

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

***Radopholus similis* a jeho diagnostika
na různých úrovních (metodika pro praxi)**

Název: *Radopholus similis* a jeho diagnostika na různých úrovních
(metodika pro praxi)

Autoři: Zouhar M., Mazáková J., Gaar V.

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Povoleno: Děkanátem AF

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

Náklad: 30

Počet stran: 25

Doporučená cena: 150,- Kč

Vydání: první

Rok vydání: 2008

ISBN: 978-80-213-1766-6



Zouhar M., Mazáková J., Gaar V.

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

***Radopholus similis* a jeho diagnostika
na různých úrovních (metodika pro praxi)**

Zouhar Miloslav, Mazáková Jana, Gaar Vladimír

© Miloslav Zouhar

ISBN:978-80-213-1766-6

Radopholus similis a jeho diagnostika na různých úrovních (metodika pro praxi)

Autoři metodiky: M. Zouhar, J. Mazáková, V. Gaar

Obsah

1. CÍL METODIKY A DEDIKACE.....	- 2 -
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	- 2 -
2.1. ÚVOD	- 2 -
2.2. CHARAKTERISTIKA HÁDÁTEK RODU RADOPHOLUS	- 3 -
2.2.1. Morfologie	- 3 -
2.2.2. Vývojový cyklus	- 3 -
2.2.3. Hostitelský okruh	- 4 -
2.2.4. Taxonomické zařazení	- 4 -
2.2.5. Rozšíření, škodlivost a ochranná opatření	- 4 -
2.3. DIAGNOSTICKÉ METODY	- 6 -
2.3.1. Odběr vzorků	- 7 -
2.3.1.1. Metoda	- 7 -
2.3.2. Extrakce háďátek z biologického materiálu	- 7 -
2.3.2.1. Metoda	- 7 -
2.3.3. Diagnostika na úrovni komparativní mikroskopie	- 8 -
2.3.3.1. Přehled	- 8 -
2.3.3.2. Příprava nativních a trvalých preparátů	- 9 -
2.3.4. Diagnostika na úrovni nukleových kyselin	- 10 -
2.3.4.1. Izolace nukleových kyselin	- 10 -
2.3.4.1.1. Přehled	- 10 -
2.3.4.1.2. Metoda	- 11 -
2.3.4.2. Polymerázová řetězová reakce a její využití pro detekci a determinaci fytoparazitických háďátek	- 13 -
2.3.4.2.1. Přehled	- 13 -
2.3.4.2.2. Metoda	- 17 -
2.3.4.3. Agarózová elektroforéza – frakcionace fragmentů DNA ve stejnosměrném elektrickém poli	- 18 -
2.3.4.3.1. Přehled	- 18 -
2.3.4.3.2. Metoda	- 19 -
2.3.4.4. Restrikční štěpení jako klíč pro determinaci rostlinně parazitických háďátek	- 20 -
2.3.4.4.1. Přehled	- 20 -
2.3.4.4.2. Metoda	- 21 -
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	- 25 -
4. ZÁVĚR.....	- 25 -

1. Cíl metodiky a dedikace

Cílem této metodiky je poskytnout pracovníkům řešícím v České republice problematiku týkající se výzkumu fytoparazitických háďátek základní informace o technikách diagnostiky těchto škodlivých organismů na úrovni morfologie i molekulární biologie a poskytnout tak snadno dostupný metodický materiál pro zavádění těchto metod do rutinní praxe. Metodika vznikla za finanční podpory MZe a je výstupem řešení projektu NAZV QF4156 „Vývoj diagnostických metod pro determinaci karanténních háďátek z rodů *Aphelenchoides*, *Bursaphelenchus*, *Xiphinema* a *Radopholus*“.

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Úvod

Fytoparazitická háďátka patří do skupiny organismů, která bývají oku rostlinolékaře často utajena. Malé tělesné rozměry a v mnoha případech nespecifické příznaky napadení rostlin jsou důvodem pro časté podceňování významu těchto parazitů. Symptomatické diagnostické metody používané ve fytopatologii a speciální rostlinné parazitologii mohou, v tomto případě selhat, neboť napadení rostlin háďátka bývá zaměňováno s celou řadou bakteriálních či houbových onemocnění (Hunt, 1993). Nezůstává bez povšimnutí, že háďátka vynikají nadprůměrnou rezistencí vůči nepříznivým podmínkám, snadno se přizpůsobují novým agroekosystémům, do kterých jsou introdukovány. Vzhledem k rozměrům od 0,1 mm do několika milimetrů, biologii a bionomii není boj s těmito fytoparazity jednoduchý. Všechny druhy mají typický, protáhlý, hadovitý tvar těla a to alespoň v některých fázích vývoje. Při získávání potravy poškozují buňky různých rostlinných pletiv. Některé druhy háďátek pronikají z půdy do rostlin, kde žijí v mezibuněčných prostorách. Na napadených částech se objevují výrazné deformace nebo části pletiv zcela odumírají. Háďátka jsou schopna přežít řadu let bez potravy a to i ve zcela suchém prostředí, řady druhů vynikají schopností anhydrobiózy, která jim umožňuje přecházet do stavu hybernace a přežít tak nepříznivé období. Jako příklad lze uvést háďátka rodu *Anquina*, které bylo objeveno v botanických sbírkách, ve kterých setrvala v životaschopném stavu po dobu několika desítek let (Siddiqui, 2000). Tuto schopnost lze sledovat i u dalších rodů, jakými jsou *Aphelenchoides*, *Ditylenchus*. Anhydrobióza je jednou nikoli jedinou schopností háďátek jak překonat nepříznivé podmínky pro jejich zdárný vývoj. Ve vývojových cyklech mnoha rodů lze naléznout klidová stadia, která mohou přežít bez hostitele řadu let. Rody *Globodera*, *Heterodera* *Punctodera*, jsou řazena do skupiny sedenterních háďátek a jejich klidové

stadium zvané cysta (obal samičky naplněný vajíčky) je schopna přežít v půdě bez hostitele několik let, přičemž výjimkou nejsou ani klimaticky velmi nepříznivé pouštní oblasti. Další vlastností, která staví háďátka do pozice významných parazitů rostlin, je rychlost vývoje. Dokončení vývojového cyklu za méně než tři týdny není nic neobvyklého (Powers et al., 1997). Jak již bylo řečeno, boj s fytoparazitickými háďátky je nelehkou úlohou, proto je nezbytné využít přesné, rychlé a citlivé diagnostické metody pro včasné zjištění ohniska napadení (osivo, sadba, porost) a umožnit tak eradikaci těchto parazitů rostlin.

2.2. Charakteristika háďátek rodu *Radopholus*

2.2.1. Morfologie

Háďátka rodu *Radopholus* jsou základními morfologickými znaky i rozměry podobná rodu *Pratylenchus*. Je pro ně charakteristický silný sexuální dimorfismus (Kaplan & O'Bannon, 1985). Na kutikule se nevytvářejí žádné výrůstky, samičky mají rovnoměrně vyvinuté dva vaječníky nebo méně často je zadní vaječník více nebo méně redukován, degenerován a nefunkční. U samiček jsou hlavové pyskové papily slabě vyvinuté, laterální sektor je úzký, ale rozšiřuje se směrem dozadu až k poslednímu prstenci. Jícnové žlázy překrývají střevo. Ocas je dlouhý 2 – 4 μm , směrem ke konci se zužuje a samotný konec ocasu je buď zakulacený, nebo mírně zašpičatělý. Fasmidy mohou být lokalizovány uprostřed ocasu nebo v přední části ocasu. Pyskové papily samečků jsou dobře patrné, zakulacené. Oblast hlavy je slabě sklerotizovaná, stylet robustní, v bazální části silně knoflíkovitě rozšířený. Bursa kopulatrix je dobře patrná. Spikula je párová a rovněž dobře patrná. Tato metodika je zaměřena na determinaci karanténního druhu *Radopholus similis*, zde jsou uvedeny jeho základní tělesné rozměry použité pro jeho morfometrickou determinaci. Samička: (n=12) : L = 0,52 - 0,88 (0,69) mm, a = 22-30 (27), b = 4,7-7,4 (6,5), b' = 3,5-5,2 (4,5), c = 8-13 (11), c' = 2,94,0 (3,4), V = 55 - 61 (56), st = 17-20 (19) μm , H = 9-16 (12). Samec: (n = 5): L = 0,59 - 0,67 (0,63) mm, a = 31-44(35), b = 6,1-6,6 (6,4), b' = 4,1-4,9 (4,8), c = 8-10 (9), c' = 5,1-6,7 (5,7), st = 12-17 (14) μm , spikula = 19-22 (20) μm , gubernakulum = 8-12 (9) μm , H = 7-11 (9) μm . (Ryss, 1988).

2.2.2. Vývojový cyklus

Háďátka rodu *Radopholus* patří mezi kořenová endoparazitická háďátka. Háďátka mohou prodělat celý vývojový cyklus uvnitř kořenů. Běžný cyklus je pohlavní, ovšem je možný i partenogenetický vývoj. Oplozené samičky mohou nést sperma ve svých spermatékách celý život. Za příznivých podmínek kladou vajíčka (cca. 6 denně), z nichž se posléze vyvíjejí larvy. Ty se třikrát svlékají a dospívají, cyklus se opakuje. Při optimálních podmínkách je cyklus dokončen za 18-20 dní.

V jednom gramu kořenové hmoty napadených rostlin lze naléznout cca desítky až stovky jedinců háďátek.

2.2.3. Hostitelský okruh

Do hostitelského okruhu těchto fytoparazitů spadá několik stovek rostlinných druhů. Primárními hostiteli těchto háďátek jsou: banánovník (*Musa* sp.) pepř černý (*Piper nigrum*), citrus (*Citrus* sp.), okrasné rostliny patřící do čeledi *Araceae* (*Anthurium* sp., *Epipremnum* sp., *Philodendron* sp., *Spathiphyllum* sp., *Syngonium* sp.), do čeledi *Marantaceae* (*Calathea* sp., *Maranta* sp.) a do čeledi *Zingiberaceae* (*Hedychium* sp., *Zingiber* sp.). Mezi další hostitelské druhy patří: areková palma (*Areca cathecu*), kokosová palma (*Cocos nucifera*), kávovník (*Coffea* sp.), *Chamaedorea elegans*, cukrová třtina (*Saccharum officinale*), čajovník (*Camellia sinensis*) a kurkuma dlouhá (*Curcuma domestica*) (Riley & Kelly, 2001).

2.2.4. Taxonomické zařazení

Taxonomie je stále vyvíjejícím se oborem a orientovat se ve spleti názvů, synonym a akronym není často snadné. Autoři metodiky se přiklání k zařazení podle Maggenti et al., (1987).

Kmen: *Nematoda* RUDOLPHI, 1808

Třída: *Secernentea* VON LINSTOW, 1905

Podtřída: *Tylenchia* INGLIS, 1983

Řád: *Tylenchida* THORNE, 1949

Podřád: *Tylenchina* CHITWOOD, 1950

Nadčeď: *Tylenchoidea* ORLEY, 1880

Čeď: *Pratylenchidae* THORNE, 1949

Podčeď: *Pratylenchinae* THORNE, 1949

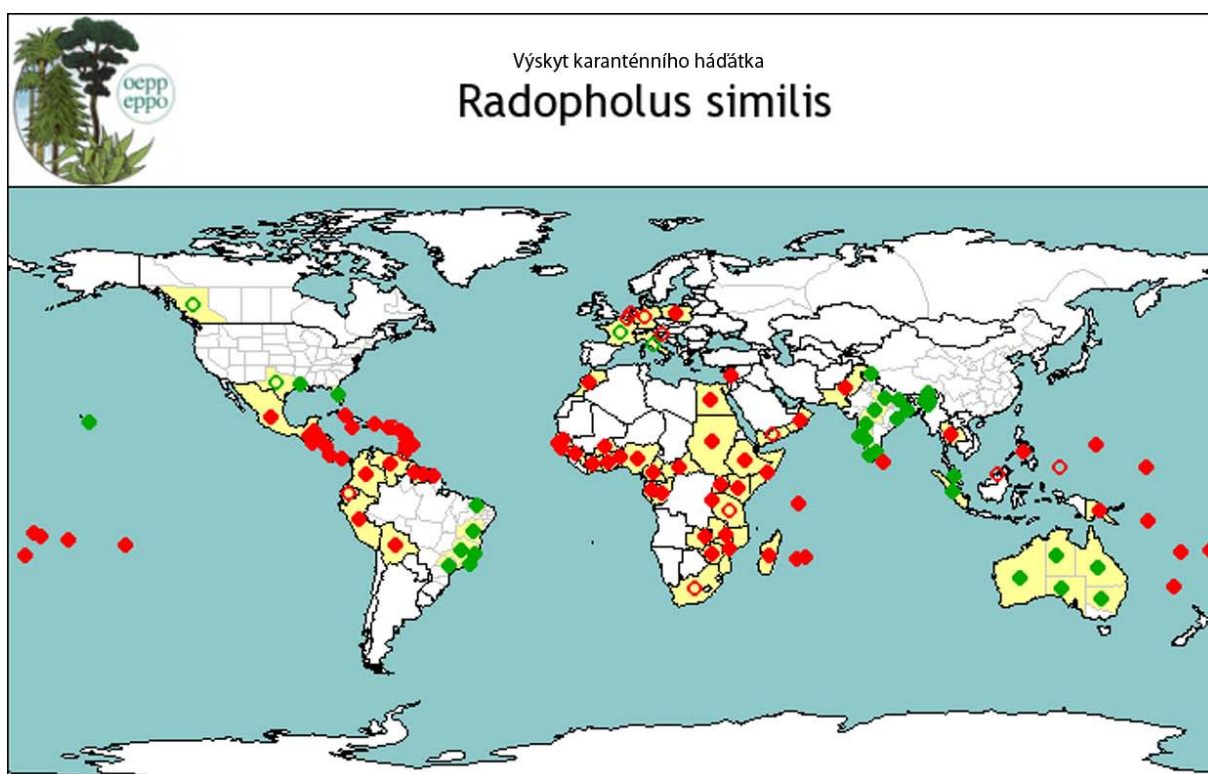
Rod: *Radopholus* THORNE, 1949

K rodu *Radopholus* je v současné době řazeno více než dvacet pět druhů.

2.2.5. Rozšíření, škodlivost a ochranná opatření

Radopholus similis je celosvětově rozšířené háďátko, zejména pak v rovníkových oblastech. Bylo nalezeno na okrasných rostlinách ve sklenících v Evropě: Belgie, Francie, Německo, Itálie a Holandsko, dále pak v Asii: Brunej, Darussalam, Indie (Arunadal Pradesh, Goa, Karnataka, Kerala, Madhya Pradesh, Maharashtra, Orissa, Tamil Nadu), Indonésie (Sumatra), Libanon, Malajsie (Peninsular), Oman, Pakistan, Filipíny, Srí Lanka, Thajsko, Yemen, dále pak v Africe: Burundi,

Cameron, Střední Afrika, Kongo, Egypt, Etiopie, Gabon, Ghana, Guinea, Keňa, Madagaskar, Malawi, Mauricius, Mozambik, Nigerie, Réunion, Senegal, Seychely, Somálsko, Jižní Afrika, Sudan, Tanzanie, Zambie, Zimbabwe, dále pak v severní Americe: Kanada, USA (Arizona, Kalifornie, Florida, Louisiana, Texas), dále pak v střední Americe a Karibiku: Barbados, Belize, Costa Rica, Kuba, Dominica, Dominikánská republika, Guadeloupe, Guatemala, Honduras, Jamajka, Martinik, Panama, Puerto Rico, St. Kitts a Nevis, St. Lucia, St. Vincent a Grenadines, Trinidad a Tobago, Spojené státy panensk. Ostrovů, dále pak v jižní Americe: Brazílie, Kolumbie, Ekvádor, Franc. Guiana, Guiana, Peru, Surinam, Venezuela.



Na mapě převzaté z informačního bulletinu EPPO je znázorněn hlášený výskyt hádátka *R. similis* na národní úrovni (červeně) a hlášený výskyt na podnárodní úrovni (zeleně).

Hádátka rodu *Radopholus* jsou migrující endoparazité, kteří cizopasí na kořenech hostitelských rostlin. Inhibují příjem vody a živin, rostliny slábnou, růst a vývoj se zpomaluje a sklizeň je rapidně snížena. Hostitelský okruh tohoto rodu je velmi rozsáhlý. Největší škody způsobují druhy *Radopholus similis* a *Radopholus citrophilus*, a to na ovocných stromech, zejména na citrusech a banánovnících v tropech a subtropích. Sklizňové ztráty, způsobené těmito endoparazity, se pohybují v rozmezí 5 – 100 % a jsou ovlivněny mnoha faktory, mezi něž patří například půdní typ nebo klima. Pro ochranu rostlin proti fytoparazitickým hádátkům jsou doporučovány tři kurativní strategie (aplikace nematocidů, použití fyzikálních metod, aplikace bioagens). První z nich je aplikace fumigujících či nefumigujících nematocidů (Webster, 1972). Tato varianta v ČR není použitelná, neboť

většina účinných přípravků není v registru pesticidů ČR zařazena. V registru přípravků jsou registrovány pouze pro okrasné rostliny proti půdním hádátkům: Basamid Granulát (dazomet), Dursban 10G (chlorpyrifos) a Dursban 480EC (chlorpyrifos). Většinou se aplikují do půdy před setím a výsadbou, Dursban 480 EC se používá ve formě závlaky k rostlinám. Fyzikální metody jsou využitelné pro asanaci semen a sadby, použít lze moření horkou vodou. U napadeného osiva, hlíz, či rostlin sadby je časté ošetření vodou při teplotě 43,5 °C, po dobu 30 minut. Pro ošetření výsevního substrátu lze doporučit propařování půdy při teplotě 90-95 °C po dobu 15-20 minut. Pro volné výsadby je možné v teplejších klimatických pásmech využívat solarizace, kdy půda je zakryta polyetylenovou folií a vystavena v průběhu léta po dobu až 3 týdnů slunečnímu záření. Dochází k prohřátí půdního profilu do hloubky 20-25 cm a k eradikaci majoritního podílu půdní mikrofauny. V ČR je aplikace této metody omezena klimatickými podmínkami. Aplikace bioagens je v posledních deseti letech takřkajíc číslem jedna pro rozsáhlou nematologickou komunitu (Duan et al., 2003). Jako bioagens je možné použít grampozitivní bakterie *Pausteria penetrans*, které omezují množení hádátek a možnost invazních larev penetrovat do kořenů (Jaffee et al., 1998). Nematofágní houby patří k nejvýznamnějším nepřátelským organismům hádátek. Vyskytují se téměř ve všech půdách, především v půdách s dostatečným obsahem organických látek. Nejvýznamnější a také nejčastější nematofágní houby patří do řádu Moniliales (Hyphomycetes) ze skupiny hub nedokonalých fungi imperfecti. Nematofágní houby z řádu Moniliaes jsou jak endo, tak ektoparazity. Smrt hádátka není způsobena pravděpodobně jen mechanickým poškozením, ale i působením toxických látek („Nematotoxin“) produkovaných nematofágními houbami. V kompostech a mulčích byla zjištěna zvýšená aktivita výše uvedených nematofágních hub. Z tohoto hlediska lze doporučit zapravování organické hmoty ve formě například kompostů jako jednu strategii napomáhající k selektivnímu snížení infestace půdy hádátka (Gené et al., 2005, Jensen et al., 1997, Morton et al., 2004, Perssonová & Jansson, 1999).

2.3. Diagnostické metody

Aplikace vhodných metod diagnostiky pro určení diagnózy onemocnění rostlin je pro pěstitele prvním a bezpochyby nejpodstatnějším krokem při integrované produkci zemědělských komodit. Metody diagnostiky fytoparazitických hádátek vycházejí z jejich morfometrických znaků. Dichotomické klíče jsou základním prvkem při diagnostice hádátek. S vývojem diagnostických metod vstupují i na pole nematologie nové metody, využívající různých biochemických charakteristik jako markerů taxonů. V této metodice jsou uvedeny metody detekce a determinace na úrovni morfologických komparativních technika, dále pak na úrovni CAPS markerů.

2.3.1. Odběr vzorků

2.3.1.1. Metoda

Odběr vzorků kořenových háďátek je možné zaměřit na odběr rostlinné hmoty i na odběr půdních vzorků. Pro snadný, rychlý a přesný monitoring výskytu je tedy vhodné odebírat části rostlin, které vykazují symptomy napadení fytoparazitickými háďátky, tedy deformace, nekrózy, případně hniloby. Účelem je odebírat části rostlin s příznaky a části v horizontální úrovni nad těmito částmi. Pakliže jsou rostliny napadeny, je pravděpodobné, že v nekrotických kořenech bude menší podíl háďátek než v kořenech do této chvíle bez příznaků. Odběr půdních vzorků sleduje prokořenění půdy. Z tohoto profilu je vhodné odebírat vzorky a to často i s kořeny rostlin. Pakliže jsou háďátka přítomna, pak v profilu kořenového systému.

V procesu monitoringu není vhodné používat polyetylenové či jiné neprodyšné pytlíky, dochází pak ke zvýšení teploty a háďátka ztrácí schopnost pohybu či umírají, což může nežádoucím způsobem ovlivnit monitoring. Vzorky půdy či kořenů je vhodné umístit do chladu (10°C) a to pouze na nezbytnou dobu, tak aby nedošlo k multiplikaci populací saprofytických rodů, které znesnadňují detekci zástupců fytoparazitických háďátek.

2.3.2. Extrakce háďátek z biologického materiálu

2.3.2.1. Metoda

Odebrané vzorky uložené v papírových sáčkích je nutné rozdělit na tři části, první část bude podrobena izolaci háďátek ihned a další dvě je vhodné umístit zpět do chladicího boxu při 4-10 °C, jako zálohový referenční materiál. Dělením vzorků se rozumí rozdělení každého vzorku na tři zhruba stejné části. Pro extrakci háďátek rodu *Radopholus* lze využít zejména metodu sedimentační sítovou.

Sedimentační sítová metoda je založena na stejném principu jako Baermannova nálevka, jejíž



využití pro tento rod není optimální vzhledem k rozměrům háďátek. 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 (buničinou se rozumí materiál neuvolňující drobné chloupky, ideálně pak ubrousky ROTH (P-lab R008721) a na ní pak půdní vzorek, či vzorek kořenové hmoty, které se přikryjí druhou vrstvou buničiny.



Do spodní misky s pevným dnem se nalije voda (běžná voda z vodovodního řádu) a do ní se pak umístí miska s materiálem určeným pro izolaci. Hladina vody by neměla listy zaplavit. Hádátka budou přirozeně migrovat z materiálu a shromažďovat se ve spodní misce. Doporučená doba plavení je cca 9-12 hodin. Suspenze háďátek ze spodní misky se přefiltruje pomocí síta s velikostí otvorů 0,025 mm. Suspenzi háďátek lze skladovat bez poškození i několik dní při 4°C.

2.3.3. Diagnostika na úrovni komparativní mikroskopie

2.3.3.1. Přehled

Dichotomické klíče pro determinaci taxonů háďátek jsou určeny k porovnávání morfologických znaků a naměřených hodnot s hodnotami popsány a umožňují tak determinaci háďátka ve vzorku. V tomto ohledu lze pracovat s nativními či trvalými preparáty. Obě skupiny skýtají řadu výhod i nevýhod. Nativní preparáty se snadno připravují a háďátka z preparátů je možné posléze využít pro další techniky, s háďátkem lze rovněž manipulovat. Pro sledování nativních preparátů je velmi obtížné použít „mokré“ imersní objektiv, což je v celé řadě případů zcela nezbytné. Nativní preparáty nelze skladovat déle než několik hodin. Trvalé preparáty lze skladovat po dobu několika desítek let a slouží i jako referenční materiál. Při jejich pozorování lze používat mokré imersní objektivy. Hádátka z trvalých preparátů lze jen velmi obtížně použít pro aplikaci dalších technik, není možné s nimi manipulovat bez poškození trvalého preparátu. Pro sledování infrastruktury háďátek doporučujeme využít Nomarskiho kontrast, provedení mikroskopické komparativní diagnostiky se tím usnadní. Měření jednotlivých morfologických charakteristik je také podmíněno technickým vybavením laboratoře. Optimálním řešením je digitální kamera na trinokuláru mikroskopu a vhodný software pro měření a ukládání hodnot. V krajním případě lze využít měřicího okuláru a kalibrovat objektivy pomocí měřítka na podložním sklíčku. Konec konců v dobách, kdy dichotomické klíče vznikaly, tomu nebylo jinak.

2.3.3.2. Příprava nativních a trvalých preparátů

Pro detekci a determinaci háďátek rodu *Radopholus* na úrovni morfologických a anatomických znaků je vhodné použít jak nativních preparátů, tak preparátů fixovaných. Příprava nativních preparátů háďátek je obdobná jako v případě přípravy jiných nativních preparátů pro světelnou mikroskopii. Tedy do kapky vody na podložním sklíčku přemístíme pomocí nematologické jehly několik jedinců háďátek a zakryjeme krycím sklíčkem. Není třeba se obávat rozdrcení háďátek, jejich rozměry jsou v případě rodu *Radopholus* příliš malé. Rozdílem od přípravy nativních preparátů například hub, či rostlinného pletiva je fakt, že háďátka se pohybují. Pro tento případ lze použít anesteziologické techniky umožňující pozorování morfologických charakteristik použitelných pro determinaci háďátek. Anestézie může být provedena fyzikálně či chemicky, a vyžaduje určitou zkušenost, tak aby háďátka nebyla usmrcena, neboť v takovém případě bývají jak vnitřní tak řada vnějších struktur neidentifikovatelné. Nejjednodušší metodou je zahřátí preparátu nad lihovým kahanem a to na dobu nezbytně nutnou (tuto dobu je nutné odzkoušet). Jako detekční kritérium pro úspěšnou anestézii lze považovat fakt, že se háďátka přestanou hýbat a jejich struktury nejsou poškozeny. Pro anestézii lze rovněž využít CO₂ a to ve formě malých kousků suchého ledu přiložených do blízkosti háďátek, je ale nutné brát zřetel na velmi nízkou teplotu: „Preparát nesmí zmrznout!“ Dále doporučujeme aplikaci dichlor-etyl-éteru (Fluka 35650). Je vhodné připravit zásobní roztok v koncentraci 0,1 % a ten použít přímo pro anestézii. Po úspěšné anestézii jsou háďátka připravena pro světelnou mikroskopii.



Sada nástrojů pro manipulaci s háďátky.

Po několikaletých zkušenostech s fixací lze doporučit metodu fixace pomocí roztoku TAF: 7 ml 40 % formalínu, 2 ml trietanolaminu, 91 ml destilované vody. TAF vykazuje velmi dobré výsledky co do

zřetelnosti detailu a vysoké stability sloučeniny (Southey, 1985). Pro práci s hádátky lze s úspěchem využít skleněnou misku s konkávním dnem (ED – embryonal dishes). Hádátka pomocí nematologické jehly přemístíme do 20 µl vody (cca 20 ks), 2 ml fixativu zahřejeme na 80 °C a pak pomocí Pausterovy pipety rychle přepipetujeme do mikroskopické misky s hádátkou. Takto připravená hádátka uložíme v laboratorní teplotě minimálně na 10 dnů. Tímto způsobem lze fixovaná hádátka skladovat i po několik let. Takto fixovaná hádátka lze použít pro přípravu permanentních glycerolových preparátů. Na podložní sklíčko s jamkou napipetujeme 10 % glycerol a do něj přemístíme hádátka, klademe důraz na to, aby všechna hádátka byla pod hladinou glycerolu. Podložní sklíčko inkubujeme při 60 °C až do doby odpaření maximálního množství vody, tento fakt ověříme vizuálně (glycerol zhoustne na koncentraci 99 % glycerolu). Inkubaci několikrát (1x za 5 minut) přerušíme a preparát necháme vychladnout (30 sekund). V průběhu odpařování je nezbytné ověřovat množství glycerolu v jamce a případně jej doplnit tak, aby nedošlo ke zničení hádátek. Připravíme si podložní sklíčko pro permanentní preparáty, napipetujeme na ně cca 5 µl 99 % glycerolu a inkubujeme při 80 °C 15 minut, tak, aby se odpařily zbytky vody v glycerolu. Do těchto kapek přemístíme 2 ks hádátek z glycerolu, po stranách umístíme přiměřené množství směsi parafínu a včelího vosku (1:4), přiložíme krycí sklíčko (nejlépe kruhové průměr 12 mm) a přeneseme do 80 °C. Počkáme až se směs parafínu a včelího vosku dokonale rozpustí a krycí sklíčko zcela zakryje hádátka. Preparát je připraven pro mikroskopii a uložení do sbírky. Glycerolové preparáty skladujeme vždy vodorovně a bez přístupu světla. Diagnostické znaky a fotodokumentace je uvedena v přílohách.

2.3.4. Diagnostika na úrovni nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jako hmotná podstata genetické informace dávají základ pro expresi proteinů a tudíž jsou i podstatou všech buněčných procesů. Jejich snadná replikovatelnost a stabilita dávají dobré předpoklady pro využití těchto redenaturovatelných molekul pro diagnostické účely (Krčmář & Břicháček, 1993).

2.3.4.1. Izolace nukleových kyselin

2.3.4.1.1. Přehled

Prvním krokem při práci s nukleovými kyselinami (NA) je jejich izolace v nativním stavu z biologického materiálu, v dostatečném množství a čistotě. Izolované nukleové kyseliny je třeba zbavit všech látek, které se po lyzi buněk stávají součástí hrubých lyzátů a jejichž přítomnost by bránila

účinnému a specifickému působení enzymů používaných k jejich analýze a úpravám (Rosypal, 2000). Základní principy izolace nukleových kyselin spočívají v uvolnění nukleových kyselin z vazby na proteiny. Po rozrušení buněk, popřípadě ostatních buněčných kompartmentů, je izolace NA zaměřena na odstranění kontaminujících buněčných komponent a dále pak na vlastní disociaci nukleových kyselin. Materiál je homogenizován nejčastěji v pufru, který obsahuje chelatační činidlo (např. EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina či její dvojsodná sůl) bránící degradaci nukleových kyselin přítomnými nukleázami. Pro rozrušení buněčných stěn je vhodné použít inkubaci v dusíku a posléze tření v třecí misce či skleněném hmoždířku. Lze také použít některé z komerčně dodávaných homogenizátorů. Pro rozdělení komplexu NA - protein se do reakční směsi přidává nějaký druh tenzidu, např. sodium dodecyl sulfát (SDS) (Křemen et al., 1998). Denaturace proteinů je dosaženo inkubací ve vodní lázni 60 - 80 °C. K oddělení denaturovaných proteinů, lipidů a jiných složek hrubého homogenátu se nejčastěji používá fenolová nebo fenol-chloroformová extrakce. Fenol denaturuje proteiny, rozpouští tuky a napomáhá oddělení jednotlivých fází získaných centrifugací. Spodní, organická fáze, je tvořena fenolem nebo fenol-chloroformem, mezifázi tvoří denaturované proteiny a zbytky buněk. Horní fáze obsahuje nukleové kyseliny (Rosypal, 2000). Jednotlivé typy nukleových kyselin se extrahují do vodné fáze v závislosti na hodnotě pH použitého pufru. Alkalický pufr (pH 8,0) extrahuje DNA, kdežto při kyselém pH (4,5 - 6,0) se extrahuje RNA (Sambrook et al., 1989). Nežádoucí typ nukleové kyseliny lze odstranit působením příslušné nukleázy. Nukleové kyseliny se z vodné fáze vysráží etanolem, případně isopropanolem. Účinné precipitaci nukleových kyselin přítomných v nízkých koncentracích napomáhá snížení teploty a přídavek solí (Rosypal, 2000). Nejčastěji se používá octan sodný, dále octan amonný, octan draselný, chlorid litný, chlorid sodný, chlorid hořečnatý a další (Krčmář & Břicháček, 1993). Posledním krokem izolace je shromáždění precipitátu nukleových kyselin centrifugací a rozpuštění získaného sedimentu ve vhodném rozpouštědle (TE, ddH₂O, ddH₂O - DEPC) (Rosypal, 2000).

2.3.4.1.2. Metoda

Pro úspěšnou diagnostiku za využití polymorfismů DNA je primárním faktorem úspěchu vhodná metoda extrakce DNA. Cílem je izolovat DNA v dostatečné čistotě, kvalitě a množství pro následné analýzy. Lze použít následující metodu extrakce Uveden je postup optimalizovaný a testovaný na háďáčcích rodu *Radopholus*.

2.3.4.1.2.1. Izolace DNA ze suspenze hádátek či jednotlivých hádátek

Izolace DNA ze suspenze hádátek je provázeno celou řadou restrikcí a doporučení. Malé množství biologického materiálu není vždy zárukou pozitivního výsledku následných analýz DNA, proto je nezbytně nutné minimalizovat ztráty biologického materiálu a izolované DNA v procesu izolace na minimum. Za tímto účelem byl optimalizován postup izolace za použití hydroxyapatitových kolonek, které jsou součástí komerčně dodávaného kitu pro izolaci savčí DNA (GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit Sigma Aldrich-GN10)

1. Suspenzi hádátek či jednotlivá hádátka umístit do 1,5 ml polypropylénové mikrozkušavky s konkávním dnem a to do 20 μ l ddH₂O.
2. Připipetovat 180 μ l roztoku T a 20 μ l roztoku Proteinázy K (20 mg/1 ml) inkubovat 1 h při 55°C.
3. Přidat odměřené množství (jedno plné víčko 0,2 ml mikrozkušavky) Glass Beads (G9143 Sigma Glass beads, unwashed, připravených pro izolaci DNA podle přiloženého protokolu) a vortexovat 20 minut na nejvyšší otáčky.
4. Spinovat (několik sekund centrifugovat tak, aby se vše co bylo na stěnách mikrozkušavky dostalo na dno) a inkubovat při 55°C 2 hodiny, v průběhu inkubace 3-4 x vortexovat po 1 minutě a spinovat.
5. Přidat 200 μ l roztoku C a 10 minut vortexovat na maximální otáčky, spinovat a inkubovat 3 minuty při 70 °C.
6. Připravit kolonky napipetováním 500 μ l roztoku pro přípravu kolonek a centrifugací při 12000 g 1 minutu.
7. Do homogenátu přidat 200 μ l etanolu (etanol pro molekulární biologii Merck 1085430250), vortexovat 30 sekund, spinovat.
8. Nanést homogenát na kolonku a to společně s Glass Beads (za tímto účelem je vhodné použít špičky s širokým otvorem, a nebo jen ustříhnout špičky běžné), centrifugovat při 6500 g 1 minutu. DNA je nyní zachycena na hydroxyapatitovém jádru kolonky.
9. Přenést kolonku do nové mikrozkušavky a přidat 500 μ l promývacího roztoku.
10. Centrifugovat při 6500 g 1 minutu, přenést kolonku do nové mikrozkušavky.
11. Přidat do kolonky 500 μ l promývacího roztoku a centrifugovat 6500 g 1 minutu.
12. Přenést kolonku do nové mikrozkušavky a centrifugovat při 18000 g 3 minuty. Je nutné vysušit jádro kolonky touto centrifugací.
13. Přenést kolonku do nové sterilní mikrozkušavky a připipetovat na střed kolonky 100 μ l elučního roztoku, nechat inkubovat v laboratorní teplotě 10 minut a centrifugovat při 6500 g 2 minuty.

14. Do kolonky připipetovat dalších 100 µl elučního roztoku a nechat inkubovat v laboratorní teplotě 10 minut.
15. Centrifugovat při 18000 g 3 minuty.
16. DNA v mikrozkuhavce je vhodné zkoncentrovat podle množství háďátek použitých pro izolaci DNA. K roztoku DNA připipetovat 2,5 x objem isopropanolu (p-lab I 05701) a 10 % objemu DNA 3 M octanu sodného.
17. Inkubovat při -30°C 9 - 12 hodin.
18. Centrifugovat při 12000 g 15 minut.
19. Supernatant odstříknout a přidat 100 µl 70 % etanolu mírně promíchat pohyby ruky, nevortexovat.
20. Centrifugovat při 12000 g 10 minut, supernatant odstříknout a peletku sušit na stole dnem vzhůru.
21. Po vyschnutí resuspendovat peletku (někdy ani není vidět) v adekvátním množství elučního roztoku. Pro jednotlivé kusy háďátek doporučujeme resuspendovat v 5-20 µl, pro množství 10-50 háďátek v 20-50 µl a pro množství nad 50 háďátek v 50-100 µl.

Takto připravená DNA je použitelná pro další analýzy.

2.3.4.2. Polymerázová řetězová reakce a její využití pro detekci a determinaci fytoparazitických háďátek

2.3.4.2.1. Přehled

V letech 1983 - 1985 vyvinuli Mullis, Faloon a Saiki enzymovou vysoce účinnou metodu, kterou se in vitro exponenciálně množí 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 MgCl₂. 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 (*Tfi*, *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) mikrozkuškových 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 po dobu 15 sekund až 2 minut, 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 a AT bazí 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 hořčičných 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. Využitelnost PCR pro detekci a

determinaci fytofágních háďátek je nediskutovatelným faktem, který podtrhuje i skutečnost publikační činnosti nematologů na celém světě. V průběhu let docházelo k vývoji a modifikacím základního principu PCR a dnes tedy můžeme naleznout nové původní metody založené na principu PCR (RAPD, SCAR, RT-PCR, Real Time PCR, Multiplex - PCR, RD – PCR a další). Mnoho prací zabývajících se diagnostikou organismů na úrovni nukleových kyselin směřuje k populačně konzervativním úsekům, ITS (Internal Transcribed Spacer) regionům v oblasti cistronu rDNA (Powers et al., 1997, Iwahori et al., 1998, Hoyer et al., 1998, Al-Banna et al., 1997). Tato část genomu je osekvenována již u mnoha druhů organismů. Cistron rDNA je složen ze tří genů pro ribozomální RNA a ze dvou mezeríků, tedy ITS1 a ITS2. Tato struktura se opakuje a to řádově tisícekrát (Ondřej, 1992, Vachtenheim & Duchoň, 1992). V diagnostice jsou tyto úseky využívány zejména pro jejich vlastnost populační stálosti v rámci rodu či čeledi.

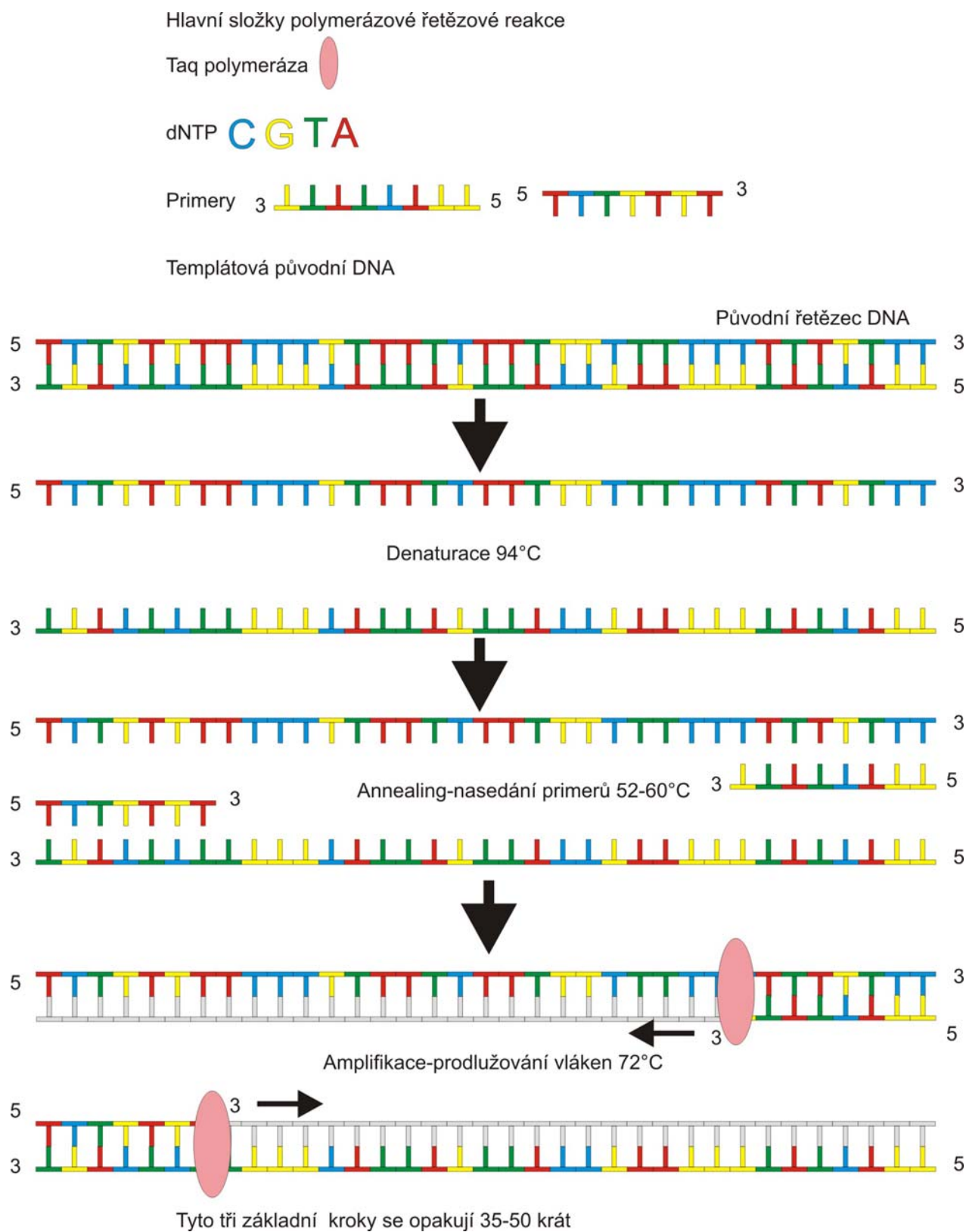


Schéma polymerázové řetězové reakce.

2.3.4.2.2. Metoda

Snahy autorů vytvořit specifické primery pro každý z vybraných druhů nebyly úspěšné. Proto byla zvolena strategie post restrikčního štěpení (viz. níže) pro rozlišení vybraných druhů. Pro detekci a determinaci *Radopholus similis* na úrovni rDNA byly vybrány primery pro PCR z oblastí genů 18S a 28S pro subjednotky ribozómu. Selektce probíhala se zaměřením na specifickou amplifikaci pouze pro taxon *Radopholus similis*. Prvním krokem je tedy příprava DNA fragmentů pro restrikční štěpení. Pro amplifikace rDNA fragmentu lze použít tyto primery (RS18 F 5' - TTGATTAGGTCCCTGCCCTTT – 3' a R28S R 5' - AAGTTCAGCGGGTATTCACG – 3'). Primery naředíte na zásobní koncentraci 100 pmol/μl, do reakce po-té pipetujte koncentraci 10 pmol/μl. Pro tyto primery byla optimalizována následující reakční směs (mastermix) a teplotní standardy pro PCR. Reakce je optimalizována pro termocyklér PTC-200 (BioRad).

Reakční podmínky:

Mastermix pro 25μl reakci

- | | |
|---|------------------|
| 1. pufr pro <i>Taq</i> polymerázu (Fermentas) - | 2,5 μl |
| 2. MgCl ₂ - | 2,5 μl |
| 3. <i>Taq</i> polymeráza (1,5 U)(Fermentas) - | 0,5 μl |
| 4. dNTP (každého nukleotidu 25 mM) - | 0,30 μl |
| 5. primer 1 | 1,0 μl |
| 6. primer 2 | 1,0 μl |
| 7. izolovaná DNA (dle otestované, vhodné koncentrace) | 1,0 – 5,0 μl |
| 8. ddH ₂ O - | do 25 μl doplnit |

Mastermix připravujeme vždy ve sterilních podmínkách nejlépe ve flow boxu. Používáme sterilní špičky s filtrem, předejdeme tak problémům souvisejícím s kontaminacemi. Pakliže připravujete mastermix pro několik vzorků je vhodné jej míchat v mikrozkuhavce 2,0 ml po-té dobře promíchat a rozpipetovat do 0,2 ml mikrozkuhovek pro PCR. DNA je vhodné přidat do víčka před uzavřením mikrozkuhovek a po-té spinováním smíchat s mastermixem. Ujednotí se tak okamžik kontaktu DNA s mastermixem. Po spinování umístíme mikrozkuhavky do termocykléru a spustíme program: „1 krok 95°C 2 minuty, 35 kroků 94 °C 1 minuta – 56 °C 1 minuta – 72 °C 1 minuta, 1 krok 72 °C 4 minuty, závěrečné chlazení na 4 °C „. Po PCR je vhodné otestovat přítomnost amplifikovaných fragmentů pomocí agarózové horizontální elektroforézy (viz. níže). Koncentrace DNA je jednou z limitních hodnot pro úspěšný průběh PCR. Je tedy nutné ji věnovat náležitou pozornost. Po izolaci

DNA z malého množství biologického materiálu ještě není zajištěno, že koncentrace cílových úseků DNA ve vzorku bude dostatečná pro její PCR amplifikaci. S ohledem na tuto skutečnost doporučujeme v první fázi připravit testovací PCR s různým množstvím DNA pipetovaným do reakce. Po ověření vhodného množství je další postup již jasný a případný falešně negativní výsledek neovlivní celkový proces diagnózy.

2.3.4.3. Agarózová elektroforéza – frakcionace fragmentů DNA ve stejnosměrném elektrickém poli

2.3.4.3.1. Přehled

Vizualizace replikovaných řetězců NA je nutnou součástí metod studujících NA. Nukleové kyseliny jsou separovány ve stejnosměrném elektrickém poli. Jako medium, ve kterém se NA pohybují, může sloužit agaróza, která je vhodná pro separaci fragmentů cca stovky párů bazí a více. 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 nízkonapěťovou 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 omezován jejich délkou a současně hustotou gelu. Kratší fragmenty se pohybují rychleji a delší pomaleji. Průběh elektroforézy se sleduje 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 o vlnové délce 260 nm, emituje EB oranžovočervené záření v oblasti viditelného světla 560 nm. Tímto způsobem jsou barveny zejména agarózové gely. Lze rovněž použít alternativní způsoby barvení jako například Syber green. Většina reagensů používaná pro elektroforézu jsou látky zdraví škodlivé, jedovaté atd. proto doporučujeme oddělit na pracovišti místnost pro práci s elektroforézou tak, aby celý proces práce s elektroforézami probíhal v uzavřeném cyklu se zvýšenou ochranou zdraví a prostředí, zahrnující používání ochranných pomůcek a likvidaci odpadů. Ethidium bromid je řazen mezi silné mutageny a proto jsou při práci s ním spojena i opatření ochraňující zdraví laborantů i prostředí. Zbytky použitého EB je nutné likvidovat podle směrnic týkajících se likvidace chemických odpadů. Jednou z firem zajišťující servis na území ČR je firma HORNET.

Vzorky nukleových kyselin s přidáním barvivem a glycerolem (Ficoll) se podvrstvějí pod elektroforetický pufr do jamek v gelu. Po skončení elektroforézy, které indikuje doputování zóny

barviva ke spodnímu okraji gelu, se nukleové kyseliny vizualizují pomocí transiluminátoru (Chrambach et al., 1987).

2.3.4.3.2. Metoda

Do mikrozkupek 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 % agaróзовého gelu:

1. Navážít 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

2.3.4.4. Restrikční štěpení jako klíč pro determinaci rostlinně parazitických háďátek

2.3.4.4.1. Přehled

Za rutinní metodou pro diagnostiku fytoparazitických háďátek se dá označit kombinace PCR a restrikčního štěpení. Pro aplikaci této metody není nutné speciální vybavení, postačí jen základně vybavená molekulárně biologická laboratoř na rozdíl od například sekvenačních technik či technik rekombinantní DNA. Restrikční endonukleázy jsou původní bakteriální enzymy. Nukleázy katalyzují hydrolýzu fosfodiesterové vazby v nukleových kyselinách. Restrikční endonukleázy mají jednu zajímavou vlastnost, která je odlišuje od ostatních nukleáz – štěpí DNA pouze v místech se specifickou nukleotidovou sekvencí. Proto jich lze využívat ke štěpení genomové DNA na sadu specifických fragmentů. Restrikční endonukleázy zabraňují přenosu DNA mezi různými druhy bakterií, protože různé druhy bakterií syntetizují restrikční endonukleázy štěpící různé nukleotidové sekvence. Restrikční endonukleázy používané v molekulární biologii pocházejí převážně z bakterií, a protože jsou jimi rozpoznávána místa na DNA krátká (obvykle 4-8 nukleotidových párů), je vysoká pravděpodobnost, že se tato místa náhodně vyskytnou v každé delší molekule DNA. Proto mohou být tyto enzymy použity pro analýzu DNA z jakéhokoli zdroje. Restrikční endonukleázy se staly běžným předmětem obchodu a v dnešní době jsou rozesílány poštou, typický katalog firem zabývajících se dodáváním těchto enzymů, obsahuje více než stovku restrikčních endonukleáz, přičemž každá rozpoznává jinou sekvenci DNA. Průměrná velikost fragmentů produkovaných různými restrikčními endonukleázami se tedy značně liší, což umožňuje naštěpit dlouhou molekulu DNA na fragmenty o délce, která nejlépe vyhovuje jejich dalšímu využití (Alberts et al., 1998).

Restrikční enzymy (RE) mohou být použity pro štěpení DNA v místě specifických známých sekvencí. Princip spočívá v rozložení palindromatických sekvencí v genomu a jejich nalezení pomocí restrikční endonukleázy. Sekvence nukleotidů, kterou RE rozpoznává, se nazývá rozpoznávací sekvence, nejčastěji se jedná o palindromatickou strukturu. Místo, v němž je štěpena, se nazývá restrikční (Perry & Wright, 1998). Zde jsou uvedeny některé příklady využití rDNA pro detekci a determinaci fytoparazitických háďátek. Úsek od 3' konce genu 18S až po 5' konec genu 28S byl použit pro srovnání PCN (Potato Cyst Nematodes) ze dvou kontinentů (Ferris et al., 1995). Stejně tak i v následující práci se jednalo o populační studii zaměřenou na *G. pallida*, *G. rostochiensis*, *G. virginiae* (Marks & Brodie, 1998). Pro studium fylogeneze izolátů *B. xylophilus* a *B. mucronatus* bylo použito sekvenční analýzy ITS rDNA a byly zde nalezeny mutace, které je možné využít pro konstrukci fylogenetických stromů (Iwahori, 1998). Na základě studia rDNA byly nalezeny restrikční

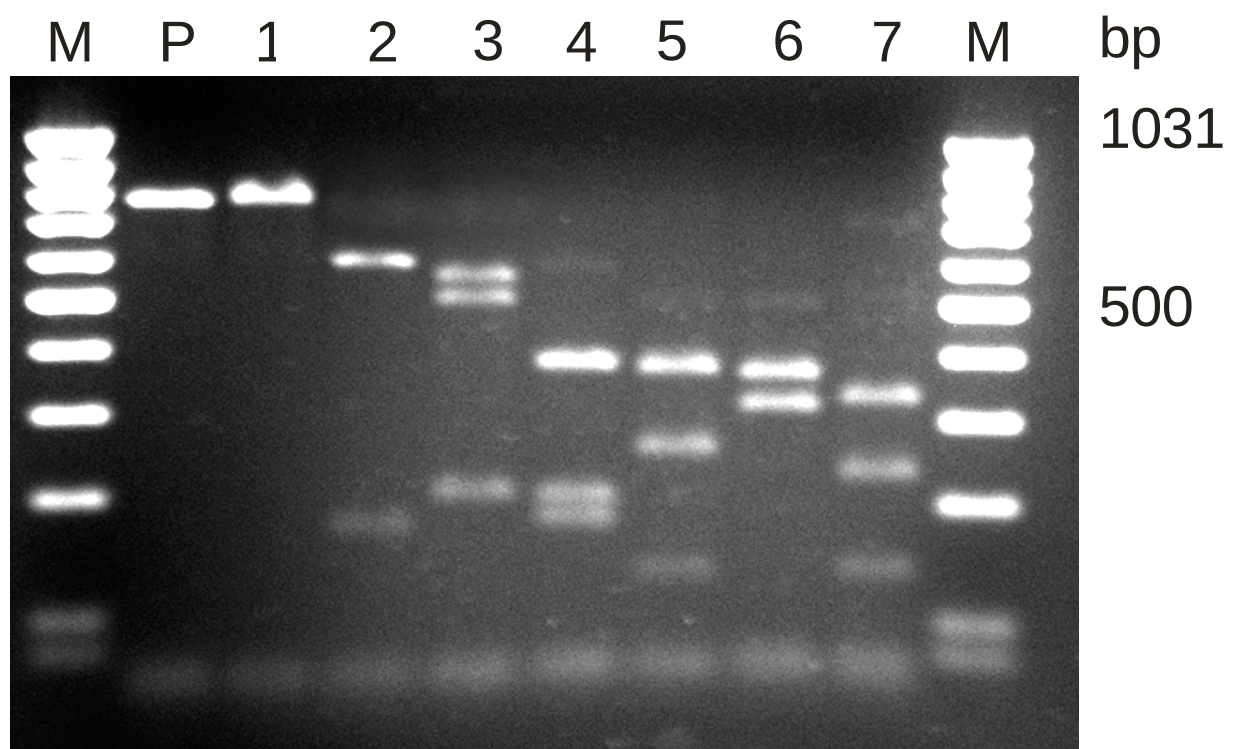
endonukleázy, které je možné použít pro diferenciaci pěti druhů z rodu *Bursaphelenchus* tato metoda restričního mapování byla optimalizována pro několik desítek druhů (Hoyer et al., 1998).

2.3.4.4.2. Metoda

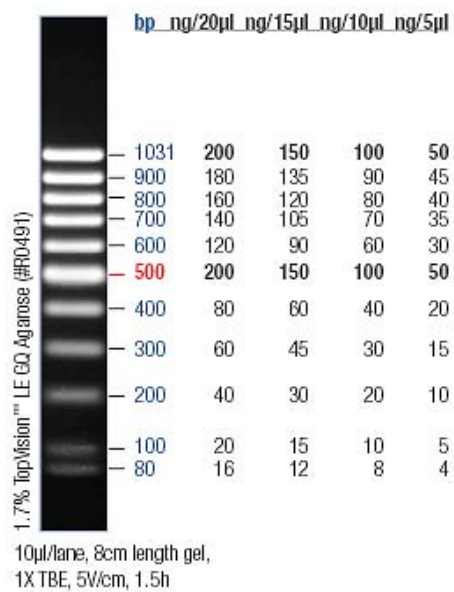
Byly vybrány restriční endonukleázy, které charakterizují motivem vzniklých fragmentů *R. similis*. Takovéto restriční mapování je používáno v řadě jiných případů jako relevantní sekvenční charakteristika daného fragmentu dsDNA. V případě molekulární diagnostiky háďátek rodu *Bursaphelenchus* se používá sada pěti enzymů. Pro účely determinace *R. similis* bylo vytypováno 7 restričních endonukleáz *Bst*XI (1), *Eo*NI (2), *Taq*I (3), *Bse*MI (4), *Pst*I (5), *Hpa*I (6), *Alu*I (7).

1. 10 µl PCR produktu napipetovat do 12 mikrokumavek 0,2 ml.
2. Připipetovat 5 µl ddH₂O a 2 µl pufru pro daný enzym (lze také použít univerzální pufr dodávaný výrobcem enzymu).
3. Připipetovat 1 µl enzymu.

Inkubujeme v předepsané teplotě (37°C nebo 60°C) po dobu dvou hodin. V případě 60 °C doporučujeme použít termocyklér s vyhříváním víčkem tak aby nedocházelo k odpařování směsi, je rovněž možné přidat 20 µl minerálního oleje pro PCR (Sigma – M5904). Produkty restričního štěpení separujeme na 1,5 - 1,8% agarózové horizontální elektroforéze. Získané fragmenty (motivy bandů) porovnáme s následujícími markery (P- neštěpený produkt, produkty štěpení restričními endonukleázami *Bst*XI (1), *Eo*NI (2), *Taq*I (3), *Bse*MI (4), *Pst*I (5), *Hpa*I (6), *Alu*I (7)).



Jako molekulární marker „M“ byl použit MassRuler DNA Ladder (Fermentas SM0383).



Seznam literatury

- Al-Banna, L., Williamson, V., Gardner, S., L. (1997). Phylogenetic analysis of nematodes of genus *Pratylenchus* using nuclear 26 S rDNA. *Molecular Phylogenetic Evolution* 7(1): 94-102.
- Alberts, B., Bray, D. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1998). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, 630 p.
- Duan, Y.P., Castro, H.F., Hewlett, T.E., White, J.H., Ogram, A.V. (2003). Detection and characterization of *Pasteuria* 16S rRNA gene sequences from nematodes and soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 105-112.
- Ferris, V. R., Miller, L. I., Faghihi, J., Ferris, M. (1995). Ribosomal DNA comparisons of *Globodera* from two continents. *Journal of Nematology* 27: 273-283.
- Gené, J., Verdejo-Lucas, S., Stchigel, A.M., Sorribas, F.J., Guaro, J. (2005). Microbial parasites associated with *Tylenchulus semipenetrans* in citrus orchards of Catalonia, Spain. *Biocontrol Science and Technology* 15(7): 721 - 731.
- Hoyer, U., Burgermaister, W., Faghihi, H. (1998). Identification of *Bursaphelenchus* species (Nematoda, *Aphelenchoididae*) on the basis of amplified ribosomal DNA (ITS-RFLP). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 50: 273-277.
- Hunt, D. J. (1993). *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematics and bionomics*. CABI Cambridge, 352 p.
- Chrambach, A., Dunn, M. J., Radola, B. J. (1987) *Advances in Electrophoresis*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, Germany 440 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.
- Iwahori, H., Kanzaki, N., Futai, K. (1998). Phylogenetic relationship among several isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* based on their ribosomal DNA sequences. *Proceedings of International Symposium, Tokyo, Japan, 27-28 October*.
- Jaffee, B. A., Ferris, H., Scow, K. M. (1998). Nematode-Trapping Fungi in Organic and Conventional Cropping Systems. *Phytopathology*, 88(4): 344-350.
- Jensen, C.H., Neumeister, H.G., Lysek, G. (1997). Nematophagous Fungi – Study by Fluorescence Microscopy and EDX – Technique of the Periodicity of Trap Formation in Soil. *Biological Rhythm Research* 28(3): 365 – 373.
- Kaplan, D.T., O'Bannon, J.H. (1985). Occurrence of biotypes in *Radopholus citrophilus*. *Journal of Nematology*. 17:158-162.
- Krčmář, M., Břicháček, B. (1993). *Molekulárně biologické metody ve virologické diagnostice*. Institut pro další vzdělávání pracovníků ze zdravotnictví Brno, 87 s.

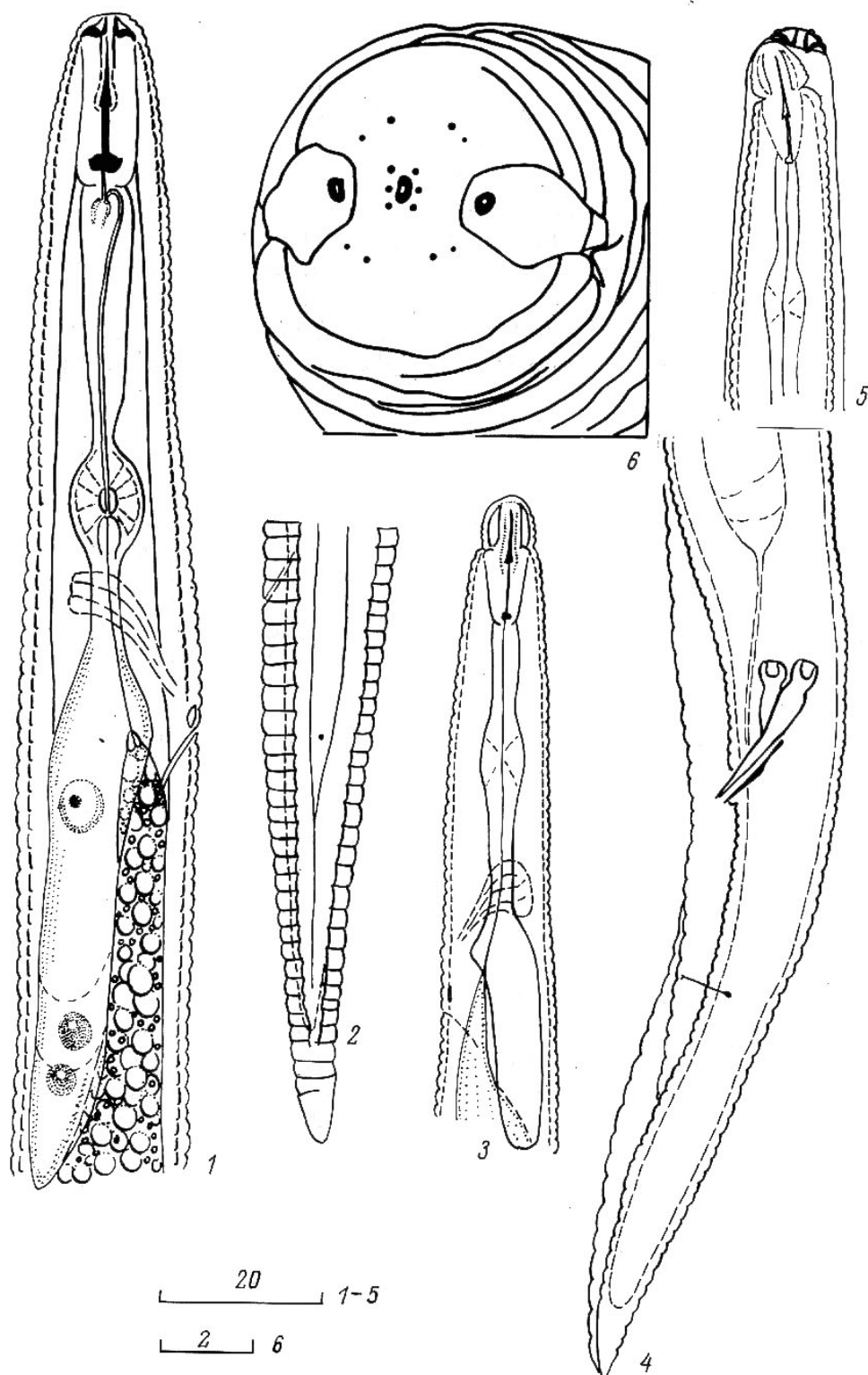
- Křemen, J., Pohlreich, P., Stříbrná, J. (1998). *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Karolinum Praha, 117 s.
- Maggenti, A.; Luc, M.; Raski, D. J.; Fortuner, R., Geraert, E. (1987). A Reappraisal of *Tylenchina* (Nemata). 2. Classification of the suborder *Tylenchina* (Nemata : *Diplogasteria*). *Revue Nématol.*, 10: 135 – 142.
- Marks, R. J., Brodie, B. B. (1998). *Potato cyst nematodes biology, distribution and control*. CABI Wallingford, 395 p.
- Morton C.O., Hirsch P.R., Kerry B.R. (2004). Infection of plant parasitic nematodes by nematophagous fungi – a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology* 6(2): 161 – 170.
- Ondřej, M. (1992). *Genové inženýrství kulturních rostlin*. Academia, Praha, 123 s.
- Perry, R. N., Wright, D. J. (1998). *Free-living plant-parasitic nematodes*. CABI, 438 p.
- Perssonová, C., Jansson, H.B. (1999). Rhizosphere Colonization and Control of *Meloidogyne* spp. by Nematode-trapping Fungi. *Journal of Nematology* 31(2): 164-171.
- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A. M., Murray, P. C. B., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., Adams, B. A., Harris, T. S. (1997). The rDNA transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology* 29(4): 441-450.
- Riley, I. T.; Kelly S. J. (2001): *Radopholus nativus* (Nematoda: *Pratylenchidae*), and potential economic pest of wheat in Western Australia. *Nematology*, 3: 1 25–30.
- Rosypal, S. (2000). *Úvod do molekulární biologie*. Brno, 996 p.
- Ryss A. J. (1988). Корневые паразитические нематоды семейства *Pratylenidae* мировой фауны. Академия наук СССР, ISBN: 5-02-025633-1, 367 p.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1590 p.
- Siddiqi, M.R. (2000). *Tylenchida Parasites of Plants and Insects*. 2nd Edition. CABI Publishing, 805 p.
- Southey, J. F. (1985). *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. Her Majesty's Stationery Office London, 202 p.
- Vachtenheim, J., Duchoň, J. (1992). *Molekulární biologie pro mediky a lékaře. Od klonování DNA po lékařské aplikace*. UK Praha, 175 s.
- Webster, J.M. (1972). *Economic nematology*. London Academic Press Inc., 563 p.
- Poděkování: Autoři tímto děkují Ing. Šárce Štěpánkové za spolupráci na řešení problematiky diagnostiky háďátka *R. similis*.

3. Srovnání „novosti postupů“

V předložené metodice jsou uvedeny uplatnitelné postupy pro detekci a determinaci hádátek rodu *Radopholus similis*. Současná metodické postupy diagnostiky těchto hádátek jsou zaměřeny pouze na morfometrickou komparativní diagnostiku. V tomto ohledu je existence nových funkčních a aplikovatelných metod diagnostiky na úrovni nukleových kyselin jedinou možností, jak potvrdit, nebo vyvrátit výsledky diagnostických metod doposud používaných. Jako novum lze tedy označit nové optimalizované metody diagnostiky hádátka rodu *Radopholus similis* na úrovni CAPS markerů. V metodice jsou rovněž uvedeny optimalizované postupy extrakce hádátek z rostlinného materiálu, příprava trvalých i nativních preparátů a 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

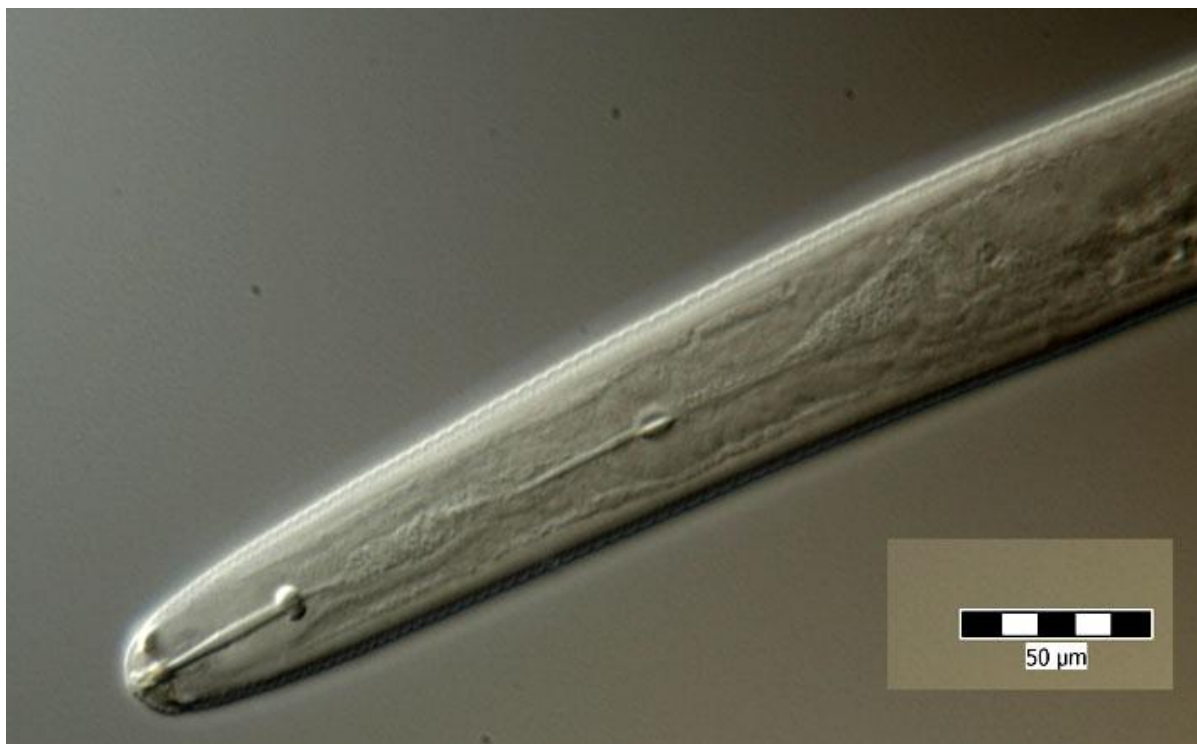
Tato metodika je určena pro organizace na území ČR zabývající se výzkumem či aplikací výsledků výzkumu do praxe a to na úrovni ochrany rostlin. Jedná se na prvním místě o Státní rostlinolékařskou správu, dále pak o Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví Průhonice. Metodika bude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



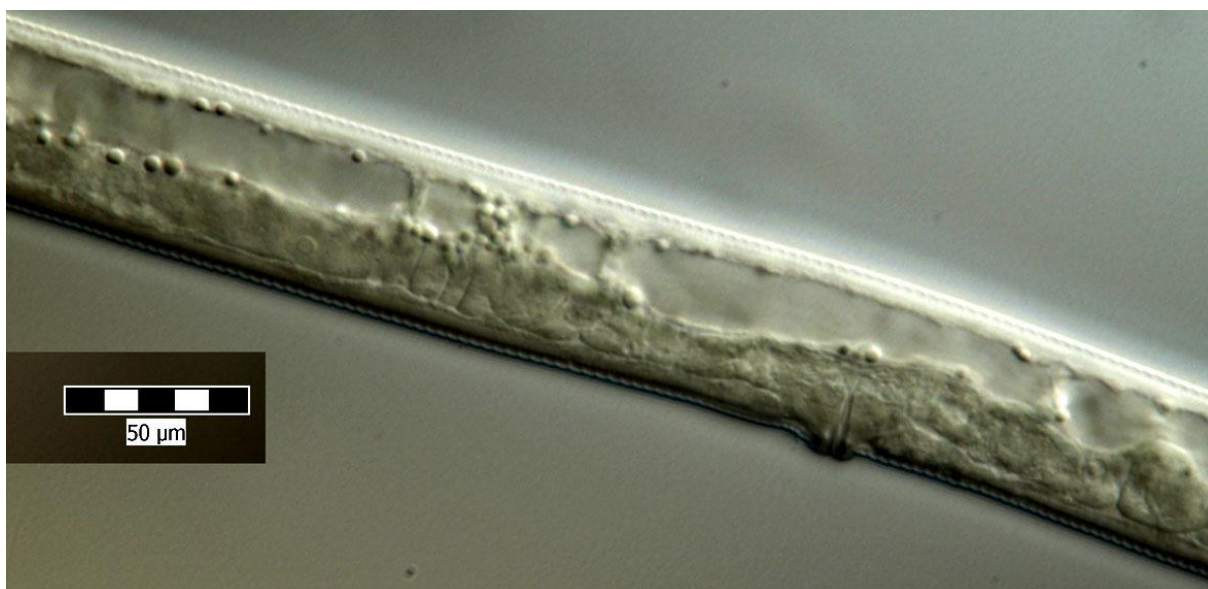
Perokresba převzata z Ryss 1988. 1,2,6 -samička, 1- hlavová část, 2 – ocas, 6 – hlava zobrazená pomocí skanovacího elektronového mikroskopu, 3-5 samec, 3 – hlavová část, 4 – ocas, 5 – samec v kutikule larvy 4. vývojového stupně.



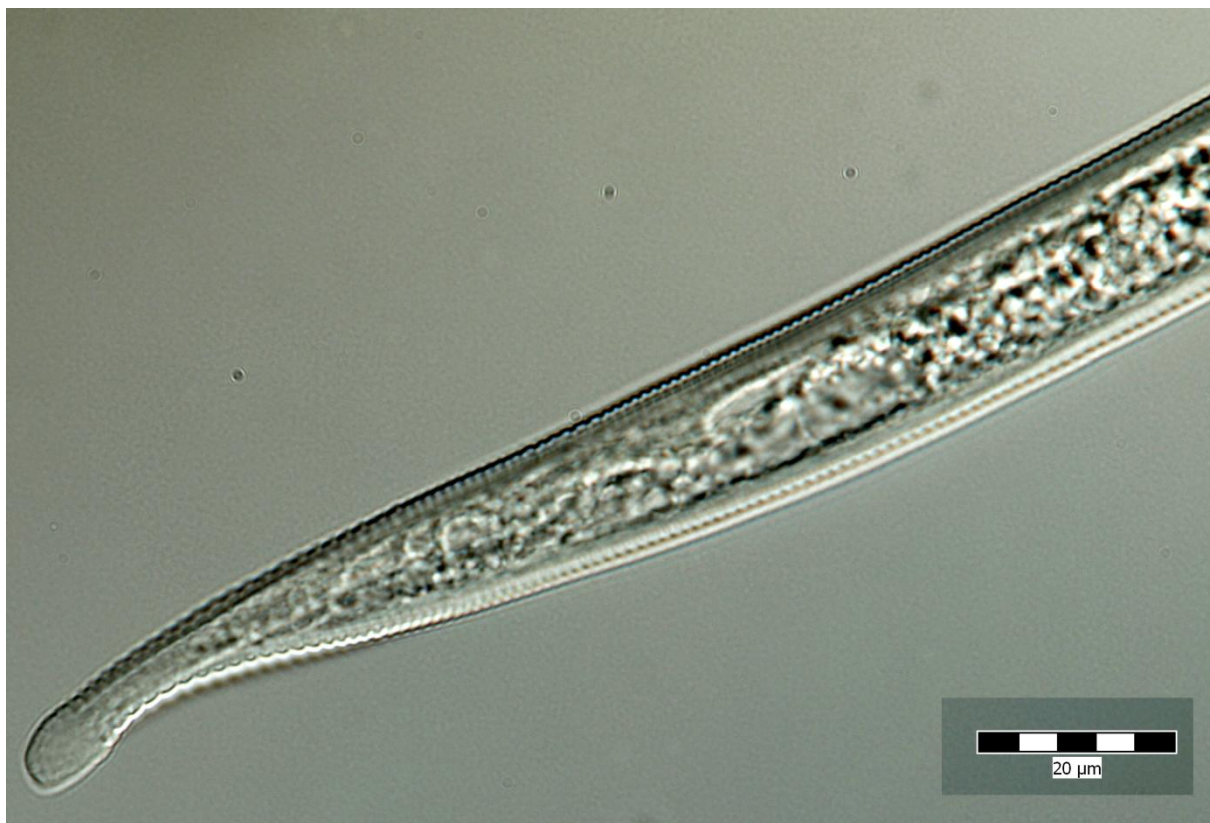
Perokresba převzatá z Siddiqui 2000. A – Samec *R. similis*. B – samička *R. similis*.



R. similis samička hlavová část.



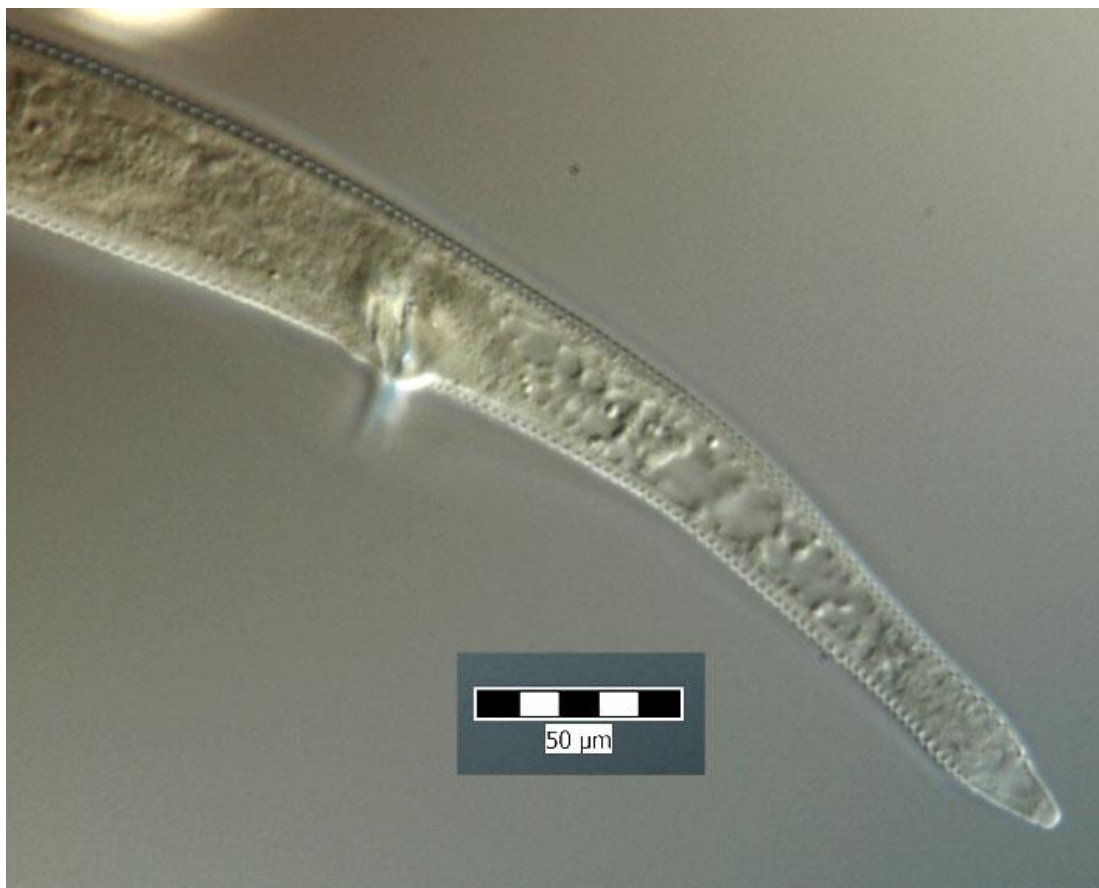
R. similis samička vulvální část.



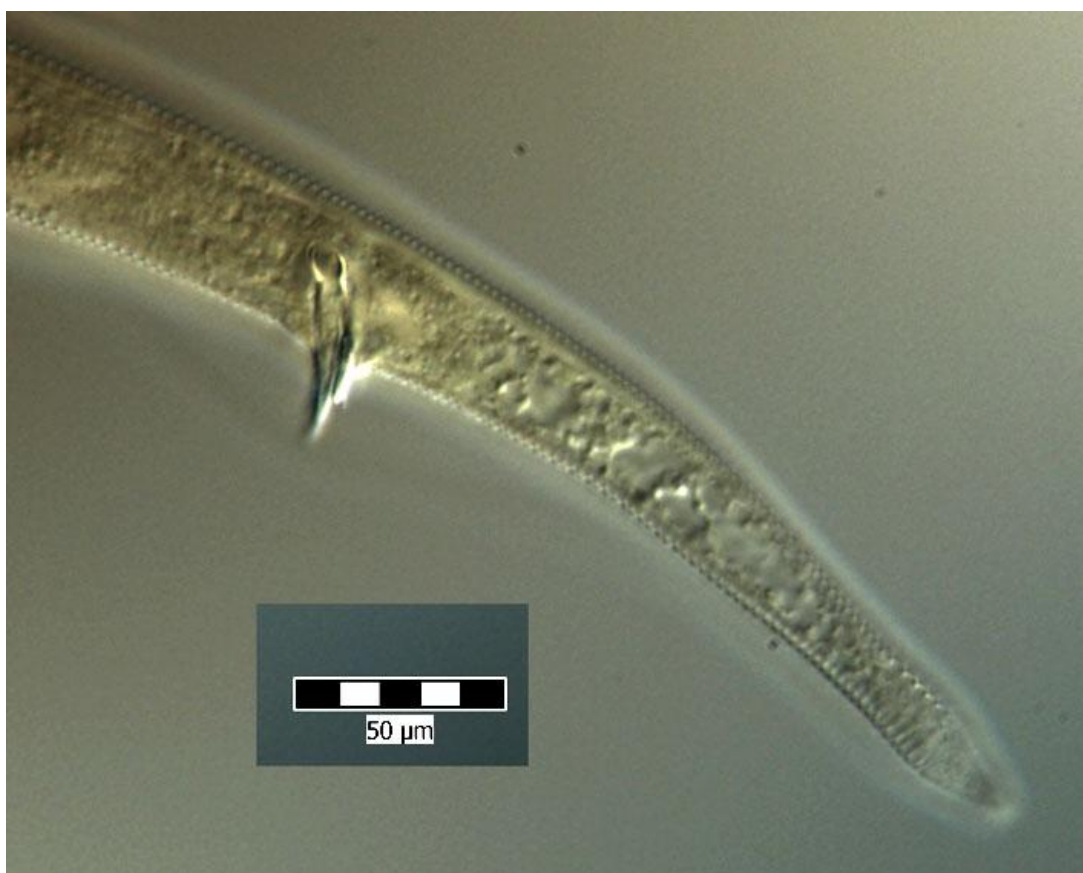
R. similis samička ocas.



R. similis samec hlavová část.



R. similis samec zakončení ocasu.



R. similis samec spikula.



R. similis samec bursa copulatrix.

Příznaky napadených kořenů banánovníku a rostlina s příznaky chřadnutí.



