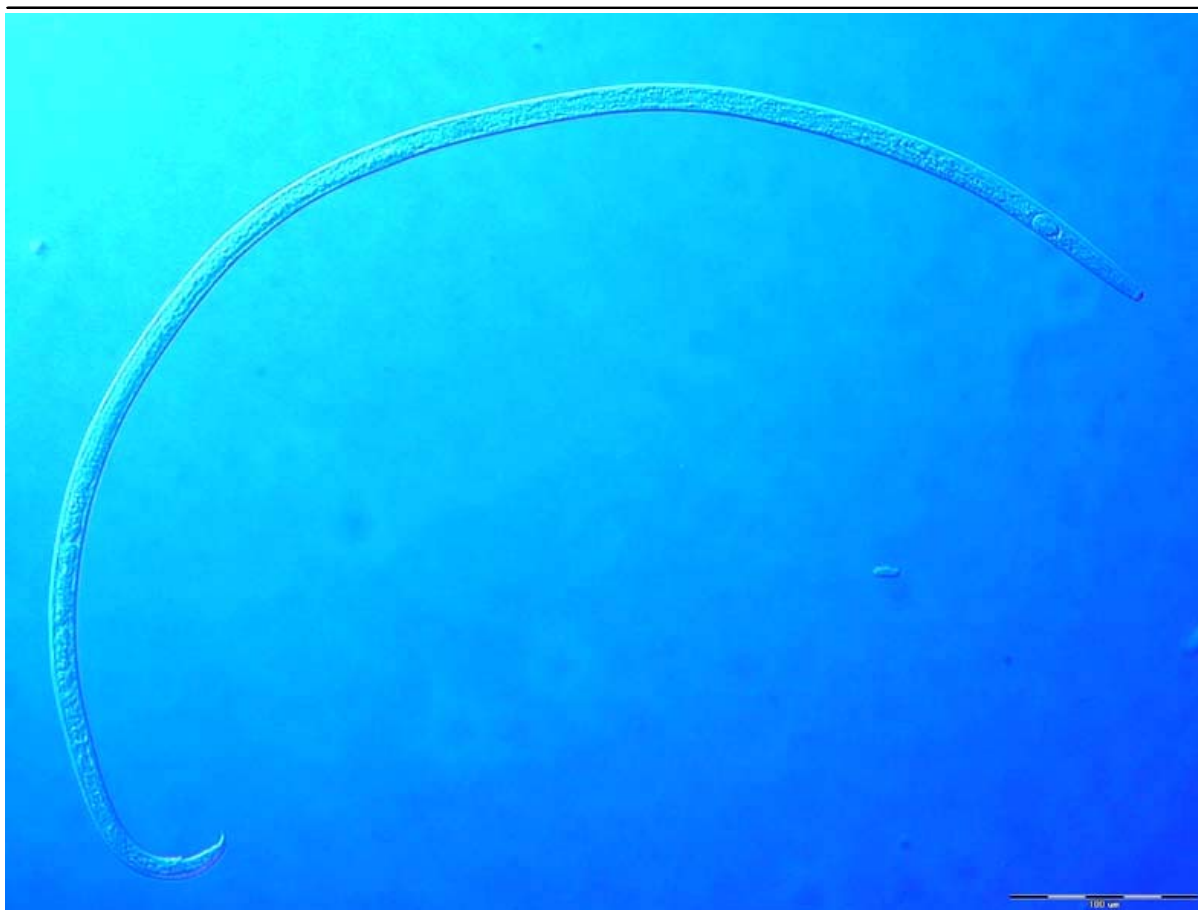
B. mucronatus ocas sameček.



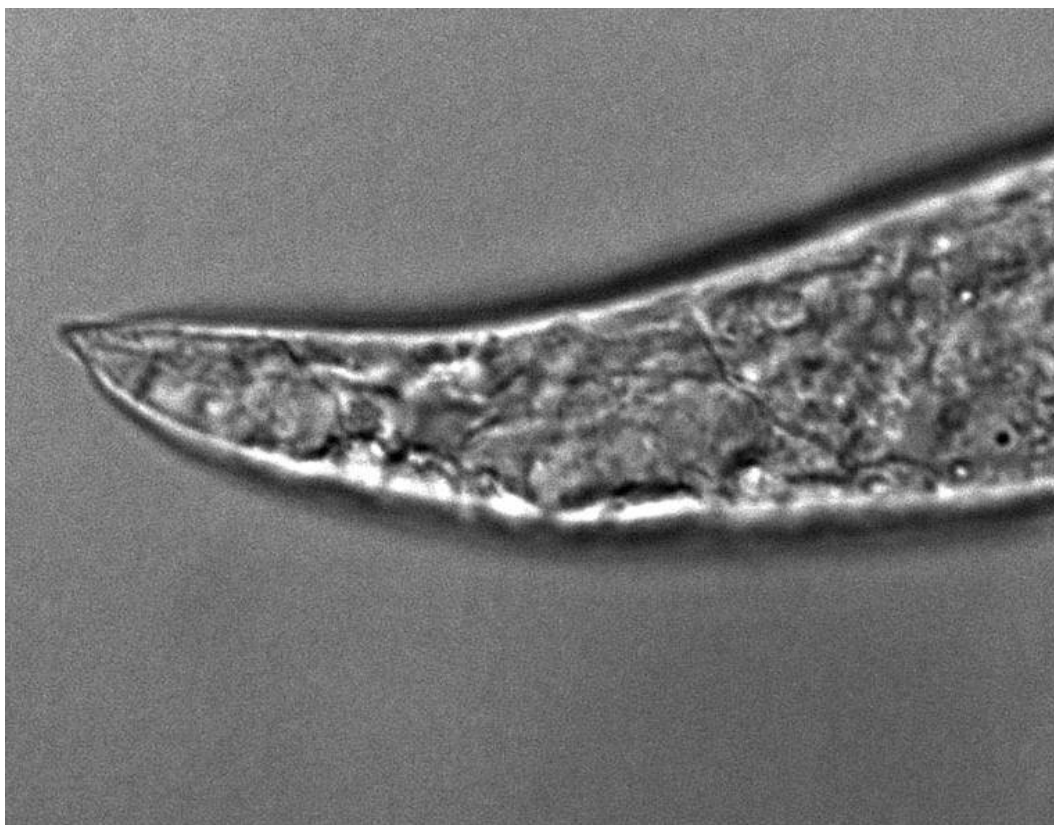
B. mucronatus hlavová část.



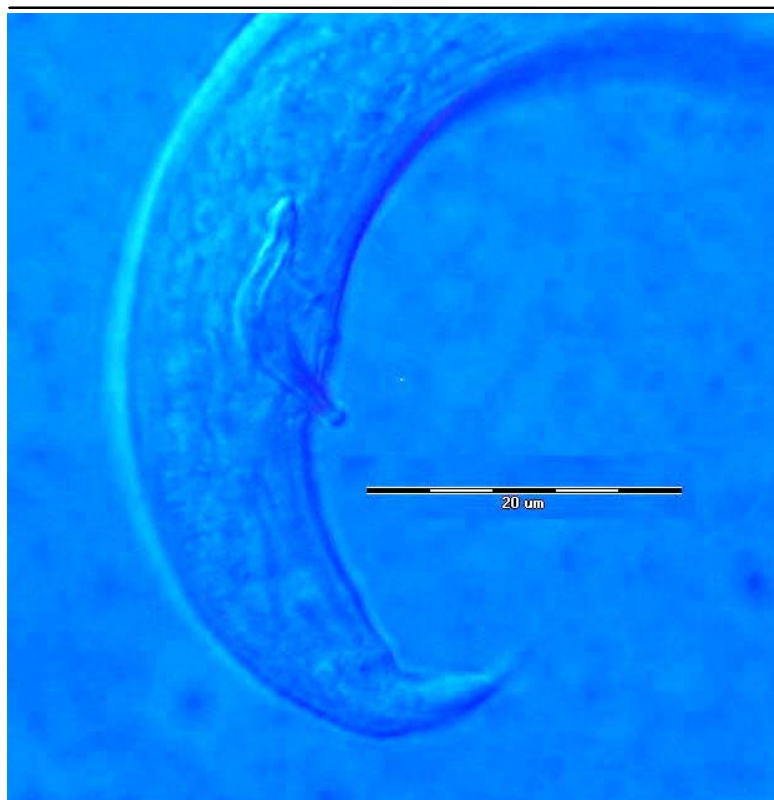
Bursaphelenchus vallesianus: A. samička, B. samec, C. hlava samičky, D. vulva, E. ocas samička, F. plachetka, G. spikula, H. laterální linie, I. ocas samce.



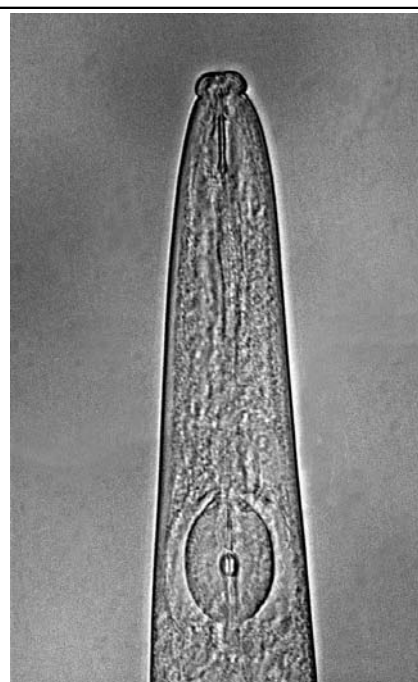
B. vallesianus celkový tvar těla.



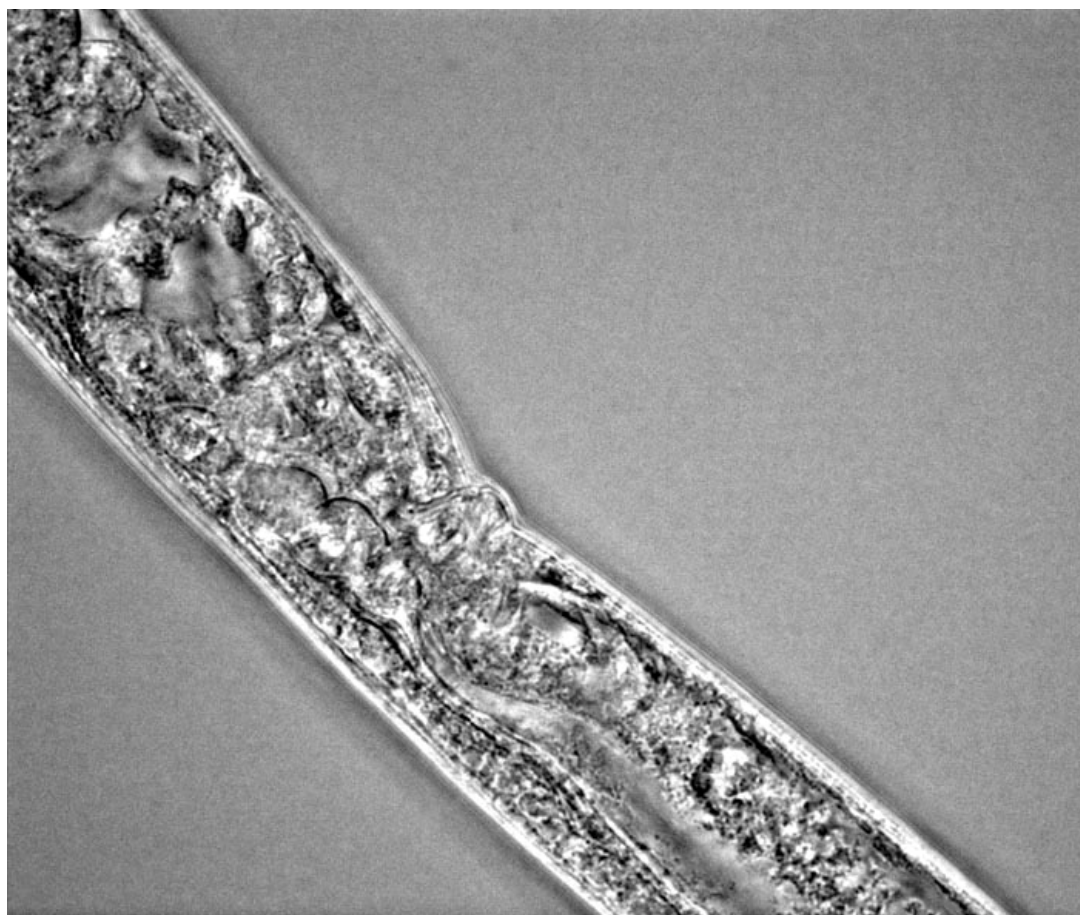
B. vallesianus ocas samička.



B. vallesianus ocas sameček.



B. vallesianus hlavová část.



B. vallesianus vulva.

	<i>B. vallesianus</i>	<i>B. xylophilus</i>	<i>B. mucronatus</i>
<i>Charakterizace ♀</i>			
L	1000,3 (866-1116)	520 (450-610)	870 (700-970)
stylet	13 (11-14)	12,8 (12,6-13)	15,8 (14-16)
a	53,7 (47,3-64,1)	42,6 (37-48)	41,8 (36,5-45,9)
c	38,8 (29,4-43,6)	9,6 (8,3-10,5)	26,2 (19,6-30,4)
V	73,2 (72-75,1)	74,7 (73-78)	75 (73-77)
<i>Charakterizace ♂</i>			
L	967,3 (752-1107)	730 (590-820)	790 (640-970)
spikula	15,6 (13-21)	27 (25-30)	26 (23-29)
Stylet	12,9 (12-14)	14,9 (14-17)	15 (14-16)
a	61 (47-68,9)	42,3 (36-47)	44 (38,8-51,1)
c	33,5 (25,9-38,2)	26,4 (21-31)	29,1 (25,7-35,6)

Základní tělesné rozměry a indexy háďátek.

13. Metody diagnostiky na úrovni nukleových kyselin

13.1. Základní informace o metodách izolace DNA

Nukleová kyselina se u eukaryotických organismů nachází ve velkém množství v buněčném jádře. Cílem extrakce je tedy vyizolovat tuto nukleovou kyselinu (NA) z buňky a dále pak odseparovat proteiny a další komponenty tvořící podpůrné lešení nukleoproteinových struktur. Výsledkem je tedy čistá NA bez příměsí zbytků buněčných struktur. Při extrakci NA jsou používány zdraví škodlivé chemikálie a proto je nutné pracovat v rukavicích.

Prvním krokem je homogenizace, pro kterou lze s úspěchem použít třecí misky. Pro snazší homogenizaci lze přidat tekutý dusík. V hrubém homogenátu je obsažena celá řada enzymů a mezi nimi i nukleázy, tyto enzymy jsou schopny odbourávat nukleové kyseliny a tak znemožnit úspěšnou izolaci NA. Proto je nutné NA chránit přidáním chelatačního činidla (EDTA), které je zpravidla obsaženo v extrakčním pufru. Ethylen-diamino-tetraoctová kyselina vyváže z roztoku kationty a tak znemožní nukleázám odbourat NA. Ochranná funkce extrakčního pufru však není jedinou jeho funkcí. Pufr zpravidla také obsahuje detergentní látky napomáhající destrukci buněčných struktur, jako SDS (sodium dodecyl sulfát), Triton X - 100, CTAB (cetyl trimetyl amonium bromid), merkaptoethanol apod. Proteiny jsou v dalším kroku denaturovány a separovány z komplexu NA - protein. Vzorek je dále protřepán s fenolem, nebo se směsí fenol : chloroform. Po centrifugaci vznikají v mikrozkuhavce tři oddělené fáze, spodní (organická), střední (denaturované proteiny) a horní (vodná fáze s NA). Horní fáze je použita v dalším kroku. Pomocí ethanolu se NA vysráží (precipituje). Pro snazší precipitaci jsou do ethanolu přidávány soli (LiCl, KCl, NaCl apod.) a vzorek je umístěn do mrazícího boxu. Pro precipitaci lze také použít izopropanol. Precipitát NA se centrifugací

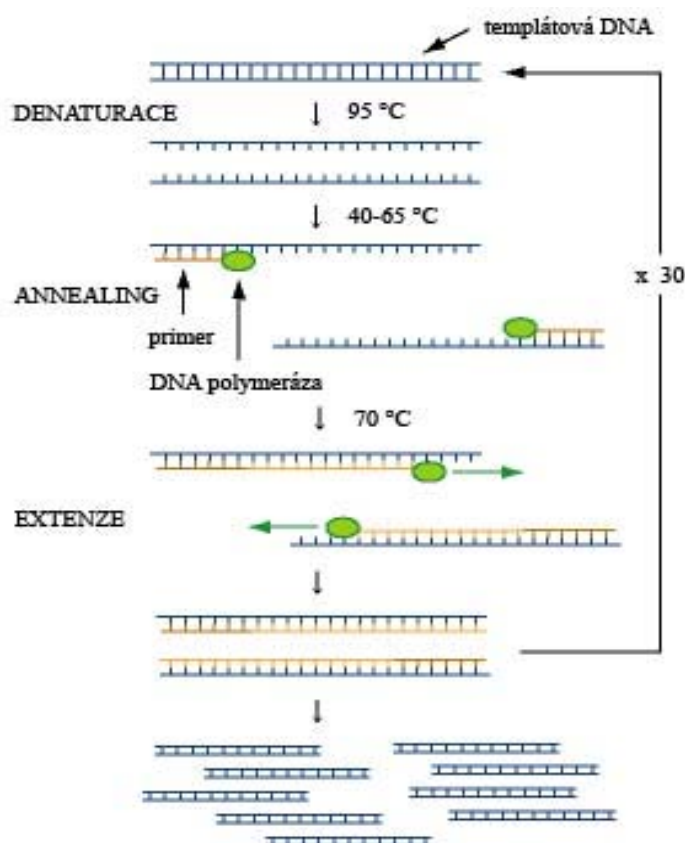
shromáždí na dně mikrozkuhavky a nechá se vysušit (mikrozkuhavka se otočí dnem vzhůru na filtrační papír). Vzniklá peleta se promyje v 70 % ethanolu a po prosušení je možné NA rozpustit ve vodě, TE, či nějakém jiném médiu. Sušení může probíhat i v exikátoru, ovšem NA by neměla přeschnout (špatně se rozpouští). Takto vyextrahovaná NA je použitelná pro další analýzy.

13.2. Základní informace o analýze nukleových kyselin pomocí PCR

V letech 1983 - 1985 vyvinuli Mullis, Faloon a Saiki enzymovou vysoce účinnou metodu, kterou se *in vitro* exponenciálně amplifikují vybrané sekvence nukleových kyselin. Metoda se nazývá polymerázová řetězová reakce - PCR (Polymerase Chain Reaction). Podstatou PCR je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA, ke které dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'OH-konce směřují proti sobě. Jako primery se obvykle používají dva uměle připravené krátké oligonukleotidy o délce 18 - 30 bází, odvozené z koncových sekvencí DNA určené k amplifikaci. Délka, komplementarita a poměr purinových a pyrimidinových nukleotidů v primeru určují specifitu i reakční podmínky PCR. Reakční směs pro amplifikaci specifického fragmentu DNA je složena z pufru (pro danou polymerázu), DNA - polymerázy, směsi deoxyribonukleotidů, dvou či více primerů, templátové DNA a $MgCl_2$. Při syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy, které se izolují z termofilních organismů. Nejčastěji používaná *Taq* DNA polymeráza je izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* a odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. Termofilní bakterie *Thermus aquaticus* byla objevena v termálních pramenech (70 - 75 °C) Yellowstonekého národního parku v roce 1969. Velikost tohoto enzymu je 60-68 kDa a specifická aktivita je 2000-8000 u.mg⁻¹ bakterií. Enzymatická aktivita *Taq* DNA polymerázy byla popsána v roce 1976 (Innis et al., 1990). Kromě DNA polymerázové aktivity má také 5'→3' exonukleázovou aktivitu, postrádá však endonukleázovou a 3'→5' exonukleázovou aktivitu. V současné době se také používají rekombinantní enzymy, např. Ampli *Taq* DNA polymeráza, získaná expresí genu *Taq* DNA polymerázy *T. aquaticus* v *E. coli*. Kromě toho byl připraven modifikovaný rekombinantní enzym, tzv. Stoffelův fragment, který se liší od původního enzymu delecí 289 N-koncových aminokyselin. Touto úpravou se odstraňuje 5'→3' exonukleázová aktivita a zvyšuje termostabilita a životnost enzymu. Kromě těchto polymeráz je v současné době na trhu celá řada dalších polymeráz izolovaných z různých bakterií (*Tfl*, *Pfu*, Dynazyme, *Taq* gold apod.). Výběr polymerázy závisí na konkrétním případě. Z praktického hlediska je

rozhodujícím faktorem cena (Křemen et al., 1998). Standardní PCR se nejčastěji provádí v reakční směsi o objemu 25 - 50 µl. Amplifikace DNA probíhá v tepelně a chemicky inertních (polypropylénových) mikrozkuvkách nebo v jamkách speciálních destiček pro PCR (Innis et al., 1990). Syntéza DNA probíhá opakovaně formou 30 a více cyklů, při nichž se v závislosti na teplotě reakční směsi střídají pravidelně tři následující kroky:

- denaturace templátové DNA při teplotě 94-96 °C 15 sekund až 2 minuty, přičemž se rozdělí komplementární řetězce DNA,
- připojení primerů (annealing) k jednovláknovým DNA řetězcům snížením teploty na 30 - 65 °C po dobu 30 - 60 sekund. Asociací primerů se ohraničuje amplifikovaná oblast ve směru od 3'-OH konců na obou templátových řetězcích. Teplota annealingu je závislá na množství CG v primeru a rovněž na délce primeru, což vyplývá i ze vzorce (jeden z mnoha) pro stanovení $T_a = 2(A+T) + 4(G+C) - 5$,
- polymerizační reakce (extenze, elongace) primerů ve směru 5' → 3' na obou řetězcích obvykle při optimální teplotě pro *Taq* DNA polymerázu (65 - 75 °C) po dobu 30 - 60 sekund. Na aktivitu *Taq* DNA polymerázy má základní vliv množství hořčnatých iontů v reakci, i tento faktor patří mezi základní při optimalizaci PCR. Krok polymerizace tedy uzavírá jeden amplifikační cyklus. Výslednými produkty jsou fragmenty DNA, jejichž konce jsou vymezeny 5'-konci primerů a jejichž délky jsou dány vzájemnou vzdáleností primerů.



Automatické opakování jednotlivých cyklů umožňují speciální programovatelné termostaty, tzv. PCR termocykléry, ve kterých lze dosáhnout přesně definovatelných změn inkubačních teplot během krátkých intervalů. Každý z termocyklérů má svoje specifické vlastnosti (rychlost změny teploty), takže pokud je metoda PCR optimalizována pro určitý typ, je nutné při využití metody na jiném typu termocykléru program optimalizovat.

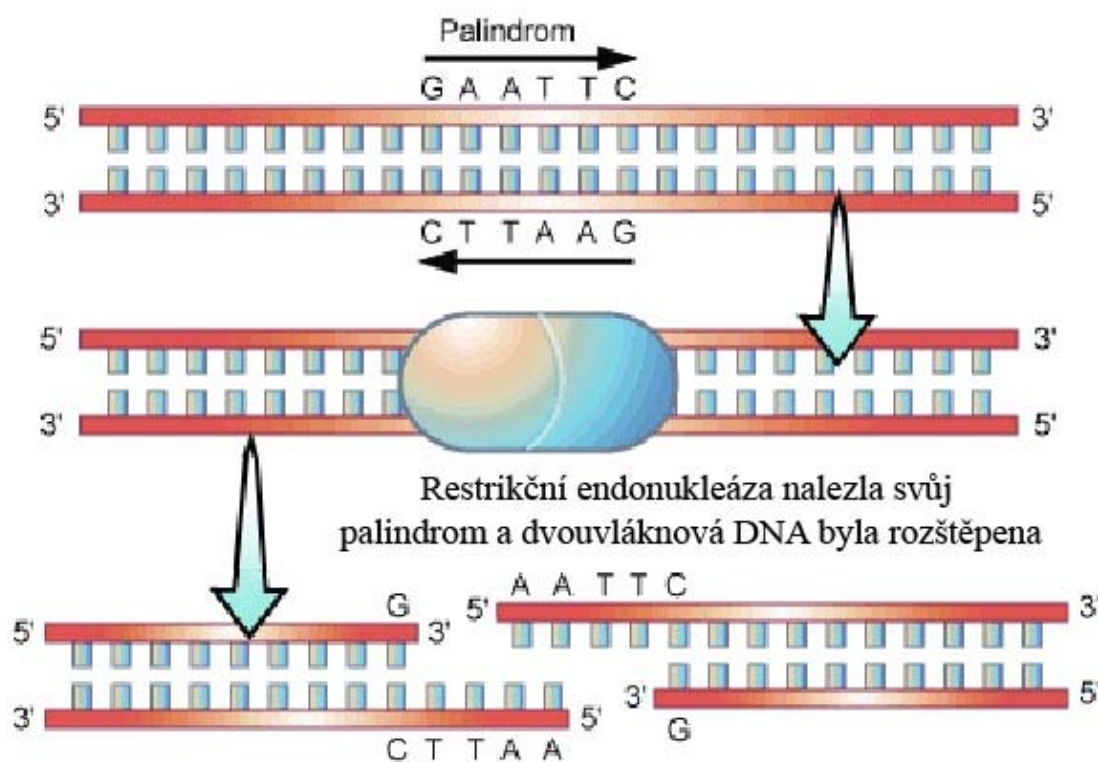


Termocyklér PTC200 (MJ research).

13.3. Restrikční štěpení

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) je metodou, která nemalou měrou přispěla k rozšíření spektra metod studujících strukturu DNA. Je rovněž metodou vhodnou pro epidemiologické i diagnostické využití. Princip RFLP spočívá v rozložení palindromatických sekvencí v genomu a jejich nalezení pomocí restrikční endonukleázy (Vachtenheim a Duchoň, 1992). Restrikční endonukleázy (RE) jsou bakteriální enzymy, které spolu s příslušnými metylázami tvoří systém chránící bakterie proti invazi cizí DNA. RE specificky štěpí obě vlákna ds DNA, není-li tato DNA modifikována, nejčastěji DNA metylázou. Sekvence nukleotidů, kterou RE rozpoznává, se nazývá rozpoznávací sekvence, nejčastěji se jedná o palindromatickou strukturu. Místo, v němž je DNA štěpena, se nazývá restrikční (štěpné) místo. Konce dsDNA po rozštěpení konkrétní endonukleázou nabývají tvar odpovídající palindromatické sekvenci,

kerou RE štěpí. Vznikají tedy lepivá či plochá zakončení. Tato vlastnost je bohatě využívána při práci s geny, klonování a studiu genomu (Břicháček a Krčmář, 1993). Uvádí se, že restrikčních endonukleáz je popsáno a vyizolováno přes 1500. Běžně je komerčně dostupných asi 500 RE. Převážně jsou bakteriálního původu. Označení enzymu je zkratkou bakteriálního kmene, ze kterého je RE vyizolována (Rosypal, 1999).



13.4. Agarózová elektroforéza a vizualizace produktů PCR

Produkty PCR lze analyzovat pomocí horizontální agarózové elektroforézy. Agaróza je lineární polysacharid, který se skládá z D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktosy. Pro elektroforetické účely se připravuje z agaru o vysokém stupni čistoty. Nukleové kyseliny se dělí nízkonapětovou elektroforézou při potenciálovém spádu 5-10 V/cm délky gelu. Díky zbytkům kyseliny fosforečné jsou NA záporně nabity, a proto se ve stejnosměrném elektrickém poli pohybují ke kladnému pólu. Jejich pohyb je omezen jejich velikostí a současně koncentrací agarózy. Kratší fragmenty se pohybují rychleji a delší pomaleji. Průběh elektroforézy lze sledovat podle pohyblivosti přidávaných barviv. Jako barvivo pro vizualizaci fragmentů NA lze použít ethidium bromid (EB), který se váže mezi báze NA. Pokud je NA

označená EB vystavena záření UV o vlnové délce 260 nm, emituje EB oranžovočervené záření v oblasti viditelného světla 560 nm. Tímto způsobem jsou barveny zejména agarozové gely. Ethidium bromid je látka u níž byl prokázán mutagenní účinek, proto je nutné brát zřetel na ochranu zdraví. Vždy používat rukavice a zabránit kontaminaci okolního prostředí. Pro práci s EB je vhodné používat jedno vyhrazené pracoviště a označené pomůcky.

13.5. Detekce a determinace *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. vallesianus* a *B. mucronatus*

Spektrum metod využitelných pro diagnostiku fytoparazitických háďátek je poměrně široké. Pro rutinní diagnostiku je vhodné vybrat metodu aplikovatelnou v jakékoli laboratoři a rovněž pak reprodukovatelnou. V případě detekce a determinace háďátek rodu *Bursaphelenchus* je možné doporučit kombinaci PCR a restrikčního štěpení. Tato metoda dává stabilní výsledky a jejich hodnocení je snadné pro hodnotitele. Pomocí univerzálních primerů pro amplifikaci cistronu rDNA se nejprve připraví fragment, který je pak nutné rozštěpit sadou enzymů. Motiv bandů se pak porovná s připravenými markery. V této práci jsou uvedeny výsledky pro diferenciaci tří druhů rodu *Bursaphelenchus*.

13.5.1. Izolace DNA

Pro izolaci DNA z háďátek rodu *Bursaphelenchus* lze doporučit několik postupů. Jako výchozí materiál pro izolaci DNA lze použít přesně odpočítaný počet háďátek. Pomocí nematologické jehly přeneseme háďátka do mikrozkušavky s 20 µl vody nebo izolačního pufru. Přistoupíme-li k izolaci DNA ze suspenze háďátek, je vhodné zvýšit koncentraci háďátek v suspenzi pomocí centrifugace. Pro tento účel se nejlépe hodí výkyvný rotor, pokud jím nedisponujeme postačí rotor stabilní, je ovšem nutné brát zřetel na tvar vzniklé pelety háďátek. Centrifugujeme 5 minut při 6000 g, pak odsajeme vodní fázi pomocí pipety, nebo vývěvy. Dbáme na to, aby nedošlo k poškození pelety a odsátí háďátek. Důležitým aspektem při koncentrování háďátek tímto způsobem je časový interval mezi centrifugací a odsátím vodné fáze, který by měl být co nejkratší. Háďátka rodu *Bursaphelenchus* jsou subtilní a poměrně rychle se pohybují, v případě prodloužení tohoto intervalu dochází k rychlé resuspendaci pelety háďátek.

Pro izolaci DNA z několika jedinců (1-10) doporučujeme následující metodu:

Hlavním krokem je bezeztrátová homogenizace vzorku biologického materiálu. Lze použít homogenizaci přímo v mikrozkuhavce (500 μ l) pomocí (Pellet Pestle[®]Motor, Sigma) a skleněného násadce 3 mm. Zde je nutné po homogenizaci násadec opláchnout izolačním pufrem (LB) tak, aby únik materiálu byl co nejmenší. Druhou možností je mechanická homogenizace ve skleněném minihmoždířku nebo v mini třecí misce. V obou případech je nutné kvantitativně převést homogenát do mikrozkuhavky. Pro snazší homogenizaci je možné použít inkubaci v tekutém dusíku, ovšem není to nezbytné. Množství izolačního pufru je závislé na použité metodě izolace, doporučené množství je od 50 do 200 μ l.

1. K homogenátu v mikrozkuhavce přidat proteinázu K do konečné koncentrace 400 μ l/ml.
2. Inkubovat ve vodní lázni 1 h při 55 °C , následuje denaturace 5 minut (85 °C)
3. Připipetovat ekvivalentní množství směsi fenol: chloroform (1 : 1) pH 7,4.
4. Vortexovat 2000 rpm 10 minut.
5. Centrifugovat 10 minut při 7000 g.
6. Opatrně odpipetovat horní fázi, aby nedošlo ke kontaminaci proteiny ve střední fázi, nebo fenolem ve spodní fázi a připipetovat 2,5 x objemu 96 % etanolu s 0,1 dílu 8 M LiCl.
7. Inkubovat 12 h při –30 °C, nebo 10 minut v tekutém dusíku.
8. Centrifugovat 10 minut při 9000 g.
9. Peletu propláchnout v 70 % etanolu 200 μ l (napipetovat a překlápět v ruce 20x).
10. Centrifugovat 15 minut 11 000 g.
11. Odstříknout etanol rychlým pohybem s otevřenou mikrozkuhavkou (peleta drží u dna mikrozkuhavky, není třeba se obávat že vypadne).
12. Peletu vysušit ve vakuu nebo na stole na sterilním ubrousku mikrozkuhavkou umístěnou dnem vzhůru a resuspendovat ve 25 μ l sterilní ddH₂O.
13. DNA je připravena pro další analýzy.

Použitý extrakční pufr:

LB (lysis buffer)

1,7 mM SDS

20 mM DTT

1x PCR reakční pufr A pro *Taq* DNA polymerázu (Fermentas)

Proteináza K (Fermentas)

Pro izolaci DNA ze suspenze více než deseti hád'átek lze doporučit komerčně dodávaný kit firmy Qiagen (QIAamp DNA mini kit c.n. 51304). Tento kit svojí dostupnou cenou a

jednoduchostí provedení umožňuje aplikaci metody izolace DNA pomocí hydroxyapatitové matrix i v laboratořích, kde tato technika není osvojena. Postup izolace vychází z manuálu dodávaného výrobcem, změny byly provedeny zejména v oblasti homogenizace vzorku.

QIAamp DNA mini kit

1. Koncentrovanou suspenzi háďátek v mikrozkušavce 500 µl homogenizovat s přídavkem 50 µl a posléze 150 µl homogenizačního pufru ATL pomocí (Pellet Pestle[®] Motor, Sigma) a skleněného násadce 3 mm. (Pozor na tvorbu pěny). Celý objem přenést do 2 ml mikrozkušavky.
2. Připipetovat 20 µl proteinázy K (součást kitu), krátce vortexovat a inkubovat v 55 °C 1 hodinu. V průběhu inkubace 5 x zamíchat vortexováním.
3. Krátce centrifugovat (spinování nebo stočení- krátká centrifugace 6000 g 1 minuta za účelem shromáždění celého objemu mikrozkušavky na dno).
4. Přidat 200 µl AL pufru a inkubovat v 70 °C 10 minut, stočit.
5. Přidat 200 µl 96% etanolu (pro molekulární biologii), vortexovat 15 sekund, stočit.
6. Přepipetovat celý objem do QIAamp Spin Column, centrifugovat 6000 g 2 minuty (DNA a hrubý homogenát je teď zachycen na filtru QIAamp Spin Column).
7. Vyměnit mikrozkušavku 2 ml za novou a do filtru připipetovat 500 µl AW1, centrifugovat 6000 g 2 minuty.
8. Vyměnit mikrozkušavku 2 ml za novou a do filtru připipetovat 500 µl AW2, centrifugovat 20 000 g 4 minuty.
9. Vyměnit mikrozkušavku 2 ml za novou, centrifugovat 20 000 g 4 minuty (filtr se tak vysuší).
10. Filtr opatrně přenést do sterilní mikrozkušavky 2 ml, na střed filtru napipetovat 100 µl AE elučního pufru nebo sterilní ddH₂O. (V této fázi dochází k eluci purifikované DNA do sterilní mikrozkušavky.).
11. Centrifugovat 6000 g 5 minut.
12. DNA je připravena pro další analýzy.

13.5.2. Rozlišení *B. xylophilus*, *B. mucronatus* a *B. vallesianus* na úrovni rDNA pomocí PCR RFLP

Prvním krokem pro rozlišení výše uvedených druhů významných háďátek rodu *Bursaphelenchus* pro podmínky ČR je amplifikace cistronu rDNA na templátu izolované nukleové kyseliny. Doporučujeme nejprve oslovit naše pracoviště pro poskytnutí referenčního

materiálu pro diagnostiku těchto druhů háďátek. Pozitivní kontrola by se měla stát nedílnou součástí každé detekce. Pro amplifikaci doporučujeme primery nasedající univerzálně na cistron rDNA F 5'- TTG ATT AGG TCC CTG CCC TTT - 3' a R 5'- TTT CAC TCG CCG TTA CTA AGG - 3' (Braasch et al., 1999, 2004).

Reakční podmínky:

- | | |
|--|-----------------|
| 1. pufr pro Taq polymerázu (Fermentas) - | 2,5 µl |
| 2. MgCl ₂ - | 1,5µl |
| 3. Taq polymeráza (1,5 U)(Fermentas) - | 0,5 µl |
| 4. dNTP (každého nukleotidu 200mM) - | 0,25 µl |
| 5. primer mix (15 pmol) - | 0,4 µl |
| 6. izolovaná DNA - | 1,0 - 10 µl |
| 7. ddH ₂ O - | 9,85 – 18,85 µl |

Koncentraci DNA doporučujeme v případě neúspěšné amplifikace změnit, ideální je postup s využitím koncentrační řady NA. Pro následné restrikční štěpení bude využito cca 50 µl PCR produktu, je tedy nutné připravit od každého vzorku minimálně tři reakce.

Program pro termocyklér:

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

Program byl optimalizován v podmínkách naší laboratoře na termocykleru MJ Research PTC 200. Produkty PCR je vhodné nejprve zkontrolovat pomocí horizontální agarózové elektroforézy (1% gel) a poté přistoupit k další analýze. PCR produkty je nutné připravit pro nanášení do gelu. Do mikrozkušavek odpipetujeme 5 µl produktu a přidáme 1 µl barviva pro elektroforetickou separaci (nanášecí barvivo – Loading dye). Barvivo kromě barev obsahuje i glycerol, který umožní nanášení produktu do jamek elektroforetického gelu.

Příprava 1% agarózového gelu:

1. Navážit požadované množství agarózy do Erlenmayerovy baňky.
2. Agarózu promíchat s TBE pufrem.
3. Mírně povařit v mikrovlnné troubě za průběžného promíchávání.

4. Zchladit pod proudem vody na 50-60 °C.
5. Připipetovat 5% (objemu gelu) ethidium bromidu (0,5 µg/ml), opatrně zamíchat a nalít do předem připravené vaničky s hřebenem.
6. Po ztuhnutí gelu hřeben vyjmout a vaničku uložit do horizontálního elektroforetického aparátu.
7. Zalít připraveným elektroforetickým pufrem (TBE).

Příprava TBE

Připravujeme zásobní roztok 5x koncentrovaný (uchovat ve 4°C).

Na 1 l TBE 5x pH (8,0)

TRIS - 54,5 g

Kyselina boritá - 27,5 g

EDTA - 3,65 g

Pro rozlišení výše uvedených háďátek je tedy nezbytné podrobit amplifikovaný fragment restriknímu štěpení pěti vybranými restrikními endonukleázami. Pro tento účel jsou etablované tyto restriktázy : RsaI, HaeIII, MspI, HinfI, AluI (Fermentas).

1. Do sterilní mikrozkušavky napipetovat 10 µl PCR produktu.
2. Přidat 1,1 µl 10x reakčního pufru, 0,8 µl restrikní endonukleázy a důkladně promíchat.
3. Inkubovat 9-12 h při teplotě vhodné pro danou RE, tedy 37 °C ve vodní či suché lázni.
4. Naštěpenou DNA lze ihned analyzovat na 1,5% agarózovém gelu, nebo skladovat při – 20 °C.

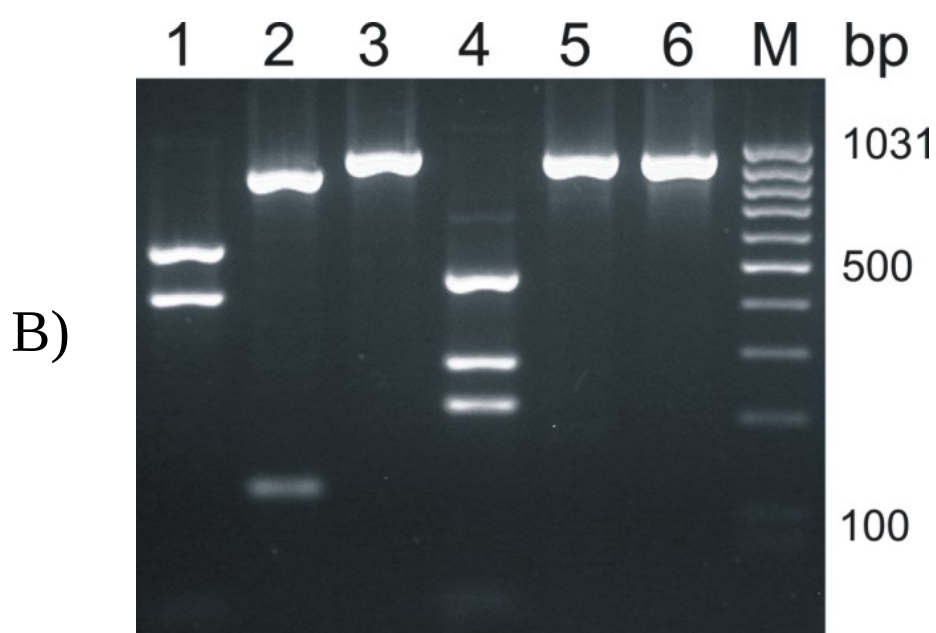
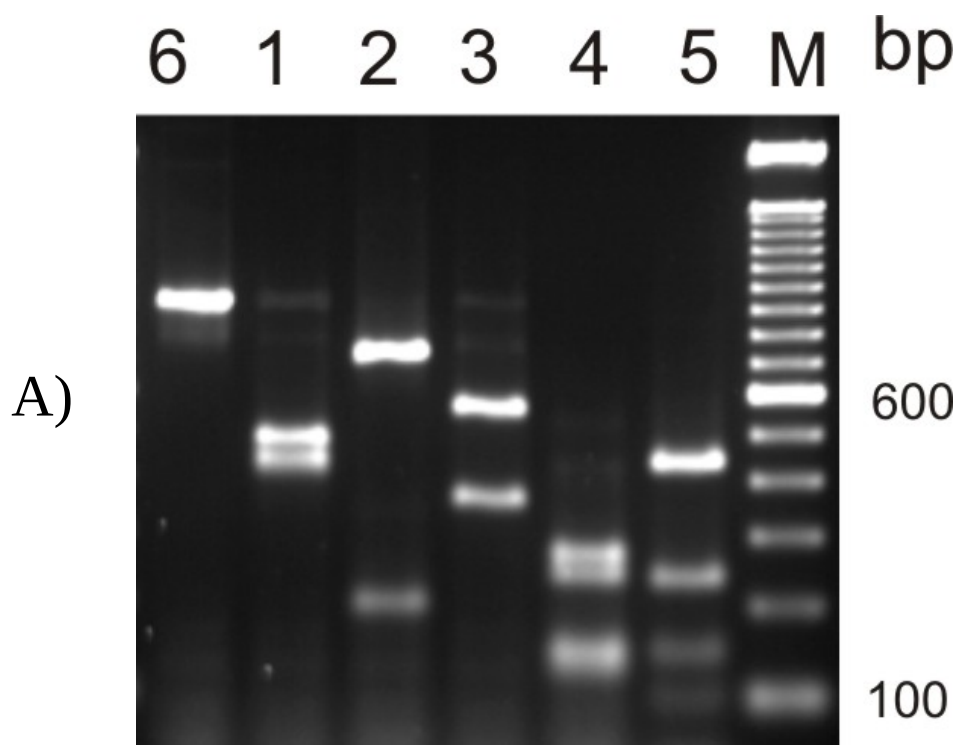
Po restrikním štěpení porovnáme motivy vzniklých bandů s markery uvedenými v této publikaci. V případě shody připraveného restrikního profilu s markerem lze usuzovat na přítomnost konkrétního druhu háďátka ve vzorku. Jestliže se připravený profil liší, jedná se o jiný druh.

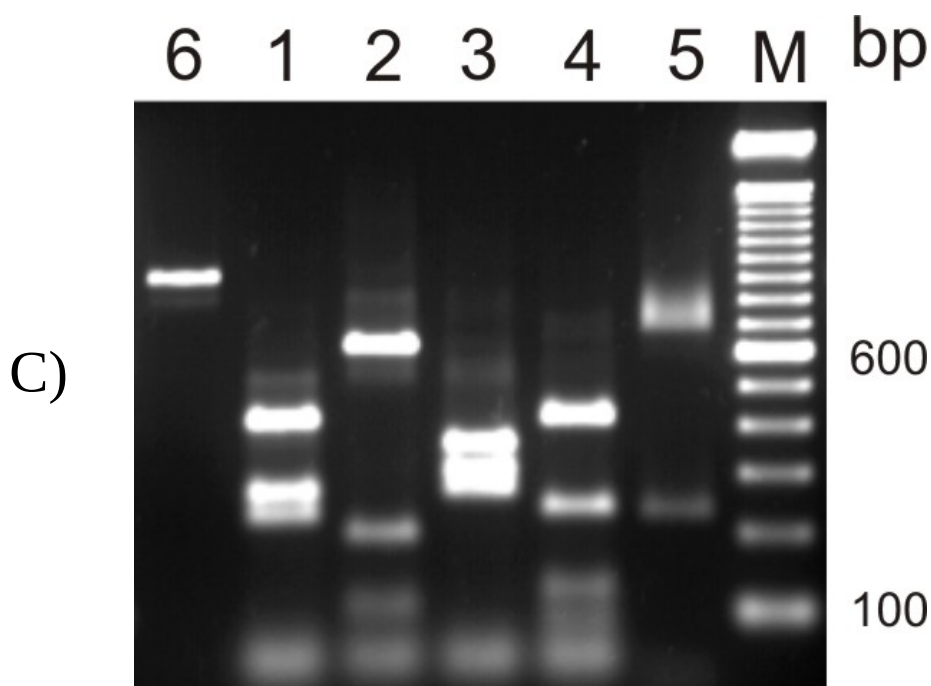
Výsledek restrikčního štěpení části cistronu rDNA háďátek

A) *B. xylophilus* B) *B. vallesianus* C) *B. mucronatus*

M-molekulární marker

1. restrikční endonukleáza RsaI
2. restrikční endonukleáza HaeIII
3. restrikční endonukleáza MspI
4. restrikční endonukleáza HinfI
5. restrikční endonukleáza AluI
6. neštěpený produkt





Závěr

Háďátka rodu *Bursaphelenchus* v čele s karanténním *B. xylophilus* vnesly do nematologie nové světlo a to v celosvětovém významu. Jejich hospodářská význam, snadné šíření, krátký životní cyklus a vysoké ekonomické ztráty jsou faktory, které staví tato háďátka v současné době na první místo zájmu nematologů. Diagnostika háďátek rodu *Bursaphelenchus* zaznamenala od svého počátku značný rozvoj. K základním morfologicko-anatomickým metodám se postupem času přiřazovaly i metody na molekulární úrovni. Rozlišení karanténního druhu od ostatních tak již není závislé jen na hodnotiteli a jeho praktických zkušenostech v diagnostice háďátek, ale univerzálnost molekulárních metod umožňuje rychlou, přesnou a opakovatelnou diagnostiku i na pracovištích, kde nematologie není nosným oborem. V rámci inkorporace ČR do EU se vytvořili dobré materiální základy v podobě vybavených laboratoří na úseku Státní rostlinolékařské správy. Tato skutečnost umožňuje využívání těchto metod pro potřeby praxe.

Seznam citované literatury

- Braasch, H., Metge, K., Burgermeister, W. (1999): *Bursaphelenchus* species in conifers in Germany and their ITS-RFLP pattern. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdiensts 51: 312-320.
- Braasch, H., Schonfeld, U., Polomski, J., Burgermeister, W. (2004): *Bursaphelenchus vallesianus* sp. N. – a new species of the *Bursaphelenchus sexdentati* group (Nematoda: parasitaphelenchidae) Nematol. Medit. 32: 71-79.
- Břicháček, B., Krčmář, M. (1993): Molekulárně biologické metody ve virologické diagnostice, IDVPZ Brno, 86 s.
- Courtney, W. D., Polley, D., Miller V. L. (1955): TAF, an improved fixative in nematode technique. Plant Disease and Reproduction 39: 570-571.
- Davis, G. R. M., Davies, K. A. Morris, K., Thomas, W. K. (2003): Evolution of Parasitism in Insect-transmitted Plant Nematodes. Journal of Nematology 35 (2): 133-141.
- Evans, H. F., McNamara, D. G., Braasch, H., Chadoeuf, J., Magnusson, C. (1996) Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 26: 199-249.
- Hunt, D. J. (1993): Aphelenchida Longidoridae and Trichodoridae Their systematics and Bionomics. CABI, 352 p.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. (1990): PCR Protocols: A guide to methods and applications. San Diego, Academic Press Inc., 416 p.
- Křemen, J., Pohlreich, P., Stříbrná, J. (1998): Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně. Karolinum Praha, 117 s.
- Kosaka, H., Aikawa, T., Ogura, N., Tabata, K., Kiyohara, T. (2001): Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: the induced resistance of pine trees by the avirulent isolates of nematode. European Journal of Plant Pathology 107: 667–675.
- Li, G. W.; Shao, G. Y.; Huo, Y. L.; Xu, F. Y. (1983): Discovery of and preliminary investigations on pine wood nematodes in China. Forest Science and Technology 7: 25-28.
- 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.

- Mamiya, Y.; Enda, N. (1979): *Bursaphelenchus mucronatus* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae) from pine wood and its biology and pathogenicity to pine trees. *Nematologica* 25: 353-361.
- Mota, M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas¹, A. C., Burgermeister, W., Metge, K., Sousa, E. (1999): First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Journal of Nematology* 7: 727-734.
- Matsunaga, K., Togashi, K. (2004): Among-tree difference in the inhibition of systemic dispersal of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Pinus densiflora*. *Appl. Entomol. Zool.* 39 (2): 271–277.
- Penas, A.C., Correia, P., Bravo, M. A., Mota, M., Tenreiro, R. (2004): Species of *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Parasitaphelenchidae) associated with maritime pine in Portugal. *Nematology* 3: 437-453.
- Rosypal, S. (2000): Úvod do molekulární biologie. Brno, 996 s.
- Schrader, G., Unger, J. G. (2003): Plant quarantine as a measure against invasive alien species. The framework of the International Plant Protection Convention and the plant health regulations in the European Union. *Biological Invasions* 5: 357–364.
- Steiner, G.; Buhner, E. M. (1934): *Aphelenchoides xylophilus* n. sp. A nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. *Journal of Agricultural Research* 48: 949-955.
- Suzuki, K. (2002): Pine wilt disease – a threat to pine forest in Europe. *Dendrobiology* 48: 71–74.
- Togashi, K., Matsunaga, K. (2003): Between-isolate difference in dispersal ability of *Bursaphelenchus xylophilus* and vulnerability to inhibition by *Pinus densiflora*. *Nematology* 5(4): 559-564.
- Vachtenheim, J., Duchoň, J. (1992): Molekulární biologie pro mediky a lékaře. Od klonování DNA po lékařské aplikace. UK Praha, 175 s.

Některé fotografie a schémata byla převzata z veřejně přístupných webových stránek.

<http://www.uochb.cas.cz/~natur/cerambyx/>

<http://www.egbeck.de/skripten/13/bs13-10.htm>

<http://www.246.ne.jp/~takeru/chalk-less/lifesci/images/pcr.gif>

Poznámky

Kontakt na kolektiv autorů: Katedra ochrany rostlin ČZU v Praze, Kamýcká 129, Praha 6 Suchbát, 165 21, e-mail: zouhar@af.czu.cz, tel.: +420224382611.



Název: Diagnostika významných hád'átek rodu *Bursaphelenchus*
(metodika pro potřebu praxe)

Autor: kolektiv autorů

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Povoleno: Děkanátem AF

Tisk: PowerPrint, ČZU-Kamýcká ul., Praha 6 Suchdol

Náklad: 30

Počet stran: 46

Doporučená cena: 150,- Kč

Vydání: první

Rok vydání: 2007

ISBN: 978-80-213-1613-3