

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

Metodika detekce entomopatogenů a parazitů u invazních druhů hmyzu

Tomáš Tonka, Jana Ouředníčková, Oldřich Pultar



CERTIFIKOVANÁ METODIKA
2025

Autorský kolektiv:

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH - FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ
Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, s.r.o.

Ing. Jana Ouředníčková, Ph.D.

RNDr. Oldřich Pultar

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu:

ttonka@fzt.jcu.cz

Autoři fotografií a obrázkových schémat:

RNDr. Oldřich Pultar

Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.

Obrázky na titulní straně:

Kadávery mšice kopřivové (*Microlophium carnosum*) infikované entomopatogenní houbou *Zoophtora phalloides*.

Houba rodu *Hesperomyces* na krovkách imaga slunéčka východního (*Harmonia axyridis*)

Hnízdo s housenkami třetího instaru přástevníčka amerického (*Hyphantria cunea*)

Lymantria dispar MNPV v tukových buňkách housenky bekyně velkohlavé (*Lymantria dispar*).

Fázový kontrast.

Odborný oponent:

Ing. Lenka Grimová, Ph.D. – Česká zemědělská univerzita v Praze

Oponent ze státní správy:

Ing. Jana Patočková, Ph.D. - Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

Název: Metodika detekce entomopatogenů a parazitů u invazních druhů hmyzu

Dedikace: Publikace je realizačním výstupem výzkumného projektu NAZV QK22020019

„Inovace integrované a ekologické produkce ovoce a révy vinné v návaznosti na nově se šířící druhy škodlivých organismů“.

© FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ, JIHOČESKÁ UNIVERZITA V Č. BUDĚJOVICÍCH

© VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, s.r.o.

2025

ISBN: 978-80-88669-03-6 (online, pdf)

doi: 10.60615/dzhe-aw37



Obsah

ÚVOD	5
CÍL METODIKY A DEDIKACE	7
VLASTNÍ POPIS METODIKY	7
1. Sběr a uchovávání vzorků pro entomopatogenní vyšetření	8
1.1. Sběr zástupců řádu motýli (Lepidoptera)	9
1.2. Sběr zástupců řádu brouci (Coleoptera)	12
1.3. Sběr zástupců řádu dvoukřídlí (Diptera)	16
1.4. Sběr zástupců řádu polokřídlí (Hemiptera)	21
1.5. Sběr druhů řádu blanokřídlí (Hymenoptera)	23
2. Vyšetření hmyzu v laboratoři	26
2. 1. Příprava vzorku pro identifikaci/izolaci entomopatogena	26
3. Detekce a izolace entomopatogenních virů	30
3.1. Izolace viru z nakaženého hmyzu	32
3.2. DNA izolace u okludovaných virů	33
3.3. <i>In vivo</i> množení viru	34
3.4. Testy virulence viru	35
4. Izolace a identifikace entomopatogenních bakterií	37
4.1. Izolace entomopatogenních bakterií pro identifikaci	37
4.2. Kvantifikace izolovaných entomopatogenních bakterií	38
5. Izolace a identifikace entomopatogenních hub	42
5.1. Izolace EPF	43
5.2. Purifikace čisté kultury EPF	45
5.3. Identifikace EPF pomocí molekulárních metod	45
6. Identifikace parazitických protist	46
6.1. Obecná identifikace protist (včetně mikrosporidií)	47
7. Izolace a identifikace entomopatogenních hlístic (Nematoda)	48
7.1. Ovocnářsky významní zástupci hlístic	49
7.2. Izolace EPN z půdních vzorků	51
7.3. Izolace EPN z hostitelských organismů	51
8. Techniky vyšetření společné pro skupiny entomopatogenů	53
8.1. Izolace DNA	53
8.2. Izolace RNA	58
8.3. Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii	61
SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	63
POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	63
EKONOMICKÉ ASPEKTY	64
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	65
SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE	66

Anotace

Předkládaná metodika popisuje postupy detekce a identifikace entomopatogenů a parazitů u invazních druhů hmyzu. Zároveň jsou zde popsány postupy využitelné k detekci fytopatogenů přenášených nebo spojených s invazními druhy. Invazní škůdci hmyzu jsou hrozbou pro systémy pěstování ovoce, zeleniny a dalších plodin pěstovaných v ČR. Zvládnutí účinné ochrany proti těmto škůdcům je zásadním krokem při získání ekonomicky návratné produkce v systémech pěstování ovoce a dalších plodin. Vzhledem ke snižování spektra chemických přípravků na ochranu rostlin jsou hledány alternativní způsoby ochrany proti škůdcům. Jednou z alternativ je i biologická ochrana, využívající entomopatogeny (viry, bakterie, houby a nematody) různých druhů hmyzu v přímé ochraně rostlin. Postupy popsané v této metodice mohou vést k identifikaci nových entomopatogenních bioagens, potenciálně použitelných v biologické ochraně. Stejně tak ale metody a postupy zde překládané mohou vést k detekci nových fytopatogenů, přenosných invazními druhy hmyzu, které doposud nebyly na území ČR zachyceny a popsány. Těmito postupy se dá předcházet potenciálním fytopatogenním rizikům už v raných fázích introdukce, kdy nejsou ještě patrné viditelné příznaky nově introdukovaných fytopatogenů, a tím redukovat riziko vzniku infekcí. Předkládaná publikace je určena pro laboratoře, zabývající se ochranou rostlin, pro potenciální zájemce o nové metody a přípravky na ochranu rostlin z řad průmyslových podniků, stejně jako pro laboratoře státní správy (ÚKZÚZ), které se zabývají ochranou rostlin.

Annotation

The methodology presented here describes procedures for detecting and identifying entomopathogens and parasites in invasive insect species, as well as phytopathogens transmitted or associated with non - native pests. Invasive insects are a significant threat to fruit, vegetable, and other crop production in new invaded areas. Effective pest control is essential for economically feasible profit, especially in the case of reducing the chemical control. Thus, alternative control methods, such as biological control using entomopathogens (e.g., viruses, bacteria, fungi, nematodes) are being explored. The procedures described here may promote the discovery of new entomopathogenic bioagens for use in biological control. Additionally, these methods can help in detecting previously unreported phytopathogens transmitted by invasive species. In the case of early identification before visible symptoms of infection appear, these methods may help mitigating the phytopathogenic risks and reduce the possibility of widespread crop outbreaks. This publication is intended for plant protection laboratories, industrial enterprises interested in new methods and plant protection additives, and state administration laboratories (ÚKZUZ) involved in plant protection.

ÚVOD

Introdukce nepůvodních druhů a jejich šíření je jedním ze současných problémů, podílejících se závažným způsobem na poklesu diverzity původních druhů a ekosystémů po celém světě. Společně s klimatickou změnou šíření nepůvodních druhů často negativně ovlivňuje celosvětovou biodiverzitu. Zavlékání nových druhů, na kterém se významnou měrou podílejí aktivity spojené s ekonomikou a obchodem, způsobuje environmentální a ekonomicky významné problémy v oblasti boje s nepůvodními druhy, ať už živočichů, nebo rostlin.

Z hlediska ochrany rostlin se jedná o problémy spojené s přenosem onemocnění rostlin, poškozováním rostlin a plodin, alergickými reakcemi (např. u přástevníčka amerického). Dopady spojené s aktivitou introdukovaných škůdců, popř. infekcí a jejich vektorů, jsou a budou závažným nejenom environmentálním problémem, ale zejména problémem ekonomickým. Ekonomické náklady spojované s invazními druhy, ať už se jedná o náklady na eradikaci, nebo socio-ekonomické škody, dosahují celosvětově miliard dolarů a zřejmě budou nadále stoupat. Pro ČR není tento údaj znám, nicméně, z dostupných zdrojů vyplývá, že se bude jednat o vysokou částku zatěžující ekonomicky jak stát, tak pěstitele a další složky zabývající se pěstováním plodin, ovoce a vinné révy, popř. chovatele všech druhů zvířat.

Jednou ze skupin invazních druhů, jejichž ekonomický impakt není doposud vyčíslen v podmínkách ČR, jsou hmyzí škůdci ovoce a vinné révy. Jejich rozšíření a početnost na území ČR jsou součástí předešlých publikací vzniklých během řešení tohoto projektu (Holý a kol., 2021; Ouředníčková a kol., 2024). Ochranná opatření proti invazním škůdcům ovoce a vinné révy nejsou doposud zcela využívána a praktikována a spektrum insekticidů pro eradikaci škůdců se zužuje, stejně jako v případě neinvazních druhů v rámci politiky Evropské unie a jejích nařízení. Proto je výzkum případných patogenních agens, která by byla schopná v rámci přípravků na ochranu rostlin na bázi mikroorganismů regulovat početnosti škůdců, významným a z hlediska ochrany rostlin i důležitým vkladem do budoucna.

U všech druhů hmyzu se vyskytují patogenní agens (entomopatogeni). Z různých druhů hmyzu bylo izolováno množství virů, bakterií, ricketsií, nematodů, hub a prvoků, které nějakým způsobem ovlivňují chování a ekologii hostitelů a jsou potenciálním zdrojem bioagens, která se případně dají, za určitých podmínek, použít v biologické ochraně proti škůdcům. Celá tato skupina patogenů se označuje termínem mikrobiální agens (microbial agent – MBA, popř. microbial control agent – MCA) a některé z nich se používají jako biologický prostředek ochrany po celá desetiletí (Lacey, 2015). Mezi úspěšné cílené aplikace mikroorganismů v biologické ochraně proti škůdcům patří aplikace *Oryctes* virů (*Alphanudivirus oryrrhinocerotis*) proti nosorožíkům škodícím na kokosových palmách na ostrovech v jižním Pacifiku (Huger, 2005; Vega, 2012), dále virů jaderné polyedrie nebo granulovirů proti housenicím pilatek (Bird, 1955), housenkám bekyní a obaleče jablečného, nebo použití bakterií *Bacillus thuringiensis* proti celé řadě škůdců rostlin, ať už ve formě přímé aplikace spor, izolovaného delta endotoxinu, nebo ve formě transgenních rostlin. Celá řada entomopatogenů byla finalizována do podoby komerčních biopreparátů a registrována pro použití v ochraně rostlin, zejména *B. thuringiensis*, a v poslední době zejména entomopatogenní houby, jako *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, *Lecanicillium lecanii* nebo *Lecanicillium longisporum*. Nepřímo mezi entomopatogeny můžeme zařadit i některé nematody, které napadají různé druhy hmyzu

a infikují je bakteriemi, kterými se živí, a které způsobují u hostitelských organizmů smrtelné septikémie. V Evropě byly do finální podoby komerčního využití v biologické ochraně zavedeny entomopatogenní hlístovky *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae*, *Heterorhabditis bacteriophora* a *Heterorhabditis megidis*.

Z již dříve provedených pokusů a aplikací plyne, že se přípravky na bázi mikroorganismů (biopesticidy) dají s úspěchem použít jako alternativa chemické ochrany, nicméně zatím je použití těchto přípravků ekonomicky a logisticky náročnější než použití chemických insekticidů. Na druhou stranu, výhodou použití biopesticidů je bezpečnost a ochrana zdraví člověka, redukce reziduí pesticidů v prostředí, a i ve sklizených plodech, minimální nebo žádný dopad na necílové organizmy (užitečné a indiferentní druhy) a ochrana biodiverzity v zemědělských ekosystémech. Nevýhodou je např. právě druhová specifita, delší nástup účinku od začátku opatření na škůdce, nebo kratší doba přežívání v prostředí a v neposlední řadě i ekonomicky náročnější proces související s formulací, skladováním a registrací přípravku.

Většina entomopatogenů podle posledních výzkumů hraje důležitou úlohu v regulaci populací škůdců. Z tohoto důvodu jsou ideálním kandidátem na zařazení do systémů integrované ochrany rostlin. Proto je velmi důležité zkoumat hmyzí populace a hledat nová patogenní agens, která by se dala v budoucnosti, blízké či vzdálené, použít jako alternativa k chemickým přípravkům na ochranu rostlin. Potřebujeme znát nejenom samotné škůdce, ale i mechanismy, které regulují a ovlivňují ekologii jednotlivých druhů v ekosystémech, zvláště zemědělských, silně narušených zásahy člověka. Hledání a ověřování účinnosti entomopatogenů je jedním z důležitých kroků, které mohou vést ke zlepšení životního prostředí, ochraně zdraví lidí a zachování co nejširší biodiverzity ekosystémů.

Jedním z cílů výzkumného projektu bylo studium patogenních agens u různých invazních škůdců s tím, že se podaří objevit, popř. popsat patogenní mikroorganismy, regulující populace škůdců v přirozených podmínkách ovocných sadů a vinic. V případě výzkumu patogenů vrtule višňové se nepodařilo získat biologický materiál vhodný pro patologické zpracování, proto byla pozornost zaměřena na autochtonní vrtuli třešňovou s předpokladem, že případní patogeni by mohly být přenosní i na invazní druh. Předkládaná metodika je založená na postupech identifikace a detekce mikroorganismů v populacích introdukovaných skupin hmyzu, které byly zavlečeny na naše území. Metodika popisuje postupy a metody, které vedou k poznání mikroorganismů a identifikaci jednotlivých škůdců ovoce a vinné révy.

S poklesem spektra povolených chemických přípravků a zvyšujícími se nároky na k přírodě šetrnější ochranu rostlin, se snižují i možnosti využití chemické ochrany proti škůdcům, včetně škůdců a rostlin zavlečených. Jednou z priorit budoucích opatření je proto biologická ochrana rostlin založená na použití biologických přípravků v ochraně rostlin proti škůdcům a plevelům. Biologické prostředky založené na mikroorganismech jsou jednou z účinných, a v minulosti již vyzkoušených, strategií boje proti škůdcům.

CÍL METODIKY A DEDIKACE

Cílem metodiky bylo popsat a optimalizovat metody detekce patogenů a parazitů u invazních škůdců ovocných dřevin. Použité postupy vycházejí z molekulárně biologických analýz, které doplňují metody mikroskopické a kulturační, včetně popisů kultivace patogenů a biotestů. Tyto přístupy mohou vést k vyššímu procentu identifikace patogenů a parazitů, jež mohou sloužit jako potenciální agens biologické ochrany rostlin proti hmyzím škůdcům. Protokoly byly optimalizovány pro použití v běžných laboratořích, zabývajících se výzkumem biologické ochrany a vybavené zařízeními pro molekulární biologii.

Cílem metodiky bylo také poskytnout laboratořím ochrany rostlin a orgánům státní správy informace a postupy, které zvýší možnosti identifikace nových, doposud nepopsaných entomopatogenů a povedou k větší intenzitě výzkumů v oblasti patologie hmyzu jako alternativního výzkumu přípravků na ochranu rostlin proti škůdcům. Metodika popisuje vhodné metody k identifikaci a detekci konkrétního druhu patogena či parazitu v populacích invazních i běžných hmyzích škůdců ovoce. Součástí je také interpretace získaných informací v kontextu použití nalezených bioagens v systémech integrované ochrany ovoce, a obecně v kontextu potenciálních bioagens použitelných v biologické ochraně proti hmyzím škůdcům. Metodika je realizačním výstupem výzkumného projektu **QK22020019 „Inovace integrované a ekologické produkce ovoce a révy vinné v návaznosti na nově se šířící druhy škodlivých organismů“** financovaného MZe – Národní agenturou pro zemědělský výzkum.

VLASTNÍ POPIS METODIKY

Z doposud známých a popsáných druhů hmyzu je přibližně pouhé jedno procento druhů považováno za škůdce. Kromě druhů způsobujících přímé škody na plodinách, ovoci, zelenině, vinné révě apod. jsou mezi škodlivé druhy počítáni i přenašeči fytopatogenů různého původu, jako jsou viry, houby nebo bakterie.

Jedním ze současných problémů ochrany rostlin je i klimatickou změnou a zejména činností člověka urychlená invaze nepůvodních druhů do nových, nepůvodních areálů rozšíření. Tyto druhy, tzv. invazní nebo nepůvodní, často narušují ekologické vztahy v původních ekosystémech a vzhledem k tomu, že většina invazních druhů patří více či méně mezi škodlivé druhy, způsobují i nemalé ekonomické škody v nových areálech výskytu. Ochrana proti těmto druhům je problematická vzhledem k narušení ekologických vztahů ať už invazními druhy, nebo člověkem. Nativní ekologické faktory nejsou přizpůsobeny novým druhům a jejich eradikace je problematická.

Metoda biologické ochrany rostlin je metoda, která využívá živé mikroorganismy, popř. predátory nebo parazitoidy, v ochraně rostlin proti škůdcům. Mezi mikroorganismy, nazývané také entomopatogenní, se řadí viry, bakterie, houby a některé druhy prvoků, kteří infikují celou řadu hmyzích hostitelů a dají se s menším či větším úspěchem izolovat, kultivovat a následně ve formě biopřípravků používat v systémech integrované ochrany rostlin.

V této metodice jsou popsány metody detekce patogenů při monitoringu populací invazních druhů škůdců ovoce a vinné révy na území ČR. V metodice jsou popsány mikroskopické a molekulární přístupy detekce patogenů u hmyzích škůdců. Podkladem pro

metodikou byla detekce patogenních agens u různých stádiích (larvy, imaga) invazních škůdců, která probíhala v rámci řešení projektu QK22020019 "Inovace integrované a ekologické produkce ovoce a révy vinné v návaznosti na nově se šířící druhy škodlivých organismů" v letech 2022–2023 na území ČR.

Problematika šíření invazních druhů je jednou z hlavních priorit nejenom ochrany přírody, ale i ochrany rostlin proti novým, introdukovaným škůdcům. Screening patogenů byl prováděn nejenom pro potřeby zjištění potenciálních entomopatogenních agens, použitelných případně v rámci biologické ochrany proti nepůvodním škůdcům, ale i jako prvotní výzkum entomopatogenů ovoce a vinné révy. Nicméně tyto metody zde popsané mohou identifikovat i fytopatogenní organizmy, doprovázející nepůvodní druhy hmyzu a zavlečené na naše území, které mohou být potenciální fytopatologickou hrozbou pro pěstitele rostlin.

Cílem mapování bylo zjistit, jestli a jaké druhy patogenů se vyskytují na sledovaném území v populacích invazních škůdců. Prvotní výzkum, který nebyl nikdy proveden na území ČR, a také v zahraničním měřítku je v takovém rozsahu neobvyklý, vedl k získání informací o zastoupení parazitů a patogenů u populací invazních druhů hmyzu, škodících na ovoci a vinné révě. Získané poznatky mohou do budoucna být prvním krokem k výzkumu potenciálních biologických agens, využitelných v ochraně sadů proti invazním škůdcům.

Přesto, že se jednalo o jednorázovou studii v rámci řešení projektu, cílem bylo zjistit, jaké je složení entomopatogenních organismů v populacích invazních druhů hmyzu a zda se vůbec patogeni v populacích vyskytují. Účelem metodiky není návod, jak postupovat v ochraně ovoce a vinné révy, popř. jiných plodin a rostlin. Spíše se jedná o návod pro laboratoře zabývající se výzkumem invazních škůdců, popř. hmyzu obecně, jak zjistit a identifikovat patogeny a parazity v hmyzích populacích. Tento návod může sloužit jako postup při identifikaci potenciálních biologických agens, která se mohou stát v budoucnu součástí biologických přípravků na ochranu rostlin. Většina entomopatogenů, podle posledních výzkumů, hraje důležitou úlohu v regulaci populací škůdců. Z tohoto důvodu jsou ideálním kandidátem na zařazení do systémů integrované ochrany rostlin. Proto je důležité zkoumat hmyzí populace a hledat nová patogenní agens, která by se dala v budoucnosti, blízké či vzdálené, použít jako alternativa k chemickým přípravkům na ochranu rostlin. Potřebujeme znát nejenom škůdce, ale i mechanismy, které regulují a ovlivňují ekologii jednotlivých druhů v ekosystémech, zvláště zemědělských, silně narušených zásahy člověka. Hledání a ověřování účinnosti entomopatogenů je jedním z důležitých kroků, které mohou vést ke zlepšení životního prostředí, zdraví lidí a zachování co nejširší biodiverzity ekosystémů.

1. Sběr a uchovávání vzorků pro entomopatogenní vyšetření

Sběr materiálu pro sledování infekcí nejenom škůdců ovoce a ovocných dřevin je prvním a klíčovým krokem pro úspěšný výzkum a identifikaci entomopatogenů. Přenos do laboratoře a uchovávání infekčního materiálu jsou kritickými body pro identifikaci a případné další analýzy, stejně jako pro kultivaci a infekční pokusy, které by v ideálním případě měly skončit finalizací v podobě přípravku na ochranu rostlin na bázi mikroorganismů. Zabránění kontaminaci infekčního materiálu nebo znehodnocení a poškození entomopatogenů před

jejich zpracováním je proto kritickým krokem při detekci patogenů hmyzu.

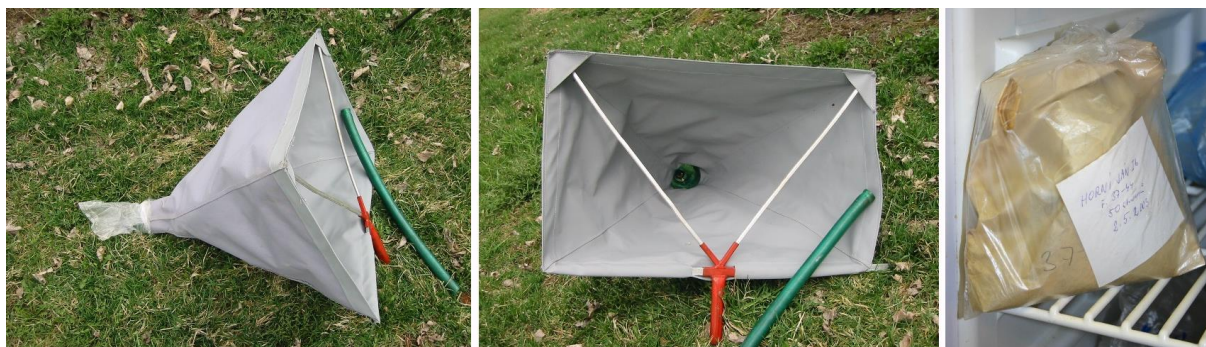
Příznaky infekcí podle jednotlivých skupin jsou podrobněji popsány v kapitolách popisujících jejich identifikaci. Zde se budeme podrobněji zabývat odchytem, resp. sběrem hostitelského hmyzu, transportem a uchováváním vzorků k patologickým vyšetřením.

Není v možnostech tohoto textu popsat podrobně všechny metody používané pro sběr a odchyt hmyzu, u kterého se následně zkoumá přítomnost či nepřítomnost celé řady entomopatogenů. Neexistuje univerzální odchytová metoda, vždy se bere zřetel na cílovou skupinu hmyzu, kterou chceme vyšetřovat, a stejně tak i na to, jaké jsou její ekologické nároky.

1.1. Sběr zástupců řádu motýli (Lepidoptera)

U tohoto řádu hmyzu jsou hlavním stádiem vhodným pro patologická vyšetření housenky (larvy). Stádia vajíček, kukel nebo imag mají význam především při výzkumu přenosu a šíření patogenů nebo jsou vhodnými stádii pro založení bezinfekčních chovů pro další množení relativně čistých kultur patogenů, infekční biotesty apod.

Základní metody sběru volíme podle bionomie housenek. Volně žijící housenky, požírající listy nebo slupku plodů se nejsnadněji a ve větším množství získávají sklepáváním. Je možné použít jak sklepávací ploché, tak pyramidální (obr. 1). Důležité je roztřídit úlovek v co nejkratší době. Vždy obsahuje i pavouky, kteří spřádají pavučinou úlomky, což pozdější třídění ztěžuje a část uloveného hmyzu i zabíjí.



Obr. 1 Pyramidální sklepávací síť a způsob uchovávání vzorků.



Obr. 2 Vaječné snůšky s diapauzními vajíčky bekyně velkohlavé a neonátní housenky.

Individuální sběr housenek přímo z rostlin pinzetou je efektivní zejména při vyšší populační hustotě a u druhů, jejichž housenky se alespoň v prvních instarech agregují do hnízd nebo žerou poblíž míst nakladení mnohočetných vaječných snůšek (např. bekyně, přástevníci, zavíječi, předivky, bourovci aj.) (obr. 2). Přítomnost housenek se dá většinou dobře zjistit podle symptomů napadení rostliny, tj. žírem na listech, svinováním listů, požíváním slupky plodů, vytvářením hedvábných hnízd apod. U druhů vytvářejících hnízda, se zpravidla (pokud to rozměry hnízda umožňují) odstřihne celá část rostliny s hnízdem. Podobně druhy svinující listy je nejlepší sbírat i s listem, jeho odtržením nebo odstřižením.

Transport housenek se provádí v nádobách (obalech), které umožňují výměnu plynů a udržují přiměřenou vlhkost bránící vadnutí a vysychání živné rostliny, kterou do nádoby vkládáme. Nejvhodnější jsou papírové kelímky, misky a tácky uzavíratelné PET víčky. Papírové stěny absorbují kondenzát vodní páry a zabraňují tak utopení housenek. Naopak zpětným odparem vody ze stěn se udržuje přiměřeně vlhké prostředí. K odsávání případných kondenzátů je vhodné dno nádoby vyplnit savou buničinou (např. toaletní papír, papírové utěrky a ubrousky). Víčko, pokud uzavírá nádobu vzduchotěsně, je nutné perforovat několika otvory umožňujícími výměnu plynů.



Obr. 3 Hyponom klíněnky jabloňové (vlevo). Závrtky housenek obaleče jablečného na jablku (uprostřed). Klejotokem provázený závrtok housenky obaleče švestkového (vpravo).

Při dlouhodobější přepravě je nutné doplňovat čerstvou potravu a odstraňovat zbytky, zejména trus, který je vždy okamžitě rozkládán saprofágy, kteří spotřebují značnou část kyslíku, produkují velké množství oxidu uhličitého a představují vždy nežádoucí sekundární kontaminaci vyšetřovaného materiálu. Při každé výměně se doporučuje vysbírat všechny kadávery, aby se zabránilo jejich sekundární kontaminaci.

Pro přepravu housenek za výše uvedených podmínek se osvědčily papírové sáčky, které se vloží do mikrotenových sáčků (LDPE), obzvláště k transportu podchlazeného materiálu v polystyrénových krabicích s chladicí vložkou. Mikrotenové sáčky jsou dostatečně propustné pro plyny, a přitom omezují odpar vody. Perforace není nutná (ta je nutná u polystyrénových obalů vzduchotěsně uzavíratelných).

U druhů kryptických (žijících skrytě), např. minující motýli, karpofágní obaleči (druhy žijící uvnitř plodů) apod. nebo u vaječných snůšek a kukel, je individuální sběr hlavní metodou. Při sběru materiálu se orientujeme podle symptomů napadení (hyponomy, závrtky aj.) (obr. 3).

U kryptických druhů je nejvhodnější odebírat celé rostlinné orgány, bez izolace housenek v terénu. Odpadají tím problémy s udržováním podmínek pro přežívání housenek, včetně volby vhodných přepravních obalů. Ty vyžadují zabránění vysychání, překročení kritických teplot a zajištění výměny plynů. Použitelné k tomu jsou výše zmíněné techniky.

V laboratoři se housenky prohlížejí a zpracovávají vhodnými technikami a patologickými metodami (viz dále) ihned nebo se uchovávají v podchlazeném stavu (kolem 5 °C), popř. se mohou zmrazit pro potřeby např. molekulární detekce patogenů (-20 °C nebo -80 °C pro potřeby izolace RNA). U karpofágních druhů je možné ponechat housenky ve vývoji v plodech naskládaných do bedýnky vyložené přehnutou jednovrstvou vlnitou lepenkou, do které po opuštění plodů housenky zalézají a tvoří si zde kukelní komůrky. Infikované housenky nesou známky infekce a zpravidla komůrku nedokončují (obr. 4). Přesto se doporučuje na závěr plody rozříznout a přesvědčit se o tom, jestli chodby neobsahují kadávery housenek, které již nestihly plod opustit.

U druhů požírajících slupku plodů je možné dochovat housenky do vyšších instarů na čerstvém ovoci naskládaném ve vhodné nádobě. Plody doporučujeme proložit ústřížky filtračního papíru, které housenky připřádají k plodům tak jako v přírodě listy. Poměrně malou část karpofágních housenek lze převést do laboratorního chovu na náhradní potravě nebo na semisyntetické půdě. To je celkem jednoduché u druhů, které se vyskytují v jádrovinách. Jako náhradní potravu ochotně přijímají jádra, která je vhodné k zabránění plesnivění a rozvoji kvasinkových kultur sterilizovat ponořením do 1% formalínu nebo 0,2% chlornanu sodného na 10 min a po sterilizaci důkladným propráním ve vodě. U peckovin je to možné jen u druhů, které se živí jádry a ta se získávají louskáním pecek hostitelského druhu. I tato jádra je vhodné sterilizovat, ale postačuje i jejich vysušení.

Housenky přezimující nebo kuklíci se pod šupinami borky se získávají odlupováním šupin nebo instalací 25–30 cm širokých pásů z jednovrstvé vlnité lepenky kolem kmenů (obr. 5). Po sejmutí se pásy transportují v roličkách a kadávery se vyjímají v laboratoři. Pásy je možné dlouhodobě uchovávat v chladničce, uzavřené do LDPE sáčku k ochraně před vysycháním.

Přenos housenek na umělé (semisyntetické) diety je sice možný, ale značně náročný. Obecným problémem těchto půd jsou velmi časté až pravidelné kontaminace saprofágními houbami, kvasinkami a bakteriemi, roztočem sýrovým (*Tyrophagus putrescentiae*) a octomilkami (obr. 6). Příprava půd a udržování chovu proto vyžaduje přísnou sterilitu prostředí i používaného materiálu, sterilizaci a/nebo konzervaci půd. Při zajištění sterility uvnitř chovných nádob je možné udržet i v nesterilním prostředí půdu 10–14 dní (výjimečně i déle) po sterilizaci povrchu půdy a víček UV zářením (germicidní zářivky po dobu minimálně 2 h). Nicméně přírodní housenky s sebou vždy přinášejí mikrobiální kontaminace, takže UV sterilizace je nakonec neúčinná. Konzervace půd kyselinou methyl – benzoovou, kyselinou benzoovou, kyselinou propionovou, kyselinou sorbovou nebo sorbanem draselným potlačí i rozvoj entomopatogenních infekcí, především houbových a bakteriálních. Úspěšně jim však odolávají infekce virové.

Hotové půdy, dostupné např. u specializovaných firem v USA, jsou u nás nedostupné a ingredience pro jejich přípravu (hlavně vitamíny a soli) jsou obtížně dostupné a prodávané za vysokou cenu pouze prostřednictvím obchodu se speciálními chemikáliemi. Z uvedených důvodů se dá přenos housenek na semisyntetické diety doporučit pouze pro specializované laboratoře, specifické projekty a pro potřeby namnožení patogenů *in vivo* (obr. 6).



Obr. 4 Kadáver housenky obaleče jablečného, infikované *Cydia pomonella* granulovirem v pásu vlnité lepenky.

Obr. 5 Lepenkový pás na slivoni švestce.



Obr. 6 Propagace viru jaderné polyedrie in vivo v housenkách bekyně velkohlavé na semisyntetické dietě (vlevo) a ukázka častého problému chovu na semisyntetických půdách při propagaci patogenů, kontaminace kropidlákem černým (*Aspergillus niger*).

Motýli jsou řádem s nejlépe prozkoumanými sexuálními feromony, z nichž velké množství je i komerčně dostupných. Využití lapáků k odchytu motýlů je sice lákavé, ale naráží na několik problémů. V naprosté většině tvoří úlovky samci, jen někteří patogeni se přenášejí prostřednictvím imag a feromony jsou sice dostupné v jiných částech světa, ale u nás obtížně nebo vůbec. Nemalým problémem může být také zpracovatelnost úlovků, protože množství ulovených motýlů může být pro rutinní patologická vyšetření nezpracovatelné.



Obr. 7 Suchý lapák (funnel trap) s feromonem nebo kairomonem jako zdroj živých imag.

K monitoringu jsou zpravidla používány lapáky opatřené lepovou vložkou k imobilizaci motýlů. Lep z organických polymerů prosycuje ulovené jedince, což patologické zpracování minimálně komplikuje, obvykle však naprosto znemožňuje. Použitelné jsou tzv. „suché lapáky“ (obr. 7). Jejich vybírání se doporučuje každý den, úlovky se ihned patologicky zpracují nebo se uchovávají podchlazené či zmrazené.

Problém jednopohlavního úlovku je odstranitelný tam, kde je znám i kairomon, který se použije místo pohlavního feromonu a láká do lapáků obě pohlaví. Příkladem je octan etylnatý (hrušková esence), který je kairomonem obaleče jablečného.

1.2. Sběr zástupců řádu brouci (Coleoptera)

U tohoto druhově bohatého a ekologicky velice diverzifikovaného řádu hmyzu, jsou hlavními stadii pro patologická vyšetření jak larvy, tak imaga. Larvy se získávají individuálním sběrem v/na substrátu, ve kterém žijí, popř. který využívají jako potravu. Časté jsou infekce u larev žijících v půdě nebo opadance.

Larvy se získávají se vyrýváním z půdy nebo kompostů rýcími vidlemi. Po rozbití hroudy se objevují převážně bělavé, larvy typu ponravy (scarabaeiformní) nebo kampodeoidní larvy (carabiformní) a žlutohnědé larvy typu drátovci (elateriformní larvy), které se sbírají pinzetou a přepravují v nádobkách naplněných půdou. Při transportu a uchování je třeba nádoby



Obr. 8 Scarabaeiformní larva (ponrava) zlatohlávka zlatého (*Cetonia aurata*) a listová drť k její výživě.

chránit před vysokou teplotou a musí být zajištěna dobrá výměna plynů. Pokud uzávěr nádoby umožňuje rychlý odpar vody, je třeba půdu sytit vodou tak, aby byla vlhká, ale ne promáčená. Pokud mají být larvy chovány k propagaci patogenů, zajistíme jim potravu (obr. 8). U saprofágních larev vrubounovitých to může být směs rozdrčeného suchého a čerstvého listí (jabloň, buk), která se smíchá s půdou nebo může být krmná směs použita i bez přidavku půdy. Larvy zlatohlávek dobře prospívají také na rozcupovaném papíru. Ještě lepším krmivem pro tyto larvy jsou vyschlé kravince nebo koňský hnůj. Oba substráty je třeba před použitím tepelně sterilizovat, protože téměř vždy obsahují spóry hub hnojníků (*Coprinus spp.*), jejichž mycelia odnímají velké množství kyslíku, a naopak produkují CO₂. Druhy fytofágní, požírající kořinky rostlin, přikrmujeme vlasovými kořeny trsnatých trav (kostřava, lipnice) nebo semenáčů (duby aj.), které se zbaví zbytků půdy vyplachováním kořenů ve vodě.



Obr. 9 Larva lesknáčka (Nitidulidae) na hnijící jahodě.

Kampodeoformní larvy lesknáčkovitých brouků se zpravidla zdržují v kvasících rostlinných zbytcích (obr. 9). Larvy se sbírají individuálně pinzetou nebo se substrát s larvami umístí do hrubšího síta v plastové míse. Larvy sítem propadají do mísy, kde se snadno a ve větším množství dají sesbírat. Transportují se v nádobkách perforovaných několika malými otvory pro výměnu plynů a bez substrátu, který se nahradí buničinou. Pokud nejsou krátce po transportu patologicky zpracovány, je možné je uchovávat v 4 °C. Pro propagaci patogenů v laboratorní teplotě

podáváme larvám jako potravu mírně navlhčené mumifikované ovoce (křížaly). V případě použití kvasícího substrátu je nutné zajistit absorpci vytékajících šťáv a dokonalou výměnu plynů. K jímání šťáv se dno chovné nádoby naplní sádrou, která se po zatvrdnutí nechá vyschnout nebo se použijí suché granulky hydrogelu. K provzdušnění se použije zakrytí nádoby tkaninou (monofil, mušelín).

K propagaci patogenů za pokojových podmínek je možné larvy ponechat v napadených rostlinných orgánech, nejlépe v papírových obalech (ve velmi suchém prostředí je možné udržet přiměřenou vlhkost vsunutím do LDPE sáčku). U peckovin je z praktického hlediska vhodné oddělit larvy od dužiny a osušit je, aby se předešlo obtížně zvládnutelnému rozvoji

plísni a kvasinek. Nevýhodou je, že není možné průběžně sledovat vývoj infekce. Při zjištění kadáverů je vhodné provést kontrolu, nejedná-li se o larvy paralyzované imagy parazitoidů nebo usmrčené jejich larvami (obr. 10).

K propagaci patogenů lze použít udržovacího chovu larev (nebo i vajíček a kukel) v celulózových sendvičích (obr. 11). Sendvič je tvořen 3 vrstvami lisované buničiny (např. vložky do vinařských deskových filtrů, materiál na výrobu pivních podtáček apod.). Spodní a svrchní vrstva zůstává celistvá, do střední jsou vyraženy komůrky, do kterých se umístí larvy. Sendvič se stáhne gumičkami nebo klipsy, navlhčí vodou a uloží do LDPE sáčku. Vajíčka a kukly, u některých druhů i larvy dokončují vývoj do dalšího stádia. Starší larvy, pokud vyžadují speciální výživu, ve vývoji nepokračují, nicméně žijí dostatečně dlouho na to, aby se v nich rozvinula infekce. Metoda umožňuje průběžnou kontrolu infekce.



Obr. 10 Přítomnost vajíčka nebo larvy parazitoida signalizuje, že kadáver larvy květopase jabloňového není důsledkem mikrobiální infekce.

Larvy subkortikálního hmyzu sbíráme oddělením kůry s lýkem od dřeva. Kadávery se na místě seberou pinzetou a přežívající larvy transportujeme do laboratoře i s kůrou oddělenou od dřeva. K tomu se odstraní všechny larvy mimo chodby a viditelně mechanicky poškození jedinci. Na takto připravený výřez kůry přiložíme stejně velký výřez kůry škůdcem nenapadené, a to lýkovou částí k sobě. Vzniklý sendvič pevně sevřeme vhodnou svorkou (např. modelářskou svorkou) a v LDPE sáčku transportujeme do laboratoře, kde můžeme postupně sledovat vývoj infekce.



Obr. 11 Vajíčka chrousta maďalového (vlevo) a larvy květopasa jabloňového (uprostřed) v komůrkách buničinového sendviče. Larvy lýkožrouta smrkového infikované entomo - patogenní houbou v korovém sendviči (vpravo).

Sběr imag brouků je jednodušší, a kromě individuálního ručního sběru nebo sběru pinzetou se uplatňuje především sklepávání do sklepáadel nebo entomologických sítěk a smýkání. Získaný materiál se ukládá a transportuje v nádobkách (např. kelímky na koprologické vzorky) opatřených perforacemi pro výměnu plynů. Do kelímku se vloží buničina k odsávání vodního kondenzátu a případně i vhodná potrava. Podobně jako larvy, resp. spolu s larvami, se dají získávat imaga především invazních brouků čeledi lesknáčkovitých, z kvasících substrátů jak individuálním sběrem pinzetou, tak odchytem přes síto. Imaga invazního lesknáčka amerického (*Glischrochilus quadrisignatus*), jsou silně



Obr. 12 Imaga polníka rybízového získané z keřů černého rybízu se dají chovat v Petriho miskách s listy černého rybízu.

přitahována kvasícím ovocem a vůní kvasných produktů (obr. 13). Je proto možné v místech výskytu provádět odchyt do lapáků s návnadou (např. lapáky s návnadou pro octomilku japonskou). K získání živých brouků z kapalných návnad je třeba provádět kontrolu i vícekrát za den, úlovky zcedit, promýt vodou a vysušit buničinou. V horkých letních dnech, v době mezi 17.–19. hod. nalitím octomilkové návnady nebo vložením přezrálého banánu na misku nebo



Obr. 13 Imaga invazního lesknáčka amerického (*Glischrochilus quadrisignatus*) na hniјících broskvích (vlevo) a na hladině návnady lapáku na octomilku japonskou.

do kelímku na střeše osobního auta přilákáme velké množství imag, která dobře létají, přistávají kolem návnady a dají se snadno sbírat exhaustorem.

Podobně jako motýli, i brouci se dají získávat lovením do suchých lapáků s atraktantem. Súlovky se zachází stejně jako při ostatních metodách sběru imag (viz výše). Lapáky by měly být umístěny ve stínu listů a kontrolovány každý den.

Specifickou metodou je sběr vzorků invazního slunéčka východního (*Harmonia axyridis*). Larvy i imaga se získávají individuálním sběrem v ohniscích přemnožení stromových mšic nebo mer, popř. sklepáváním do sklepáadel nebo do entomologické sítky. Ke sběru imag se použije speciální miskovitá pinzeta na hmyz nebo exhaustor. Z exhaustoru se jedinci dobře přesypávají do transportních nádob po narkotizaci CO₂. Do transportních dobře větraných nádob se imagům vkládá buničina, na kterou se při delším transportu injekční stříkačkou nebo stříčkou vstřikuje voda. Pro larvy se do nádoby vkládá část rostliny, na kterou se nasypou mšice nebo mery (rostlina nemusí být živnou rostlinou mšic a mer). V laboratoři se přemístí úlovek do Petriho misek s potravou, kterou mohou být mšice, mery, vajíčka motýlů (např. *Plodia interpunctella*, *Ephesia kuehniella* apod.). Obě stadia ochotně přijímají i náhradní potravu (např. těsto z medu, kvasnic a pylu orobince). Při použití náhradní potravy je třeba zásobovat slunéčka i zdrojem vody (vlhčený tampon z buničiny) (obr. 14).

Přes četné snahy nebyla u tohoto druhu zatím zjištěna žádná významná mikrobiální infekce. Až nedávno se v Evropě začala šířit a stoupat infekce způsobená druhově specifickou houbou *Hesperomyces harmoniae*, která se vyskytuje na dospělých po celou vegetační

sezónu, ale její výskyt kulminuje na podzim. V tomto období lze k jejich sběru využít masové migrace imag do zimovišť a vyhledávání míst pro zimování, jako jsou travní drny, lidská obydlí, parapety. Dochází k tomu po snížení teploty blízko k 0 °C. Signálem pro „start“ je



Obr. 14 Chov larev (vlevo) a imag (vpravo) invazního slunéčka východního na náhradní potravě.

pak opětovné zvýšení teploty na 18-20 °C. Vlastní let pak probíhá za slunečného počasí v denních hodinách při teplotách nad 15 °C. Slunéčka využívají tzv. hypsotaxi, orientaci na dominanty obzoru, na které naletují v tisících jedinců. Na stěnách budov se snadno odchyťávají imaga exhaustorem a po narkotizaci CO₂ se přesypávají do kelímků s otvory pro výměnu plynů, do kterých se vloží buničina. Kontrola infekce se provádí opět po narkotizaci. I dlouhodobě je možné slunéčka skladovat v chladničce.

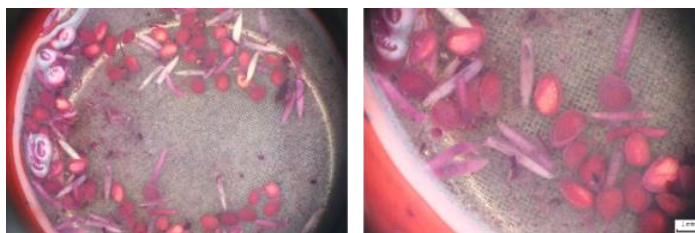
Při uplatnění metody je možné zároveň získávat i další invazní druhy využívající hypsotaxi, jako je kněžice mramorovaná (*Halyomorpha halys*), kněžice zeleninová (*Nezara viridula*) nebo vroubenka americká (*Leptoglossus occidentalis*). Imaga slunéčka východního naletují i do světelných lapačů, které jsou vhodným prostředkem pro monitoring sezonního vývoje entomopatogenní houby *Hesperomyces harmoniae*.

1.3. Sběr zástupců řádu dvoukřídlí (Diptera)

V popředí zájmu v rámci tohoto řádu jsou čeledi octomilkovitých (Drosophilidae), vrtulovitých (Tephritidae) a bejlomorkovitých (Cecidomyiidae), zahrnující jedny z hospodářsky nejvýznamnějších nepůvodních druhů.

Přestože z čeledi octomilkovitých se součástí naší fauny stalo více nepůvodních druhů, včetně octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*), pozornost je věnována hospodářsky nejvýznamnější octomilce japonské (*Drosophila suzukii*). Nicméně k patologickému vyšetření by měly být brány v úvahu i další druhy, které přicházejí s octomilkou japonskou do styku, s ohledem na možnou vzájemnou přenosnost patogenů.

Larvy octomilky japonské získáváme ze zrajících až zralých plodů ovoce. Vybírají se takové plody, které nenesou známky poškození (okousání vosami, poškození kroupami, výletové otvory vrtulí apod.). Poškozené plody hostí spíše jiné druhy octomilek. Plody



Obr. 15 Mrtvé larvy z ovoce obsahujícího antokyany (ostružiny, červené víno) se barví, živé zůstávají bílé.

se přepravují v prodyšných nádobách, chráněné před ostatními octomilkami jemnou síťovinou a zpracovávají se v laboratoři „vyluhováním“ (obr. 15). Plody v síti (cedníku) ponoříme do mísy s hypertonickým roztokem chloridu sodného (82 g kuchyňské soli na 1 litr roztoku), ve kterém larvy z plodů vylézají. Po 2 hodinách se larvy v míse procedí hustým sítkem, propláchnou vodou

a položením dna sítka na polštářek z buničiny se vysuší. Nehybné larvy se ihned patologicky zpracují nebo zamrazí, živé se uloží v uzavíratelné nádobě do chladničky k pozdějšímu zpracování.



Obr. 16. Maliny v neprodyšném PE sáčku jako zdroj larev octomilky japonské.

Z drobného ovoce je možné získat larvy také vložením ovoce do neprodyšného PE sáčku s jezdcem a vystavení teplotě cca 30 °C (obr. 16). V důsledku nedostatku kyslíku za vysoké teploty larvy opouštějí plody a lezou po stěnách sáčku. Ovoce se ze sáčku vysype a larvy vypláchnou vodou do sítka. Dále se postupuje jako v předchozím případě. K získání dospělých octomilek japonských lze použít několik metod efektivních v době nejvyšší abundance, tj. od srpna do října. Pokud je známo silné ohnisko na malinách nebo ostružinách,

je možné exhaustorem za svítání dobře lovit imaga na plodech. Když pomine noční chladová strnulost hmyzu, je metoda neefektivní. Podobně při stmívání a těsně po setmění se dají smýkat nebo lovit exhaustorem hlavně samci *D. suzukii*, kumulující se na koncích letorostů a listů. Nejeefektivněji se imaga získávají sklepáváním do entomologické sítě z plodenství bezu černého, maliníku a ostružiníku nebo z trsů plodů třešní a višní. Mávání sítkou nad periferií koruny (větví) těsně před západem slunce poskytuje nejlepší výsledky lovu. Ve stejné době je možné lovit octomilky stejně jako lesknáčka na střeše automobilu exhaustorem. K přilákání se použije návnada z octa a červeného vína, připravená dle popisu v již dříve vydané metodice (Ouředníčková et al., 2024). Ze sítě se vychytávají exhaustorem a po narkotizaci CO₂ přesypávají do transportních nádob (obr. 17). Osvědčily se PET kelímky s víčkem perforovaným velkými otvory, pod které se vkládá síťovina. Životnost octomilek se zvyšuje vložením úkrojku jablka. K absorpci šťávy, vytékající z ovoce se dno naplní sádrou nebo vrstvou hydrogelu (obr. 18).



Obr. 17 K odchytu octomilek se používá exhaustor (vlevo). K imobilizaci imag se použije CO₂, přiváděný hadičkou z tlakové bomby do exhaustoru.



Obr. 18 Konstrukce lapáku: přidání úkrojku jablka jako výživy imag ulovených octomilek, dřevitá vata k ochraně imag před utopením ve vysrážené vodě na stěnách lapáku.

K získání imag octomilky japonské, zejména ke studiu dynamiky infekcí patogeny, je možné použít monitorovací lapáky z 200-250 ml PET kelímků, opatřených bočními vletovými otvory s hmoždinkami a dnem pokrytých ztuhlou sádrou (obr. 18). Návnadou se nasýtí sádra. Protože ta zpočátku reaguje s kyselinou v návnadě, doporučuje se po jejím zatvrdnutí a vysušení ji zalít

octem, potom znovu vysušit a teprve potom nasáknout návnadou, množstvím, které se 100% vsákne a nevytváří na povrchu kapalnou film. Selektivitu návnady ve směru k octomilce japonské je možné zvýšit přidáním hřebíčkové silice (eugenolu) v koncentraci 0,01% návnady.

Při kontrole se celý lapák sejme, uzavře do PE sáčku s jezdcem, do kterého se vypouští vsunutou hadičkou CO₂ z tlakové láhve pro imobilizaci úlovku (obr. 17).



Obr. 19 Instalovaný lapák (vlevo), kadávery octomilek, kumulovaných na špejli, se sporulující entomopatogenní houbou (vpravo nahoře), ulovený sameček o. japonské (uprostřed) a zaslepení vletových otvorů plastickou hmotou (dole).

V laboratoři se přemístí úlovky do plastových Petriho misek, na jejichž dno se položí tenký plátek jablka (čím nezralejší, tím lepší – nižší obsah cukrů omezuje rozvoj plísní). Vzorky se exponují 10–14 dní. Poté se živí jedinci volně vypustí a kadávery patologicky zpracují. Kondenzaci vody odpařené z ovoce na víčku misky zabráníme udržováním stálé teploty.

Speciálně ke studiu infekce entomopatogenní houbou *Entomophthora muscae* je předchozí technika modifikována. Do stejného PET lapáku se před ztuhnutím sádky zapíchne dřevěná špejle, a kromě nasycení sádky návnadou, se do lapáku vloží úkrojek jablka. Protože tyto lapáky se exponují od konce srpna do konce října, způsobují nižší noční teploty kondenzaci vodní páry na stěnách kelímku. Aby se ulovené octomilky v kondenzátu neutopily, vloží se do kelímku dřevitá vata, které dávají imaga přednost před stěnami lapáku (obr. 19). Lapáky se exponují 2–3 dny. Před sejmutím se vstupní otvory zaslepi plastickou hmotou (plastelína, sklenářský tmel), aby se zabránilo úniku úlovků, a hlavně

vstupu necílových druhů v laboratoři. Celý lapák se sejme a v pokojových podmínkách exponuje 10–14 dní. Charakteristické kadávery se soustřeďují na špejli, ze které je po expozici pinzetou sejmemo a patologicky zpracujeme. Delší expozice je neúčelná a vede k sekundárním saprofytickým infekcím. Živé jedince po této době můžeme považovat za neinfikované. Dosavadní výzkum relací mezi o. japonskou a entomopatogenní houbou *E. muscae* prokázal interspecifický přenos patogena, ale stále nedorozřešenou otázkou zůstává infekčnost a virulence lokálních sérotypů a konspecifický transfer v populaci o. japonské, stejně jako mezisezonní konspecifický transfer. Podle výsledků výzkumného projektu NAZV QK22020019 v částech zaměřených na tohoto patogena bylo prokázáno široké rozšíření na necílových druzích octomilek i jiných dvoukřídlých. Zároveň se však ukázalo, že k infekcím o. japonské dochází především (ne-li výhradně) přenosem z jiných druhů, a to především na konci léta. K dalšímu výzkumu patogena, jeho přírodních zdrojů, jejich významu v přenosu na o. japonskou, popř. i jejich využití k řízenému přenosu, je tedy nezbytné zabývat se jím i u jiných octomilek.

Zdroje octomilek a houby se nacházejí ve skládkách matolin z letního ovoce, na kompostech a v kontejnerech na bioodpad. Získání biologického materiálu je jednoduché. Stačí mávání entomologickou sítí nad bioodpadem, resp. nad kontejnerem. Vhodným termínem je druhá polovina června a od konce srpna do začátku října. Úlovek se rozdělí do více nádob, ale počet na jeden kelímek by se měl pohybovat mezi 50-100 jedinci (obr. 20). Větší množství vede k úhynu octomilek již během přepravy a množství takto vzniklých kadáverů je nepracovatelné.



Obr. 20 Rozdělení úlovku octomilek do více nádob.

Z čeledi vrtulovitých je sledováno pět druhů, z nichž jeden (vrtule třešňová) je autochtonní a je brán v úvahu jako potenciální zdroj vzájemně přenosných patogenů a model pro práci s vrtulí višňovou. Získávání larev vrtule třešňové (*Rhagoletis cerasi*) (obr. 21) a vrtule višňové (*Rhagoletis cingulata*) je možné provádět třemi technikami:



Obr. 21 Larva vrtule třešňové

1. Vyluhováním třešní nebo višní hypertonickým solným roztokem postupem, uvedeným u octomilky japonské. Vrtule třešňová se získává z třešní během 4. – 8. třešňového týdne sladkých odrůd višní a světlých ptáčnic. Vrtule višňová se získává od poloviny července z třešní 7. – 8. třešňového týdne višní a tmavých ptáčnic. Je nutné počítat s tím, že ve vzorcích na vrtuli višňovou jsou u nás doposud nálezy tohoto druhu sporadické a naprostá většina larev patří vrtuli třešňové. V případě pozitivního patologického nálezu je nutná determinace larvy genetickou metodou. Plody se sklízí i se stopkou, aby se zabránilo vytékání šťávy.

2. Místo vyluhování nasypeme plody bez odstopkování do suchého síta a za svítání vybíráme z mísy larvy, které plody opustily a pátrají po místě k zakuklení. Larvy je nutné jen krátkodobě uložit v 4 °C lépe v - 20 °C, protože zakrátko se svlékají do puparia a kuklí se. U višní často dochází přes všechny snahy o vytékání šťávy do mísy s larvami. V tomto případě doporučujeme larvy opláchnout v sítku vodou a vysušit buničinou.

3. Pod třešeň nebo višeň se rozloží plachta, na kterou vypadávají z plodů larvy. Ty je nutné po rozednění sbírat a okamžitě zchladit nebo zmrazit.



Obr. 22 Plastové kyblíky pro transport plodů pro odchyt larev vrtulí (vpravo). Ořechy obsahující larvy vrtule mají černou, mokvající rubinu (uprostřed). Plody rakytníku napadené larvami vrtule rakytníkové (vlevo).

Plody se přepravují v plastových otevřených kyblících nebo kartónových krabičkách (obr. 22 vlevo). U višní, kde často dochází k vytékání šťávy z plodů se doporučuje dno nádoby vyložit absorpčním materiálem (buničina, hydrogel, piliny) a před přenesením na síto odstopkovat plody. Krátkodobě se získané larvy uchovávají v 4 °C, pro pozdější zpracování se mohou larvy zamrazit.

Larvy vrtule ořechové (*Rhagoletis completa*) se získávají stejně jako larvy třešňových vrtulí podle bodu 2) a 3). Podobně jako larvy octomilky japonské, pokud jsou ořechy uzavřené po dobu 2-4 hod. do neprodyšného PE sáčku s jezdcem, začnou po otevření sáčku opouštět rubinu. Larvy, které dokončily vývoj, mají pozitivní geotaxi a prolézají na dno sáčku, popř.

pokud jsou ořechy na síti, propadají do mísy. Mladší larvy naopak vykazují negativní geotaxi a mají tendenci lézt směrem vzhůru a unikají ze sáčku i mísy a pokud jsou uchovávány v pokojových podmínkách, hynou. Díky přítomnosti většího počtu larev v každém ořechu je snadné jejich získání vybíráním pinzetou z chodeb v rubině po jejím rozříznutí (obr. 22 uprostřed).

Larvy vrtule rakytníkové se získávají technikami uvedenými u třešňových vrtulí pod body 2) a 3). Přítomnost larev vrtule se snadno pozná podle změny barvy a konzistence plodů (obr. 22 vpravo). Larvy vrtule velkohlavé (*Ceratitis capitata*) je možné izolovat z plodů stejně jako u třešňových vrtulí podle bodu 2) a 3). U třešní a višní je možná záměna s třešňovými druhy vrtulí. V případě pozitivního patologického nálezu je nutná determinace larev molekulárně genetickou metodou. U velkoplodého ovoce (švestky, meruňky, broskve, jádroviny) je možné metodu



Obr. 23 Imago vrtule třešňové



Obr. 24 Jeden z typů McPhailova lapáku (vlevo). Imago vrtule přilepené pouze končetinami k lapáku (vpravo).

izolace suchým sítím modifikovat použitím přepravních bedýnek na ovoce místo síta. Místo mís se použije táč se zvýšeným okrajem adekvátní velikosti, nebo se kolem bedýnky zhotoví bariéra z pásů kartónu, fixovaných na vnějším obvodu lepící páskou, pod které larvy po vypadnutí z bedýnky zalézají.

Díky přítomnosti většího počtu larev je také snadné jejich získání vybíráním pinzetou z chodeb ve větších plodech po jejich rozříznutí. Nebezpečí záměny s larvami octomilek je minimální, protože larvy jsou vzájemně snadno rozlišitelné. Záměna je možná s larvami vrtule ořechové na nektarinkách v blízkosti napadených ořechových sadů nebo alejí.

K získávání imag vrtule třešňové a vrtule ořechové pro patologická vyšetření je nejefektivnější metoda sklepávání do entomologické sítě v místech růstu plodů v době, kdy samičky kladou vajíčka (obr. 23). Ze sítě se imaga vychytávají exhaustorem a k přenosu do přepravních nádobek se narkotizují CO₂. Jako přepravní nádobky se osvědčily kelímky na odběr koprologických vzorků, perforované pod víčkem malými otvůrkami pro výměnu plynů nebo PP zkumavky. Imaga jsou citlivá na nedostatek vody. Proto se doporučuje na dno kelímku nalít vrstvičku sádky, která se zvlhčuje vodou nebo suspenzí převařených kvasnic v cukrové vodě. Ve zkumavkách se nechá sádka zatvrdnout v šikmé poloze (podobně jako šikmý agar). V těchto nádobkách je možné udržovat vrtule i dlouhodobě při laboratorní teplotě, a to až do jejich úhynu nebo objevu plísní na sádce. Oba zmíněné druhy se dají nasávat exhaustorem přímo z plodů, pokud je to časově rentabilní s ohledem na populační hustotu. U v. ořechové jsou jinak ostražitá imaga snadno polapitelná exhaustorem v době, kdy je jejich pozornost odvedena pro ně esenciálními činnostmi, jako je boj samců o samici nebo páření.



Obr. 25 Dospělec ostnohřbetky americké fixovaný lepem na žluté lepové desce.

Imaga všech zmíněných vrtulí jsou lákána žlutou barvou a většinou i atraktanty. K jejich získávání pro patologická vyšetření je tedy možné využít žlutě zbarvené lapáky, ale efektivnost odchytu je nejnižší ze všech zmíněných metod. Speciálně pro vrtule je určen McPhailův lapák

v různých modifikacích (obr. 24). Jako atraktant se u vrtule třešňové použije uhličitán amonný, hydrogenuhličitán amonný nebo octan amonný.

Naopak žluté optické lapáky jsou velice účinné, ale typy, které jsou natřeny viskózním polymerem jsou pro patologická vyšetření nevhodné. Lep prosycuje ulovený hmyz, s úlovkem se obtížně manipuluje a mění strukturu tkání a buněk.

Přesto existují výjimky. Na odchyt vrtule ořechové v silně napadených ohniscích lze použít upravené lapáky REBELL amarillo, exponované na dobu 15–30 min na spodní větve ořechů za jasného dne a bezvětří mezi 10.–17. hodinou od konce července do konce srpna. Modifikace spočívá v tom, že před použitím se špachtlí setře lep na minimální vrstvu (výrobce nanášená vrstva lepu je příliš silná a vede k přilepení imag tělem a prosycení polymerem), na kterou se imaga přichycují pouze nohama (obr. 24).

Podobně se dají použít u vrtule višňové a v. rakytníkové žluté lepové desky s tuhým, termicky nanášeným lepem. Exponují se v době letu imag a kontrolují po 1–2 jasných, teplých dnech. Dospělci se lepí končetinami, tělo zůstává volně a ulovení jedinci žijí. V obou případech se úlovky opatrně z lapáku sejmou pinzetou a ukládají ve zkumavce. Většina jedinců je při snímání poraněna odtržením nohou a/nebo křídel a brzy hynou. Proto se úlovky zpracovávají co nejdříve nebo zamrazí.

1.4. Sběr zástupců řádu polokřídlí (Hemiptera)

U podřádu mšicosaví (Sternorrhyncha) patří mezi nejvýznamnější patogeny entomopatogenní houby. U puklic a štítenek (nadčeleď Coccoidea) nebo mšic (nčel. Aphidoidea) se provádí vizuální kontroly kolonií na živných rostlinách. Kadávery očividně napadené houbami se sejmou preparační jehlou do mikrozskumavek nebo zkumavek, ve kterých se přepravují a následně podchlazené nebo zamražené uchovávají k patologickému zpracování.

Z podřádu kříśů (Auchenorrhyncha) se ostnohřbetka americká (*Stictocephala bisonia*) získává sklepáváním nebo smýkáním. Nymfy se vyskytují na vojtěšce nebo kopřivách, imaga především na černém rybízu, maliníku, ořešáku

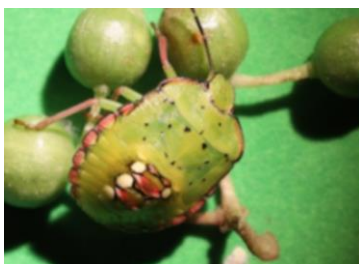


Obr. 26 Kolonie nymf a imag voskovky zavlečené na kopřivách.

královském, třešních a révě vinné. Sbírají se exhaustorem s nasávací trubičkou většího průměru. Transportují a uchovávají se v nádobkách provzdušněných perforací stěn nebo víčka. Do nádoby se vkládá list ořešáku (nebo rybízu, třešně, meruňky apod., ale ty rychleji vysychají) nebo kousky kopřivového stonku. Pokud list zavadá, nahradí se novým.

Dospělé ostnohřbetky nalétají na žluté optické lapáky, na které se zpravidla lepí prodlouženým štítem, takže orgány uložené v hlavě, hrudi a zadečku nejsou prosyceny lepem a ulovený hmyz je patologicky zpracovatelný (obr. 25). V ještě lepším stavu jsou jedinci ulovení do suchých feromonových lapáků na kněžici mramorovanou. Živí jedinci jsou zelení, kadávery rychle zežloutnou nebo hnědnou. Úlovky nejsou příliš početné, ale korespondují s počtem imag získaných při 100 sklepnutí.

Voskovka zavlečená (*Metcalfa pruinosa*) se získává skleпáváním do sítky, a to jak nymfy, tak imaga. Nymfy se nejčastěji vyskytují na kopřivě dvoudomé kuklíku městském a pajasanu žláznatém, imaga na trnovníku akátu, javorech a ořešáku královském (obr. 26). Obě stádia



Obr. 27 Nymfa a imago kněžice zeleninové

dobře skáčou a snaží se uniknout ze skleпávadla. Úlovky ze sítky se vyklepou do zipovacího sáčku, ze kterého se vyklepou nebo vybírají po narkotizaci CO₂. Transport i další udržovací chov se provádí v papírových miskách s PET víčkem, perforovaných

pro výměnu plynů (polévkové misky), do kterých se vloží ústřížky stonků kopřivy dvoudomé i s listy. Nymfy se dají z početných kolonií rukou skleпávat ze živné rostliny přímo do misky, nebo se do misky opatrně odstřihují lity s kolonií.

Z podřádu ploštíc (Heteroptera) je základní metodou sběru skleпávání nymf i imag do skleпávadla nebo sítky. U druhů, které jsou z ovocnářského hlediska v popředí zájmu, se provádí na živných rostlinách, na kterých dochází k agregaci jedinců. U kněžice zeleninové (*Nezara viridula*) k takovým rostlinám patří bez černý (*Sambucus nigra*) a bez chebdlí (*Sambucus ebulus*) ve stádiu zelených, fialových i zralých peckoviček (obr. 27). Skleпává se z vrcholových plodenství. Úlovek se pinzetou přenese do vhodné provzdušněné nádoby, do které předem nastříháme několik větviček plodenství bezu. Ve stejných nádobách je možné kněžice transportovat, i dále v laboratorních podmínkách chovat.



Obr. 28 Nymfa kněžice mramorované (*Halyomorpha halys*) na dužnatém lusku jerlínu japonského (*Sophora japonica*) a imago na nažce javoru (*Acer* sp.).

Nymfy tohoto druhu se dají

dobře získávat okleпáním z plodů zelených až zrajících rajčat, které preferují před ostatními rostlinami. K patologickému vyšetření jsou dobře použitelné úlovky do feromonového lapáku. Díky tomu, že kromě sexuálního feromonu se součástí atraktantu i kairomon, vyskytují se v lapácích i nymfy kněžice mramorované (obr. 28, 29).



Obr. 29 Lapák na kněžici mramorovanou

Oba druhy kněžic vykazují hypsotaxi a naletují spolu se sluníčkem východním na stěny vhodných budov. Kromě sakrálních budov jsou preferovány také budovy čerpacích stanic s velkými parkovišti kamiónů a v intravilánech měst panelové domy. Oba druhy také naletují na světelné lapače, které v lokalitách s vysokou abundancí patří k významným zdrojům materiálu pro patologická vyšetření, zejména pro monitoring dynamiky nákaz. Často se také seskupují kolem světla na stěnách domů.

Další nepůvodní druh ploštice, udávaný jako příležitostný škůdce broskví, je blánatka lipová (*Oxycarenus lavaterae*) (obr. 30). Patologické vzorky (nymfy i imaga) lze snadno získat sklepáváním z plodných větví lip (*Tilia spp.*). Jedinci sklepnutí ze stromu se přesypou do připravené provzdušněné nádoby, naplněné lipovými oříšky. Výběrově se mohou ze sklepávadla sbírat exhaustorem, ze kterého se snadno vyklepávají do přepravní nádoby. Ve stejné nádobce se dají ploštice uchovávat delší dobu při laboratorních podmínkách a může v nich probíhat i další vývoj nymf. V případě potřeby se doplňuje/vyměňuje potrava.



Obr. 30 Blánatka lipová na lípě

Od konce srpna do října se blánatky seskupují na kmenech lip nebo na budovách či jiných stromech, odkud se snadno pinzetou shrnují do připravené nádoby. Zpočátku převažují nymfy, s postupem času jsou stále více zastoupena imaga. V zimních měsících se na stejných místech dají přezimující imaga sbírat v hibernákulích u paty stromů. Sbírají se do nádobek se suchým listím nebo zmačkaným papírem a uchovávají se v chladničce.

1.5. Sběr druhů řádu blanokřídlí (Hymenoptera)

Patologický materiál se získává podobně jako je tomu u motýlů. Volně žijící housenice širopasých blanokřídlých (podřád Symphyta) se sklepávají do sklepávadla nebo do sítky a pinzetou se vybírají do provzdušněných kelímků. Vedle listů živé rostliny se housenicím do nádoby vkládá také savá buničina, která odsává vyvrhovaný obranný exkret (směs chymu a slinných exkretů). Pokud se housenice dále v kelímku chovají, je nutné doplňování potravy, výměna buničiny a zároveň odstraňování exkrementů (ty je možné patologicky vyšetřovat, protože často obsahují patogeny, vyměšované spolu s trusem). Krátkodobě se housenice uchovávají v chladničce při 4 °C, dlouhodobě v zamraženém stavu - 20 °C.

Mnoho druhů této skupiny hmyzu klade skupiny vajíček nebo je klade jednotlivě, ale v malých prostorových rozestupech. Housenice se pak vyskytují v početných skupinách nebo dokonce vytvářejí hnízda opředená



Obr. 31 Holožír larev paličnatky *P. quadrimaculatus* na hlohu (vlevo). Housenice paličnatky na kmeni stromu (vpravo).

hedvábím. Svoji přítomnost mohou signalizovat zřetelnými holožíry (obr. 31). V těchto případech se materiál sbírá ručně pinzetou a hnízda se odstřihují i se zapředenou částí živé rostliny. Jednotlivé housenice se ukládají do výše popsaných kelímků, hnízda se vkládají do papírových sáčků, vsunutých do sáčků z HDPE k zabránění vysychání.

Během sběru se separovaně ukládají do zkumavek nalezené kadávery, které bývají pevně přichyceny na listech a větvičkách živné rostliny, ale vyplatí se pátrat po nich i v nezatravněných ploškách pod korunou a u paty kmenů, kde se často vyskytují a kupí.

Paličnatka *Palaeocymbex quadrimaculatus* způsobuje holožírý na třešních, višních a hlozích. Po dokončení vývoje housenice slézají po kmenech do detritu, kde v hustém kokonu přezimují a kuklí se. Tato paličnatka bývá silně napadána zatím blíže neurčeným virem, který housenice usmrcuje v době migrace do detritu. Gumovité kadávery pak tvoří u paty kmene hromádky.



Obr. 32 Larva pilatky žlutonohé v plodu švestky.

Druhy s krypticky žijícími karpofágními housenicemi se sbírají stejným způsobem, jak je popsáno u kryptických housenek motýlů. Druhy s podobným způsobem života jako má pilatka žlutonohá (*Hoplocampa flava*) se dají z napadených plodů získat vybráním pinzetou po rozříznutí plodu nebo se plody nasypou do hrubého síta a housenice opouštějící plody a propadají do mísy s vlnitou lepenkou na dně (obr. 32).

Zvláštní pozornost si zasluhuje nepůvodní druh, tmavka švestková (*Eurytoma schreineri*), která se stala obávaným škůdcem švestek a ohrožuje i meruňky. K patologickému vyšetření larev se vzorky odebírají na lokalitách, kde v červenci došlo k vadnutí a opadávání plodů (obr. 33). Plody napadené tmavkou jsou mumifikované, mírně nafouklé, bez stopky. Pokud mají mumifikované plody stopku, jsou ploché a často v chuchvalcích, jedná se o moniliózu.



Obr. 33 Plody a pecky švestky napadené tmavkou švestkovou.

Přestože vzorky plodů se dají odebírat od července do konce března následujícího roku, doporučujeme provádět je až v průběhu března. Larvy jsou dobře ukryty v mumifikované dužině a zdřevnatělé pecce. Až po dlouhodobém kontaktu s vlhkou půdou je umožněno patogenům pronikání do pecky k larvě. Při vzorkování se řídíme vzhledem opadaných plodů. Zárukou výskytu larev tmavky jsou mumifikované plody (obr. 35, horní řada) a to i takové, které mají prasklou mumifikovanou dužinu nebo jsou na pecce jen její zbytky. Výjimečně se larvy nacházejí v „nových peckách“, které byly zbaveny dužiny pozřením nebo hnilobou (obr. 35, spodní řada). U starých pecek, charakteristických tmavší barvou a zpravidla i různě velkou kontaminací půdními částicemi, vyloučíme pecky s dírkou (z těch se již vylíhla imaga) a pecky které při stisknutí mezi prsty jsou houbovitě měkké (starší než 2 roky) a puklé ve švech.



Obr. 34 Svěrák pro louskání pecek

Sebrané plody a pecky se v prodyšných obalech (papírové krabičky nebo tubusy) přepraví do laboratoře a uloží až do zpracování v 4 °C. Krypticky (uvnitř pecek) žijící larvy se získají louskáním mumifikovaných plodů a pecek svěrákem (jiné způsoby louskání bývají destruktivní a dochází při něm k významnému poranění larev) (obr. 34).

Získané larvy se přemístí do komůrek v celulóзовých sendvičích, jak bylo popsáno v části o propagaci patogenů krypticky žijících larev brouků a exponují v laboratorních

podmínkách. Průběžnými kontrolami se zjišťuje stav vývoje larev. K vyšetření se berou pouze kadávery a larvy, které sice nejeví symptomy infekce, ale nereagují na podráždění pinzetou. Kukly lze pokládat za zdravé a jakmile skončí kuklení, vyloučí se i živé larvy, reagující na podráždění, které představují zdravou část populace s prolongovanou diapauzou.

Imaga se získávají sklepáváním ze švestek v ohniscích výskytu během května. Upřesnění optimálního termínu je možné provést instalací a kontrolami žlutých optických lapáků. Ze sítěk nebo sklepávadla se sbírají exhaustorem. Narkotizace není třeba, imaga se dobře vyklepávají do transportních nádob. Jako přepravní nádoby se osvědčily kelímky na odběr koprologických vzorků, perforované pod víčkem malými otvůrkami pro výměnu plynů. Do kelímků se vloží nastříhaný filtrační papír, jen mírně zvlhčený vodou. Při laboratorních podmínkách tmavky nežijí dlouho, proto se doporučuje vzorky ihned zpracovat, zchladit nebo zmrazit.

2. Vyšetření hmyzu v laboratoři

Entomopatogeny infikovaný hmyz najdeme prakticky v jakémkoliv prostředí – v půdě, ve vodě, na povrchu rostlin apod. Odlišení napadených jedinců od nenakažených v přírodě závisí na vnější identifikaci příznaků napadení a přítomnosti viditelných znaků infekce. Napadení jedinci často vykazují viditelné příznaky infekce, jako je změna postavení těla, změna barvy, projevy patogena viditelné skrz kutikulu, popř. přímo viditelné např. mycelium hub na povrchu napadeného jedince, ztrátu aktivity a zájmu o potravu, letargii, neobvyklou pozici na rostlině, křehký integument, mumifikaci v případě larev atd.

Pokud sbíráme uhynulé jedince, uchováváme je před vyšetřením v laboratoři v uzavřených vzorkovnicích. Pokud jsou jedinci stále aktivní a živí, přeneseme je do laboratoře, kde je udržujeme při životě a postupně odebíráme uhynulé jedince pro vyšetření na přítomnost entomopatogenů. Entomopatogen je organismus, který, na rozdíl od parazitů, způsobuje většinou rychlý úhyn napadeného jedince. Mezi entomopatogeny patří celá řada tzv. mikrobiálních kontrolních agens (MCA – microbial control agents), mezi které se řadí např. viry, bakterie, houby a nematodi.

Většina infekcí mikroorganismy či nematody probíhá inaparentně (skrytě) uvnitř hostitelů a pro detekci patogenů je potřeba mikroskopické techniky, aby bylo možné jednotlivého entomopatogena přesně určit. Některé příznaky jsou společné pro skupiny entomopatogenů, např. zbarvení nebo chování napadeného hostitele, ale často mohou být stejné nebo podobné příznaky výsledkem působení jiných faktorů, např. fyziologických poruch vyvolaných nedostatkem nebo nekvalitní potravou, otravou pesticidy apod.

Pro všechny kroky izolace a identifikace entomopatogenů, stejně jako pro molekulární analýzy, je zásadním požadavkem dodržování zásad správné laboratorní praxe. Pracujeme ve sterilním a čistém prostředí, před každou prací sterilizujeme nástroje, nádobí, roztoky (pokud je to možné) a pracovní plochu tak, aby nedošlo ke kontaminaci našich vzorků. Přestože drtivá většina entomopatogenů je pro člověka neškodná, je potřeba zachovávat určitou opatrnost při práci s nakaženým hmyzem. Někteří roztoči (např. r. *Pyemotes*) způsobují kožní dermatitidy u člověka, některé houbové patogeny (*Candida* spp., *Aspergillus* sp.) mohou v určitých případech být pro člověka zdraví škodlivé, stejně jako je tomu v případě některých rickettsií.

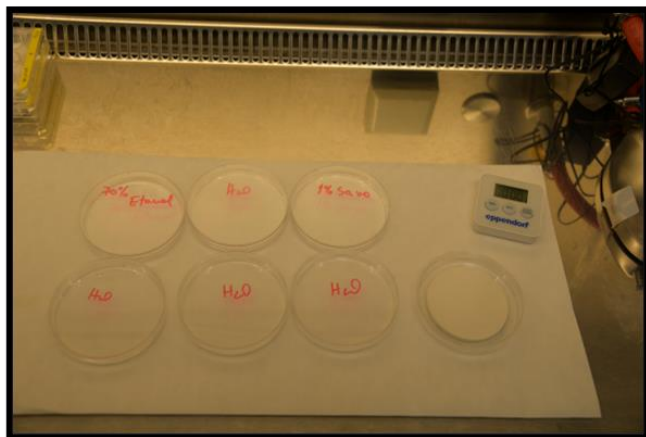
2. 1. Příprava vzorku pro identifikaci/izolaci entomopatogena

Detailní výzkum a izolace entomopatogenů vyžaduje preparaci hostitelského organismu. Prvním krokem k získání čisté kultury patogena je povrchová sterilizace infikovaného kadáveru, ale pouze v případě, že se jedná o patogena, který napadá vnitřní tkáně hostitele. V případě izolace entomopatogenních hub, které ve formě mycelia porůstají hostitelskou kutikulu není tato povrchová sterilizace vhodná (viz dále).

Povrchová sterilizace infikovaného hostitele

Pokud potřebujeme získat čistou nebo sterilní kulturu (např. pro inokulaci do média nebo pro přenos na další hostitele), je povrchová sterilizace důležitou a nezbytnou součástí celého

procesu identifikace a izolace (obr. 35). Povrchová sterilizace je i důležitou součástí molekulární detekce patogenů, protože zabraňuje kontaminaci cizí DNA, která by mohla zkreslovat výsledné molekulární analýzy, ať už PCR nebo následné sekvenování amplifikovaných sekvencí.



Obr. 35 Příprava na povrchovou sterilizaci vzorků

Postup:

1. Jedince ponoříme na několik sekund do 70% etanolu
2. Rychle opláchneme ve sterilní destilované vodě
3. Ponoříme do 0,5% roztoku Sava (popř. jiného roztoku obsahujícího NaClO) po dobu 1 min. Pokud je objekt větší, např. čmelák, použijeme 1% roztok Sava.
4. Opláchneme dvakrát po sobě ve sterilní destilované vodě.
5. Osušíme na sterilním filtračním papíru.

Někdy se do roztoku Sava přidává smáčedlo Tween 80, které zvyšuje pronikání dezinfekce. Povrchová sterilizace malých nebo drobných druhů hmyzu jako jsou molice nebo třásněnky může zahubit patogeny, které chceme detekovat uvnitř těchto hostitelů. V takovém případě je nutné výše uvedený postup modifikovat tak, aby se minimalizoval dopad povrchové sterilizace na přežití entomopatogena uvnitř hostitele – buď sterilizaci vyloučit úplně, popř. nenechávat delší dobu v jednotlivých roztocích, ale objekt pouze krátce ponořit a ihned postupovat dalším krokem povrchové sterilizace.

Pitva infikovaného hostitele

V případě generalizované nákazy nebo na konci infekce u bakterií nebo virů jsou všechny tkáně hostitele dezintegrovány a pitva jednotlivých orgánů není možná. V těchto případech je celé tělo hostitele vyplněno bakteriemi nebo viry nebo houbovým myceliem a vzorky entomopatogenů se dají odebírat přímo po proniknutí do tělní dutiny přes kutikulu hostitele. Jiná situace je v případě, že je infekce lokalizována pouze v některém orgánu. Většina infekcí se vyskytuje v trávicí soustavě jako vstupní bráně infekce u celé řady entomopatogenů; někdy také v tukovém tělese larev. V tomto případě je pitva hostitele a vyšetření orgánů nezbytná pro izolaci a identifikaci patogena. Opět záleží na velikosti a stádiu pitvaného jedince. Dospělí čmeláci nebo včely se pitvají v miskách v odpovídajícím objemu Ringerova roztoku (popř. ve sterilní vodě), mšice, malé a střední housenky, dospělce vrtulí nebo tmavky se pitvají na podložním sklíčku. Pokud máme živé jedince, např. housenky k udržení v laboratoři, jednoduchým vyšetřením trusu níže uvedeným způsobem se dají identifikovat patogeni vyskytující se v jejich trávicí soustavě.

1. Na podložní sklíčko kápeme Ringerův roztok.
2. Do kapky položíme pitvaného jedince. V případě larev roztrhneme kutikulu a vyjmeme trávicí soustavu. Z kutikuly poté izolujeme tukové těleso.
3. Jednotlivé tkáně prohlížíme pod mikroskopem; můžeme použít fázový kontrast.

Barvení entomopatogenů na podložním sklíčku

Celá řada entomopatogenů se identifikuje pomocí barvených preparátů. Jedná se o techniku používanou od začátku výzkumu patogenních agens. Tkáň s patogeny se rozetře na sklíčko do co nejtenčí vrstvy, nechá se zaschnout, fixuje se a barví se barvivem. Pro jednotlivé skupiny mikroorganismů existují různé techniky barvení, většina entomopatogenů je ale dobře barvitelná a následně rozlišitelná pomocí Giemsy – Romanowského barvení.

Část napadené tkáně se roztáhne preparační jehlou na podložním sklíčku tak, aby roztěr byl na jednom místě hustší. Takto připravený roztěr se nechá zaschnout, na zaschlý roztěr kápeme metanol (tím se roztěr fixuje) a po opětovném usušení se roztěr barví roztokem Giemsa – Romanowského po dobu 20 min. Po opláchnutí vodou a usušení se preparát prohlíží ve světelném mikroskopu. Pro zhotovení trvalých preparátů se roztěry mohou zalévat do různých médií, např. Histoclad (Clay Adams, USA).

Elektronový mikroskop

Pro detailnější identifikaci patogenů jsou nutné pokročilejší techniky, buď mikroskopické nebo molekulární. Pro přípravu vzorků pro elektronovou mikroskopii je prvním krokem fixace části tkáně. Postup fixace se neliší pro TEM (transmisní elektronový mikroskop) a SEM (skenovací elektronový mikroskop). Fixace probíhá ve 2,5% glutaraldehydu, obvykle přes noc při 4 °C. Dále se vzorky promývají, vysušují a v případě TEM se zalévají do pryskyřice, v případě SEM se vzorky pozlacují. Podrobnější popis procesu přípravy vzorků je uveden v kapitole 8. Dnes se většina těchto postupů děje na specializovaných pracovištích formou služby.

Příprava inokula

V souladu s Kochovými postuláty musí být identifikovaný potenciální entomopatogen schopen vyvolat infekci v novém hostiteli. Patogen musí být izolován z nakaženého jedince a musí být kultivovatelný na umělém médiu (fakultativní parazit) nebo ve vnímavém hostiteli (v případě obligatorních parazitů – viry, rickettsie, nematodi). Patogen musí po přenesení (inokulaci) do zdravých jedinců stejného nebo příbuzného druhu vyvolat infekci se stejnými příznaky, jaké byly pozorovány u původního hostitele. Z tohoto hostitele musí být patogen znovu izolovatelný a kultivovatelný na umělém médiu se stejnými charakteristikami, jako měl po izolaci z původního hostitele.

Postupy identifikace, izolace a přípravy inokula se liší u jednotlivých skupin patogenů, nicméně pro úspěšnou identifikaci a zavedení případného entomopatogenního agens do ochrany proti škůdcům je i příprava inokula, zvláště s ohledem na testování virulence příslušného patogena, často výslednou fází determinace a identifikace patogena u hmyzího hostitele.

Příloha

Roztoky

- 70% etanol
- 0,5% roztok SAVO (chlornan sodný)
- Ringerův roztok (Ringer's solutin)
 - 9 g NaCl
 - 0,4 g KCl
 - 0,4 g CaCl₂
 - 0,2 g NaH₂CO₃
 - doplníme do 1L sterilní destilované vody
- Giemsa – Romanowský barvicí roztok
 - 1 díl roztoku Giemsa – Romanowski: 20 dílů vody

3. Detekce a izolace entomopatogenních virů

Celá řada virů, které se vyskytují u hmyzu, reguluje populace mnoha jeho druhů hmyzu, včetně druhů hospodářsky významných škůdců. V popředí výzkumu hmyzu jsou zejména viry, které způsobují epizootie a regulují populace hostitelů. Tento zájem trvá několik desítek let a počátek výzkumu entomopatogenních virů, majících využití v ochraně rostlin, sahá hluboko do minulého století.

Infekční virové částice mnoha druhů hmyzích virů jsou zapuštěny do okluzních tělísek. Okluzní tělísko je bílkovinná hmota (protein), která obaluje viriony (jeden až desítky, podle druhu viru) a chrání virové částice ve vnějším prostředí. Tyto okluze se vyskytují například u bakulovirů, entomopoxvirů a cypovirů a na rozdíl od virových částic jsou viditelné ve světelném mikroskopu.

V počátcích hmyzí patologie byly virové infekce identifikovány podle příznaků u hostitelů (např. Wipfelkrankheit neboli „vrškování“ – housenky zavěšené na vyvýšených místech – obr. 36). Později se k identifikaci začala využívat elektronová mikroskopie. V posledních letech, podobně jako u jiných skupin organismů, se identifikace entomopatogenních virů provádí molekulárními metodami.



Obr. 36 Kádavery housenek štetconoše trnkového usmrčených virem jaderné polyedrie.

Rozdělení entomopatogenních virů kopíruje klasické Baltimorovo schéma na DNA a RNA viry. Není účelem tohoto textu podrobněji popisovat rozdělení, systém a zástupce jednotlivých skupin hmyzích virů. Zájemcům o tuto problematiku doporučujeme např. texty v monografiích zabývajících se hmyzí patologií (např. Kaya a Vega, 2012; Rowley a kol., 2022; Hajek a Shapiro, 2018). Rozdělení entomopatogenních virů je dostupné i online na stránkách ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses - <https://ictv.global/>).

Z hlediska výzkumu entomopatogenních virů jako možných přípravků na ochranu rostlin na bázi mikroorganismů jsou nejdůležitější skupinou DNA viry. Jejich kultivace je jednodušší, stejně jako skladování a uchovávání, na rozdíl od celé řady RNA virů.

DNA hmyzí viry jsou většinou okludované virové částice v proteinové okluzi, které jsou dobře viditelné ve světelném mikroskopu. Okludované viry patří do čeledi *Baculoviridae* a podle morfologie okluze se dělí na polyedrické viry a granuloviry. Tyto viry napadají zástupce řádu Lepidoptera, Hymenoptera a Diptera. Ve všech případech se tyto viry vyskytují u larválních stádií. Mezi vnější příznaky infekce virem patří změna barvy kutikuly. Většinou jsou napadení jedinci světlejší, larvy odmítají přijímat potravu, jsou letargické, pomalé, nebo bez pohybu. Před smrtí často vylézají na povrch rostlin a umírají v zavěšené poloze (obr. 38). Po úhynu velmi snadno praská kutikula, vnitřní tkáň jsou v důsledku infekce virem a následné bakteriální septikémii dezintegrovány a z tělní dutiny se vyřine masa okluzních tělísek (obr. 37).

Vnitřní příznaky infekce jsou patrné až po pitvě napadených jedinců, a to pouze v době na začátku infekce, popř. v jejím průběhu. Na konci infekce žádné orgány nejsou identifikovatelné v důsledku dezintegrace tkání. Nakažené střevo (u řádů Hymenoptera a Diptera) je světlé až

bílé, u larev řádu Lepidoptera bývá generalizovaná nákaza tukového tělesa, a v obou případech jsou ve světelném mikroskopu vidět okluzní tělíska různých tvarů a velikostí podle druhu viru.



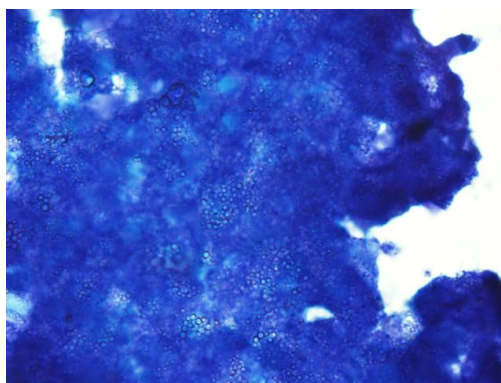
Obr. 37 Křehký integumet kádáveru housenky obaleče jablečného, usmrcené virem granulózy (*Cydia pomonella* GV), se trhá i při sebejemnější manipulaci.

Viry z podčeledi *Entomopoxvirinae* patří do čeledi *Poxviridae*. Napadají zástupce řádů Lepidoptera, Coleoptera a Diptera. Charakteristickým znakem těchto virů je změna barvy nakažených hostitelů (bílé nebo světle modré zbarvení), snížený příjem potravy a extrémní dlouhověkost nakažených jedinců. Většinou je napadené tukové těleso, které se na konci infekce rozpadá a je vyplněno okluzemi. U lýkožrouta smrkového je při infekci virů z této podčeledi napadena trávící soustava a okluze jsou uvolňované do lumenu střeva.

Zástupci čeledi *Iridoviridae* napadají celou řadu významných škůdců nebo přenašečů nemocí.

Charakteristickým znakem infekce je červené, zelené, modré nebo oranžové zbarvení infikovaných jedinců, kteří hynou dříve než neinfikovaní hostitelé. Viry se replikují v tukovém tělese, hemocytech a v epidermis. Netvoří inkluze a virové částice se dají pozorovat pouze v elektronovém mikroskopu (obr. 39).

Většina infekcí způsobených RNA viry probíhá bez viditelných příznaků na životě hostitele. Výjimkou jsou zástupci z čeledi *Iflaviridae*, způsobující tzv. flacherie u housenek bource morušového (*Iflavirus flackerie*). Napadení jedinci tmavnou, jejich vývoj je přerušen a hynou v larvální fázi vývoje. Podobný účinek má např. pytlíčkovitý virus plodu, známý pod názvem Sacbrood virus (*Iflavirus sacbroodi*) u včel. Další zástupci virů z čeledi *Iflaviridae* způsobují deformace různých orgánů např. u včel virus deformovaných křídel (*Iflavirus aladeformis*). RNA viry napadají různé tkáně, ale často nezpůsobují epizootie a jejich vliv na hostitele nemusí být nutně patogenní. Tyto viry se pak dají identifikovat pomocí elektronové transmisní mikroskopie nebo pomocí metod NGS, popř. klasickými RT – PCR metodami pomocí specifických primerů.



Obr. 38 Okluzní tělíska bakuloviru v tukovém tělese přástevníčka amerického obarvené Giemsou - Romanowského barvením.

Následující popis identifikace virů se bude týkat pouze okludovaných virů – bakulovirů (z čeledi *Baculoviridae*) a entomopoxvirů (z podčeledi *Entomopoxvirinae*). Pro pozorování těchto virů ve světelném mikroskopu potřebujeme připravit preparáty infikované tkáně hostitele. Pitva a příprava infikovaných hostitelů byla popsána výše (viz kap. 2).

1. Na odmaštěné podložní sklíčko se rozetře tkáň z vypitvaného hostitele. Tkáň se roztáhnou preparační jehlou, popř. skalpelem do co nejtenčí vrstvy tak, aby byly co nejpresněji zachovány jaderné a cytoplazmatické detaily.

2. Rozetřená tkáň na sklíčku se nechá zaschnout.
3. Po zaschnutí se tkáň fixuje, fixační činidlo závisí na typu barvy, která bude použita pro barvení preparátů. Nejčastěji pro běžné použití se roztěry tkání fixují metanolem.
4. Poté se preparát barví roztokem Giemsa – Romanowský.
5. Jádra jsou obarvená červeně, cytoplazma je zbarvená modře, od tmavě do světle modré, podle intenzity a doby barvení. Okluzní tělíska jsou bezbarvá, ale s dobře odlišitelnými okraji (obr. 38).

Důležitou metodou pro identifikaci a detekci virů je elektronová mikroskopie, zejména transmisní. Malé neokludující DNA a všechny RNA viry nejsou ve světelném mikroskopu viditelné, ale jsou rozlišitelné elektronovým mikroskopem. Postup přípravy vzorků je podrobně popsán v kap. 8.

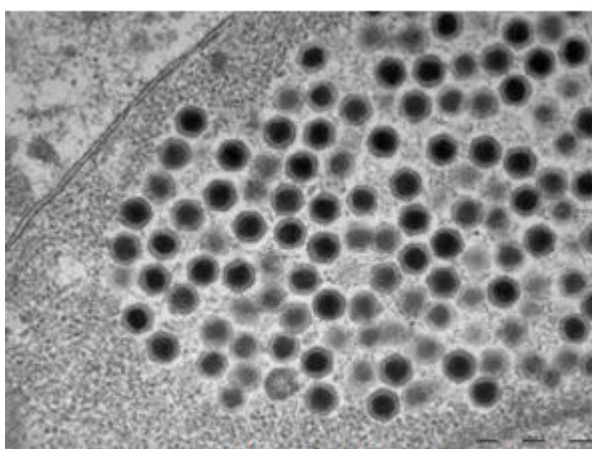
3.1. Izolace viru z nakaženého hmyzu

Pro pokusy s viry nebo na analýzu a identifikaci virů potřebujeme často jejich čistou suspenzi. Pro RNA viry není izolace a purifikace jednoduchá a často ani dost dobře proveditelná, protože se v hostitelích vyskytují v nízkých koncentracích a často nemáme způsob, jak virové částice RNA virů izolovat a purifikovat. Pak je jednou možností izolace celkové RNA z hostitele a metody sekvenování transkriptomu. Naproti tomu DNA okludované viry se dají z hostitele izolovat často v dostatečném množství s odpovídající čistotou pro další analýzy.

Obecně je izolace entomopatogenních virů založena na následujících krocích:

Homogenizace hostitele a filtrace

Homogenizace infikovaných hostitelů se provádí v Ringerově roztoku nebo PBS pufru. Pufry usnadňují dezintegraci membrán buněk a uvolnění virových částic nebo okluzních tělísek. Homogenizovaná suspenze často obsahuje části hostitele (hlavové kapsule, části střev nebo kutikuly), a proto se homogenát filtruje přes tkaninu - např. gázu, aby se odstranily větší části tkání.



Obr. 39. *Iridovirus* – virové částice v tukovém tělese cvrčka; fotografie z transmisního elektronového mikroskopu (TEM)

Centrifugace

Přefiltrovaný homogenát obsahuje například tukové kapénky a bakterie, proto následuje centrifugace. Okluzní tělíska jsou větší než bakterie a ve světelném mikroskopu se dají odlišit od tukových kapének. Proces centrifugace závisí na typu viru, čas a metoda centrifugace se podle toho liší. Na neokludované viry použijeme gradientovou centrifugaci a speciální odstředivky, ale pro potřeby okludovaných virů postačí běžné laboratorní vybavení a postupy. Před purifikací viru připravíme všechny potřebné

roztoky ze sterilní vody, sterilní nástroje a laboratorní vybavení, které budou použity během purifikace. Počet kroků promývání závisí na stupni znečištění homogenátu.

Purifikace okluzních tělísek virů

1. Infikované larvy se např. ve skleněném homogenizátoru s pufrem zhomogenizují. Malé larvy (první instary, drobný hmyz) homogenizujeme celé, větší jedince před homogenizací vypitváme a použijeme pouze část infikované tkáně
2. Suspenze se přefiltruje přes gázu
3. Homogenát se poté centrifuguje 5 min při 10 000 RPM při laboratorní teplotě
4. Supernatant se odstraní, pelet se resuspenduje v homogenizačním pufru a opakuje se krok 3.
5. Kroky 3 a 4 se mohou několikrát zopakovat, podle čistoty homogenátu, která závisí na velikosti tkáně, popř. hostitele, ze kterého virus izolujeme
6. Pelet obsahující okluzní tělíčka se nakonec resuspenduje v homogenizačním pufru nebo destilované sterilní vodě.
7. Suspenze se může uchovávat v lednici ve 4 °C nebo v mrazáku v -20 °C.

3.2. DNA izolace u okludovaných virů

Během desítek let se pro identifikaci entomopatogenních virů používaly různé molekulární a biochemické metody, např. sérologické (ELISA), (RT -) PCR, PCR – RFLP za využití restrikčních endonukleáz apod. V poslední době je ale stále více v popředí detekce virů založena na sekvenování genomu. Ať už se jedná o sekvenaci genomu pouze samotných virů (např. bakulovirů) nebo celogenomového sekvenování hostitele a následné bioinformatické analýzy získaných dat. V případě DNA virů se izoluje DNA, v případě RNA virů je sekvenování často jediná metoda, která zachytí virovou infekci v hostiteli. Postup detekce RNA virů metodou NGS byl zpracován podrobně v případě detekce mykovirů u hub, princip metody je ale stejný a postup je aplikovatelný i na identifikaci RNA virů u hmyzu (Tonka a kol., 2021). Levnější metodou identifikace RNA virů je metoda RT-PCR, která je pomocí specifických primerů identifikovat sekvence virů v hostiteli. Tato metoda je ale na rozdíl od NGS sekvenování vhodná pouze k identifikaci virů, u kterých jsou známy sekvence a jsou na ně navrženy specifické primery.

Příprava virových částic pro izolaci DNA

Prvním krokem je uvolnění virových částic z proteinové okluze a následné uvolnění virové DNA z virionu. DNA se následně izoluje podle manuálu výrobce komerčních kitů, popř. klasickou fenol – chloroformovou extrakcí.

1. Uvolnění virových částic z okluze – okluzní tělíčka se rozpustí v 500 µl sterilní destilované vody a výsledná suspenze se inkubuje s 0,05 objemem 1 M roztoku uhličitanu sodného (Na_2CO_3) 30–60 minut při 37 °C. Suspenze musí být na konci

inkubace čírá – musí se rozpustit protein. Pokud čírá není, přidá se uhličitán a prodlouží se čas inkubace tak, aby se rozpustily všechny proteinové inkluze. Kontrola rozpuštěných proteinů probíhá ve světelném mikroskopu.

2. K roztoku se přidá RNáza a vzorek se inkubuje 10 minut při 37 °C.
3. Následuje proces izolace DNA.

3.3. *In vivo* množení viru

V některých případech budeme k identifikaci a dalším infekčním pokusům potřebovat virový infekční materiál. Proto je někdy nutné si potřebné množství viru namnožit *in vivo*. Většinou se jedná o DNA viry, které se dají v laboratoři jednoduše množit a uchovávat na původním hostiteli. Není to úplně případ RNA virů, které se ve většině případů neprojevují viditelnými příznaky, ale identifikace těchto virů je založena na molekulárních nebo mikroskopických analýzách. Přenos RNA virů mezi hostiteli není často znám a chov jejich hostitelů může být náročný časově i technologicky.

Některé viry se dají kultivovat v tkáňových hmyzích kulturách, ale tento proces je složitější a ekonomicky náročnější než propagace viru *in vivo*. Navíc v případě, že se jedná o tkáňovou kulturu z nepříliš běžných druhů hmyzu, je *in vitro* kultivace obtížná, a ne vždy úspěšná. Vzhledem k tomu, že většina entomopatogenních virů je hostitelsky specifická (jeden virus infikuje jeden hostitelský druh), tak *in vivo* propagace virových částic by měla probíhat na původním hostitelském druhu, popř. na blízkce příbuzném, pokud je na něm možné virus množit. Na druhou stranu, množení viru na nepůvodním hostiteli může skončit selekcí jiného viru/kmene, než byl virus původní.

V případě chovu hmyzu pro množení entomopatogenních virů, ať už pro vědecké potřeby či pro komerční využití v ochraně rostlin, je potřeba dodržovat určitá opatření zabráňující

náhodné infekci chované populace. Čistý chov hostitele musí být oddělen od virem infikovaných hostitelů, nejlépe prostorově. Je nutné dodržovat zásady správné laboratorní praxe jako je sterilizace laboratorního vybavení a nástrojů, stejně jako chovných klecí nebo nádob. Kontrola chovu by se měla provádět denně,

stejně jako je nutné oddělovat potravu pro čistý chov a chov s infekčním virem. Případný přenos viru nebo jiného entomopatogenního agens do čistého chovu hostitele může mít za následek kolaps celé laboratorní populace hostitelského druhu (obr. 40).



Obr. 40 Průmyslová (nebo spíše manuální) produkce viru jaderné polyedrie bekyně velkohlavé *in vivo*.

Postup při propagaci viru závisí na typu viru, obecně pro drtivou většinu DNA virů (bakuloviry, entomopoxviry, iridoviry) je postup následující:

1. Čerstvě vylíhlé larvy hostitele se chovají přibližně do stádia 4. nebo 5. instaru v případě housenek, v případě např. iridoviru u cvrčka domácího se mohou virem infikovat přímo dospělci.
2. Takto stará hostitelská stádia se přenesou na oddělené místo, kde bude probíhat infekce virem. Na povrch malého kousku potravy, popř. kousek umělé půdy se nakape suspenze virů. Koncentrace virových částic závisí na vlastnostech virů a stáří hostitele. Ideální je situace, kdy je každý jedinec infikován virem zvlášť. Je potřeba se přesvědčit, že hostitel zkonsumoval celou část infikované potravy, což je většinou během 24 hodin.
3. Alternativou k infekci, popsané v bodu 2, je infekce ponořením jedince do suspenze virů. Ponořený hostitel polyká suspenzi a tím se infikuje. Nevýhodou je, že infekční virus je následně přítomný i na povrchu hostitelů.
4. Virem nakažené larvy se přenesou na viruprostou umělou půdu nebo potravu. Infikovaní jedinci mohou být chováni společně. Infekce trvá několik dní v závislosti na teplotě a vlastnostech viru do doby, kdy se objeví příznaky infekce.
5. Infikovaní jedinci jsou odebíráni a takto infikované larvy/dospělci se uchovávají vcelku při - 20 °C do doby izolace čisté virové kultury.

3.4. Testy virulence viru

Pro potřeby využití viru v rámci programů biologické ochrany je nutné znát biologické vlastnosti patogena, jako jsou patogenita a virulence. Termín patogenita popisuje potenciální schopnost patogena způsobit infekci, virulence je charakteristika, která se dá měřit. Virulence vyjadřuje stupeň patogenity, v rámci dávkových biopokusů se vyjadřuje termíny jako letální dávka (LD), letální koncentrace (LC) nebo letální čas (LT), potřebné k usmrcení určité části populace.

Protože je důležité v testech virulence znát přesnou dávku, resp. koncentraci viru, která vyvolá určitý měřitelný efekt (v případě LD je nutné znát přesně, jaká je iniciační zkonsumovaná dávka viru), existují inokulační metody, které se v těchto biopokusech používají. Jedná se o podání suspenze viru v kapce (většinou vody, často je suspenze viru ve vodě obarvená potravinářským barvivem, aby byla viditelná pod kutikulou larev) čerstvě vylíhlým larvám, popř. larvám ve stádiu L2. Poté jsou larvy přeneseny na půdu a chovány do doby úhynu nebo kuklení. Dávka viru je vyjádřena počtem virových částic na ml.

Druhým způsobem je povrchová kontaminace umělé půdy, kdy je přesný obsah suspenze viru napipetován na půdu. Larvy se na takto kontaminované půdě nechají po určitý čas, a pak jsou přeneseny na čistou půdu, kde jsou chovány. Dávka viru je pak vyjádřena počtem částic na mm².

Alternativou k tomuto způsobu inokulace je poskytnutí virové suspenze na malý kousek umělé diety (plug), který je konzumován individuálními jedinci. Po zkonsumování infikované potravy jsou hostitelé chováni na umělé půdě bez viru. Dávka viru je pak vyjádřena jako počet



Obr. 41 Entomopoxvirus lýkožrouta smrkového nanesený na granule (plug) smrkového lva.

částic na larvu. V případě, že není k dispozici semisyntetická dieta, se dá po vhodné úpravě použít i přírodní plug. Po vsáknutí inokula se granule umístí např. do mikroskopavky a do každé se dá jeden dospělec/larva testovaného druhu hmyzu (obr. 41).

Věk hostitelů pro biopokusy je u každého hostitele variabilní a velmi závislý na virulenci jednotlivých virů. Virulentnější kmeny virů není možné testovat na neonatálních jedincích. To je možné u virů, jejichž virulence není vysoká a infekce přežívajících neonatálních larev přetrvává do vyšších instarů. Průběh infekce závisí i na teplotě, typu a kvalitě potravy, fyziologickém stavu hostitelů apod. Jako kontrola se používá většinou sterilní destilovaná voda v objemu stejném, v jakém je inokulační dávka virové suspenze.

1. Ředící řadou se připraví suspenze viru o různých koncentracích okluzních tělísek (OB) - např. 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 OB/ml.
2. Pro testování každé koncentrace se použije 30–35 larev (hostitelů obecně) a stejný počet larev pro kontrolní skupinu.
3. Pro infekci a inokulaci se použije jedna z výše uvedených metod. Kontrolní skupina se inokuluje stejným způsobem, pouze sterilní destilovanou vodou bez viru.
4. První den po inokulaci se odstraní mrtví jedinci, kteří uhynuli jiným způsobem než na infekci virem – (nevhodné zacházení, špatný fyziologický stav jedince apod.).
5. Infikované larvy se chovají v 25 °C v temperovaných inkubátorech, kde se ideálně dají nastavit vlhkost a délka dne.
6. Mortalita hostitelů se odečítá po 7 a 14 dnech, včetně kontrolní skupiny.
7. Pro správné statistické vyhodnocení a určení přesné dávky (LD, LC) je nutné pokus minimálně třikrát opakovat ve stejných podmínkách a počtech.

Nejběžnější metodou vyhodnocování dávkových/koncentračních pokusů je probitová analýza. Nicméně v současné době se používají i generalizované modely, které jsou součástí všech dostupných statistických programů.

Příloha

1x PBS (Phosphate buffered saline)

- Na_2HPO_4 1,15 g
- KH_2PO_4 0,2 g
- NaCl 8,0 g
- KCl 0,2 g

V 800 ml destilované vody se rozpustí všechny soli, výsledný pufr má pH 8. Takto upravený pufr se doplní do 1000 ml destilovanou vodou.

4. Izolace a identifikace entomopatogenních bakterií

Bakterie, které jsou patogenní pro hmyz, nacházíme ve všech prostředích – vodě, půdě, na povrchu rostlin apod. Nejznámější entomopatogenní bakterie (EPB) jsou grampozitivní bakterie z třídy Bacilli (Bacillaceae, Firmicutes). K jejich izolaci, identifikaci a kultivaci se v zásadě používají běžné mikrobiologické techniky, zavedené do bakteriologie před desítkami let.

V současnosti při identifikaci bakterií hrají hlavní roli molekulárně biologické postupy. Mezi nejznámější EPB patří např. *Lysinibacillus sphaericus* (dříve *Bacillus sphaericus*) a *Bacillus thuringiensis*. Přestože byla většina těchto bakterií izolována z hmyzích hostitelů, běžně se vyskytují i v půdě, kde mohou přicházet do kontaktu s hostitelskými organizmy. Vzhledem k tomu, že živé organizmy nejsou v prostředí rozloženy rovnoměrně, je při hledání nových, případně již známých a v biologické ochraně otestovaných bakteriálních kmenů nezbytné provádět jejich izolaci nejen z půdy a kadáverů hmyzu, ale také například z povrchu rostlin a dalších potenciálních mikrohabitatů. Na druhou stranu, pokud hledáme kmen již popsaného druhu, musíme hledat v prostředí, kde se daná populace hmyzu vyskytuje. Tak např. *L. sphaericus*, který se běžně používá jako prostředek proti larvám komárů, se bude hledat ve vodním prostředí, naproti tomu *B. thuringiensis*, který se primárně používá v ochraně proti žravým škůdcům, budeme hledat u larválních stádií terestrických druhů hmyzu (obr. 42).



Obr. 42 Kadáver housenky pídálky podzimní infikovaný entomopatogenní bakterií *Bacillus thuringiensis* ssp.

Na druhou stranu patogenní kmen k jednomu druhu hmyzu může být izolován jako nepatogenní kmen u jiného druhu hmyzu. Proto neexistují jasná pravidla, jak izolovat nové kmeny/druhy bakterií, nicméně obecně se dá postupovat následovně:

Každý podezřelý vzorek nebo vzorek substrátu je třeba sbírat a uchovávat samostatně ve sterilní nádobě. Použití zipovacích sáčků není ideální, protože nejsou sterilní a může u nich dojít ke kontaminaci vzorku. Vhodné jsou například sterilní mikrozkušavky, epruvety nebo jiné uzavíratelné sterilní nádoby. Dodržení sterilních podmínek při manipulaci se vzorkem je zásadní pro zajištění izolace cílových bakterií. Zároveň je však nutné mít na paměti, že vzorky mohou být kontaminovány bakteriemi patogenními pro člověka. Při manipulaci a izolaci je proto nezbytné zachovávat pravidla bezpečnosti práce s potenciálně infekčním materiálem.

4.1. Izolace entomopatogenních bakterií pro identifikaci

1. Izolace bakterií probíhá podle toho, z jakého vzorku bakterie izolujeme.

- **Izolace bakterií z půdy** – odebraný vzorek půdy se rozdělí na několik částí, přičemž každá část je vložena do samostatné sterilní zkumavky obsahující 10 ml sterilní vody. Směs se okamžitě intenzivně promíchá pomocí vortexu za účelem uvolnění mikroorganismů z půdních částic.
- **Izolace bakterií z kadáverů hmyzu** – pokud je hmyz malý, celý jedinec se vloží do mikrozkušavky a přidá se 1 ml sterilní vody. Pokud je kadáver větší, rozdělí se

pinzetou na několik kousků o hmotnosti cca 0,3 g a dá se do 1 ml sterilní vody v mikrozkušavce.

- Tkáň se zhomogenizuje v pufru (PBS), může se přidat Tween 80 pro snazší a lepší homogenizaci vzorku.
 - **Izolace bakterií z vody** – přes membránový filtr o velikosti 22 μm se vzorek protlačí do sterilní zkumavky. Filtrát se dále zpracovává.
2. Zhomogenizovaný, popř. přefiltrovaný vzorek se zahřeje na vodní lázni, v případě mikrozkušavek v termobloku na 80 °C a pak se rychle zchladí na ledu. Tento krok zahubí bakterie netvořící spory a vegetativní, tedy nesporoformní stádia bakterii r. *Bacillus*.
 3. Poté se nechá zkumavka stát několik minut, aby pevná část homogenátu klesla ke dnu zkumavky a ze supernatantu se odebere 100 μl , který se dále naředí na koncentraci na 10^{-1} a na 10^{-2} (PBS pufr) a přenesení se na běžný mikrobiologický agar. Miska s agarem a suspenzí se nechá inkubovat 24 hodin ve 30 °C.
 4. Pokud po 24 hodinách rostou bakteriální kolonie na agaru, sterilní kličkou se odebere část kolonie do 10 ml tekutého média (LB např.) a nechá se 48 hodin při 30 °C při 250 otáčkách/min třepat.
 5. Po 48 hodinách se kontroluje čistota bakterií pod mikroskopem.
 6. Z každé zkumavky se kličkou přendá kultura z tekutého média na misky s agarem a na 24–48 hodin se dají inkubovat. Takto získaná čistá kultura je základem pro identifikaci, kultivaci a biopokusy s nově izolovaným kmenem/druhem bakterie.

4.2. Kvantifikace izolovaných entomopatogenních bakterií

Patogenita bakterií může být určována různými metodami, přičemž prvním krokem při testování jejich entomopatogenního potenciálu bývá kvantifikace testovaných kmenů. Jednou z běžně používaných metod je přímé počítání buněk či spor pomocí počítací komůrky. Na podložní sklíčko se aplikuje kapka suspenze obsahující bakterie nebo spory, která se následně vyhodnocuje pod světelným mikroskopem. Počet pozorovaných buněk (spor) se stanoví podle návodu k použití konkrétní komůrky. Na základě známého objemu komůrky a použitého ředění se vypočítá koncentrace buněk (spor) v 1 ml původní suspenze. Tato metoda však neumožňuje rozlišit mezi živými a mrtvými buňkami či sporami.

Druhou používanou metodou je počítání životaschopných buněk na agarových plotnách. Vychází se z teorie, že z jedné bakterie/spory/buňky vznikne nová kolonie.

1. Naředíme si původní vzorek bakterií ředící řadou.
2. Pro každou koncentraci v ředící řadě se připraví potřebný počet zkumavek s 0,9 ml sterilní vody. Pokud poslední v ředící řadě bude koncentrace suspenze 10^{-8} , bude potřeba 8 zkumavek.
3. Z původní suspenze (viz výše) o známé koncentraci se napipetuje objem 0,1 ml suspenze s bakteriemi do první připravené zkumavky s 0,9 ml sterilní vody. Vzorek se

promíchá a následně se odebere 0,1 ml z promíchaného ředěného vzorku, který se přenesení do další zkumavky s 0,9 ml sterilní vody.

4. Stejným způsobem se pokračuje až do poslední ředící zkumavky. Takto je připravená ředící řada s koncentrací buněk bakterií od 10^{-1} do 10^{-8} buněk/bakterií na ml.
5. Na předem připravené agarové plotny (např. LB agar) se pipetuje 0,1 ml suspenze z každé ředící zkumavky. Následně se suspenze rovnoměrně rozetře po povrchu agaru pomocí sterilní skleněné hokejky.
6. Misky se inkubují 24–48 hodin ve 30 °C.
7. Po inkubaci se spočítají počty kolonií na miskách, spolehlivé výsledky poskytují misky, na kterých vyrostlo 30–150 kolonií (CFU – colony forming unit – kolonii tvořící jednotka). Počet buněk/spor v ml původní kultury se spočítá podle vzorce:

$$CFU/ml = \frac{\text{počet kolonií}}{\text{objem vzorku v ml pipetované na misku}} \times \text{ředicí faktor}$$

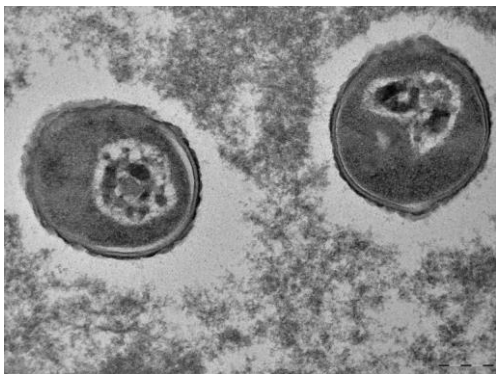
např.

$$CFU/ml = \frac{112}{0.1} \times 10^3 = 1.12 \times 10^6$$

Pro pozorování bakterií ve světelném mikroskopu se připravují barvené preparáty, které se prohlíží ve světelném mikroskopu v olejové imerzi (obr. 44). Roztěry bakterií, popř. infikovaných hostitelských tkání se dají barvit metodou Giemsa – Romanowský (viz kap. 2.1), ale nejčastějším barvením pro pozorování bakterií, jejich tvaru, popř. typu je barvení Gramovo. Následující postup je určen pro rozlišení gram – pozitivních a gram – negativních bakterií.

1. Po izolaci bakterií z hostitele/prostředí se kličkou odebere část kolonie z agaru/média na podložní sklíčko do kapky sterilní vody a krycím sklíčkem se rozetře do tenké vrstvy.
2. Roztěr se nechá zaschnout a poté se fixuje protažením sklíčka s bakteriemi nad hořícím plynovým kahanem.
3. Na takto fixované sklíčko se kápne roztok krystalické violeti a nechá se působit 1 minutu.
4. Poté se sklíčko opláchne v destilované vodě a na opláchnuté sklíčko se kápne Lugolův roztok, který se nechá působit 1 minutu. Následně se roztok ze sklíčka slije.
5. Sklíčko se opláchne etanolem, který může působit maximálně 25 sekund a následně se sklíčko opláchne vodou.
6. Na sklíčko s roztěrem bakterií se kápne roztok safraninu a nechá se cca 30 sekund působit.
7. Po opláchnutí vodou se preparát usuší a prohlíží pod mikroskopem v imerzním oleji.
8. Gram – pozitivní bakterie jsou tmavě fialové, gram – negativní bakterie jsou růžové.

V současné době probíhá identifikace bakterií pomocí analýzy DNA. Tvar, morfologie bakterií a aspekty bakteriální infekce v hostitelských tkáních se studují pomocí technik



Obr. 43 Bakterie r. *Enterococcus* izolovaná z kadáveru larev přástevníčka amerického.

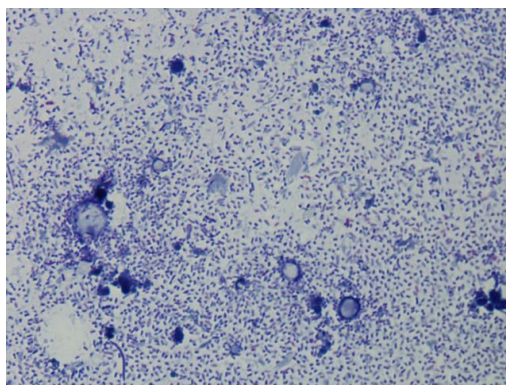
elektronové mikroskopie (obr. 43).

Pro izolaci DNA se odeberou jednotlivé kolonie z agarových ploten. Část kolonie se kličkou nebo lancetkou přenese do mikrozkušavky, zhomogenizuje v tekutém dusíku buď pomocí mlýnku a kovových kuliček nebo manuálním homogenizátorem. Takto rozdrčené bakterie se resuspendují v 100 µl sterilní destilované vody nebo příslušném pufru podle metody extrakce DNA. Pro extrakci se používají vždy čerstvě narostlé kolonie buněk nebo spor. Pokud se izoluje DNA z bakterií kultivovaných v tekutém médiu, odebere se do

mikrozkušavky 1 ml buněčné suspenze, zkušavka se 2 minuty centrifuguje při maximální rychlosti. Po odstranění supernatantu se dále pokračuje podle výše uvedeného postupu.

Pro studium bakterií a vlivu infekce na hostitele se používá transmisní elektronový mikroskop (TEM). Nakažený jedinec se vypitvá a kousek nakažené tkáně se fixuje v glutaraldehydu a dále se vzorek zpracovává rutinními postupy přípravy vzorku pro EM. Pro úspěšný a robustní infekční biopokus je potřeba předem si stanovit některé skutečnosti. Předně je potřeba si stanovit koncentraci inokula tak, aby nebyla příliš nízká, popř. příliš vysoká, protože v takovém případě by byly výsledky zkreslené. Dalším kritériem ovlivňujícím infekční pokusy s bakteriemi je stáří a vývojový stupeň larev, na kterých bude probíhat pokus. Mladé larvy jsou citlivější i na nízké koncentrace bakterií v inokulu, naopak starší larvy budou potřebovat k vyvolání infekce koncentrovanější inokulum, tj. vyšší dávku bakterií. Důležitý je i výběr kontrolní skupiny, které může být poskytnuta pouze destilovaná sterilní voda. Přesnější experimenty jsou dosahovány při pokusech, kdy je infekční dávka podávána na umělých půdách. Přírodní potrava může být zdrojem nežádoucí variability při hodnocení biopokusu.

Všechny tyto souvislosti v důsledku ovlivňují výsledek a stanovení dávek nutných pro infekci a pozdější použití v případě finalizace preparátu a jeho použití v polních/přírodních aplikacích. V testech, kde mortalita v kontrole překročí 20 % mrtvých jedinců, je nutné testy opakovat. Infekční dávku o známém objemu (a tudíž i známou koncentrací) aplikujeme na povrch potravy, popř. můžeme smíchat uměle připravenou krmnou směs se suspenzí spor bakterií. Ideální je, aby každý testovaný jedinec byl individuálně nakrmen stejně velkou dávkou se stejně velkým objemem inokula – při iniciaci infekce můžeme jedince chovat individuálně a až po pozření potravy s dávkou přendáme larvy do společné nádoby.



Obr. 44 Bakterie v tukovém tělese larvy vrtule ořechové obarvené na roztěru Giemsou – Romanowský.

Pokud testujeme infekci na listech, popř. jiných částech rostlin, abychom simulovali případné polní podmínky, nakapeme na list, popř. výřez listu o stejné velikosti kapičku (cca 100 µl) suspenze bakterií o známé koncentraci, kterou můžeme podle velikosti listu nebo

listového výřezu sterilní jehlou rozprostřít po celém povrchu tak, abychom zajistili konstantní dávku po celém povrchu listu. Jinou metodou je ponoření listu nebo jeho části do suspenze bakterií, list necháme oschnout a poskytneme jako potravu larvám. Nevýhodou je, že koncentrace bakterií se může na ploše lišit.

Inokulum pro biopokusy a testy bakteriální aktivity se připravuje stejným způsobem jako jiná entomopatogenní agens. Pro testy aktivity používáme inokulum připravené vždy z čerstvě kultivovaných bakterií, suspendovaných ve sterilní vodě, popř. v pufru (např. PBS, viz kap. 3.1). Potřebné koncentrace pro pokusné účely se připravují ředící řadou, každá testovaná koncentrace by měla být nejméně 3× replikována. Jako kontrolu používáme sterilní destilovanou vodu, popř. pufr, ve kterém jsou bakterie rozpuštěny. Biopokusy s bakteriemi končí většinou do jednoho týdne, kdy se odečítá mortalita testovaných larev. Testy provádíme při 25 °C, v inkubátorech s regulovaným světelným režimem. Pro každou replikaci je nutné zajistit stejné podmínky pokusu.

Přílohy

LB médium

- Trypton 10 g/l
- Kvasničný extrakt 5 g/l
- Chlorid sodný (NaCl) 5 g/l
- pH 7,0 ± 0,2

LB agar

- Trypton 10 g/l
- Kvasničný extrakt 5 g
- Chlorid sodný (NaCl) 5 g
- Agar - agar 15 g
- pH 7,0 ± 0,2

Roztok krystalické violeti

- 2 g $C_{25}H_{30}ClN_3$ - **gentianová (krystalová) violet** ve 20 ml 95% ethanolu

šťávelan amonný

- 0,8 g $(NH_4)_2C_2O_4$ v 80 ml destilované vody

Lugolův roztok

- 1 g jodu
- 2 g KI
- 300 ml destilované vody

Roztok safraninu

- - 10 ml 2,5 % roztoku safraninu v 95 % ethanolu a 100 ml destilované vody

5. Izolace a identifikace entomopatogenních hub

Více než 100 let jsou entomopatogenní houby (EPF) důležitou součástí biologických metod ochrany proti hmyzím škůdcům. Zástupci říše houby (Fungi) se vyskytují po celém světě v různých ekosystémech, ale v terestrických ekosystémech jsou zastoupeny nejvíce. Jsou jednou z nejčastějších příčin infekcí vyskytujících se v přírodě. Pokud napadají hmyz, jsou označovány jako entomopatogenní houby. EPF představují velmi diverzifikovanou a taxonomicky širokou skupinu, zahrnující řadu druhů napadajících hmyz a další členovce. Vzhledem k této rozmanitosti není možné v rámci jedné části metodiky popsat jednotný postup identifikace a determinace všech těchto patogenů. Houby, jakožto fylogeneticky i biologicky vysoce variabilní skupina organismů, se vyznačují složitými životními cykly, ve kterých se střídají pohlavní a nepohlavní stadia. Tato stadia mohou mít odlišnou morfologii, ekologii i spektrum napadaných hostitelů (obr. 45).

Současné taxonomické studie, založené na molekulárních metodách, vnášejí nové světlo do klasifikace této rozmanité říše. Na základě sekvenčních dat jsou pohlavní teleomorfy a nepohlavní anamorfy jednoho druhu, velmi často popsány jako dva různé druhy, dnes na základě získaných informací spojovány dohromady. Tím se sice mění lety zažitá klasifikace hub, na druhou stranu nové postupy vnášejí do taxonomie přesnější informace o fylogenetických vztazích mezi rody/skupinami v rámci říše houby. Zájemce o poslední poznatky o klasifikaci a taxonomii hub odkazujeme na literaturu, zabývající se systémy hub (Hibbet a kol., 2007; Spatafora a kol., 2017).



Obr. 45 Anamorfa *Lecanicillium lecanii* na N2 puklice švestkové.

Vzhledem k výše uvedenému se zde budeme zabývat pouze identifikací nejběžněji se vyskytujících EPF, jako jsou houby v oddělení Hypocreales. Anamorfy těchto druhů tvoří vláknitá mycelia s nepohlavně se množícími konidii vyrůstajícími na konidioforech. Hlavním typem přenosu je infekce přes kutikulu. Konidie se přichytí na povrchu kutikuly a začnou klíčit dovnitř hostitele, kde napadají rozličné tkáně ve formě hyf. Úhyn hostitele je způsoben kombinací produkce toxinu houbou, spotřebováním živin a poškozením orgánů. Po smrti hostitele hyfy klíčí z kadáverů a za vhodných podmínek tvoří konidie na povrchu uhynulého hostitele. Při nevhodných podmínkách houba neklíčí, ale kadáver zahubený houbou zůstává v mumifikované formě. Klíčení nastává až po přenosu kadáveru do vhodných podmínek, s odpovídající vlhkostí a teplotou.

EPF ze skupiny Hypocreales jsou fakultativní patogeni a někdy je složité určit, jestli námi nalezený kadáver porostlý myceliem uhynul na infekci EPF nebo je houbová infekce sekundární a rozvinula se až po smrti jedince. Většina těchto hub má široké hostitelské spektrum, jsou snadno kultivovatelné na umělých půdách a jsou proto vhodnými adepty na použití v biologické ochraně proti různým škůdcům, včetně škůdců ovoce a vinné révy.

5.1. Izolace EPF

Většina těchto hub se izoluje z mrtvých kadáverů nebo z půdy. Izolace z půdy (nebo i např. z fyloplánu, kde se často tyto houby vyskytují) je poněkud obtížnější a vyžaduje citlivější metody, zejména s ohledem na možné kontaminace námi požadovaných vzorků.

Izolace EPF z hostitelských kadáverů

Nejjednodušší metodou izolace EPF je odebrat houbu přímo z mrtvého hostitele porostlého sporulujícím myceliem. Pokud EPF nesporuluje, dáme kadáver inkubovat do vlhké komůrky při 20–25 °C, kde může nastat po několika hodinách až dnech sporulace, popř. další růst mycélia nebo konidií. V případě, že je růst houby pomalý nebo nedostatečný, nebo je izolace obtížná, je nezbytné přenést houbu na další hostitele, abychom získali více materiálu. Při izolaci EPF se povrchová sterilizace napadených hostitelů nedoporučuje.

Pro izolaci většiny EPF se běžně používá PDA médium (potato dextrose agar) s přídavkem antibiotik, např. streptomycinem nebo penicilinem v koncentraci do 0,1 %. Inokulace se provádí sterilní jehlou přenesením houbového materiálu na povrch média, které se následně inkubuje za vhodných podmínek. Ve většině případů je však nutné použití selektivních médií, jejichž hlavním cílem je potlačení bakteriální kontaminace. Do média se proto přidávají různé antibiotické látky, jako jsou tetracyklin, chloramfenikol nebo streptomycin, které inhibují růst bakterií. Je však důležité mít na paměti, že některé druhy hub mohou být na přítomnost antibiotik citlivé, což může ovlivnit jejich růst nebo morfologii.



Obr. 46 *Drosophila* spp. infikované houbou *Entomophthora muscae* (vlevo). Larvy zlatohlávka zlatého v kompostu infikovaného houbou *Metarhizium anisopliae* (vpravo).

Daleko složitější je situace s inhibicí houbových kontaminací, zejména při izolaci EPF z půdy. Houby r. *Trichoderma*, *Mucor*, *Aspergillus* rostou daleko rychleji na agaru než většina EPF. Pro tyto účely se používají agary obohacené o fungicid dodine (N - dodecylguanidin monoacetát 650 µg/ml agaru), který se používá pro izolaci např. *Beauveria bassiana* a *Metarhizium* spp. z půdy a mrtvých hmyzích hostitelů. Dodine potlačuje růst *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. a *Mucor* spp, ale podporuje růst *Beauveria* spp. a *Metarhizium* spp.

Identifikace většiny EPF vyžaduje použití mikroskopu. Na druhou stranu, celá řada houbových entomopatogenů je lehce zařaditelná do druhu/rodu na základě vnějších znaků na napadeném hostiteli (např. *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Entomophthora muscae* = obr. 46) a k identifikaci stačí použití stereomikroskopu. Pro přesnou identifikaci je ale potřeba každý izolát převést do čisté kultury, jak pro potřeby identifikace pomocí molekulárních technik, tak i pro biotesty s izolovanou EPF. Čistá kultura může být i základem biopřípravku na ochranu rostlin, který musí být přesně identifikován.

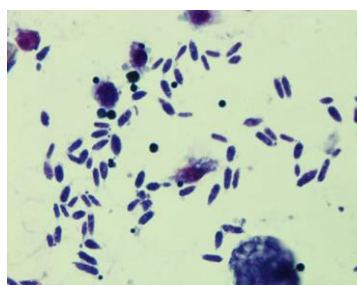
Izolace EPF z půdy

Mnoho druhů entomopatogenních hub se vyskytuje v půdě ve formě saprofytů, nebo přetrvává jako infekční spory uvolněné z kadáverů infikovaných hostitelů. Tyto spory představují zásobárnu infekčního materiálu (tzv. infekční pool) pro nové hostitele (obr. 47). Odběr půdních vzorků nevyžaduje specializované vybavení – vzorky se odebírají z hloubky do 10 cm svrchní organické vrstvy. Samozřejmě je sterilizace odběrového náčiní mezi jednotlivými vzorky, aby se zabránilo křížové kontaminaci. Stejně tak musí být sterilní i nádoby, zkumavky nebo vzorkovnice používané k transportu a uchování vzorků. Přestože spory entomopatogenních hub často přetrvávají v půdě dlouhodobě a zůstávají infekčně aktivní, je doporučeno uchovávat odebrané vzorky při teplotě 4 °C a zpracovat je co nejdříve po odběru.



Obr. 47 Imago listokaza zahradního infikované houbou *Beauveria brongniartii*.

Velmi rychlou a efektivní technikou je přímá izolace hub z půdy na selektivním médiu. Smícháme 10 g půdy s 90 ml destilované sterilní vody, často obohacené o Tween 80 nebo jiný detergent, následně vzorek zhomogenizujeme a dáme inkubovat na 20–60 minut na třepačku. Poté z homogenátu odebereme 100–200 µl suspenze a rozprostřeme je na příslušný agar (resp. médium) a dáme inkubovat do 25 °C na 3–7 dnů do termostatu. Narostlé kolonie individuálně dále přeneseme na novou půdu. Pokud je koncentrace hub na agaru příliš velká, odebereme menší množství, než je 100 µl z homogenátu. Když je naopak koncentrace hub ve vzorku nižší, což je velmi častý případ, na agar na misce dáme více než 200 µl homogenátu.



Obr. 48 Spory symbiotických hub ze střeva voskovky zavlečené barvené metodou Giemsa – Romanowský.

Pro nepřímou izolaci entomopatogenních hub z půdy se používají tzv. hmyzí pasti. Většina entomopatogenních Hypocreales jsou saprofyti, ale pokud mohou infikovat živého hmyzího hostitele, napadají jeho. Pro izolaci hub z půdy se používají housenky zavíječe voskového *Galleria mellonella*, ale také larvy potměníka moučného, *Tenebrio molitor*. Do větší nádoby dáme vzorky půdy, navlhčíme jí na povrchu a larvy přidáme k substrátu. Necháme 14 dní inkubovat nejčastěji při laboratorní teplotě. Pokud se během 14 dnů vyskytnou v nádobě

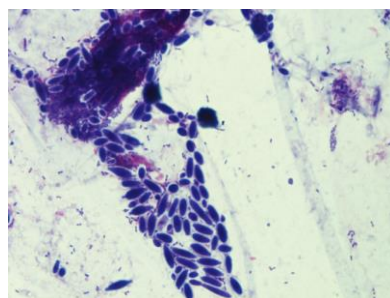
s půdou houbami napadené kadávery, odebíráme jednotlivé larvy a kontrolujeme přítomnost či nepřítomnost entomopatogenní houby. Podle velikosti nádoby s půdou dáváme k půdním

vzorkům 5 až 15 larev. K eliminaci infekce entomopatogenními nematody se doporučuje půdu před zvlhčením nechat vyschnout.

5.2. Purifikace čisté kultury EPF

Po izolaci entomopatogenních hub jednou z výše uvedených metod je potřeba zjistit, zda-li se podařilo vyizolovat čistou kulturu stejného genotypu. Kolonie na agaru nemusí pocházet z jedné propagule, takže je nutné zjistit, jestli se jedná o jeden genotyp, nebo je vyizolovaná kolonie směsí různých genotypů, resp. druhů.

1. Z kolonie narostlé na agaru se kličkou odebere část mycélia do sterilní destilované vody. Koncentrace suspenze musí být velmi nízká, aby bylo zaručeno, že každá kolonie na agaru vyroste z jedné propagule. Koncentrace suspenze konidií se zkontroluje v mikroskopu.
2. V případech, kdy se genotypizace izolovaných kolonií EPF provádí na základě růstu hyf, jedná se o metodicky jednodušší přístup než izolace čisté kultury z jediné propagule. Mycelium nebo suspenze konidií se inokuluje do středu Petriho misky obsahující agar. Pro podporu směrového růstu hyf, který usnadňuje následnou izolaci čistých kultur, je vhodné použít médium s nízkým obsahem živin. Nedostatek živin stimuluje růst hyf směrem od inokula do periferie. Růst hyf se monitoruje pod mikroskopem a sterilním nástrojem se odebírá okrajová část kolonie s aktivně rostoucími hyfami, která slouží jako inokulum pro další subkultivaci.



Obr. 49 Spory houby *Metschnikowia* sp. ze střeva vrtule třesňové.

5.3. Identifikace EPF pomocí molekulárních metod

V současné době je identifikace EPF založena na molekulární analýze izolované DNA z kolonií narostlých na umělých půdách. Pro identifikaci druhů/kmenů/populací hub byla navržena celá řada primerů a sekvenování houbové DNA je dnes zcela běžnou součástí každé identifikace nového druhu či kmene již dříve popsanych EPF. Součástí identifikace EPF je i izolace a kultivace čistých kultur, které nejsou mixem různých genotypů jedné houby (viz předchozí text).

Problémem při izolaci nukleových kyselin z hub je buněčná stěna, která odolává celé řadě chemických činidel. Proto při extrakci DNA z hub je důležitá správná a co možná úplná destrukce a homogenizace buněčné stěny. V těchto případech se používá k homogenizaci tkáně např. tekutý dusík nebo písek, který se přidává k lyzačním roztokům v mikrozkmavkách, kde napomáhá k mechanickému rozrušení buněčné stěny pomocí plastových tyčinek.

6. Identifikace parazitických protist

Paraziti hmyzu, dříve označovaní jako Protista, jsou řazeny v současném systému klasifikace organismů do několika odlišných skupin. Interakce mezi tzv. protisty a hmyzem zahrnují celou řadu vztahů od komenzalismu, přes mutualismus až po vztahy striktně parazitické, kdy jsou zástupci protist pro své hostitele patogenní. Do této skupiny mikroorganismů patří i paraziti člověka, přenášení komáry nebo jinými zástupci dvoukřídlých, nicméně ti nejsou pro hmyz patogenní, a tudíž nejsou pro tuto metodiku relevantní.

Různé skupiny protist se vyskytují v různých formách uvnitř svých hostitelů v larválním stádiu a ve stádiu dospělců. Obecně je nejčastějším prvky napadeným orgánem u hmyzu některá (popř. celá) část trávicí soustavy, včetně Malpighických žláz, jako je tomu u améb a bičíkovců. Zástupci Apicomplexa se vyskytují většinou ve střevech hostitelů, Malpighických trubicích nebo tukovém tělese ve formách intracelulárních a epicelulárních. Mikrosporidie se vyskytují pouze uvnitř buněk (intracelulárně) a jsou nejenom hostitelsky, ale i tkáňově specifické, tzn. že se mohou vyskytovat v jakémkoliv tkáni, nejenom v trávicí soustavě, tukovém tělese, ale i pohlavních orgánech apod. Mikrosporidie jsou také nejprozkoumanější a nejvíce studovanou skupinou "protist" u hmyzu, a proto většina metodických postupů je odvozena od studia mikrosporidií u hmyzích hostitelů.

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární paraziti celé řady hostitelů, od hmyzu přes další členovce až po obratlovce, včetně člověka. Jsou uzpůsobeny svým životním cyklem hostitelským buňkám, na kterých jsou závislé metabolicky. Dříve se mikrosporidie řadily do samostatného kmene v rámci prvoků, dnes jsou řazeny mezi houby, popř. do blízkosti hub, se kterými mají společného předka (Wijayawardene, 2021).

Charakteristickým znakem mikrosporidií je tvorba infekčních spor, vybavených unikátním vystřelovacím aparátem, dopravujícím zárodek patogena do nové buňky. Jsou nejběžnějším a nejčastějším patogenem hmyzu, s desítkami popsanych druhů za cca 170 let výzkumu hmyzích parazitů. Obecně způsobují smrt svých hmyzích hostitelů, redukují délku vývojových stádií a/nebo plodnost. Často se vyskytují v chovech hmyzu. U některých hostitelů s průhlednou kutikulou mohou být infekce mikrosporidiemi pozorovány na změně barev tkáně, kdy infikované tkáně jsou světlejší nebo bílé, na rozdíl od neinfikovaných jedinců. Při pitvě podezřelých jedinců se po roztržení kutikuly objeví zvětšená infikovaná tkáň, často mléčně zabarvená v důsledku masy spor mikrosporidií vycházejících z rozpadajících se buněk.

Tvar spor je různý, většinou oválný, vejčitý, hruštičkovitý, často dvou různých velikostí, kdy tzv. environmentální spory, většinou větší slouží k přenosu mezi hostiteli, zatímco menší spory, často tenkostěnné, jsou určeny pro přenos uvnitř hostitele. Spory jsou uvolňovány do prostředí výkaly, popř. regurgitací potravy v případě infekce trávicí soustavy, v případě infekce tukového tělesa jsou spory uvolňovány po rozpadu kadáveru hostitele. Některé mikrosporidie jsou přenášeny transovariálně ve vajíčkách na další generaci.

Environmentální spory jsou většinou tlustostěnné, jejich funkcí je přenos na nového hostitele, tlustá stěna zabraňuje vysychání a dlouhodobějšímu přechovávání ve vnějším prostředí, aniž by došlo ke ztrátě infekčního potenciálu spory. Spory jsou velmi odolné k vnějším podmínkám, vydrží částečné vyschnutí tkáně hostitele. Při uchovávání při -20 °C sice životaschopnost spor klesá rychleji, nicméně schopnost infekce si zachovávají po dobu

několika měsíců a mohou být tímto způsobem udržovány delší dobu.

Pitva napadených hostitelů probíhá stejně jako v případě identifikace jiných entomopatogenů. Na podložním sklíčku rozetřeme na sucho část tkáně. Po zaschnutí fixujeme tkáň metanolem a barvíme nejčastěji roztokem Giemsa – Romanowský. Identifikace mikrosporidií je dnes založena na molekulární analýze, která doplňuje morfologické charakteristiky získané většinou pozorováním vývojových stádií a morfologie spor v transmisním elektronovém mikroskopu. Molekulární data jsou založena na amplifikaci rRNA genu, který je používán pro fylogenetické analýzy a vztahy mezi druhy, nicméně v současné době se k druhové identifikaci a analýze fylogenetických vztahů používají metody amplifikace více genů, které přesněji charakterizují vztahy mezi organizmy.

6.1. Obecná identifikace protist (včetně mikrosporidií)

Stejně jako u jiných entomopatogenů je základním a prvním krokem k identifikaci prvků a mikrosporidií pitva hmyzího hostitele a inspekce tkání ve světelném mikroskopu. A stejně jako i u jiných entomopatogenů je pro vyšetření výhodnější pitva živých, popř. krátce uhynulých nakažených jedinců. Jednak máme v těchto případech možnost identifikovat napadenou tkáň, což v případě postupující infekce a následné bakteriální septicémie nelze přesně určit, a jednak se můžeme pokusit o izolaci infekčního inokula pro následné laboratorní testy vztahu hostitel – patogen. U protist a mikrosporidií, napadajících hmyz, se dají trvalá stadia ve formě spor (mikrosporidie) nebo cyst (ameby, gregaríny, kokcidie) pozorovat a získat i z kadáverů, nicméně vývojová stadia jednotlivých parazitů nejsou v tomto případě zachována a identifikace takového materiálu je značně ztížena. Dalším krokem je studium struktur jednotlivých stádií a vývojového cyklu v transmisním elektronovém mikroskopu a molekulární analýza získaného materiálu.

Spory mikrosporidií např. pro infekční pokusy se dají poměrně dobře izolovat z nakažených hostitelů. Stejně jako v případě jiných entomopatogenů je celá tělní dutina hostitele vyplněna masou spor, které se dají lehce izolovat. Homogenizací infikovaného hmyzího hostitele a následnou několikanásobnou centrifugací získáme poměrně čistou kulturu infekčních spor. Jednou z alternativ je i centrifugace v gradientu (např. Ludox nebo sacharózový gradient), nicméně k této metodě je potřeba speciální centrifuga, která není ve všech laboratořích běžně dostupná. Takto vyčištěnou kulturu spor používáme k infekčním pokusům, kdy spory podáváme hostiteli per os s potravou, případně injikujeme sporovou suspenzi přímo do tělní dutiny hostitele. Spory se dají uchovávat v lednici při 4 °C, popř. v mrazáku při - 20 °C. K suspenzi spor můžeme přidat kryoprotektanty, např. 50% glycerol, nicméně zmrazování a rozmrazování snižuje životaschopnost spor, takže je praktické spory skladovat v malých alikvótách. Některé spory můžeme uchovávat ve zmražených kadáverech hostitelů. Takto uchovávané spory se používají k infekčním pokusům.

Vzhledem k hostitelské specifitě mikrosporidií je nutné pro každou mikrosporidii mít svého hostitele. Některé mikrosporidie lze chovat na náhradních hostitelích (např. *Vairimorpha plodiae/ephestie* z *Plodia interpunctella/Ephestia kuehniella*) jako je *G. mellonella*, ale ve většině případů to není možné. Proto je ekologické hledisko hostitelského organismu v případě studia mikrosporidií důležité pro pochopení a studium vztahů hostitel - patogen.

7. Izolace a identifikace entomopatogenních hlístic (Nematoda)

Na základě charakteristik, které odlišují entomopatogenní hlístice od ostatních zástupců kmene i řádu háďátek (Rhabditida), zavedli ve své monografii Mráček a Weiser (1988) pro tyto entomopatogeny český název hlístovky, aby je odlišili od druhů fytopatogenních a volně žijících. Nicméně v dalším textu se budeme držet termínu nematodi a entomopatogenní nematodi (EPN).

Systematicky EPN zahrnují dvě vyhraněné čeledi, Steinernematidae a Heterorhabditidae (obr. 48). Jsou to obligátní parazité členovců, převážně hmyzu, žijící v půdě i uvnitř nepůdních hostitelů. Kromě diakritických morfologických, anatomických i biochemických znaků je spojuje, ale také rozlišuje, vývojový cyklus, taxonomická příslušnost symbiotických bakterií a hostitelské spektrum.

Obecně vývojový cyklus probíhá od vajíček, kladených uvnitř hostitele hermafroditickými nebo partenogenetickými samicemi čel.

Heterorhabditidae, nebo samečky oplodněnými samičkami čel. *Steinernematidae*, přes čtyři juvenilní larvální stádia (J1-J4). Jedině tzv. invazní larvy (J3=IJ) jsou schopny napadnout a proniknout do nového hostitele i přežívat mimo něj. V případě slabšího napadení hostitele může celý vývojový cyklus proběhnout uvnitř něho, aniž by ho opouštěly invazní larvy, a to i vícekrát podle velikosti hostitele (obvykle 2-3×). V těchto případech probíhá vývoj podle



Obr. 48 Samice, samec a invazní larva *Heterorhabditis bacteriophora*.

některých autorů bez J2 a J3. První generace dospělých nematodů je abnormálně velká, a proto se jí říká „obří generace“, zatímco následující jsou znatelně menší a označují se za „normální generace“. Jakmile jsou zásoby živin z kadáverů vyčerpány, invazní larvy J3 hostitele opouštějí a vyhledávají nového, zatímco dospělci a larvy, které nestačily dokončit vývoj do stádia J3 hynou. Invazní larvy jsou schopny ve vlhké půdě přežívat až 6 měsíců v pásmech mírného klimatu a kolem 3 měsíců v subtropích a tropech.

EPN, stejně jako jiní nematodi, mají podélnou svalovinu, a proto se pohybují vlněním těla jako hadi a k pohybu potřebují tekutinu, ať už hemolymfu hostitele, nebo ve vnějším prostředí vodu, byť jen v podobě mikrofilmu na půdních částicích. Zástupci čel. *Steinernematidae* pronikají do hostitele přirozenými otvory (ústní ústrojí, spirakula, řitní otvor, poranění), larvy čel. *Heterorhabditidae* penetrují hostitele (zavrtávají se) přes tenký integument, nejčastěji přes intersegmentální membrány. Po vniknutí do hostitele invazní larvy J3 kontaminují jeho břišní dutinu symbiotickou (pro nematody, pro hmyz patogenní) bakterií tak, že ji regurgitují ze svého střeva jícnem, pokračují ve vývoji do J4 a dospělých jedinců, kteří se dále množí. Hostitel obvykle za 24–48 hod po napadení invazními larvami na hyne septikemií. Vývojový cyklus trvá pouhé 3-4 dny, nově vyvinuté invazní larvy opouštějí kadávery hostitele za 7–10 dní po napadení.

Žádné vývojové stádium EPN zpravidla není samo o sobě pro hostitele virulentní a vlastní invaze larev ho nezabíjí, přestože vyměšují různé substance, které k tomu postupně přispívají a mortalitou hostitelů se projeví jen při velmi silné infekci z axenických kultur (bez bakterií).

Vlastními virulentními patogeny jsou entomopatogenní bakterie z čeledi Enterobacteriaceae, pro které je výživa tkáněmi a tělními tekutinami hmyzu esenciální, ale samy nedokáží do hemocoelu hostitelů proniknout a ani po pozření hostitelem infekci nevyvolávají. To dokáží jedině prostřednictvím invazních larev EPN, které jsou pro ně tedy vektorem a „dočasným bydlíštěm“. Tuto vazbu můžeme nazývat intrasomální forézí. Po proniknutí do hemolymfy hmyzu se larvy nematodů množí, způsobují septikemii umocněnou tím, že otvírají cestu k množení dalších mikrobů, ale zároveň se larvy konkurenci bakterií brání uvolňováním metabolitů s antibiotickými, fungicidními a nematocidními účinky. Svými exotoxiny potlačují imunitu a zabíjejí hostitele, jehož rozklad zpřístupňuje bakteriím živiny a nematodům usnadňuje pohyb v těle hostitele. Nakonec, po namnožení, se bakterie stávají potravou larev nematodů, které se k nim v této fázi symbiomy chovají jako mikrofágní. Živí se jimi všechna pohyblivá stádia, vyjma J2, které sice bakterie „hltají“, ale netráví před svlékáním do stádia J3, které potravu vůbec nepřijímají. Jsou „kontejnerem“, v kterém jsou bakterie přepravovány do konečného hostitele.

Každý druh nematodů žije v symbióze s jediným druhem bakterie, ale jeden druh bakterie může být symbiontem pro více druhů EPN stejné čeledi, např. rod *Xenorhabdus* je specifický pro r. *Steinernema* podobně rod bakterie *Photorhabdus* je specifický pro nematody r. *Heterorhabditis*. V současnosti je reprezentován jediným symbiotickým druhem *Photorhabdus luminescens*, který kromě jiného, způsobuje také modrou bioluminiscenci kadáverů hostitele.

Ve své podstatě patří EPN k málo specifickým patogenům/parazitům, ale některé druhy vykazují vyšší infekčnost i patogenitu pro konkrétní taxony hostitelů. V přírodních podmínkách dochází k infekci pouze u druhů, které alespoň krátkou dobu ve stádiu larvy nebo imaga přicházejí do kontaktu s půdou, která je habitatem nematodů obecně, ale několik druhů pravidelně napadá i podkorní hmyz nebo stádia hmyzu, která se zdržují pod borkou. Nejčastější jsou infekce zástupců řádu motýlů (Lepidoptera) a brouků (Coleoptera), méně jsou zastoupeny řády dvoukřídlých (Diptera), blanokřídlých (Hymenoptera), třásnokřídlých (Thysanoptera), švábů (Blattodea), rovnokřídlých (Orthoptera), blech (Siphonaptera) a podřádu ploštic (Heteroptera).

7.1. Ovocnářsky významní zástupci hlístic

Čeď Steinernematidae je zastoupená cca 54 druhy rodu *Steinernema*. Zástupci jsou gonochorní (jednopohlavní, tj. mají oddělené samčí a samičí jedince). Invazní larvy infikují hostitele symbiotickými bakteriemi a pokračují ve vývoji do posledního larválního stádia J4. Tyto larvy dospívají v samce a samice obří generace. Po spáření samice kladou vajíčka, ze kterých se líhnou J1, pokračující ve vývoji přes J2-J4 v dospělce normální generace.

K nejvýznamnějším druhům čeledi patří *Steinernema carpocapsae*. Patří k menším druhům. Odolává dobře i podmínkám mimopůdních habitatů. Invazní larvy na pohyblivé hostitele číhají a útočí na ně ze zálohy („ambusher“ typ). V Evropě je původní, stejně jako ve zbytku světa, až na Orientální a Etiopskou oblast. Hostiteli jsou housenky motýlů, např. obaleče jablečného, nesytka jablečné nebo n. rybízové. *Steinernema feltiae* patří k chladnomilnějším druhům s teplotním rozpětím množení v intervalu 12–25 °C a optimem



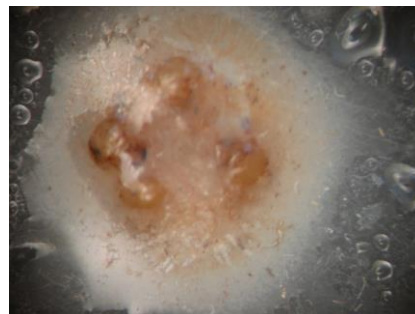
Obr. 49 Vodní past s larvami tmavky švestkové

kolem 18 °C. II jsou aktivní i při teplotách pod 10 °C. Invazní larvy hostitele aktivně vyhledávají („cruiser“ typ) i přepadají ze zálohy („ambusher“ typ). Tento druh je „specialistou“ na dvoukřídlé, hlavně z čeledi smutnicovitých (Sciaridae) a tiplicovitých (Tipulidae), ale řada popsaných biotypů stejně tak dobře napadá housenky motýlů nebo larvy brouků, i housenice pilatky jablečné a v půdě žijící stádia třásněnek.

Steinernema weiseri byla popsána z ČR, ale výskyt byl potvrzen i na Slovensku, v Německu, Velké Británii a Turecku. Patří mezi chladnomilnější druhy s optimem mezi 20–25 °C. Infikuje osenice (*Agrotis* spp.), obaleče ořechového (*Cydia splendana*), první dva instary drvopleně obecného (*Cossus cossus*), housenice pilatky žluté (*Hoplocampa flava*) a podle nálezů pod jabloněmi ve stromořadích patrně také píďalky (Geometridae).

Čeď Heterorhabditidae je monogenerická, s jediným rodem *Heterorhabditis* a 11 uznanými druhy. Vývoj je od předchozích výrazně odlišný především v tom, že druhy jsou heterogonické, střídající hermafroditní a gonochorní generace ve svém vývoji. Invazní larvy po vniknutí do hostitele a jejich infekci symbiotickou bakterií pokračují ve vývoji do J4 a dospělce, který má samčí i samičí rozmnožovací orgány zároveň (homogamní hermafroditi) a je schopen samooplození (autogamie). Vykladením oplodněných vajíček přechází vývoj do gonochorní generace s J1 – J4 a dospělými, oddělenými samci a samicemi. Z vajíček pokračuje vývoj na úroveň J3, která podle vyživovacích podmínek dokončí vývoj až po gonochorní dospělce, nebo opustí kadáver jako invazní larva. V Evropě jsou původní tři druhy. Aktivně vyhledávají hostitele.

Heterorhabditis megidis je velký holarktický druh, osidlující mírné a chladnější oblasti areálu. Aktivní je již od 10 °C. Infikuje především půdní larvy nosatcovitých a listorohých brouků. *Heterorhabditis downesi* je chladnomilnější evropský druh známý spíše z larev nosatců škodících v jehličnatých lesích, ale infikuje i lalokonosce s menší účinností než předchozí. *Heterorhabditis bacteriophora* je kosmopolitně rozšířený, teplomilný druh, který na Balkáně vystupuje až do výšek nad 1100 m n. m. Jeho účinnost se snižuje při poklesu teploty půdy pod 20 °C. Preferuje písčité půdy. Snáší i vápnité půdy a nižší vlhkost, nicméně infekční larvy přesto přežívají jen krátce po aplikaci. Jejich poměrně široká ekologická valence se uplatňuje přes hostitele. Je dost polyfágní a účinný na larvy řady druhů brouků, motýlů, dvoukřídlých a blanokřídlých.



Obr. 50 Vylézání invazních larev hlístovek z kadáveru larvy zobonosky ovocné

7.2. Izolace EPN z půdních vzorků

EPN se izolují zejména z půdy. Půdní vzorky o známé hmotnosti a objemu se odebírají stejným způsobem, jako v případě jiných entomopatogenů vyskytujících se v půdě. Půda pro izolaci EPN se odebírá do hloubky 15 cm, vzorek půdy by měl mít minimálně 1 kg. Půdu odebíráme na větší ploše (např. 4 m²), kde náhodně odebereme 3 vzorky, které se v plastickém zipovacím sáčku smíchají do výsledné hmotnosti vzorku. Vzorky v sáčku se uchovávají v chladu při transportu do laboratoře.

Metody izolace EPN jsou založeny na metodách izolace fytopatogenních hádátek a využívají pozitivní tropismus nematodů k vodě, resp. vlhkosti. Zde je popsána metoda izolace dle Baermanna (1917), která používá skleněnou nálevku:

- na skleněnou nálevku ve stojánku se nasadí gumová hadička, která se stáhne kovovou sponkou
- do nálevky se vloží filtrační papír, popř. jemné sítko a vzorek půdy
- na takto připravený materiál se lije voda do doby, než dosáhne k půdnímu vzorku
- nematodi migrují z půdy směrem do vody a snadno se odebírají povolením kovové svorky na hadičce do předem připravené nádoby – kádinky, misky apod.

Izolovaní jedinci (zejména larvy) nematodů se uchovávají v destilované vodě při 4 °C, kde vydrží několik týdnů v živém stavu a s neomezenou schopností nové infekce. Destilovaná voda se dá nahradit Ringrovým roztokem nebo M9 puforem. Pro dlouhodobější uchovávání se doporučuje nechat larvy skladovat v molitanových kuličkách či částech molitanu v dobře uzavíratelných nádobách. Molitan udržuje dlouhodobě vlhkost, nehrozí, že se larvy utopí ve vodě. Takto připravené vzorky s nematody se uchovávají dlouhodobě ve 4 °C. V pravidelných intervalech (jednou za dva měsíce) se larvami infikují živí hostitelé, aby byla zachována a otestována životaschopnost izolovaných kmenů/druhů EPN. Takto uchovávání nematodi jsou schopni infekce celé roky.

7.3. Izolace EPN z hostitelských organizmů

K izolaci hlístovek se používají tzv. vodní pasti. Do větší Petriho misky se vloží miska menší dnem vzhůru. Překryje se filtračním papírem a do spodní misky se nalije voda, která se vsákne do papíru a vytvoří na něm jemný film. Na papír se položí kadávery hmyzu, podezřelého z infekce hlístovkami. Miska se zakryje víčkem a exponuje při teplotě 18-25 °C. Během 7-10 dní infikované hostitele opouštějí J3 hlístovek, tvořící kolem rozpadlého kadáveru bělavý zákal miliónů invazních larev. Při zvětšení je v „zákalu“ vidět intenzivní hadovitý pohyb. Larvy se stříčkou z papíru opláchnou a pipetou přenesou do zkumavky, naplněné ústřížky polyuretanu (molitan). V podchlazeném stavu je lze uchovávat i několik let beze ztráty infekčnosti pro hostitele.

Ve skutečnosti je však obtížné nacházet v přírodě zachovalé infikované hostitele k typické izolaci hlístovek vodní pastí. Proto se často používá metoda tzv. „Galleriových pastí“. Ta spočívá v tom, že se housenky zavíječe voskového (*Galleria melonella*) vystaví půdním

vzorkům v Petriho miskách, při které dojde k infekci ve vzorku se vyskytujícími hlístovkami. Jakmile hostitelské housenky uhynou, vychytávají se hlístice metodou vodní pastí. Výsledkem je obvykle směs druhů, ze které můžeme odhadnout druhovou diverzitu v ekosystému, dominanci, popsat nové druhy atd. Ale ta hlavní informace, z čeho se nematody dostaly do půdy a proti čemu se dají použít, uniká.

Stejně jako i u jiných entomopatogenů i u EPN se v poslední době v určování druhů a taxonomickém zařazení kmenů a pro výzkum fylogenetických vztahů používají molekulární metody. Izolace DNA probíhá z larev izolovaných z hmyzích hostitelů.

Izolace EPN z hmyzích hostitelů

1. Z vodní pasti se odeberou larvy do centrifugační zkumavky. Centrifugujeme 1 minutu při 3000 otáčkách při laboratorní teplotě.
2. Odebere se supernatant, pelet larev se naředí sterilní destilovanou vodou a opět se centrifuguje 1 minutu při 3000 otáčkách při laboratorní teplotě.
3. Krok 2 se opakuje ještě 2×. Výsledný pelet larev, který je zbaven destilované vody, se použije na izolaci DNA nebo RNA.

Přílohy

M9 pufr

- 15 g KH_2PO_4
- 30 g Na_2HPO_4
- 25 g NaCl
- 5 ml 1 M MgSO_4
- do 1 l destilované vody

Ringerův roztok

- 9 g NaCl
- 0,4 g KCl
- 0,4 g CaCl_2
- 0,2 g NaH_2CO_3
- do 1 l destilované vody

8. Techniky vyšetření společné pro skupiny entomopatogenů

Pokud se liší primární postupy při sběru, izolaci a identifikaci jednotlivých skupin entomopatogenů (virů, bakterií, hub a protist), techniky identifikace molekulárními metodami a příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii jsou pro všechny skupiny uvedených patogenů stejné. Proto jsou tyto metody uvedené zvlášť v jedné kapitole, a nejsou probírány v jednotlivých kapitolách s popisujícími izolaci a identifikaci jednotlivých patogenních skupin.

8.1. Izolace DNA

Metod izolace DNA je dnes celá řada, ať už se jedná o izolaci DNA na kolonkách (kity od různých výrobců) nebo izolace klasické pomocí různých chemikálií - např. CTAB nebo fenol/chloroform. Pro potřeby sekvenování celého genomu (WGS) se izoluje DNA přímo z čisté kultury patogena, pokud je to možné, na druhou stranu izolace celkové DNA z komplexu hostitel/patogen je také možná a v některých případech i jednodušší. Genom se pak může sekvenovat metodami metagenomickými a získané sekvence se vyhodnocují bioinformatickými metodami (Tonka a kol., 2021). Nejběžnější a nejpoužívanější metodou je ale PCR identifikace patogenů pomocí univerzálních primerů.

Izolace DNA pomocí kitu

Kolonková metoda izolace DNA pomocí kitu je jednoduchou a rychlou metodou získání čisté a kvalitní DNA, s minimem kontaminací, na druhou stranu většinou i v nižší koncentraci. Metoda izolace přes kolonky je v zásadě ve všech dostupných komerčních kitech podobná a podrobný popis izolace v jednotlivých krocích je součástí kitů.

Izolace DNA metodou CTAB

Tato metoda slouží k extrakci většího množství poměrně čisté DNA. Chemicky je metoda založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) vytvářet komplex s nukleovými kyselinami a působit jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z membrán a proteinů.

1. Pro homogenizaci analyzovaného vzorku lze použít tekutý dusík. Pokud se dusík nepoužívá, vzorek o hmotnosti zhruba 100 mg vložíme do sterilní 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky. Pro lepší drcení tkáně (zvláště např. pro mikrosporidie, sporulující bakterie nebo EPF) přidáme sterilní křemičitý písek.
 - Alternativou k manuální homogenizaci pomocí plastových tyčinek může být homogenizační mlýnek, do kterého se vloží mikrozkuavka s kovovými kuličkami se vzorkem tkáně. Po automatické homogenizaci se přidá extrakční pufr a postupuje se dále podle návodu.
2. Ke vzorku se přidá 500 µl přehřátého pufru 2× CTAB s 1% 2-merkaptotanolem (který se před samotnou izolací přehřeje na 65 °C), pletivo/tkáň se rozdrtí pomocí

plastové tyčinky a promíchá s pufrem ve kterém homogenizujeme tkáň. Směs se nechá inkubovat při 65 °C přibližně 45 minut. Během inkubace se vzorek každých 15 min lehce promíchá (např. na vortexu).

3. Přidá se 500 µl směsi chloroform - IAA (IAA - izoamylalkohol) a vzorek se 1 minutu protřepává na vortexu nejvyšší rychlostí. Poté se vzorek centrifuguje 5 minut maximální rychlostí při laboratorní teplotě.
4. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek se odpipetuje vodná fáze (- supernatant). Přidá se 500 µl směsi chloroform: IAA, vzorek se opět 1 min protřepává a následně centrifuguje 5 minut maximální rychlostí při laboratorní teplotě.
5. Do nových mikrocentrifugačních zkumavek se přepipetuje supernatant, ke kterému se přidá 2/3 objemu isopropanolu. 2 – 3x se zkumavka lehce promíchá a dá na 30 min - inkubovat při 20 °C. Výtěžnost DNA se zvýší prodloužením inkubace směsi v -20 °C – na 24-48 hod. Vzorek se po inkubaci centrifuguje 5 min ve 4 °C maximální rychlostí. DNA se zachytí na dně mikrocentrifugační zkumavky, supernatant se odstraní.
6. K peletu se přidá 300 µl 1x TE pufru a vzorek se 30–60 min inkubuje při 37 °C.
7. K rozpuštěné DNA se přidá 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 600 µl ledového 96% ethanolu. Směs se 2–3x lehce promíchá a vloží se do - 20 °C) minimálně na 20 min, optimálně opět přes noc (větší výtěžnost DNA).
8. Poté se vzorky 10 minut centrifugují maximální rychlostí při 4 °C. DNA vytvoří pelet na dně mikrocentrifugační zkumavky a pipetou se opatrně odstraní supernatant (aby nedošlo k odstranění i peletu DNA).
9. K peletu se přidá 1000 µl ledového 70% ethanolu, vzorek se 2–3x lehce promíchá a centrifuguje se 2 minuty maximální rychlostí při teplotě 4 °C. Okamžitě se odstraní všechno supernatant. Pro dokonalé přečištění se může krok č. 9 opakovat.
10. Vzorky se nechají inkubovat 10 min při laboratorní teplotě, aby se odpařil zbytek ethanolu. Pelet nesmí vyschnout zcela, snížila by se jeho rozpustnost. Alternativou je inkubace vzorku 5 minut při 70 °C. Mikrozkumavka musí být otevřená, aby se ethanol odpařil.
11. Podle množství peletu (DNA) se přidá 20–200 µl 1x TE pufru nebo sterilní destilované vody. Pro dokonalé přečištění se přidá 1 µl RNAzy A (podle objemu, ve kterém jsme rozpustili pelet DNA) a nechá se 30 minut inkubovat ve 37 °C.

Přílohy

2x CTAB extrakční pufr

- 2% CTAB (Cetrimoniumbromid/cetyltrimethylamoniumbromid)
- 100 mM Tris - HCl, pH 8,0
- 50 mM EDTA
- 1,4 M NaCl

TE (TRIS/EDTA) pufr

- 1M Tris - HCL, pH 8,0
- 10 mM EDTA

1% 2 - merkapttoetanol (2 - sulfanylethan - 1 - ol)
chloroform - IAA (24 : 1) (IAA isoamylalkohol)
isopropanol
70% etanol
96% etanol
Rnáza A 2 mg/ml
3 M octan sodný

Izolace DNA fenol - chloroformovou metodou

Izolace pomocí fenol - chloroformu je klasická metoda izolace DNA. Na rozdíl od izolace kitem je pracnější a trvá delší dobu, ale poskytuje větší množství DNA. Nevýhodou je použití fenolu, který je zdraví nebezpečnou látkou, proto je nutné veškeré manipulace s fenolem provádět v digestoři, popř. velmi dobře větrané místnosti. Stejně jako v případě izolace kitem, nebo pomocí metody CTAB, je prvním krokem homogenizace vzorku. V tomto případě se může jednat o část infikované tkáně, nebo v případě malých, drobných, druhů hmyzu (mšice, červci, vrtule) o část nebo celého jedince. K homogenizovanému zlyzovanému vzorku se přidá fenol, popř. směs fenolu a chloroformu, které vysráží ze vzorku proteiny. Vzorek se separuje na dvě poloviny, horní vodná fáze obsahuje DNA, spodní organická fáze je směsí fenolu nebo fenolu a chloroformu. Proteiny jsou vysráženy na rozhraní obou fází. Opakovaným přidáváním fenol - chloroformu k vodné fázi s DNA dochází k přečišťování vzorku od proteinů.

Prvním krokem v izolaci je homogenizace tkáně. Ta se provádí buď v tekutém dusíku v třecí misce příslušné velikosti, pokud nemáme k dispozici tekutý dusík, homogenizaci provádíme v lyzačním roztoku v mikrozkuhavce pomocí plastových tyčinek.

1. Vzorek o hmotnosti 100 mg se zhomogenizuje a přidá se extrakční (lyzační pufr) v objemu 500 μ l.
2. Homogenát v extrakčním pufru se inkubuje 3–12 h, popř. přes noc v termobloku při 56 °C. Záleží na typu a velikosti tkáně ve vzorku. Doba inkubace se řídí velikostí vzorku a typem tkáně – kratší dobu budeme potřebovat na homogenizaci např. střeva, delší dobu na homogenizaci chitinem impregnovaných částí – kutikula, části těla apod. Vzorek se během inkubace v extrakčním pufru promíchává na vortexu, ale pouze jemně (při malé rychlosti), aby nedošlo k mechanickému poškození vláken DNA.
3. Po inkubaci se vzorek v mikrozkuhavce centrifuguje při 12 000 otáčkách 3 min při laboratorní teplotě.
4. Do nové zkuhavky se odebere vodná fáze a přidá se stejný objem fenolu (pH= 8) nebo směsi fenol : chloroform. Směs se promíchá pomocí vortexu 1 min a poté se centrifuguje 5 min při 14 000 otáčkách při laboratorní teplotě.
5. Vrchní vodná fáze s extrahovanou DNA se odebere do nové mikrozkuhavky (nesmí se nabrat část proteinové vrstvy) a k vodné fázi se přidá stejný objem směsi fenol : chloroform. Následně se směs 1 min promíchává a následně centrifuguje 5 min při 14 000 otáčkách při laboratorní teplotě. Tento krok se opakuje do té doby, kdy se na rozhraní vodné a organické fáze neobjevuje vrstva proteinů, většinou dvakrát.

6. K vodné fázi se přidá stejný objem směsi fenol : chloroform : isoamylalkohol, vzorek se promíchá a centrifuguje 5 min při 14 000 otáčkách při laboratorní teplotě. Ve vodné fázi, která se odebere do nové zkumavky nesmí být před precipitací DNA žádné zbytky fenolu.
7. K vodné fázi v nové zkumavce se přidá 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 2,5 objemu 96% etanolu. Směs se promíchá otáčením zkumavky v ruce. Roztok se centrifuguje při 14 000 otáčkách 5 min ve 4 °C a poté se odstraní supernatant.
8. Vzorek se nechá 10 minut vysušit, aby se odstranil zbytkový etanol, který by mohl v následných analýzách ovlivňovat výsledky.
9. K precipitátu se přidá eluční pufr (TE pufr) nebo destilovaná sterilní voda v objemu odpovídajícímu množství precipitátu na dně zkumavky, většinou 100–300 µl.
10. Pelet se rozpustí při 37 °C po dobu 30–45 minut, popř. se zkumavka s rozpouštěnou DNA může dát přes noc do 4 °C.

Přílohy

Lyzačních pufrů je celá řada s různým složením jednotlivých komponent. Zde uvádíme složení námi používaného a osvědčeného lyzačního pufru:

1 M NaCl	10 ml
1 M Tris - HCl, pH = 8	1 ml
50 mM EDTA	10 ml
10% SDS	5 ml
destilovaná voda	74 ml

Před použitím přidáme k lyzačnímu pufru Proteinázu K v koncentraci 100 µg/ml.

fenol, pH8.0

fenol - chloroform (1 : 1)

fenol - chloroform - IAA (25 : 24 : 1)

1x TE pufr (viz předchozí kapitola)

3 M octan sodný

96% etanol

70% etanol

Identifikace patogenů pomocí metody PCR

PCR (polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce) je metoda založená na amplifikaci úseků vyizolované DNA pomocí krátkých nukleotidových sekvencí tzv. primerů (cca 20 bp). Amplifikované PCR produkty lze následně sekvenovat a porovnat s databází BLAST. Takto se dají ve velmi krátké době identifikovat jednotlivé druhy entomopatogenů, a na základě PCR získaných sekvencí se také dají vysvětlit původ a fylogenetické zařazení patogenů.

Tato metoda je založena na amplifikaci regionů odpovídajících jednotlivým primerům. Nejprve proběhne PCR reakce za přítomnosti specifických univerzálních primerů. Po PCR analýze jsou amplifikované fragmenty purifikovány a sekvenovány. Na základě sekvenční analýzy je pak možné identifikovat jednotlivé druhy entomopatogenů. Analýza sekvencí může

poskytnout data pro konstrukci fylogenetických stromů, data pro identifikaci patogenů a hodnocení homogenity souboru jednotlivých druhů/rodů.

Většina dnes používaných univerzálních primerů k identifikaci určitých skupin organismů je léty prověřená a obecně přijímaná. Každý primer je navržený na jiný úsek sekvence DNA různých organismů tak, aby se daly jednotlivé organismy jednoduše diverzifikovat a určit. Po amplifikaci úseků DNA v PCR reakci se tyto amplikony sekvenují, aby se zjistila podobnost s organismy, pro které jsou primery určené. Seznam námi používaných primerů v identifikaci entomopatogenních organismů je uveden v **Tabulce 1**.

V momentě, kdy máme k dispozici PCR amplikon entomopatogena, necháme vzorek osekvenovat (např. SEQme s.r.o., Dobříš). Osekvenovaný úsek DNA porovnáváme se sekvencemi v nukleotidové databázi NCBI (nt) pomocí algoritmu BLAST (blastn) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tab. 1. Univerzální primery používané k identifikaci hostitelských organismů a jednotlivých skupin entomopatogenů.

Smer	Primer	Sekvence (5'→3')	Gen	Teplota annealingu	Cilový organismus	Reference
F	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	COI	51	hmyz a roztoči	Fowler et al., 1994
R	HCO2198	TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA				
F	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	57	houby + dalsi	White et al., 1990
R	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC				
F	LR0R	GTACCCGCTGAACCTAAGC	LSU	52	houby, kvasinky	Elya et al., 2018 Vilgalys and Hester, 1990
R	LR5	ATCCTGAGGGGAACTTC				
F	ss18f	CACCAGGTTGATTCTGCC	rRNA	45	hmyz, kvasinky, mikrosporidie	Weiss and Vossbrinck, 1998
R	ss1492r	GGTTACCTTGTTACGACTT				
F	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	rRNA	54	bakterie	Salter et al., 2014

Metoda PCR

Námi popisované PCR reakce probíhají ve stejném objemu, se stejným zastoupením všech reagensů. Liší se pouze v sekvencích primerů a teplotních profilech, které se pro amplifikaci jednotlivých primerů používají. Všechny zde popsány primery i profily jsou používány rutinně v identifikaci jednotlivých organismů, nejenom entomopatogenů.

PCR reakce probíhá v objemu 20 µl:

Schéma pipetování:

- 10 µl GoTaq PCR master mixu (Promega Corp.)
- 1 µl DNA (koncentrace 50 ng v reakci)
- 0.5 µl forwardového primeru (chybí koncentrace)
- 0.5 µl reverzního primeru (chybí koncentrace)
- 8 µl PCR vody (do objemu 20 µl)

Amplifikace probíhá v termocyklerech (např. Biometra;Analytik Jena). PCR produkty jsou separovány na 2% agarózovém gelu v 1×TBE pufru pomocí vyhodnocovacího zařízení, jehož

součástí je kamerový systém, UV transiluminátor a vyhodnocovací software. Pomocí tohoto programového vybavení je možné pomocí velikostního markeru a pozitivní kontroly potvrdit (stanovit) velikost PCR produktu. Úspěšně amplifikované fragmenty jsou sekvenovány.

Přílohy

5× TBE pufr (zásobní roztok)

Tris 54 g

50 mM EDTA 20 ml

kys. boritá 27,5 g

destilovaná voda do 1 l

Purifikace PCR produktu

Po PCR reakci se v reakční směsi nachází i zbytky nukleotidů a primerů, které negativně ovlivňují sekvenování. PCR produkty se před sekvenací purifikují kitem ExoSap - IT (např. Applied Biosystems™). Pomocí enzymatických reakcí – exonukléazami a alkalickými fosfatázami, přidanými do PCR směsi, dojde k odstranění primerů a zbytků nukleotidů. Uvedený postup byl doporučen výrobcem (Applied Biosystems™), složení roztoků není uvedeno.

1. Z PCR reakce se přepipetuje 10 µl vzorku do nové mikrozkušavky (objem 0,2 ml).
2. Ke vzorku se přidají 2 µl ExoSapu – pipetuje se do víčka mikrozkušavky vzhledem k tomu, že směs enzymů je velmi hustá a viskózní. Po uzavření mikrozkušavky se vzorek krátce centrifuguje, aby se směs enzymů dostala do reakce.
3. Takto připravená směs se inkubuje 30 min při 37 °C v termobloku nebo termocykleru. Po uvedené době se enzymy ve směsi inaktivují inkubací vzorku 20 min při 80 °C.
4. Po ochlazení směsi na 4 °C (např. na ledu) se k PCR reakci přidá 5 µl primerů (ve finální koncentraci 5 µM), forward nebo reverzního. Takto upravený vzorek se posílá do externí laboratoře k sekvenování.

8.2. Izolace RNA

RNA je méně stabilní než DNA a její izolace vyžaduje opatření, které zabrání degradaci RNA během izolace. Místo, kde se bude izolovat RNA by mělo být vysterylizováno speciálními chemikáliemi (RNase free) nebo UV světlem. Stejně jako při izolaci DNA, všechny nástroje musí být sterilní, vždy je nutné nosit rukavice a často je měnit, aby se zabránilo kontaktu s RNA. Izolace by měla probíhat na ledu, aby se omezila enzymatická aktivita. Pokud dojde ke kontaminaci nástrojů, laboratorního skla nebo roztoků, je třeba je vyměnit. Všechny nástroje a laboratorní sklo a plasty, potřebné pro izolaci RNA, je nutné bezpodmínečně sterilizovat v autoklávu, stejně jako v případě DNA.

RNA se izoluje ve formě celkové RNA z nakaženého hostitele. Jednou z metod je izolace RNA za použití TRIzolu, který indukuje lýzi buněk a inhibuje RNAzy. Je zdravý nebezpečnou

látkou, a je tedy na místě opatrnost při jeho použití, protože denaturuje DNA a proteiny.

Izolace RNA pomocí činidla Trizol

Trizol (obchodní název TRI Reagent) je chemické činidlo (nebo roztok) založené na směsi guanidin thiokyanátu a fenolu. Touto izolační metodou je možné dosáhnout vyšší koncentrace extrahované RNA než při izolaci pomocí kitu, vyšší čistoty a stability při skladování. Nevýhodou jsou zdravotní rizika spojená s manipulací s fenolem a chloroformem a také poměrně časově náročná doba izolace. Při práci s Trizolem dodržujeme bezpečnostní pravidla. Je dobré používat dvoje nitrilové rukavice a chránit se tak proti přímému kontaktu s chemickou látkou, včetně nádob a nástrojů, které s ní přišly do styku. Samozřejmostí práce se zdravím poškozujícími sloučeninami, obsahujícími fenol, chloroform, thiokyanát apod., je práce v dobře odvětrané místnosti nebo v digestoři.

Na izolaci používáme biologický materiál v čistém stavu, čerstvý nebo hluboko zamražený (- 80 °C).

1. Malá část tkáně (0,1 – 10 mg) se vloží do mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml. Do zkumavky se přidá na 60 °C předeřhátý 1 ml TRI Reagent a celá suspenze se homogenizuje tyčinkou. Homogenizace se dá alternativně provádět mechanicky pomocí mlýnků s vysokou frekvencí. V takovém případě se používají mikrozukumavky s kulatým dnem o objemu 2 ml se safe-lock uzávěrem. Před homogenizací se do zkumavky přidávají kuličky, které pomáhají rozbít homogenizovanou tkáň. Kuličky skleněné necháme ve vzorku, kuličky kovové se po sterilizaci dají použít opakovaně.
2. Homogenizovaný vzorek se nechá inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Po homogenizaci se vzorek centrifuguje při 3000 otáčkách 20 minut při teplotě 4 °C.
3. Po centrifugaci se odebere supernatant do nové mikrozukumavky a přidá se 200 µl chloroformu. Vzorek se 15 s vortexuje a 5 min inkubuje při laboratorní teplotě a následně ve 4 °C 15 minut při 12000 ot.
4. Do nové zkumavky se opatrně odebere čistá vodná vrchní fáze supernatantu a opakuje se krok 3. Vodná fáze se převede do nové mikrozukumavky a přidá se 500 µl ledového izopropanolu a 500 µl 1,2 M NaCl. Vzorek se promíchá a nechá inkubovat při laboratorní teplotě 10 minut a opět se vzorek centrifuguje 10 minut při 12 000 otáčkách ve 4 °C.
5. Odstraní se supernatant a RNA pelet se promyje přidáním 1 ml 75% ethanolu. Vzorek se promíchá na vortexu a centrifuguje se 5 minut při 8 500 otáčkách ve 4 °C.
6. Supernatant se odstraní a opakuje se krok 5. V této fázi izolace mohou být vzorky RNA ve formě peletu v etanolu skladovány nejméně týden v 4 °C, nebo několik měsíců v mrazícím zařízení při - 20 °C.
7. Po centrifugaci a pečlivém odstranění veškerého supernatantu mikropipetou se nechá RNA pelet 5–10 min sušit (stát při laboratorní teplotě), aby se odstranily zbytky ethanolu, který by mohl ovlivnit následnou kvalitu rozpouštění nukleové kyseliny. Pelet RNA nesmí být sušen delší dobu, protože se zvyšující se dobou sušení klesá rozpustnost

RNA.

8. K částečně vysušenému peletu RNA, zbaveného zbytkového etanolu, se přidá 20 μ l RNA - free vody, případně 1 μ l inhibitoru RNAz, a vzorek se nechá inkubovat 10 minut v termobloku nastaveném na 60 °C.
9. Extrahovaná celková RNA se používá hned k dalším analýzám nebo se vzorek může uchovávat v hlubokomrazícím zařízení v -80 °C.

Izolace RNA pomocí komerčního kitu

Nicméně v současné době je daleko jednodušší použít celou řadu komerčních kitů na izolaci celkové RNA, které používají kolonkovou metodu. Dodržování správné laboratorní praxe pro izolaci RNA je stejné jako v případě izolace pomocí TRIzol, ale kolonková izolace je rychlejší, jednodušší a méně zdraví škodlivá. Kvalita výsledné RNA je vyšší a lépe použitelná pro další analýzy.

K izolaci celkové RNA se používá celá řada kitů využívajících specifickou vazbu RNA na kolonkách. Postupy a metody izolace RNA jsou součástí kitů. Výsledná RNA je čistá, stabilní, nicméně výtěžnost RNA je v porovnání s izolací pomocí TRIzolu menší.

Takto připravená izolovaná RNA je vhodná pro NGS sekvenování ve specializovaných laboratořích.

Reverzní transkripce izolované celkové RNA

RT-PCR je alternativní metoda detekce

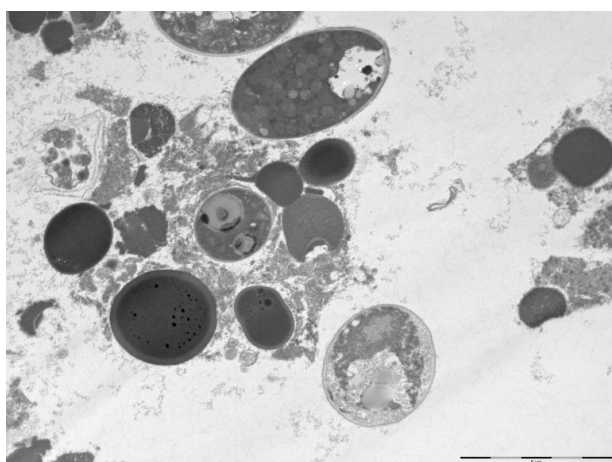
Vyizolovaná RNA PCR reakce probíhá na templátu DNA, analýza je založena na replikaci DNA a klíčovým enzymem je DNA polymeráza. Proto je nutné izolovanou celkovou RNA přepsat procesem reverzní transkripce na cDNA, která slouží jako templát pro PCR s příslušnými primery (např. univerzálními, viz výše). Existuje celá řada komerčních kitů pro reverzní transkripci. Jedná se v zásadě o jednu reakci kombinující reverzní transkripci a PCR, která probíhá v termocyklerech, stejně jako klasická PCR. Proces reverzní transkripce probíhá podle manuálu výrobce kitu.

Reverzní transkripce se připraví pomocí kitu, např. kitem ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA)

1. Na ledu smícháme 0,5 μ l forward primeru, 0,5 μ l reverse primeru, 3 μ l celkové RNA a 1 μ l vody bez nukleáz.
2. Směs necháme denaturovat při 70 °C 5 minut, poté okamžitě přemístíme zpět na led a necháme inkubovat alespoň 5 minut.
3. Připravíme reakční mix pro reverzní transkripci dle pokynů výrobce

4. Celý namíchaný objem reakčního mixu přidáme k denaturované celkové RNA s příslušnými F i R primery.
5. Vzorek vložíme do termobloku a nastavíme teplotní profil reakce následovně
 - 25 °C - 5 minut
 - 42 °C - 60 minut
 - 70 °C - 15 minut
6. Výsledkem reakce je cDNA, kterou můžeme použít pro další analýzy, popř. zamrazit při -80 °C do doby použití.

8.3. Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii



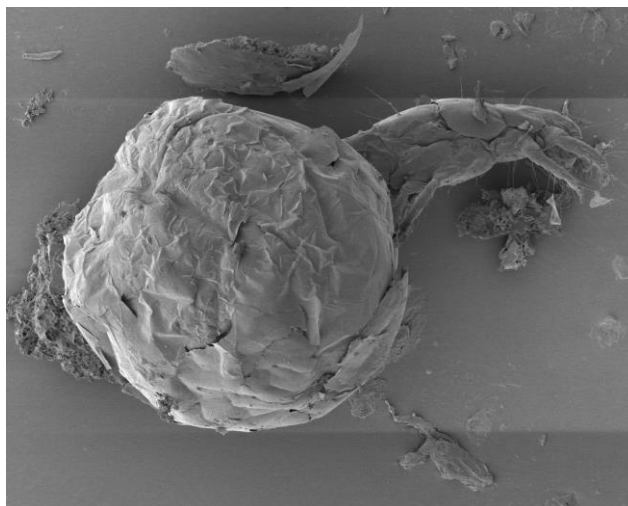
Obr. 51 Endosymbiotické houby ve střevě voskovky zavlečené pozorované v TEM.

Elektronové mikroskopy jsou v zásadě dvou typů: transmisní elektronový mikroskop (TEM), který se používá pro studia ultrastruktur stádií patogenů v buňkách (ze kterých jsou poté odvozené např. životní cykly), a slouží k pozorování vnitřních detailů organismů a tkání, a skenovací (scanning) elektronový mikroskop (SEM), který se používá ke studiu povrchu a vnějších struktur organismů, bakterií, jedno a mnohobuněčných organismů. Fixace a dehydratace jsou pro oba mikroskopy stejné, liší se ve finální fázi přípravy vzorků.

Na TEM se vzorky fixují v glutaraldehydu, po fixaci se v současné době většinou vzorky předávají specializovaným laboratorům k dalšímu zpracování. Fixáž je připravována zaměstnanci laboratoře elektronové mikroskopie (LEM) a skladována v alikvótách v mikrozkuvkách při -20 °C. Před použitím je nutné fixáž rozmrazit. Poloténkové řezy barvené toluidinovou modří se prohlíží ve světelném mikroskopu, ultraténkové řezy barvené uranylem se prohlíží v TEM (obr. 51). Vzorky pro TEM i SEM se připravují v externí laboratoři (např. LEM Parazitologický ústav AVČR – <https://www.bc.cas.cz/servisni-pracoviste/laborator-elektronove-mikroskopie/>).

Následující postup popisuje přípravu biologických vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM). Konkrétní protokol se může mírně lišit v závislosti na standardních pracovních postupech dané laboratoře, typu zkoumané tkáně a stupni její zachovalosti. Níže uvedený popis však představuje obecně používaný rámcový postup přípravy vzorků pro TEM analýzu.

1. Část infikované tkáně se fixuje přes noc při 4 °C v 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M kakodylátovém pufru. Někdy se k pufru přidává 1% sacharóza, která zvyšuje osmolaritu a lepší pronikání fixačního roztoku do tkáně.
2. Po promytí v 0,1 M PBS pufru (s 4% glukózou) se vzorky postfixují v pufrovaném 2% OsO₄ dvě hodiny při 4 °C.
3. Pak se vzorek dále promývá 0,1 M PBS puftrem a vzestupnou etanolovou řadou (25, 59, 70, 80, 96, 100%) a acetonem se vzorky převedou do pryskyřice (např. EPON). V každé koncentraci se vzorky promývají 2 × 10 minut.
4. Po zalití do pryskyřice a ztvrdnutí se krájí polotenké řezy, které se barví toluidinovou modří. Ty se prohlízejí ve světelném mikroskopu pro přípravu ultratenkých řezů.
5. Ultratenké řezy se kontrastují citrátem olova a octanem uranylu a prohlíží v TEM.



Obr. 52 Fyzogastriická samice roztoče *Pyemotes* sp. izolovaného z larev tmavky švestkové.

Vzorky pro SEM se připravují podobně.

1. Celý objekt, popř. část tkáně, který budeme chtít pozorovat v mikroskopu fixujeme přes noc při 4 °C v 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M kakodylátovém pufru.
2. Po fixaci následuje odvodnění vzestupnou etanolovou řadou (25, 59, 70, 80, 96, 100%) a po promytí acetonem se vzorky suší metodou kritického bodu pomocí CO₂.
3. Po vysušení se vzorky lepí na kovové terčíky a pokrývají se zlatem (pozlacují se) a prohlízejí se na skenovacím elektronovém mikroskopu.

SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Tato metodika vznikla na základě dlouholetých zkušeností a systematického studia patogenních organismů hmyzu, realizovaného v rámci různorodých výzkumných projektů a úkolů. V rámci jejího vývoje byly integrovány poznatky, metody a přístupy z různých oblastí výzkumu entomopatogenů, a to jak z terénních šetření, tak i z laboratorních experimentů, mikroskopických technik, molekulárních analýz a bioinformatického zpracování sekvenčních dat.

Významnou část vývoje metodiky tvořily aktivity řešené v rámci projektu QK22020019 „*Inovace integrované a ekologické produkce ovoce a révy vinné v návaznosti na nově se šířící druhy škodlivých organismů*“. Metodika představuje první ucelený návod k diagnostice entomopatogenních agens, který je prakticky využitelný nejen v oblasti výzkumu, ale i pro pracovníky státní správy, ochrany rostlin, aplikované ekologie a dalších souvisejících profesí.

Současně metodika zaplňuje významnou mezeru v oblasti identifikace a managementu patogenů invazních druhů hmyzu, a to jak v systémech pěstování ovoce a révy vinné, tak i v širším kontextu ochrany životního prostředí, kde dosud podobný souhrnný a prakticky zaměřený dokument chyběl.

Popisované metody poskytují vysokou diagnostickou přesnost, zejména molekulárně - analytické přístupy k identifikaci hmyzích patogenů. Metodika dále obsahuje i praktické návody pro izolaci a kultivaci patogenů, což umožňuje její využití i subjekty z komerční sféry, například při vývoji alternativních přípravků na ochranu rostlin (POR).

Vzhledem k tomu, že dosud nebyla v České republice publikována jednotná metodika shrnující diagnostické přístupy k identifikaci patogenů u hmyzu, lze tuto práci považovat za inovativní a přínosnou nejen z hlediska vědeckého, ale i z hlediska praktického využití.

POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Tato metodika je určena pro odborná pracoviště zabývající se entomologií, ochranou rostlin a diagnostikou nových i stávajících patogenních organismů s potenciálem využití v biologické ochraně proti škůdcům hospodářských plodin. Uplatnění najde rovněž v systémech integrované produkce ovoce, zeleniny a révy vinné, stejně jako při ochraně proti škodlivým organismům v lesních ekosystémech.

Předpokládanými uživateli výsledku jsou především orgány státní správy a veřejné instituce zajišťující dohled nad ochranou rostlin (např. Ministerstvo zemědělství, Ministerstvo životního prostředí, ÚKZÚZ, referenční a diagnostické laboratoře), dále výzkumné ústavy a odborná pracoviště zaměřená na zemědělství, lesnictví a biologickou ochranu rostlin.

Metodika přispívá k plnění požadavků vyplývajících z evropské legislativy, zejména Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1143/2014 o prevenci a řízení zavlékání a šíření invazních nepůvodních druhů a nařízení Rady (ES) č. 708/2007 o využívání nepůvodních a místně se nevyskytujících druhů v akvakultuře.

Praktické uplatnění metodiky se předpokládá rovněž v akreditovaných diagnostických laboratořích, výzkumných ústavech zřizovaných Ministerstvem zemědělství (např. pro pěstitele ovoce, révy vinné, chmele, zeleniny či okrasných rostlin), a dále ve specializovaných

pracovištích medicínské a veterinární entomologie (např. krajské hygienické stanice, státní veterinární ústavy).

Metodiku lze rovněž využít ve výuce na středních a vysokých školách, zejména v rámci předmětů zaměřených na rostlinolékařství, zemědělskou entomologii, diagnostiku patogenů a parazitů či metody ochrany rostlin. Detailně popsané postupy mohou být aplikovány i v rámci vývoje nových biologických přípravků na ochranu rostlin založených na mikroorganizmech, a to jak v rámci státního, tak i soukromého aplikovaného výzkumu a vývoje.

Metodika bude volně dostupná na webových stránkách Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (<https://www.fzt.jcu.cz>) a Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského Holovousy (<https://www.vsu.cz>).

EKONOMICKÉ ASPEKTY

Snižování výnosů ovocných, zeleninových a dalších hospodářských plodin v důsledku působení invazních druhů představuje jeden z významných ekonomických dopadů biologických invazí. Zavlékání nových druhů je často spojeno také s introdukcí fytopatogenních agens do nových geografických oblastí. Tím dochází nejen k nárůstu nákladů na ochranu proti novým škůdcům, ale rovněž ke zvýšení výdajů spojených s prevencí a potlačováním výskytu nově zavlečených rostlinných patogenů.

Omezení negativních ekonomických dopadů invazních druhů, a to jak hmyzích škůdců, tak s nimi spojených fytopatogenů, je v systému pěstování ovoce, zeleniny i dalších plodin prioritou. Postupy popsané v této metodice mohou významně přispět jak k **identifikaci nových entomopatogenních mikroorganismů** s potenciálem využití v biologické ochraně, tak i k **včasné detekci fytopatogenů**, přenášených nebo vázaných na invazní škůdce. Včasná identifikace umožňuje zabránit rozvoji fytopatogenních epifytií či epizootií a tím významně snižovat ekonomické ztráty spojené s následnou eradikací a ochranou.

Většina metod popsaných v této publikaci je technicky i finančně nenáročná – základní mikroskopické vyšetření nevyžaduje nákladné přístrojové vybavení. Náročnější finanční i materiálové zázemí je potřeba u pokročilých technik, jako je transmisní elektronová mikroskopie či molekulárně – genetická analýza. I přes vyšší náklady jsou tyto metody ve srovnání s výdaji spojenými s výskytem a šířením invazních škůdců a patogenů, včetně nákladů na jejich monitoring, potlačení a dlouhodobou ochranu porostů, ekonomicky opodstatněné.

Zároveň může identifikace nových entomopatogenních agens a parazitů významně přispět k vývoji a zavedení nových **biologických přípravků** využitelných v ochraně rostlin, a tím i k rozvoji biotechnologického sektoru a firem zaměřených na produkci biologických prostředků ochrany rostlin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- BAERMANN, G.**, 1917. *Eine einfache Methode zur Auffindung von Ancylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben*. Geneesk. Tijdschr. Ned. Indie, **57**, s. 131–137.
- BIRD, F.T.**, 1955. Virus diseases of sawflies. *The Canadian Entomologist*, **87**(3), s. 124–127.
- HAJEK, A.E. a SHAPIRO - ILAN, D.I.**, 2018. *Ecology of Invertebrate Diseases*. Chichester, UK: Wiley, s. 215 – 285. <https://doi.org/10.1002/9781119256106>.
- HIBBETT, D.S. et al.**, 2007. A higher - level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*, **111**(5), s. 509 – 547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>.
- HOLÝ, K., STARÁ, J., KOCOUREK, F., OUŘEDNÍČKOVÁ, J., SKALSKÝ, M. a PULTAR, O.**, 2021. *Invazní škodlivé organizmy ovocných plodin v podmínkách ČR*. Certifikovaná metodika. Praha: VÚRV, 61 s. ISBN 978-80-7427-360-5.
- HUGER, A.M.**, 2005. The Oryctes virus: its detection, identification, and implementation in biological control of the coconut palm rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **89**(1), s. 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.02.010>
- LACEY, L.A., GRZYWACZ, D., SHAPIRO - ILAN, D.I., FRUTOS, R., BROWNBRIDGE, M. a GOETTEL, M.S.**, 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, **132**, s. 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.
- OUŘEDNÍČKOVÁ, J. et al.**, 2024. *Možnosti identifikace, monitoringu a regulace populací invazních škodlivých organizmů ovocných plodin*. Certifikovaná metodika. Holovousy: VŠÚO. 151 s. ISBN 978-80-88669-01-2.
- SINGH, P.**, 1977. *Artificial diets for insects, mites, and spiders*. New York: Plenum Press, 594 s.
- SPATAFORA, J.W. et al.**, 2017. The fungal tree of life: from molecular systematics to genome - scale phylogenies. *Microbiology Spectrum*, **5**, FUNK - 0053 - 2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK - 0053 - 2016>.
- SKUHRAVÝ, V. et al.**, 1968. *Metody chovu hmyzu*. Praha: Academia, 288 s.
- ROWLEY, A.F., COATES, Ch.J. a WHITTEN, M.W. (eds.)**, 2022. *Invertebrate Pathology*. Oxford: Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198853756.001.0001>.
- TONKA, T., WALTEROVÁ, H., HEJNA, O. a ČURN, V.**, 2021. *Metodika identifikace, determinace a přenosu mykovirů u hub rodu Armillaria*. České Budějovice: Zemědělská fakulta JU. Září 2021.
- VEGA, F. a KAYA, H.**, 2012. *Insect Pathology*. 2. vydání. London: Academic Press.
- WEISER, J. a MRÁČEK, Z.**, 1988. *Parazitické hlístice hmyzu*. Praha: Academia.
- WIJAYAWARDENE, N. et al.**, 2022. Outline of fungi and fungus - like taxa – 2021. *Mycosphere*, **13**, s. 53–453. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/13/1/2>.

SEZNAM PUBLIKACÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE

TONKA, T., LORENC, F., OUŘEDNÍČKOVÁ, J. a PULTAR, O., 202X. First detection of *Eremothecium coryli*, a plant pathogenic yeast transmitted by *Halyomorpha halys*, in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, Manuscript submitted for publication.

TONKA, T., PULTAR, O. a OUŘEDNÍČKOVÁ, J., 202X. The first record of the parasitism of *Pyemotes* sp. (Acari: Pyemotidae) on *Eurytoma schreineri* Schreiner, 1908 (Hymenoptera: Eurytomidae) inside plum seeds. *Acarologia*. Manuscript accepted for publication.

OUŘEDNÍČKOVÁ, J. et al., 2024. *Možnosti identifikace, monitoringu a regulace populací invazních škodlivých organizmů ovocných plodin*. Certifikovaná metodika. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

v y d á v á

O S V Ě D Ě N Í

UKZUZ 167020/2025

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Metodika detekce entomopatogenů a parazitů u invazních druhů hmyzu**

Autor/autoři: **Ing. Jana Ouřednicková, Ph.D, RNDr. Oldřich Pultar, Mgr. Tomáš Tonka, Ph.D.**

Název organizace/cí:
VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s. r. o.
Jihočeská univerzita České Budějovice

Místo vydání: **Brno**
Rok vydání: **2025**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu NAZV QK22020019 „Inovace integrované a ekologické produkce ovoce a révy vinné v návaznosti na nově se šířící druhy škodlivých organismů“.

Brno 9. 10. 2025

Dokument je podepsán elektronickým podpisem
Podpisující: **Mgr. Jurečka Daniel**
Organizace: **Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský**
Šifra ověření: **20497825**
Vydání cert.: **Podpisová kvalifikace CA 4**
Datum a čas: **09.10.2025 14:13:57**
Přívod: **v zastoupení**
Místo: **Brno**

Ing. Daniel Jurečka
ředitel ústavu

.....
podpis/elektronický podpis
zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe ČR:

V dne

Mgr. Jan Radoš

Digitálně podepsal Mgr.
Jan Radoš
Datum: 2025.10.17
09:37:09 +02'00'

.....
podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky
Odboru precizního zemědělství,
výzkumu a vzdělávání

Metodika detekce entomopatogenů a parazitů u invazních druhů hmyzu

Vydal:

© FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ, JIHOČESKÁ UNIVERZITA V Č. BUDĚJOVICÍCH
© VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY, s.r.o.

1. vydání, 2025

ISBN: 978-80-88669-03-6 (online, pdf)

doi: 10.60615/dzhe-aw37

