

Fytopatologická praktika

1

Náplň předmětu Metody diagnostiky původců chorob dřevin

Ing. Dagmar Palovčíková



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Náplň a požadavky předmětu

- **System a morfologie hub** (základní charakteristika a charakteristika vybraných taxonů)
- **Optická mikroskopie a vlastní technika práce s mikroskopem** (praktické využití, volba a ošetření mikroskopů, určení optických konstant, určení velikosti objektů, bezpečnost práce)
- **Příprava, sběr a zpracování materiálu**, histologická technika a tvorba preparátů
- **Zobrazování mikroskopovaných objektů** (kreslení, fotografie, projekce, využití softweru, tvorba protokolů a determinace dle zdrojů)
- **Kultivace a izolace houbových patogenů** (přípravné práce, vlastní metody a technika, využití u konkrétních patogenů)

Metody diagnostiky původců chorob dřevin

Rozdělení metod:

- A symptomatické** - identifikačním znakem jsou projevy choroby a typické znaky patogena - plodnice, mycelium, hniloba
- B kultivační** - izolace patogena, determinace na základě morfologických znaků na kolonii, biologickými testy intersterility, případně testy inkompatibility, možno použít i dále uvedené biochemické metody
- C biochemické** - jsou založeny na analýze přítomnosti markerů, ať již jde o charakteristické znaky produkce isoenzymů, imunologické metody, nebo přímo DNA markery

A symptomatické metody

- symptomy - projevy - zbarvení asimilačního aparátu, jeho opad, tvorba vlků....
- makroskopické znaky patogena
- u dřevních hub - podle charakteristických plodnic - dužniny, stavby pokožky klobouku, hymenia ...
- charakter a druh hniloby



- metody jsou relativně jednoduché
- použitelné za předpokladu, že organismus fruktifikuje a makroskopie je dostatečná
- + identifikace přímo v terénu
- - vyžaduje určité zkušenosti, většinou doplnění mikroskopii a popř. kultivačními metodami



Mikroskopické metody

- metoda tzv. **vlhkých komůrek (VK)**, kdy se část rostliny vloží do vlhkého prostředí a příznivé teploty, kde houba vytvoří fruktifikační orgány
- problémem je přerůstání dalšími organismy, které nemají k poškození žádný vztah a patogena přerůstají
- použití rašeliníku ve VK



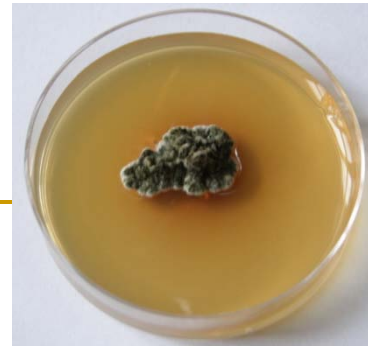
-
- organismy z vlhkých komůrek je možno určit na základě klasických mikroskopických metod, nebo je možno je izolovat a dále kultivovat
 - vlastní mikroskopické m. - požadavky na přístrojové vybavení, literaturu a zkušenosti
-

B Kultivační metody

- kultivace patogena v podmínkách in vitro
- kultivační metody se uplatňují především v případech, kdy je třeba zjistit přítomnost patogenů v pletivech anebo izolujeme z pletiv patogena - plodnice, rhizomorf...
- identifikace se pak provádí na základě morfologie kultur - růstových charakteristik, růstu na různých typech médií apod.
- používány jsou rovněž metody, které se zakládají na studiu kompatibility izolovaného mycelia s testovacími kmeny

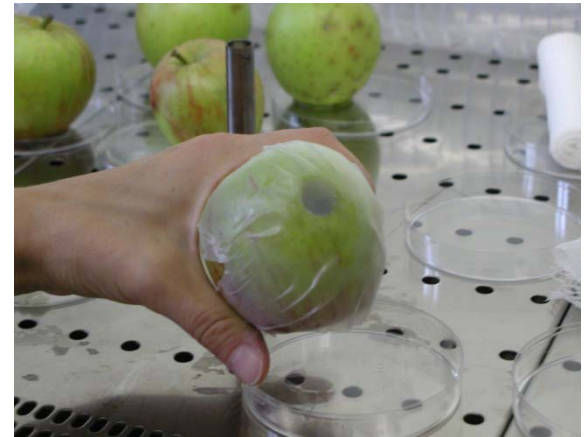
Štěpinková metoda

- odebrání kousku infikované tkáně, její povrchová sterilizace a následné kultivace na živném mediu
- povrch. sterilizace - používá se nejčastěji etanol, chlornan sodný, peroxid vodíku
- živné médium - sladidinový agar s přísadkou antibiotik
- následuje pasážování - přeočkování - odstranění nebo potlačení sek. organismů, získání pouze čisté kultury



Izolace pomocí pastí „baiting method“

- izolace do tkáně zdravé rostliny nebo plodů
- metoda „green apples“ - testovaný materiál - vzorky dřeva a kůry se vkládají do dužniny zeleného jablka, případně dalších částí pletiv rostlin a patogen



-
- **metoda izolace z půdy** - substrát spolu s kořínky se zaleje sterilní vodou a na vodní hladinu se vloží návnada - jehličí, listí... izolace se provádí až po objevení příznaků z případných nekrotických a skvrnitých - ověření mycelia a zoosporangií, následná kultivace na selektivním agaru
-

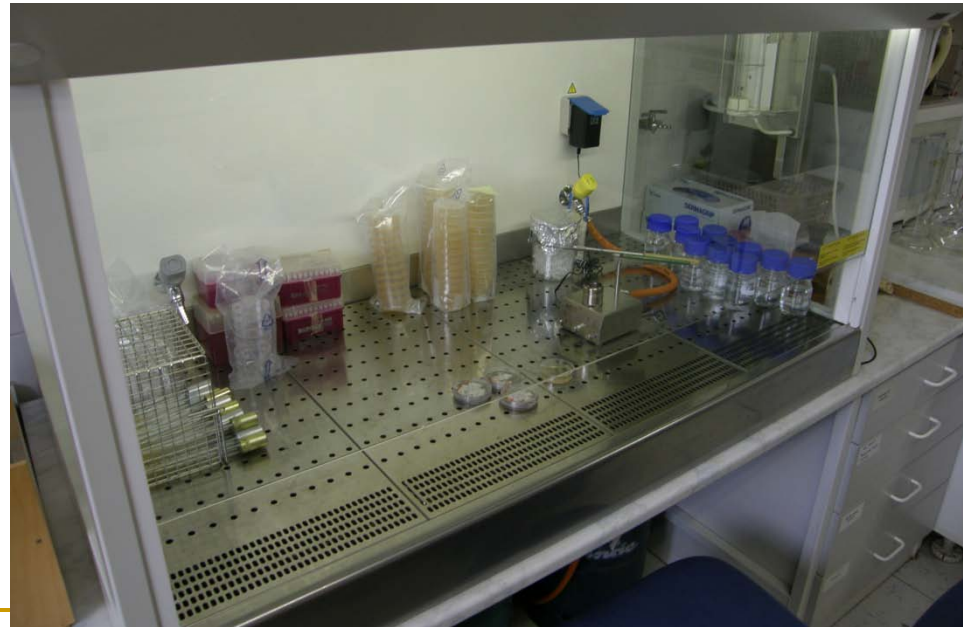
Kultivační metody postupy

- **příprava kultivačního média** (zdroj uhlíku, dusíku, minerálních prvků...)
- **agar** - polysacharid, ze stélek mořských řas - ruduch *Gelidium* a *Glacilaria* (až 40 % v sušině), na ztužování media - 1- 3 %
- odvážení objemu a nasypat do vody
- před použitím nechat nabobtnat, bod rozpouštění je 96 °C, bod tuhnutí 35 -60 °C
- mletý, práškovitý nebo řasa
- sterilizace při 121°C po dobu 15 min.

-
- **sladinový agar** (záchytný) M 137- obsah slad. extraktu 2-3 %, zdroj N pepton - 0,3%,
 - příprava - 50 g na 1l vody, nabobtnat, rozvařit, sterilizace při 121 °C, při přetlaku 100 kPa (autokláv sterilizace vodní parou) po dobu 20 min
 - bramborový agar (PDA), bram.- mrkvový (PCA), V-8 juice agar, Czapk.- Dox. agar...
 - výběr agaru dle nároků patogena
-

- **tekuté médium** - 2-3 % roztok sladiny, tvorba pelet - shluku mycelií, provzdušnění na třepačce, využití průmyslové - fermentační tanky
- Petriho misky 9 a 5,5 cm v průměru, sterilní, doba přežití kultury - asi 3 měsíce
- delší uložení - šikmé agary, po steril. uložení na šikmou plochu, nechat ztuhnout, šikmá plocha 2/3 délky zkumavky (uložení ve sbírce- 7°C a tma)
- okraj zavázání parafilmem - propustí přebytečnou vlhkost a oxid uhličitý
- důležitá je opakovaná vizuální kontrola

- **očkování - inokulace** - přenesení části populace z přirozeného prostředí na sterilní živné médium - klička, očko, háček z drátu, opálení nad plamenem, oplach lihem, ožehnutí nad plamenem
- práce v aseptickém prostředí flowboxu, hygienické podmínky



C biochemické metody

- metody imunologické - přítomnost specifických bílkovin a tvorby antigenů využívá celá řada imunologických testů
- ELISA test - na bázi imunoenzymatické reakce a lze s ní rovněž detekovat antigen (u václavek) - rychlost, použití i u tlejícího dřeva, nebo jiný infikovaný substrát
- metody založené na základě molekulární biologie - izolace DNA a sekvenování
-

Uchovávání kultur a sbírky mikroorganismů

- slouží k uchovávání a poskytování kultur pro srovnávací taxonomii
- zachování genofondu organismů
- deponování patentových kultur
- výzkum v taxonomii a ekologie mikroorganismů
- **Způsoby uchovávání:**
- na šikmých agarech,
- pod minerálním olejem,
- ve sterilním písku,
- ve sterilní vodě,
- při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- lyofilizace kultur (vysušení za snížené teploty),
- v kapalném dusíku

Lyofilizáty



Uložení pod minerálním olejem



Uložení v kapalném dusíku (Dewarova nádoba)



Významné sbírky kultur hub ve světě

- CBS - Utrecht - Holandsko
(<http://www.cbs.knaw.nl/>)
 - CABI - Surrey, Velká Británie
 - DSMZ - Braunschweig, Německo
 - IFO - Japonsko
 - ATCC - Manasas, Virginia - USA
-

Významné sbírky kultur hub v České republice

- CCF - Sběrka kultur hub katedry botaniky PřF UK (<https://botany.natur.cuni.cz/cs/sbirka-kultur-hub-ccf>)
- CCM - Česká sbírka mikroorganismů (<http://www.sci.muni.cz/ccm/>)
- CCBAS Sběrka kultur basidiomycetů ??
- CMF ISB Sběrka mikroskopických hub
Ústav půdní biologie AV ČR
- ostatní sbírky na adrese:
~~<https://web.natur.cuni.cz/fccm/sbircz.htm>~~

Sběr a uchovávání herbářového materiálu

- plodnice ideální při produkci spor, nenapadené hmyzem, jinými houb. org.
- uložení a popis, doplnění fotografiemi
- herbář - sušení materiálu - sušička tepl. -30-40°C
- ostatní materiál - typické příznaky. se sporulujícími plodnicemi
- pro převoz novin. papír, papírové sáčky, boxy



- ukládání v papírových obálkách s etiketou - název instituce, jméno latin. a české, lokalita, substrát, hostitel, datum sběru a determinace, kdo sbíral a kdo determinoval
- jednotlivé obálky do krabic v herbářích
- dezinfekce materiálu - dříve globol, dnes hluboké podmrazení a plynování

