

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra ochrany rostlin



Bionomie, diagnostika a monitoring hád'átek z rodu
***Bursaphelenchus* v ČR**

doktorská disertační práce

Autor: **Ing. Marie Maňasová**

Školitel: **prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.**

Konzultant: **Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.**
katedra ochrany rostlin

Praha 2014

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou doktorskou disertační práci "Bionomie, diagnostika a monitoring háďátek z rodu *Bursaphelenchus* v ČR" jsem vypracovala samostatně pod vedením školitele a konzultanta a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené doktorské disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 27.11.2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli prof. Ing. Pavlu Ryšánkovi, CSc. a konzultantovi Ing. Miloslavu Zouharovi, Ph.D. za cenné rady a odborné konzultace. Ing. Janě Wenzlové a Ing. Vojtěchovi Kuchařovi za pomoc při realizaci této práce. Dále bych ráda poděkovala svému manželovi za podporu při studiu.

OBSAH:

1. ÚVOD	5
2. PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU POZNÁNÍ	6
2.1. TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ HÁDÁTKA <i>BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS</i>	6
2.2. HISTORIE VÝSKYTU <i>B. XYLOPHILUS</i>	7
2.3. BIOLOGIE A BIONOMIE	8
2.3.1. PRIMÁRNÍ – DISPERZNÍ STADIUM	9
2.3.2. SEKUNDÁRNÍ – PROPAGATIVNÍ STADIUM	9
2.3.3. HOSTITELSKÝ OKRUH	11
2.3.4. DRUHOVÉ SLOŽENÍ A STAV LESŮ ČR	11
2.3.5. PODMÍNKY VÝSKYTU <i>B. XYLOPHILUS</i>	13
2.3.6. VÝSKYT PŘENAŠEČŮ V ČESKÉ REPUBLICE	15
2.4. PŘÍZNAKY NAPADENÍ	19
2.4.1. RANÁ FÁZE	19
2.4.2. POKROČILÁ FÁZE	19
2.5. HOSPODÁŘSKÝ VÝZNAM	20
2.6. OCHRANA ROSTLIN PROTI HÁDÁTKU <i>B. XYLOPHILUS</i>	20
2.7. SOUČASNÝ POSTUP PŘI PROVÁDĚNÍ KONTROL V ČR	22
2.7.1. ODBĚR VZORKŮ DŘEVA	22
2.7.2. EXTRAKCE HÁDÁTEK	24
2.8. DRUHY RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i> V ČESKÉ REPUBLICE A SOUSEDÍCÍCH ZEMÍCH	24
2.9. METODY DIAGNOSTIKY	25
2.9.1. METODY DIAGNOSTIKY NA ÚROVNI MORFOLOGICKÝCH A ANATOMICKÝCH CHARAKTERISTIK	25
2.9.1.1. Základní morfologicko-anatomické znaky háďátek rodu <i>Bursaphelenchus</i>	26
2.9.1.2. Rozlišení jednotlivých skupin v rámci rodu <i>Bursaphelenchus</i>	27
2.9.2. METODY DIAGNOSTIKY NA ÚROVNI NUKLEOVÝCH KYSELIN	31
2.10.2.1. PCR – polymerázová řetězová reakce	32
2.10.2.2. RAPD – náhodná amplifikace polymorfní DNA	33
2.10.2.3. PCR-RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů	33
2.10.2.4. Real-time PCR – kvantitativní PCR v reálném čase (QPCR)	34
2.10.2.5. NESTED PCR – PCR využívající vnějších a vnitřních primerů	35
2.10.2.6. Sekvenování DNA	36
3. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	37
3.1. HYPOTÉZA	37
3.2. CÍL PRÁCE	38
3.3. DÍLČÍ CÍLE	38
4. MATERIÁL A METODY	38
4.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL	38
4.1.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL Z LABORATORNÍHO CHOVU	38
4.1.2. BIOLOGICKÝ MATERIÁL Z PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ	39
4.1.3. EXTRAKCE HÁDÁTEK ZE DŘEVA A KULTUR NA <i>BOTRYTIS CINEREA</i>	39
4.2. TESTOVÁNÍ NÁCHYLNOSTI DRUHŮ BOROVIC PĚSTOVANÝCH V ČR K HÁDÁTKU <i>BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS</i>	40

4.2.1. TESTOVÁNÍ SAZENIC	40
4.2.2. TESTOVÁNÍ ATRAKTIVITY DŘEVA NA AGAROVÝCH PLOTNÁCH	41
4.2.3. TESTOVÁNÍ NÁCHYLNOSTI V SEGMENTECH VĚTVÍ	42
4.3. METODY MONITOROVÁNÍ PŘENAŠEČŮ – BROUKŮ Z ČELEDI CERAMBYCIDAE	44
4.3.1. MÍSTA MONITOROVÁNÍ PŘENAŠEČŮ	44
4.3.2. METODY MONITOROVÁNÍ PŘENAŠEČŮ	45
4.4. METODY MONITOROVÁNÍ HÁDÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i>	45
4.4.1. MÍSTA MONITOROVÁNÍ HÁDÁTEK	45
4.4.2. METODY MONITOROVÁNÍ HÁDÁTEK	45
4.5. VÝVOJ A OVĚŘOVÁNÍ NOVÝCH POSTUPŮ OCHRANY PROTI HÁDÁTKU <i>B. XYLOPHILUS</i>	46
4.5.1. OVĚŘOVÁNÍ NEMATOCIDNÍCH ÚČINKŮ SILIC NA HÁDÁTKO <i>B. XYLOPHILUS</i>	46
4.5.1.1. Přímá aplikace silic	48
4.5.2. VÝVOJ METODY OŠETŘENÍ OBALOVÉHO DŘEVA POMOCÍ KYANOVODÍKU	49
4.5.2.1. Testování účinnosti HCN na modelovém organismu - háďátku <i>Caenorhabditis elegans</i>	49
4.5.2.2. Ošetření dřevních pilin s háďátky <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	50
4.5.2.3. Ošetření dřevěných špalků uvnitř s pilinami	51
4.6. DIAGNOSTIKA HÁDÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i> NA ÚROVNI MORFOLOGICKÝCH ZNAKŮ	52
4.6.1. TVORBA TRVALÝCH PREPARÁTŮ	52
4.6.1.1. Fixace háďátek pomocí Ditlevsenova roztoku tzv. FAA	52
4.6.1.2. Fixace háďátek pomocí roztoku TAF	53
4.6.1.3. Fixace háďátek pomocí roztoku formaldehydu o koncentraci 4 % a 10 %	53
4.6.1.4. Převedení háďátek do čistého glycerolu	53
4.6.1.5. Trvalé preparáty	54
4.6.2. MORFOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY	54
4.7. DIAGNOSTIKA HÁDÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i> POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH MARKERŮ	56
4.7.1. IZOLACE DNA	56
4.7.1.1. Izolace DNA z dřevních vzorků	56
4.7.1.2. Izolace DNA z jednoho a více jedinců	61
4.7.2. PCR (POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE)	64
4.7.2.1. Primery	64
4.7.2.2. Reakční směs	65
4.7.2.3. PCR protokol	65
4.7.3. REAL-TIME PCR (POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE V REÁLNÉM ČASE)	66
4.7.3.1. Primery a sonda	66
4.7.3.2. Reakční směs pro real-time PCR	67
4.7.3.3. Real-time PCR protokol	67
4.7.4. HORIZONTÁLNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	68
4.7.4.1. Příprava 1 a 1,5% agarózového gelu	68
4.7.4.2. Sestavení elektroforetické aparatury	69
4.7.4.3. Vizualizace agarózového gelu	69
5. VÝSLEDKY	69
5.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL	69
5.1.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL Z LABORATORNÍHO CHOVU	69
5.2. TESTOVÁNÍ NÁCHYLNOSTI DRUHŮ BOROVIC PĚSTOVANÝCH V ČR K HÁDÁTKU <i>B. XYLOPHILUS</i>	70
5.2.1. TESTOVÁNÍ SAZENIC	70
5.2.2. TESTOVÁNÍ ATRAKTIVITY DŘEVA NA AGAROVÝCH PLOTNÁCH	71
5.2.3. TESTOVÁNÍ NÁCHYLNOSTI V SEGMENTECH VĚTVÍ	71
5.3. METODY MONITOROVÁNÍ PŘENAŠEČŮ – BROUKŮ Z ČELEDI CERAMBYCIDAE	73
5.3.1. MÍSTA MONITOROVÁNÍ PŘENAŠEČŮ	73
5.3.2. METODY MONITOROVÁNÍ PŘENAŠEČŮ	74
5.4. METODY MONITOROVÁNÍ HÁDÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i>	74

5.4.1. MÍSTA MONITOROVÁNÍ HÁĐÁTEK	74
5.4.2. METODY MONITOROVÁNÍ HÁĐÁTEK	75
5.5. VÝVOJ A OVĚŘOVÁNÍ NOVÝCH POSTUPŮ OCHRANY PROTI HÁĐÁTKU <i>B. XYLOPHILUS</i>	75
5.5.1. OVĚŘOVÁNÍ NEMATOCIDNÍCH ÚČINKŮ SILIC NA HÁĐÁTKO <i>B. XYLOPHILUS</i>	75
5.5.2. VÝVOJ METODY OŠETŘENÍ OBALOVÉHO DŘEVA POMOCÍ KYANOVODÍKU	86
5.5.2.1. Testování účinnosti HCN na modelovém organismu - háďátku <i>Caenorhabditis elegans</i>	86
5.5.2.2. Ošetření dřevních pilin s háďátky <i>B. xylophilus</i>	87
4.5.2.3. Ošetření dřevěných špalků uvnitř s pilinami	87
5.6. DIAGNOSTIKA HÁĐÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i> NA ÚROVNI MORFOLOGICKÝCH ZNAKŮ	89
5.6.1. TVORBA TRVALÝCH PREPARÁTŮ	89
5.6.2. MORFOLOGICKÉ CHARAKTERISTIKY	90
5.7. DIAGNOSTIKA HÁĐÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i> POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH MARKERŮ	93
5.7.1. IZOLACE DNA A PCR	93
5.7.1.1. Izolace DNA z dřevních vzorků	93
5.7.1.2. Izolace DNA z jednoho a více jedinců	96
5.7.1.3. Real-time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)	101
6. DISKUZE	104
6.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL	104
6.2. TESTOVÁNÍ NÁCHYLNOSTI DRUHŮ BOROVIC PĚSTOVANÝCH V ČR K HÁĐÁTKU <i>BURSAPHELENCHUS XYLOPHILUS</i>	105
6.3. METODY MONITOROVÁNÍ PŘENAŠEČŮ – BROUKŮ Z ČELEDI <i>CERAMBYCIDAE</i>	106
6.4. METODY MONITOROVÁNÍ HÁĐÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i>	107
6.5. VÝVOJ A OVĚŘOVÁNÍ NOVÝCH POSTUPŮ OCHRANY PROTI HÁĐÁTKU <i>B. XYLOPHILUS</i>	108
6.6. DIAGNOSTIKA HÁĐÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i> NA ÚROVNI MORFOLOGICKÝCH ZNAKŮ	110
6.7. DIAGNOSTIKA HÁĐÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i> POMOCÍ MOLEKULÁRNÍCH MARKERŮ.	112
7. ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ PRO VYUŽITÍ POZNATKŮ V PRAXI NEBO PRO DALŠÍ ROZVOJ OBORU	113
7.1. ZHODNOCENÍ NÁCHYLNOSTI SORTIMENTU ODRŮD BOROVIC PĚSTOVANÝCH V ČR VŮČI HÁĐÁTKŮM RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i>, PŘEDEVŠÍM PAK <i>B. XYLOPHILUS</i>.	113
7.2. OVĚŘENÍ METOD MONITOROVÁNÍ PŘENAŠEČŮ – BROUKŮ Z ČELEDI <i>CERAMBYCIDAE</i> A JEJICH VHODNOST JAKO PŘENAŠEČŮ.	114
7.3. OVĚŘENÍ METOD MONITOROVÁNÍ HÁĐÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i>.	114
7.4. VYVINUTÍ A OVĚŘENÍ NOVÝCH POSTUPŮ OCHRANY PROTI HÁĐÁTKŮM RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i>, PŘEDEVŠÍM PAK PROTI <i>B. XYLOPHILUS</i>.	115
7.5. STUDIUM MORFOLOGICKÝCH ZNAKŮ A OVĚŘENÍ METOD UŽÍVANÝCH K TVORBĚ TRVALÝCH PREPARÁTŮ K DIAGNOSTICE DRUHŮ HÁĐÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i>.	115
7.6. VYVINUTÍ A OVĚŘENÍ SPOLEHLIVOSTI MOLEKULÁRNĚ DIAGNOSTICKÝCH METOD PRO URČOVÁNÍ DRUHŮ HÁĐÁTEK RODU <i>BURSAPHELENCHUS</i>.	116
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	117
9. PŘÍLOHY	127

1. ÚVOD

V nedávné době začalo docházet v porostech borovic, které mají hned po smrku největší rozlohu lesních porostů v ČR, k poměrně častému vadnutí a chřadnutí stromů. Činitelů, kteří mohou způsobovat takováto poškození, je celá řada. Na špatném zdravotním stavu se podílí nedostatek vláhy, dřevokazný hmyz, houbová onemocnění i zasolení pozemků poblíž komunikací a poškození porostů imisemi a emisemi. Dalším celosvětově důležitým faktorem ovlivňujícím zdravotní stav jehličnanů zejména borovic je háďátko *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer, 1934), (Nickel, 1970), česky nazývané háďátko borovicové.

B. xylophilus patří mezi karanténní organismy, je na seznamu A2 EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Toto háďátko má původ v Severní Americe, kde způsobuje škody zejména na exotických borovicích. Odtud se rozšířilo do Asie nejdříve do Japonska a později do téměř celé východní Asie. *B. xylophilus* byl na konci 20. století zaznamenán i v Evropě, v Portugalsku, odtud se rozšířil i do Španělska. Pokud by se toto háďátko rozšířilo i do zbytku Evropy, představovalo by ohrožení pro porosty borovic i ostatních jehličnanů a tím následně i pro celý ekosystém.

Háďátko borovicové ovlivňuje evapotranspiraci stromu, což se navenek projevuje nejprve žloutnutím a usycháním jehlic později vadnutím celého stromu, které vede k jeho odumření ve velice krátké době. Soubor těchto symptomů je označován jako PWD (Pine Wilt Disease), v češtině se používá pojem chřadnutí borovic. Přenos většiny háďátek rodu *Bursaphelenchus* na nové lokality je zajišťován hmyzími vektory, převážně brouky z čeledi tesaříkovití (*Cerambycidae*). Podobné příznaky, i když ne tak rychle nastupující, stejný způsob přenosu a stejný životní cyklus vykazují i jiné druhy rodu *Bursaphelenchus*, např. *B. mucronatus* a *B. vallesianus*. V ČR byl potvrzen výskyt obou těchto druhů.

Primární způsoby diagnostiky háďátek vycházejí z morfologické stavby jejich těla. Tyto metody vyžadují praxi v pozorování tělních struktur. Háďátko *B. xylophilus* je velice podobné zejména háďátku *B. mucronatus*, od kterého se liší pouze zakončením ocasu samičky a dalšími drobnými morfologickými odchylkami. Proto bylo vyvinuto mnoho metod založených na molekulární diagnostice. Ta je ovšem ztížena přítomností PCR inhibitorů ve dřevě borovic.

Vzhledem k již potvrzenému výskytu příbuzných druhů a přítomnosti vhodných hostitelských rostlin na našem území, je monitorování našeho území, diagnostika nalezených háďátek a studium jejich bionomie velice důležité.

2. Přehled o současném stavu poznání

2.1. Taxonomické zařazení háďátka *Bursaphelenchus xylophilus*

Háďátko borovicové bylo poprvé popsáno v roce 1931 ve Spojených státech amerických na borovici bahenní (*Pinus palustris*) a v roce 1934 bylo označeno jako *Aphelenchoides xylophilus* (Steiner and Buhner). V roce 1970 bylo přejmenováno háďátko borovicové do rodu *Bursaphelenchus*, vzhledem k jeho typické burse.

V roce 1972 bylo objeveno v Japonsku háďátko pojmenované *Bursaphelenchus lignicolus* (Mamiya and Kiyohara). Na základě křížení a morfologických znaků byl v roce 1981 označen *B. lignicolus* synonymem pro *B. xylophilus* (Nickle et al., 1981). Obecně se pro háďátko *Bursaphelenchus xylophilus* vžil název „pinewood nematode“ (PWN), česky „háďátko borovicové“ a pro příznaky, které způsobuje „pine wilt disease“ (PWD), česky „chřadnutí borovic“ (Zouhar a kol., 2007).

Dřívější řazení háďátek rodu *Bursaphelenchus*:

- Třída: SECERNENTEA
- Podtřída: DIPLOGASSTERIA
- Řád: APHELENCHIDA
- Podřád: APHELENCHINA
- Čeleď: PARASITAPHELENCHIDAE
- Podčeleď: BURSAPHELENCHINAE
- Rod: *Bursaphelenchus*
- Druh:
 - *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner, 1934) Nickle, 1970
 - *Bursaphelenchus fraudulentus* (Rühm, 1956)
 - *Bursaphelenchus mucronatus* (Mamiya and Enda, 1979)
 - *Bursaphelenchus crenati* (Rühm, 1956)

(Hunt, 1993)

V současnosti je řazení háďátek rodu *Bursaphelenchus* do taxonomického systému:

- Kmen: NEMATODA
- Třída: CHROMADOREA

- Řád: TYLENCHIDA
- Podřád: APHELENCHINA
- Nadčeleď: APHELENCHOIDOIDEA
- Čeleď: PARASITAPHELENCHIDAE
- Rod: *Bursaphelenchus*
- Druh:
 - *Bursaphelenchus vallesianus* (Braasch et al., 2004)
 - *Bursaphelenchus baujardi* (Walia et al., 2003)
 - *Bursaphelenchus conicaudatus* (Kanzaki et al., 2000)

(De Ley and Blaxter, 2004).

2.2. Historie výskytu *B. xylophilus*

Pine wilt disease (PWD) – chřadnutí borovic bylo poprvé popsáno v jižním Japonsku, v přístavním městě Nagasaki v roce 1905, jako příčina byl uváděn podkorní hmyz (Suzyki, 2002). Sem bylo pravděpodobně zavlečeno v obalovém materiálu pocházejícím ze Severní Ameriky. (Duncan and Moens, 2006). Ztráty způsobené PWD dosáhly až milionu m³ dřeva ročně, a proto v roce 1950 začali v Japonsku eliminovat podkorní hmyz kácením napadených stromů, odkorňováním kmenů a pálením dřeva, tímto zásahem se ztráty snížili na 200–300 tisíc m³ dřeva ročně. Teprve v roce 1971, za použití Kochových postulátů, bylo za příčinu chřadnutí borovic označeno háďátko *Bursaphelenchus xylophilus* (Suzuki, 2002).

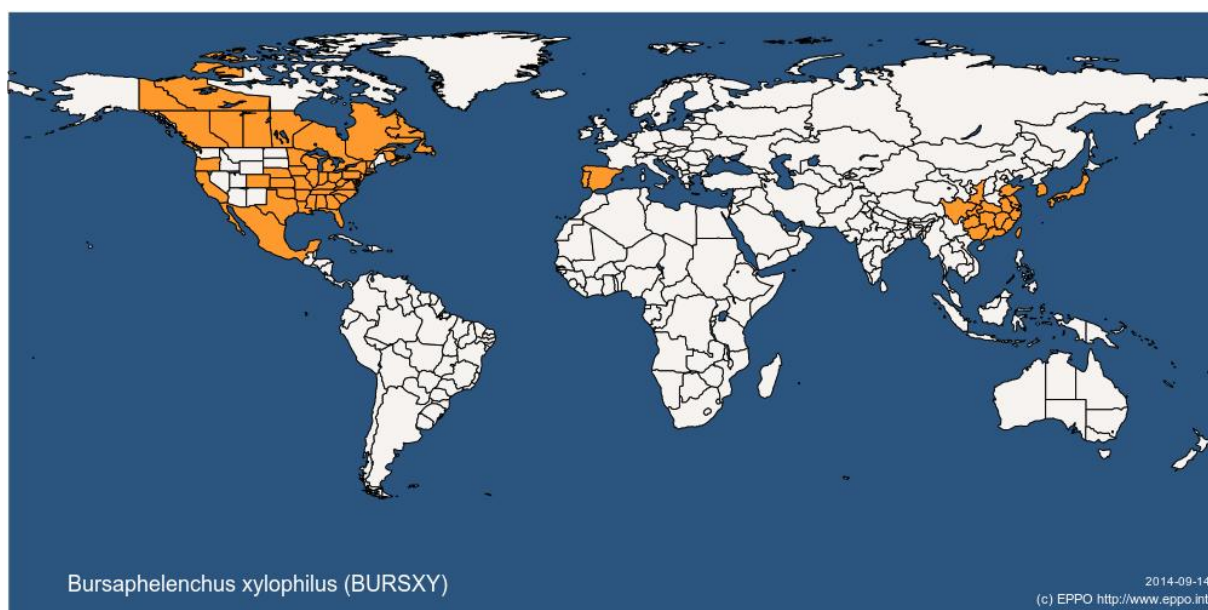
V roce 1931 bylo v Bogalusa v Louisianě háďátko *B. xylophilus* izolováno ze dřeva borovice bahenní (*Pinus palustris*). V roce 1934 bylo toto háďátko taxonomicky určeno jako *Aphelenchoides xylophilus*, který byl v roce 1970 přejmenován na *Bursaphelenchus xylophilus*, díky své typické burse a jiným znakům (Nickel et al., 1981). Na americkém kontinentě se háďátko vyskytuje v Mexiku, Kanadě a USA (Duncan and Moens, 2006).

Až v roce 1979 bylo PWD způsobené háďátkem borovicovým hlášeno v USA na druhích borovic, které byly v Missouri nepůvodní. Pozdější studie prokázaly, že *B. xylophilus* pochází ze Severní Ameriky a domácí porosty jím nejsou ohroženy (Cram and Hanson, 2004).

V 80. letech 20. století došlo k dalšímu rozšíření v Asii. V roce 1982 byl *B. xylophilus* objeven v Nanjingu, v Číně na borovici Thunbergově (*Pinus thunbergii*) a na borovici

Massonově (*Pinus massoniana*), v roce 1985 na Tchaj-wanu na borovici hustokvěté (*Pinus densiflora*) a na borovici luchenské (*Pinus luchuensis*) a v Pusanu, v Koreji v roce 1988 na borovici Thunbergově a na borovici hustokvěté (Suzuki, 2002).

První výskyt háďátka borovicového v Evropě byl zaznamenán v Portugalsku v roce 1999, a to na dvou lokalitách v Marateca a ve Vale de Landeira poblíž Lisabonu (Mota et al., 1999). Háďátko bylo v Evropě (Finsko, Německo, Švédsko) objeveno i v obalovém materiálu, který pocházel převážně z Číny a Severní Ameriky (Gaar, 2006), ale i z Portugalska (Anonym, 2008). Jako poslední oblast, do které bylo zavlečeno háďátko borovicové, uvádí EPPO nově objevenou lokalitu poblíž města Villanueva ve Španělsku, 80 km od portugalské hranice (Schröder et al., 2009) - obr. 1.



Obr. 1: Výskyt háďátka *Bursaphelenchus xylophilus* ke dni 14. 9. 2014 (www.eppo.int).

2.3. Biologie a bionomie

Životní cyklus háďátka *B. xylophilus* a jiných druhů tohoto rodu zahrnuje dvě rozdílné formy: primární stadium - fytofágní, disperzní a sekundární stadium - mykofágní, propagativní (Duncan and Moens, 2006). V obou formách se jako vektorů uplatňují tesařiči rodu *Monochamus* (Gaar, 2006).

2.3.1. Primární – disperzní stadium

Během primárního stadia je háďátko ve 4. klidovém larválním stadiu (tzv. dauer larvě) přeneseno na vzdušnicích mladých dospělců brouků rodu *Monochamus* na mladé výhony náchylných druhů jehličnanů (Duncan and Moens, 2006), které potřebují pro pohlavní dozrání. Háďátka osidlují výhony v místech poškození, které je způsobeno žírem. Tento způsob přenosu je označován za „primární“, protože zde dochází k primární infestaci hostitele (Dwinell and Mota, 2001).

4. larvální stadium se svléká v dospělce do 48 hodin po napadení hostitele (Cram and Hanson, 2004). Háďátka se živí parenchymatickými buňkami v pryskyřičných kanálcích, v tomto místě probíhá také rozmnožování (Dwinell and Mota, 2001).

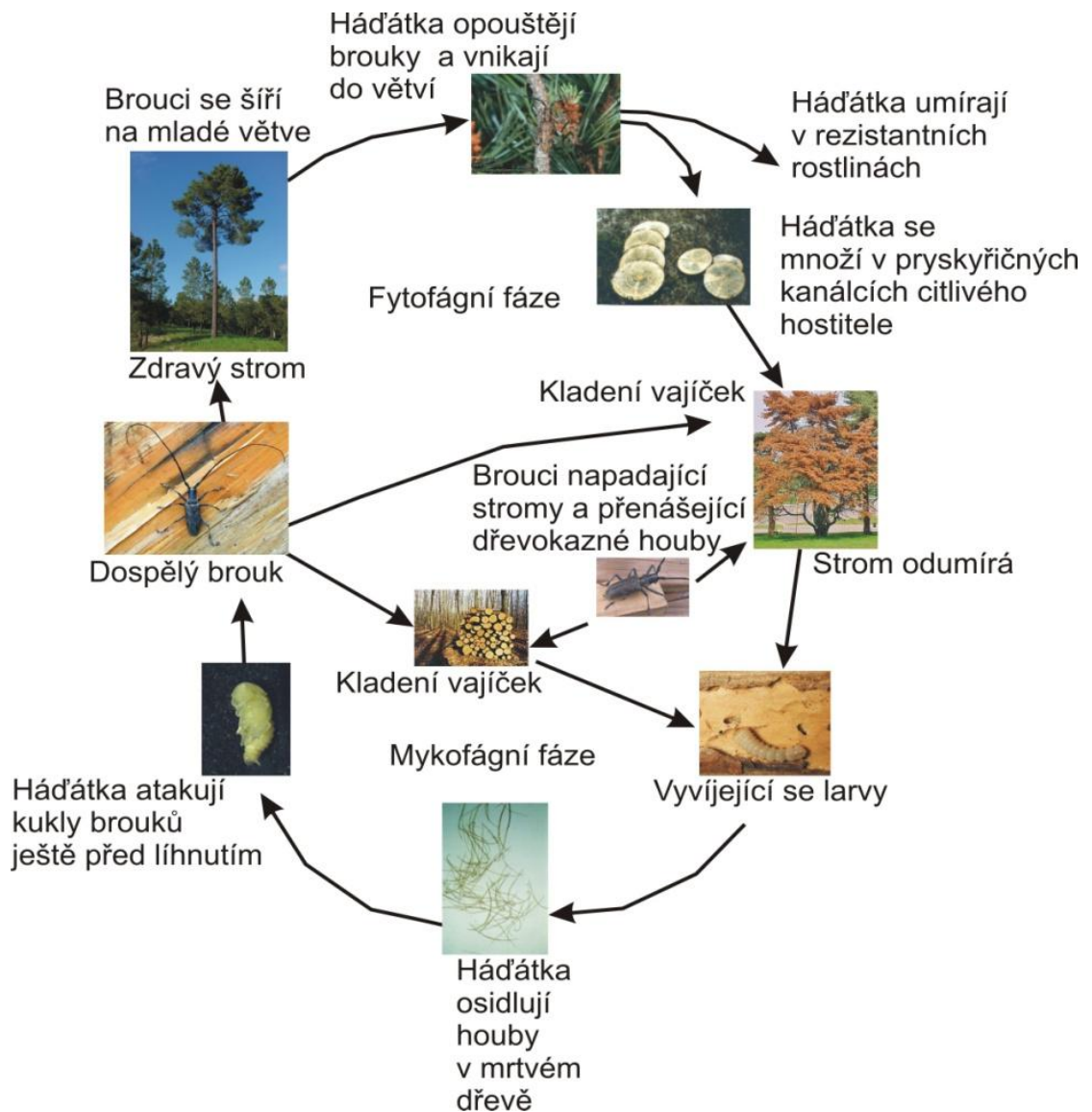
Na stromech jsou viditelné první symptomy již přibližně po třech týdnech, jsou to: usychání, žloutnutí, vadnutí jehlic a pokles produkce pryskyřice. Háďátka se v tuto dobu vyskytují v celém odumírajícím stromě (Duncan and Moens, 2006) a jsou ve veškerém bělovém dřevě větví, kmene i kořenů (Cram and Hanson, 2004). Vzhledem k nižší produkci pryskyřice, dochází ke snížení obranyschopnosti stromu a k jeho napadení dřevokazným hmyzem, jehož dospělci se zde páří. V podmínkách příznivých pro rozvoj háďátek dochází k odumření stromu již za 30 až 40 dní od počátku infestace a jejich počet je v řádu milionů jedinců (Duncan and Moens, 2006).

2.3.2. Sekundární – propagativní stadium

K sekundárnímu přenosu háďátek dochází v době kladení vajíček brouky rodu *Monochamus* na odumřelém, umírajícím nebo čerstvě pokáceném stromě. Dauer larvy migrují ze vzdušnic přenašeče do dřeva otvory po kladení vajíček (Dwinell and Mota, 2001). Háďátka se živí hyfami hub rodu *Ceratocystis* spp., které jsou modře zbarvené a jinými houbami, které napadají odumírající a odumřelé stromy (Cram and Hanson, 2004) a dřevem (Gaar, 2006).

Larvy 4. stadia (dauer larvy) se svlékají v dospělce, kteří se páří a samičky kladou vajíčka. Háďátka se rychle rozmnožují a vzniká směs všech vývojových stadií (Gaar, 2006). Háďátka mají svůj životní cyklus synchronizovaný s vývojem potomstva tesaříků. Pokud jsou životní podmínky méně vhodné, změní se 2. larvální stadium na zvláštní typ klidového stadia (pre-dauer larvu). To obvykle nastává, když je vektor v pozdním larválním stadiu nebo ve stadiu kukly. Háďátka ve 3. klidovém larválním stadiu (pre-dauer larvě) se shlukují v okolí

kukelních komůrek a zde přezimují (Duncan and Moens, 2006). Tyto larvy se svlékají a opět vzniká zvláštní typ larvy 4. stadia – dauer larva (Cram and Hanson, 2004), je to typ semi-klidového stadia známého zejména u střevních parazitů drobných přežvýkavců, např. rodu *Trichostrongylorus* (Zouhar a kol., 2007). Dospělci brouků, kteří se právě vylíhli, produkují oxid uhličitý, který je atraktantem pro háďátka, ty se shlukují na periteciích v okolí kukel a brouci si otěrem o ně zanášejí háďátka pod krovky a do vzdušnic. Pohlavně nevyzrálí dospělci brouků opouštějí spolu s háďátkou dřevo (Duncan and Moens, 2006) a začíná nový primární cyklus (obr. 2).



Obr. 2: Životní cyklus háďátka *B. xylophilus* (Zouhar a kol., 2007).

2.3.3. Hostitelský okruh

Hlavní hostitelskou rostlinou háďátka borovicového jsou stromy rodu *Pinus*. Pravděpodobně mohou všechny druhy borovic sloužit jako hostitel pro háďátka *B. xylophilus* (jeho sekundární životní cyklus), ale jen některé patří mezi náchylné, na kterých probíhá primární infestační cyklus (Duncan and Moens, 2006). Mezi náchylné druhy patří i převládající japonské druhy borovic *P. thunbergii*, *P. densiflora*, *P. luchuensis* (Suzuki, 2002). K dalším citlivým asijským druhům borovic patří *P. bungeana* a *P. massoniana*. V Evropě jsou velmi citlivé tři druhy *P. nigra*, *P. sylvestris* a *P. pinaster* (Duncan and Moens, 2006). Mezi hostitelské rostliny mohou patřit i jiné rody jehličnanů, jako je rod *Picea*, *Abies*, *Larix*, *Pseudotsuga* a *Cedrus* (Suzuki, 2002), ale většinou nebývají poškozeny. Jen v Americe bylo nalezeno několik případů odumření stromů rodu *Pseudotsuga* a *Picea* v důsledku napadení háďátkem *B. xylophilus* (Duncan and Moens, 2006). *Thuja plicata* se ukazuje jako rezistentní proti tomuto háďátku (Gaar, 2006).

2.3.4. Druhové složení a stav lesů ČR

Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství za rok 2013 uvádí, že plocha lesních pozemků na území České republiky mírně roste. V roce 2013 se výměra zvýšila meziročně o 1843 ha, což je vysvětlováno převisem nově zalesňovaných pozemků nad pozemky, které jsou z lesního fondu odnímány. Celková výměra lesů činila v roce 2013 2663731 ha (Anonym, 2014).

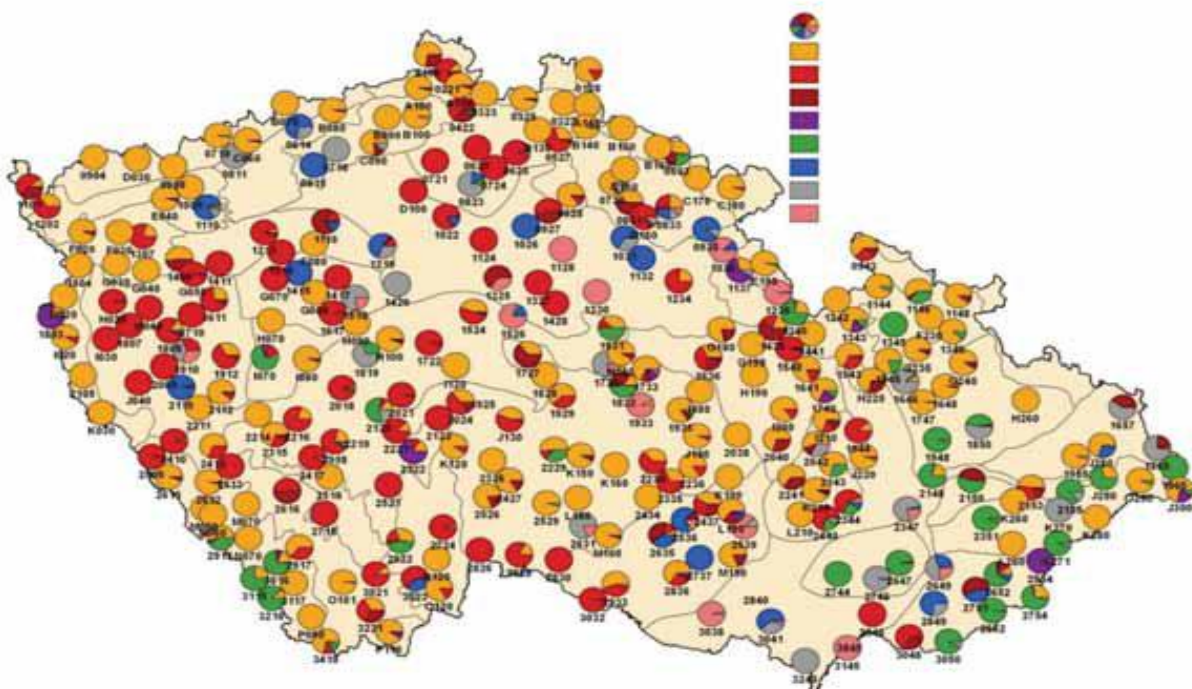
V posledních době dochází v jehličnatých porostech na území ČR k poměrně častému a náhlému vadnutí a usychání stromů. Činitelů, kteří se mohou podílet na tomto jevu, je poměrně mnoho. Nedostatek vláhy, s ním spojené oslabení stromů, poškození stromů dřevokaznými brouky, nejrůznější mykózy a nepochybně také globální znečištění ovzduší, které doprovází kyselá deště, má vliv na odumírání lesních porostů v ČR (Zouhar a kol., 2007).

Celková plocha jehličnatých dřevin se snižuje, např. plocha smrku poklesla oproti roku 2000 v průběhu 13 let o 69614 ha a výměra borovice klesla o 21438 ha, naopak stoupla výměra jedle a modřínu, ta stoupla oproti roku 2000, ale klesla naopak oproti roku 2012. Postupná změna ve skladbě lesa je výsledkem trvalého úsilí lesníků o změnu a zčásti i

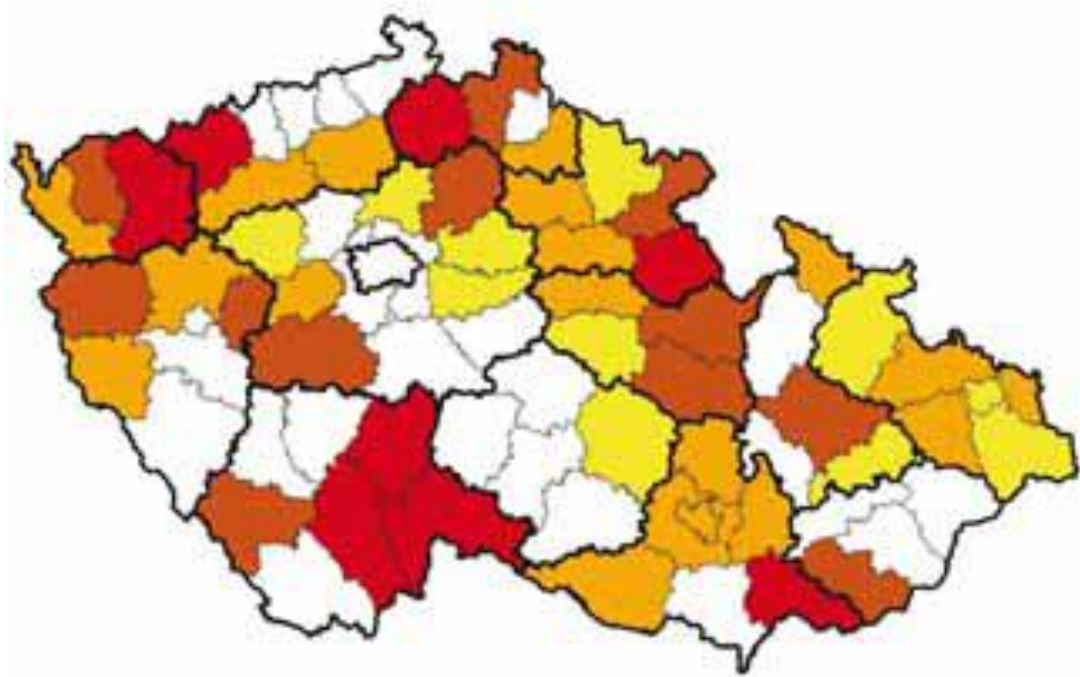
výsledkem cílené finanční podpory státu zaměřené na zabezpečení nezbytného podílu zpevňujících a melioračních dřevin při obnově lesních porostů.

Z listnatých dřevin se zvyšuje podíl dubu o 20419 ha buku o 47847, ale i jasanu a javoru, dochází také k většímu smíšení lesních porostů.

Jehličnaté porosty zaujímají z celkové plochy lesů 1894593 ha (72,9 %), z toho smrky 1327398 ha (51,1 %), borovice 431721 ha (16,6 %), modřiny 100917 ha (3,9 %), jedle 27509 ha (1,1 %) a ostatní jehličnaté stromy 7048 ha (0,3 %). Listnaté porosty mají plochu 674 048 ha (25,9 %) a zbylé 1,2 % výměry jsou holiny - obr. 3,4 (Anonym, 2014).



Obr. 3: Mapa druhového složení lesních porostů v ČR. Žlutá smrka, červená borovice, tmavě červená - modřín, fialová - jedle, zelená - buk, modrá - dub, šedá a růžová - ostatní dřeviny (Anonym, 2014).



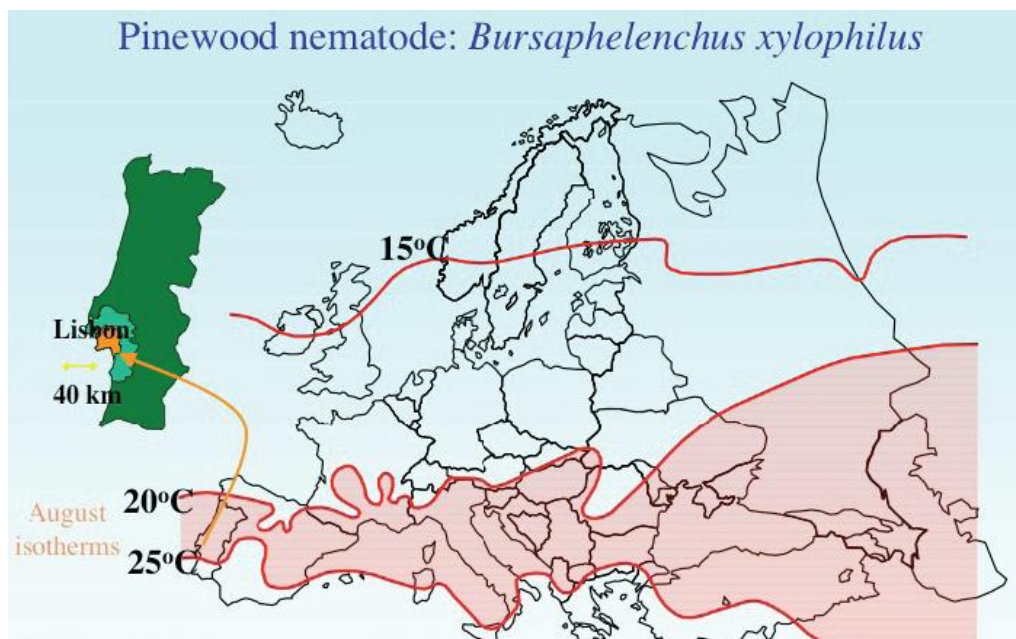
Obr. 4: Mapa výskytu sypavky borové. Bíle - nehlášeno, vzestupný výskyt od žluté přes okrovou hnědou a po červenou s nejvyšším výskytem (Anonym, 2014).

2.3.5. Podmínky výskytu *B. xylophilus*

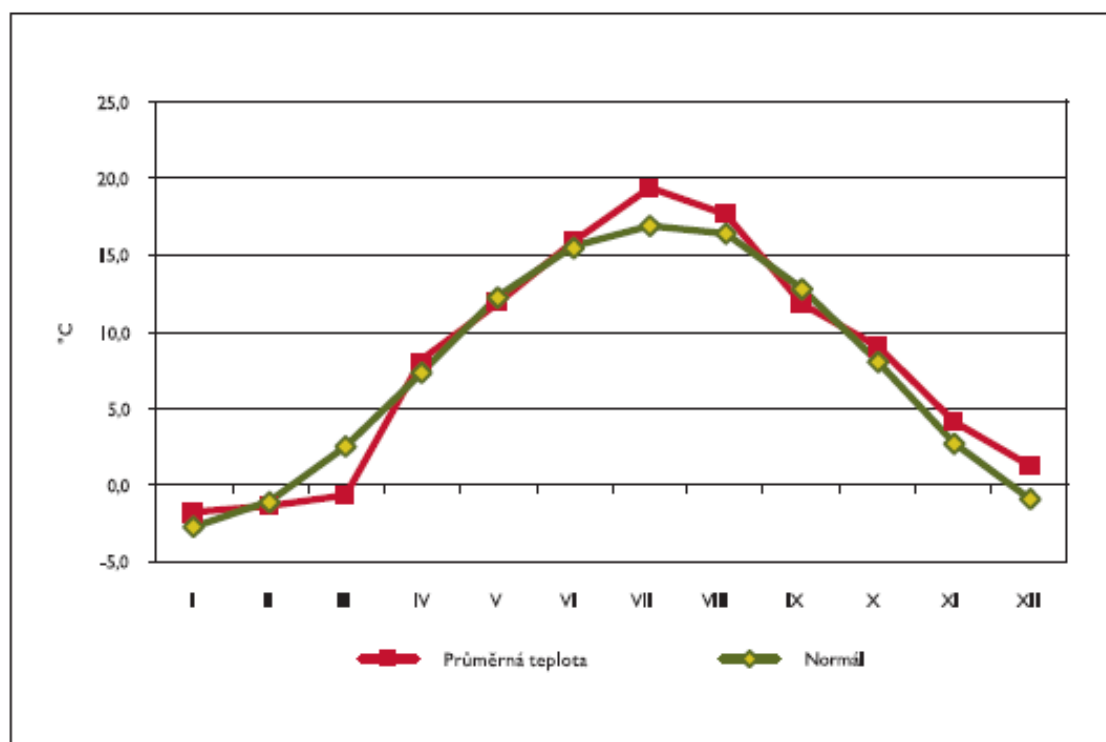
Pro vznik a další rozvoj pine wilt disease je nutné splnění třech nezbytných podmínek: 1. přítomnost agresivního škůdce (v případě háďátka borovicového současně s vektorem), 2. náchylný hostitel a 3. příznivé podmínky prostředí pro rozvoj poškození (Zhao et al., 2007).

Obecně se dá říct, že malá zásoba vody v půdě současně s vysokými teplotami napomáhají rozvoji chřadnutí borovic (Suzuki and Kiyohara, 1978). Závažné poškození způsobené háďátkem borovicovým je spojeno s vyššími teplotami a objevuje se v oblastech, kde průměrné letní teploty dosahují 20°C (Rutherford et al., 1992). V ČR se podle měření Českého hydrometeorologického ústavu pohybují průměrné letní teploty, tedy teploty v červenci a srpnu, v posledních letech těsně pod touto hodnotou - obr. 5,6 (Anonym, 2014).

Vývojový cyklus háďátka je relativně rychlý, závisí na teplotě, při 15°C trvá 12 dnů, při 20 °C 6 dnů a při 30 °C pouze 3 dny. Samice začínají klást vajíčka již od 4. dne. Líhnutí larev následuje za 26 - 32 hodin při 25 °C. Spodní teplotní hranice vývoje háďátka je 9,5°C. Schopnost reprodukce ustává při teplotě 40 °C, při této teplotě by populace vymřela do několika měsíců. S nárůstem teploty se stupňuje její letální účinek a z tohoto úkazu vychází i ochranná karanténní opatření (Gaar, 2006).



Obr. 5: Oblast s teplotami do 20 °C v letních měsících je oblast s vysokou pravděpodobností možného výskytu *B. xylophilus* - značena růžově, oblast s teplotami od 15 °C do 20 °C v letních měsících je oblast s možností výskytu *B. xylophilus* (Autor: M. Mota).



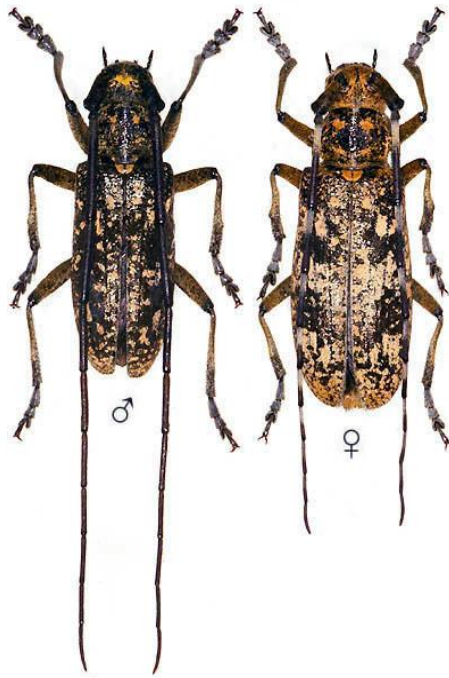
Obr. 6: Graf průměrných měsíčních teplot na území ČR v roce 2013 a normál (Autor: Český hydrometeorologický ústav).

2.3.6. Výskyt přenašečů v České Republice

Nejvýznamnější přenašeči háďátka *B. xylophilus* patří do rodu *Monochamus*. V ČR se vyskytuje celkem 5 druhů tohoto rodu, 3 z nich patří mezi druhy, u kterých byl přenos háďátka prokázán, *M. galloprovincialis*, *M. saltuarius* a *M. sutor* (Gaar, 2006). Schopnost přenosu háďátka borovicového byla prokázána i u dalšího tesaříkovitého brouka *Acanthocinus griseus*. Jeho výskyt na celém území Evropy i části Asie dává dobrý předpoklad pro zavlečení tohoto háďátka na další neexponované lokality (Zouhar a kol., 2007). U druhů *M. urussovi* a *M. sartor* nebyl přenos dosud prokázán, ale lze předpokládat, že kdyby došlo k jejich kontaktu s *B. xylophilus*, byli by přenosu schopni (Evans et al., 1996).

I když je celkové zastoupení těchto druhů tesaříků na našem území uváděno jako celkem řídké, jsou lokality, kde se vytvářejí silné populace nejen na zlomech a odlomech v mladých porostech, ale i na vývratech a zlomech v mýtných porostech zvláště na jižních expozicích například v Moravskoslezských Beskydách (Kula a kol., 2009). Většina druhů brouků preferuje jeden hostitelský druh jehličnanů, ale toto je silně ovlivněno konkrétní geografickou oblastí výskytu. Například *M. sutor* preferuje spíše smrky, ale populace žijící v severních zemích naopak borovici. Odlišnosti ale existují i na menších lokalitách, některé druhy upřednostňují spíše nížiny, jako *M. galloprovincialis* a naopak *M. sartor* osidluje vyšší nadmořské výšky (Schröder et al., 2009).

Druh *M. galloprovincialis* (Olivier, 1795), viz obr. 7, preferuje převážně borové lesy, méně často pak modřín a smrk. Samice kladou vajíčka do korunové části ještě stojících oslabených stromů. Pro kladení využívají i stromy čerstvě poražené, polomy a stromy poškozené ohněm. Ve střední Evropě se vyskytuje poddruh *M. galloprovincialis pistor* (German, 1818). Je poměrně hojný v borových porostech celého území naší republiky, ale pro skrytý způsob života a noční aktivitu uniká pozornosti.



Obr. 7: *Monochamus galloprovincialis pistor* (Photo © M.Hoskovec).

M. saltuarius (Gebler, 1830), viz obr. 8, vyhledává pro vývoj borovice a smrky, z nichž preferuje hlavně *Pinus rotundata* (borovice blatka). Místně se vyskytuje v jehličnatých porostech východních a jižních Čech, pouze místy je hojnější, v jižních Čechách především na Šumavě, Novohradských horách, Třeboňsku a ve východních Čechách kolem Hradce Králové.



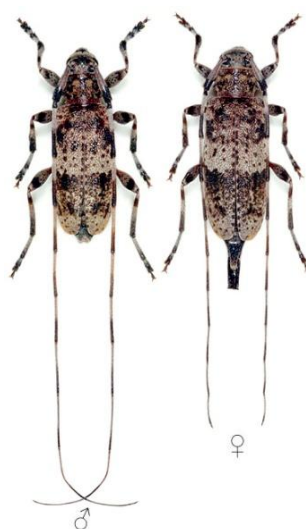
Obr. 8: *Monochamus saltuarius* (Photo © M.Hoskovec).

M. sutor (Linnaeus, 1758), viz obr. 9, osidluje především smrky, ale výjimkou nejsou ani ostatní jehličnany jako borovice, modříný a jedle. Imaga nalétají v červnu až srpnu na pokáceném smrkové dříví a na čerstvé vývraty. V oblasti Čech je tento druh celkem vzácný, hojněji bývá pozorován na Moravě. Hlavní lokality výskytu jsou Novohradské hory, Šumava, Krušné hory, Jeseníky a Beskydy.



Obr. 9: *Monochamus sutor* (Photo © M.Hoskovec).

A. griseus (Fabricius, 1792), viz obr. 10, se vyvíjí pod kůrou odumírajících či odumřelých stromů, nejčastěji v horních částech kmenů a větví borovic a smrků, vzácněji na jedlích. V nižších polohách je vázán na borové porosty, v nepůvodních smrkových porostech jsou lokality, kde je hojný a vystupuje až do vyšších horských poloh.



Obr. 10: *Acanthocinus griseus* (Photo © M.Hoskovec)

M. sartor (Fabricius, 1787), viz obr. 11, se vyskytuje především ve smrkových lesích vyšších poloh, může se vyskytovat až do 1800 m. n. m.. V nížinách se vyskytuje řidčeji, ale není vyloučeno, že bude zavlečen společně se dřevem. Hostiteli jsou pro něj převážně smrky, méně borovice a jedle v horských a podhorských oblastech. Samice kladou vajíčka do neodkorněných kmenů, do stromů, které jsou napadeny václavkou nebo poškozené požárem. Na území ČR je jeho výskyt celkem řídký, spatřován bývá v horských oblastech, jako jsou Šumava, Chebsko, Krkonoše, Beskydy a Vysoký Jeseník.



Obr. 11: *Monochamus sartor* (Photo © M.Hoskovec).

M. urusovi (Fischer von Waldheim, 1806), viz obr. 12 je příbuzným druhu *M. sartor* a na naše území byl introdukován poměrně nedávno s dovozem smrkového dřeva z Ruska. (Heyrovský a Sláma, 1992; Zahradník, 2001).



Obr. 12: *Monochamus urusovi* (Photo © M.Hoskovec).

2.4. Příznaky napadení

Vývoj příznaků můžeme rozdělit do dvou etap následujících po napadení stromu háďátky. Je to, rané stadium a pokročilé stadium (Suzuki, 2002).

2.4.1. Raná fáze

Raná fáze je provázena cytologickými změnami v parenchymatických buňkách xylému. V mnoha cévicích se utvářejí kavitace a embolie. Tyto příznaky se objevují jak na hostitelských rostlinách s háďátky kompatibilními tak nekompatibilními. Nárůst populace háďátek není v nepříznivých podmínkách možný, proto je tato fáze označována za latentní (Suzuki, 2002).

2.4.2. Pokročilá fáze

Na počátku pokročilého stadia začíná být viditelné snížení produkce pryskyřice, žloutnutí (Suzuki, 2002) a vadnutí (Duncan and Moens, 2006) 2-3 letých jehlic, které je doprovázené poklesem transpirace. Tento jev je specifický pro háďátko borovicové a je doprovázen zvýšenou produkcí etylénu. Odumírání kambia a kavitace postupují do větší části vnějšího xylému a tím zapříčiňují vodní deficit, snížení transpirace a fotosyntézy. Vodní stres podporuje zvyšování populační hustoty háďátek. Fyziologický stav vody v napadeném stromě a populační hustota háďátek jsou brány za klíčové faktory pro rozvoj „onemocnění“ – napadení (Suzuki, 2002). Strom po napadení háďátkem borovicovým může odumřít (Duncan and Moens, 2006). Viditelné symptomy se mohou objevit i jen na části koruny, nebo na jedné větvi (tzv. „praporec“), příznaky jsou později lokalizovány i na celém zbytku koruny (Gaar, 2006). Lokalizace prvního výskytu příznaků je závislá na místě napadení vektory. Při prvních viditelných příznacích v koruně, nelze předpokládat výskyt háďátka i ve kmeni stromu, je tedy nutné přizpůsobit metody monitorování. Stromy napadené háďátkem v Portugalsku odumírají, dle pozorování, zpravidla během jedné sezóny. Lze tedy předpokládat, že vývoj bude obdobný i v ostatních částech Evropy. Vektoři háďátek, brouci rodu *Monochamus*,

napadají většinou pokácené nebo odumírající stromy. Jejich larvy vytvářejí chodbičky a rýhy v bělovém dřevě pod kůrou. Přítomnost těchto brouků i příznaků jejich žíru může být nepřímým symptomem přežívání háďátek rodu *Bursaphelenchus* (Zouhar a kol., 2007).

2.5. Hospodářský význam

Největší ekonomické škody, které háďátka borovicové způsobuje, jsou v Japonsku. Od konce 2. světové války zničilo již více než 26 milionů m³ dřeva, ze kterých by se, pro představu, mohlo postavit 1,7 milionu japonských dřevěných domů. Při objevení PWD po roce 1905 dosahovaly škody až 1 milionu m³ dřeva ročně. Předpokládalo se, že původcem škod jsou dřevokazní brouci a proto byla v roce 1950 přijata opatření na jejich likvidaci, spočívající v kácení stromů, odkorňování kmenů a pálení dřeva zamořeného kůrovci. Díky těmto zásahům klesly škody na přibližně 200 – 300 tisíc m³ dřeva ročně. V 70. letech došlo opět k nárůstu množství poškozeného dřeva a v roce 1979 již dosahovalo 2,4 milionu m³ dřeva (Suzuki, 2002).

V Portugalsku představuje lesní hospodářství velmi významnou složku národní ekonomiky. Podílí se 12 % na průmyslovém hrubém domácím produktu, 3,2 % na celkovém hrubém domácím produktu, 5 % na národní zaměstnanosti a 10 % na zahraničním obchodu. Borovice přímořská (*Pinus pinaster*) je důležitým producentem pryskyřice a dřeva a má důležitou funkci ochrany mořského pobřeží. Také pinie (*Pinus pinea*) hraje důležitou roli v ekonomice, kde se podílí na vývozu velice kvalitních piniových semínek. Tak obrovské ekonomické a ekologické dopady vyplývají z introdukce takového škůdce, jakým je háďátka borovicové, i když pokud je známo, k náchylným druhům borovic patří jen borovice přímořská (Webster and Mota, 2008).

Ve Spojených státech amerických způsobuje háďátka borovicové škody převážně na nepůvodních druzích borovic zejména na borovici lesní (*Pinus sylvestris*). Domácí druhy poškozují méně (Cram and Hanson, 2004).

2.6. Ochrana rostlin proti háďátku *B. xylophilus*

Ochrana rostlin proti háďátku borovicovému je pouze preventivní. Pokud je strom již jednou napaden, neexistuje žádná léčba (Cram and Hanson, 2004). Opatření pro kontrolu

hád'átka borovicového jsou zaměřeny na ovlivnění trojúhelníku napadení borovice – hád'átka – tesařík. V historii se ukázalo jako efektivní kácení, odkornování a následné pálení napadených borovic, ale tyto metody vyžadovali velké množství pracovních sil. Později, s rozvojem metod chemické ochrany, byly lesy ošetřovány organofosfátovými insekticidy pro přímou likvidaci tesaříků. V Japonsku byla zkoušena i injekce chemických přípravků do kmene stromu, ale ke snížení infestace nedošlo (Suzuki, 2002). Ve Spojených státech amerických je doporučeno nevysazovat nepůvodní borovice na území, kde v létě dosahuje průměrná teplota nad 20 °C. Pokud již vysazeny jsou, doporučuje se podpořit vláhový režim závlivkou, aby nedocházelo k vodnímu stresu (Cram and Hanson, 2004). Hlavní riziko infestace nastává v době mezi kácením a odvozem dřeva z lesa (Duncan and Moens, 2006). Napadení se lze bránit odkorněním pokácených kmenů a načasováním těžby mimo období kladení vajíček vektory (zpravidla od července do září) (Cram and Hanson, 2004), nebo chemickým ošetřením dřeva v lese (Suzuki, 2002). Probíhající výzkum se snaží objevit alternativní způsoby ochrany, do kterých patří šlechtění rezistentní klonů borovic, využití hmyzích atraktantů (Duncan and Moens, 2006) a indukovaná rezistence neagresivními populacemi *B. xylophilus* (Kosaka et al., 2001).

Jako preventivní opatření proti rozšiřování na nové lokality se doporučuje tepelné ošetření dřeva a kontrola dovážených jehličnanů z oblastí s výskytem hád'átka (Schrader and Unger, 2003). Vědci z Kanady, Spojených států a Evropské unie ve své studii došli k závěru, že tepelné ošetření dřeva na teplotu v jádře 56 °C po dobu minimálně 30 minut likviduje hmyzí vektory i hád'átka. Pasterace dřeva je nyní primární ochranou pro dovoz řeziva i obalového materiálu. Zkoumáno bylo i záření, fumigace a moření (Dwinell and Mota, 2001). Fumigací lze účinně usmrtit hád'átka ve štěpce (Cram and Hanson, 2004). Fumigace je, ale povolena jen v některých státech (Gaar, 2006). V roce 2008 oznámilo Švédsko a Finsko nalezení hád'átek *B. xylophilus* v dřevěném obalovém materiálu z Portugalska, a to jak v materiálu označeném, tak neoznačeném dle standardu ISPM 15. V listopadu 2008 zaznamenalo Španělsko výskyt hád'átka borovicového v kulatině původem z Portugalska (Kapitola a kol, 2009)

V červenci roku 1985 umístila EPPO hád'átka *B. xylophilus* na seznam karanténních škůdců A1 (Cao et al., 2005). Až do roku 1999, kdy došlo v Portugalsku k napadení hád'átkem, byla opatření proti hád'átku borovicovému v Evropě pouze preventivní. Po zavlečení hád'átka byla přijata rostlinolékařská opatření spočívající v úplném vyhubení hád'átka borovicového na území výskytu a v rozsáhlém průzkumu v ostatních členských státech Evropské unie (Schrader and Unger, 2003). V roce 2006 byla v Portugalsku do praxe

zavedena nová karanténní opatření proti hád'átku *B. xylophilus*. Kolem napadených ploch byly pro kontrolu vymezeny a označeny 3 km široké pásy, v těchto pásech byl eradikován porost *Pinus pinaster*. Zavedením tohoto opatření se nepodařilo zastavit postup hád'átku *B. xylophilus*, o dva roky později bylo hád'átko borovicové objeveno i ve vnitrozemí Portugalska (Mota and Vieira, 2008).

V České republice nebyl dosud *Bursaphelenchus xylophilus* identifikován (Gaar, 2006).

2.7. Současný postup při provádění kontrol v ČR

Monitoring hád'átek rodu *Bursaphelenchus* je zaměřen na hledání lokalit, které druhovým složením porostů kopírují výskyt hostitelských rostlin a dále pak na dřevozpracující podniky v jejich blízkosti. Je nutné sledování symptomů odumírání a chřadnutí borovic. V neposlední řadě je nutné kontrolovat veškerý dřevní materiál importovaný na území ČR a to i v případě, že se jedná o dřevo ve formě palet (Zouhar a kol., 2007). Díky tomu, že v rámci volného trhu v EU se dodávky centrálně neevidují, je nutné dřevěný obalový materiál přemístěný do ČR z Portugalska vyhledávat aktivně. Jako primární možnost se jeví kontaktovat dovozce, prodejce a přepravce. Lze využít již dříve kontaktované sklady a překladiště, kde se zjišťuje, jestli zde nejsou přítomny dodávky s obalovým materiálem z Portugalska.

Vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že splnění požadavků ISPM 15 pro náchylné dřevo a kůru nezaručuje, aby byl materiál prostý hád'átek, je třeba jej považovat za podezřelý z napadení hád'átkem *B. xylophilus*. Odběr vzorků je prováděn bez ohledu na to, zda jsou či nejsou patrné příznaky napadení dřeva škodlivými organismy (Kapitola a kol., 2009).

V roce 2009 bylo v České Republice podrobena průzkumu 111 lesních lokalit a 225 rizikových lokalit v okolí celních skladů, míst pěstování jehličnanů, dřevařských podniků atd. Výsledky laboratorních rozborů nepotvrdily přítomnost hád'átka borovicového ani v jednom ze vzorků (Strachotová, 2010).

2.7.1 Odběr vzorků dřeva

Pro účely monitorování háďátek rodu *Bursaphelenchus* lze odebírat vzorky dřeva několika různými způsoby. Schröder et al. (2009) doporučují odebírat vzorky z různých míst na stromě, bez vynechání korunové části a s preferováním míst, kde je zřetelná aktivita přenašečů. Pro usnadnění detekce háďátka borovicového je doporučeno v místě odběru odstranit kůru stromu k zamezení kontaminace vzorku jinými saprofágními či mykofágními háďátky.

Z živých stromů je vhodné odbírat vzorky pomocí dláta. Tento způsob odběru je šetrnější k háďátkům a umožňuje i delší skladování vzorků. Dlátem se odebírá vždy čisté dřevo bez kůry a to kousky dlouhé cca 5-10 cm. V případě, že jsou příznaky velmi rané a háďátka ještě nedosáhla kmene stromu, je vhodné strom porazit a přímo odebrat příznakové větve (Zouhar a kol., 2007).

Pro detekci háďátka borovicového v odumřelých stromech se využívá i další nářadí, jako jsou různé vrtačky a pily. Při odběru pomocí tohoto nářadí však hrozí mechanické poškození háďátek. Vrtačka nebo řetězová pila, respektive vrták a řetěz pily, navíc generují při vyšších rychlostech velké množství tepla, které může ohrozit živá háďátka, proto je třeba s nimi zacházet velmi opatrně. Při použití vrtačky je nutné vyvrtat více děr k získání dostatečného množství vzorku pro detekci. V současnosti je uváděno ve standardu EPPO, při popisu odběru vzorků, použití řetězové pily (Schröder et al., 2009).

Tyto způsoby odběru vzorků lze použít i pro řezivo nebo pro další typy dřevěného materiálu. Pro odběr z obalového materiálu se používá šetrnějších nedestruktivních metod, vrtání nebo vysekávání. Důležité je získání co nejhrubších třísek. K vrtání se používá ruční akumulátorová vrtačka s vrtákem o průměru 20–30 mm, pro předcházení tepelnému poškození háďátek jsou při odběru nastaveny co nejnižší otáčky. Může se též používat ruční kolovrátek. Vrtá se v místě, kde dojde k co nejmenšímu narušení funkčnosti obalu. Pro vysekávání je vhodné použít dláto a gumovou palici.

Pokud lze v dodávce rozlišit obaly novější od starších, odebírají se vzorky přednostně z novějších obalů, neboť je u nich vyšší pravděpodobnost přežívání háďátka borovicového.

Dřevo, na němž je zjištěno napadení hmyzími škůdci nebo původci houbových chorob, je odebíráno přednostně v místech s příznaky takového napadení. Pozornost při tomto odběru bývá zaměřena na příznaky, které mohou souviset s přítomností háďátka, jako jsou požerky a výletové otvory tesaříků rodu *Monochamus* a modré zbarvení dřeva vzniklé v důsledku napadení houbami například rodu *Ceratocystis* (Kapitola a kol., 2009).

2.7.2. Extrakce háďátek

V jednotlivých vzorcích dřeva jsou háďátka v různých vývojových stádiích. Před samotnou extrakcí je tedy dobré vzorky dřeva mírně ovlhčit, uzavřít v plastových sáčkách a po dobu 2-3 týdnů skladovat při 25 °C. Tyto podmínky jsou dostačující pro dokončení vývojového cyklu a nárůst populace *B. xylophilus* ve vzorcích (Schröder et al., 2009).

Odebrané vzorky dřeva se musí před samotnou extrakcí naštípat na drobné třísky, při tomto tvaru jsou háďátka ve vzorku nejméně poškozena (Zouhar a kol., 2007).

Živá háďátka bývají izolována ze vzorků dřeva nejčastěji metodou Baermannovy nálevky (Southey, 1986), ale existují i její různé modifikace a další metody. Penas et al. (2002) zkoušeli různé metody plavení háďátek. Vhodnost použití konkrétních metod izolace je závislá na množství dřevního vzorku. Baermannova nálevková metoda je vhodná pro extrakci menšího množství vzorků. Naopak pro větší objem dřevních vzorků se osvědčila metoda plavicích misek. Tato metoda se osvědčila i z hlediska náročnosti háďátek na kyslík (Zouhar a kol., 2007).

2.8. Druhy rodu *Bursaphelenchus* v České republice a sousedících zemích

V Evropě se vyskytuje více druhů háďátek z rodu *Bursaphelenchus*. Jejich hostitelský okruh je velmi široký, napadají převážně dřeviny, a to jak jehličnaté, tak listnaté. V Německu bylo zatím objeveno přibližně 30 druhů z tohoto rodu například: *B. chitwoodi*, *B. crenati*, *B. cryphali*, *B. eggersi*, *B. eidmanni*, *B. eremus*, *B. idius*, *B. incurvus*, *B. hofmanni* a *B. mucronatus*, v Rakousku bylo nalezeno 6 druhů: *B. abietinus*, *B. eggersi*, *B. fraudulentus*, *B. hofmanni*, *B. leoni*, *B. sexdentati*, na Slovensku 7 druhů: *B. cryphali*, *B. eidmanni*, *B. idius*, *B. nuesslini*, *B. piniperdae*, *B. poligraphi*, *B. sachsi* a v Polsku 4 druhy: *B. glochis*, *B. mucronatus*, *B. naujaci*, *B. pinophilus*, většina z nich je přenášena hmyzími vektory. V ČR byly zatím objeveny tyto druhy: *B. eremus*, vyskytující se na listnatých druzích, patřící do skupiny *piniperdae*, *B. fungivorus*, patřící do skupiny *hunti*, *B. hofmanni*, patřící do skupiny *piniperdae*, *B. mucronatus*, patřící do skupiny *xylophilus* (Ryss et al., 2005), *B. vallesianus*, patřící do skupiny *piniperdae* (Gaar et al., 2006), *B. borealis* patřící do skupiny *borealis* a *B. pinophilus* patřící do skupiny *piniperdae* (Čermák et al., 2013), které svůj životní cyklus

uskutečňují na jehličnanech (Ryss et al., 2005).

2.9. Metody diagnostiky

2.9.1. Metody diagnostiky na úrovni morfologických a anatomických charakteristik

Pro determinaci a detekci háďátek rodu *Bursaphelenchus* na úrovni morfologických a anatomických znaků je vhodné použít jak preparátů fixovaných, tak nativních. Lze doporučit fixaci pomocí roztoku TAF (Courtney et al., 1955): 7 ml 40% formalínu, 2 ml trietanolaminu, 91 ml destilované vody. TAF vykazuje velmi dobré výsledky co do zřetelnosti detailu i vysoké stability sloučeniny. Obsažený trietanolamin neutralizuje volnou kyselinu mravenčí a svými hygroskopickými vlastnostmi háďátka během výparu fixativu nevysychají. Háďátka se pomocí nematologické jehly přemístí do 20 μ l vody (cca 20 ks), 2 ml fixativu se zahřeje na 80 °C a pak pomocí Pausterovy pipety přepipetuje do mikrozkušavky s háďátko. Takto připravená háďátka se uloží při pokojové teplotě minimálně na 10 dnů. Takto lze fixovaná háďátka skladovat i po několik let. Tímto způsobem fixovaná háďátka lze použít pro přípravu permanentních glycerolových preparátů. Na podložní sklíčko s jamkou se napipetuje 10% glycerol a do něj se přemístí háďátka, všechna háďátka musí být pod hladinou glycerolu. Podložní sklíčka s jamkou se inkubují při 60°C až do doby odpaření maximálního množství vody, tento fakt se ověří vizuálně (glycerol zhoustne na koncentraci 99 %). V průběhu odpařování vody je nezbytné ověřovat množství glycerolu v jamce a případně jej doplnit, tak aby nedošlo ke zničení háďátek. Připraví se podložní sklíčka pro permanentní preparáty, napipetuje se na ně cca 5 μ l 99% glycerolu a inkubují se při 80 °C 15 minut. Do těchto kapek se přemístí 2 ks háďátek z glycerolu, po stranách se dá přiměřené množství směsi parafínu a včelího vosku (1:4), přiloží se krycí sklíčko a preparát se přemístí do 80 °C. Inkubace probíhá až do úplného rozpuštění směsi parafínu a včelího vosku a krycí sklíčko zcela zakryje háďátka. Preparát je připraven pro světelnou mikroskopii a uložení do sbírky. Glycerolové preparáty se skladují vždy vodorovně bez přístupu světla (Zouhar a kol., 2007).

Pro důkladnější pozorování detailů lze použít kromě světelného mikroskopu rastrovací elektronový mikroskop. Pro chemickou fixaci se háďátka uloží ve zkumavkách s 3% glutaraldehydem rozpuštěném v 0,05 M fosfátovém pufru pH 6,8, při 22 °C na 2-24 hodin. Následně se háďátka dehydratují v etanolu a suší kapalným oxidem uhličitým. Pevné vzorky

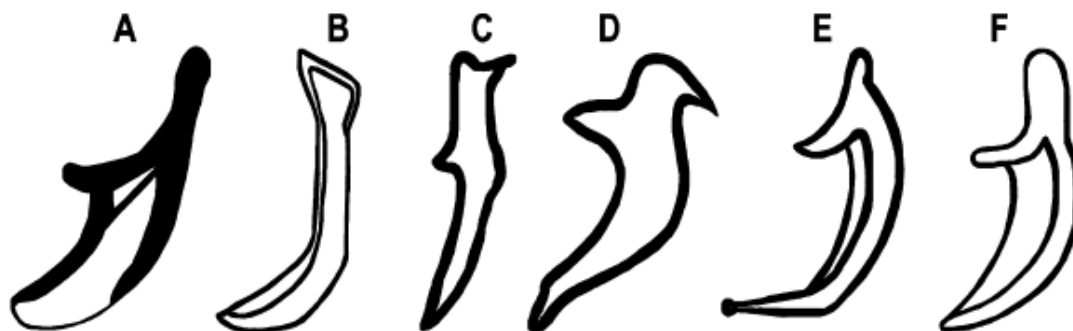
se mohou pokovovat směsí paladia a zlata. Takto připravené vzorky jsou připraveny pro rastrovací elektronovou mikroskopii (Nickel et al., 1981).

2.9.1.1. Základní morfologicko-anatomické znaky háďátek rodu *Bursaphelenchus*

Háďátka rodu *Bursaphelenchus* mají štíhlé tělo, které se po zahřátí stočí ventrálním směrem. Jsou 0,3- 1,4 mm dlouhá, mají 2-6 laterálních rýh, které nejsou u některých druhů popsány. Cefalické papily mají dobře vyvinuté, rozdělené na šest stejných částí, vyjma *B. lini* a *B. eproctatus*, kteří mají dvě laterální papily užší než zbylé čtyři, v posteriorní části jsou výrazně zaškrčené, *B. platzeri* má zaškrčení slabé. Stylet je velmi dobře vyvinutý, 12-20 μm , v některých případech až 26 μm dlouhý. Kužel styletu se zužuje a násadec styletu je robustní, na bázi zduřelý, u *B. lini* není báze zduřelá (Kanzaki, 2008). Procorpus je cylindrický (Zouhar a kol., 2007) přecházející ve střední bulbus, který je svalnatý, kulovitý nebo vejčité protažený. Laloky jícnových žláz jsou štíhlé, dlouhé 3-4 šířky těla, dorzálně se překrývající (Nickel et al., 1981). Nervový prstenec je umístěn ve vzdálenosti jedné šířky těla od středního bulbu (Zouhar a kol., 2007). Exkreceční póry jsou u většiny druhů nápadné, umístěné variabilně, většinou anteriorně ke střednímu bulbu a posteriorně k nervovému prstenci. Samičí reprodukční orgány jsou umístěny monodelficky (Kanzaki, 2008). Vyuvíjející se oocyty jsou uspořádány většinou ve dvou nebo třech řadách, u menšího počtu druhů pouze v řadě jedné (Zouhar a kol., 2007). Vulva je různorodá a nachází se v 70-80 % délky těla (Kanzaki, 2008). Vulvální pysky u některých druhů nepatrně přecházejí, anteriorní pysk překrývá vulvu kaudálním směrem a vytváří tak vulvální záklopku (Zouhar a kol., 2007), ta může mít různou velikost. Většina druhů má pravděpodobně dvou- až tří- buněčnou spojku mezi děložou a děložním váčkem. Ten je většinou dobře vyvinutý, dlouhý 3-6 šířek těla, zabírající více než 50 % vzdálenosti mezi vulvou a řitním otvorem, u některých druhů může být velmi krátký. Samičí ocas je velmi variabilní od krátkého po dlouhý, se zaobleným nebo špičatým koncem, u některých druhů zakončen hrotem. Samčí spikula je častěji dělená, u některých druhů obě části splývají. Délka spikuly se liší, tvar je většinou obloukovitý (Kanzaki, 2008), u některých druhů je zakončena typickým diskovitým rozšířením zvaným „cucullus“ (Nickel et al., 1981). Na konci ocasu se nachází variabilní kutikulární struktura ve formě plachetky (Zouhar a kol., 2007). Samčí kaudální papily se nacházejí poblíž řitního otvoru (Nickel et al., 1981), jejich počet je rozdílný od 4 - ve 2 párech, po 11 - jedna samostatně a 5 párů (Kanzaki, 2008).

2.10.1.2. Rozlišení jednotlivých skupin v rámci rodu *Bursaphelenchus*

Rod *Bursaphelenchus* se rozděluje na základě morfologických struktur do šesti skupin podle druhů *B. hunti*, *B. aberrans*, *B. eidmanni*, *B. borealis*, *B. xylophilus* a *B. piniperdae* (Ryss et al., 2005). Braasch (2001) rozděluje rod *Bursaphelenchus* do pěti skupin podle druhů *B. eggersi*, *B. leoni*, *B. xylophilus*, *B. sexdentati* a *B. hofmanni*, které nejsou tak homogenní jako skupiny předešlé. Pět druhů rodu *Bursaphelenchus* je unikátních a nemohou být zařazeny do žádné skupiny, jsou to: *B. abietinus*, *B. fungivorus*, *B. idius*, *B. cryphali* a *B. tetratospicularis*. Počet laterálních rýh je základním ukazatelem pro rozlišení do skupin, dalšími pomocnými znaky jsou tvar spikuly, přítomnost a velikost vulvální záklopky a tvar samičího ocasu (Braasch, 2001). Podle Ryss et al. (2005) jsou jednotlivé druhy do skupin řazeny jen dle tvaru spikuly (obr. 13).



Obr.13: Tvary spikuly typické pro rod *Bursaphelenchus*. A: skupina *B. hunti*, B: skupina *B. aberrans*, C: skupina *B. eidmanni*, D: skupina *B. borealis*, E: skupina *B. xylophilus* a F: skupina *B. piniperdae* (Ryss et al., 2005).

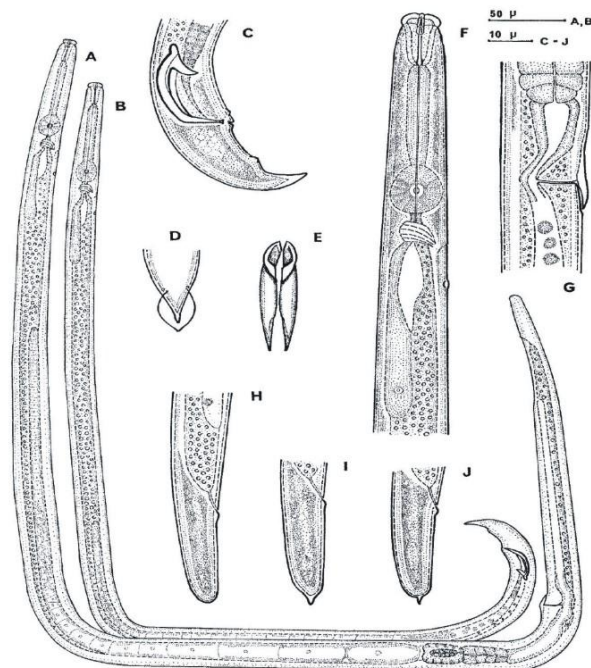
Druhy skupiny *B. xylophilus* lze snadno odlišit od ostatních skupin: 1) přítomností čtyř laterálních rýh, 2) tvarem spikuly (Braasch, 2001), která je zakřivená a zakončena diskovitým zploštěním, zvaným „cucullus“ (Mota et al., 1999), 3) umístěním kaudálních papil (počet je 7, 1 nepárová před konečником, 1 pár na konečniku a 2 páry za konečником před bursou) a 4) přítomností velké vulvální záklopky. V rámci této skupiny se mohou druhy rozlišovat podle tvaru samičího ocasu. Samice *B. xylophilus* (obr. 14) má konec ocasu zaoblený, pouze v Severní Americe se vyskytují samice, které mají konec ocasu ukončen hrotem. Samice *B. mucronatus* (obr 15) mají ocas vždy zakončen hrotem (Braasch, 2001). Do této skupiny patří 10 druhů: *B. conicaudatus*, *B. mucronatus*, *B. fraudulentus*, *B. crenati*, *B. baujardi*, *B. kolymensis*, *B. xylophilus*, *B. eroshenkii*, *B. luxuriosae* a *B. abruptus* (Ryss et al., 2005). Dle Braasch (2001) patří do této skupiny jen *B. xylophilus*, *B. mucronatus* a *B. fraudulentus*.

Začlenění některých druhů do skupiny *B. sexdentati* je někdy obtížné kvůli podobnosti tvaru spikuly s druhy ve skupině *B. eggersi*. *B. leoni* je snadno odlišitelný díky dlouhému, tenkému ocasu samice a tvaru spikuly. *B. abietinus* má dvě laterální rýhy, 6 kaudálních papil (2 páry nad konečником, 1 pár pod konečником těsně před bursou) a charakteristickou spikulu a malou vulvální záklopku. Skupina *B. eggersi* (zahrnuje druhy *B. eggersi*, *B. tusciae* a *B. glochis*) má tři laterální rýhy, sedm kaudálních papil (1 nepárová a 1 pár nad konečником, 1 pár pod konečником a 1 pár na burse), rovnou spikulu a malou vulvální záklopku, samičí ocas je stočen k břišní straně). Skupina *B. leoni* (zahrnuje druhy *B. leoni*, *B. silvestris* a *B. eidmanni*) má také tři laterální rýhy, počet a umístění kaudálních papil je také obdobné jako u skupiny *B. eggersi* (jen u *B. silvestris* není známa nepárově uložená papila), spikula má dorsálně ohnutý condylus, velkou vulvální záklopku a dlouhý a tenký samičí ocas. Skupina *B. hofmanni* (zahrnuje *B. hofmanni*, *B. hellenicus*, *B. sachsii*, *B. nuesslini*, *B. pinastris*, *B. chitwoodi* a *B. paracorneolus*) má sedm kaudálních papil (ne u všech je známa jedna nepárová) s variabilním rozmístěním okolo konečniku, variabilním tvarem spikuly a malou vulvální záklopkou. Skupina *B. sexdentati* (zahrnuje *B. sexdentati*, *B. poligraphi*, *B. pinophilus*, *B. incurvus*, *B. naujaci*, *B. piniperdae* a *B. borealis*) má čtyři laterální rýhy, sedm kaudálních papil (1 nepárová před konečником, 1 pár na konečniku, 1 za konečником a 1 pár na burse), spikula je zakřivená a relativně kompaktní, malá vulvální záklopka a protuberance za vulvou. *B. fungivorus* má také čtyři laterální rýhy, umístění a počet kaudálních papil je stejný jako u skupiny *B. xylophilus*, spikula má charakteristický tvar a je kompaktní, samice nemají vulvální záklopku a jejich ocas je dlouhý, zužující se a ventrálně zatočený. *B. idius* má šest laterálních rýh sedm kaudálních papil (1 nepárovou a 1 pár před konečником, jeden pár těsně za konečником a 1 pár před bursou), jemnou spikulu a vulvální záklopka není známa. Neznámý počet laterálních rýh mají *B. cryphali* a *B. teratospicularis*, oba mají čtyři kaudální papily (1 pár před a 1 pár za konečником před bursou), tvar spikuly je charakteristický pro každý druh zvlášť, vulvální záklopka není známa (Braasch, 2001).

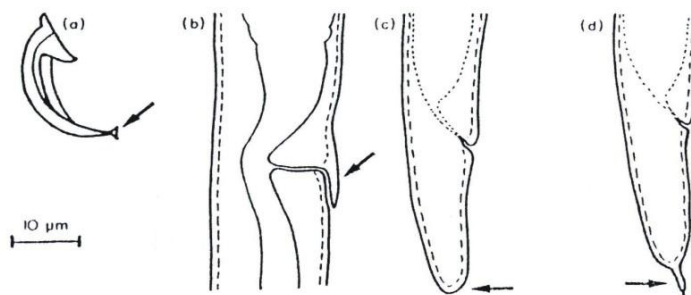
Ryss et al. (2005) rozděluje rod *Bursaphelenchus* do skupin dle tvaru spikuly. U skupiny *B. hunti* nejsou dorsální a ventrální části spikuly spojeny se špičkou a ta je široká a tupá. U ostatních skupin se dorsální a ventrální části na špičce spojují a ta je úzká a kónická. U skupiny *B. aberrans* má spikula capitulum kompaktní, rostrum a condylus splývají. U dalších skupin má spikula capitulum prodloužené, rostrum a condylus jsou dobře vyvinuté a oddělené, U skupiny *B. eidmanni* je spikula přímá, rostrum je menší umístěné v polovině její délky. Následující skupiny mají spikulu ve tvaru připomínajícím hák, s výrazným rostrem, které je lokalizované více vpředu. Skupina *B. borealis* má condylus spikuly zakřivený

dozadu. Zbývající dvě skupiny mají condylus spíše rovný nebo nezřetelný. Skupina *B. xylophilus* má capitulum vpředu zploštělé, condylus malý, dorsální linie laminy je v poslední třetině zalomená, spikula má většinou cucullus. U skupiny *B. piniperdae* je capitulum vpředu prohloubené, condylus je prodloužený, dorsální linie laminy je plynule zakřivená nebo ve středu zalomená, cucullus většinou schází, pokud je někdy přítomen tak je malý (obr. 16).

Ryss et al. (2005) se zabývá komplexně rodem *Bursaphelenchus*, Braasch (2001) ve své práci počítá s druhy přítomnými v Evropě. Nejpočetnější skupinou v rámci rodu *Bursaphelenchus* je skupina *B. piniperdae*, čítá přibližně 45 druhů a je také skupinou nejrozmanitější (Ryss et al., 2005).



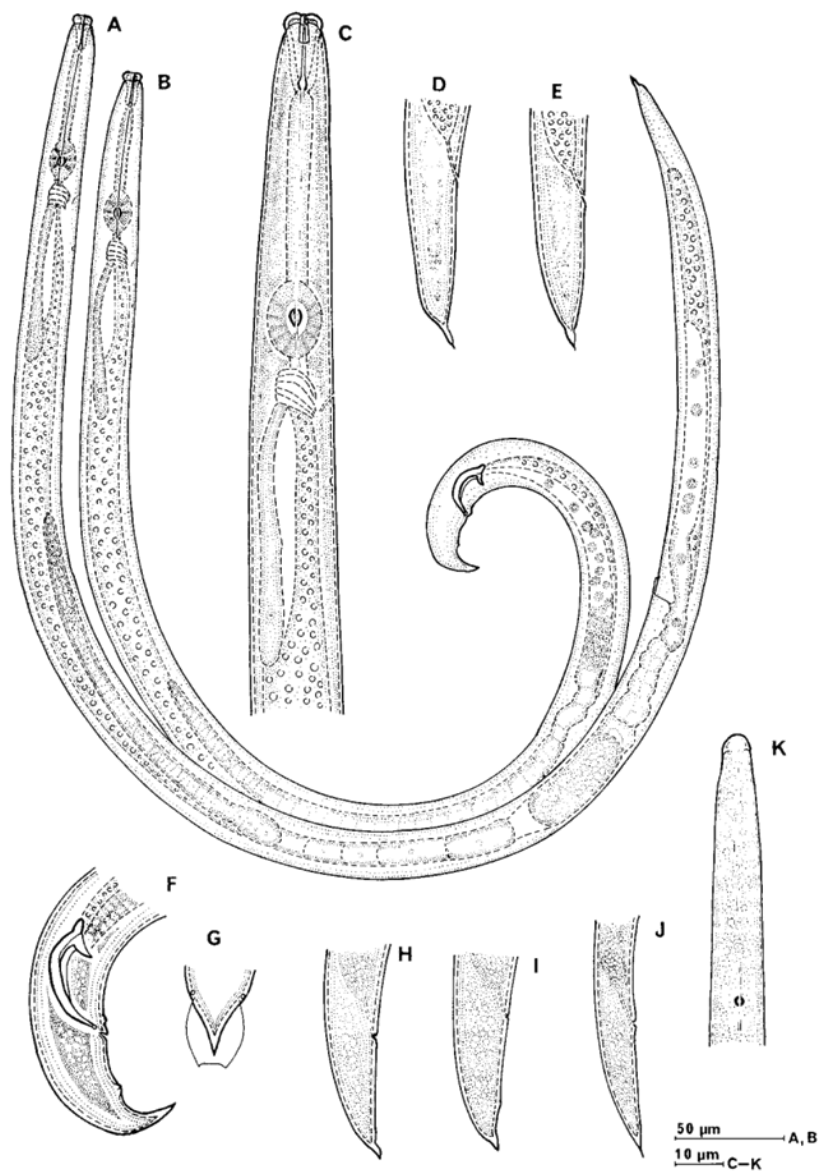
Bursaphelenchus xylophilus: A. samička, B. samec, C. ocas samce, D. ventrální pohled na samčí ocas s plachetkou, E. Ventrální pohled na spikulu, F. samička hlava, G. vulva, H.-J. ocas samičky.



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

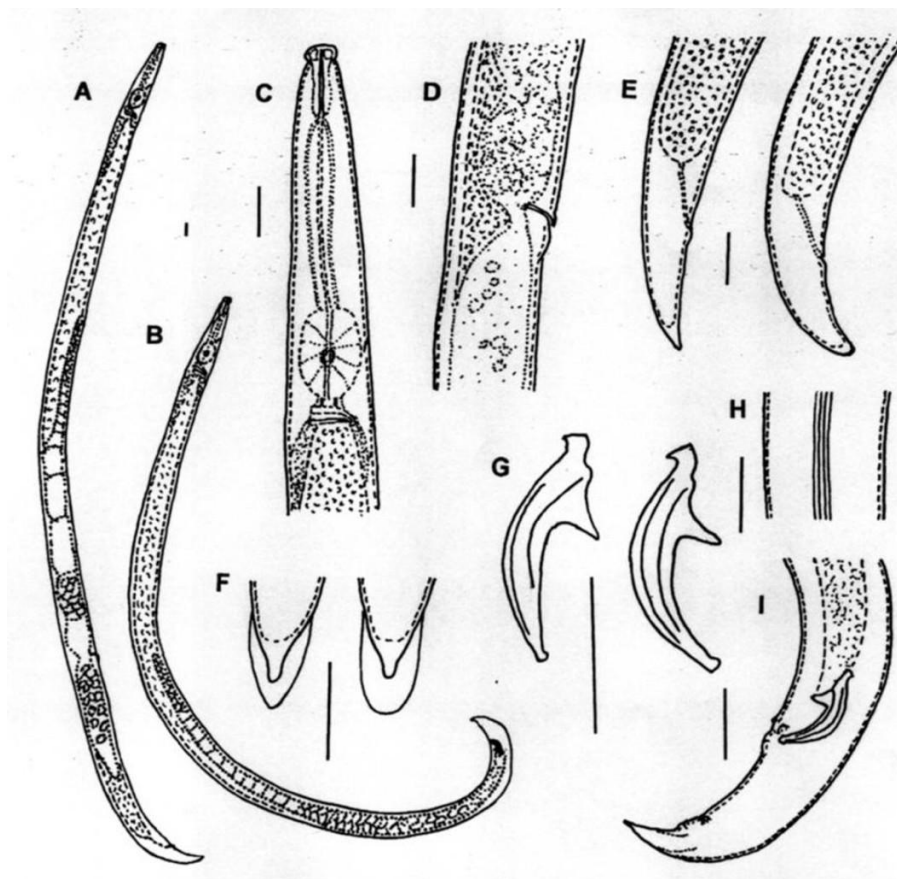
A. spikula, B. vulva obou druhů, C. ocas *B. xylophilus*, D. ocas *B. mucronatus*.

Obr. 14: *Bursaphelenchus xylophilus* a základní rozlišení *B. xylophilus* a *B. mucronatus* (Zouhar a kol., 2007).



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

Obr. 15: *Bursaphelenchus mucronatus* (Zouhar a kol., 2007).



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

Obr. 16: *Bursaphelenchus vallesianus*, zástupce skupiny *B. piniperdae* (Zouhar a kol., 2007).

2.9.2. Metody diagnostiky na úrovni nukleových kyselin

Diagnostika pomocí molekulárních technik má mnoho výhod ve srovnání s identifikací pomocí morfologických metod, například: nevyžaduje zvláštní trénink v pozorování morfologických znaků a metody jsou použitelné i pro juvenilní stádia, která nemají specifické diagnostické morfologické charakteristiky. Mnoho molekulárních technik, které byly vyvinuty a použity pro determinaci háďátek z rodu *Bursaphelenchus*, byly rovněž použity k identifikaci PWN (Kanzaki, 2008), například: RFLP (Webster et al., 1990; Abad et al., 1991; Beckenbach et al., 1992; Tarés et al., 1992), satelitní DNA sondy (Tarés et al., 1993, 1994; Harmey and Harmey, 1994) druhově specifické PCR (Matsunaga and Togashi, 2004; Takeuchi et al., 2005), RAPD-PCR (Braasch et al., 1995), PCR-RFLP z ITS rDNA (Hoyar et al., 1998; Iwahori et al., 1998, 2000; Burgermeister et al., 2005) a sekvenování DNA (Iwahori et al., 1998, 2000; Kanzaki and Futai, 2002; Ye et al., 2007). Mezi těmito

molekulárními technikami jsou PCR-RFLP profily ITS rDNA (= ITS-RFLP) nejvíce používány (Kanzaki, 2008).

2.10.2.1. PCR – polymerázová řetězová reakce

V roce 1985 byla zavedena do praxe Kary B. Mullisem polymerázová řetězová reakce (PCR). Výhodou PCR je, že umožňuje získat požadovanou specifickou sekvenci genomové DNA, bez jejího předchozího klonování ve vektorech. Princip PCR se zakládá na replikaci nukleových kyselin, které jsou základním molekulárním pochodem všech živých organismů. Podstatou PCR je opakující se enzymová syntéza nových řetězců požadovaných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Potřebný úsek nukleotidové sekvence je vymezen dvěma primery, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'OH-konce směřují proti sobě (Šmarda a kol., 2005). Jako primery se většinou používají dva krátké oligonukleotidové řetězce o délce 18-25 párů bází, odvozených z koncových sekvencí DNA určených k amplifikaci. Syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích probíhá za přítomnosti DNA-polymerázy a nukleotidů. Při syntéze DNA se využívají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů. Nejčastěji je používána *Taq* DNA-polymeráza, která je izolována z bakterie *Thermus aquaticus* a odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. Tato její vlastnost umožňuje, aby syntéza probíhala opakovaně formou cyklů (Šmarda a kol., 2005). Na trhu je celá řada dalších polymeráz, které jsou izolované z různých bakterií - *Tfl*, *Pfu*, Dynazyme, *Taq* gold apod. (Křemen a kol., 1998). PCR je proces, při kterém se v závislosti na teplotě směsi v reakci pravidelně střídají tři kroky, během kterých probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu. Tyto tři kroky jsou:

- 1) denaturace dvouřetězcových molekul DNA, za teploty 94 °C,
- 2) připojení primerů (annealing) k jednovláknovým řetězcům, za teploty 30 – 60 °C,
- 3) syntéza nových řetězců pomocí DNA-polymerázy, za teploty 65 – 75 °C.

Reakce probíhají v přístroji zvaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Dalším opakováním tohoto procesu se exponenciálně (2^n , n = počet cyklů) zvyšuje počet kopií amplifikovaného úseku molekuly DNA. Vzhledem k tomu, že výsledkem PCR je mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA, může být tato metoda označena za způsob klonování DNA (Šmarda a kol., 2005).

Identifikací hádátka *B. xylophilus* pomocí druhově specifických primerů, užitých v PCR, se ve svých publikacích zabývají Kang et al. (2004), Matsunaga and Togashi (2004) a

Leal et al. (2005). Pro navržení primerů bylo využito klonování do vektoru a následné sekvenace úseku (Kang et al., 2004). Druhově specifické primery byly navrženy do oblastí genomu ITS 1 a 2 (internal transcribed spacer) (Matsunaga and Togashi, 2004), IGS (intergenomic spacer) (Kang et al., 2004) a Hsp70 (heat-shock protein 70) (Leal et al., 2005), ve kterých se významně liší *B. xylophilus* od *B. mucronatus* (Kang et al., 2004).

2.10.2.2. RAPD – náhodná amplifikace polymorfni DNA

Tato metoda byla popsána nezávisle i pod názvy AP-PCR, MAP a DAF. Je to rychlá a jednoduchá metoda, která je vhodná pro rychlou srovnávací typizaci genomové DNA některých mikroorganismů a rostlin. Technika nejčastěji používá jeden nebo více krátkých primerů o délce 8-12 nukleotidů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA i málo specifické podmínky pro připojení primeru. Za daných podmínek dochází k nasedání primeru s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích genomové DNA. Většinou se vyskytne několik míst, která od sebe nejsou příliš vzdálená, umožňující připojení primerů na protilehlých řetězcích 3'-konci směřujícími k sobě. Výsledkem je amplifikace směsi fragmentů s rozdílnou délkou a různým molárním množstvím, v závislosti na izolátu, ze kterého genomová DNA pochází. Použitelnost oligonukleotidových primerů může být vyhodnocena pouze empiricky a informace o sekvenci templátové DNA není potřebná. Tato metoda má problémy s reprodukovatelností a interpretací výsledků, i když je vysoce účinná. Technika se v praxi používá pro identifikační postupy a taxonomické studie (Šmarda a kol., 2005).

RAPD-PCR byla využita pro analýzu vnitrodruhových rozdílů populací háďátek *B. xylophilus* z Japonska (Kusano et al., 1999), Číny (Zheng et al., 1998) a ve směsi izolátů háďátek z různých geografických oblastí (Braasch et al., 1995).

2.10.2.3. PCR-RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů

PCR-RFLP je modifikací standardní PCR, která je využívána pro typizaci cílové sekvence, často určitého genu, obsahujícího sekvenční polymorfismus. V závislosti na zvolených primerech může být provedena analýza kteréhokoliv genu. Tato sekvence, která má délku až 5 kb, se amplifikuje za specifických podmínek pomocí primerů připojujících se ke koncovým konzervovaným oblastem. Výsledkem amplifikace jsou produkty PCR mající

stejnou délkou, které se detekují pomocí elektroforézy. Amplifikované produkty jsou štěpeny restriční endonukleázou a následně opět analyzovány v polyakrylamidové nebo agarózové elektroforéze (Šmarda a kol., 2005). Restriční endonukleázy (RE) jsou enzymy bakterií, které spolu s příslušnými metylázami tvoří obranný systém bakterie proti invazi cizorodé DNA. Restriční enzymy specificky štěpí obě vlákna dsDNA, pokud není DNA modifikována, což zapříčiňuje nejčastěji metyláza. Sekvence nukleotidů, kterou RE rozeznávají, je označována jako rozpoznávací sekvence, nejčastěji se jedná o palindromickou strukturu. Místo, kde je DNA štěpena, se nazývá štěpné neboli restriční místo. Konce dsDNA následně po rozštěpení konkrétní endonukleázou nabývají tvar odpovídající palindromické struktuře. Vznikají plochá nebo lepivá zakončení. Této vlastnosti se bohatě využívá při práci s geny, klonování i studiu genomu (Břicháček a Krčmář, 1993).

PCR-RFLP metoda byla aplikována na mnoho druhů hád'átek, k jejich identifikaci na úrovni druhů či populací (Harris et al. 1990; Ferris et al. 1993; Braasch et al., 1999). Tato technika byla zavedena pro hád'átka rodu *Bursaphelenchus* k identifikaci populací *B. mucronatus* a *B. xylophilus* pomocí ITS rDNA (Hoyar et al. 1998; Iwahori et al. 1998). Výhodou metody ITS-RFLP je její rychlost, jednoduchost a relativně nízké náklady, nicméně je obtížné použít techniku k systematické analýze, přičemž porovnání referenčních vzorků s hledaným profilem je nezbytné. Z tohoto důvodu je metoda ITS-RFLP obecnější než sekvenování DNA a její využití může být omezeno na identifikaci některých druhů nebo populací (Kanzaki, 2008).

2.10.2.4. Real-time PCR – kvantitativní PCR v reálném čase (QPCR)

Kvantifikace PCR produktu v průběhu reakce – v reálném čase. Kvantifikace množství molekul DNA je důležitá při diagnostice některých patogenů nebo při detailním studiu exprese genů. Real-time PCR má široké využití také v klinické diagnostice pro genotypizační analýzu bodových mutací, chromozomových aberací nebo delecí. Kvantifikace amplifikovaného fragmentu při real-time PCR je uskutečněna pomocí detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu ve speciálním zařízení, které kromě cyklického střídání teplot umožňuje detekci fluorescence a sledování postupu PCR v reálném čase. Již není nutné detekovat PCR-produkty pomocí elektroforézy. Pro kvantitativní detekci produktu během PCR existují tři metody založené na použití:

- fluorescenčně značených primerů,
- interkalačního barviva vázajícího se na DNA,
- fluorescenčně značených sond vázajících se na střední část amplifikovaného produktu

Ke značení primerů a hybridizačních sond se používají specifické molekuly fluoroforů, které emitují světlo určité vlnové délky po předchozí absorpci světla rozdílné vlnové délky. Absorbovaná vlnová délka je vždy nižší než emitovaná vlnová délka. Dvojitě značené sondy obsahují k fluoroforu ještě zhášec, což je molekula, která přijímá energii z fluoroforu ve formě světla a zapřičiňuje její rozptýlení buď ve formě tepla, nebo světla o vyšší vlnové délce. Pro dosažení optimálního zhášení je nutné, aby se absorpční spektrum zhášeče překrývalo s emisním spektrem fluoroforu. V současnosti existuje mnoho fluoroforů, které jsou určeny pro jednobarevné nebo vícebarevné mnohonásobné detekce polymorfních sekvencí (Šmarda a kol., 2005).

Pro identifikaci háďátek rodu *Bursaphelenchus* se využívá dvojice primerů z ITS oblasti (Cao et al., 2005), dvojice primerů z oblasti Hsp70 (Leal et al., 2007) a dvojitě značených sond (Cao et al., 2005; Leal et al., 2007). Přítomnost háďátka byla prokázána i ve vzorcích s obsahem DNA 0,01 ng (Cao et al., 2005) a 0,005 ng (Leal et al., 2007). Tato metoda je vysoce citlivá na přítomnost inhibitorů PCR pocházejících ze dřeva. Použitelnost real-time PCR by mohla být zvýšena, pokud bychom mohli eliminovat potřebu extrakce háďátek z borovicového dřeva před vlastní izolací DNA, tj. jestliže by DNA háďátek mohla být získána přímo ze dřeva, spíše než z extrahovaných háďátek (Cao et al., 2005).

2.10.2.5. NESTED PCR – PCR využívající vnějších a vnitřních primerů

PCR využívající vnitřních a vnějších primerů je ve srovnání se standardní PCR vysoce citlivá metoda, umožňuje detekovat i jedinou molekulu templátové DNA. Při typickém postupu se amplifikace dělá ve dvou krocích. První amplifikační krok, obsahující 15-30 cyklů, je s jedním párem tzv. vnějších primerů. V prvním kroku vzniká produkt, který je přepipetován do nové mikrozkuhavky pro druhý amplifikační krok pomocí páru tzv. vnitřních primerů, které jsou specifické pro vnitřní část sekvence amplifikované s prvním párem primerů. Druhý amplifikační krok obsahuje dalších 15-30 cyklů a po jeho dokončení se produkt detekuje pomocí elektroforézy. Přenos produktů amplifikace z první reakce do druhé dovoluje nařazení inhibitorů, které mohly být přítomny v původním vzorku, ale může přinést i kontaminaci. Tomu lze předejít, pokud použijeme v průběhu reakce jen jednu

mikrozkumavku. Obsah prvního amplifikačního kroku je od obsahu druhého kroku oddělen směsí minerálních olejů, která se po skončení prvního kroku promíchá s ostatními reagensy centrifugací. Častějším způsobem je navržení dvojic vnitřních a vnějších primerů, které se od sebe výrazně liší teplotou annealingu (Šmarda a kol., 2005).

Metoda NESTED – PCR byla použita pro detekci hád'átek *B. xylophilus* ve vzorcích s malým množstvím DNA a pro zesílení detekce ITS oblasti, která je specifická pro toto hád'átko (Takeuchi et al., 2005).

2.10.2.6. Sekvenování DNA

Cílem sekvenování DNA je stanovení primární struktury DNA neboli pořadí nukleotidů v jejich molekulách. Metody, které dovolují rychle a spolehlivě stanovit sekvenci nukleotidů hrají klíčovou roli v analýze genomů a umožňují lepší porozumění molekulární podstatě základních biologických procesů. Znalost sekvence DNA je rutinně využívána k odvození informace o sekvenci aminokyselin kódovaných proteinů, o regulaci jejich tvorby a umožňuje detailně stanovit charakter mutací, které se mohou například projevit vznikem genetických chorob. Znalost sekvencí DNA také výrazně urychlila rozvoj ostatních molekulárních metod, mezi které patří například PCR, jejíž provedení je na znalosti sekvencí DNA často závislé.

Dnes jsou k sekvenaci DNA používány dvě principiálně odlišné metody. První je založena na specifické degradaci řetězců nukleových kyselin pomocí chemických sloučenin, z toho důvodu je označována jako chemická metoda nebo také podle jmen autorů jako Maxam – Gilbertovo sekvenování. Druhá metoda se zakládá na principu specifické inhibice enzymové syntézy řetězců DNA a je tudíž označována jako enzymová metoda nebo také podle autora Sangerovo sekvenování. V obou metodách je primárním požadavkem pro zahájení sekvenování příprava molekul DNA s přesně definovanými konci. Nejčastěji používaným výchozím materiálem pro sekvenování DNA jsou restriční fragmenty, naklonované ve vhodném klonovacím vektoru, nebo fragmenty získané při PCR. Společným rysem obou metod je taktéž splnění několika technologických požadavků:

- vytvoření souboru jednořetězcových molekul DNA, jejichž vzájemná velikost se liší o jedinou bázi,
- rozdělení tohoto souboru fragmentů elektroforézou s takovou rozlišovací schopností, která umožňuje navzájem separovat řetězce DNA lišící se svou délkou o jedinou bázi,

- definování jednoho z konců fragmentu DNA, u kterého stanovujeme sekvenci.

Poslední fáze sekvenování je založena na vyhodnocení sekvencí. Zde se využívá speciálních počítačových programů, kterými lze stanovené sekvence komplexně analyzovat.

Při této analýze se provádí:

- vyhledání otevřených čtecích rámců, které mohou být případnými geny,
- vyhledání exonů a intronů a převedení sekvence nukleotidů do sekvence aminokyselin v proteinech,
- vyhledání známých motivů na DNA, typických pro regulační oblasti,
- vyhledání repetitivních sekvencí,
- vyhledání rozpoznávacích míst pro restriční enzymy, čímž je získána kompletní restriční mapa,
- srovnání stanovené sekvence nukleotidů nebo z ní odvozené sekvence aminokyselin se sekvencemi uloženými v databankách, v nichž se shromažďují údaje získané v laboratořích v celém světě (Šmarda a kol., 2005)

Sekvenace DNA se může stát standardním nástrojem pro molekulární taxonomii a identifikaci, jak to navrhuje Ye et al. (2007), z důvodu rozšíření databází sekvencí DNA, například GenBank. Databáze nám také umožní porovnávat hledanou sekvenci se všemi ostatními sekvencemi uloženými v databázích za použití počítačového systému, a odhadnout fylogenetické vztahy v případě řádného vybrání genetického loku a analytického algoritmu. Největší nevýhodou této techniky jsou náklady na sekvenování (Kanzaki, 2008).

3. Hypotéza a cíle práce

3.1. Hypotéza

Výzkumná hypotéza vychází z předpokladu, že existuje reálná možnost introdukce háďátka *Bursaphelenchus xylophilus* na území ČR a že je možné získat poznatky, na základě kterých lze definovat podmínky a předpoklady pro oddálení zavlečení, nebo pro zabránění šíření a snížení možných škod.

3.2. Cíl práce

Cílem práce je získat nové poznatky o bionomii, metodách diagnostiky a monitoringu hád'átka *Bursaphelenchus xylophilus* a dalších druzích tohoto rodu v ČR.

3.3. Dílčí cíle

- Zhodnotit náchylnost sortimentu odrůd borovic pěstovaných v ČR vůči hád'átkům rodu *Bursaphelenchus*, především pak *B. xylophilus*.
- Ověřit metody monitorování přenašečů – brouků z čeledi *Cerambycidae* a jejich vhodnost jako přenašečů.
- Ověřit metody monitorování hád'átek rodu *Bursaphelenchus*.
- Vyvinout a ověřit nové postupy ochrany proti hád'átkům rodu *Bursaphelenchus*, především pak proti *B. xylophilus*.
- Studium morfologických znaků a ověřování metod užívaných k tvorbě trvalých preparátů k diagnostice druhů hád'átek rodu *Bursaphelenchus*.
- Vyvinout a ověřit spolehlivost molekulárně diagnostických metod pro určování druhů hád'átek rodu *Bursaphelenchus*.

4. Materiál a metody

4.1. Biologický materiál

4.1.1. Biologický materiál z laboratorního chovu

- Hád'átka chovaná na kultuře houby *Botrytis cinerea*.
 - Houba *B. cinerea* kultivovaná na MEA (malt extract agar, 50 g/l) s glycerolem (15 ml/l), obr. 1.
 - Kultivace *B. cinerea* na Petriho miskách.
 - Kultivace *B. cinerea* ve skleněných skleničkách s plastovým víčkem.

- Druh *Bursaphelenchus xylophilus*: původ háďátek z Portugalska (obr. 2).
- Ostatní druhy získány při monitorování ČR.
- Háďátka z jehličnanů (stromků a větví) rodu *Pinus*, které byly uměle napadeny v laboratoři pro práci s karanténními organismy.

4.1.2. Biologický materiál z přírodních zdrojů

- Háďátka získaná z dřevních vzorků, které byly odebrány při monitorování území ČR.
- Háďátka získaná z brouků čeledi *Cerambycidae*, kteří byli odchyceni při monitorování na území ČR.

4.1.3. Extrakce háďátek ze dřeva a kultur na *Botrytis cinerea*

Extrakce háďátek ze dřevních vzorků pomocí Bearmannovy nálevkové metody

- Do skleněné nálevky opatřené gumovou hadičkou, uzavřenou tlačkou byla nalita čerstvá okysličená voda a bylo do ní vloženo sítko.
- Vzorky byly nastříhány na malé třísky, ty byly umístěny na papírový ubrousek (1 vrstevný).
- Ubrousek s třískami byl opatrně umístěn na sítko do nálevky, okraje ubrousku byly zahrnuty směrem dovnitř nálevky a vše bylo opatrně dolito vodou.
- Živá háďátka sedimentovala u dna nálevky v gumové hadičce.
- Po 24 hodinách byl obsah nálevky stočen do kádinky.

Extrakce háďátek z dřevních vzorků pomocí plavicích misek

Pro velký vzorek dřeva je lepší využít plavicích misek

- Do spodní misky byla nalita čerstvá okysličená voda, poté do ní byla umístěna vrchní perforovaná miska, na ni byly rozloženy papírové ubrousky (1 vrstevné).
- Vzorky byly rozstříhány na třísky, které byly větší než u předchozí extrakce.
- Třísky byly opatrně rozloženy na ubrousky na vrchní misce a překryty buničinou.
- Miska byla opatrně dolita vodou a všechny vzduchové bubliny, které se pod buničinou vytvořily, byly opatrně odstraněny.

- Vzorky byly slity po 48 hodinách přes nematologické síto a obsah síta byl slit do kádinky.

Extrakce háďátek z kultur na *Botrytis cinerea* pomocí Bearmannovy nálevkové metody.

- Postup přípravy nálevek je stejný jako u dřevních vzorků.
- Obsah Petriho misek byl opatrně vyklopen na papírový ubrousek (1 vrstevný), ten byl opatrně položen na sítko v nálevce. Poté byly důkladně vypláchnuty obě poloviny Petriho misek (zvláště na víčku je mnoho jedinců). Následně byl ubrousek opět zahrnut dovnitř nálevky.
- Ostatní kroky jsou stejné jako u dřevních vzorků.

Pokud nepotřebujeme velké množství háďátek, je možné vypláchnout pouze víčko rovnou do kádinky.

4.2. Testování náchylnosti druhů borovic pěstovaných v ČR k háďátku *Bursaphelenchus xylophilus*

4.2.1. Testování sazenic

Testované druhy a kultivary: *Pinus aristata*, *P. cembra*, *P. contorta* Krňák, *P. heldreichii*, *P. mugo* Wintergold, *P. mugo* Pumillo, *P. nigra* Pumilla, *P. sylvestris* Nana (tab. 1).

Druh - latinsky	česky	původ	kultivar
<i>Pinus aristata</i>	borovice osinatá	Severní Amerika	
<i>Pinus cembra</i>	borovice limba	horská oblasti Evropy	
<i>Pinus contorta</i>	borovice pokroucená	západ Severní Ameriky	Krňák
<i>Pinus heldreichii</i>	borovice Heldreichova	jižní Apeniny, Balkán	
<i>Pinus mugo</i>	borovice kleč	Evropa	Wintergold, Pumillo
<i>Pinus nigra</i>	borovice černá	okolí Středozemního moře	Pumilla
<i>Pinus sylvestris</i>	borovice lesní	Eurasie	Nana

Tab. 1: Druhy a kultivary borovic použitých při testování vnímavosti semenáčků.

V karanténní laboratoři byl mechanicky simulován žír brouků z čeledi *Cerambycidae*. V horní třetině kmínku byla skalpelem podélně naříznuta borka o délce zhruba 1 cm a příčně o délce zhruba 0,5 cm, takto naříznutá borka byla opatrně oddělena. Do takto vytvořených ran byl vložen smotek vaty, do kterého byla aplikována suspenze háďátek, 100 μ l, přibližně 1000 jedinců, rány byly následně opatrně překryty termoplastickou voskovou páskou (Parafilm), pro zabránění vyschnutí háďátek a k ochraně před možnou sekundární infekcí. Po měsíci byl tento zákrok opakován na tom samém místě.

Pro zamezení kontaminacím z vnějšího prostředí a sjednocení podmínek, byly stromky před umístěním do karanténní laboratoře, kde probíhal experiment, přesazeny do nových květináčů o velikosti 5 litrů. V izolované místnosti laboratoře s řízenou klimatizací byl rostlinám nastaven režim, který simuloval přirozené vnější podmínky, včetně střídání dne a noci. Přes den probíhala kultivace při běžném osvětlení, teplotě 23 °C a vlhkosti vzduchu 61 %, v noci byla teplota snížena na 18 °C. Zálivka stromků byla prováděna dvakrát v týdnu 100 ml vody.

Zdravotní stav stromků byl kontrolován 1 x měsíčně po dobu šesti měsíců a jejich stav byl zaznamenáván do tabulky.

K hodnocení napadení byla použita šestistupňová škála

Hodnocení napadení:

- 1 0 % - zdravý strom
- 2 20 %
- 3 40 %
- 4 60 %
- 5 80 %
- 6 100 % - usmrcený strom

4.2.2. Testování atraktivity dřeva na agarových plotnách

Příprava agarových ploten:

- Malt extract agar (50 g/l) a glycerol (15 ml/l) byl připraven dle návodu výrobce (Himedia).

- Po zchladnutí bylo do agaru přidáno antibiotikum tetracyklin (1 ml/l) a fungicid Dithane (2 g/l) (účinná látka moncozeb - 80 %, tzn. 1,6 g/l).
- Agar byl nalit do Petriho misek o průměru 10 cm do výšky cca. 3 mm.

Sterilizace dřeva:

- Větvičky *Pinus pinaster* o průměru do 1 cm a délce cca 14 cm byly namočeny pod proudem vody.
- Umístěny do 70% etanolu na 2 min.
- Umístěny do 20% sava s kapkou smáčedla na 30 min.
- 10x po 3 min propláchnuty destilovanou vodou.
- Takto připravené větvičky byly rozstříhány: krajní části odstříženy ve vzdálenosti cca. 2 cm a vyhozeny, zbylá část rozstříhána po 1 cm.
- 1 cm špalíčky byly umístěny na agarové plotny po 4 ks na plotnu.
- Do vzdálenosti 1 cm byla napipetována suspenze hád'átek cca 100 ks.
- Byla pozorována infestace dřeva hád'átky po 1, 7 a 14 dnech.

4.2.3. Testování náchylnosti v segmentech větví

Druh - latinsky	česky	původ	borka	pryskyřice
<i>Pinus pungens</i>	borovice pichlavá	východ USA	silná, tuhá	silná
<i>Pinus attenuata</i>	borovice hrbolkatá	západ Severní Ameriky	tenká, jemná	slabší
<i>Pinus contorta</i>	borovice pokroucená	západ Severní Ameriky	střední, tužší	střední
<i>Pinus resinosa</i>	borovice smolná	Severní Amerika	velmi tuhá	silná
<i>Pinus nigra</i>	borovice černá	okolí Středozevního moře	silná, elastická	střední
<i>Pinus cembra</i>	borovice limba	horské oblasti Evropy	silná, tuhá	střední
<i>Pinus peuce</i>	borovice rumelská	Balkán	silná, elastická	silná
<i>Pinus coulteri</i>	borovice Coulterova	jihozápad USA, Mexiko	extrémně silná	střední
<i>Pinus strobus</i>	borovice vejmutovka	východ Severní Ameriky	střední, tužší	silná
<i>Pinus uncinata</i>	borovice pyrenejská	Pyreneje, Alpy, Schwarzwald	tenká, jemná	slabá
<i>Pinus densiflora</i>	borovice hustokvětá	východ Asie	tenká, jemná	slabá
<i>Pinus aristata</i>	borovice osinatá	Severní Amerika	silná, elastická	silná
<i>Pinus tabuliformis</i>	borovice deskovitá	Čína, Korea	tenká, jemná	střední
<i>Pinus monticola</i>	borovice pohorská	západ Severní Ameriky	tenká, jemná	silná

<i>Pinus ayacahuite</i>	nemá	západ Severní Ameriky	tenká, jemná	silná
<i>Pinus banksiana</i>	borovice Banksova	Severní Amerika	velmi tenká	střední
<i>Pinus mugo</i>	borovice kleč	Evropa	střední, tužší	střední
<i>Pinus pinaster</i>	borovice přímořská	jižní Evropa	střední, tužší	silná
<i>Pinus sylvestris</i>	borovice lesní	Eurasie	střední, tužší	střední

Tab. 2: Druhy borovic použité při testování náchylnosti v segmentech větví.

Pro testování byly použity druhy borovic rostoucích v Dendrologické zahradě v Průhonicích (tab. 2).

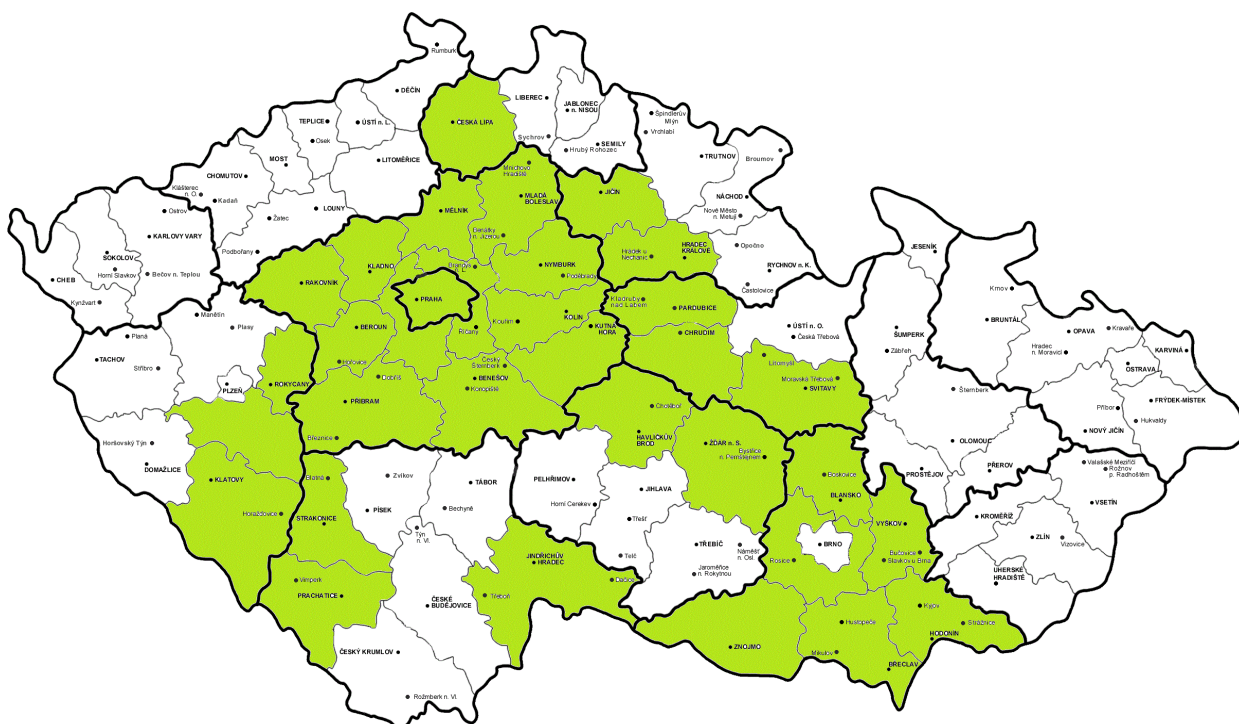
- Větve byly do zpracování skladovány při pokojové teplotě v nádobě s vodou.
- Před vlastním testováním náchylnosti byla odebrána část z každé větve a tato část byla vyplavena pomocí Baermannovy nálevkové metody a výsledek byl zkontrolován pod binoloupou (Olympus SZX7), jestli větev neobsahuje i jiná hád'átka, aby nebyl výsledek zkreslený.
- Větve byly rozstříhány na 21 přibližně stejně velkých špalíků.
- Borka byla naříznuta na užší straně špalíčku, cca 1 cm od konce, do tvaru T (síla borky a pryskyřičnatost byly zaznamenány do tabulky).
- Do takto vytvořeného zářezu byla dána vata a napipetována suspenze hád'átek cca 500 ks.
 - Zářez byl zakryt termoplastickou voskovou páskou (Nescofilm).
 - Zářez a konec u zářezu byly zakryty voskovou páskou.
 - Zářez a oba konce špalíčku byly překryty voskovou páskou.
 - Tato optimalizace probíhala u vzorku *Pinus sylvestris*, *P. nigra* a *P. pinaster* ještě před vlastním testováním všech druhů: Pro vlastní testování byla využita metoda se zakrytím zářezu a obou konců.
- Špalíčky byly umístěny do termostatu s teplotou 25 °C.
- 7 ks špalíček bylo vyhodnoceno po 14 dnech - vyplaveno pomocí Baermannovy nálevkové metody a spočítáno pod stereomikroskopem (Olympus SZX7)
- Dalších 7 ks špalíček bylo vyhodnoceno po dalších 14 dnech (tedy 28 dnech od počátku pokusu) - stejným způsobem jako předešlé.
- Posledních 7 špalíček bylo umístěno do termostatu s teplotou 12 °C pro další použití.

Výsledky byly zhodnoceny pomocí programu Statistica (Statistica 12, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2013, základní statistické analýzy).

4.3. Metody monitorování přenašečů – brouků z čeledi *Cerambycidae*

4.3.1. Místa monitorování přenašečů

Monitorování probíhala na území České republiky (obr. 17), v oblastech, kde se vyskytují borovicové porosty. Na místech bez výskytu příznakových stromů byl monitoring pouze vizuální. Na lokalitách s výskytem příznakových stromů byly odebírány vzorky. Pro výběr lokalit byla nápomocna publikace (Heyrovský a Sláma, 1992) a mapa výskytu borových porostů (Anonym, 2014).



Obr. 17: Mapa ČR s místy monitoringu vyznačenými zeleně.

4.3.2. Metody monitorování přenašečů

- Použití individuálního sběru na lokalitách, kde byly pozorovány výletové otvory a žír larev pod kůrou (obr. 3).
- Nastražení lapáků z borových větví, na které byl aplikován terpentýnový olej.
- Použití feromonového lapače Galloprotect (Sociedad Española de Desarrollos Químicos S.L. (SEDQ)), obsah: feromon: 2-undecyloxy-1-ethanol a kairomonal: ipsenol a 2-methyl-3-buten-1-ol a alpha pinen. Lapače byly umístěny na lokality, kde již byl výskyt brouků rodu *Monochamus* potvrzen, jednalo se o porosty v blízkosti Rohatce.

Dospělci a larvy byli transportováni do laboratoře v plastových lahvičkách s dostatečným množstvím dřevní drtě. Dospělci byli umísťováni jednotlivě, larvy po více kusech. V laboratoři byla do zpracování obě stadia umístěna v termostatu s teplotou okolo 5°C.

V laboratoři byla z dospělců a larev extrahována háďátka pomocí Baermannovy nálevkové metody.

- Brouci a larvy byli rozřezáni pomocí skalpelu
- Takto připravení jedinci byli umístěni na papírový ubrousek do skleněné nálevky opatřené gumovou hadičkou s tlačkou a zaliti přiměřeným množstvím vody.
- Po 24 hodinách byl obsah nálevky odpuštěn a zkoumán pomocí stereomikroskopu (Olympus SZX7).

4.4. Metody monitorování háďátek rodu *Bursaphelenchus*

4.4.1. Místa monitorování háďátek

Lokality odběru jsou shodné jako lokality monitorování přenašečů (obr.17 viz str. 47).

4.4.2. Metody monitorování háďátek

Pro odběr dřevních vzorků byly vybírány stromy s příznaky, jako je vadnutí a usychání jehlic, případně s výskytem výletových otvorů brouků z čeledi *Cerambycidae*. Vzorky byly odebírány také z již odumřelých stromů.

- Odběr dřeva ve výšce cca 150 cm nad zemí pomocí dláta, odebrané kousky byly dlouhé cca 5-10 cm, odběr v obou případech byl prováděn po odstranění borky - obr. 4 (Zouhar a kol., 2007).
- U stromů, kde napadení ještě nedosáhlo kmene, prováděl odběr vzorků odborně vyškolený lezec, který v koruně odřízl pilou příznakové větve (obr. 5).
- Odebrané vzorky byly rozděleny na několik částí.
 - 1. část byla zpracována 2-3 týdny po monitorování (po vylíhnutí a dospění všech vývojových stadií).
 - Polovina byla vyplavena pomocí Bearmannovy nálevkové metody a pomocí plavicích misek.
 - Druhá polovina byla použita pro detekci hád'átek pomocí molekulárních metod.
 - 2. část byla ponechána v laboratoři a zpracována po 3 – 6 měsících stejným způsobem jako část první.

4.5. Vývoj a ověřování nových postupů ochrany proti hád'átku *B. xylophilus*

4.5.1. Ověřování nematocidních účinků silic na hád'átko *B. xylophilus*

Použité esenciální oleje (tab. 3, 4, 5):

Firma Salus:

<i>Mentha spicata</i>	MS
<i>Pelargonium graveolens</i>	PG
<i>Cymbopogon winterianus</i>	CW
<i>Eucalyptus citriodora</i>	EC
<i>Pimpinella anisum</i>	PA
<i>Foeniculum vulgare</i>	FV
<i>Rosmarinus officinalis</i>	RO
<i>Lavandula angustifolia</i>	LA
<i>Eugenia caryophyllus</i>	HŘ
<i>Thymus vulgaris</i>	TV
<i>Litsea cubeba</i>	LC
<i>Salvia officinalis</i>	SO

Tab. 3: Použité esenciální oleje od firmy Salus

Firma Sigma:

Spearmint oil	SPO
Lemongrass oil	LGO
Anise oil	ANO
Terragon oil	TEO
Davana oil	DAO
Juniper berry oil	JBO
Cedar leaf oil	CLO
Cedar wood oil	CWO
Eucalyptus oil	EUO
Rosemary oil	ROO
Eugenol	EUG
Geranium extract	GEE
Fennel oil	FEO
Thyme oil	THO

Tab. 4: Použité esenciální oleje od firmy Sigma

Bez udání původu od Ing. Ondřej Douša, Ph.D., Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i.,

Praha:

Croton oil	CRO
Cornmint oil	COO
Eucalyptus oil	EUCO
Thyme oil white	TOW
Thyme oil red	TOR
Canaga oil	CANO
Thujone alfa-beta	TAB
Davana oil	DAVO
Juniper berry oil	JUBO
Terragon oil	TARO
Tagetes oil	TAGO
Wintergreen oil	WIO
Fir needle oil	FNO
Cedar leaf oil	CELO
Cinnamon oil	CINO

Tab. 5: Použité esenciální oleje od Ing. Ondřej Douša, Ph.D., VÚRV.

4.5.1.1. Přímá aplikace silic

Příprava silic:

- Byl smíchán Tween[®]20 (Amresco) a esenciální olej v poměru 1,5:1 (výsledná koncentrace esenciálního oleje 40 %) - emulze byla vortexována 30 min (obr. 6).
- Výsledná koncentrace byla docílena až v jamkách destičky - obr. 7 (Orange Scientific, Tissue Culture OrPlates - 24 jamek).

Testování:

- Celkový objem suspenze esence, Tweenu a destilované vody v jamkách byl 1 ml
- Do jamek destičky byla napipetována destilovaná voda pro získání výsledné koncentraci esence 2,5 % - na této koncentraci byla testována prvotní účinnost silic, při pozitivním výsledku byla testována nižší koncentrace: 0,5 %, 1 %, 1,5 % a 2 %.

- Do jamek byla připipetována emulze esenciálního oleje a Tweenu, výsledná emulze byla velice důkladně promíchána pipetováním, pro pipetování byly použity pipetovací špičky se širokým ústím (obr. 8).
- Byla zařazena kontrola jen s destilovanou vodou a kontrola s 2,5% emulzí Tweenu.
- Do takto připravených jamek bylo přidáno 50 ks háďátek *B. xylophilus*.
- Destičky byly překryty lepicí páskou a zavřeny víčkem.
- Dále byly inkubovány při pokojové teplotě na třepačce (150 otáček/min).
- První vyhodnocení proběhlo po 3 h a další po 24 h.
- Destičky byly ponechány v klidu po dobu 15 min, aby háďátka klesla ke dnu jamky.
- Emulze byla z jamky odpipetována - 800 μ l.
- Do jamky byl napipetován 1 ml okysličené vody - toto bylo opakováno průměrně 3 x. Některé esence měly výrazně mléčné zakalení, zde se tento postup musel opakovat vícekrát. Okysličená voda byla použita proto, že některá háďátka mohou vypadat jako mrtvá, ale po okysličení prostředí ožijí.
 - Okysličená voda byla vyrobena pomocí kyslíkového sifonu (firma Liss).
- Jednotlivé jamky byly prohlíženy pod binolupou a počet mrtvých háďátek byl zaznamenán do tabulky.
- Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu Statistica (Statistica 12, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2013, základní statistické analýzy, analýza rozptylu).

4.5.2. Vývoj metody ošetření obalového dřeva pomocí kyanovodíku

4.5.2.1. Testování účinnosti HCN na modelovém organismu - háďátku *Caenorhabditis elegans*

Příprava vzorků:

- Do speciálně upravených 50 ml plastových zkumavek - víčko bylo odvrtno po celém průměru a vývrt byl zakryt mikrotkaninou Uhelon 130 T (průměr oka cca 80 μ m) (obr. 9) bylo dáno 5 g pěstební substrátu (ošetřený při 121 °C po dobu 25 min v autoklávu, pro likvidaci případných antagonistických organizmů).
- Do takto připravených zkumavek byla pomocí skleněné špičky napipetována suspenze háďátek v množství cca 300 jedinců.

- Takto připravené vzorky byly odvezeny do firmy Draslovka a.s. Kolín, která vlastní experimentální komoru pro HCN fumigaci, zde proběhla vlastní fumigace.

Fumigace:

- Vzorky byly umístěny do fumigační komory.
- Fumigační komora byla naplněna HCN v koncentraci 7 g/m^3 , tato hladina byla v průběhu fumigace monitorována.
- Vzorky byly vyjímány z komory po 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 4,5 h, 5 h, 5,5 h a 6 h.
- Tento pokus byl 6x opakován.
- Vně komory byla umístěna kontrola bez expozice.

Vyhodnocení:

- Vyhodnocení pokusu probíhalo na katedře ochrany rostlin ČZU v Praze.
- Pro vyplavení háďátek ze substrátu byla využita Baermannova nálevková metoda - substrát s háďátkami byl umístěn na papírový ubrousek (1 vrstvý) a umístěn do skleněné nálevky naplněné vodou a opatřené gumovou hadičkou s tlačkou.
- Po 12 h byl obsah nálevky odpuštěn a zkontrolován pod binolupou.

4.5.2.2. Ošetření dřevních pilin s háďátkami *Bursaphelenchus xylophilus*

Příprava vzorků:

- Do upravených 50 ml plastových zkumavek (provrtané víčko s mikrotkaninou Uhelon) bylo naváženo 5 g borových pilin - piliny vyráběny pomocí elektrické pily bez olejového mazání. (obr. 10).
- Do zkumavek, na piliny, byla napipetována suspenze háďátek v počtu cca 300 jedinců, dále byl připipetován 2 ml destilované vody (spláchnutí háďátek do pilin, zvýšení vlhkosti).

Fumigace:

- Vlastní fumigace probíhala taktéž ve firmě Draslovka a.s..
- Pokus měl dvě varianty s rozdílným množstvím HCN a s různou teplotou, doba expozice byla 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 30 h a 40 h.

- Varianta 1: množství HCN 10 g/m³, teplota 20 °C
- Varianta 2: množství HCN 20 g/m³, teplota 25 °C
- Pokus byl opakován 5x.
- Kontrola bez expozice byla umístěna vně komory.

Vyhodnocení:

- Vyhodnocení proběhlo stejně jako u varianty s *C. elegans*.

4.5.2.3. Ošetření dřevěných špalků uvnitř s pilinami

Příprava vzorků:

- Do pytlíčků z mikrotkaniny (síťovina Uhelon 130T – extra – průměr oka cca 18 µm) bylo odměřeno 5 g borových pilin.
- K pilinám bylo napipetováno 500 µl suspenze hád'átek (cca 1200 jedinců) a 2,5 ml destilované vody, pytlíčky byly zavázány nití.
- Takto připravené pytlíčky byly umístěny do otvoru vyvrtaného ve špalku (špalek: 12,5 cm x 10 cm x 10 cm), přes celou stranu s otvorem bylo přilepeno sklo uprostřed se silikonovou zátkou (obr. 11).
- Takto připravené vzorky byly odvezeny do Draslovky a.s. Kolín, kde byla provedena fumigace.

Fumigace:

- Množství HCN v komoře bylo 12,3; 18,21; 21,71 a 24,12 g/m³, a doba expozice byla 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 a 20 h, ošetření probíhalo ve dvou blocích 2-10 hodin a 12-20 hodin, výsledky byly zpracovány odděleně.
- Pokus byl opakován 5x.
- V průběhu pokusu byla měřena koncentrace HCN v komoře i uvnitř špalků (proto skla opatřena silikonovou zátkou).
- Vně komory byla umístěna kontrola bez expozice.

Vyhodnocení:

- Skla na špalcích byla naříznuta diamantovým řezačem a poté rozbita kladívkem.

- Piliny s háďátky byly vyjmuty z pytlíčku a dále zpracovány jako je uvedeno výše.
- Výsledky byly zhodnoceny pomocí kumulativního Ct produktu, který pomohl určit, zda je vztah mezi množstvím HCN ve fumigační komoře a časem fumigace. Hodnoty Ct produktu byly vyhodnoceny pomocí programu Statistica (Statistica 12, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2013, základní statistické analýzy), kumulativní Ct produkt byl vypočten dle vzorce (T_n a T_{n+1} je doba v hodinách odběru a C_n a C_{n+1} je koncentrace v příslušnou dobu odběr):

$$C_{t_{n,n+1}} = \frac{(T_{n+1} - T_n) \times (C_n + C_{n+1})}{2,00}$$

4.6. Diagnostika háďátek rodu *Bursaphelenchus* na úrovni morfologických znaků

Diagnostiku háďátek na základě morfologický znaků lze provádět u nativních a trvalých preparátů. Při tvorbě trvalých preparátů dochází k jisté deformaci háďátka, ale trvalá fixace nám umožňuje na rozdíl od nativního preparátu jedince sledovat opakovaně (obr. 12).

4.6.1. Tvorba trvalých preparátů

4.6.1.1. Fixace háďátek pomocí Ditlevsenova roztoku tzv. FAA

- Háďátka byla vybírána pomocí nematologické jehly do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml s obsahem 20 μ l destilované vody, v počtu cca. 20 háďátek na zkumavku.
- Mikrozkušavka s háďátky byla umístěna do termobloku s teplotou 80 °C pro usmrcení háďátek.
- Zkušavka byla doplněna pomocí Pausterovy pipety roztokem FAA, který byl před tím zahřát na 80 °C.
- Složení roztoku FAA:
 - 95% ethanol - 20 ml

- 40% formaldehyd - 6 ml
- Ledová kyselina octová - 1 ml
- Destilovaná voda - 18 ml
- Hádátka byla ponechána v roztoku min. 10 dní.

4.6.1.2. Fixace háďátek pomocí roztoku TAF

- První dva kroky jsou totožné s předchozí metodou.
- Zkumavka byla doplněna roztokem TAF, který byl zahřát na 80 °C.
- Složení roztoku TAF:
 - 40% formaldehyd - 7 ml
 - Trietanolamin - 2 ml
 - Destilovaná voda - 91 ml
- Hádátka byla v roztoku ponechána min. 10 dní.

4.6.1.3. Fixace háďátek pomocí roztoku formaldehydu o koncentraci 4 % a 10 %

- První dva kroky jsou totožné jako u předchozích metod.
- Formaldehyd byl naředěn na koncentraci 4 % a 10 % destilovanou vodou (ředění ne starší jednoho měsíce).
- Zkumavka s háďátky byla doplněna takto připraveným formaldehydem, ohřátým na 80 °C.
- Hádátka byla v roztoku ponechána min. 10 dní.

4.6.1.4. Převedení háďátek do čistého glycerolu

Varianta 1:

- Bylo odsáto 2/3 fixačního roztoku z mikrozukavky.
- Mikrozukavka byla doplněna roztokem:
- Glycerin - 1 ml
- 96% ethanol - 20 ml

- Destilovaná voda - 79 ml
- Otevřené mikrozkuhavky byly umístěny do etanolové lázně na 48 h.
- Obsah mikrozkuhavky byl vylit do skleněné misky označované jako: "embryo dish" (ED) a hád'átka byla vybrána pomocí nematologické jehly a umístěna na hodinové sklíčko do roztoku 5% glycerolu v etanolu.
- Veškerý etanol se nechal odpařit (v průběhu odpařování, byl pro lepší prosycení struktur doplňován 2 x roztok glycerolu).
- Takto prosycená hád'átka byla připravena pro mikroskopii nebo tvorbu trvalých preparátů.

Varianta 2:

- Hád'átka byla vylita z mikrozkuhavky s fixačním roztokem do ED a vybrána pomocí nematologické jehly na podložní sklíčko s jamkou do 5% vodného roztoku glycerolu, sklíčko bylo inkubováno 2 h při 60 °C na termobloku.
- Veškerá voda se nechala odpařit, v průběhu odpařování byl roztok průběžně doplňován.
- Takto prosycená hád'átka byla připravena pro mikroskopii a tvorbu trvalých preparátů.

4.6.1.5. Trvalé preparáty

- Na podložní sklíčko trvalého preparátu byla umístěna kapička (cca 3-5 μ l) 99% glycerolu, sklíčko bylo inkubováno 15 min při 80 °C, pro odpaření zbytkové vody.
- Do takto připraveného glycerolu byla po jednom umístěna hád'átka.
- Krycí sklíčko bylo fixováno směsí parafínu a včelího vosku (1:4), směs byla roztavena při 80 °C.
- Hotový preparát byl popsán a zařazen do sbírky. Uchováván byl v horizontální poloze.

4.6.2. Morfologické charakteristiky

Měření a lokalizace morfologických znaků byla provedena pomocí mikroskopu BX51 Olympus, s využitím softwaru QuickPhotomicro 2,3 a 3,0. Při určování hád'átek bylo postupováno s využitím polytomických klíčů (Ryss et al., 2005).

U samců byly hodnoceny charakteristiky:

- C1: tvar spikuly
- C3: zakončení spikuly
- C5: rostrum spikuly
- C8: kondylus spikuly
- C10: úhel mezi spojnicí kondylus-rostrum a přímkou kopírující zakřivení lamina
- C13: tvar lamina
- C14: zakřivení lamina
- C15: poměr délky spikuly a šířky spikuly pod kondylem
- C16: délka styletu
- C18: délka spikuly
- C19: poměr mezi délkou spikuly a vzdáleností kondyla a rostra
- C20: poměr mezi vzdáleností kondyla a rostra a prohloubením kapitula
- C21: tvar nasedání rostra na kalom
- C22: délka těla samce
- C23: index a (délka těla/šířkou těla)
- C24: index c (délka těla/délkou ocasu měřenou od análního otvoru)

U samic byly hodnoceny charakteristiky:

- C2: tvar ocasu samice
- C4: poměr mezi šířkou těla v místě vulvy a délkou postuterinního vaku
- C6: vulvální záklopka
- C9: zakřivení ocasu samice
- C16: délka styletu
- C27: délka těla samice
- C28: index a
- C29: index c
- C30: index c' (délka ocasu/šířkou těla v místě análního otvoru)
- C31: index V (vzdálenost vulvy od předního konce těla/délkou těla x 100 - udává se v %)
- C32: poměr délky postuterinního vaku a vzdálenosti vulvy od konečníku

4.7. Diagnostika hád'átek rodu *Bursaphelenchus* pomocí molekulárních markerů

4.7.1. Izolace DNA

4.7.1.1. Izolace DNA z dřevních vzorků

Izolace DNA z dřevních vzorků je obtížná, neboť ve dřevě jehličnanů jsou přítomny PCR inhibitory (Cao et al., 2005).

4.7.1.1.1. Příprava dřevního vzorku před izolací

Vzorky byly nastříhány na malé kousky a homogenizovány několika metodami:

- Homogenizace v kulovém mlýnu (Retsch[®], MM400).
 - Vzorky byly dány do kovového drtiče s přídavkem pufru.
 - Drtiče se vzorky byly třepány v kulovém mlýnu 30 s na plný výkon.
 - Kovové drtiče byly předem podchlazeny tekutým dusíkem, poté do nich byl vložen rostlinný materiál, který byl opět zmražen.
 - Drtiče se vzorky byly třepány v kulovém mlýnu 30 s na plný výkon.
- Homogenizace ve třecích miskách.
 - Vzorky byly podchlazeny tekutým dusíkem a třeny pomocí tloučku.
 - Ke vzorkům byl přidán křemenný písek, vzorky byly podchlazeny tekutým dusíkem a třeny pomocí tloučku.

4.7.1.1.2. Izolace DNA pomocí komerčního kitu DNeasy Plant Mini Kit (firmy Qiagen)

Tato izolace je založena na navázání DNA na mikromembránu, odkud je později pomocí elučního pufru vymyta.

- K izolaci bylo použito 100 mg homogenizovaného vzorku (1. napadeného, 2. zdravého dřeva + 10 µl suspenze hád'átek – cca 100 jedinců).
- Ke vzorkům bylo připipetováno 200 µl pufru AP1 a vzorky byly důkladně promíchány v mikrozkmavce pomocí minishakeru (Pellet Pestle[®] Motor, Sigma) se skleněným tloučkem o Ø 3 mm, ten byl opláchnut 2x 100 µl pufru AP1.

- Poté probíhala inkubace vzorků 10 min při 65 °C, v průběhu byly 2-3x promíchány překlopením.
- K lysátu bylo připipetováno 130 µl AP2 pufru, vzorek byl důkladně promíchán a inkubován na ledu 5 min.
- Lysát byl centrifugován 5 min při 20 000 g (centrifuga: Hettich, Universal 320 R).
- Supernatant byl přepipetován do QIAshredder Mini spin column (kolonky s filtrem) a kolonka byla umístěna do 2 ml mikrozkuhavky a centrifugována 2 min při 20 000 g.
- Supernatant byl přepipetován do čisté mikrozkuhavky. K supernatantu byl připipetován pufr AP3 v množství jeden a půl násobek objemu supernatantu. Vzorek byl promíchán pipetou.
- 650 µl roztoku bylo přepipetováno do DNeasy Mini spin column umístěné ve 2 ml mikrozkuhavce, vzorek byl centrifugován 1 min při 6 000 g. Supernatant byl vylit. Tento krok byl opakován se zbývajícím roztokem z předchozího bodu.
- Kolonka DNeasy Mini spin column byla umístěna do nové 2 ml mikrozkuhavky. Na filtr bylo napipetováno 500 µl pufru AW, vzorek byl centrifugován 1 min při 6 000 g, supernatant byl vylit. Poté bylo přidáno znovu 500 µl pufru AW a znovu byl vzorek centrifugován za stejných podmínek, supernatant byl opět vylit, poté byl vzorek znovu centrifugován 2 min při 20 000 g pro úplné vysušení mikromembrány filtru.
- Kolonka DNeasy Mini spin column byla umístěna opět do nové mikrozkuhavky. Na filtr bylo opatrně napipetováno 100 µl AE pufru. Vzorek byl ponechán při laboratorní teplotě 15 min, poté byl centrifugován 1 min při 6000 g.
- Výsledné množství DNA bylo 100 µl.

4.7.1.1.3. Izolace DNA pomocí přístroje InnuPure C12 a kitu innuPREP Plant DNA Kit – IP (firmy Analytik Jena)

Tato metoda je založena na navázání DNA na magnetické partikule.

- K izolaci DNA bylo naváženo 50 mg homogenizovaného vzorku (1. napadeného dřeva, 2. zdravého dřeva + 1, 3, 5, 10 jedinců).
- Ke vzorkům bylo připipetováno 200 µl Lysis Solution SLS a 25 µl Proteinasy K, vše bylo dobře promícháno pomocí minishakeru, skleněný tlouček byl opláchnut 2x 100 µl Lysis Solution SLS. Vzorky byly dobře promíchány a umístěny po dobu 10 s na vortexu.

- Vzorky byly inkubovány minimálně 30 min při 50 °C, během inkubace byly několikrát promíchány otočením mikrozkušavky v ruce. Vzorky byly centrifugovány na stolní centrifuze.
- Supernatant byl přepipetován na Pre-filter kolonku umístěnou ve 2 ml mikrozkušavce. Vzorky byly centrifugovány 1 min při 10 000 g.
- Na svá místa byl umístěn spotřební materiál pro přístrojovou izolaci. V přední části kovového držáku byly mikrozkušavky pro izolovanou DNA (Elution Tubes), za nimi byly umístěny špičky s filtrem (MFR Tips a za nimi byly umístěny stripy s reagensy (Reagent Strips).
- Do nejzazší řady stripů (bráno od mikrozkušavek) bylo napipetováno 60 µl magnetických partikulí (MAG Suspension), které byly před tím důkladně vortexovány. K magnetickým partikulím byly připipetovány vzorky.
- Kovová konstrukce byla vložena do přístroje a byl spuštěn program „Plant_DNA_2b“.
- Izolovaná DNA byla získána v množství 200 µl.

4.7.1.1.4. Izolace DNA s PVP (polyvinylpyrrolidone)

PVP se váže na terpenoidy a tím zabraňuje jejich dalšímu znečištění DNA (Reynolds and Williams, 2004)

4.7.1.1.5. Izolace DNA s PVP I (Porebski et al., 1997)

- Bylo odváženo 0,5 g homogenizovaného dřevního vzorku (infikované a zdravé dřevo jako v předchozích dvou případech) do 15 ml zkumavky.
- Ke vzorkům bylo připipetováno 5 ml extrakčního pufru ohřátého na 60 °C a přidáno 50 mg PVP, vše bylo promícháno a inkubováno při 60 °C na třepačce po dobu 60 min.
Poté byly vzorky ponechány při pokojové teplotě 6 min.
- Ke vzorkům bylo připipetováno 6 ml chloroform-izoamylalkoholu (24:1), vzorky byly promíchávány převrácením do vytvoření suspenze. Poté byly vzorky centrifugovány 20 min při 4 000 g.
- Vrchní vodná fáze byla přepipetována do nové 15 ml zkumavky, při použití špiček se širokou špičkou. Byly opakovány dva předchozí kroky.

- Ke vzorkům byl připipetován 5M NaCl v množství poloviny objemu vzorku, vše bylo dobře promícháno.
- Ke vzorkům byl připipetován dvojnásobný objem vzorku (před přidáním NaCl) ledového (-20°C) absolutního etanolu, vzorky byly promíchávány překlopením a umístěny do termostatu s teplotou 4 °C přes noc nebo do mrazničky s teplotou -20 °C na 10 min. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 6 min při 4 000 g.
- Supernatant byl ze vzorků vylit a pelety byly promývány chlazeným etanolem (4 °C).
- Pelety byly vysušeny při 37 °C cca 60 min.
- Pelety byly rozpuštěny v 300-600 µl TE pufru přes noc v termostatu s teplotou 4 °C. Po rozpuštění byly vzorky přepipetovány do mikrozkušavek o objemu 2 ml.

Přečištění DNA:

- Ke vzorkům byly připipetovány 3 µl RNasy A (10 mg/ml) a vzorek byl inkubován při 37 °C ve vodní lázni 60 min.
- Ke vzorkům byly připipetovány 3 µl Proteinasy K (1 mg/ml) a vzorek byl inkubován při 37 °C 30 min.
- Ke vzorkům bylo připipetováno 150 µl fenolu a 150 µl chloroformu. Vzorky byly vortexovány a centrifugovány při 14 000 g 15 min.
- Vrchní vodná fáze byla přepipetována do nové mikrozkušavky. Do fenolové fáze bylo připipetováno 50 µl TE pufru, vše bylo opět vortexováno a centrifugováno a vrchní vodná fáze byla připipetována k té předchozí.
- Ke vzorkům byl připipetován 2 M octan sodný v množství 1/10 objemu vzorku a dvojnásobek objemu vzorku absolutního etanolu a vše bylo promícháno.
- Vzorky byly umístěny do mrazničky s teplotou -80 °C přes noc, poté byly vzorky centrifugovány při 14 000 g 20 min.
- Supernatant byl vylit a pelety byly promyty 70% etanolem (2x).
- Pelety byly vysušeny při pokojové teplotě cca 60 min. Poté byly pelety resuspendovány ve 200 µl TE pufru.

Složení extrakčního pufru:

100 mM TRIS

1,4 M NaCl

20 mM EDTA (pH 8)

2% CTAB (2 g)

0,3% β -mercaptoethanol

Složení TE pufru:

1 M TRIS (1 ml) (pH 8)

0,5 M EDTA (0,2 ml) (pH 8)

Doplnit do 100 ml destilovanou vodou

Upravit na pH 8

4.7.1.1.6. Izolace DNA s PVP II

- Bylo naváženo 200 mg homogenizovaného dřeva (ostatní viz výše) do mikrozkušavky.
- Ke vzorkům bylo připipetováno 500 μ l extrakčního pufru. Vzorky byly dobře promíchány a byly inkubovány 15 min ve vodní lázni při 55 °C. Poté byly centrifugovány 5 min při 12 000 g.
- Vrchní vodná fáze byla přepipetována do nové mikrozkušavky. K ní bylo připipetováno 250 μ l chloroform-izoamylalkoholu (24:1), vše bylo promícháno překlápěním a centrifugováno 1 min při 20 000 g.
- Vrchní vodná fáze byla opět přepipetována do nové mikrozkušavky a k ní bylo připipetováno 50 μ l 7,5M octanu amonného a 500 μ l ledového (-20°C) absolutního etanolu. Vzorky byly překlápěny do vytvoření sraženiny, nebo byly umístěny na 60 min do mrazničky s teplotou -20 °C.
- Vzorky byly centrifugovány 2 min při 20 000 g a supernatant byl vylit.
- Pelety byly opakovaně (2x) promyty 500 μ l chlazeného (4 °C) 70% etanolu.
- Pelety byly sušeny při pokojové teplotě asi 15 min.
- Pelety byly resuspendovány ve 100 – 200 μ l ddH₂O nebo v TE pufru přes noc v termostatu s teplotou 4 °C.

Složení extrakčního pufru:

1 M TRIS (10 ml) (pH 8)

0,5 M EDTA (4 ml) (pH 8)

5 M NaCl (28 ml)

2% CTAB (2 g)

Do 100 ml doplnit destilovanou vodou

PVP (1 g)

Upravit na pH 5

4.7.1.1.7. Izolace DNA pomocí FTA[®] metody (firmy Whatman)

FTA metoda je založena na navázání DNA na speciálně upravený papír, tato metoda je patentována firmou Whatman.

- Infestovaný segment větve byl přestřižen v půli a řeznou plochou obtištěn na FTA papír.
- Z FTA papíru s obtiskem dřeva byly vyraženy terčíky o průměru 2 mm.
- Terčíky byly umístěny do PCR mikrozkušavek.
- K terčikům bylo připipetováno 200 µl FTA pufru a mikrozkušavky byly inkubovány 5 min při pokojové teplotě a po celou dobu inkubace byly promíchávány otáčením.
- Byl odsán FTA pufr a postup 2x opakován.
- K terčikům bylo připipetováno 200 µl TE pufru pH 8 a mikrozkušavky byly opět inkubovány 5 min při pokojové teplotě za stálého promíchávání otáčením.
- TE pufr byl odsán a postup byl ještě jednou zopakován.
- Takto ošetřený terčík byl připraven pro PCR reakci.

4.7.1.2. Izolace DNA z jednoho a více jedinců

Před izolací DNA z jednoho a více jedinců, musíme mít nejprve háďátka ve vodném prostředí, abychom je mohli vybírat pro další izolaci.

4.7.1.2.1. Izolace DNA z jednoho a více jedinců

DNA z jednoho a více jedinců byla izolována pomocí komerčně dodávaného kitu DNeasy Plant Mini Kit (firmy Qiagen), pomocí přístroje InnuPure C12 a kitu innuPREP Plant DNA Kit – IP (firmy Analytik Jena) a pomocí FTA metody. Postup byl stejný jako u izolace DNA z dřevních vzorků, jen místo navážky byl použit pouze jeden jedinec háďátka, případně více jedinců získaných extrakcí z dřevních vzorků nebo extrakcí chovu na kultuře *B. cinerea*. Homogenizace probíhala pomocí minishakeru a musela být velmi důkladná. U metody FTA

byl umístěn jeden jedinec na vyseknutý terčik FTA papírku a důkladně rozdrčen skleněnou tyčkou. Ostatní použité metody jsou popsány níže.

4.7.1.2.2. Izolace DNA pomocí komerčního kitu TriPure Isolation (firmy Roche)

- Do mikrozkušavky s obsahem 10 μ l destilované vody byl umístěn jeden jedinec.
- Ke vzorkům bylo připipetováno 50 μ l pufru TriPure Isolation a byly přidány skleněné partikule. Vzorek byl důkladně homogenizován pomocí minishakeru (Pelet Pestl mini shaker). Skleněný tlouček byl opláchnut 750 μ l téhož pufru.
- Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě 5 min.
- Ke vzorkům bylo připipetováno 160 μ l chloroformu a poté byly 15 s vortexovány.
- Vzorky byly opět inkubovány při laboratorní teplotě 15 min. Poté byly centrifugovány 15 min při 12 000 g a 4°C.
- Horní bezbarvá fáze byla odpipetována a vylita. Do zbylé fáze bylo připipetováno 240 μ l absolutního etanolu. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě 3 min a poté byly centrifugovány 5 min při 2000 g a 4 °C.
- Supernatant byl slit a peleta byla promyta 3x pomocí 800 μ l 0,1M citrátu sodného. Ke vzorkům bylo připipetováno dané množství citrátu sodného a ty pak byly 30 min ponechány na převraceče, poté byly centrifugovány 5 min při 2 000 g a 4 °C. Supernatant byl slit.
- K peletám bylo připipetováno 1 200 μ l 75% etanolu a vzorky byly 20 min ponechány na převraceče, poté byly centrifugovány 5 min při 2 000 g a 4 °C. Supernatant byl slit.
- Pelety byly vysušeny při laboratorní teplotě na sterilním ubrousku cca 20 min.
- K peletám bylo připipetováno 30 μ l 8 mM NaOH a 2 μ l HEPES pufru. Pelety byly resuspendovány pomocí pipetování.

4.7.1.2.3. Izolace DNA pomocí hydroxidu sodného (Floyd et al., 2002)

- Jeden jedinec byl umístěn pomocí nematologické jehly do mikrozkušavky pro PCR.
- Do mikrozkušavky bylo připipetováno 20 μ l 0,25 M NaOH.
- Mikrozkušavky byly inkubovány v termostatu 24 h při 25 °C.
- Poté byly zahřáty na 3 min na 99 °C a nechány vychladnout při pokojové teplotě.

- Mikrozkušavky byly centrifugovány a NaOH byl neutralizován 4 μ l 1 M HCL, 10 μ l 0,5 M Tris-HCL (pH 8) a 5 μ l 2% Triton X-100.
- Mikrozkušavky byly opětovně zahřáty na 99 °C po dobu 3 min, zchlazeny při pokojové teplotě a stočeny.
- Takto vyizolovaná DNA byla použita pro PCR.

4.7.1.2.4. Izolace DNA pomocí lyzačního pufru (konvenční izolace k izolaci FTA)

- Do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml bylo napipetováno 20 μ l destilované vody, poté byla do mikrozkušavky přemístěna pomocí nematologické jehly háďátka v potřebném počtu (5 a 10 jedinců).
- Poté bylo do mikrozkušavky připipetováno 50 μ l lyzačního pufru a obsah byl důkladně homogenizován pomocí minishakeru (Pelet Pestl mini shaker).
- Tlouček byl důkladně omyt 50 μ l lyzačního pufru a k homogenátu byl připipetován 1 μ l proteinasy K, obsah byl důkladně promíchán.
- Mikrozkušavky byly inkubovány v termostatu 1 h při 37 °C.
- Proteinasa K byla zdenaturována při 85 °C po dobu 5 min.
- Do mikrozkušavek bylo připipetováno ekvivalentní množství fenolu a chloroform:isoamylalkoholu (24:1).
- Mikrozkušavky byly důkladně vortexovány 15 min.
- Poté byly centrifugovány při 9000 g 10 min.
- Vrchní fáze byla odpipetována do nové mikrozkušavky.
- Bylo připipetováno ekvivalentní množství chloroformu.
- Vzorky byly opět vortexovány 15 min a centrifugovány jako v předešlém kroku a vrchní fáze byla opětovně přepipetována do nové mikrozkušavky.
- Bylo připipetováno ekvivalentní množství ledového isopropanolu a vzorky byly inkubovány přes noc při -25 °C.
- Vzorky byly centrifugovány opět při 9000 g 10 min.
- Supernatant byl vylit.
- Pelety byly 2x promyty 80% etanolem, centrifugovány při 9000 g 10 min. Supernatant byl vylit.
- Pelety byly usušeny při pokojové teplotě cca 20 min.
- Poté byly rozpuštěny ve 20 μ l TE pufru pH 8.

- Takto připravená DNA byla použita v PCR reakci.

Složení lyzačního pufru:

100 mM Tris-HCl [pH 8.0]

5 mM EDTA

200 mM NaCl

0.2% SDS

4 µg/ml proteinasy K

4.7.2. PCR (polymerázová řetězová reakce)

4.7.2.1. Primery

Při PCR byly použity specifické primery pro druhy *B. xylophilus* a *B. mucronatus*, tyto primery byly z ITS (internal transcribed spacer) oblasti genomu, oblasti, která kóduje rRNA (tab. 6).

Označení primerů	Sekvence (5'→3')	Délka amplifikovaného fragmentu	Teplota pro annealing
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>			
XF	ACGATGATGCGATTGGTGAC	557 (bp)	61,3 °C
XR	TATTGGTCGCGGAACAAACC		
<i>Bursaphelenchus mucronatus</i>			
MF	TCCGGCCATATCTCTACGAC	210 (bp)	61,3 °C
MR	GTTTCAACCAATTCCGAACC		

Tab. 6: Specifické primery pro PCR (Matsunaga and Togashi, 2004).

Pro PCR, která byla výchozím krokem k dalším analýzám byly použity nespecifické primery z oblasti ITS regionu (tab. 7).

Označení primerů	Sekvence (5'→3')	Délka amplifikovaného fragmentu	Teplota pro annealing
F (S18)	TTGATTAGGTCCCTGCCC TTT	různá délka pro každý druh	58 °C
R (S21)	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG		

Tab. 7: Nespecifické primery pro PCR (Braasch et al., 1999, 2004).

4.7.2.2. Reakční směs

Reagencie potřebné pro PCR byly napipetovány do mikrozkušavek o objemu 200 μ l umístěných v chladícím stojánku. DNA byla pipetována do víčka mikrozkušavek. K promísení obsahu byla použita stolní centrifuga těsně před umístěním do thermocykleru.

Množství reakční směsi bylo 25 μ l u specifické PCR a 50 μ l u nespecifické PCR, kde byl PCR produkt využit v dalších reakcích (tab.8).

Reagencie	Koncentrace	25,0 μ l	50 μ l
<i>Taq</i> buffer (Fermentas)	10x	2,5 μ l	5,0 μ l
MgCl ₂ (Fermentas)	25 mM	3,0 μ l	6,0 μ l
dNTP (Fermentas)	10 mM	0,5 μ l	1,0 μ l
Primer mix (F, R) (Sigma)	20 pmol/ μ l	0,4 μ l	0,8 μ l
<i>Taq</i> polymeráza (Fermentas)	5 u/ μ l	0,5 μ l	1,0 μ l
DNA		1,0-3,0 μ l	2,0-6,0 μ l
ddH ₂ O		do 25 μ l	do 50 μ l

Tab. 8: Reakční směs při použití *Taq* polymerázy.

4.7.2.3. PCR protokol

Amplifikace fragmentů DNA probíhala v thermocykleru MJ Research PTC 200 a Bio-Rad C 1000TM ThermalCycler (tab. 9, 10).

	Kroky	Teplota	Čas
	Počáteční denaturace	95 °C	2 min
35x	Denaturace	94 °C	1 min
	Annealing - nasedání	61,3 °C	30 s
	Elongace - prodlužování	72 °C	1 min
	Konečná elongace	72 °C	4 min
	Stop teplota	14 °C	∞

Tab. 9: PCR protokol pro primery XF, XR a MF a MR.

	Kroky	Teplota	Čas
	Počáteční denaturace	94 °C	2 min
35x	Denaturace	94 °C	1 min
	Annealing	58 °C	1 min
40x	Elongace	72 °C	1 min
	Konečná elongace	72 °C	20 min
	Stop teplota	14 °C	∞

Tab. 10: PCR protokol pro primery F (S18), R (S21), 35x v thermocykleru MJ Research a 40 x v thermocykleru Bio-Rad.

Výsledky amplifikace byly vizualizovány pomocí horizontální gelové elektroforézy a UV záření.

4.7.3. Real-time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)

Real-time PCR byla použita pro identifikaci druhu *Bursaphelenchus xylophilus*.

4.7.3.1. Primery a sonda

Značení sondy oproti publikaci bylo změněno na TET a TAMra. Ke konstrukci primerů byla použita oblast genomu Hsp70 (heat shock protein), tab. 11.

Označení	Sekvence (5'→3')
Bx F	TAAGATGTCTTTTACAGATGCCAAG
Bx R	GCCTGGACGACCTTGAAT
Sonda	[TET]ATTGGCCGCAAATTCGATGAACC[TAM]

Tab. 11: Použité primery a sonda pro real-time PCR (Leal et al., 2007).

4.7.3.2. Reakční směs pro real-time PCR

Pro standardizaci reakce byla použita DNA vyizolovaná pomocí přístroje InnuPure C12 z 200 jedinců rozpuštěná v 200 µl elučovacího pufru, tedy v 1 µl byla DNA rovna 1 jedinci. Ředění bylo 10 jedinců (10 µl DNA), 1 jedinec, 0,1, 0,01, 0,001 a 0,0001 jedince, Pro kvantifikaci byla použita DNA vyizolovaná z uměle infikovaného dřeva. Jako negativní kontrola byla použita voda (tab. 12).

Celkové množství reakční směsi bylo 25 µl.

Reagencie	Koncentrace	25,0 µl
qPCR mix - iTaq™ Universal Probes Supermix (BioRad)	2x	12,5 µl
Forward primer BxF (Fermentas)	0,7 µM	0,175 µl
Revers primer BxR (Fermentas)	0,5 µM	0,125 µl
Probe – sonda (Fermentas)	0,1 µM	0,025 µl
Izolovaná DNA		1,0-10 µl
ddH ₂ O		do 25 µl

Tab. 12: Reakční směs pro real-time PCR.

4.7.3.3. Real-time PCR protokol

Amplifikace DNA fragmentů probíhala v přístroji CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System firmy Bio-Rad (tab. 13).

	Kroky	Teplota	Čas
	Pre-inkubace	50 °C	2 min
	Počáteční denaturace	95 °C	10 min
45 x	Denaturace	94 °C	5 s
	Annealing - nasedání	62 °C	30 s

	Elongacec-prodlužování	72 °C	10 s
--	------------------------	-------	------

Tab. 13: real-time PCR protokol

Příprava vzorků pro real-time PCR probíhala ve sterilním prostředí, aby nedošlo ke kontaminaci cizorodou DNA.

4.7.4. Horizontální gelová elektroforéza

K separaci PCR produktů byl použit 1% a 1,5% agarózový gel. Před nanášením do agarózového gelu byly PCR produkty nejprve smíchány s barvivem (Loading dye), které obsahuje glycerol.

4.7.4.1. Příprava 1 a 1,5% agarózového gelu

- Bylo naváženo potřebné množství agarózy (př. pro 50 ml 1% gelu, 0,5 g agarózy a pro 1,5% gel 0,75 g agarózy) do Erlenmayerovy baňky.
- Agaróza byla smíchána s 1x TBE pufrem, vše bylo rozvařeno v mikrovlnné troubě, během varu byl gel několikrát promíchán.
- Gel byl zchlazen pod tekoucí vodou na 50-60 °C, poté byl přelit do speciální Erlenmayerovy baňky určené pro práci s ethidium bromidem.
- Do Erlenmayerovy baňky byl připipetován ethidium bromid v množství 5 % objemu gelu (0,5 µl/ml).
- Takto upravený gel byl nalit do vaničky pro elektroforézu, která byla utěsněna gumami a byl do ní předem zasunut hřebínek pro vytvoření jamek.
- Gel byl ponechán polymerizovat při laboratorní teplotě přibližně 30 min.

Složení TBE pufru:

1 l TBE 5x

TRIS - 54,5 g

Kyselina boritá - 27,5 g

EDTA - 3,65 g

Upravit na pH 8,0

Takto připravený zásobní roztok byl 5x koncentrovaný a byl uchováván při 4 °C.

4.7.4.2. Sestavení elektroforetické aparatury

- Z vaničky s gelem byly odstraněny těsnicí gummy a hřebínek pro vytvoření jamek byl opatrně vysunut.
- Vanička byla umístěna do aparatury pro horizontální elektroforézu.
- Vanička byla zalita 1x TBE pufrem, hladina pufru byla minimálně 2 mm nad gelem.
- Do gelu byly napipetovány PCR produkty, ke kterým bylo nejprve přidáno barvivo (Loading dye) - 5 μ l produktu a 1 μ l barviva (5:1). Pro další zpracování PCR produktů po separaci bylo pipetováno až 50 μ l produktu smíchaných s barvou (5:1).
- Elektroforetická aparatura byla zakryta víkem a připojena ke zdroji elektrického napětí, separace probíhala při konstantním napětí 80 V.

4.7.4.3. Vizualizace agarózového gelu

Molekuly DNA nejsou pouhým okem viditelné, proto byl do gelu přidán ethidium bromid, který se váže na molekuly DNA a je možné ho vizualizovat pomocí UV záření.

- Aparatura pro horizontální elektroforézu byla odpojena od zdroje elektrického proudu.
- Vanička s gelem byla vyjmuta z aparatury a gel byl umístěn na transiluminátor (Syngene-In-Genius, Syngene Bio Imaging).
- Bylo zavřeno víko s UV filtrem, případně dvířka a zapnuto UV záření.
- Pro fotografování bylo využito počítačového programu (Gene Snap from Syngene).

5. Výsledky

5.1. Biologický materiál

5.1.1. Biologický materiál z laboratorního chovu

Hád'átka chovaná na *B. cinerea*.

Pro krátkodobé uchovávání populací *B. xylophilus* se osvědčily populace chované v Petriho miskách, ovšem z dlouhodobého hlediska to bylo neuspokojivé, proto se přešlo na chov ve skleněných skleničkách, kde je přežívání hád'átek výrazně delší, je zde větší množství MEA a je zde vyšší a stabilnější vlhkost.

Extrakce hád'átek ze dřeva a kultur na *Botrytis cinerea*:

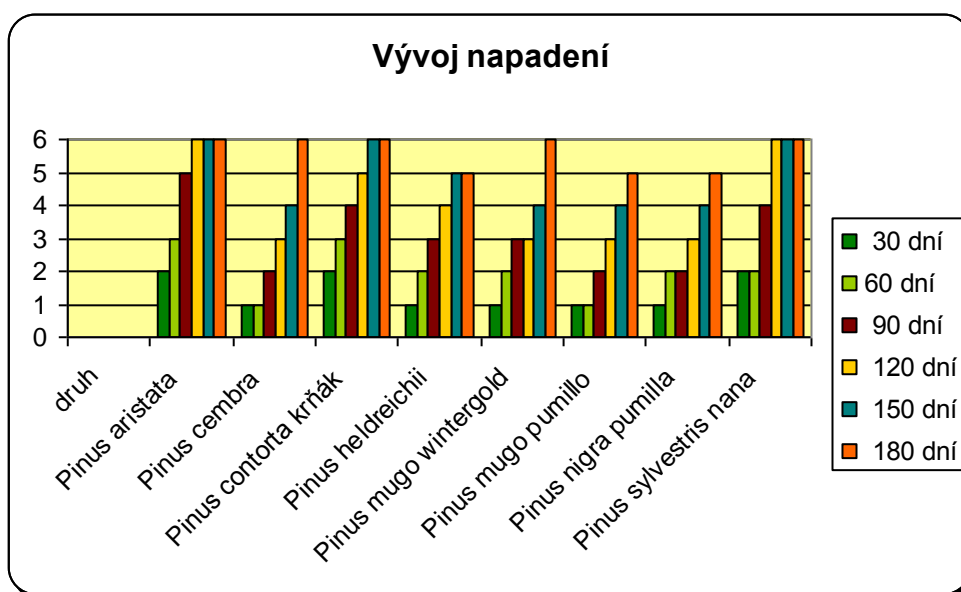
Pro extrakci hád'átek ze dřeva a populací chovaných na *B. cinerea* se osvědčila více Baermannova nálevková metoda. Získané suspenze hád'átek byly čistší než u metody pomocí plavících misek a také výtěžnější. Tato metoda byla také jednodušší neboť zde stačilo suspenzi odputit a nemusel být celý obsah přeléván přes nematologické síto.

5.2. Testování náchylnosti druhů borovic pěstovaných v ČR k hád'átku *B. xylophilus*

5.2.1. Testování sazenic

Termín hodnocení	30 dní	60 dní	90 dní	120 dní	150 dní	180 dní
Druh	Stupeň poškození					
<i>Pinus aristata</i>	2	3	5	6	6	6
<i>Pinus cembra</i>	1	1	2	3	4	6
<i>Pinus contorta</i> Krňák	2	3	4	5	6	6
<i>Pinus heldreichii</i>	1	2	3	4	5	5
<i>Pinus mugo</i> Wintergold	1	2	3	3	4	6
<i>Pinus mugo</i> Pumillo	1	1	2	3	4	5
<i>Pinus nigra</i> Pumilla	1	2	2	3	4	5
<i>Pinus sylvestris</i> Nana	2	2	4	6	6	6

Tab.14: Vývoj napadení na jednotlivých druzích a kultivarech borovic



Graf 1: Vývoj napadení jednotlivých druhů a kultivarů borovic, osa x druhy borovic, osa y stupeň poškození: 0 zdravý strom, 6 odumřelý strom.

Nejvíce náchylné k napadení byly *Pinus aristata*, *P. sylvestris nana* a *P. contorta krňák*, tyto druhy také nejdříve dosáhly nejvyššího stupně napadení (tab. 14, graf 1). Nejodolnější se jevily druhy *P. mugo pumillo*, *P. nigra pumilla* a *P. heldreichii*, ostatní druhy neměly v první fázi napadení tak progresivní vývoj, ale nakonec také odumřely (obr. 13-18).

5.2.2. Testování atraktivity dřeva na agarových plotnách

Tento postup se neosvědčil, i přes sterilizaci dřeva a přítomnost fungicidních složek v médiu, docházelo velice rychle k růstu různých druhů hub. V průměru také docházelo k infestaci dřevních špalíčků jen v průměru u 1/4 vzorků, tedy 1 špalíček ze 4 na Petriho misce, byl napaden háďátko *B. xylophilus* (obr. 19,20).

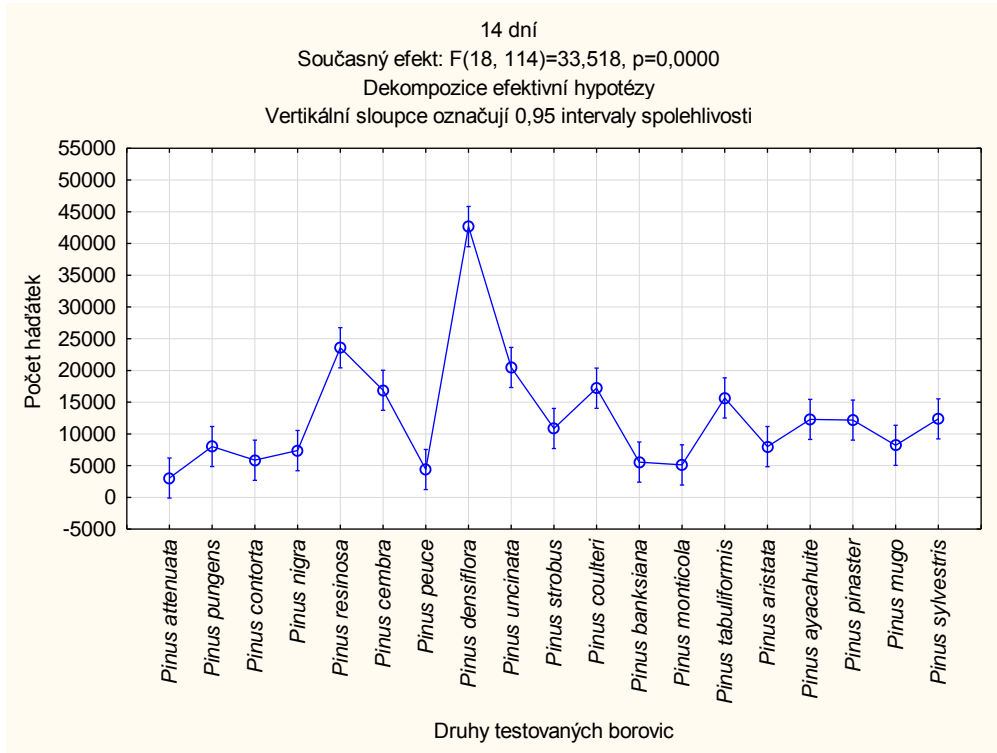
5.2.3. Testování náchylnosti v segmentech větví

Při testování byla použita metoda obalení voskovou páskou na obou koncích a na místě infestace, při této metodě byl sice postup infestace pomalejší, ale bylo zabráněno úniku háďátek ze segmentů.

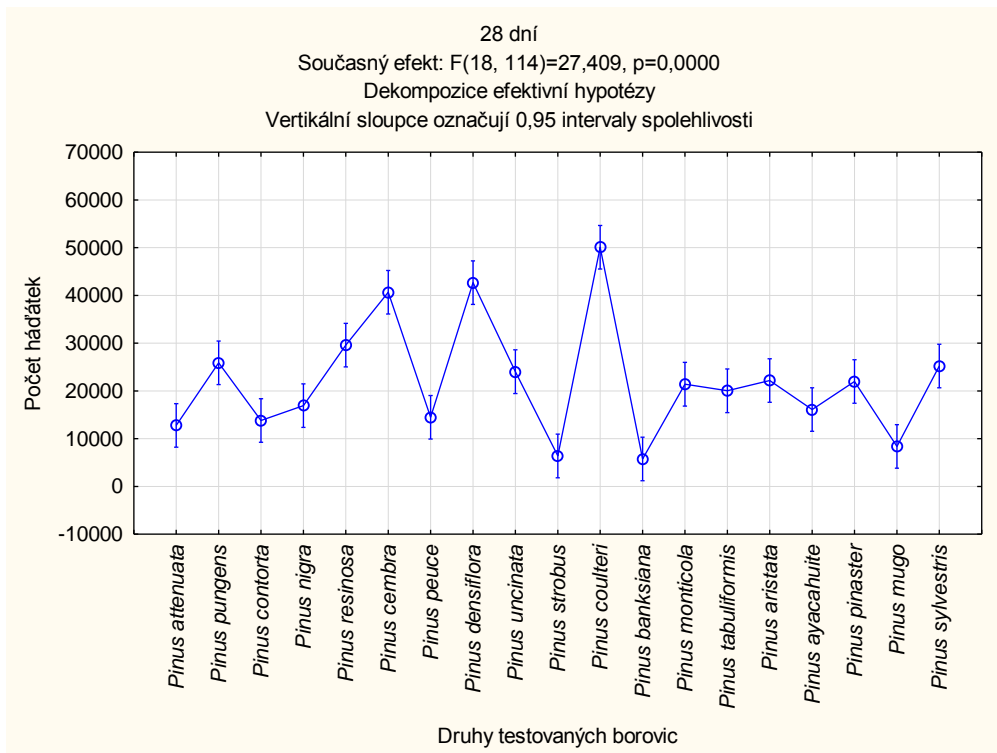
K nejvyššímu namnožení již po 14 dnech došlo u druhu *P. densiflora*, po 28 dnech však již k většímu nárůstu nedošlo, počet háďátek se stále pohyboval okolo 40000 jedinců na jeden segment větve, přesto to však byl druhý nejvyšší počet. Nejvyššího počtu háďátek po 28 dnech dosáhla *P. coulteri* a to přibližně 50000, po 14 dnech byl počet háďátek mnohem nižší jen přibližně 17000 jedinců. Třetím druhem s nejvyšším počtem háďátek po 28 dnech byla *P. cembra*.

Nejnižších hodnot počtu háďátek byl po 28 dnech zaznamenán u *P. banksiana*, po 14 i 28 dnech byl zjištěn téměř stejný počet háďátek. U naší původní borovice *P. mugo* byl také zaznamenán 14 i 28 dnech téměř stejný výsledek, jeden z nejnižších, počet háďátek nedosáhl ani 10000. Jediným druhem, u kterého byl zaznamenán pokles po 28 dnech byl druh *P. strobus*, zde se ukázala obranyschopnost tohoto druhu (graf 2 a 3, tab.15). *P. strobus* a *P. banksiana* patří k severoamerickým druhům borovic, které jsou původním hostitelem háďátka

borovicového. Ve všech segmentech větví zkoumaných druhů došlo k namnožení hád'átka *B. xylophilus* mnohonásobně oproti počátečnímu množství. Hmotnost segmentu neměla vliv na počet hád'átek.



Graf 2: Vývoj napadení segmentů po 14, analýza rozptylu (graf programu Statistica).



Graf 3: Vývoj napadení segmentů po 28 dnech, analýza rozptylu (graf programu Statistica).

Druh	Počáteční počet háďátek	Počet háďátek po 14 dnech: průměr ± SO	Počet háďátek po 28 dnech: průměr ± SO
<i>Pinus attenuata</i>	500	3051,71 ± 2170,93	12785,71 ± 2527,10
<i>Pinus pungens</i>	500	8013,71 ± 2751,56	25902,86 ± 3905,76
<i>Pinus contorta</i>	500	5864,29 ± 1187,36	13814,29 ± 5749,61
<i>Pinus nigra</i>	500	7376,14 ± 1069,95	16914,29 ± 3843,73
<i>Pinus resinosa</i>	500	23579,57 ± 3556,76	29600 ± 6879,04
<i>Pinus cembra</i>	500	16874,71 ± 4281,64	40674,29 ± 14021,89
<i>Pinus peuce</i>	500	4392,29 ± 1251,16	14494,29 ± 2568,65
<i>Pinus densiflora</i>	500	42671,43 ± 10252,14	42680 ± 4124,08
<i>Pinus uncinata</i>	500	20477,86 ± 6975,95	24037,14 ± 4081,53
<i>Pinus strobus</i>	500	10857,14 ± 5489,21	6394,29 ± 3196,22
<i>Pinus coulteri</i>	500	17203,57 ± 2954,11	50097,14 ± 12994,11
<i>Pinus banksiana</i>	500	5562,86 ± 2393,98	5754,29 ± 1368,34
<i>Pinus monticola</i>	500	5122,86 ± 1193,17	21417,14 ± 7923,97
<i>Pinus tabuliformis</i>	500	15662,86 ± 7118,42	20042,86 ± 2459,44
<i>Pinus aristata</i>	500	8005,71 ± 1786,05	22177,14 ± 6780,99
<i>Pinus ayacahuite</i>	500	12285,71 ± 5102,1	16104,29 ± 4804,68
<i>Pinus pinaster</i>	500	12180 ± 1733,36	21984,29 ± 1733,36
<i>Pinus mugo</i>	500	8202,86 ± 1061,41	8388,57 ± 780,59
<i>Pinus sylvestris</i>	500	12368,57 ± 2771,33	25232,86 ± 4371,73

Tab. 15: Průměrné množství háďátek v segmentech větví po 14 a 28 dnech ± směrodatná odchylka (vypočítáno pomocí programu Statistica).

5.3. Metody monitorování přenašečů – brouků z čeledi *Cerambycidae*

5.3.1. Místa monitorování přenašečů

V okrese Hodonín u obce Hovorany byli odchyceni dospělci *Monochamus galloprovincialis* (obr. 21), na ostatních místech monitorování viz obr. 19 byly odebrány pouze larvy.

5.3.2. Metody monitorování přenašečů

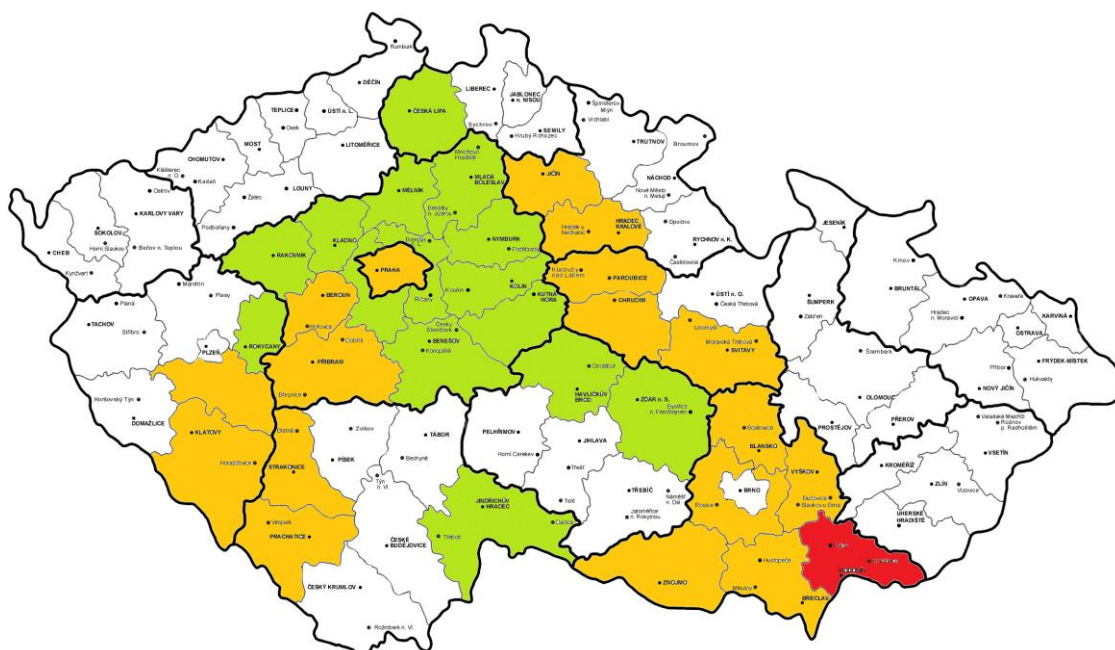
- Pokud byli v prostředí přítomni dospělci brouků v hojném počtu, tak se nejvíce osvědčila metoda pomocí individuálního sběru, byla nejméně náročná na čas i vybavení.
- Metoda za použití borových lapáků s terpentýnovým olejem byla časově náročná a nepříliš účinná.
- Metoda s použitím lapačů Galloprotect, byla časově nenáročná. Jednalo se jen o nainstalování lapače a jeho demontáže na konci sezóny, instalace lapače monitorovala celou sezónu. Bohužel se tento lapač neosvědčil, nezachytili se do něj žádní jedinci rodu *Monochamus*. Lapače byly umístěny v lokalitě poblíž Rohatce.
- Bylo odchyceno 12 dospělců a 38 larev, 10 dospělců bylo odchyceno při individuálním odběru, 2 dospělci při nastaržení lapáků.

V žádném dospělci ani larvě nebylo nalezeno žádné hád'átko.

5.4. Metody monitorování hád'átek rodu *Bursaphelenchus*

5.4.1. Místa monitorování hád'átek

Lokality odběru jsou shodné jako u monitorování přenašečů (obr. 18).



Obr. 18: Výsledky monitorování ČR, červeně je vyznačeno území s výskytem háďátek rodu *Bursaphelenchus*, žlutě - místa s výskytem prochlých porostů a stromů napadených brouky z čeledi *Cerambycidae* a zeleně - oblasti se zdravými porosty.

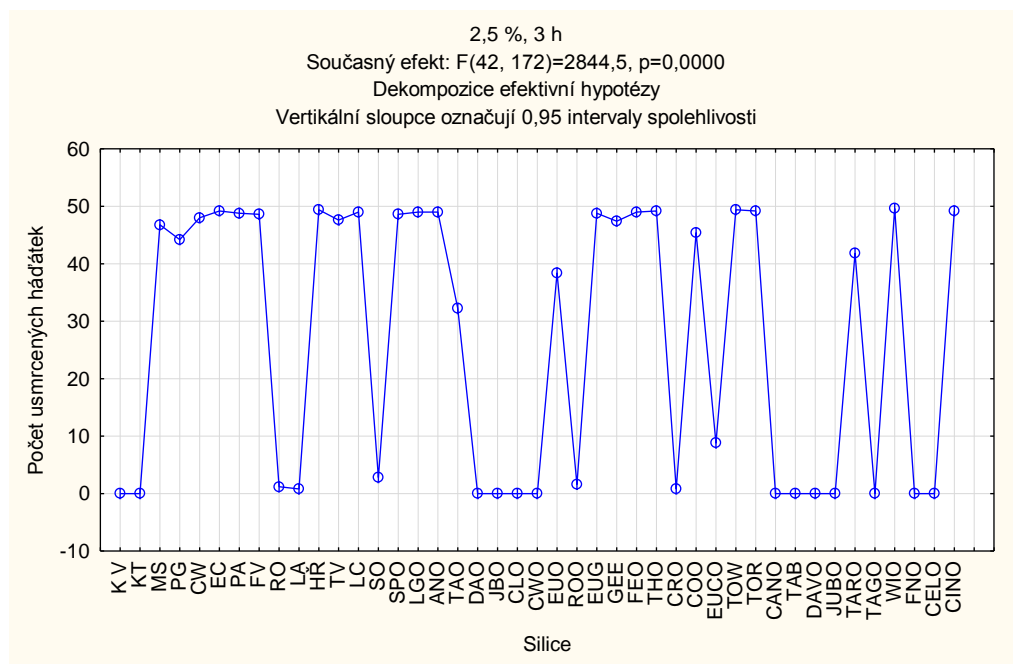
5.4.2. Metody monitorování háďátek

Metody monitorování se všechny velice osvědčily. Velkým přínosem byla účast kolegy stromolezce, neboť díky jeho příspěví mohla být infestace odhalena v ranější fázi.

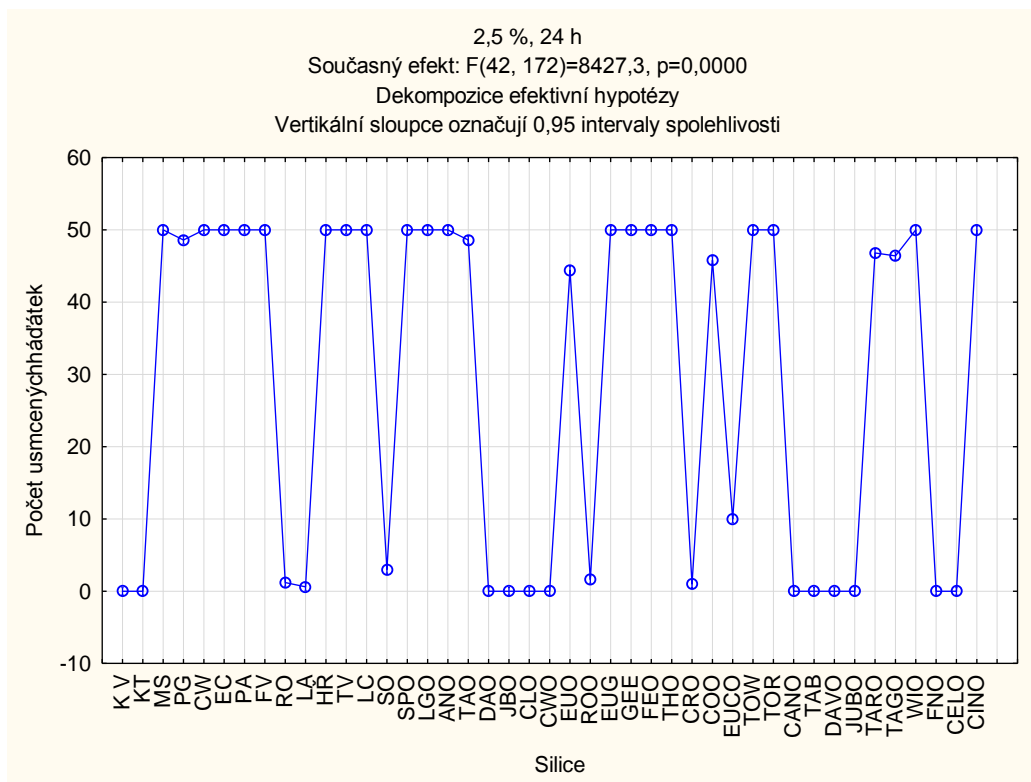
Z lokalit, na kterých probíhal monitoring, byl pozitivní výskyt háďátek rodu *Bursaphelenchus* zjištěn pouze v okrese Hodonín (obr. 22-27). Na některých z ostatních lokalit se vyskytovaly prochlé porosty, ale tento rod zde nebyl zjištěn. Většina zdravých porostů, byly porosty smíšené, bez převládajícího podílu borovic. Z ostatních rodů háďátek nalezených při monitoringu byl nejčastěji zjištěn rod *Ditylenchus*.

5.5. Vývoj a ověřování nových postupů ochrany proti háďátku *B. xylophilus*

5.5.1. Ověřování nematocidních účinků silic na háďátko *B. xylophilus*



Graf 4: Účinnost 2,5% koncentrace silic po 3 h, analýza rozptylu (graf programu Statistica)



Graf 5: Účinnost 2,5% koncentrace silic po 24 h, analýza rozptylu (graf programu Statistica).

Mezi účinky jednotlivých esenciálních olejů při koncentraci 2,5 % je významný statistický rozdíl. Silice *Mentha spicata*, *Pelargonium graveolens*, *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus citriodora*, *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris*, *Litsea cubeba*, Spearmint oil, Lemongrass oil, Anise oil, Terragon oil, Eucalyptus oil, Eugenol, Geranium extract, Fennel oil, Thyme oil, Cornmint oil, Thyme oil white, Thyme oil red, Terragon oil II, Tagetes oil (ten byl účinný až po 24 h), Wintergreen oil, Cinnamon oil byly neúčinnější.

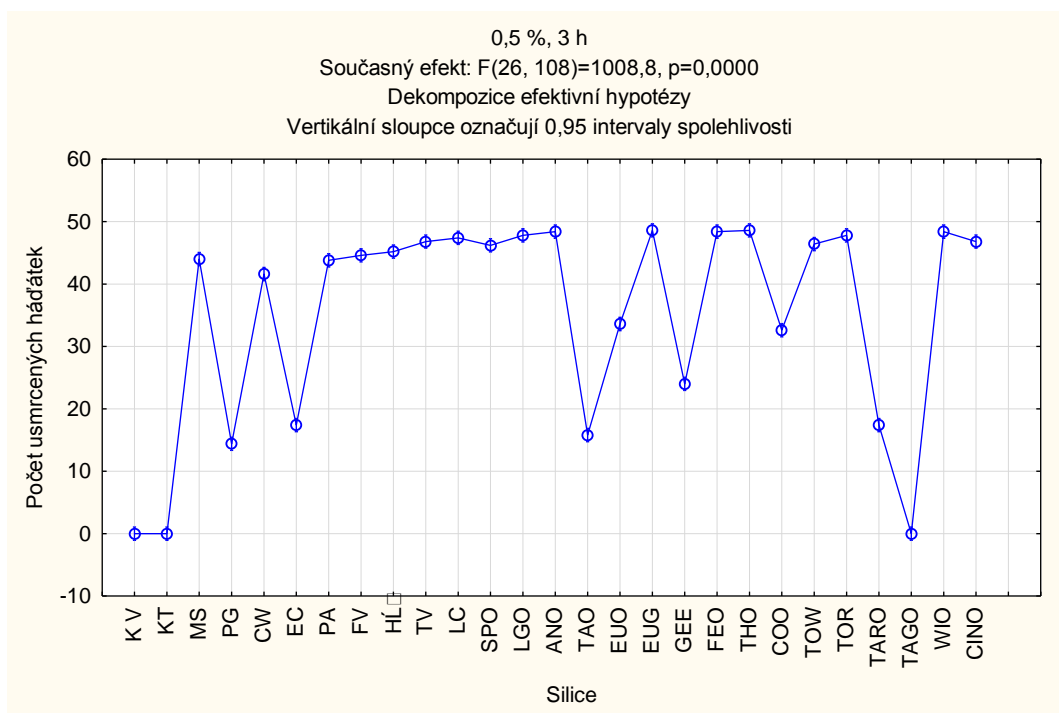
Silice	Zkr.	Koncentrace silice	Počáteční počet háďátek	Počet mrtvých háďátek (průměr ± SO)	
				Doba expozice v hodinách	
				3	24
K voda	KV	0%	50	0 ± 0	0 ± 0
K Tween	KT	0%	50	0 ± 0	0 ± 0
<i>Mentha spicata</i>	MS	2,5 %	50	46,8 ± 1,79	50 ± 0
<i>Pelargonium graveolens</i>	PG	2,5 %	50	44,2 ± 2,39	48,6 ± 1,14
<i>Cymbopogon winterianus</i>	CW	2,5 %	50	48 ± 1,23	50 ± 0
<i>Eucalyptus citriodora</i>	EC	2,5 %	50	49,2 ± 0,84	50 ± 0
<i>Pimpinella anisum</i>	PA	2,5 %	50	48,8 ± 0,84	50 ± 0
<i>Foeniculum vulgare</i>	FV	2,5 %	50	48,6 ± 1,14	50 ± 0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	RO	2,5 %	50	1,2 ± 0,84	1,2 ± 0,84
<i>Lavandula angustifolia</i>	LA	2,5 %	50	0,8 ± 0,84	0,6 ± 0,89

<i>Eugenia caryophyllus</i>	HŘ	2,5 %	50	49,4 ± 0,55	50 ± 0
<i>Thymus vulgaris</i>	TV	2,5 %	50	47,6 ± 1,14	50 ± 0
<i>Litsea cubeba</i>	LC	2,5 %	50	49 ± 1	50 ± 0
<i>Salvia officinalis</i>	SO	2,5 %	50	2,8 ± 0,84	3 ± 0,71
Spearmint oil	SPO	2,5 %	50	48,6 ± 0,89	50 ± 0
Lemongrass oil	LGO	2,5 %	50	49 ± 1	50 ± 0
Anise oil	ANO	2,5 %	50	49 ± 1	50 ± 0
Tarragon oil	TAO	2,5 %	50	32,2 ± 1,1	48,6 ± 1,34
Davana oil	DAO	2,5 %	50	0 ± 0	0 ± 0
Juniper berry oil	JBO	2,5 %	50	0 ± 0	0 ± 0
Cedar leaf oil	CLO	2,5 %	50	0 ± 0	0 ± 0
Cedar wood oil	CWO	2,5 %	50	0 ± 0	0 ± 0
Eucalyptus oil	EUO	2,5 %	50	38,4 ± 2,1	44,4 ± 1,14
Rosemary oil	ROO	2,5 %	50	1,6 ± 1,52	1,6 ± 1,14
Eugenol	EUG	2,5 %	50	48,8 ± 0,84	50 ± 0
Geranium extract	GEE	2,5 %	50	47,4 ± 1,14	50 ± 0
Fennel oil	FEO	2,5 %	50	49 ± 1	50 ± 0
Thyme oil	THO	2,5 %	50	49,2 ± 0,84	50 ± 0
Croton oil	CRO	2,5 %	50	0,8 ± 0,84	1 ± 0,71
Cornmint oil	COO	2,5 %	50	45,4 ± 1,14	45,8 ± 0,84
Eucalyptus oil II	EUCO	2,5 %	50	8,8 ± 0,84	10 ± 1,23
Thyme oil white	TOW	2,5 %	50	49,4 ± 0,55	50 ± 0
Thyme oil red	TOR	2,5 %	50	49,2 ± 0,84	50 ± 0
Canaga oil	CANO	2,5 %	50	0 ± 0	0 ± 0
Thujone alfa-beta	TAB	2,5 %	50	0 ± 0	0 ± 0
Davana oil II	DAVO	2,5 %	50	0 ± 0	0 ± 0
Juniper berry oil II	JUBO	2,5 %	50	0 ± 0	0 ± 0
Tarragon oil II	TARO	2,5 %	50	41,8 ± 2,17	46,8 ± 1,3
Tagetes oil	TAGO	2,5 %	50	0 ± 0	46,4 ± 1,67
Wintergreen oil	WIO	2,5 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
Fir needle oil	FNO	2,5 %	50	0 ± 0	0 ± 0
Cedar leaf oil II	CELO	2,5 %	50	0 ± 0	0 ± 0
Cinnamon oil	CINO	2,5 %	50	49,2 ± 0,84	50 ± 0

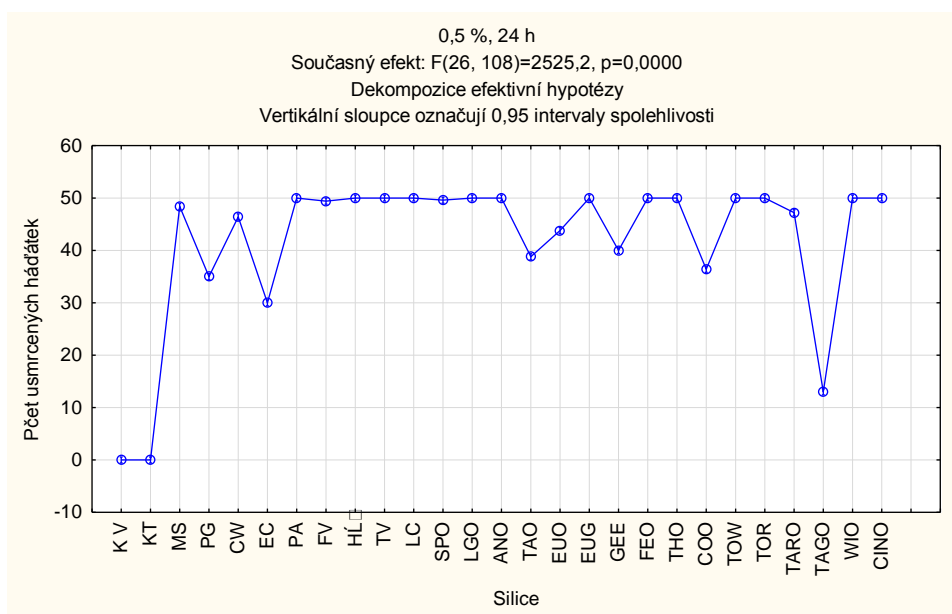
Tab.16: Průměrný počet mrtvých háďátek při 2,5% koncentraci silice ± směrodatná odchylka (vypočítáno pomocí programu Statistica).

Z výsledků testování 2,5% koncentrace silic byly vybrány nejúčinnější silice pro testování nižších koncentrací (graf 4, 5, tab 16). Silice získávané z jehličnanů byly dle předpokladu neúčinné. Silice od různých výrobců neměly výrazně rozdílný účinek, jen eukalyptová silice se výrazně lišila, nejlepší účinnost měla od firmy Salus a firmy Sigma a nejslabší ze zdroje od Ing. O. Doudy, Ph.D.. Silice z rostliny *Tagetes* (aksamitník) jako jediná neprokázala po 3 h žádnou účinnost, ale po 24 h při této koncentraci byla účinnost značně

zvýšena. Silice se stoprocentní účinnosti byly: *Mentha spicata*, *Pelargonium graveolens*, *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus citriodora*, *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare*, *Eugenia caryophyllum*, *Thymus vulgaris*, *Litsea cubeba*, Spearmint oil, Lemongrass oil, Eugenol, Geranium extract, Fennel oil, Thyme oil, Thyme oil white a red, Wintergreen oil a Cinnamon oil.



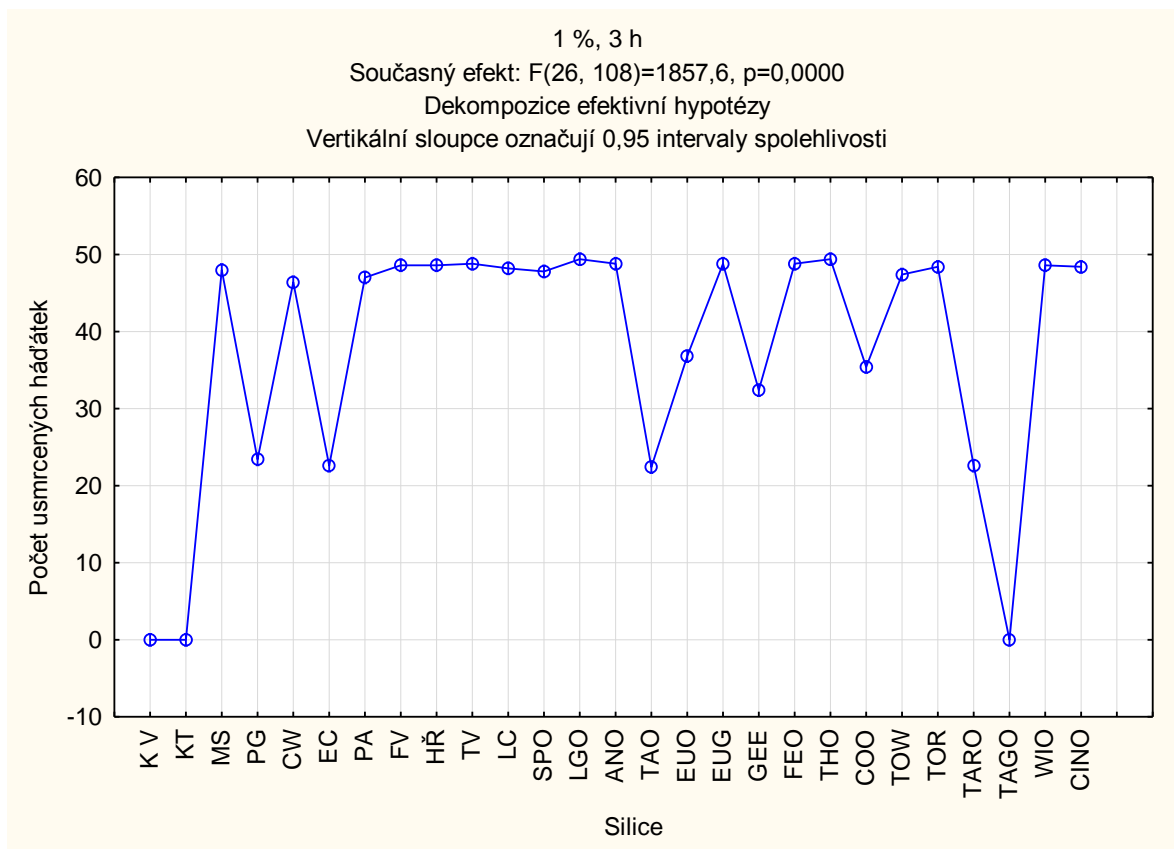
Graf 6: Účinnost 0,5% koncentrace silic po 3 h, analýza rozptylu (graf programu Statistica)



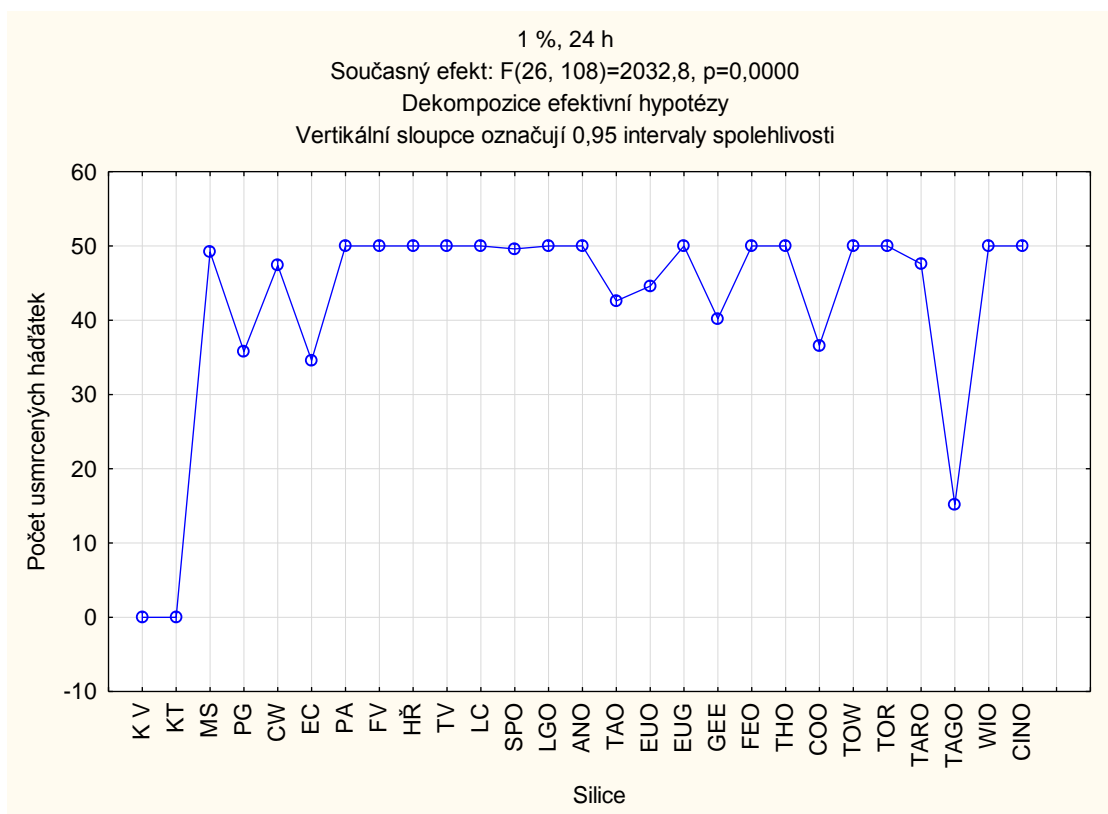
Graf 7: Účinnost 0,5% koncentrace silic po 24 h, analýza rozptylu (graf programu Statistica).

Silice	Koncentrace silice	Počáteční počet háďátek	Počet mrtvých háďátek (průměr ± SO)	
			Doba expozice v hodinách	
			3	24
KV	0 %	50	0 ± 0	0 ± 0
KT	0 %	50	0 ± 0	0 ± 0
MS	0,5 %	50	44 ± 2,35	48,4 ± 1,14
PG	0,5 %	50	14,4 ± 2,1	35 ± 1,58
CW	0,5 %	50	41,6 ± 1,67	46,4 ± 0,55
EC	0,5 %	50	17,4 ± 1,14	30 ± 1
PA	0,5 %	50	43,8 ± 1,92	50 ± 0
FV	0,5 %	50	44,6 ± 1,14	49,4 ± 0,55
HŘ	0,5 %	50	45,2 ± 1,64	50 ± 0
TV	0,5 %	50	46,8 ± 0,84	50 ± 0
LC	0,5 %	50	47,4 ± 0,55	50 ± 0
SPO	0,5 %	50	46,2 ± 1,3	49,6 ± 0,55
LGO	0,5 %	50	47,8 ± 0,84	50 ± 0
ANO	0,5 %	50	48,4 ± 0,55	50 ± 0
TEO	0,5 %	50	15,8 ± 1,64	38,8 ± 1,3
EUO	0,5 %	50	33,6 ± 1,52	43,8 ± 0,84
EUG	0,5 %	50	48,6 ± 0,55	50 ± 0
GEE	0,5 %	50	24 ± 1,73	40 ± 1
FEO	0,5 %	50	48,4 ± 0,55	50 ± 0
THO	0,5 %	50	48,6 ± 0,55	50 ± 0
COO	0,5 %	50	32,6 ± 1,14	36,4 ± 0,89
TOW	0,5 %	50	46,4 ± 0,55	50 ± 0
TOR	0,5 %	50	47,8 ± 0,84	50 ± 0
TERO	0,5 %	50	17,4 ± 1,14	47,2 ± 0,45
TAGO	0,5 %	50	0 ± 0	13 ± 1,23
WIO	0,5 %	50	48,4 ± 0,55	50 ± 0
CINO	0,5 %	50	46,8 ± 0,84	50 ± 0

Tab. 17: Průměrný počet mrtvých háďátek při 0,5% koncentraci silice ± směrodatná odchylka (vypočítáno pomocí programu Statistica).



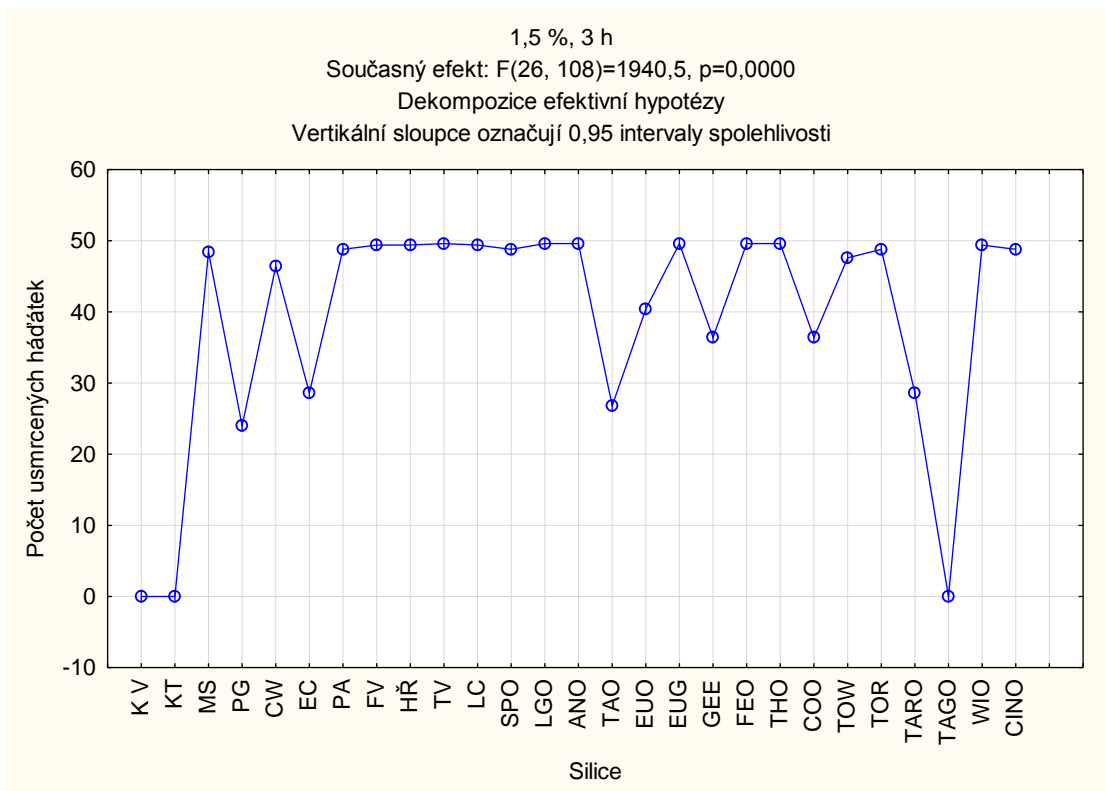
Graf 8: Účinnost 1% koncentrace silic po 3, analýza rozptylu (graf programu Statistica).



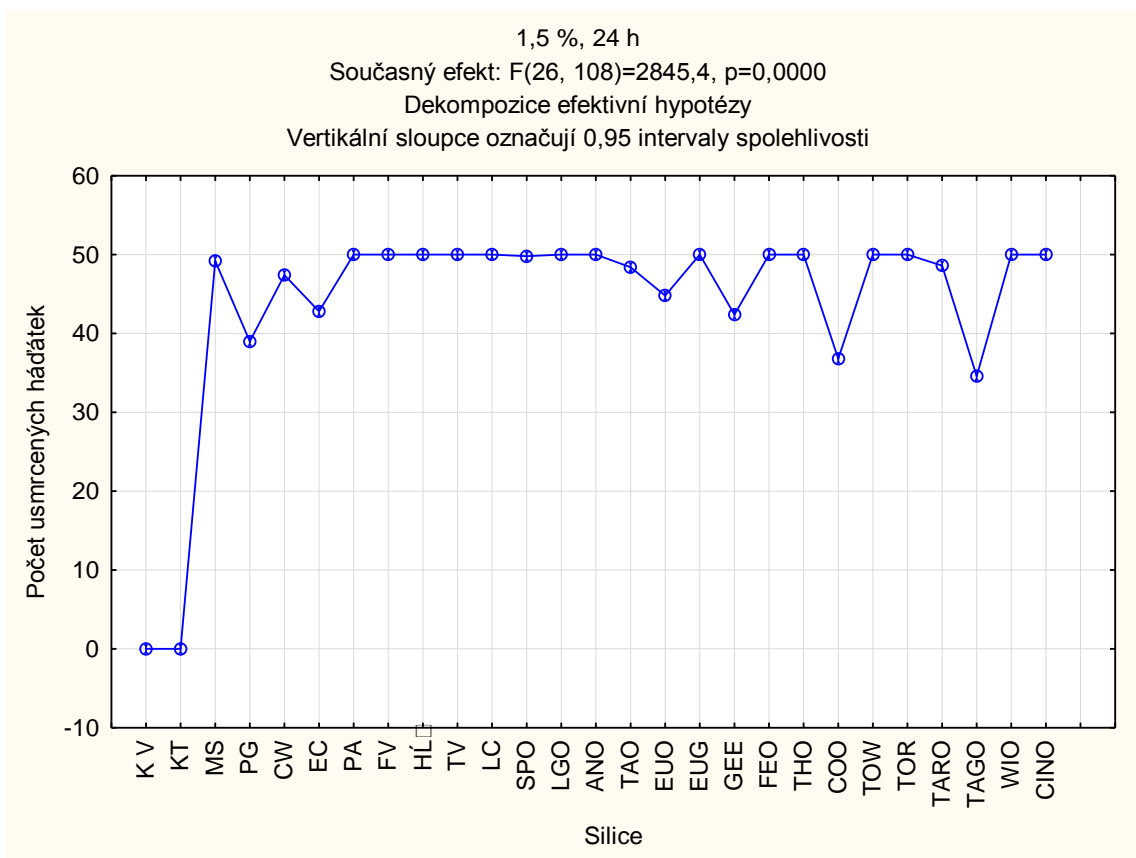
Graf 9: Účinnost 1% koncentrace silic po 24 h, analýza rozptylu (graf programu Statistica).

Silice	Koncentrace silice	Počáteční počet háďátek	Počet mrtvých háďátek (průměr ± SO)	
			Doba expozice v hodinách	
			3	24
KV	0 %	50	0 ± 0	0 ± 0
KT	0 %	50	0 ± 0	0 ± 0
MS	1 %	50	48 ± 1	49,2 ± 0,84
PG	1 %	50	23,4 ± 1,14	35,8 ± 1,48
CW	1 %	50	46,4 ± 0,55	47,4 ± 0,55
EC	1 %	50	22,6 ± 1,52	34,6 ± 1,14
PA	1 %	50	47 ± 1,23	50 ± 0
FV	1 %	50	48,6 ± 0,55	50 ± 0
HŘ	1 %	50	48,6 ± 0,55	50 ± 0
TV	1 %	50	48,8 ± 0,84	50 ± 0
LC	1 %	50	48,2 ± 1,3	50 ± 0
SPO	1 %	50	47,8 ± 0,84	49,6 ± 0,55
LGO	1 %	50	49,4 ± 0,55	50 ± 0
ANO	1 %	50	48,8 ± 0,84	50 ± 0
TEO	1 %	50	22,4 ± 1,14	42,6 ± 1,52
EUO	1 %	50	36,8 ± 0,84	44,6 ± 0,89
EUG	1 %	50	48,8 ± 0,84	50 ± 0
GEE	1 %	50	32,4 ± 1,14	40,2 ± 1,3
FEO	1 %	50	48,8 ± 0,84	50 ± 0
THO	1 %	50	49,4 ± 0,55	50 ± 0
COO	1 %	50	35,4 ± 0,55	36,6 ± 0,55
TOW	1 %	50	47,4 ± 0,55	50 ± 0
TOR	1 %	50	48,4 ± 0,55	50 ± 0
TERO	1 %	50	22,6 ± 1,52	47,6 ± 0,55
TAGO	1 %	50	0 ± 0	15,2 ± 1,92
WIO	1 %	50	48,6 ± 0,55	50 ± 0
CINO	1 %	50	48,4 ± 0,55	50 ± 0

Tab. 18: Průměrný počet mrtvých háďátek při 1% koncentraci silice ± směrodatná odchylka (vypočítáno pomocí programu Statistica).



Graf 10: Účinnost 1,5% koncentrace silic po 3 h, analýza rozptylu (graf programu Statistica).

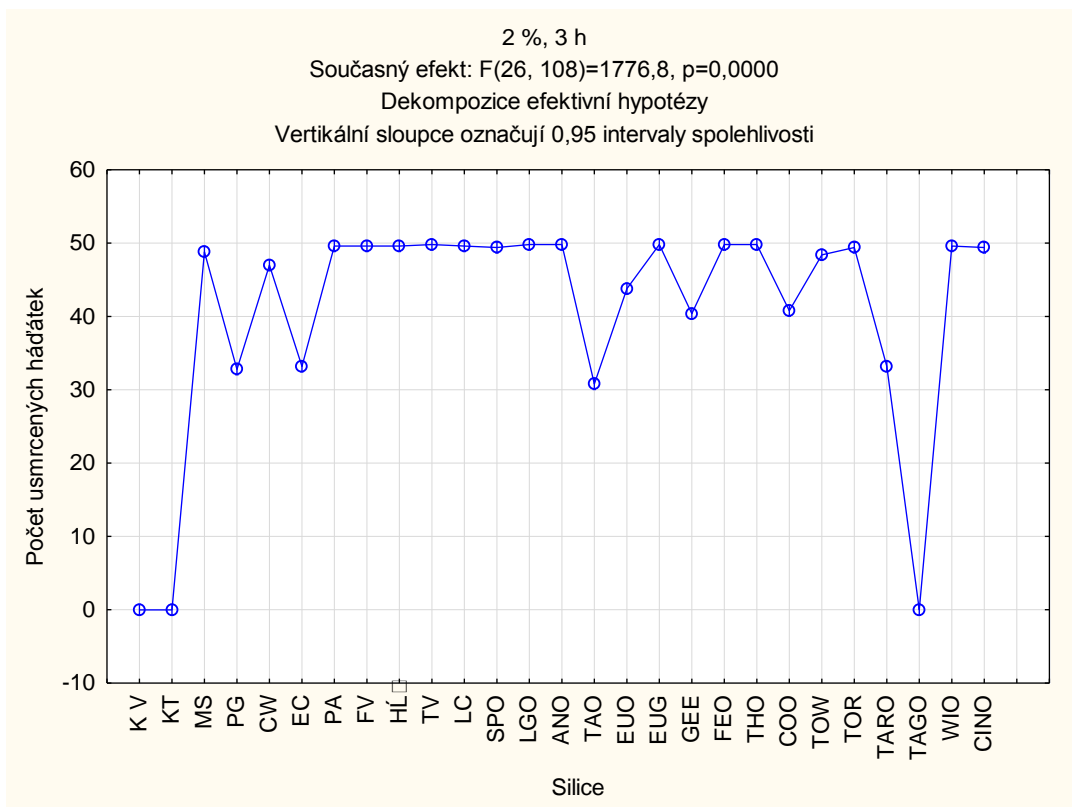


Graf

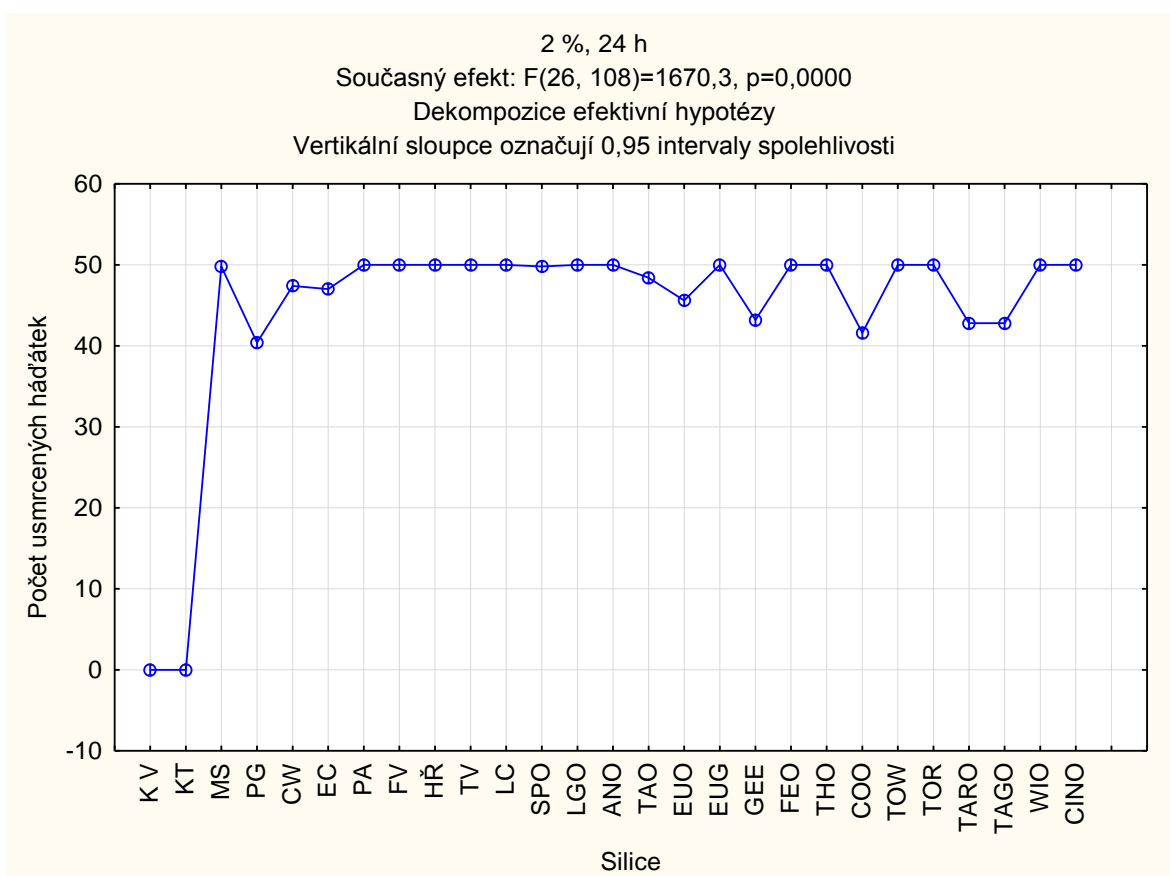
11: Účinnost 1,5% koncentrace po 24 h, analýza rozptylu (graf programu Statistica)

Silice	Koncentrace silice	Počáteční počet háďátek	Počet mrtvých háďátek (průměr ± SO)	
			Doba expozice v hodinách	
			3	24
KV	0 %	50	0 ± 0	0 ± 0
KT	0 %	50	0 ± 0	0 ± 0
MS	1,5 %	50	48,4 ± 0,55	49,2 ± 0,84
PG	1,5 %	50	24 ± 1,87	39 ± 1,23
CW	1,5 %	50	46,4 ± 1,34	47,4 ± 0,55
EC	1,5 %	50	28,6 ± 1,14	42,8 ± 1,48
PA	1,5 %	50	48,8 ± 0,84	50 ± 0
FV	1,5 %	50	49,4 ± 0,55	50 ± 0
HŘ	1,5 %	50	49,4 ± 0,55	50 ± 0
TV	1,5 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
LC	1,5 %	50	49,4 ± 0,84	50 ± 0
SPO	1,5 %	50	48,8 ± 0,84	49,8 ± 0,45
LGO	1,5 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
ANO	1,5 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
TEO	1,5 %	50	26,8 ± 0,84	48,4 ± 0,55
EUO	1,5 %	50	40,4 ± 1,14	44,8 ± 0,84
EUG	1,5 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
GEE	1,5 %	50	36,4 ± 1,14	42,4 ± 0,55
FEO	1,5 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
THO	1,5 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
COO	1,5 %	50	36,4 ± 0,55	36,8 ± 0,84
TOW	1,5 %	50	47,6 ± 0,55	50 ± 0
TOR	1,5 %	50	48,8 ± 0,84	50 ± 0
TERO	1,5 %	50	28,6 ± 1,14	48,6 ± 0,55
TAGO	1,5 %	50	0 ± 0	34,6 ± 1,14
WIO	1,5 %	50	49,4 ± 0,55	50 ± 0
CINO	1,5 %	50	48,8 ± 0,84	50 ± 0

Tab. 19: Průměrný počet mrtvých háďátek při 1,5% koncentraci silice ± směrodatná odchylka (vypočítáno pomocí programu Statistica).



Graf 12: Účinnost 2% koncentrace silic po 3 h, analýza rozptylu (graf programu Statistica).



Graf 13: Účinnost 2% koncentrace silic po 24 h, analýza rozptylu (graf programu Statistica).

Silice	Koncentrace silice	Počáteční počet háďátek	Počet mrtvých háďátek (průměr ± SO)	
			Doba expozice v hodinách	
			3	24
KV	0 %	50	0 ± 0	0 ± 0
KT	0 %	50	0 ± 0	0 ± 0
MS	2 %	50	48,8 ± 0,84	49,8 ± 0,45
PG	2 %	50	32,8 ± 0,84	40,4 ± 1,14
CW	2 %	50	47 ± 1	47,4 ± 0,55
EC	2 %	50	33,2 ± 1,92	47 ± 1
PA	2 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
FV	2 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
HŘ	2 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
TV	2 %	50	49,8 ± 0,45	50 ± 0
LC	2 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
SPO	2 %	50	49,4 ± 0,55	49,8 ± 0,45
LGO	2 %	50	49,8 ± 0,45	50 ± 0
ANO	2 %	50	49,8 ± 0,45	50 ± 0
TEO	2 %	50	30,8 ± 0,84	48,4 ± 0,55
EUO	2 %	50	43,8 ± 0,84	45,6 ± 1,14
EUG	2 %	50	49,8 ± 0,45	50 ± 0
GEE	2 %	50	40,4 ± 1,14	43,2 ± 1,48
FEO	2 %	50	49,8 ± 0,45	50 ± 0
THO	2 %	50	49,8 ± 0,45	50 ± 0
COO	2 %	50	40,8 ± 1,64	41,6 ± 1,67
TOW	2 %	50	48,4 ± 0,55	50 ± 0
TOR	2 %	50	49,4 ± 0,55	50 ± 0
TERO	2 %	50	33,2 ± 1,92	42,8 ± 1,48
TAGO	2 %	50	0 ± 0	42,8 ± 1,48
WIO	2 %	50	49,6 ± 0,55	50 ± 0
CINO	2 %	50	49,4 ± 0,55	50 ± 0

Tab. 20: Průměrný počet mrtvých háďátek při 2% koncentraci silice ± směrodatná odchylka (vypočítáno pomocí programu Statistica).

Stoprocentní účinnost již při 0,5% koncentraci vykázalo 13 silic: *Pimpinella anisum*, *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris*, *Litsea cubeba*, Lemongrass oil, Anise oil, Eugenol, Fennel oil, Thyme oil, Thyme oil white i red, Wintergreen oil a Cinnamon oil (graf 6, 7, tab. 17). Při 1% koncentraci ještě vykázala stoprocentní účinnost silice z *Foeniculum vulgare*

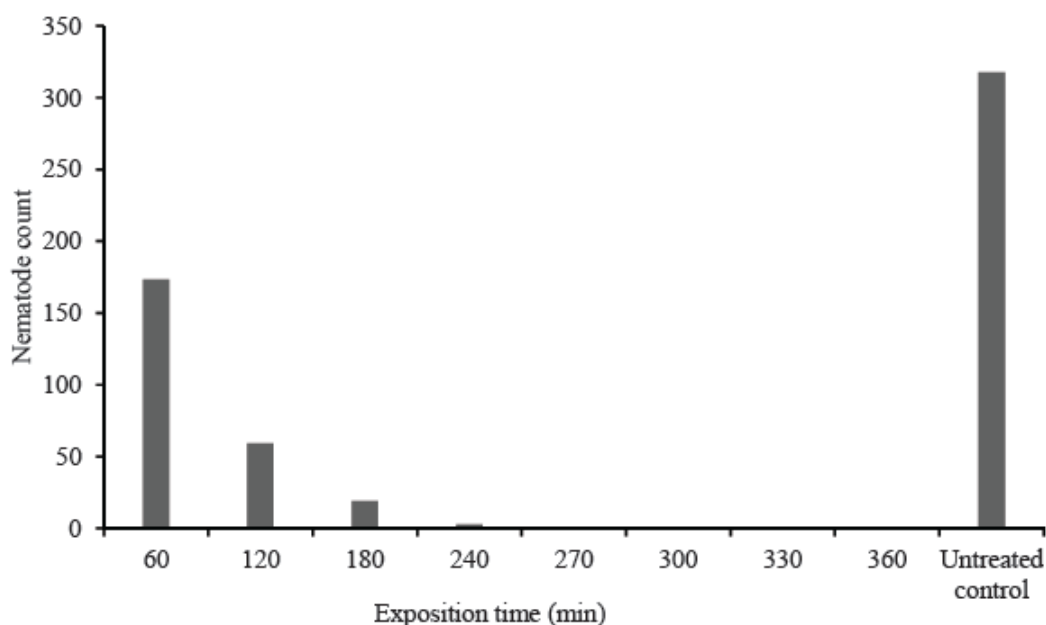
(graf 8, 9, tab. 18). Ostatní silice již i při vyšší koncentraci stoprocentní účinnosti nedosáhly (graf 10, 11, 12, 13, tab. 19, 20). Výsledky byly vcelku vyrovnané, v jednotlivých opakováních nebyly výrazné rozdíly.

5.5.2. Vývoj metody ošetření obalového dřeva pomocí kyanovodíku

5.5.2.1. Testování účinnosti HCN na modelovém organismu - háďátku *Caenorhabditis elegans*

Výsledky byly publikovány (Maňasová et al., 2012).

Již po 60 min. expozici došlo ke statisticky ($p \leq 0,05$) významnému snížení počtu háďátek o přibližně 50 %. Úmrtnost se s postupujícím časem zvyšovala a po 270 min dosáhla 100 % (graf 14).



Graf 14: Účinnost ošetření HCN na háďátka *C. elegans* (Maňasová et al., 2012)

5.5.2.2. Ošetření dřevních pilin s hád'átky *B. xylophilus*

Výsledky byly publikovány (Stejskal et al., 2014).

Obě dvě koncentrace efektivně redukovaly počet hád'átek, jen po 6 h ošetření a nižší teplotě i koncentraci HCN nedošlo ke statisticky významnému poklesu počtu hád'átek oproti kontrole.

Po 18 hodinách došlo u varianty 1 (20 g/m³ a 25 °C) k usmrcení všech hád'átek, u varianty 2 (10 g/m³ a 20 °C) došlo k usmrcení všech hád'átek až po 40 h (tab. 21).

Teplota (°C)	HCN		Počet přežívajících hád'átek po ošetření HCN (průměr ± SO)						
	koncentrace (g/m ³)	Inokulum	Doba expozice v hod						
			0	6	12	18	24	30	40
25	20	50	22,8 ± 4,8	4,6 ± 2,2	1,4 ± 0,7	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
25	20	450	336,4 ± 24,9	31,8 ± 9,6	2,8 ± 1,3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
20	10	450	216,8 ± 32,3	46,8 ± 8,7	8 ± 1,4	1,4 ± 0,5	0,2 ± 0,2	0 ± 0	0 ± 0
20	10	200	115,8 ± 12	21,2 ± 8	13 ± 3,1	0,6 ± 0,6	0 ± 0	0,2 ± 0,2	0 ± 0

Tab. 21: Počet přežívajících hád'átek po fumigaci HCN při dvou rozdílných koncentracích a teplotách.

4.5.2.3. Ošetření dřevěných špalků uvnitř s pilinami

Výsledky byly publikovány (Douda et al., přijato k publikaci).

Celková úmrtnost hád'átek byla 99-100 %. K usmrcení všech hád'átek došlo ve variantě s koncentrací HCN 12,3 g/m³ v délce expozice od 8-20 h, ve variantě 18,21 g/m³ v délce expozice 2,4,6,10 a 16-20 h, ve variantě 21,71 g/m³ v délce expozice 12,18 a 20 h a ve variantě 24,12 g/m³ v délce expozice 2,16,12 a 18 h. Ve všech případech, kdy některá hád'átka přežila, tak počet těchto přeživších hád'átek nebyl větší než čtyři jedinci (tab. 22).

S absorpcí HCN do dřevěných špalků docházelo neustále k poklesu HCN ve fumigační komoře. Koncentrace HCN uvnitř dřevěných špalků se výrazně liší, ale tyto rozdíly neovlivnily úmrtnost hád'átek (tab. 23, graf 15).

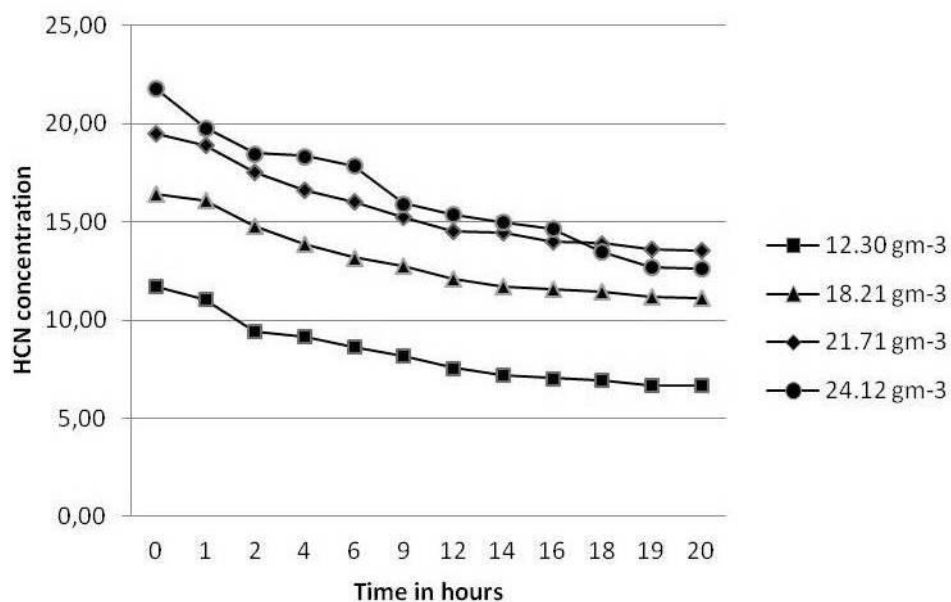
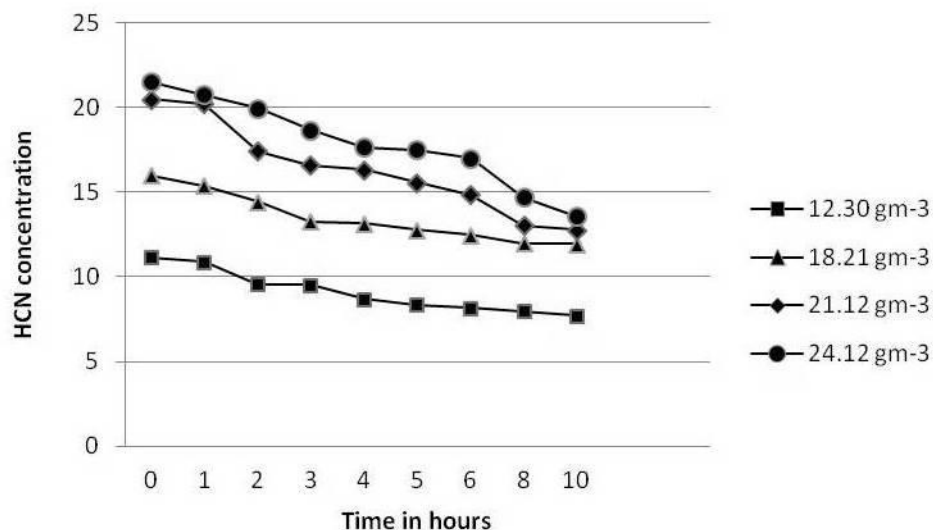
Koncentrace HCN g/m ³	Inokulum	Počet přeživajících hád'átek ± SO									
		Délka expozice v hodinách									
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
12,3	1200	0.25 ±	0.2 ± 0.2	0.2 ±	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
		0.25 (1)*	(1)	0.2 (1)							
18.21	1200	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.50 ±	0 ± 0	0.20 ±	0.20 ±	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
					0.29 (2)		0.20 (1)	0.20 (1)			
21.71	1200	0.60 ±	2.20 ±	1.40 ±	1.60 ±	2.40 ±	0 ± 0	0.20 ±	0.20 ±	0 ± 0	0 ± 0
		0.40 (2)	1.43 (2)	1.17 (2)	1.60 (1)	1.91 (3)		0.20 (1)	0.20 (1)		
24,12	1200	0 ± 0	1.50 ±	0 ± 0	0.25 ±	0.25 ±	0 ± 0	0.25 ±	1.00 ±	0 ± 0	0.75 ±
			0.96 (2)*		0.25 (1)*	0.25 (1)*		1.00 (1)	0.48 (2)*		
0 (control)	1200	1150 ±	1091 ±	1342 ±	1490 ±	1222 ±	1198 ±	1045 ±	1052 ±	1440 ±	1391 ±
		103 (5)	66 (5)	49 (5)	227 (5)	121 (5)	129 (5)	64 (5)	59 (5)	159 (5)	305 (5)
		Průměrná vlhkost pilin v %									
		32.30	30.99	29.74	28.48	27.28	26.06	24.94	23.84	22.72	21.69
		±1.10	±1.08	±1.06	±1.05	±1.02	±1.06	±0.99	±0.97	±0.94	±0.91

*Jen pro čtyři opakování

Tab. 22: Počet ± směrodatná odchylka přeživajících hád'átek v pilinách umístěných ve špalku po fumigaci HCN

Koncentrace HCN g/m ³		Ct produkt ošetření HCN (průměr ± SO)				
		Délka expozice v hodinách				
		2	4	6	8	10
12,3	Nehodnoceno	0.835 ± 0.246	1.776 ± 0.372	4.698 ± 1.712	12.379 ± 4.628	
18.21	Nehodnoceno	1.827 ± 0.555	7.344 ± 2.067	15.809 ± 3.157	19.600 ± 5.363	
21.71	Nehodnoceno	3.057 ± 0.946	7.701 ± 2.563	15.645 ± 4.202	21.700 ± 1.503	
24,12	Nehodnoceno	1.335 ± 0.383	12.601 ± 3.731	23.934 ± 3.869	30.641 ± 7.517	
Koncentrace HCN g/m ³		Ct produkt ošetření HCN (průměr ±)				
		Délka expozice v hodinách				
		12	14	16	18	20
12,3		5.631 ± 3.000	11.935 ± 1.656	13.213 ± 1.810	15.296 ± 1.165	18.665 ± 3.143
18.21		11.273 ± 2.383	13.162 ± 3.293	18.221 ± 3.727	22.852 ± 1.631	43.009 ± 7.116
21.71		22.732 ± 3.660	23.209 ± 2.188	37.032 ± 5.207	39.943 ± 3.479	44.566 ± 8.475
24,12		19.486 ± 4.794	41.652 ± 13.303	45.670 ± 9.873	57.868 ± 6.545	58.862 ± 0.006

Tab. 23 : Kumulativní Ct produkt, zvlášť vypočítaný pro délku expozice 4-10 a 12-20 h.



Graf 15: Grafy poklesu HCN v průběhu expozice při jednotlivých koncentracích, HCN bylo absorbováno dřevem.

5.6. Diagnostika háďátek rodu *Bursaphelenchus* na úrovni morfologických znaků

5.6.1. Tvorba trvalých preparátů

Fixace háďátek pomocí Ditlevsenova roztoku tzv. FAA:

Tento roztok se pro fixaci háďátek osvědčil nejlépe. Háďátka nebyla deformovaná, neměla zhroutené vnitřní struktury a byla dobře měřitelná (obr. 28, 29).

Fixace háďátek pomocí roztoku TAF:

Fixace pomocí tohoto roztoku se osvědčila pouze s delším převáděním do čistého glycerolu.

Fixace háďátek pomocí roztoku formaldehydu o koncentraci 4 % a 10 %:

Fixace pomocí různě koncentrovaného formaldehydu se osvědčila pouze s delším převáděním do čistého glycerolu (obr. 30, 31).

Pro přímé pozorování, bez tvorby trvalého preparátu, se osvědčily všechny metody fixace.

Převedení háďátek do čistého glycerolu :

Varianta 1:

Tato varianta vykazovala velice dobré výsledky pro všechny typy fixace, nejlepší však pro roztok FAA, háďátka z ostatních fixačních metod neměla struktury tak jasné a nezdeformované. Tato metoda je ovšem náročnější.

Varianta 2:

Tato varianta se osvědčila pouze u fixace pomocí FAA, pro ostatní postupy nebyla vhodná, vnitřní i vnější struktury byly zhroucené, neprosvětlitelné, jediné, co bylo zachováno, byla spikula.

5.6.2. Morfologické charakteristiky

Pokácený	C1	C3	C5	C8	C10	C13	C14	C15	C16	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24
Samec 1	1	4	2(3)	2	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 2	1	4	2(3)	2	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 3	1	4	2	2	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 4	1	4	2	2	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 5	1	4	3(2)	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Samec 6	1	4	3	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Samec 7	1	4	2(3)	2	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 8	1	4	2(3)	2	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 9	1	4	2(3)	2	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2
<i>B.fungivorus</i>	1	4	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	23	12	2

Tab. 24: Morfologické charakteristiky pro háďátka vyplavená z torza stromu, které bylo pokáceno poblíž místa Rohatce.

Dle morfologických charakteristik, převážně tvaru spikuly, byl jako nejbližší druh určen *Bursaphelenchus fungivorus*, tento druh se lišil pouze v charakteristice zakřivení lamina (tab. 24, obr. 32-37).

1	C1	C3	C5	C8	C10	C13	C14	C15	C16	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24
Samec 1	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 2	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 3	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Samec 4	6	3	3	2	1(2)	2	1(2)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Samec 5	6	3	3	2	1(2)	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 6	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	1	2	3	2	2	2	2	2
Samec 7	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
<i>B.chitwoodi</i>	6	3	3	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>B. hunanensis</i>	6	23	3	2	1	1	1	2	3	2	2	3	1	2	2	2
<i>B.rainulfi</i>	6	3	3	2	3	2	12	2	2	12	2	23	1	23	12	2
<i>B. poligraphi</i>	6	3	12	1	12	2	1	23	12	12	23	23	1	23	2	2
<i>B. eggersi</i>	6	3	3	2	2	2	1	2	2	23	3	2	2	23	12	2

1	C2	C4	C6	C9	C16	C27	C28	C29	C30	C31	C32
Samice 1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Samice 2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
Samice 3	3	2	2	2	2	2	3	1	2	2	2
Samice 4	3	3	2	2	1	2	2	2	2	2	3
Samice 5	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>B.chitwoodi</i>	1	1	?	2	2	2	1	12	2	2	1
<i>B. hunanensis</i>	23	1	2	2	3	2	23	12	2	2	1
<i>B.rainulfi</i>	23	23	1	1	2	2	23	2	3	2	3
<i>B. poligraphi</i>	23	34	?	2	12	2	23	23	23	2	34
<i>B. eggersi</i>	3	3	2	1	2	2	2	2	23	2	3

Tab. 25: Morfologické charakteristiky pro háďátka vyplavená ze vzorku č. 1, z místa: silnice č. 55 Hodonín - Břeclav, poblíž města Hodonína.

13	C1	C3	C5	C8	C10	C13	C14	C15	C16	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24
Samec 1	6	3	3	2	1	2	1(2)	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Samec 2	6	3	3	2	1	2	1(2)	1	1	2	3	2	2	2	2	2
Samec 3	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 4	6	3	3	2	1	2	1(2)	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Samec 5	6	3	3	2	1	2	1(2)	1	1	2	3	2	2	2	2	2

Samec 6	6	3	3	2	1	2	1(2)	1	1	2	2	2	2	2	2	2
Samec 7	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	1	2	3	2	2	2	2	2
Samec 8	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	1	2	3	2	2	2	2	2
Samec 9	6	3	3	2	1	2	1(2)	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Samec 10	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	1	2	3	2	2	2	2	2
Samec 11	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	1	2	2	2	2	2	2	2
Samec 12	6	3	3	2	1	2	1(2)	1	1	2	2	2	2	2	2	2

Tab. 26: Morfologické charakteristiky pro háďátka vyplavená ze vzorku č. 13, z místa: silnice č. 55 Hodonín - Břeclav, poblíž města Hodonína.

155	C1	C3	C5	C8	C10	C13	C14	C15	C16	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24
Samec 1	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 2	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 3	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	1	2	3	2	2	2	2	2
Samec 4	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 5	6	3	3	2	1	2	1(2)	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Samec 6	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 7	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 8	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2
Samec 9	6	3	3	2	1	2	1(2)	2	2	2	3	2	2	2	2	2

Tab. 27: Morfologické charakteristiky pro háďátka vyplavená ze vzorku č. 155, z místa: silnice č. 55 Hodonín - Břeclav, poblíž města Hodonína.

Všechny tyto tři vzorky pocházejí ze silniční aleje na silnici č. 55 poblíž města Hodonína. Jednalo se o mladou výsadbu borovice lesní a borovice černé.

Háďátka rodu *Bursaphelenchus* z těchto vzorků vykazovala vysokou homogenitu ve tvaru spikuly i ostatních znacích. Na základě zjištěných charakteristik a porovnáním s publikací Ryss et al. (2005) bylo vybráno 5 druhů, které vykazovaly nejvyšší shodu, nejbližší se zkoumaným jedincům blížil druh *B. chitwoodi*, ale jen v charakteristikách týkajících se samců, v charakteristikách obou pohlaví byl nejbližší druh *B. eggersi*, který se lišil významně v charakteru zakřivení samičího ocasu (ve vzorcích ze silnice č. 55 rovný ocas, *B. eggersi* zahnutý ocas) (tab. 25, 26., 27, obr. 38-44).

Háďátka nalezená v lokalitě poblíž Rohatce (pokácený strom) a na silnici č. 55 se významně lišila ve tvaru spikuly. Spikula v prvním případě měla tvar, který popisuje Ryss et

al. (2005) pro háďátka v 1. skupině pojmenované dle háďátka *B. hunti* a spikula v 2. případě odkazovala na 6. skupinu pojmenovanou dle háďátka *B. piniperdae*.

5.7. Diagnostika háďátek rodu *Bursaphelenchus* pomocí molekulárních markerů

5.7.1. Izolace DNA a PCR

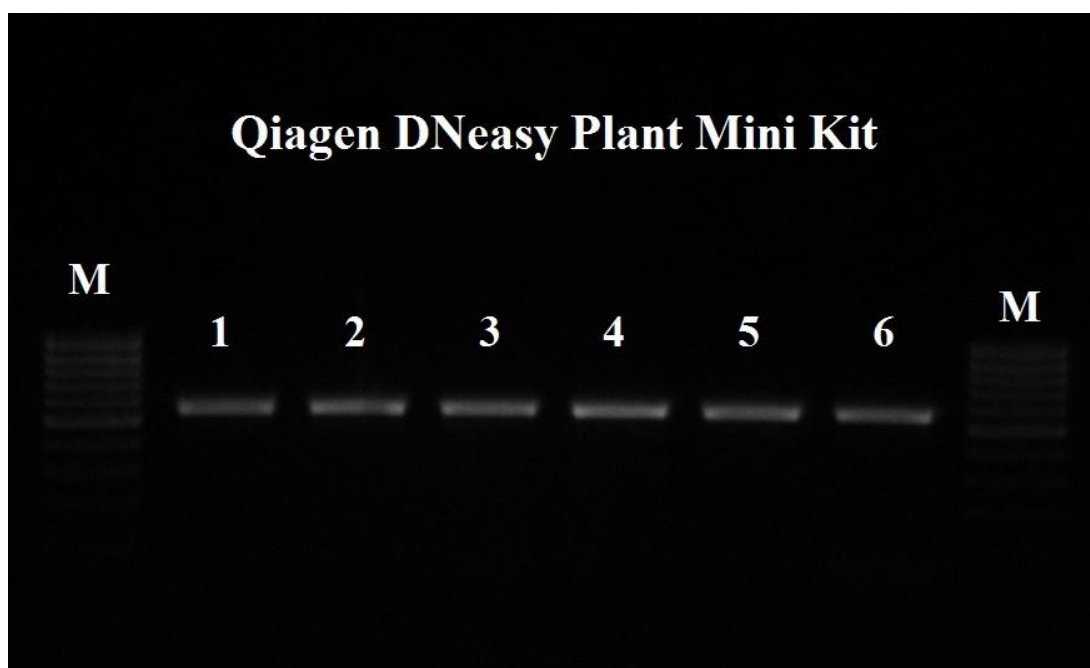
5.7.1.1. Izolace DNA z dřevních vzorků

5.7.1.1.1. příprava dřevního vzorku před izolací

Pro přípravu dřevních vzorků se nejvíce osvědčilo použití kulového mlýnu s podchlazenými drtiči. Ostatní metody, bez podchlazení, s použitím pufru, použití třecích misek se neosvědčily, neboť dřevo je velmi houževnaté a nebylo možné ho dostatečně rozdrtit.

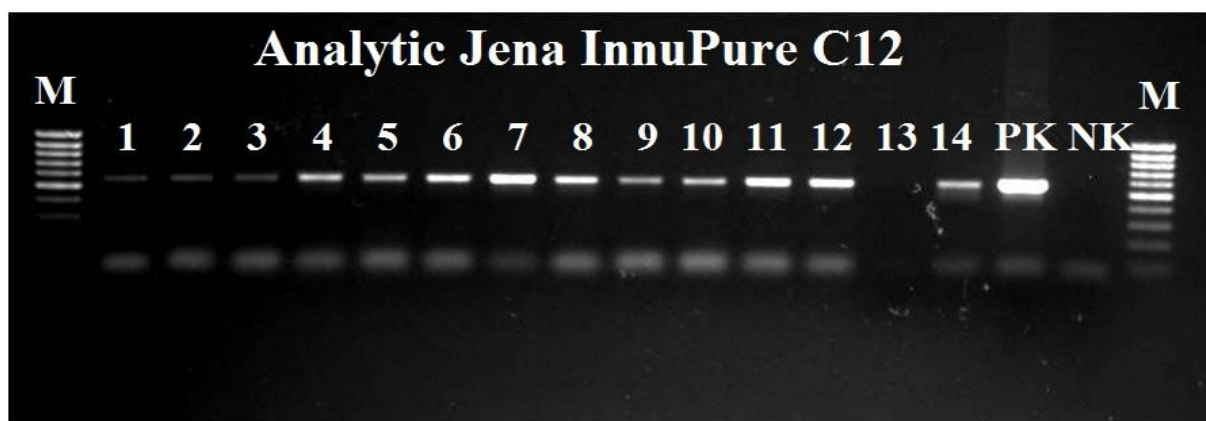
5.7.1.1.2. Izolační metody

Kit firmy Qiagen - DNeasy plant mini kit: tato metoda byla velice rychlá, spolehlivá, s vysokou výtěžností a čistotou DNA. Tato metoda je ovšem dražší. Pro PCR byly použity specifické primery pro *B. xylophilus* (obr. 19).



Obr. 19: Elektroforeogram PCR reakce č. 1, DNA izolována pomocí DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) vzorky 1-3 byly izolovány z napadeného dřeva, vzorky 4-6 ze zdravého dřeva a suspenze hád'átek, délka fragmentu 557 bp.

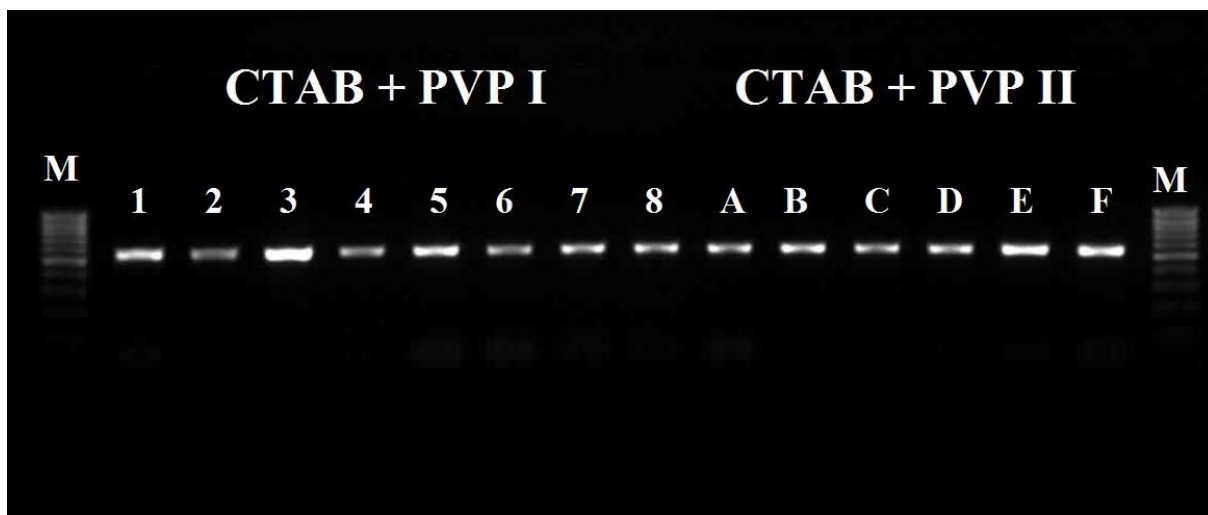
Robotická izolace firmy Analytik Jena - InnuPure C12: tato metoda vykazovala nejvyšší čistotu získané DNA. Tato metoda byla také nejrychlejší. Její nevýhodou ovšem je vysoká cena přístroje i kitů a servisní náklady na přístrojovou techniku. Pro PCR byly použity specifické primery pro *B. xylophilus*, délka fragmentu byla 557 bp (obr. 20).



Obr. 20: Elektroforeogram PCR reakce č. 2, DNA izolována robotickou izolací. Vzorky 1, 2, 3 izolovány z 1 jedince, 4, 5, 6 ze 3 jedinců, 7, 8, 9 z 5 jedinců, 10, 11, 12 z 1 jedince a vzorky 13 a 14 ze dřeva napadeného *B. xylophilus*.

Izolace DNA s PVP: první zmiňovaná metoda byla velice zdlouhavá (několik dní), její zkrácení bylo možné při vynechání purifikace, takto získaná DNA sice neměla takovou čistotu, ale pro následnou PCR reakci byla použitelná. Tato metoda je levná.

Druhá metoda s použitím kyselého pufru CTAB a PVP byla rychlejší, jednodušší a spolehlivá, takto získaná DNA vždy amplifikovala. Tato metoda se velice osvědčila, byla levná, rychlá a spolehlivá. Dokonce CTAB pufr byl velice trvanlivý, po roce od namíchání a uchovávání při pokojové teplotě byl stále funkční. Pro PCR reakci byly použity specifické primery pro *B. xylophilus* s délkou fragmentu 557 bp (obr. 21).



Obr. 21: Elektroforeogram PCR reakce č. 3, DNA izolována s pomocí PVP, vzorky 1-4 jsou pomocí první metody, bez purifikace, 5-8 po purifikaci a vzorky A-F jsou izolovány pomocí kyselého CTAB a PVP.

Izolace s pomocí FTA papíru: tato izolace byla nejrychlejší a nejméně pracná, odpadla zde nutnost homogenizovat vzorek před izolací, neboť zde bylo dřevo přímo obtištěno na papír. Nutností je více výseků (terčků) pro izolaci, neboť háďátka ve dřevě nejsou rovnoměrně rozmístěna a není jisté, že bude jejich DNA zjištěna všude v obtisku. Pro PCR reakci byly použity specifické primery pro *B. xylophilus* s délkou fragmentu 557 bp (obr. 22).



Obr. 22: Elektroforeogram PCR reakce č. 4, DNA izolována pomocí metody FTA, dřevo bylo obtištěno na FTA papír, vzorky 1-8 jsou jednotlivé terčky vyseknuté z obtisku dřeva.

Všechny zvolené metody izolace spolehlivě odstranily PCR inhibitory. DNA byla dostatečně čistá pro následnou PCR reakci (tab. 28), což dokládají elektroforeogramy výše. Nejcitlivější byla metoda s robotickou izolací, nejrychlejší metoda za použití FTA, zde ovšem musíme vyseknout více terčků, nejlépe jeden vedle druhého po celém obtisku, takže je posléze nákladnější. Nejlevnější metody jsou metody s použitím PVP.

Metoda	Vzorek 1		Vzorek 2		Vzorek 3		Vzorek 4		Navážka mg	Objem DNA μ l
	Množství ng/ μ l	Čistota 260/280	Množství ng/ μ l	Čistota 260/280	Množství ng/ μ l	Čistota 260/280	Množství ng/ μ l	Čistota 260/280		
Qiagen kit	197,9	1,71	154,5	1,76	291,4	1,83	260,3	1,76	100	100
InnuPure C12	228,8	1,78	246,9	1,85	398,5	1,82	357,2	1,79	50	200
CTAB+PVPI, bez purif.	608,3	1,79	449,2	1,85	256,7	1,6	216,2	1,62	500	300-600
CTAB+PVPI, po purif.	407,4	1,85	350,6	1,88	1844,7	1,78	1131,2	1,73		200
CTAB+PVP II	267,3	1,69	192,1	1,71	215,7	1,68	312,6	1,81	200	100-200

Tab. 28: Čistota a množství DNA v ng/ μ l u vzorků pro jednotlivé metody, vyjma FTA, měřeno přístrojem Nanodrop 2000 (thermo Scientific).

5.7.1.2. Izolace DNA z jednoho a více jedinců

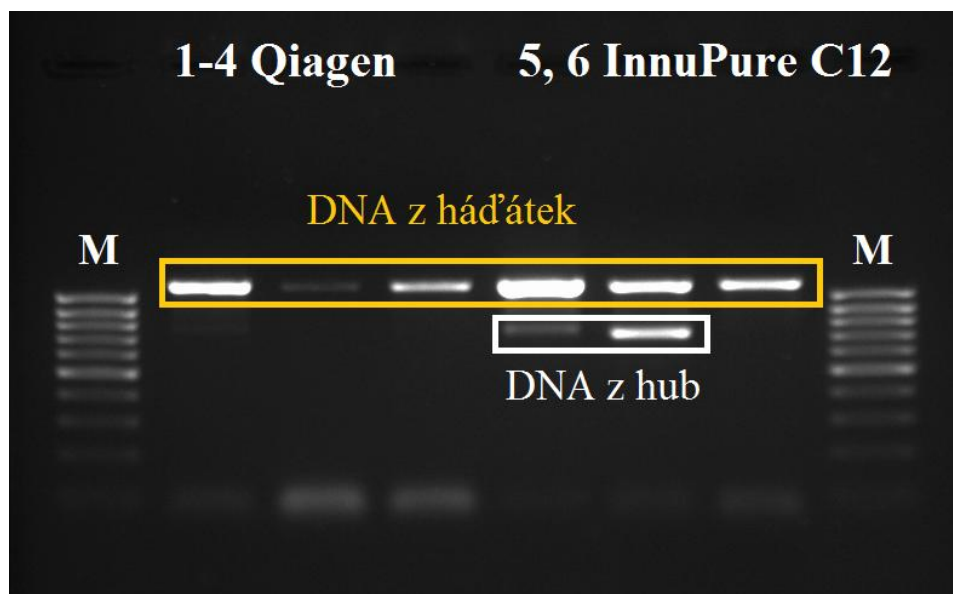
Izolace DNA z jednoho a více jedinců:

Izolace z jednoho jedince je velice důležitá pro monitorování druhů a jejich následné určování, neboť se ve vzorcích získaných při monitorování nachází více druhů hád'átek.

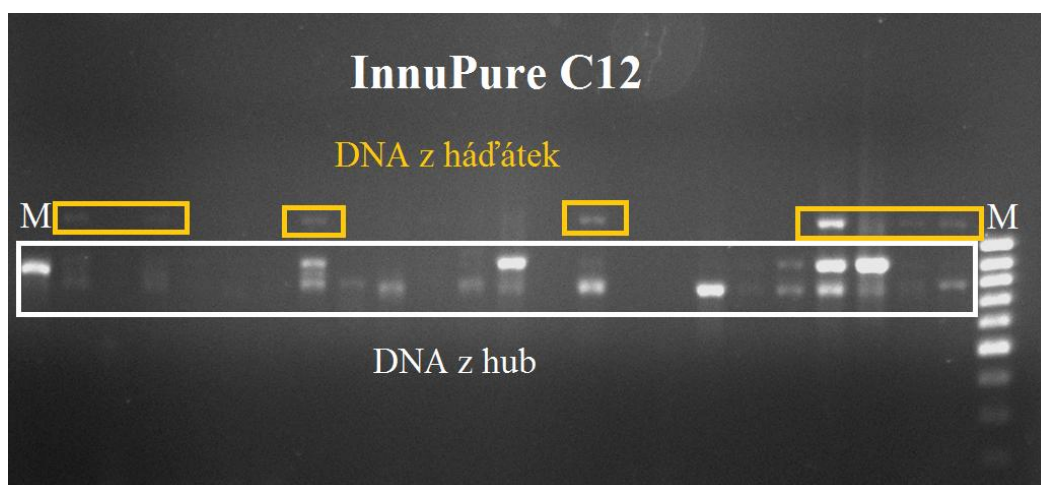
Zde byla velice důležitá homogenizace, nebylo zde více jedinců, kde by případné homogenizování jen některých, poskytlo dostatečné množství DNA.

Z výše zmíněných metod se nejvíce osvědčila metoda pomocí robotu InnuPure C12, takto získaná DNA byla sice rozpuštěna ve 200 μ l pufru, ale byla vysoce čistá a při PCR ji bylo možné bez dalšího upravování použít (obr. 23, 24). Další velice vhodnou metodou se ukázala metoda FTA, zde byl daný jedinec umístěn přímo na vyseknutý terčik a rozdrcen. Takto byla získána DNA z jednoho jedince pro jednu PCR reakci, tedy zde byla vysoká výtěžnost pro následující zpracování PCR produktu (obr. 25). Pro PCR s DNA izolovanou

metodou FTA a metodou s použitím lyzačního pufru byly použity specifické primery pro *B. xylophilus* s délkou fragmentu 557 bp. Pro ostatní PCR byly použity nespecifické primery S18 S21 s proměnlivou délkou fragmentu.



Obr. 23: Elektroforeogram pro PCR reakci č. 5 s nespecifickými primery S18S21, vyizolovaná DNA pocházela z jednoho háďátka získaného při monitoringu z pokáceného stromu poblíž Rohatce, DNA byla vyizolována pomocí robotické izolace s přístrojem InnuPure C12 a pomocí komerčního kitu firmy Qiagen.

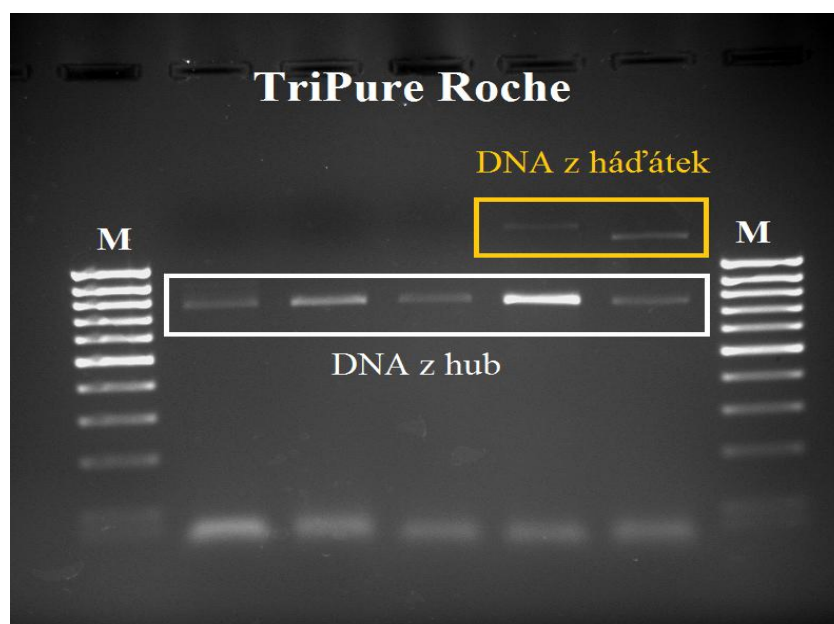


Obr. 24: Elektroforeogram pro PCR reakci č. 6 s nespecifickými primery S18S21, vyizolovaná DNA pocházela z jednoho háďátka získaného při monitoringu ze stromu označeného číslem 155, ze silnice č. 55, DNA byla vyizolována pomocí robotické izolace s přístrojem InnuPure C12.



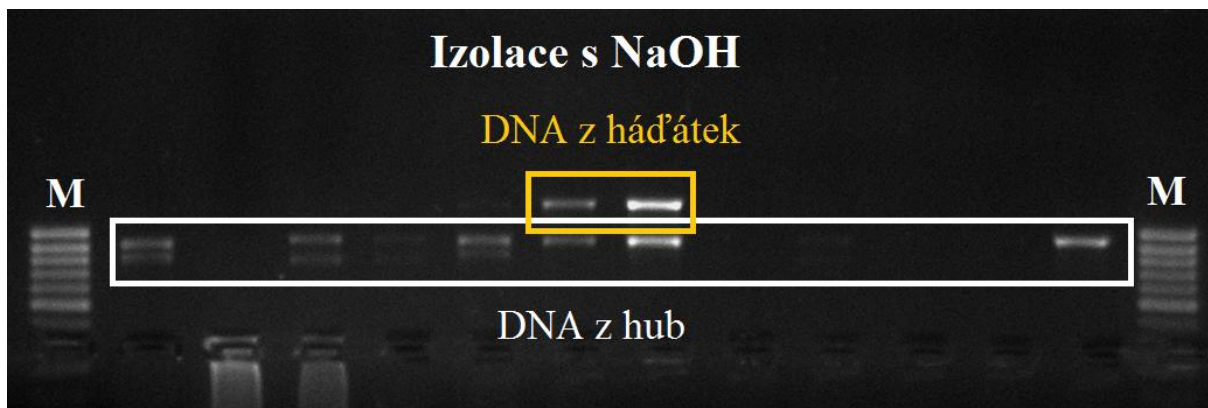
Obr. 25: Elektroforeogram PCR reakce č. 7, izolace DNA z jednoho jedince vzorky 1-10 a vzorky 9D a 10D patří ještě k obtisku dřeva na FTA papír.

Izolace pomocí kitu TriPure isolation firmy Roche byla poměrně rychlá a účinná. DNA byla rozpuštěna ve 30 µl pufru a tedy bylo dostatečné množství DNA pro opakované použití (obr. 26).



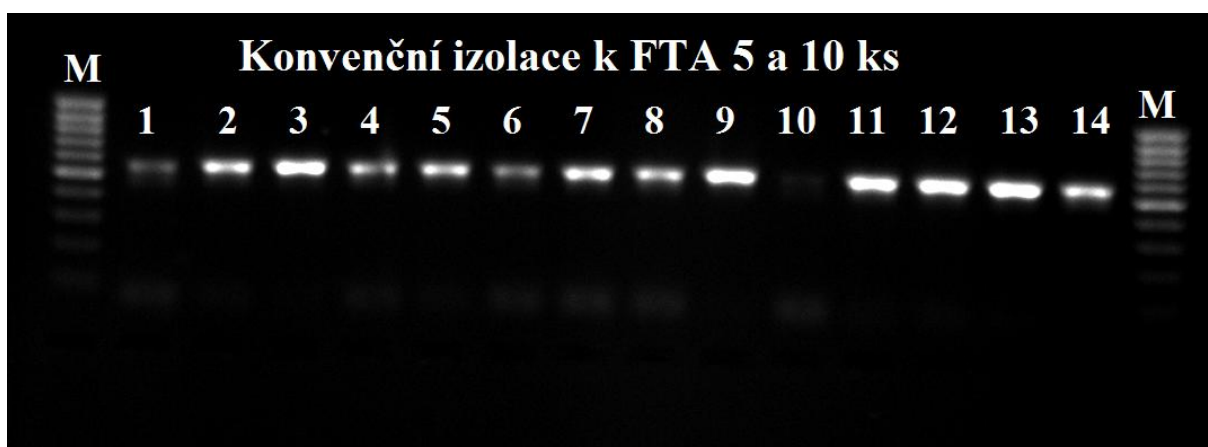
Obr.26: Elektroforeogram pro PCR reakci č. 8 s nescifickými primery S18 S21, vyizolovaná DNA pocházela z jednoho hád'átka získaného při monitoringu z pokáceného stromu poblíž Rohatce, DNA byla vyizolována pomocí kitu firmy Roche.

Izolace za pomoci NaOH byla velice jednoduchá na chemikálie, nedocházelo zde k odpipetování žádných reagensů ani vysrážení pelety, tedy nemohlo dojít ke snížení množství DNA odlitím, odpipetováním. Výsledné množství DNA bylo 39 μ l (obr 27).

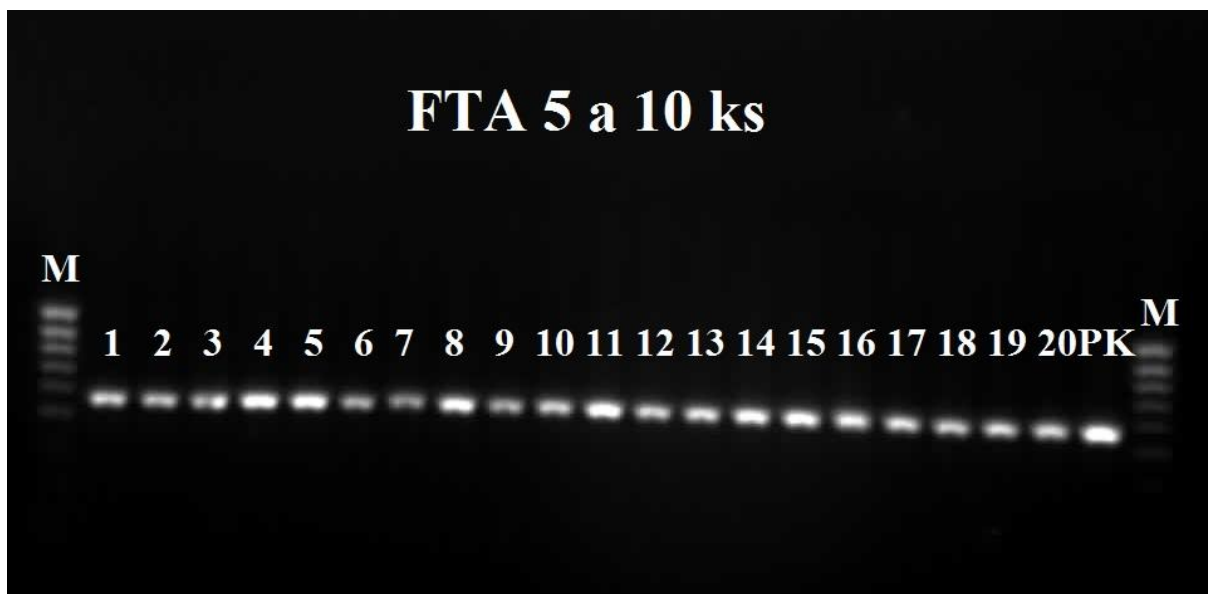


Obr.27: Elektroforeogram pro PCR reakci č. 9 s nespecifickými primery S18S21, vyizolovaná DNA pocházela z jednoho háďátka získaného při monitoringu ze stromu označeného č. 155, ze silnice č. 55, DNA byla vyizolována pomocí izolace s NaOH.

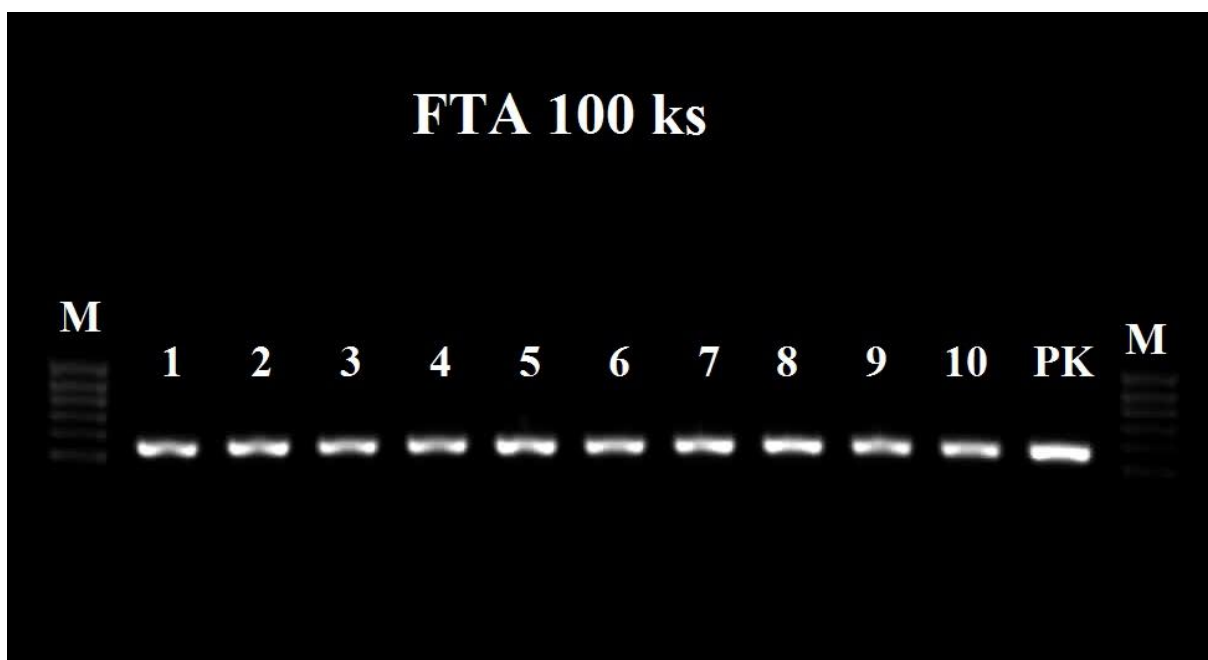
Použití izolační metody s lyzačním pufrům bylo zařazeno jako konvenční metoda k ověření účinnosti FTA metody, obě tyto metody měly srovnatelnou výtěžnost (obr. 28, 29, 30). Pro PCR reakci byly použity specifické primery pro *B. xylophilus* s délkou fragmentu 557 bp.



Obr. 28: Elektroforeogram PCR reakce č. 10, izolace DNA pomocí lyzačního pufru, tato metoda byla zvolena jako konvenční metoda k FTA.



Obr. 29: Elektroforeogram PCR reakce č. 11, vzorky 1-10 izolace DNA z 5 jedinců, vzorky 11-20 izolace DNA z 10 jedinců pomocí metody FTA



Obr. 30: Elektroforeogram PCR reakce č. 12, izolace DNA ze 100 jedinců pomocí FTA papíru.

Izolovaná DNA z jednoho jedince pocházejícího z monitorování na našem území byla použita do PCR reakce se specifickými primery pro hád'átka *B. xylophilus* a *B. mucronatus*. Pro obě tato hád'átka byla PCR reakce vždy negativní (elektroforeogramy nepublikovány).

Při použití nespecifických primerů S18 S21 docházelo bohužel k amplifikaci i houbové DNA, která je vzhledem k životnímu cyklu hád'átek neoddelitelnou kontaminací při izolaci jejich DNA.

5.7.1.3. Real-time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)

Pro standardy byla použita DNA izolovaná z 200 jedinců pomocí přístroje InnuPure C12 a rozpuštěná v 200 µl elučního pufru, tedy 1 µl odpovídal DNA z jednoho jedince. Koncentrace DNA byla 22,7 ng/ml. Tato DNA byla ředěna 1:10, 1:100, 1:1000 a 1:10000. Pro standardy bylo použito ekvivalentu 10 jedinců (10 µl DNA), 1 jedince (1 µl DNA), 0,1 jedince (1 µl ředění 1:10), 0,01 jedince, 0,001 jedince a 0,0001 jedince.

Jako neznámé množství jedinců byla použita DNA izolovaná z napadeného dřeva pomocí metod DNeasy Plant Mini kit (vzorky 1,2,3,4,5,6), pomocí InnuPure C12 (vzorky 7,8,9,10,11,12), pomocí CTAB + PVP I (vzorky 13,14,15,16,17,18) a pomocí kyselého pufru CTAB + PVP (vzorky 19,20,21,22,23,24).

Pro negativní kontrolu byla použita voda.

Výsledky jsou neprůkazné, neboť pozitivní výsledek real-time PCR byl pouze pro dva standardy odpovídající 1 jedinci a 0,1 jedince, ostatní standardy byly negativní (graf 16). Degresní přímka byla proto vypočtena jen z těchto dvou standardů a vyšla, tak že jsou změny hodnot závislé proměnné y vysvětleny hodnotami nezávislé proměnné x ze 100 % (graf 17).

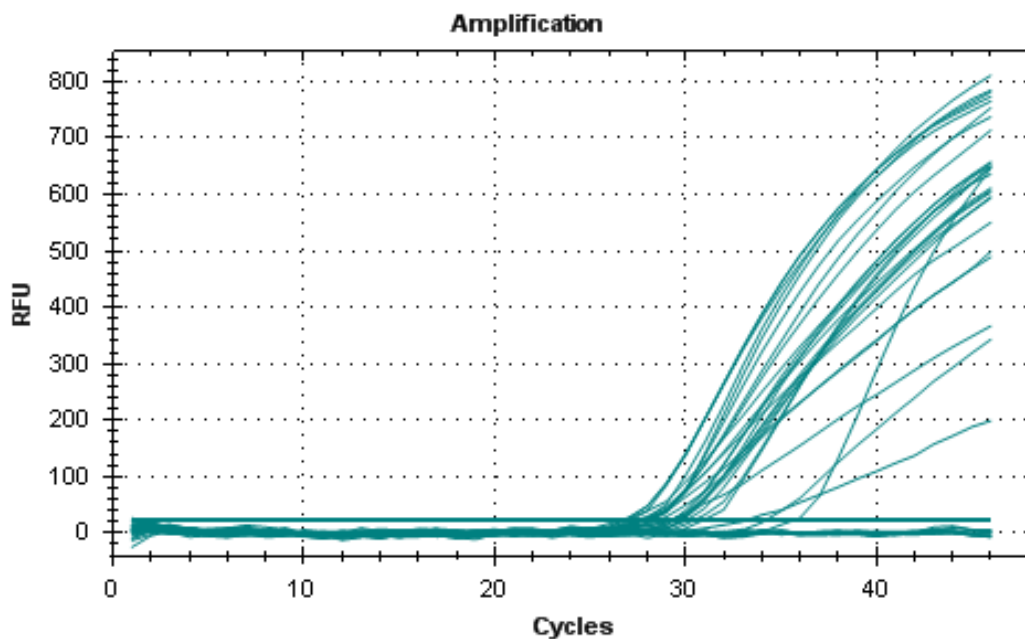
Tato metoda při takto zvolené izolační metodě DNA byla schopna detekovat 2,27 ng/ml DNA. Negativní vzorky byly negativní, nebyla zde kontaminace DNA ze vzorků.

Vzorky DNA izolované z neznámého počtu jedinců, byly kvantifikovány, což dokazuje jejich vysokou čistotu, neboť real-time PCR je citlivá na PCR inhibitory (tab. 29).

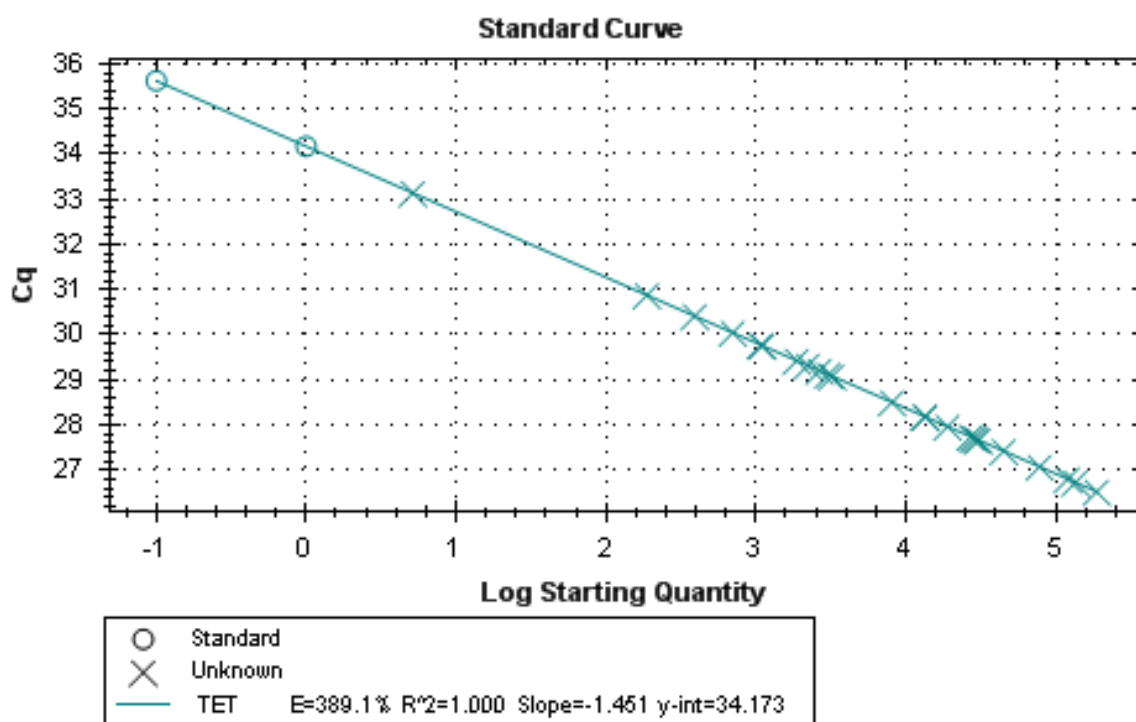
Vzorky	Počet cyklů	Počet jedinců
Standard 1		10,00000
Standard 2	34,17	1,00000
Standard 3	35,62	0,10000
Standard 4		0,01000
Standard 5		0,00100
Standard 6		0,00010
1	27,42	44981,15

2	27,67	30601,55
3	27,08	78014,09
4	27,74	27062,03
5	27,69	29577,78
6	27,97	18955,97
7	29,32	2215,43
8	29,77	1083,69
9	29,21	2653,28
10	29,12	3055,37
11	29,76	1104,67
12	29,43	1871,11
13	28,50	8101,17
14	29,08	3229,58
15	33,14	5,14
16	30,41	390,07
17	30,05	699,96
18	30,88	187,22
19	26,52	187631,99
20	26,80	120190,68
21	26,73	135291,31
22	28,18	13443,32
23	27,72	28298,05
24	28,19	13386,84

Tab. 29: Kvantifikace neznámých vzorků a počet cyklů, při kterých došlo k první detekci DNA.



Graf 16: Detekce fluorescence v závislosti na počtu cyklů.



Graf 17: Degresní přímka Real-Time PCR reakce, kroužkem jsou označeny standardy, křížkem jsou označeny kvantifikované vzorky. Koeficient determinace ukazuje, že hodnoty závisle proměnné y jsou vysvětleny změnami nezávisle proměnné x ze 100 %.

6. Diskuze

6.1. Biologický materiál

Nejčastěji využívanou houbovou kulturou pro namnožení hád'átka *B. xylophilus* je kultura *Botrytis cinerea*, tak tomu bylo i v této práci a využívají ji i nejnovější výzkumy (Kanzaki et al., 2010). Jako alternativní živné kultury testoval Sriwati et al. (2008) s pozitivním výsledkem druhy hub *Pestalopsis* sp., *Shpaeropsis sapinea* a *Phialophora repens*, *B. cinerea* byla zařazena jako pozitivní kontrola.

Pro kultivaci *B. cinerea* byl zvolen agar se sladovým extraktem (MEA) s přidavkem glycerolu, tuto metodu využívala ve své práci Ambrogioni et al. (2003). Častěji využívaným médiem pro kultivaci *B. cinerea* je bramboro-dextrózový agar PDA (Potato dextrose agar) (Mamyia, 1985).

Alternativou pro kultivaci na Petriho miskách byla zvolena kultivace ve skleněných lahvičkách. Takto lze uchovávat chov hád'átek po delší dobu.

Pro extrakci hád'átek ze dřeva je využíváno mnoha metod. Nejjednodušší je Baermannova nálevková metoda, kterou využíval např. Southney (1986), ten uváděl, že rozdrcený rostlinný materiál je vhodné zabalit do mušelínu, nebo sítka, které se položí do nálevky. Při potřebě jemnější extrakce se může vzorek umístit na mléčný filtr nebo do papírového kapesníku, jako tomu bylo v této práci. Je vhodné do nálevky přidat smáčedlo a roztok pro inhibici růstu bakterií. Tuto metodu využívali i Tomiczek et al. (2003), vzorky upravili na části o velikosti 30-120 g a ty dali plavit na 48 h. Gu et al. (2006) zpracovávali vzorky nejprve na 10 cm dlouhé třísky a později je rozmělnili na 0,5 cm dlouhé části, plavení probíhalo při 25 °C po dobu 24 h. Li et al. (2009) plavili vzorky upravené na kousky ne větší než 1 cm, 48 h při 25 °C. Shi et al. (2013) upravili vzorky na části o váze cca 10 g a plavili je zabalené ve fáci po dobu 24 h. V této práci byla použita doba plavení 24 h při pokojové teplotě.

Další možnou metodou, kterou využívali Riberio et al. (2012), bylo plavení pomocí Whitehead - Hemmingovy metody plavicích misek, kde byly vzorky zpracovány pomocí vrtačky s vrtákem o síle 1,1 cm, který měl délku 14 cm. Vrtákem bylo odvrtáno množství 60 g, kde pro plavení bylo využito 30 g vzorku a zbytek byl využit v molekulární diagnostice.

Další metodu v níž jsou využity plavicí misky uváděli ve své práci Zouhar a kol. (2007), zde byly využity dvě do sebe zapadající misky, kde vrchní byla perforována, na ní se

rozložily papírové kapesníčky a na ně rostlinný materiál, materiál byl překryt buničinou a vše bylo zalito vodou. Výhodou této metody je možnost delšího plavení bez obavy z vyčerpání kyslíku. Tato metoda byla v této práci také využita, ale neosvědčila se tolik jako Baermannova nálevková metoda, výtěžek nebyl tak velký a vzorky byly znečištěny částicemi dřeva.

Velikost vzorků byla v této práci upravena pomocí zahradnických nůžek, u větších kusů pomocí ruční pily, dláta a kladiva, výsledná velikost byla cca 0,5 cm.

Baermannovy nálevkové metody bylo využíváno i při plavení háďátek z chovu na *B. cinerea*.

6.2. Testování náchylnosti druhů borovic pěstovaných v ČR k háďátku *Bursaphelenchus xylophilus*

Při výběru semenáčků bylo přihlédnuto k možnostem trhu. V požadované velikosti a stáří se prodávají semenáčky většinou jako kultivary. Aby bylo předejito možnosti různé náchylnosti v závislosti na kultivaru, byly do testování zařazeny dva kultivary *Pinus mugo* (Pumillo a Wintergold), u těchto kultivarů nedošlo k výrazným rozdílům v rychlosti odumírání.

Byly zvoleny tříleté semenáčky s výškou cca. 50 cm (Braasch et al., 1998; Futai, 2003). Maximální velikost byla zvolena se zřetelem na možnosti karanténní laboratoře, minimální velikost pak vzhledem ke zvolenému způsobu přenosu háďátek.

Semenáčky byly ponechány v karanténní laboratoři k aklimatizaci po dobu 4 týdnů, tato doba se ukázala jako postačující. Braasch et al. (1998) doporučuje aklimatizaci po dobu 6 týdnů.

Pro simulaci napadení semenáčků i segmentů větví byla použita háďátka, která byla získána opláchnutím víčka Petriho misky, tato háďátka vykazovala větší životaschopnost, než háďátka získaná plavením pomocí Baermannovy nálevkové metody. Tato metoda byla také rychlejší. Tuto metodu využíval i Southey (1986). Mota et al. (1999) použili ve své práci k získávání suspenze Baermannovu nálevkovou metodu.

Většinou se množství háďátek používaných pro umělou simulaci napadení pohybuje v rozmezí 3000-10000 jedinců, jako je tomu např. v práci Kanzaki et al., (2010), kteří použili 5000 jedinců. Dle Kuroda et al., (2007) toto množství neodpovídá přirozenému napadení, zde

je počet háďátek závislý na druhu vektora i na konkrétním jedinci. Aby byly nasimulovány co nejnějnější podmínky, byla inokulace provedena dvakrát po 1000 jedincích.

Simulace žíru byla provedena podle Braasch et al. (1998), tato metoda byla použita jak pro semenáčky, tak pro segmenty větví. Další možné metody jsou podle Tarlochan and Sutherland (1989), kteří jen odstranili kůru a tenkou vrstvu vnějšího dřeva, dle Kanzaki et al., (2010), kteří vrtali do tříletých semenáčků otvor 4 mm široký a 10 mm hluboký.

Při reinokulaci byl šetrně sledován pokles produkce pryskyřice. Yang (2003) sledoval pokles zářezem pod kůru, což není pro semenáček příliš šetrné. Futai and Takeuchi (2008) zkoumali pokles pomocí vpichu, tato metoda je šetrnější, ale u méně pryskyřičných druhů může být méně přesná.

Stupeň náchylnosti byl ve většině publikací určován jen dle mortality stromu, toto se ale ukázalo jako nepřesné. Furuno (1982) vyhodnotil *P. flexilis* a *P. radiata* jako vhodné hostitele, ale o dva roky později Ohba et al. (1984) je vyhodnotili jako rezistentní. Je tedy nezbytné ze stromků extrahovat háďátka, neboť dle Mota et al. (2009) byla extrahována háďátka *B. xylophilus* i z bezpříznakových stromů.

Pro posouzení výsledků je důležitý i původ populace háďátek, Braasch et al. (1998) použili populace z Japonska a jen pro jednu byla *P. sylvestris* vnímavá. V této práci byla použita populace z Portugalska, je možné že tato populace je více agresivní než populace z Japonska, proto vykazovaly i americké druhy vysokou míru náchylnosti k *B. xylophilus*.

Dle Fukushige (1991) je důležité houbové osídlení dřeva. V jeho práci bylo testováno namnožení háďátek *B. xylophilus* ve dřevě, které předtím infikoval houbami *Ceratocystis* sp, *Penicillium* sp., *Verticillium* sp a *Trichoderma* spp.. V jeho práci je také zmíněno kritické množství háďátek na 1 g dřeva, které určil jako 20000 jedinců, dále jejich populace poklesává, tohoto množství nebylo v této práci dosaženo.

U druhů borovic, které vykazovaly rychlé příznaky vadnutí jako semenáčky, nebyl prokázán větší nárůst háďátek v segmentech větví oproti druhům, které byly jako semenáčky nejodolnější. Jen *P. mugo* patřila mezi semenáčky k nejodolnějším a v segmentech větví u ní došlo k jednomu z nejnižších nárůstu počtu háďátek ze všech zkoumaných druhů.

6.3. Metody monitorování přenašečů – brouků z čeledi *Cerambycidae*

Jako nejúčinnější se ukázal individuální sběr brouků a hlavně larev. Dospělci brouků byli pozorováni pouze v okrese Hodonín, na ostatních místech monitorování byly přítomny pouze larvy.

Zouhar a kol. (2007) uvádí jako nejvhodnější individuální sběr a nastražení pastí z čerstvě pokáceného dřeva.

Ve Španělsku se osvědčil lapač Galloprotect, který v našich podmínkách vykazoval nulovou účinnost.

6.4. Metody monitorování hád'átek rodu *Bursaphelenchus*

Metody monitorování jsou založeny na dvou principech. První na pokácení celého příznakového stromu a odebrání jeho částí, disků z různých míst kmene. Druhý je založen na odebrání jen části dřeva z kmene zhruba ve výšce 150 cm nad zemí.

Schröder et al. (2009) používali první zmíněný způsob, odebírali z kmene tři disky ve výšce cca 20 cm nad zemí, poté ve výšce 1 a 2 metrů. Riberio et al. (2012) odebírali 5 disků o tloušťce cca. 8 cm z vrcholu, středu, spodní části kmene a z větví, obdobnou metodu využívali i Shi et al. (2013).

Druhou zmíněnou metodu využívali ve své práci i Schröder et al. (2009), který pro odběr z kmene používá Fostnerův vrták. Zouhar a kol. (2007) používali také vrták, tentokrát o průměru 22 mm, jako další možnost uváděli využití dláta, které je šetrnější pro hád'átka.

Pro odběr vzorků z obalového materiálu využívali Tomiczek et al. (2003) pilu a sekeru. Odběr je dle Gu et al. (2006) vhodný v místech, kde se objevuje modře zbarvené dřevo, které indikuje houbové napadení, nebo místa s viditelnou hmyzí aktivitou.

V této práci bylo využito postupu dle Zouhar a kol. (2007), vzorky byly odebrány pomocí dláta po odstranění kůry z kmene ve výšce 150 cm. U stromků, které byly zavětveny až k zemi, byly odebrány segmenty větví pomocí ruční pilky. U většiny stromů bylo kromě odběru vzorku z kmene využito ještě stromolezeckých technik, kdy byly vzorky odebrány z koruny bez nutnosti pokácení stromu, z koruny byly odebrány větve. Jeden strom, který již byl odumřelý, byl pokácen a z jeho kmene byly odebrány pomocí motorové pily tři disky, z báze, ze středu a z vrcholové části kmene. Na tomto stromě byla patrná aktivita hmyzu, na jeho kmenu byly nalezeny četné výletové otvory a uvnitř kmene byly nalezeny larvy brouků z čeledi *Cerambycidae*.

Využití stromolezeckých technik se velmi osvědčilo, bylo možné odebírat vzorky z vrcholových částí stromu, bez nutnosti jeho pokácení. Při těchto technikách je možné odebírat vzorky přímo z kmene pomocí dláta i ve větších výškách. K takovému stromu je možné se vracet a sledovat vývoj napadení.

Metody založené na odběru z disků kmene jsou oproti stromolezeckým technikám značně nešetrné k porostu, každý strom se musí pokácet a pokud se napadení nepotvrdí, je pokácen zbytečně a majitel porostu je poškozen.

6.5. Vývoj a ověřování nových postupů ochrany proti hád'átku *B. xylophilus*

Rostlinné silice mají vysoký potenciál jako nematocidy, nepoškozují životní prostředí, většinou se rozkládají na netoxické produkty, jsou často selektivní a nejsou toxické pro necílové organismy (Barton, 1999; Isman, 2001; Chitwood, 2002).

Kong et al. (2006) ve své práci uváděli, že nejlepšími výsledky na hád'átku borovicové dosahují silice získané z rostlin *Cinnamomum* (skořice), *Coriandrum* (koriandr), *Eugenia* (hřebíček), *Origanum* (oregano), *Cymbopogon* (citrónová tráva) a *Thymus* (tymián).

Choi et al. (2007) dosáhli nejlepšími výsledky u téhož hád'átku s esencemi získanými z rostlin *Paeonia moutan* (pivoňka), *Perilla frutescens* (perila) a *Boswellia carterii* (kadidlovník).

Park et al. (2007) uváděli jako nejúčinnější proti *B. xylophilus* silice získané z *Trachyspermum* (drsnoplodík), *Pimenta* (nové koření) a *Litsea*.

Elbadri et al. (2008) měli také pozitivní výsledky se silicemi pocházejícími z *Thymus*, *Eugenia* a také *Sinapis* (hořčice), potenciální nematocidní aktivitu proti hád'átku borovicovému prokázal i esenciální olej získaný z *Magnolia*.

Barbosa et al. (2010) se zaměřili ve své práci na rostliny původem z Portugalska. Nejvyšší nematocidní aktivitu proti *B. xylophilus* vykazovaly druhy *Chamaespartium tridentatum* (kručinka), *Origanum vulgare* (oregano, dobromysl), *Satureja montana* (saturejka) *Thymbra capitata* (divoká saturejka) a *Thymus caespititius* (tymián, mateřídouška).

Faria et al. (2013) se zaměřili na chemické složení jednotlivých esenciálních olejů a na účinnost jednotlivých složek proti hád'átku borovicovému. Lepší účinnost prokázaly složky obsahující kyslík.

V této práci se ukázaly nejúčinnější silice *Pimpinella anisum*, *Eugenia caryophyllus*, *Thymus vulgaris* a *Litsea cubeba* od firmy Salus, Lemongrass oil, Anise oil, Eugenol, Fennel oil a Thyme oil od firmy Sigma a Thyme oil white i red, Wintergreen oil a Cinnamon oil bez udání původu od Ing. O. Douady, Ph.D.. Tyto silice pocházely z rostlin *Pimpinella anisum* (anýz) 2 silice, *Eugenia caryophyllus* (hřebíček) 2 silice, *Thymus* (tymián) 4 silice, *Litsea cubeba* 1 silice, *Cymbopogon citratus* (citónová tráva) 1 silice, *Foeniculum vulgare* (fenykl) 1 silice, *Gaultheria procumbens* (libavka) 1 silice a *Cinnamomum ceylanicum* (skořice) 1 silice.

Mortalita byla ve většině publikací (Faria et al., 2013; Barbosa et al., 2010; Elbadri et al., 2008) ověřována vizuálně pod mikroskopem, pokud bylo hád'átko v nataženém stavu, bylo považováno za mrtvé. Pokud byly pochybnosti o smrti jedince, ověřovala se mechanicky, pomocí nematologické jehly. V této práci se více osvědčilo odsátí silice a opakované vyměnění vody, nejlépe okysličené, při tomto procesu mnohá hád'átka, která vypadala jako mrtvá, začala znovu vykazovat aktivitu.

Srovnání účinků HCN s literaturou je obtížné, neboť kyanovodík nebyl dosud na hád'átka zkoušen. Zuryn et al. (2008) uváděli 100 % úmrtnost *Caenorhabditis elegans* až po 24 h působení fosfinu. Soma et al. (2001) dělali ve své práci pokusy se sulfonyl fluoridem, při koncentraci 60 g/m³ po dobu 48 h nebyla účinnost na hád'átko borovicové dostatečná. Pro 100 % účinnost uváděli Dwinell et al. (2003) koncentraci 100 g/m³ sulfonyl fluoridu. Metyl bromid byl další látkou používanou pro fumigaci dřeva, účinná dávka byla ovšem 240 g/m³ (Dwinell, 1994). Další zkoušené sloučeniny jako sirouhlík, etylen oxid a další se ukázaly jako nevhodné z hlediska životního prostředí, jejich rezidua přetrvávají ve dřevě a mohou ohrožovat člověka i přírodu (Banks, 2003).

Dávky kyanovodíku zajišťující 100 % mortalitu jsou oproti ostatním zkoumaným látkám velice nízké, pro *C. elegans* je to jen 7 g/m³ po dobu 4,5 hodiny, pro *B. xylophilus* ve dřevních pilinách 20 g/m³ po dobu 18 hodin, pro hád'átka v dřevěném špalku, při všech koncentracích 12,3-24,12 g/m³ taktéž po dobu 18 h.

Kyanovodík velice dobře prostupuje dřevěným materiálem (Schwarz and Deckert, 1930). Čapoun and Krykorková (2008) zjistili, že do smrkového dřeva proniká HCN lépe než do borovicového.

Protože má kyanovodík výbornou účinnost při malých dávkách a poměrně krátkém čase a jeho rezidua nezůstávají ve dřevě, jeví se tato látka jako velice dobrá alternativa ošetření dřeva k tepelné terapii.

6.6. Diagnostika háďátek rodu *Bursaphelenchus* na úrovni morfologických znaků

Southney (1986) využíval ve své práci různé druhy fixativů: FA 4:1, FA 4:10, což bylo 10 ml 40% formaldehydu, 1 nebo 10 ml kyseliny propionové a destilovaná voda (množství do 100 ml), dalším použitým fixativem bylo 8 ml 40% formaldehydu, 2 ml glycerolu a 90 ml destilované vody. V tomto roztoku vysychala háďátka pomaleji, dalším roztokem v této publikaci byl fixační roztok FAA, který se skládal z 20 ml 95% etanolu, 6 ml 40% formaldehydu, 1 ml kyseliny octové a 40 ml destilované vody. Tento roztok má více variant, další možnost je 50 ml etanolu, 10 ml formaldehydu, 5 ml ledové kyseliny octové a 35 ml vody. V této práci byl využit FAA roztok složený z 20 ml 95% etanolu, 6 ml 40% formaldehydu, 1 ml ledové kyseliny octové a 18 ml destilované vody.

Courtney et al. (1955) používali roztok TAF, složený ze 7 ml 40% formaldehydu, 2 ml triethanolaminu a 91 ml destilované vody.

V této práci byl použit 4% a 10% roztok formaldehydu a roztoky FAA a TAF. Nejlépe se osvědčil roztok FAA, použití ostatních fixativů nebyly uspokojivé. Velice důležitým faktorem bylo stáří fixativu, ten nesměl být starší než 1 měsíc.

Při převádění do trvalých preparátů se osvědčilo prosycování háďátek pomocí 1 ml glycerolu, 20 ml 96% etanol a 79 ml destilované vody, více než metoda prosycování háďátek pomocí 10% glycerolu, kterou uvádí Zouhar a kol. (2007).

Ze dvou lokalit v okrese Hodonín byly dle charakteristik získány dva druhy. Na lokalitě poblíž Rohatce to bylo háďátko nejvíce podobné *B. fungivorus*. Dle Braasch et al. (2002) bylo toto háďátko zjištěno v ČR v pěstebních substrátech na bázi kůry. Dle Ryss et al. (2005) by toto háďátko mělo mít lamínu cca v jedné polovině lehce zalomenou. U druhu pozorovaného v této lokalitě se lamína jevila oblá po celé své délce. V této lokalitě byli zkoumáni pouze samci.

V lokalitě na silnici č. 55 poblíž Hodonína byli zkoumaní jedinci získáni ze třech stromů, z jednoho stromu byly získány i samice. Všichni jedinci z těchto stromů vykazovali vysokou homogenitu.

Dle Ryss et al. (2005) se oběma pohlavím, nalezeným na této lokalitě, nejvíce blížil druh *B. eggersi*, který se výrazně lišil jen u zakřivení samičího konce ocasu, u *B. eggersi* je zakřivený u druhu pozorovaného na této lokalitě byl rovný. Dalším druhem shodným v samčích charakteristikách byl druh *B. chitwoodi*, v samičích charakteristikách se lišil v zakončení ocasu, které má zakončené mukrem, ale pozorovaný druh měl vždy hrot uprostřed ocasu, liší se také poměrem mezi délkou postuterinního vaku a šířkou těla v místě vulvy a poměrem délky postuterinního vaku a délky těla od vulvy ke konečníku. Oba tyto druhy se také lišili v úhlu svírajícím capitulum a špičku spikuly, tento úhel byl ovšem u některých jedinců neprůkazný a blížil se těmto druhům. Druhem, který se shoduje v samičích charakteristikách je druh *B. poligraphi*. Tento druh má již dva poddruhy, v samčích charakteristikách se liší tvarem rostra, které má hrotité, na rozdíl od jedinců pozorovaných na této lokalitě, kteří ho měli oblé, v zakončení kondylu, které má spíše tupě zakončené, zde se jevílo opět spíše oblé. Dalším rozdílem bylo nasedání rostra na kalomus, u zkoumaných jedinců bylo nasedání mírným přechodem a u *B. poligraphi* přecházelo ostrým úhlem. Další druhy, které se jevíly ve většině charakteristik stejně jako pozorovaní jedinci, byly druhy *B. hunanensis* a *B. rainulfi*, ale oba tyto druhy se již lišily více než předchozí zmíněné. *B. eggersi* je poměrně hojně rozšířený druh v Evropě, byl nalezen v Německu na *Larix leptolepis*, *Pinus sylvestris*, *Pinus strobus*, *Picea excelsa* a *Picea abies* (Rühm, 1956; Braasch et al., 1999), v Řecku na *Pinus pinaster* a *Pinus brutia* (Skarmoutsos and Skarmoutsos, 1999; Michalopoulos-Skarmoutsos et al., 2004), ve Španělsku na *Abies alba*, *Pinus radiata* a *Pinus pinaster* (Escuer et al., 2002; Abelleira et al., 2003; Escuer et al., 2004) a ve Švýcarsku, bez udání hostitelského druhu (Ryss et al., 2005). Tento druh byl také nalezen v Gruzii, státě na pomezí Evropy a Asie na *Picea orientalis*, *Pinus cedrus* a *Abies* sp. (Kakulia and Maglakelidze, 1973; Kurashvili et al., 1980). Druh *B. chitwoodi* byl zatím objeven v Německu (Rühm, 1956) a Gruzii (Kakulia and Shalibashvili, 1976) na *Pinus sylvestris*. Druh *B. poligraphi* se vyskytuje v Německu (Fuchs, 1937; Rühm, 1956; Braasch et al., 1999), na Slovensku (Tenkácová and Mituch, 1987), ale pouze na družích rodu *Picea*. Druhy *B. hunanensis* a *B. rainulfi* byly nalezeny pouze na území Asie (Ryss et al., 2005).

V České republice byly nalezeny druhy: *B. hofmanni* na importovaných koniferách, tento druh má ovšem přítomný cucullus, který pozorované druhy neměly, *B. mucronatus*, který se liší charakterem spikuly, její tvar ho řadí do skupiny *B. xylophilus*, kterému je také

nejpodobnější (Ryss et al., 2005), *B. vallesianus* (Gaar et al., 2006; Čermák et al., 2013), který se také liší přítomností cucullu (Ryss et al., 2005). Dle Čermák et al., (2013) se v České republice nachází ještě druhy *B. borealis* (skupina *B. borealis*), který se liší tvarem spikuly. Tento druh byl v ČR nalezen pouze na *Picea abies*. Druhým nově objeveným druhem byl *B. pinophilus* (Čermák et al., 2013), který se liší přítomností výrazného cucullu (Ryss et al., 2005).

6.7. Diagnostika hád'átek rodu *Bursaphelenchus* pomocí molekulárních markerů.

Cao et al. (2005) ve své práci uváděli, že izolace DNA *B. xylophilus* ze dřeva byla obtížná kvůli přítomným PCR inhibitorům.

Izolaci DNA *B. xylophilus* ze dřeva se ve své práci zabývali Takeuchi et al. (2005), kteří pro izolaci použili metody s pomocí CTAB pufru a chloroform:isoamylalkoholu (24:1), přičemž izolovaná DNA byla využita pro Nested PCR. Hu et al. (2010) ve své práci použili metodu s použitím lisačnického pufru (2,5 mM DTT, 1,125% Tween20, 0,025% Gelatin, 125 mM KCL, 25 mM Tris-HCL pH 8 a 3,75 mM MgCl₂), dále postupovali dle kitu 3S column kit (Shanghai Shenergy Bicolor Bioscience & Technology Company, Shanghai, China). DNA byla využita v klasické PCR reakci.

V této práci bylo použito několik metod založených na různých principech. Metoda založená na navázání DNA na filtr kolonky kitu DNeasy Plant mini kit (Qiagen), metoda založená na navázání DNA na magnetické partikule innuPREP Plant kit-IP a přístroje InnuPure C12 (Analytic Jena), dvě metody založené na vyvázání PCR inhibitorů na polyvinyl pyrrolidone (PVP) a metoda založená na navázání DNA na patentovaně upravený papír FTA[®] Technology (Whatman). Metoda s PVP a přečišťováním DNA byla převzata z práce Porebski et al. (1997), kteří se zabývali jahodníky. Metodu využívající robotickou izolaci použili ve své práci i Verbylaité et al. (2010), kteří ji využili úspěšně při izolaci DNA z topolu *Populus tremula* L., v této práci využívali i metodu založenou na PVP. Metodu s PVP používali úspěšně ve své práci i Reynolds and Williams (2004) pro izolaci borovicové DNA. Výsledky s využitím FTA technologie byly zpracovávány s dalšími fytoparazitickými hád'átkami pro publikaci (Marek et al., 2014), nebyly ovšem nakonec do publikace zařazeny.

Izolaci DNA z jednoho jedince se ve své práci zabývali Iwahori et al. (2000), kteří pro izolaci použili speciální filtrační papír (Toyo Roshi Co., Ltd., Tokyo, Japan). Takeuchi et al. (2005) ve své práci využívali i izolaci DNA z jednoho jedince s přidáním 80 mg dřeva, takto izolovanou DNA ovšem použili v Nested PCR. Karajeh et al. (2010) a Floyd et al. (2002) ve své práci využívali izolaci DNA z jednoho jedince pomocí NaOH, Karajah et al. (2010) použili tuto metodu pro izolaci DNA jen ze samic. Tato metoda byla také využita v této práci. V této práci byly dále použity metody izolace pomocí DNeasy Plant Mini kit (Qiagen), pomocí InnuPure C12, kitu TriPure Isolation (Roche) a také izolace pomocí FTA[®] metody (Whatman). Tato metoda byla nejspolehlivější.

Real-time PCR je velice citlivá metoda. Leal et al. (2007) ve své práci uvádí schopnost detekovat 0,005 ng DNA. V této práci to s použitím totožných primerů bylo pouze 2,27 ng. Cao et al. (2005) dosáhli citlivosti 0,01 ng DNA.

Dle Leal et al. (2007) je real-time PCR velice citlivou metodou na PCR inhibitory. V této práci byly pro kvantifikaci zvoleny vzorky izolované ze dřeva, tyto vzorky amplifikovaly, proto můžeme říct, že tyto metody izolace jsou vhodné i pro zpracování izolované DNA pomocí real-time PCR.

7. Závěry a doporučení pro využití poznatků v praxi nebo pro další rozvoj oboru

Cílem této práce bylo získat nové poznatky o bionomii, o metodách diagnostiky a monitoringu háďátka *Bursaphelenchus xylophilus* a dalších druhích tohoto rodu. Z tohoto cíle vycházely dílčí cíle.

7.1. Zhodnocení náchylnosti sortimentu odrůd borovic pěstovaných v ČR vůči háďátkům rodu *Bursaphelenchus*, především pak *B. xylophilus*.

Háďátka borovicové je nejprogresivnějším druhem tohoto rodu, proto bylo zvoleno jako druh, na který byla testována náchylnost borovic.

Bylo zvoleno několik metod testování. 1. metodou bylo umělé napadení semenáčků borovic, všechny tyto semenáčky napadení nakonec podlehly.

2. metodou bylo namnožení hád'átka borovicového v segmentech větví, tato metoda se ukázala jako vhodná vzhledem k možnosti testovat více druhů naráz, nebylo zde limitní místo v laboratoři a také bylo snazší získat větve více druhů, než jejich sazenice. Všechny zkoumané druhy až na *Pinus strobus* ukázaly nárůst populace po 14 i 28 dnech pozorování, *P. strobus* vykázala po 28 dnech pokles.

Toto testování dokázalo reálnou možnost napadení našich borových porostů, které jsou převážně tvořeny *Pinus sylvestris*, hád'átkem borovicovým, neboť ta se ukázala jako vysoce citlivá vůči tomuto hád'átku.

3. metoda testování na agarových plotnách se neukázala jako vhodná.

7.2. Ověření metod monitorování přenašečů – brouků z čeledi *Cerambycidae* a jejich vhodnost jako přenašečů.

Při monitorování se nejvíce osvědčila metoda individuálního sběru, bylo odchyceno více larev než dospělců.

Při monitorování byly odchyceny druhy, které jsou přenašeči hád'átka borovicového, i toto potvrzuje hypotézu, že existuje reálná možnost introdukce hád'átka borovicového na naše území.

Nejméně se osvědčila metoda odchyty pomocí lapače Galloprotect, tato metoda nebyla v našich podmínkách úspěšná. Tuto metodu nelze doporučit pro použití v praxi v ČR.

7.3. Ověření metod monitorování hád'átek rodu *Bursaphelenchus*.

Byly používány ověřené metody monitorování již dříve zmíněné v publikacích, tyto metody se ukázaly jako vhodné.

Při monitorování byla použita i nová metoda odběru vzorků a to bez nutnosti kácet stromy, při odběru vzorků byl nápomocen odborně vyškolený stromolezec, který odebíral vzorky ve vrcholových částech stromů. Tato metoda dovoluje opětovné odebírání vzorků z toho samého stromu, dovoluje také sledování nárůstu napadení daného stromu a v neposlední

řadě je šetrnější pro porosty. Tato metoda se ukázala jako velice vhodná pro zavedení do praxe.

Místa monitorování byla zvolena se zřetelem na výskyt borovic na našem území.

7.4. Vyvinutí a ověření nových postupů ochrany proti hád'átkům rodu *Bursaphelenchus*, především pak proti *B. xylophilus*.

Byly testovány účinky 41 silic na všechna vývojová stádia *B. xylophilus*, 19 z těchto silic bylo 100% účinných při koncentraci 2,5 % a 13 silic dokonce již jen při koncentraci 0,5 %. Silice jsou netoxické pro necílové organismy a nabízejí perspektivní alternativu k chemickým nematocidům.

Pro ochranu obalového materiálu byly testovány účinky kyanovodíku, tato sloučenina vykazovala velice dobré účinky vzhledem k jiným chemikáliím, má dobrou penetrační schopnost, po odvětrání nezůstávají její rezidua ve dřevě a v neposlední řadě nezanechává na dřevě žádné viditelné stopy. Tato metoda se ukazuje jako velice vhodná alternativa k dosud používané termo terapii.

7.5. Studium morfologických znaků a ověření metod užívaných k tvorbě trvalých preparátů k diagnostice druhů hád'átek rodu *Bursaphelenchus*.

Pro diagnostiku na základě morfologických charakteristik bylo ověřeno několik metod fixace hád'átek, pomocí roztoku FAA, TAF, 4% a 10% formaldehydu.

Nejvíce se pro potřeby praxe osvědčila metoda fixace pomocí roztoku FAA a následné pomalé prosycení glycerolem, vnější i vnitřní struktury byly při této metodě nejméně poškozeny a výsledky byly tudíž nejméně zkresleny.

Při monitorování našeho území byly získány pozitivní vzorky ze čtyř stromů nacházejících se v okrese Hodonín. Při studiu jejich morfologických znaků byly určeny jako dva druhy, nejvíce podobné druhům *B. fungivorus* a *B. eggersi*.

7.6. Vyvinutí a ověření spolehlivosti molekulárně diagnostických metod pro určování druhů háďátek rodu *Bursaphelenchus*.

Pro urychlení diagnostiky *B. xylophilus* bylo testováno 5 metod izolace přímo z dřevních vzorků, všechny tyto metody spolehlivě vyizolovaly DNA háďátka ze dřeva, tato DNA byla dostatečně čistá i pro následnou analýzu pomocí real-time PCR, která je na PCR inhibitory citlivější než klasická PCR, je ovšem také citlivější k množství DNA. Všechny tyto metody lze doporučit pro potřeby diagnostických laboratoří zabývajících se háďátkem borovicovým.

Pro analýzu DNA získanou z jedinců při monitorování byly zvoleny primery S18 S 21, tyto primery vykazovaly nízkou specifitu pro DNA háďátek a amplifikovaly i DNA hub, která je neoddělitelně spjata s háďátkem, proto se tyto primery neosvědčily pro následnou analýzu a bude potřeba navrhnout primery nové, které budou vykazovat vyšší specifitu k háďátkům, nejlépe pak přímo k rodu *Bursaphelenchus*.

Na základě výsledků dílčích cílů se ukázala hypotéza, která vycházela z předpokladu, že existuje reálná možnost introdukce háďátka *Bursaphelenchus xylophilus* na území ČR, jako pravdivá, neboť se zde nacházejí druhy borovic náchylné pro toto háďátko a nacházejí se zde i jeho přenašeči, také podnebí se ukazuje jako vhodné. Druhá část hypotézy, že je možné získat poznatky, na základě kterých lze definovat podmínky a předpoklady pro oddálení zavlečení, nebo pro zabránění šíření a snížení škod, byla také naplněna, byly nalezeny a testovány s pozitivním výsledkem metody ochrany a byly testovány metody umožňující rychlou detekci tohoto háďátka.

8. Seznam použité literatury

- Abad, P., Tarés, S., Bruguier, N., De Guiran, G. 1991. Characterization of the relationships in the pinewood nematode species complex (PWNSC) (*Bursaphelenchus* spp.) using a heterologous unc-22 DNA probe from *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology*. 102. 303-308.
- Abelleira, A., Escuer, M., Arias, M., Mansilla, J. 2003. The genus *Bursaphelenchus* Fuchs (Nematoda: Aphelenchida) in north-west Spain. *Nematology*. 5. 677-685.
- Ambrogioni, L., Irdani, T., Caroppo, S. 2003. Records of *Bursaphelenchus* species on coniferous wood imported from Asian Russia and China to Italy. *Redia*. 88. 139-146.
- Anonym. 2008. Rozhodnutí komise ze dne 15. prosince 2008, kterým se mění rozhodnutí 2006/133/ES, kterým se po členských státech žádá dočasné přijetí doplňujících opatření proti šíření háďátka *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al. z oblastí Portugalska, mimo oblastí, v nichž byla potvrzena jeho nepřítomnost. Úřední věstník Evropské unie. 64-66.
- Anonym. 2014. Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství České Republiky v roce 2013. Ministerstvo zemědělství. Praha. 136 s. ISBN: 978-80-7434-153-3.
- Banks, H.J. 2002. Alternatives to methyl bromide for durables and timber. In: Proceedings of an International Conference on Alternatives to Methyl Bromide, Sevilla, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 69-74.
- Barbosa, P., Lima, A. S., Vieira, P., Dias, L. S., Tinaco, M. T., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Figueiredo, A. C., Mota, M. 2010. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology*. 42 (1). 8-16.
- Barton, A. F. M. 1999. Industrial use of eucalyptus oil. In Proceedings: The Oil Mallee Profitable Landcare Seminar. Oil Mallee Association of Western Australia, Perth, WA, Australia. 43-54.
- Beckenbach, K., Smith, M. J., Webster, J. M. 1992. Taxonomic affinities and intra- and interspecific variation in *Bursaphelenchus* spp. as determined by polymerase chain reaction. *Journal of Nematology*. 24. 140-147.
- Braasch, H. 2001. *Bursaphelenchus* species in conifers in Europe: distribution and morphological relationships. *EPPO Bulletin*. 31. 127-142.

- Braasch, H., Bennewitz, A., Hantusch, W. 2002. *Bursaphelenchus fungivorus* – ein Nematode aus der Gruppe der Holzennematoden im Pflanzensubstrat eines Gewächshauses und in Holz – und Rindenimport. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes. 54. 1-4.
- Braasch, H., Burgermeister, W., Pastrik, K. H. 1995. Differentiation of three *Bursaphelenchus* species by means of RAPD – PCR. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes. 47. 310-314.
- Braasch, H., Carppo, S., Ambrogioni, L., Michalopoulos, H., Skarmoutsos, G., Tomiczek, Ch. 1998. Pathogenicity of various *Bursaphelenchus* species to pines and implications to European forests. In: Suitability of pine forests in relation to the pine wilt and decline. Proceedings of International Symposium in Tokyo. 27. 14-22.
- Braasch, H., Metge, K., Burgermeister, W. 1999. *Bursaphelenchus* – Arten (Nematode – Parasitaphelenchidae) in Nadelgehölzen in Deutschland und ihre ITS-RFLP – Muster. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes. 51. 312-320.
- Braasch, H., Schönfeld, U., Polomski, J., Burgermeister, W. 2004. *Bursaphelenchus vallesianus* sp. N. – a new species of the *Bursaphelenchus* sexdentati group (Nematoda: parasitaphelenchidae) Nematol. Medit. 32. 71-79.
- Burgermeister, W., Metge, K., Braasch, H., Buchbach, E. 2005. ITS – RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchoididae) and observations on their distribution. Russian Journal of Nematology. 13. 29-42.
- Cao, A. X., Liu, X. Z., Zhu, S. F., Lu, B. S. 2005. Detection of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, Using a Real-time Polymerase Chain Reaction Assay. Phytopathology. 95. 566-571
- Courtney, W. D., Polley, D., Miller, V. L. 1955. TAF, an improved fixative in nematode technique. Plant Disease and Reproduction. 39. 570-571.
- Cram, M., Hanson J. 2004. How to Identify and Manage Pine Wilt Disease and Treat Wood Products Infested by the Pinewood nematodes. USDA. p. 8.
- Čapoun, T., Krykorková, J. 2008. Research of wood penetration with hydrogen cyanide. The Science for Population Protection. p. 6.
- Čermák, V., Vieira, P., Gaar, V., Čudějková, M., Foit, J., Zouhar, M., Douda, O., Mota, M. 2013. On the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematode: Parasitaphelenchinae) associated with wood and insects from declining forest trees in the Czech republic. Forest Pathology. doi 10.1111 / efp. 12031. p. 11

- De Ley, P., Blaxter, M. 2004. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translation clades into ranks and taxa. *Nematology Monographs and perspectives*. 2. 633-653.
- Duncan, L. W., Moens, M. 2006. Migratory endoparasitic nematodes. In: Perry, R. N., Moens, M. (Eds) *Plant nematology*. CABI Publishing. London. p. 123-152. ISBN: 978-0-85199-027-9
- Dwinell, L.D. 1994. Evaluation of sodium borate for the control of nematodes and wood-borers in pine logs. In: *Proceedings of the Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions*. 13-16.
- Dwinell, L. D., Mota, M. 2001. The Pinewood Nematode. *Workshop on Exotic Pests*. p 5.
- Dwinell, L.D., Thoms, E., Prabhakaran, S. 2003. Effect of sulfuryl fluoride on the pinewood nematode in pine wood. In: *Proceedings of the Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions*. 94.
- Elbadri, G. A. A., Lee, D. W., Park, J. C., Yu, H.B., Choo, H. Y., Lee, S. M., Lim, T. H. 2008. Nematocidal Screening of Essential Oils and Herbal Extracts against *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plant Pathology Journal*. 24 (2). 178-182.
- Escuer, M., Árias, M., Bello, A. 2002. Nematodes associated with coniferous woods in Spain. *Nematology*. 4. 265.
- Escuer, M., Árias, M., Bello, A. 2004. Occurrence of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Aphelenchida) in Spanish conifer forests. *Nematology*. 6. 155-156.
- Evans, H. F., McNamara, D. G., Braasch, H., Chadoeuf, J., Magnusson, C. 1996. Pest Risk Analysis (PRA) for the territories of the European Union (as PRA area) on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in genus *Monochamus*. *EPPO Bulletin/Bulletin OEPP*. 26. 199-249.
- Faria, J. M. S., Barbosa, P., Bennett, R. N., Mota, M., Figueiredo, A. C. 2013. Bioactivity against *Bursaphelenchus xylophilus*: Nematotoxics from essential oils, essential oils fractions and decoction waters. *Phytochemistry*. 94. 220-227.
- Ferris, V. R., Ferris, J. M., Faghihi, J. 1993. Variation in spacer ribosomal DNA in some cyst forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology*. 16. 177-184.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., Blaxter, M. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*. 11. 839-850.
- Fuchs, A. G. 1937. Neue parasitische und halbparasitische Nematoden bei Borkenkäfern und einige andere Nematoden. I. Teil die Parasiten der Waldgartner *Myelophilus piniperda*

- L. und *minor* Hartig und die Genera *Rhabditis* Dujardin, 1845 und *Aphelenchus* Bastian, 1865. Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik Oekologie und Geographie der Tiere, Jena. 70. 291-380.
- Fukushige, H. 1991. Propagation of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) on Fungi Growing in Pine-Shoot Segments. Applied Entomology and Zoology. 26 (3). 371-376.
- Furuno, T. 1982. Studies on the insect damage upon the pine-species imported in Japan on the withering of the pines by the pine wilt. Bulletin of the Kyoto University Forest. 54. 16-30.
- Futai, K. 2003. Abnormal metabolites in pine wood nematode – inoculated Japanese black pine. Japanese Journal of Nematology. 33 (2). 44-56.
- Futai, K., Takeuchi, Y. 2008. Field diagnosis of asymptomatic carrier of pinewood nematode. In: Mota, M., Viera, P. (Eds.) Pine wilt disease: a worldwide threat to forest ecosystems. Springer. Berlin. p. 279-289. ISBN: 9781402084546.
- Gaar, V. 2006. Hád'átka borovicové *Bursaphelenchus xylophilus* představuje nebezpečí i pro naše borovice. Ministerstvo zemědělství ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou zprávou. 8 s.
- Gaar, V.; Zouhar, M.; Douda, O.; Marek, M.; Nováková, E.; Ryšánek, P. 2006. First occurrence of *Bursaphelenchus vallesianus* in the Czech republic. In: Abstracts of Pine wilt disease: a worldwide threat to forest ecosystems. International Symposium, 10-14 July, 2006. Lisbon, Portugal, 2006, pp. 62 (abstract).
- Gu, J., Braasch, H., Burgermeister, W., Zhang, J. 2006. Records of *Bursaphelenchus* spp. intercepted in imported packaging wood at Ningbo, China. Forest Pathology 36. 323-333.
- Harmey, J. H., Harmey, M. A. 1994. DNA profiling of *Bursaphelenchus* species. Gene. 145. 227-230.
- Harris, T. S., Sandall, L. J., Powers, T. O. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. Journal of nematology. 22. 518-524.
- Heyrovský, L., Sláma, M. 1992. Tesaříkovití – *Cerambycidae* (Řád: Brouci – Coleoptera). Nakladatelství Kabourek. Zlín. 383 s. ISBN: 8090146600.
- Hoyar, U., Burgermeister, W., Braasch, H. 1998. Identification of *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Aphelenchoididae) on the basis of amplified ribosomal DNA (ITS-RFLP). Nachrichtenblatt für den Deutschen Pflanzenschutzdienst. 50. 273-277.

- Hu, Y. Q., Kong, X. C., Wang, X. R., Zhong, T. K., Zhu, X. W., Mota M. M., Ren, L. L., Liu, S., Ma, C. 2010. Direct PCR-based method for detecting *Bursaphelenchus xylophilus*, the pine wood nematode in wood tissue of *Pinus massoniana*. Forest Pathology. doi: 10.1111 / j.1439-0329.2010.00692.x. p 6.
- Hunt, D. J. 1993. Aphelenchida, *Longidoridae* and *Trichodoridae*: Their systematics and bionomics. CABI Publishing. London. p.352. ISBN: 0-85198-758-3.
- Chitwood, D. J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annu. Rev. Phytopathol. 40. 221-249.
- Choi, I. H., Park, J. Y., Shin, S. C., Kim, J., Park, I. K. 2007. Nematicidal activity of medicinal plant essential oils against the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Applied Entomology and Zoology. 42 (3). 397-401.
- Isman, M. B. 2001. Pesticides based on plant essential oils for management of plant pests and diseases. In: International symposium on development of natural pesticides from forest resources. Korea Forest Research Institute, Seoul, Korea. 1-9.
- Iwahori, H., Kanzaki, N., Futai, K. 2000. A simple polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-aided diagnosis method for pine wilt disease. Forest Pathology. 30. 157-194.
- Iwahori, H., Tsuda, K., Kanzaki, N., Izui, K., Futai, K. 1998. PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. Fundamental and Applied Nematology. 21. 655-666.
- Kakulia, G. A., Maglakelidze, L. 1973. Nematode fauna of *Hylurgops palliatus* in the Georgian SSR. Parazitologicheskii Sbornik, Tbilisi. 3. 76-78.
- Kakulia, G. A., Shalibashvili, G. 1976. The nematode fauna of *Hylaster ater* in the pine forests of the Pitsundskii and Ritsinskii reserves. Zapovedniki Gruzii. Sbornik Trudov. 4. 259-262.
- Kang, J. S., Choi, K. S., Shin, S. H., Moon, I. S., Lee, S. G., Lee, S. H. 2004. Development of an efficient PCR-based diagnostic protocol for the identification of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). Nematology. 6. 279-285.
- Kanzaki, N. 2008. Taxonomy and Systematics of the Nematode Genus *Bursaphelenchus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). In: Zhao, B. G., Futai, K., Sutherland, J. R., Takeuchi, Y. (Eds) Pine Wilt Disease. Springer. Berlin. p. 44-66. ISBN: 9784431756545.

- Kanzaki, N., Aikawa, T., Maehara, N., Ichihara, Y. 2010. An inoculation experiment of Japanese *Bursaphelenchus* nematodes on Japanese black and red pine, *Pinus thunbergii* and *P. densiflora*. Journal of Forest Research. 1-6.
- Kanzaki, N., Futai, K. 2002. A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the xylophilus group. Nematology. 4. 35-41.
- Kapitola, P., Gaar, V. a Nováková, J. 2009. Postup při průzkumu výskytu hád'átka borovicového *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle et al. v dřevěném obalovém materiálu původem z Portugalska. Věstník SRS 1/2009. Státní rostlinolékařská správa. 7 s.
- Karajeh, M. R., Abu-Gharbieh, W. I., Masoud, S. A. 2010. DNA Extraction and PCR-Based Diagnosis of the Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species and Races) of Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences. 6 (3). 342-352.
- Kong, J. O., Lee, S. M., Moon, Y. S., Lee, S. G., Ahn, Y. J. 2006. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils against *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). Asia - Pacifik Entomology. 9 (2). 173-178.
- Kosaka, H., Aikawa, T., Ogura, N., Tabata, K., Kiyohara, T. 2001. Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: the induced resistance of pine trees by the avirulent isolates of nematode. European Journal of Plant Pathology. 107. 667-675.
- Křemář, M., Břicháček, B. 1993. Molekulárně biologické metody ve virologické diagnostice. IDVPZ Brno. 86 s. ISBN: 80-7013-143-8.
- Křemen, J., Pohlreich, P., Stříbrná, J. 1998. Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně. Karolinum Praha. 117 s. ISBN: 80-7184-525-6.
- Kula, E., Kajfosz, R., Zabecki, W., Kejdana, R. 2009. Kalamity v mladých smrkových porostech a kůrovci. Lesnická práce. 88 (8).
- Kurashvili, B. E., Kakulia, G. A., Devdariani, T. G. 1980. Parasitic nematodes of the bark-beetles in Georgia. Tbilisi, Georgia, Metsniereba. p 172.
- Kuroda, K., Ohira, M., Okamura, M., Fujisawa, Y. 2007. Migration and population growth of the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) related to the symptom development in the seedlings of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) families selected as resistant to pine wilt. Journal of the Japanese Forest Society. 89. 241-248.
- Kusano, T., Nakamura, K., Fujii, T., Sugawara, Y., Ichikawa, Y., Masuyama, E., Shinkawa, H., Okamatsu, M., Kitaura, Y., Tsubaki, K., Uchida, T., Togashi, K., Enoki, S., Jikumaru, S., Ikeda, S. 1999. RAPD-PCR fingerprinting patterns of six

- Bursaphelenchus xylophilus* isolates and *B. mucronatus* isolate. In: Futai, K., Togashi, K., Ikeda, T. (Eds). Sustainability of pine forests in relation to pine wilt and decline. Proceedings of the Symposium, Tokyo, Japan, 26-30 October 1998. Kyoto, Japan, Shokado Shoten. p. 52-56.
- Leal, I., Green, M., Allen, E., Humble, L., Rott, M. 2005. An effective PCR-based diagnostic method for the detection of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) in wood samples from lodgepole pine. *Nematology*. 7. 833-842.
- Leal, I., Green, M., Allen, E., Humble, L., Rott, M. 2007. Application of a real-time PCR method for the detection of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in wood samples from lodgepole pine. *Nematology*. 9. 351-362.
- Li, H., Trinh, P. Q., Waeyenberge, L., Moens, M. 2009. Characterisation of *Bursaphelenchus* spp. isolated from packaging wood imported at Nanjing, China. *Nematology*. 11 (3). 375-408.
- Mamiya, Y. 1985. Initial pathological changes and disease development in pine trees induced by the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Review of Phytopathology*. 51. 546-555.
- Matsunaga, K., Togashi, K. 2004. A simple method for discriminating *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* by species specific polymerase chain reaction primer pairs. *Nematology*. 6. 273-277.
- Michalopoulos-Skarmoutsos, H., Skarmoutsos, G., Kalapanida, M., Karageorgos, A. 2004. Surveying and recording of nematodes of the genus *Bursaphelenchus* in conifer forests in Greece and pathogenicity of the most important species. In: Mota, M., Vieira, P. (eds.). The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Proceedings of an International Workshop, University of Évora, Portugal, August 20-22, 2001. *Nematology Monographs and Perspectives*, Volume 1. Leiden, The Netherlands, E. J. Brill. pp. 113-126.
- Mota, M. M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgermeister, W., Metge, K., Sousa, E. 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*. 1. 727-734.
- Mota, M. M., Vieira, P. 2008. (Eds.) Pine wilt disease: a worldwide threat to forest ecosystems. Springer. Berlin. p. 405. ISBN: 978-1-4020-8455-3.
- Mota, M. M., Viera, P., Futai, K. 2009. Pine wilt disease and the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. In: Ciancio, A., Mukerji, K. G. (Eds.) *Integrated*

- management of fruit crops and forest nematodes. Springer. New York. p. 253-274. ISBN: 9781402098574.
- Nickle, W. R., Golden, A. M., Mamiya, Y., Wergin, W. P. 1981. On the taxonomy and morphology of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1970. *Journal of Nematology*. 13. 385-392.
- Penas, A. C., Dias, L. S., Mota, M. M. 2002. Precision and selection of extraction methods of aphelenchid nematodes from maritime pine wood, *Pinus pinaster* L. *Journal of Nematology*. 34. 62-65.
- Porebski, S., Bailey, L. G., Baum, B. R. 1997. Modification of CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15 (1). 8-15.
- Reynolds, M.M., Williams, C.G. 2004. Extracting DNA from submerged pine wood. *Genome*. 47. 994-997.
- Riberio, B., Espada, M., Vu, T., Nóbrega, F., Mota, M., Carrasquinho, I. 2012. Pine wilt disease: detection of the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) as a tool for a pine breeding programme. *Forest Pathology*. 42 (6). 521-525.
- Rühm, W. 1956. Die Nematoden der Ipiden. *Parasitologische Schriftenreihe* 6. 1 – 435.
- Rutherford, T. A., Riga, E., Webster, J. M. 1992. Temperature – mediated behavioral relationship in *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus*, and their hybrids. *Journal of Nematology*. 24. 40-44.
- Ryss, A., Vieira, P., Mota, M., Kulinich, O. 2005. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. *Nematology* 7. 393-458.
- Shi, J., Chen, F., Luo, Y – Q., Wang, Z., Xie, B – Y. 2013. First isolation of pine wood nematode from *Pinus tabulaeformis* forests in China. *Forest Pathology*. 43. 59-66.
- Schrader, G., Unger, G. 2003. Plant quarantine as a measure against invasive alien species. The framework of the international Plant Protection Convention and the plant health regulations in the EU. *Biological Invasions*. 5. 357-364.
- Schröder, T., McNamara, D. G., Gaar, V. 2009. Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. *Bulletin OEPP/EPPO*. 39. 179-188.
- Schwarz, L., Deckert, W., 1930. On the penetrative capacity of hydrocyanic acid gas in practical fumigation work. *Zeitschrift Desinfek.* 22. 750-758.

- Skarmoutsos, G., Skarmoutsos, H. 1999. First record of *Bursaphelenchus* nematodes from pine forests in Greece. *Plant Disease*. 83. 879.
- Soma, Y., Naito, H., Misumi, T., Mizobuchi, M., Tsuchiya, Y., Matsuoka, I., Kawakami, F., Hirata, K., Komatsu, H. 2001. Effects of Some Fumigants on Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* Infecting Wooden Packages. 1. Susceptibility of Pine Wood Nematode to Methyl Bromide, Sulfuryl Fluoride and Methyl Isothiocyanate. *Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan*. 37. 19-26.
- Southey, J. F. 1986. *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. Her Majesty's Stationery Office, London. p. 202. ISBN: 0-11-242754-5.
- Sriwati, R., Takemoto, S., Futai, K. 2008. The relationship between the pinewood nematode (PWN) and fungi cohabiting in pine trees inoculated with the PWN. In: Mota, M., Viera, P. (Eds.) *Pine wilt disease: a worldwide threat to forest ecosystems*. Springer. Berlin. p. 101-114. ISBN: 9781402084546.
- Strachotová, H. 2010. Výsledky detekčního průzkumu škodlivých organismů v ČR za rok 2009. *Státní rostlinolékařská správa*. 30-31.
- Suzuki, K. 2002. Pine wilt disease – a threat to pine forest in Europe. *Dendrobiology*. 48. 71-74.
- Suzuki, K., Kiyohara, T. 1978. Influence of water stress on development of pine wilting disease caused by *Bursaphelenchus lignicolus*. *European Journal of Forest Pathology*. 8. 97-107.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. 2005 *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita v Brně. 188 s. ISBN-13: 978-80-210-3841-7.
- Takeuchi, Y., Kanzaki, N., Futai, K. 2005. A nested PCR-based method for detecting the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood. *Nematology*. 7. 775-782.
- Tarès, S., Abad, P., Bruguier, N., Guiran, G. D. 1992. Identification and evidence for relationships among geographical isolates of *Bursaphelenchus* spp. (pinewood nematode) using homologous DNA probes. *Heredity*. 68. 157-164.
- Tarès, S., Lemontey, J. M., Guiran, G., Abad, P. 1993. Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA sequence specific for the phytoparasitic nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Gene*. 129. 269-273.
- Tarès, S., Lemontey, J. M., Guiran, G., Abad, P. 1994. Use of species-specific satellite DNA from *Bursaphelenchus xylophilus* as a diagnostic probe. *Phytopathology*. 84. 294-298.

- Tarlochan, S. P., Sutherland, J. R. 1989. Pathogenicity of Canadian isolates of the *Bursaphelenchus xylophilus* (pinewood nematode) to provenances of *Pinus sylvestris* and *Pinus contorta* as grown in Finland: a greenhouse study. *Scandinavian Journal of Forest Research.* 4 (4). 549-557.
- Tenkáčová, I., Mituch, J. 1987. Nematodes new for the fauna of Czechoslovak Socialist Republic with the affinity to scolytids (Coleoptera, Scolytidae). *Helminthologia.* 24. 281-291.
- Tomiczek, Ch., Braasch, H., Burgermeister, W., Metge, K., Hoyer, U., Brandstetter, M. 2003. Identification of *Bursaphelenchus* spp. isolated from Chinese packaging wood imported to Austria. *Nematology.* 5 (4). 573-581.
- Verbylaitė, R., Beišys, P., Rimas, V., Kuusienė, S. 2010. Comparison of Ten DNA Extraction Protocols from Wood of European Aspen (*Populus tremula* L.). *Baltic Forestry.* 16 (1). 35 – 42).
- Webster, J. M., Anderson, R. V., Baillie, D.L., Beckenbach, K., Curran, J., Rutherford, T.A. 1990. DNA probes for differentiating isolates of the pinewood nematode species complex. *Revue de Nématologie.* 13: 255-263.
- Webster, J., Mota, M. M., 2008. Pine Wilt Disease: Global Issues, Trade and Economic Impact. In: Mota, M. M., Vieira, P. (Eds) *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems.* Springer. p. 1-3. ISBN: 9781402084546.
- Yang, B. J. 2003. The history, dispersal and potential threat of pine wood nematode in China. *Nematology Monographs and Perspectives.* 1. 21-24.
- Ye, W., Giblin-Davis, R. M., Braasch, H., Morris, K., Thomas W. K. 2007. Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 43. 1185-1197.
- Zahradník, J. 2001. *Evropští tesařici.* Granit. Praha. 143 s. ISBN: 8072960105.
- Zhao, L., Wei, W., Liu, X., Kang, L., Sun, J. 2007. A novel rapid sampling method for pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *Canadian journal of Forest Research.* 37. 1867-1872.
- Zheng, J., Xu, J., Wu, Y., Li, D. 1998. RAPD fingerprinting on inter- and infra-species of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *Journal of Zhejiang Agricultural University.* 24. 597-601.
- Zouhar, M., Gaar, V., Mazáková, J., Ryšánek, P., Marek M. 2007. Diagnostika významných hád'átek rodu *Bursaphelenchus*. *ČZU v Praze.* 50 s. ISBN: 978-80-213-1613-3.

Zuryn , S., Kuang , J., Ebert , P. 2008. Mitochondrial modulation of phosphine toxicity and resistance in *Caenorhabditis elegans*. Toxicological sciences. 120. 179-186.

9. Přílohy

Seznam obrázků v textu:

- Obr. 1: Výskyt háďátka *Bursaphelenchus xylophilus* - str. 8.
Obr. 2: Životní cyklus háďátka *B. xylophilus* - str. 10.
Obr. 3: Mapa druhového složení lesních porostů v ČR - str. 12.
Obr. 4: Mapa výskytu sypavky borové - str. 13.
Obr. 5: Teplotní oblasti Evropy - str. 14.
Obr. 6: Graf průměrných měsíčních teplot na území ČR - str. 14.
Obr. 7: *Monochamus galloprovincialis pistor* - str. 16.
Obr. 8: *Monochamus saltuarius* - str. 16.
Obr. 9: *Monochamus sutor* - str. 17.
Obr. 10: *Acanthocinus grisseus* - str. 17.
Obr. 11: *Monochamus sartor* - str. 18.
Obr. 12: *M. urussovi* - str. 18.
Obr.13: Tvary spikuly typické pro rod *Bursaphelenchus* - str. 27.
Obr. 14: *Bursaphelenchus xylophilus* - str. 29.
Obr. 15: *B. mucronatus* - str. 30.
Obr. 16: *B. vallesianus* - str. 31.
Obr. 17: Mapa ČR - str. 44.
Obr. 18: Mapa s výsledky monitorování ČR - str. 74.
Obr 19: Elektroforeogram č. 1 - str. 93.
Obr 20: Elektroforeogram č. 2 - str. 94.
Obr 21: Elektroforeogram č. 3 - str. 95.
Obr 22: Elektroforeogram č. 4 - str. 95.
Obr 23: Elektroforeogram č. 5 - str. 97.
Obr 24: Elektroforeogram č. 6 - str. 97.
Obr 25: Elektroforeogram č. 7 - str. 98.
Obr 26: Elektroforeogram č. 8 - str. 98.
Obr 27: Elektroforeogram č. 9 - str. 99.
Obr 28: Elektroforeogram č. 10 - str. 99.

Obr 29: Elektroforeogram č. 11 - str. 100.

Obr 30: Elektroforeogram č. 12 - str. 100.

Publikační přílohy:

Publikace s IF:

Publikace č. 1:

Douda, O., Zouhar, M., Maňasová, M., Dlouhý, M., Lišková, J., Ryšánek, P. Přijato k publikaci. Hydrogen cyanide for treating wood against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) - results of a model study. Journal of Wood Science.

Publikace č. 2:

Marek, M., Zouhar, M., Douda, O., Maňasová, M., Ryšánek. 2014. Exploitation of FTA cartridges for the sampling, long-term storage and DNA-based analyses of plant-parasitic nematodes. Phytopatology. 104 (3). 306-312.

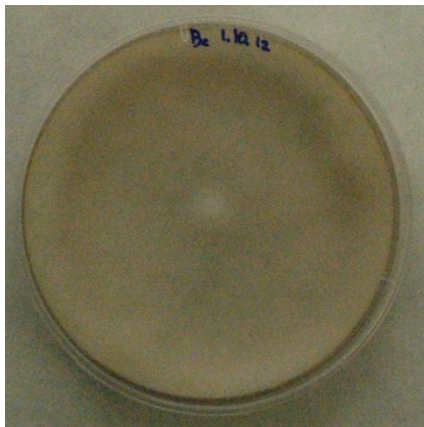
Publikace č. 3:

Stejskal, V., Douda, O., Zouhar, M., Maňasová, M., Dlouhý, M., Šimbera, J., Aulický, R. 2014. Wood penetration ability of hydrogen cyanide and its efficacy for fumigation of *Anoplophora glabripennis*, *Hylotrupes bajulus* (Coleoptera), and *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda). International Biodeterioration & Biodegradation. 86. 189-195.

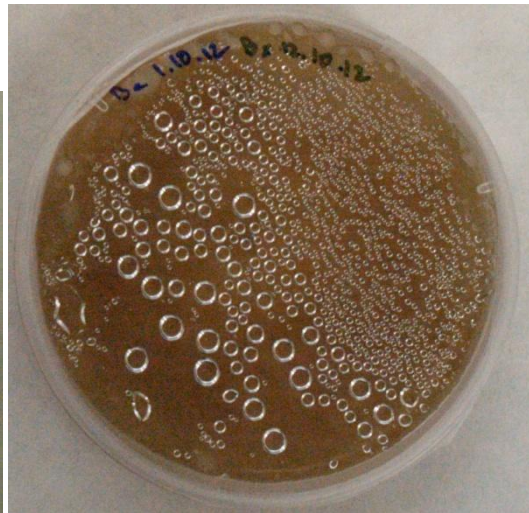
Recenzované publikace:

Publikace č. 1:

Maňasová, M., Douda, O. Zouhar, M., Nováková, E., Mazáková, J., Ryšánek, P. 2012. Gaseous Hydrogen Cyanide as an Agent to Control Nematodes in Plant Materials. Scientia agriculturae bohemica. 43 (2). 53-57.



Obr. 1: Kultura houby *Botrytis cinerea*.



Obr. 2: Kultura houby *B. cinerea* s háďátkou *B. xylophilus*.



Obr. 3: *Monochamus galloprovincialis*, poblíž obce Hovorany (foto M. Zouhar).



Obr. 4: Odběr dřeva pomocí dláta (Zouhar a kol., 2007).



Obr. 5: Odběr vzorků lezcem.



Obr. 6: Suspenze silice a Tweenu20.



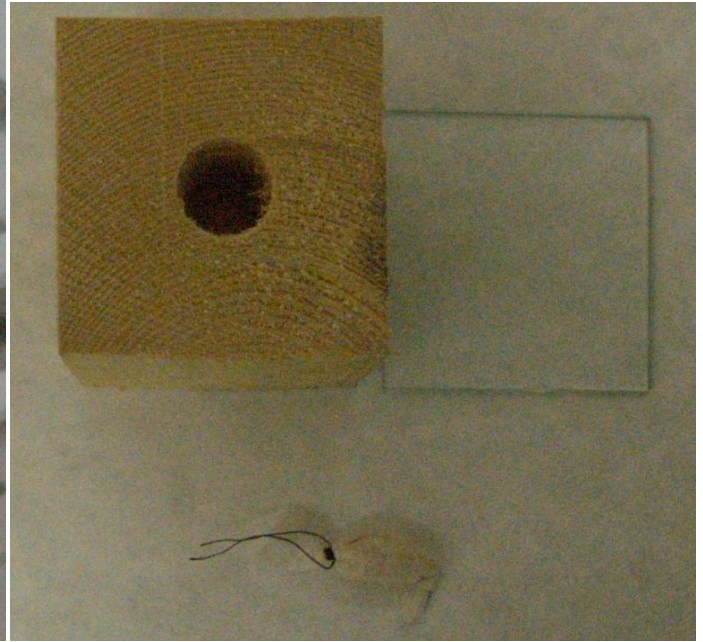
Obr. 7: Tissue Culture OrPlates s naředěnými silicemi.



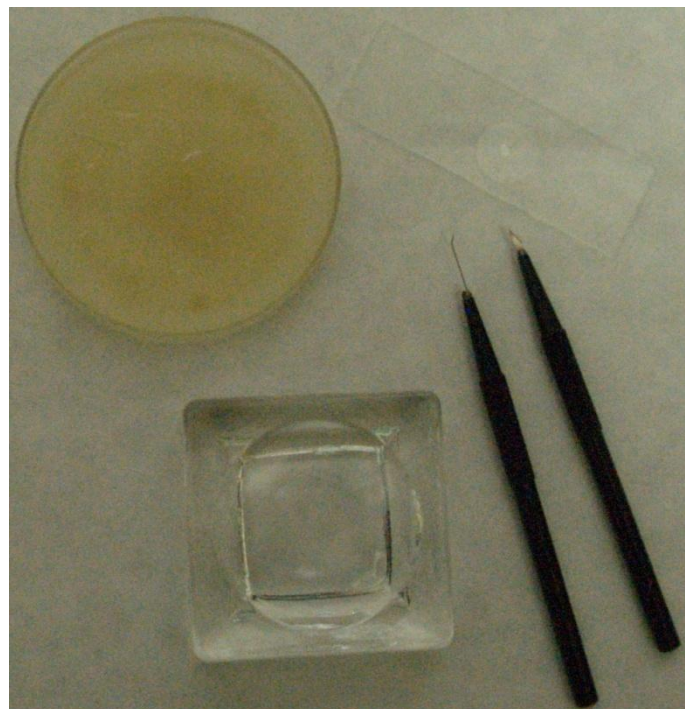
Obr. 8: Široká špička pro pipetování suspenze silic.



Obr. 9: Speciálně upravené víčko plastové zkumavky s tkaninou Uhelon.



Obr. 10: HCN, pokus s pilinami. Obr. 11: HCN, pokus se špalcky.



Obr. 12: Nematologická sada.



Obr. 13: *Pinus mugo wintergold*.



Obr. 14: *Pinus nigra pumilla*.



Obr. 15: *Pinus sylvestris nana*.



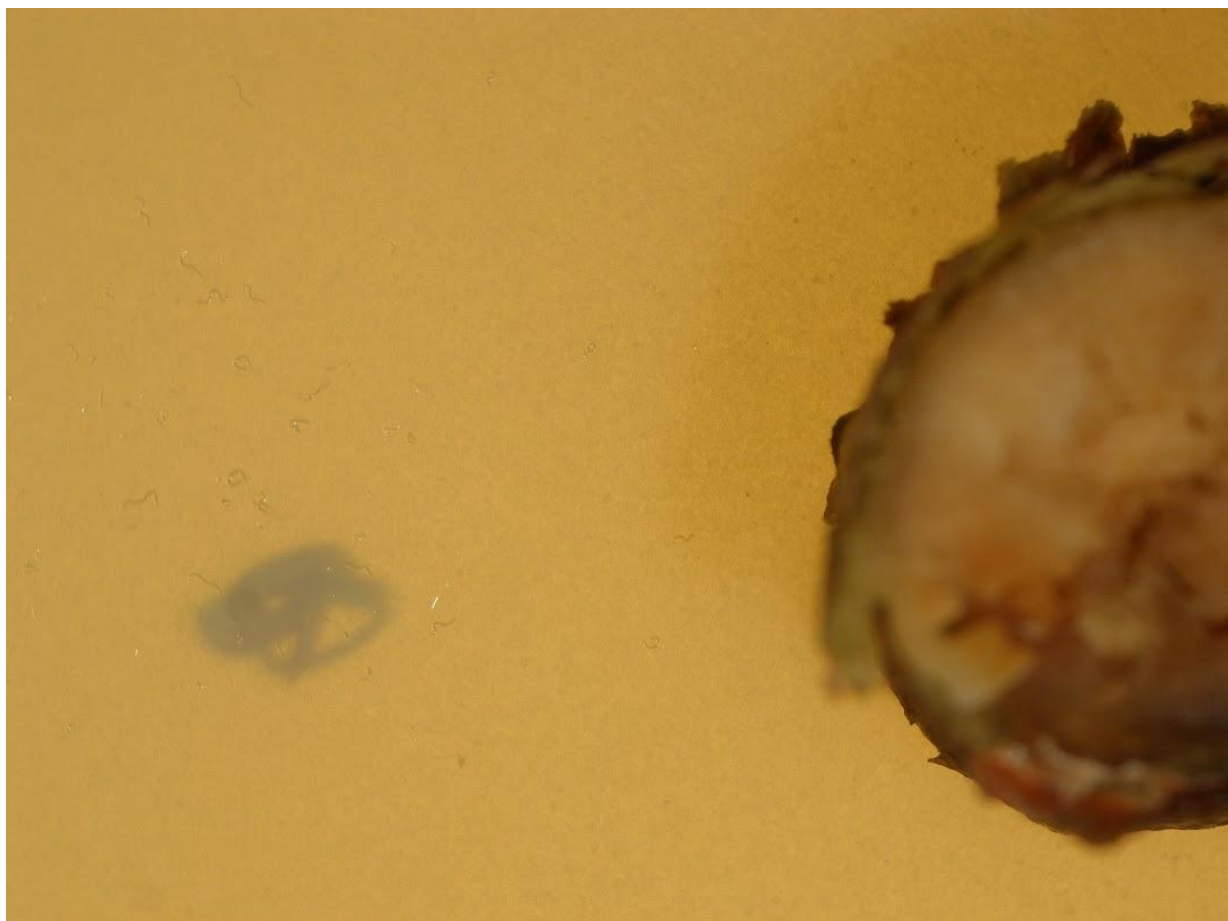
Obr. 16: *Pinus heldreichii*.



Obr. 17: *Pinus mugo pumillo*.



Obr. 18: *Pinus cembra*.



Obr. 19: Pokus atraktivity na agarových plotnách.



Obr. 20: Infestovaný špalíček na agarové plotně, šipkou je označeno háďátko borovicové.



Obr. 21: Samec a Samice *M. galloprovincialis*, u Obce Hovorany (foto M. Zouhar).



Obr. 22: Příznakový strom v lokalitě u silnice č. 55, strom č. 155.



Obr. 23: Příznakový strom v lokalitě u obce Rohatec.



Obr. 24: Strom s výskytem brouků *M. galloprovincialis* u obce Hovorany.



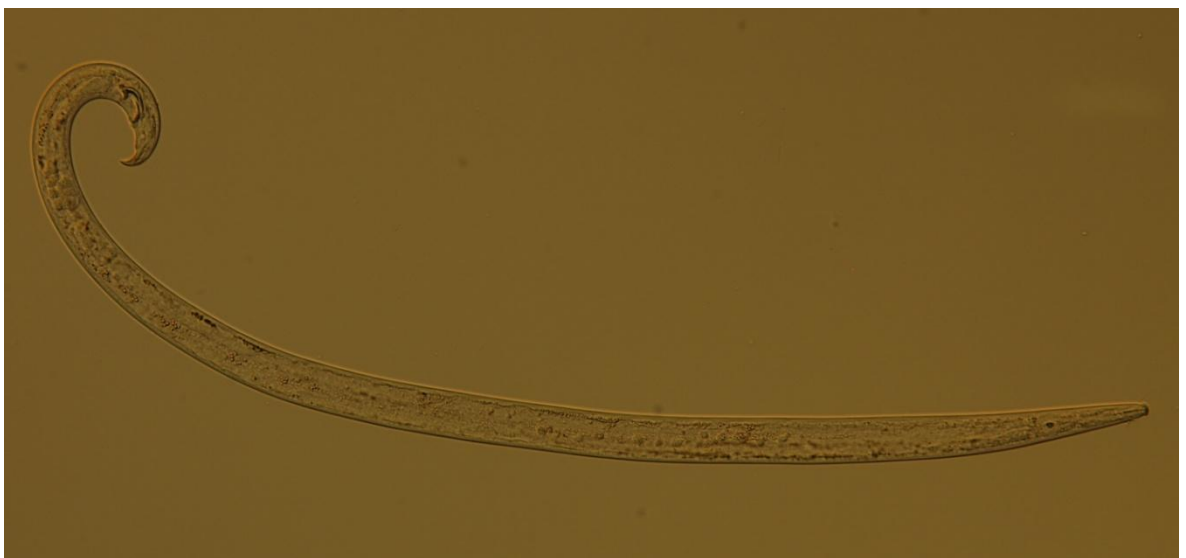
Obr. 25: Výletové otvory brouků z čeledi *Cerambycidae*, příznakový strom u obce Rohatec, později označovaný jako "pokácený".



Obr. 26: Larvy brouků z čeledi *Cerambycidae*, příznakový strom u obce Rohatec, spadlý označovaný jako "x".



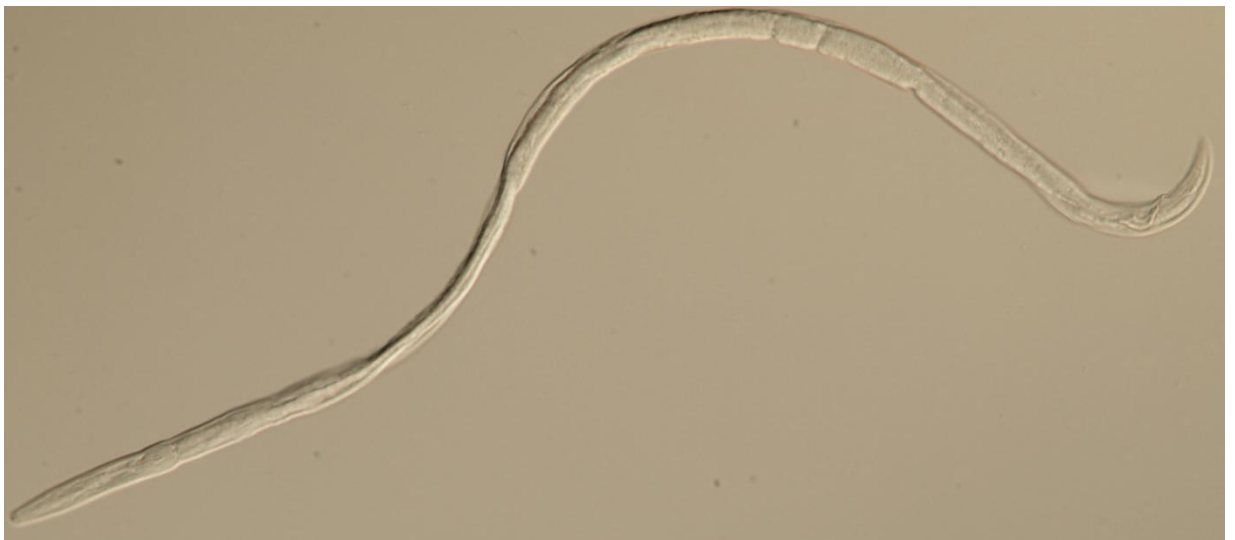
Obr. 27: Strom po odběru dlátem, označen číslem na kovové destičce. Lokalita u obce Rohatec. Pod kůrou patrná hmyzí aktivita.



Obr. 28: Samec *B. xylophilus* fixovaný FAA.



Obr. 29: Samice *B. xylophilus* fixovaná FAA.



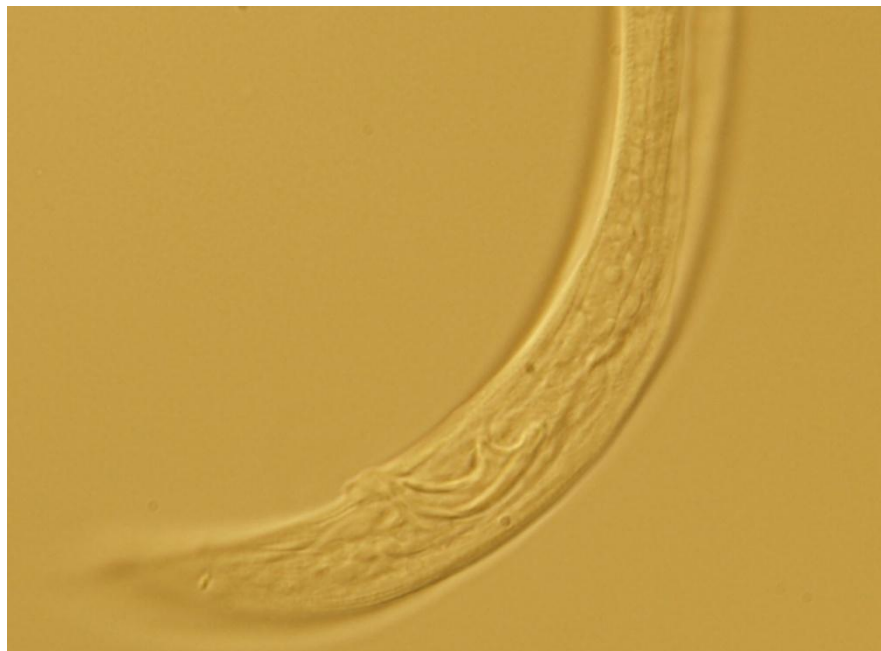
Obr. 30: Samec ze stromu č. 13, fixace 4% formaldehydem (foto V. Kuchař).



Obr. 31: Samec ze stromu č. 1, fixace 4% formaldehydem (foto V. Kuchař).



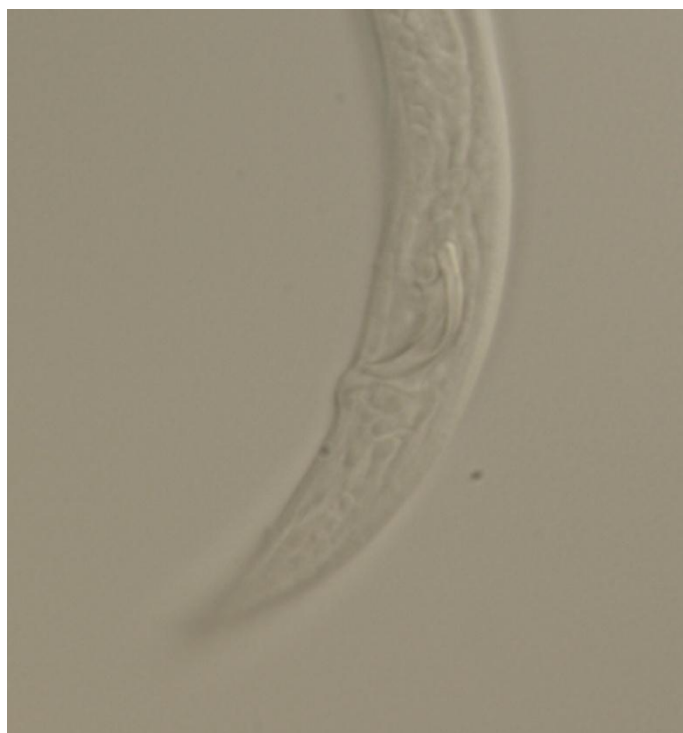
Obr. 32: Spikula samce č. 1 získaného z pokáceného stromu z lokality - Rohatec.



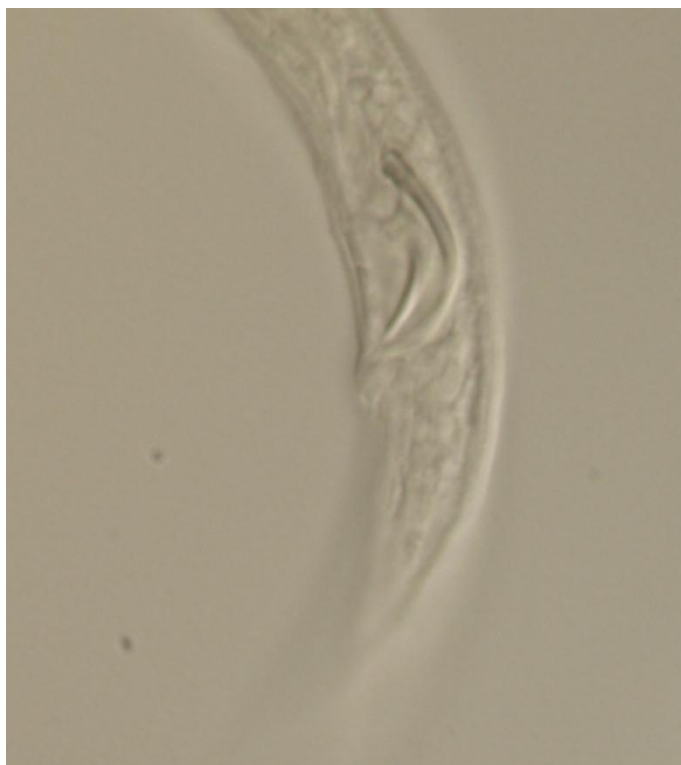
Obr. 33: Spikula samce č. 2 získaného z pokáceného stromu z lokality - Rohatec.



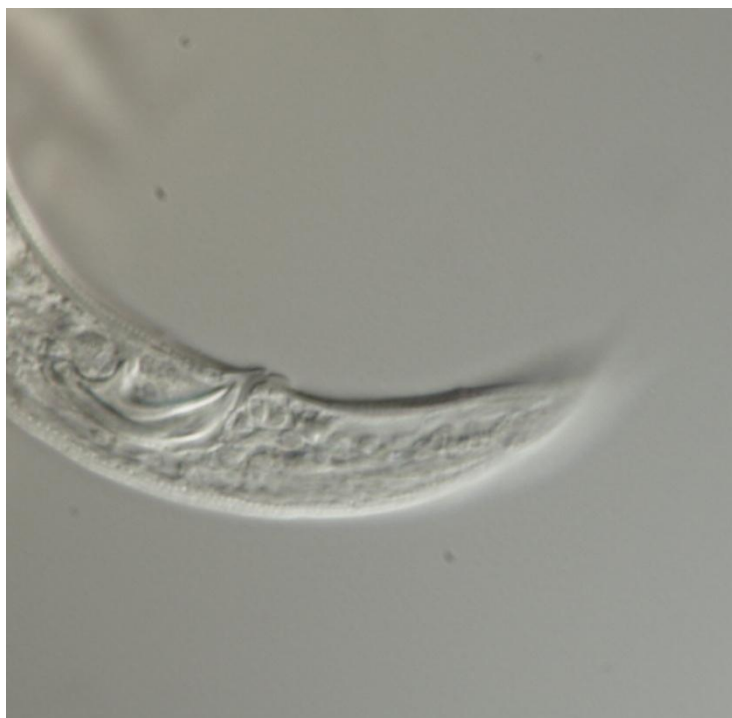
Obr. 34: Hlava samce č. 3 získaného z pokáceného stromu z lokality - Rohatec.



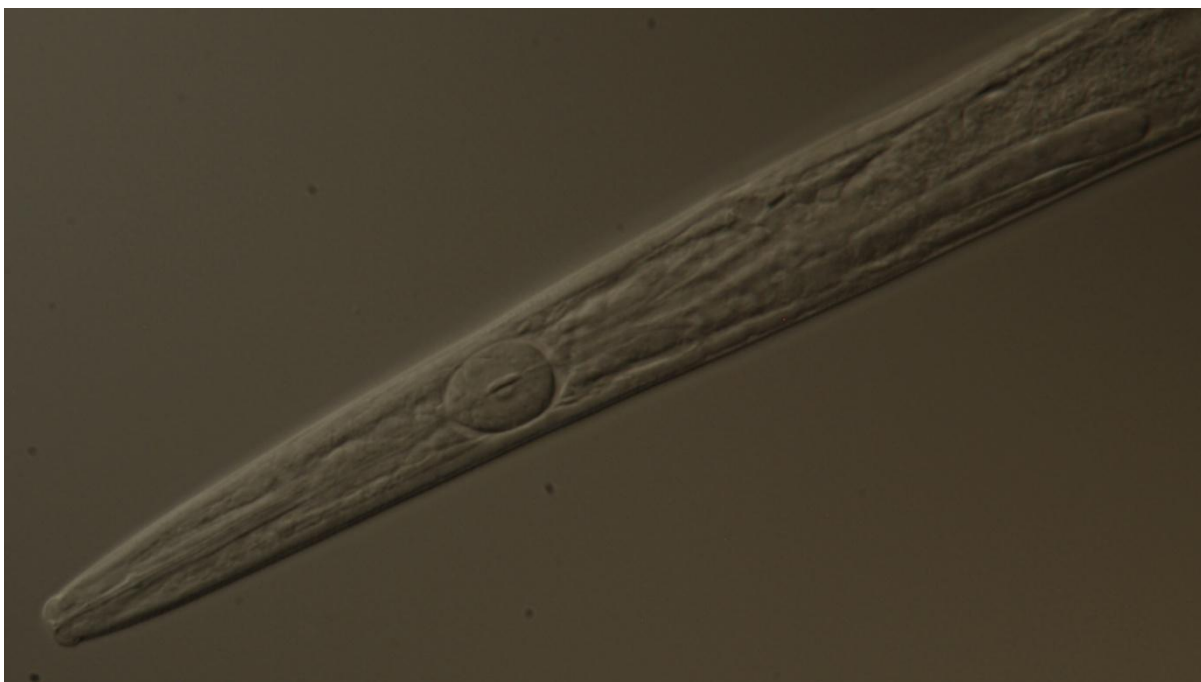
Obr. 35: Spikula samce č. 3 získaného z pokáceného stromu z lokality - Rohatec.



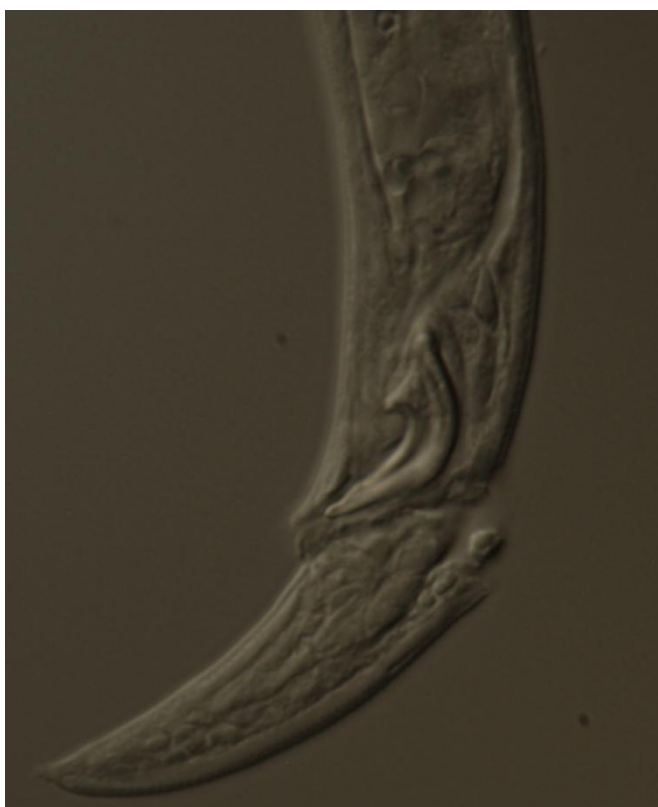
Obr. 36: Spikula samce č. 4 získaného z pokáceného stromu z lokality - Rohatec.



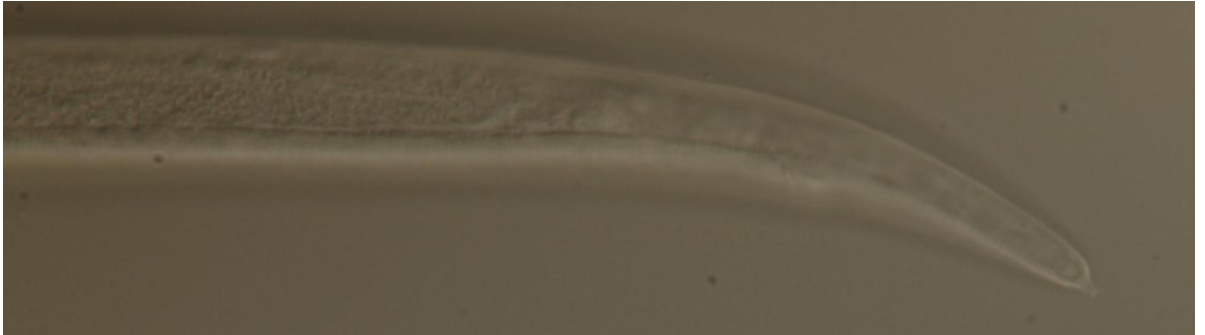
Obr. 37: Spikula samce č. 5 získaného z pokáceného stromu z lokality - Rohatec.



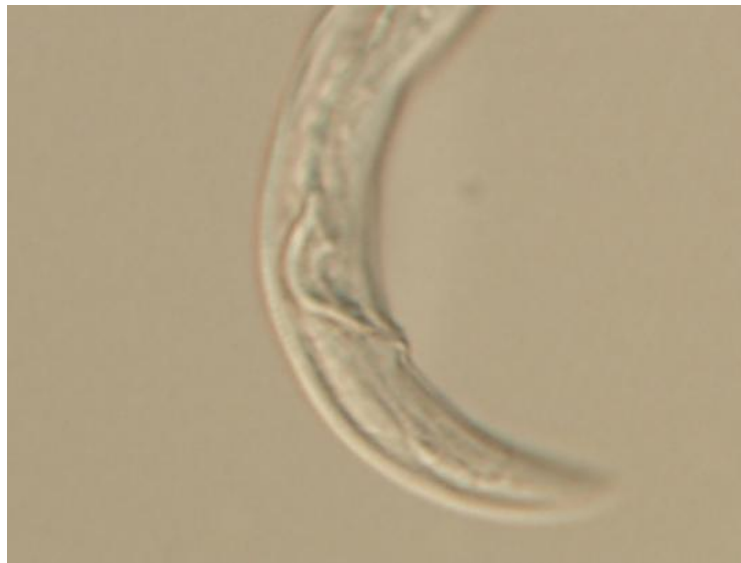
Obr. 38: Hlava samce č. 1 získaného ze stromu č. 1 z lokality - silnice č. 55 (foto V. Kuchař).



Obr. 39: Spikula samce č. 2 získaného ze stromu č. 1 z lokality - silnice č. 55 (foto V. Kuchař).



Obr. 40: Ocasní část samice č. 1 získané ze stromu č. 1 z lokality - slinice č. 55 (foto V. Kuchař).

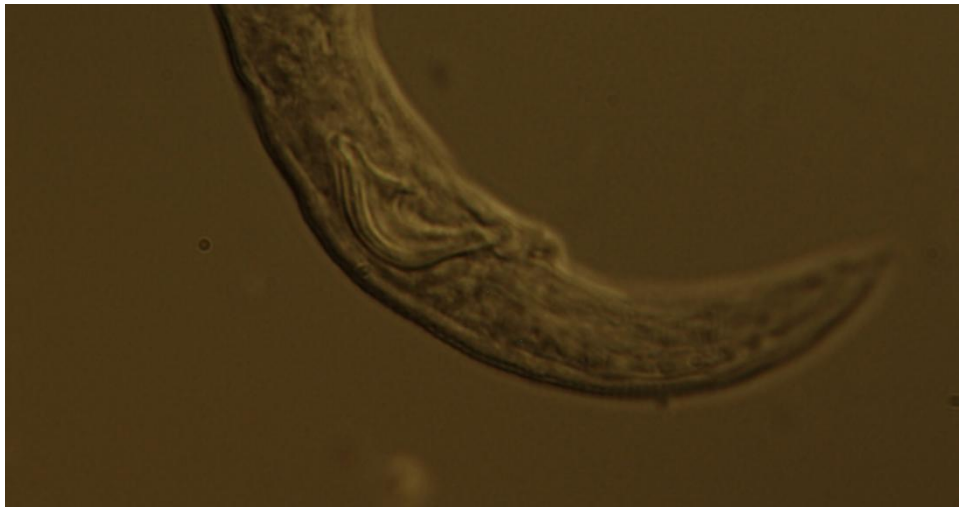


Obr. 41: Spikula samce č. 1 získaného ze stromu č. 13 z lokality - silnice č. 55 (foto V. Kuchař).

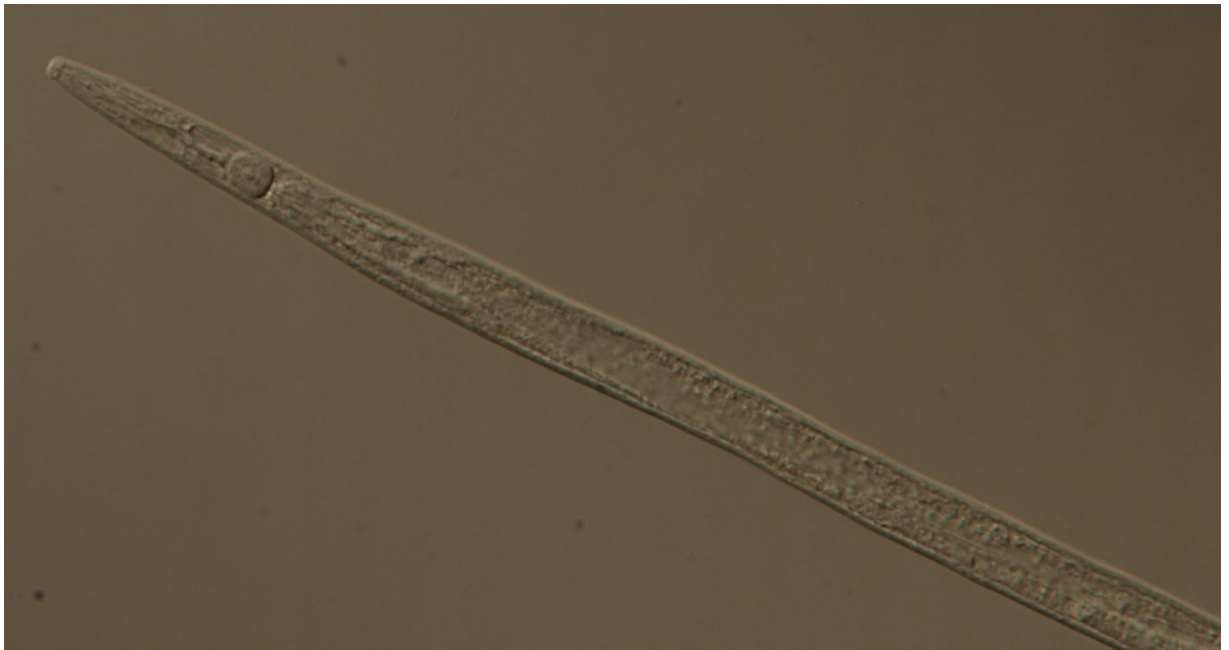


Obr. 42: Obr. 59: Spikula samce č. 2 získaného ze stromu č. 13 z lokality - silnice č. 55 (foto

V. Kuchař).



Obr. 43: Obr. 59: Spikula samce č. 3 získaného ze stromu č. 13 z lokality - silnice č. 55 (foto V. Kuchař).



Obr. 44: Hlava samce č. 4 získaného ze stromu č. 13 z lokality - silnice č. 55 (foto V. Kuchař).

Hydrogen cyanide for treating wood against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) - results of a model study

Note

O. Douda^{1*}, M. Zouhar², M. Maňasová², M. Dlouhý³, J. Lišková³, P. Ryšánek²

¹ Crop Research Institute Prague, Division of Plant Health, Drnovská 507, 161 06 Prague 6 - Ruzyně, Czech Republic

² Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Plant Protection, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6 - Suchbát, Czech Republic

³ Lučební závody Draslovka a.s. Havlíčkova 605, 280 99 Kolín IV, Czech Republic

* - corresponding author; e-mail: douda@vurv.cz, tel.: +420 2330 224 94

fax: +420 233 311 591

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; methyl bromide alternative; hydrogen cyanide; fumigation; wood treatment

Partial results were presented as lecture at 6th International Congress of Nematology in Cape Town, South Africa in May 2014.

Abstract

The Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) belongs to economically most important quarantine plant parasitic nematodes in Asia and Europe. As wood transported within the international trade plays major role in *B. xylophilus* spreading into new areas attention should be given to wood treatment. With methyl bromide ban in the EU in 2000 new chemicals should be investigated. This work describes results obtained from model fumigation of hollow wooden blocks containing *B. xylophilus* nematodes in sawdust with gaseous hydrogen cyanide (HCN). Data considering HCN concentration in gas chamber and treated wooden blocks are also presented; HCN concentrations inside wooden blocks were recounted to ct product values which show irregular sorption of HCN by the wood. Total *B. xylophilus* mortality was observed in the variants treated with the initial HCN concentration of 12.30 g.m⁻³ and exposure times from 8 to 20 hours, 18.21 g.m⁻³ and exposure times of 2, 4, 6, 10 and 16 to 20 hours, 21.71 g.m⁻³ and exposure times of 12, 18 and 20 hours and 24.12 g.m⁻³ and exposure times of 2, 6, 12 and 18 hours. Results show overall good efficiency of HCN treatment on *B. xylophilus* mortality, however research on naturally infested wood should be desirable.

Introduction

Goods exchanges play major roles in spreading quarantined pest organisms. This is especially true for wood-borne pests, which can also be transported within the packing wood. A major pest that can be transported this way is the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). This nematode species currently presents a major threat to pine trees in large parts of Europe [1] and East Asia [2]. *B. xylophilus* originates from North America, where it lives in the local conifers from the genus *Pinus* without causing any substantial damage [3]. However, bringing the *B. xylophilus* nematode to Japan during the beginning of the 20th century has led to widespread mass devastation of the local pines. From the end of World War II to 2002, pine wilt disease caused the loss of 26 million m³ of timber in Japan. The *B. xylophilus* nematode was first isolated and described as the cause of pine tree damage from the timber of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) as late as 1969 [1]. The presence of *B. xylophilus* in Japan is presumed to come from the United States, where this species was initially described in 1934 as one of many parasites of pines [4].

The presence of *B. xylophilus* was also identified in other Asian countries in the 1980s (Taiwan, 1985; China and South Korea, 1989) [5]. *B. xylophilus* occurrence was described in Europe in 1999 and in Portugal on *Pinus pinaster* [6]. The presence of *B. xylophilus* in Europe prompted the European Plant Pathology Organization (EPPO) to immediately include the species in its A1 List of pests recommended for regulation as quarantine pests.

The range of hosts for *B. xylophilus* include conifers from the genus *Pinus* (*nigra*, *silvestris*, *pinaster*, *thunbergii*, *bungeana*, *densiflora*, *luchuensis*) and conifers from other genera that could be inhabited, even in the absence of damage by *B. xylophilus* - e.g., *Picea* sp., *Pseudotsuga* sp. *Picea* sp., *Larix* sp., *Abies* sp., *Cedrus* sp. [1], [7-8]. For susceptible *Pinus* species, the nematodes can destroy a fully grown tree within several weeks. The life cycle of *B. xylophilus* includes development through the phytophagous and mycopagous phases and their transport by beetle vectors - especially sawyer beetles from the genus *Monochamus* [7-12]. Passive transport of the nematodes in infested wood is crucially important when considering the spread of *B. xylophilus* on an international scale. Thus, wooden pallets, shipping crates and construction timber can easily transport *B. xylophilus* [13].

A triangular system that encompasses pine trees, nematodes and its vector is a perfect system for *B. xylophilus* survival and spreading and makes most pest management measures ineffective. Even if extensive research of the flight traps intended to capture *B. xylophilus* insect vectors is conducted [14-16] with promising results according to authors' opinion vector targeting management techniques could be used rather for *B. xylophilus* monitoring than direct tree protection. Chemical treatment aimed at protecting pine trees in affected countries is expensive and does not persist long. The only option is then the absolute decontamination of the affected area, which involves removing all of the host trees, including the roots, and establishing an extensive quarantine zone [17].

Thus, preventive measures are key to dealing with the possibility of *B. xylophilus* introduction into unaffected areas. Heat treatment of timber transported across borders was

designed and described by EPPO standard no. PM 10/6 [18]. This type of treatment requires heating the core of the treated wood to at least 56 °C [19] for at least 30 min. However, this could be difficult to successfully perform with large logs. This technique also requires special facilities that are energetically expensive and complicated, especially when bulky construction timber has to be treated. The quality changes of the treated wood could also be problematic, in addition to the overall efficiency of the heat treatment technique [20-21]. Therefore, alternative techniques for treating timber should be investigated.

Considering that chemical methyl bromide application is phased out by most industrial countries, no chemical is currently routinely used for *B. xylophilus* management. Experimental work now focuses on chemicals such as sulphuryl fluoride [22], methyl iodide [23] as fumigation agents or copper sulphate as liquid treatment [24]. Gaseous hydrogen cyanide (HCN) possesses certain advantages over other chemicals: it is naturally occurring, it is lighter than air gas and thus easy to ventilate after treatment, HCN's simple molecular structure makes it highly permeable in plant material and its considerable reactivity results in its rapid degradation without any undesirable residues. Currently, HCN is routinely used for fumigating food production and storage facilities [25-26]. The main disadvantage of HCN in treating wood-borne organisms is its extreme acute toxicity to warm-blooded organisms, so treatment with HCN places a high demand on the staff. However, these drawbacks could be mitigated by ensuring that only trained workers interact and carefully handle HCN [21b].

The main aim of this study was to evaluate the efficiency of the gaseous hydrogen cyanide treatment on pine wood nematode (*B. xylophilus*) mortality in a model experimental system. Because HCN affects the mortality of the free living nematode *Caenorhabditis elegans* and of *B. xylophilus* was recently demonstrated [21b, 25], this work focuses more precisely on different HCN concentrations and exposition times necessary to kill *B. xylophilus* in wood. Four HCN concentrations and 10 exposition periods were tested. The experimental design enabled us to measure the HCN concentrations during treatment.

Material and Methods

Fumigation chamber, sample preparation and experimental design:

All experiments were performed in a fumigation chamber localised within the Draslovka Kolín a.s. - the only European industrial manufacturer of gaseous HCN (trade name Uragan D2). The experiments were conducted in a stainless steel gas chamber (volume 650 l) equipped with forced ventilation, an air lock and glove manipulators, which enabled gas withdrawal from the samples and measurement of HCN concentrations using gas chromatography (Shimadzu GC-17A, RT-QPLOT, 30 m, ID 0.53 mm, GC Software Clarity DataApex). The GC method is based on comparing the detector response from the sample with an external standard with a known concentration. 0.5 vol. % HCN in nitrogen was used as the standard (Linde Gas). Four HCN concentrations in the gas chamber were tested: 12.30, 18.21, 21.71 and 24.12 g.m⁻³ in exposition times 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 hours.

B. xylophilus individuals were obtained from in vitro cultures on *Botrytis cinerea* fungus maintained on MEA medium. Two weeks after inoculation on *B. cinerea*, the nematodes were extracted from the fungal mycelium using Baermann's funnel extraction technique. Extracted nematodes were concentrated and transferred into fresh water to ensure their viability for subsequent experiments.

Pinewood sawdust was prepared by sawing *P. sylvestris* logs using a chainsaw. Two grams of sawdust (average moisture content 6.7% with standard deviation 0.7) were inserted into Uhelon fabric bags with a mesh size of 18 μm to allow HCN free access to the sawdust and to restrict the possibility of spreading the nematodes from bags. 2 ml of tap water was pipetted into bags containing the sawdust to ensure that there was sufficient moisture in the bags for nematode survival. The moisture content of the sawdust was measured during sample preparation and evaluation using the data loggers. On average moisture content of sawdust containing nematodes was 32.30% 2 hours after inserting into gas chamber and 21.69 after 24 hours lasting exposition (Table 1). Next, 500 μl of the nematode suspension containing approximately 1,200 *B. xylophilus* individuals was pipetted into each bag. A magnetic stirrer was used during inoculation to ensure inoculum homogeneity. No water drops were observed on the bottom of the bags; whole volume of 2.5 ml of water was absorbed into sawdust as is apparent from its moisture content (Table 1). Next, the bags were sealed using steel wire and inserted into hollow spruce blocks (100 x 100 x 120 mm) covered by glass containing a silicon septum. The glass was fitted to the wood block using HCN impenetrable glue (Fig. 1). Five replicates were prepared for each exposition time and HCN concentration.

Sample treatment and evaluation

Prepared wood blocks containing the nematodes were transferred into a gas chamber and exposed to HCN at specific concentrations and exposure times at 24 °C. Because of the fumigation chamber capacity samples were treated always in two separate batches, 1st from 2 to 10 hours, 2nd from 12 to 20 hours. HCN was introduced into the chamber in a liquid form, and vapours of the desired concentration were produced. HCN samples were withdrawn during treatment using the air lock and septum on the glass seal of the wood block, and the HCN concentrations were established using gas chromatography. The HCN concentration inside the gas chamber was also measured. After treatment, the HCN was ventilated from the blocks, the glass seals were crushed, the bags with sawdust and nematodes were removed and the nematodes were extracted from the sawdust for 24 h using Baermann's extraction technique. The obtained suspensions were surveyed using the stereomicroscope, and the nematodes were quantified. An untreated control variant was prepared in the same manner, and the control samples were placed next to the gas chamber during treatment of the experimental ones. The nematode numbers were expressed as the means of surviving nematodes. Cumulative Ct product values expressing effectiveness of a fumigant (concentration x time presented in $\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{m}^{-3}$) for the wooded blocks were calculated separately for both series of concentration measurements (2 to 10 hours and 12 to 20 hours) according to the following formula [26], where T_n is the time the first reading was taken in hours, T_{n+1} is

the time the second reading was taken in hours, C_n is the concentration reading at T_n in g.m^{-3} , C_{n+1} is the concentration reading at T_{n+1} in g.m^{-3} and $Ct_{n,n+1}$ is the calculated Ct product between T_n and T_{n+1} , in g hm^{-3} :

$$Ct_{n,n+1} = \frac{(T_{n+1} - T_n) \times (C_n + C_{n+1})}{2.0}$$

Calculated cumulative Ct product values underwent basic statistical analysis (Statistica 12, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2013).

Results and discussion

The results demonstrated that HCN possesses an overall good efficiency as a nematode killing agent. All data considering nematode survival are presented in Table 1. The HCN treatment almost completely removed the nematode population; the overall mortality obtained was between 99.00% and 100%. A complete nematode mortality was observed in the variants treated with the initial HCN concentration of 12.30 g.m^{-3} and exposure times from 8 to 20 hours, 18.21 g.m^{-3} and exposure times of 2, 4, 6, 10 and 16 to 20 hours, 21.71 g.m^{-3} and exposure times of 12, 18 and 20 hours and 24.12 g.m^{-3} and exposure times of 2, 6, 12 and 18 hours. In all cases where living nematodes were present at the time of extraction, no more than 4 individuals were identified **thus indicating that no reproduction of nematodes occurred after treatment.**

The HCN concentration inside the gas chamber decreased almost constantly (Fig. 2a, 2b) with gas sorption into wooden blocks. However, some HCN concentration variations occurred in the second half of the exposure periods with the HCN concentrations 18.21 and 21.71. The HCN concentration in the experimental wooden blocks varied substantially, though the observed variations did not considerably affect nematode mortality.

Considering the experiment design we can conclude that the methods used in this study are suitable for researching the nematicidal properties of HCN. The system used to maintain nematodes in sawdust worked well because nematodes in the untreated control survived the experiment period (Table 1). They appeared healthy and even multiplied if gravid females were present. Under no circumstances the moisture content of the sawdust was lower than 15% during treatment - the level which correlates with nematode population decline [27].

Hydrogen cyanide possesses a strong potential as a nematode killing agent. The treatment was effective, even at the lowest concentration and shortest exposure times in this study. A fact that living nematodes were detected after treatment with highest HCN dose even if in minimal numbers could be connected with temperature in fumigation treatment and higher presence of eggs in samples at temperatures around $20 \text{ }^\circ\text{C}$ as was probably observed by [22] in the case of fumigation with sulfuryl fluoride. According to our results longer

exposition periods would be desirable for *B. xylophilus* eggs treatment using the HCN. The high permeability of HCN, which was apparent from the concentrations measured in this study (Table 2a, b), causes a relatively high sorption of the gas into the treated wood. This is advantageous when designing treatment protocols, especially if large volumes will need to be treated. Some varying HCN concentrations in wooden blocks during the experiment could be explained solely by the different wood structures of the separate wood blocks used in the experiments and fluctuation of the absorption of the gas in wood because the gas chamber is made of non absorbing material and is perfectly sealed. The wood from younger trees with denser annual rings likely absorbs HCN less readily. This fact should be considered when planning model fumigation experiments. Ct product values (Table 2a, b) show that establishment of the HCN concentration in sample wood blocks was rather fast, especially in the cases of higher initial HCN concentrations 21.71 and 24.12 g.m⁻³. From this reason no expected linear increase of nematode mortality in consequence of longer exposition and higher HCN concentration was observed. Hydrogen cyanide concentrations inside the fumigation chamber (Fig. 2a, 2b) show clearly sorption of the HCN into wooden blocks and decreasing of the HCN concentration in the chamber.

Earlier experiments have demonstrated the nematicidal effects of HCN against free living *Caenorhabditis elegans* [27], where 100% mortality was observed after 270 min of HCN exposure at 7 g.m⁻³. The nematicidal properties of gaseous HCN against *B. xylophilus* were observed earlier [21]. In this case, no living nematodes were observed after 18 h of HCN exposure at 20 g.m⁻³ or after 40 h of exposure at 10 g.m⁻³. Similar results were obtained in this study with one substantial exception - in two cases, living *B. xylophilus* individuals were observed after 20 h of HCN exposure at 24.12 g⁻³. This exception could be caused by different nematode numbers used in the experiments. Only 450 nematodes were used in the inoculum in the previous trial [21], whereas we used an average of at least 2.5 fold more individuals. The number of nematodes used in this study is more similar to the number observed in trees that are naturally infested with *B. xylophilus*, where the nematode population exceeds 1,000 individuals per gram of dry wood from 40 to 60 days after inoculation [5]. Nevertheless, the experimental treatment of naturally infested wood with HCN would be desirable, especially for treating construction timber.

Hydrogen cyanide efficiency as nematode killing agent is comparable to other methyl bromide alternatives that are currently being studied, such as sulphuryl fluoride and methyl isothiocyanate. However, comparison is informative only due to the different experimental designs used in several surveys. A fairly high number of *B. xylophilus* individuals were observed after 48 hours of treating naturally infested wooden blocks with sulphuryl fluoride [30]. However, in a subsequent study, 100% of the *B. xylophilus* individuals were dead in naturally infested wood boards treated with sulphuryl fluoride after 24 hours of fumigation at 15 and 30 °C [22], indicative of good efficiency. In the case of sulphuryl fluoride, its chemical properties must be closely monitored because sulphuryl fluoride is a powerful greenhouse gas and has a rather long atmospheric lifetime [31]. Even if it does not currently pose a problem because of the low amount of sulphuryl fluoride used globally for fumigation the rapid decomposition of HCN in the atmosphere represents an advantage when comparing

the potential of those two fumigants. The effect of HCN on *B. xylophilus* appears to be comparable to methyl isothiocyanate [32], which is currently used as a soil fumigant and against soil-borne plant parasitic nematodes. However, its rather slow decomposition in soil [33] precludes its use in treating wood, especially package wood, although more research is needed to assess the properties of methyl isothiocyanate as a wood fumigant.

We conclude that the results of this study confirmed the nematicidal effects of gaseous HCN against *B. xylophilus*. The main issues in next testing are related with the size of the contaminated wood pieces submitted to fumigation. Thus further evaluation of the effects of HCN on *B. xylophilus* and a discussion about its possible commercial applications will require testing of large volumes of infested wood e.g. construction timber and package wood to see and understand behaving and mode of action of HCN in wood with intact wood structure and to meet numbers of nematodes exposed to each assay (HCN concentration/time) required by EPPO protocols [34-35].

Acknowledgment

This research was supported by the research project nr. QI111B065 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. Authors would like to thank Mr. Pedro Barbosa and Dr. Václav Čermák for providing nematodes for the establishing of the laboratory cultures, to Ms. J. Wenzlová and Ms. Jana Vavříčková for technical assistance and to Dr. Václav Stejskal and Dr. Radek Aulický for review of the manuscript.

References

1. Suzuki K (2002) Pine wilt disease - a threat to pine forest in Europe. *Dendrobiol* 48:71-74
2. Kikuchi T., Shibuya H., Jones J. X. (2005). Molecular and biochemical characterization of an endo-beta-1, 3-glucanase from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* acquired by horizontal gene transfer from bacteria. *Biochem J* 389:117-125
3. Mamiya Y (1983) Pathology of the pine wilt disease caused by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annual Rev Phytopathol* 21:201-220
4. Steiner G, Buhner EM (1934) *Aphelenchoides xylophilus* n. sp. a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. *J Agric Res* 48:949-951
5. Li Y, Li F, Yu D, Yang W, Zhang H (2003) *Bursaphelenchus xylophilus* was intercepted from imported wood packaging materials from Portugal in Shenzhen. *Port Plant Quar* 17:110
6. Mota MM, Braasch H, Bravo MA, Penas AC, Burgermeister W, Metge K, Sousa E (1999) First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* 1(7-8):727-734

7. Malek RB, Appleby JE (1984) Epidemiology of pine wilt in Illinois. Disease distribution, *Plant Dis* 68:180-186
8. Duncan LW, Moens M (2006) Migratory endoparasitic nematodes. In: Perry RN, Moens M (eds) *Plant nematology* CABI, Wallingford, pp123-152
8. Evans HF, McNamara DG, Braasch H, Chadoef G, Magnusson C (1996) Pest risk analysis for the territories of the EU on *Bursaphelenchus xylophilus* and its vectors in the genus *Monochamus*. *EPPO Bull* 26:199-249
9. Mamiya Y, Enda N (1972) Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematologica* 18:159-162
10. Yi C, Byun B, Park J, Yang S, Chang K (1989) First finding of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner et Buhner) Nickle and its insect vector in Korea. *Res Reports of the Forestry Res Inst Seoul* 38:141-149
11. Yang B (2004) The history dispersal and potential threat of pine wood nematode in China. In: Mota M, Vieira P (eds) *The pinewood nematodes *Bursaphelenchus xylophilus*: proceedings of an international workshop* University of Évora, *Nematology Monographs and Perspectives*, Leiden-Boston, pp21-24
12. Chang R, Chao J, Fan Y, Lu S, Jou W (1995) Investigation the insect vector of pine wilt disease in Taiwan. *Plant Protection Bull* 37:448
13. Webster J (2004) The pine wood nematode: Implications of factors past and present for pine wilt disease. In: Mota M, Vieira P (eds) *The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*: proceedings of an international workshop* University of Évora, *Nematology Monographs and Perspectives*, Leiden-Boston, pp55-64
14. Pajares JA, Ibeas F, Diez JJ, Gallego D (2004) Attractive responses by *Monochamus galloprovincialis* (Col., Cerambycidae) to host and bark beetle semiochemicals. *J Appl Entomology* 128(9-10), 633-638
15. Allison JD., Borden JH, McIntosh RL, De Groot P, Gries R (2001) Kairomonal response by four *Monochamus* species (Coleoptera: Cerambycidae) to bark beetle pheromones. *J Chem Ecology* 27(4):633-646
16. Ibeas F, Gallego D, Diez JJ, Pajares, JA (2007) An operative kairomonal lure for managing pine sawyer beetle *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerymbcidae). *J Appl Entomology* 131(1):3-20
17. Nakamura K, Yoshida N (2004) Successful control of pine wilt disease in Fukiage-hama seacoast pine forest in southwestern Japan, In: Mota M, Vieira P (eds) *The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*: proceedings of an international workshop* University of Évora, *Nematology Monographs and Perspectives*, Leiden-Boston, pp269-281

18. EPPO (2009) Heat treatment of wood to control insects and wood-borne nematodes. EPPO standard nr. PM 10/6 (1) EPPO Bull 39(1):31
19. Uzunovic A, Gething B, Coelho A, Dale A, Janowiak JJ, Mack R, Hoover K (2013) Lethal temperature for pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in infested wood using radio frequency (RF) energy. J Wood Sci 59:160-170
20. Hillis W E, Rozsa AN (1978) The softening temperatures of wood. Holzforschung - Int J of the Biol, Chem, Phy and Technol of Wood 32(2):68-73
21. Stejskal V., Aulický R., Kučerová Z. 2014b. A review of pest control strategies and damage potential of seed-infesting pests in the Czech stores. Plant Protection Sci 50(4):165-173
22. Bonifácio LF, Sousa E, Naves P, Inácio ML, Henriques J, Mota M, Barbosa P, Drinkall MJ, Buckley S (2013) Efficacy of sulfuryl fluoride against the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchidae) in *Pinus pinaster* boards. Pest Manag Sci 70:6-13
23. Soma Y, Komatsu H, Abe Y, Itabashi T, Matsumoto Y, Kawakami F (2006) Effects of Some Fumigants on Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Infecting Wooden Packages, 6 Mortality of Pine Wood Nematode and Longhorn Beetles by Methyl Iodide Tarpaulin. Fumigation Res Bull of the Plant Protection Serv Jpn 42:7-13
24. Tan QQ., Wu H.Y., Jiang S.X., Ma H.B. (2013). Mortality and Movement Behaviour of *Bursaphelenchus xylophilus* under Different Dosages of Copper Sulphate. Plant Protection Sci 49(2):98-103
25. Stejskal V, Douda O, Zouhar M, Manasova M, Dlouhy M, Simbera J, Aulický R (2014) Wood penetration ability of hydrogen cyanide and its efficacy for fumigation of *Anoplophora glabripennis* *Hylotrupes bajulus* (Coleoptera) and *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda). Int Biodeterioration & Biodegradation 86:189-195
26. Aulický R, Stejskal V, Dlouhý M, Lišková J (2014). Validation of hydrogen cyanide fumigation in flourmills to control the confused flour beetle. Czech J Food Sci In press 303/2014-CJFS.
27. Maňasová M, Douda O, Zouhar M, Nováková E, Mazáková J, Ryšánek P (2012) Gaseous hydrogen cyanide as an agent to control nematodes in plant materials. Sci Agri Bohem 43:53-57
28. Morallo-Rejesus B, Rejesus RS (1992) Chemical control methods insecticides and pesticides Cited in Towards integrated commodity and pest management in grain storage. In: Semple RL, Hicks PA, Lozare JV, Castermans A (eds) Proceedings and selected papers from the Regional Training Course on Integrated Pest Management Strategies in Grain Storage Systems conducted by the National Post Harvest Institute for Research and Extension (NAPHIRE) Department of Agriculture Philippines.

29. Sousa E, Naves P, Bonifácio L, Inácio L, Henriques J, Evans H (2011) Survival of *Bursaphelenchus xylophilus* and *Monochamus galloprovincialis* in pine branches and wood packaging material. EPPO Bull 41(2):203-207
30. Buckley S, Drinkall MJ, Thoms EM, (2010) Review of research on the control of pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) using the fumigant sulphuryl fluoride and current status for inclusion in ISPM No 15. In: 10th International Working Conference on Stored Product Protection Julius-Kühn-Archiv Berlin vol 425 pp 1024e1030
31. Papadimitriou VC, Portmann RW, Fahey DW, Mühle J, Weiss RF, Burkholder JB (2008) Experimental and theoretical study of the atmospheric chemistry and global warming potential of SO₂F₂. The J Phys Chem A 112(49):12657-66
32. Soma Y, Naito H, Misumi T, Mizobuchi M, Tsuchiya Y, Matsuoka I, Kawakami F (2001) Effects of some fumigants on pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* infecting wooden packages. Res Bull of the Plant Protection Serv Jpn 7:19-26
33. Smelt JH, Leistra M (1972) Conversion of metham-sodium to methyl isothiocyanate and basic data on the behaviour of methyl isothiocyanate in soil. Pesticide Sci 5(4):401-407
34. Schröder T, McNamara DG, Gaar V (2009) Guidance on sampling to detect pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in trees, wood and insects. EPPO Bull 39(2):179-188
35. Magnusson C, Schröder T. (2009) Technical protocol for testing nematodes during treatment development. International Forestry Quarantine Research Group14G17

Fig. 1: Schematic figure of the experimental wooden block, dimensions in millimetres

Fig. 2a: Mean changes of HCN concentrations in fumigation chamber for the initial concentrations 12.30, 18.21, 21.71 and 24.12 g.m⁻³ during fumigation; exposition times 2 - 10 hours.

Fig. 2b: Mean changes of HCN concentrations in fumigation chamber for the initial concentrations 12.30, 18.21, 21.71 and 24.12 g.m⁻³ during fumigation; exposition times 10 - 20 hours.

Table 1

Table 1.: Number of surviving nematodes (mean from five replicates \pm standard error, number of replicates with surviving nematodes in brackets) after HCN treatment in hermetic fumigation chamber after 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 hours of fumigation, 4 HCN concentrations were tested; moisture content of sawdust (mean from five replicates \pm standard error) is also included.

Target HCN concentration in gas chamber (g.m ⁻³)	Nematode inoculum	Exposition time in hours									
		2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
12.30	1200	0.25 \pm 0.25 (1)*	0.2 \pm 0.2 (1)	0.2 \pm 0.2 (1)	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)
18.21	1200	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)	0.50 \pm 0.29 (2)	0 \pm 0 (0)	0.20 \pm 0.20 (1)	0.20 \pm 0.20 (1)	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)
21.71	1200	0.60 \pm 0.40 (2)	2.20 \pm 1.43 (2)	1.40 \pm 1.17 (2)	1.60 \pm 1.60 (1)	2.40 \pm 1.91 (3)	0 \pm 0 (0)	0.20 \pm 0.20 (1)	0.20 \pm 0.20 (1)	0 \pm 0 (0)	0 \pm 0 (0)
24.12	1200	0 \pm 0 (0)	1.50 \pm 0.96 (2)*	0 \pm 0 (0)	0.25 \pm 0.25 (1)*	0.25 \pm 0.25 (1)*	0 \pm 0 (0)	0.25 \pm 0.25 (1)*	1.00 \pm 1.00 (1)	0 \pm 0 (0)	0.75 \pm 0.48 (2)*
0 (control)	1200	1150 \pm 103 (5)	1091 \pm 66 (5)	1342 \pm 49 (5)	1490 \pm 227 (5)	1222 \pm 121 (5)	1198 \pm 129 (5)	1045 \pm 64 (5)	1052 \pm 59 (5)	1440 \pm 159 (5)	1391 \pm 305 (5)
		Average moisture content of sawdust in percent									
		32.30 \pm 1.10	30.99 \pm 1.08	29.74 \pm 1.06	28.48 \pm 1.05	27.28 \pm 1.02	26.06 \pm 1.06	24.94 \pm 0.99	23.84 \pm 0.97	22.72 \pm 0.94	21.69 \pm 0.91

* Only four replicates tested.

Table 2a.: Ct product of the HCN dose (mean from 5 replicates \pm standard error) inside wooden blocks containing nematodes; **exposition times 2 to 10 hours**

Initial HCN concentration in gas chamber (g.m ⁻³)	Ct product of the HCN treatment (average \pm SE)				
	Exposition time in hours				
	2	4	6	8	10
12.30	NA ^a	0.835 \pm 0.246	1.776 \pm 0.372	4.698 \pm 1.712	12.379 \pm 4.628
18.21	NA ^a	1.827 \pm 0.555	7.344 \pm 2.067	15.809 \pm 3.157	19.600 \pm 5.363
21.71	NA ^a	3.057 \pm 0.946	7.701 \pm 2.563	15.645 \pm 4.202	21.700 \pm 1.503
24.12	NA ^a	1.335 \pm 0.383	12.601 \pm 3.731	23.934 \pm 3.869	30.641 \pm 7.517

NA^a: Not assessed.

Table 2b.: Ct product of the HCN dose (mean from 5 replicates \pm standard error) inside wooden blocks containing nematodes; **exposition times 12 to 20 hours**

Initial HCN concentration in gas chamber (g.m ⁻³)	Ct product of the HCN treatment (average \pm SE)				
	Exposition time in hours				
	12	14	16	18	20
12.30	5.631 \pm 3.000	11.935 \pm 1.656	13.213 \pm 1.810	15.296 \pm 1.165	18.665 \pm 3.143
18.21	11.273 \pm 2.383	13.162 \pm 3.293	18.221 \pm 3.727	22.852 \pm 1.631	43.009 \pm 7.116
21.71	22.732 \pm 3.660	23.209 \pm 2.188	37.032 \pm 5.207	39.943 \pm 3.479	44.566 \pm 8.475
24.12	19.486 \pm 4.794	41.652 \pm 13.303	45.670 \pm 9.873	57.868 \pm 6.545	58.862 \pm 0.006

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

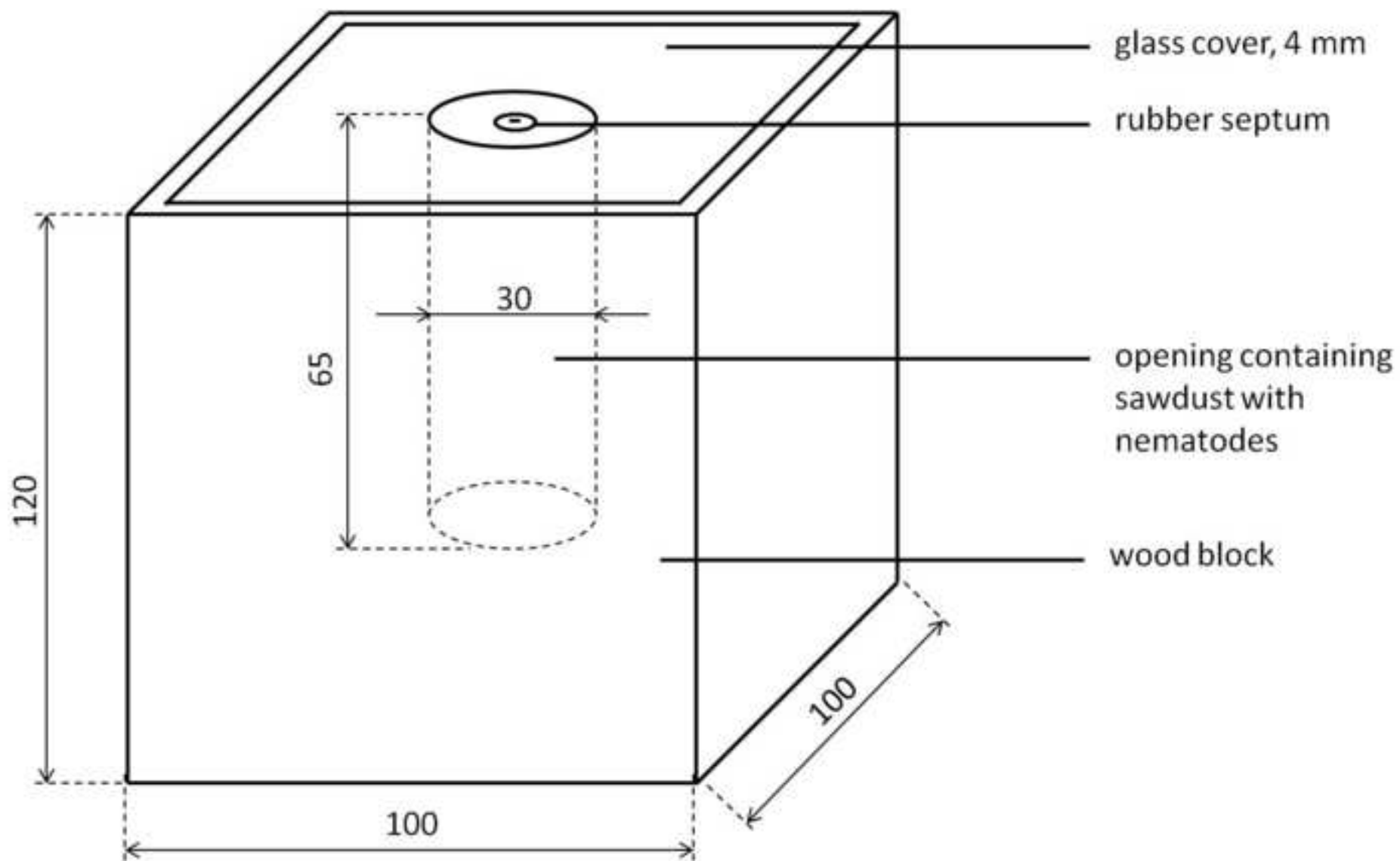


Fig. 2a

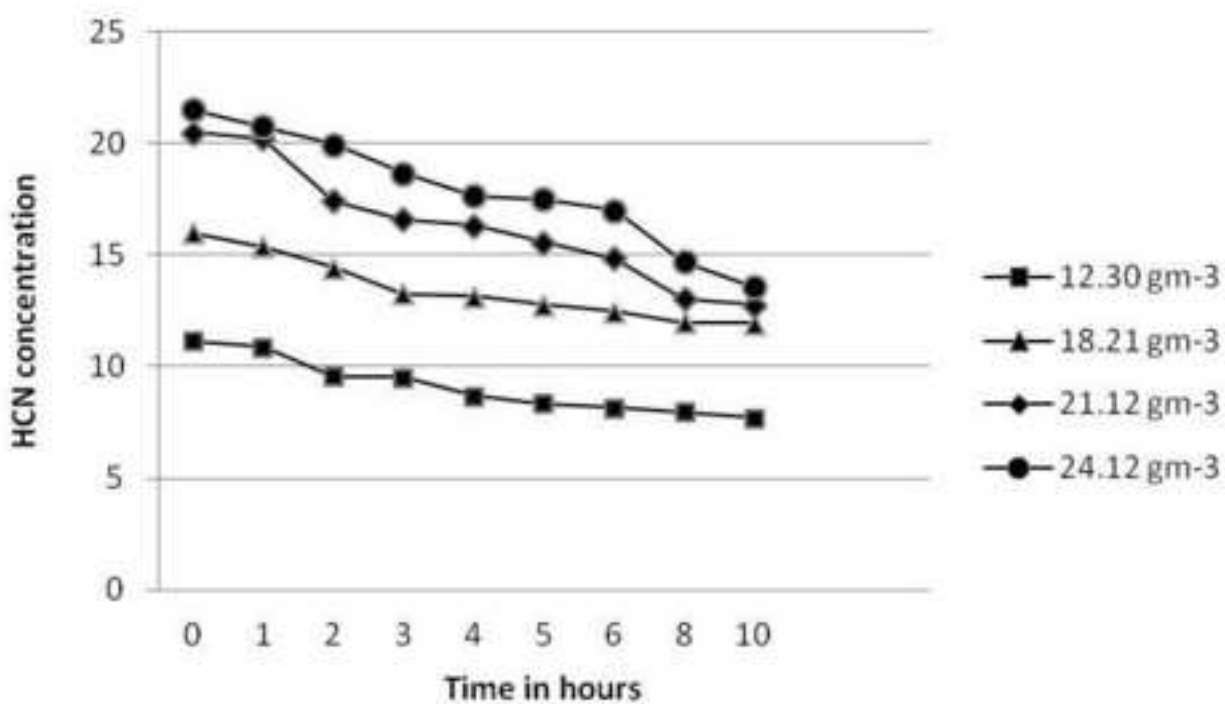
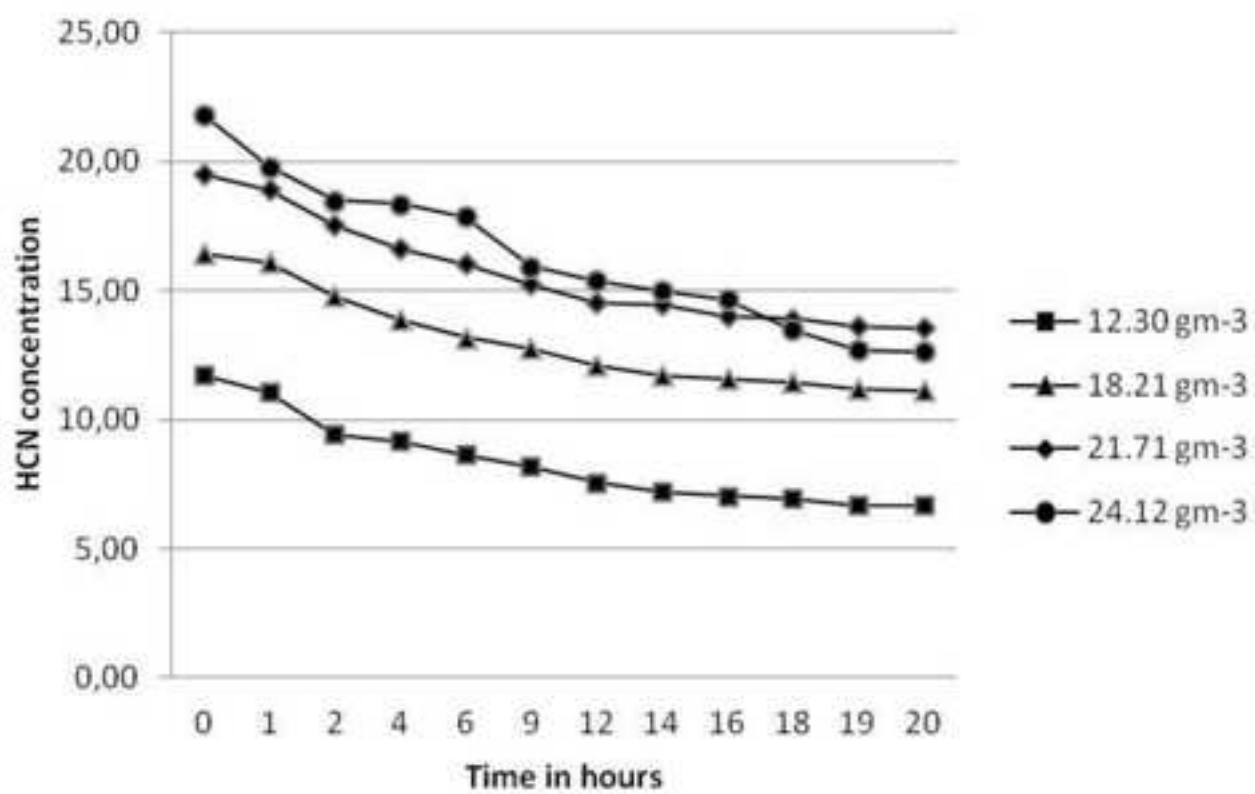


Fig. 2b



Certification Form

[Click here to download Certification Form: Certification form Douda et al 2014.pdf](#)

Submission Form

[Click here to download Submission Form: Submission_form Douda et al 2014.doc](#)

September 16, 2013

Revised manuscript for the Phytopathology

**Exploitation of FTA cartridges for the sampling, long-term storage and
DNA-based analyses of plant-parasitic nematodes**

Running title: FTA application for plant-parasitic nematodes

Martin Marek^{a,*}, Miloslav Zouhar^a, Ondřej Douda^b, Marie Maňasová, and Pavel Ryšánek^a

^a Czech University of Life Sciences (CULS) Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Plant Protection, Kamycká 129, 165 21 Prague 6 – Suchdol, The Czech Republic

^b Crop Research Institute, Division of Plant Health, Department of Entomology, Drnovská 507, 161 06 Prague 6 – Ruzyňe, The Czech Republic

* E-mail: autographa.californica@gmail.com

Abstract

The use of DNA-based analyses in molecular plant nematology research has dramatically increased over recent decades. Therefore, the development and adaptation of simple, robust and cost-effective DNA purification procedures are required to address these contemporary challenges. The solid phase-based approach developed by Flinders Technology Associates (FTA) has been shown to be a powerful technology for the preparation of DNA from different biological materials, including blood, saliva, plant tissues, and various human and plant microbial pathogens. In this work, we demonstrate, for the first time, that this FTA-based technology is a valuable, low-cost and time-saving approach for the sampling, long-term archiving and molecular analysis of plant-parasitic nematodes. Despite the complex structure and anatomical organization of the multicellular bodies of nematodes, we report the successful and reliable DNA-based analysis of nematode high-copy and low-copy genes using the FTA technology. This was achieved by applying nematodes to the FTA cards either in the form of a suspension of individuals, as intact or pestle-crushed nematodes, or by the direct mechanical printing of nematode-infested plant tissues. We further demonstrate that the FTA method is also suitable for the so-called "one-nematode-assay", in which the target DNA is typically analyzed from a single individual nematode. More surprisingly, a time-course experiment showed that nematode DNA can be detected specifically in the FTA-captured samples many years after initial sampling occurs. Collectively, our data clearly demonstrate the applicability and the robustness of this FTA-based approach for molecular research and diagnostics concerning phytonematodes; this research includes economically important species, such as the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*), the sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*) and the Northern root-knot nematode (*Meloidogyne hapla*).

Keywords: Nematode, FTA cards, sampling, DNA analysis, PCR

Introduction

DNA-based analyses in molecular plant nematology research have dramatically increased over previous decades (19, 21, 23, 24). These activities are mainly focused on fundamental investigations concerning the biology of nematodes at the molecular and cellular levels (11) as well as practical applications concerning phytosanitary diagnostics (10, 16) and plant breeding/transgenic technologies (8, 14, 25). To effectively address these contemporary challenges in molecular plant nematology, the development and adaptation of simple, rapid and cost-effective DNA purification procedures are needed.

The matrix-based approach developed by Flinders Technology Associates (FTA, Whatman) is a powerful technology for the preparation of DNA from different biological materials, including blood, saliva, plant tissues, and various human and plant pathogens (1, 4, 6, 9, 13, 20). This solid phase format enables out-of-lab sampling and greatly simplifies DNA archiving and purification. Unlike other conventional DNA purification methods that use various organic chemicals (e.g., phenol and chloroform) (17), the FTA-based approach uses only nontoxic aqueous solutions. All of the steps during FTA-based archiving and DNA preparation are carried out at room temperature, which significantly reduces the expense and is environmentally friendly. The DNA captured on the FTA cartridges can be used in various polymerase chain reaction (PCR)-based protocols, such as marker-based selection (MAS), molecular diagnostics, phylogenetic studies and transgene detection (2, 13, 20, 22). There is no evidence thus far concerning the feasibility of this FTA-based technology in the sampling and analysis of plant-parasitic nematodes, which are eukaryotic multicellular organisms that infect plants.

In the current report, we demonstrate that the FTA-based technology is fully applicable to the collection, long-term archiving and molecular analysis of plant-parasitic nematodes. Despite the complex structural and anatomical organization of multicellular

nematode bodies, we show the successful and highly reliable DNA-based analysis of target high-copy and low-copy genes using the FTA technology.

Materials and methods

Nematode species

The following three biologically different species of plant-parasitic nematodes were analyzed in this report: the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) (17), the sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*), and the Northern root-knot nematode (*Meloidogyne hapla*) (27). Detailed information concerning the geographic origins of the nematodes used, their host preferences and the sources of the nematodes are listed in Table 1.

FTA-based sampling, archiving and DNA preparation

To capture the nematode specimens on the FTA matrix, individual intact or pestle-crushed nematodes were dripped onto the surface of the FTA cards (Whatman). The direct mechanical printing of nematode-infested plant tissues on the FTA cards with a help of a hard tool was also tested. After application of the samples, the FTA cards were air-dried and stored at room temperature for the indicated durations. A schematic overview of the nematode sampling methods used for the FTA-based approach is illustrated in Fig. 1.

A sterile perforator (Harris Uni-Core device; Whatman) with a diameter of 3 mm was used to punch a disk from the FTA card where the specimen had been previously applied (Fig. 1H). The perforator was cleaned as described in the manufacturer's protocol to prevent cross-contamination. For each PCR test, one disk was treated. Briefly, the disk was washed with 200 μ l of a FTA purification solution (Whatman) three times for 5 min. The disk was then washed with 200 μ l of TE buffer (10 mM Tris, 0.5 mM EDTA [pH 8.0]) twice for 5 min and

air-dried. In the last step, the disk was directly used as a template for the PCR reaction; this was carried out in the same tube in which all of the previous purification steps occurred. All purification steps were carried out at room temperature.

Conventional DNA preparation procedure

For comparative testing, total genomic DNA was also extracted from the nematodes following modified methods that have been previously described (5, 15-17). Briefly, the desired amount of nematodes was transferred into a sterile 1.5-ml tube containing 50 μ l of lysis buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.2% SDS and 4 μ g/mL proteinase K). The mixture was incubated for 1 h at 55°C. The proteinase K was then denatured for 5 min at 85°C. The DNA was extracted using phenol-chloroform extraction. Finally, the DNA was precipitated with an equal volume of ice-cooled isopropanol and washed with 80% ethanol. The resulting DNA pellet was re-suspended in 20 μ L of TE buffer (10 mM Tris, 0.5 mM EDTA [pH 8.0]). The DNA stocks were stored at -20°C.

PCR amplification

The universal primers S18 and S26 (Table 2) were used to amplify the nuclear high-copy rDNA gene region encompassing the 3'-end of 18S rRNA; the complete sequences of ITS1, 5.8S rRNA and ITS2; and the 5'-end of the 28S rRNA from *D. dipsaci*. Additionally, the *D. dipsaci*-specific primers PF1 and PR1 (17) (Table 2) were also used to amplify the high-copy ITS-rDNA region. The primers DIT5F and DIT5R (26) (Table 2) were used for the amplification of a low-copy sequence-characterized amplified region (SCAR)-derived DNA marker. To amplify the host chloroplast gene encoding ribulose-1,5-(bis)-phosphate-carboxylase (RuBisCO), the primers Rbcl-F and Rbcl-R (16) (Table 2) were used. For the specific amplification of the *H. schachtii* ITS-rDNA region, the primers HSF2 and HSR2

(Table 2) were designed. The previously described primers MH0F and MH1R (27) (Table 2) were used for the detection of *M. hapla*.

The PCR reactions were performed in 0.2-ml tubes with a final reaction mixture volume of 50 μ l, which contained 5.00 μ l of a 10 \times buffer for the DNA polymerase (Fermentas), 6 μ l of 25 mM MgCl₂ (Fermentas), 0.5 μ l of 25 mM dNTP (Fermentas), 0.5 μ l of the oligonucleotide primers (50 μ M), 0.8 μ l (2.5U) of Taq DNA polymerase (Fermentas), and one 3 mm DNA-containing FTA disk or 2.00 μ l of DNA (100 ng/ μ l). The PCR protocol used was as follows: an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 36 cycles (94°C for 1 min, 58°C to 60°C for 30 s, and 72°C for 1 min) and a final extension at 72°C for 7 min.

DNA electrophoresis

The generated PCR products were separated by electrophoresis in a 1.2% (w:v) agarose gel with 1 \times TBE buffer. The gels were stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The lengths of the DNA fragments were estimated by comparison with the MassRuler Low Range 100-bp DNA ladder (Fermentas).

Evaluation of PCR reliability

The reliability of the PCR tests was calculated according to the following formula: % positive assays = (number of positive assays/total number of assays) \times 100. A positive assay was a PCR test in which a DNA band of an expected length was detected by DNA electrophoresis and confirmed by DNA sequencing.

Results

FTA-based analysis of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*

To prove the applicability of FTA technology in molecular plant nematology, the stem nematode *D. dipsaci* was chosen as a model organism for pilot testing. The first assays were carried out with a suspension of individual nematodes eluted from naturally infested chicory leafs using a Baermann funnel technique, as shown in Fig. 1C. Different numbers of nematodes were dripped onto the FTA matrix, which was subsequently air-dried and kept at room temperature for a one-month period. Afterwards, 3-mm discs were punched from the FTA matrix, and the DNA was purified according to the manufacturer's recommendations. Finally, the species-specific primers, PF1 and PR2 (17) were used to amplify a target ITS-rDNA gene fragment. As shown in Fig. 2A, we could reliably detect specific DNA fragments of an expected length of 327 bp. When only ten nematode individuals were loaded onto the FTA cards, a specific DNA band (327 bp) was detected in all independent assays; this demonstrates the high sensitivity and reproducibility of the FTA-based strategy.

Our results show that the FTA technology is fully applicable to the molecular analysis of *D. dipsaci* to same extent as well-established conventional (standard) methods (17) that use organic chemicals. In our comparative analyses, we gained similar reliability in the PCR tests in both the FTA-based and standard procedures (Fig. 2). The major benefit of the FTA-based approach is the reduced time needed for the preparation of the DNA. While the conventional and organic chemical-based method required several hours, the FTA-based strategy took twelve minutes to obtain PCR-ready DNA. This leads to significant time savings when the FTA technology is used.

Sampling and analysis of other plant-parasitic nematodes by the FTA technology

To prove the applicability of the FTA technology for other plant-parasitic nematodes, we tested the following two nematode species: the sugar beet nematode, *Heterodera schachtii*,

and the Northern root-knot nematode, *Meloidogyne hapla*. The FTA-based sampling and the subsequent molecular analysis of these species also resulted in successful PCR amplification of the target DNA regions, as demonstrated in Figs. 3 and 4. In the case of *H. schachtii*, the FTA strategy provided results similar to the standard DNA purification method. We noted that the FTA technology resulted in a higher yield of PCR products when a low number of nematodes were used in the assays (Fig. 3).

During *M. hapla* testing, the FTA technology appeared to be significantly more efficient than the standard DNA purification procedure, especially when low numbers of nematodes were used in the assays (Fig. 4). While both the FTA and standard method resulted in the amplification of sufficient quantities of target DNA when either 50 or 100 nematodes were used, the standard method failed to achieve this when only 10 nematodes were used. These results are outlined in Fig. 4B. The FTA technology consistently resulted in the amplification of sufficient amounts of amplified PCR product, as shown in Fig. 4A. Collectively, our data show that the FTA technology can be used for the sampling and molecular analysis of phytoparasitic nematodes from the genera *Heterodera* and *Meloidogyne*.

FTA cards are capable of capturing nematode DNA directly from nematode-infested plant tissues

The elution of plant-parasitic nematodes using the Baerman funnel method is a time-consuming procedure. Therefore, we decided to assess the direct printing of nematode-infested plant tissues onto the FTA matrix. We placed *D. dipsaci*-infested chicory leaves onto the FTA matrix and mechanically printed them, as demonstrated in Fig. 1. Again, the FTA matrix was air-dried after sample application and stored at room temperature for a one-month period. The nematode DNA was then prepared according to the above-mentioned protocol

and amplified by PCR. As shown in Fig. 5A, we could amplify the high-copy ITS-rDNA gene with similar reliability to the conventional and organic chemical-based DNA purification procedures. Along with the nematode-specific DNA, we also successfully amplified the host plant gene encoding ribulose-1,5-(bis)-phosphate-carboxylase (RuBisCO). These results demonstrate that the multiplex PCR setup can be used in combination with the FTA technology (Fig. 2C).

It is widely known (7, 18) that multiple copies of rDNA citrons occur in eukaryotic genomes, which significantly facilitates PCR amplification. For this reason, we investigated whether a nematode low-copy gene could also be detected using the FTA-based approach. To test this, we chose a previously identified *D. dipsaci* SCAR-derived marker (26). Surprisingly, we demonstrated the successful PCR amplification of this target SCAR marker using the FTA method. More importantly, the FTA-based analysis of this low-copy gene was more consistent than the conventional DNA purification procedure, as measured by the reliability of the PCR assays (Fig. 5B). Together, our data prove that the FTA-based technology greatly simplifies the processes of sampling and the molecular analysis of endoparasitic phytonematodes directly from nematode-infested plant tissues.

A single nematode analysis using FTA

In nematology laboratories, there is often a need to analyze DNA from a limited number of nematodes. Cases in which only one nematode is available for an analysis are not exceptional. In such cases, the so-called “single-nematode assay” is used; a single nematode is usually crushed with a hand pestle and its homogenate is directly subjected to PCR amplification. For this reason, we were curious whether the FTA technology could be used to address these tasks. We loaded one, two and five *H. schachtii* nematodes, which were mechanically crushed using a hand pestle, onto FTA cards. Subsequent PCR reactions demonstrated that the FTA-

based strategy can efficiently capture and provide a sufficient amount of DNA for PCR amplification from a single nematode, as shown in Fig. 6A. The advantage of such an approach is that DNA from a single nematode can be captured onto the FTA matrix and stored at room temperature for a long-term period, and DNA from this matrix may be analyzed in again in the future if necessary.

How long can be nematodes archived on the FTA cards?

How long biological samples can be safely stored on the FTA cards without an observable loss of DNA quality must be determined. To address this, we printed naturally *D. dipsaci*-infested chicory leaves onto the FTA card. The short time-course experiments showed that PCR-ready DNA can be routinely and reliably prepared from FTA-captured nematodes after one year of storage at room temperature (data not shown). Our long-term experiment, in which FTA cards loaded with *D. dipsaci* specimens were stored for seven years at room temperature, demonstrated that nematode DNA can be specifically detected even after lengthy storage (Fig. 6B). High-copy genes, such as ITS-rDNA (17), and the low-copy SCAR marker (26) were successfully detected (Fig. 4). Our data therefore demonstrate the applicability of FTA technology for the long-term and cost-effective archiving of plant-parasitic nematodes, which can be highly valuable for diagnostic laboratories or in long-standing plant breeding processes.

Discussion

In the current paper, we tested the FTA-based technology for the sampling, long-term archiving and the molecular analysis of three representative species of plant-parasitic nematodes; the species tested were *D. dipsaci*, *H. schachtii* and *M. hapla*. We demonstrated

that the FTA technology is a highly promising tool for the above-mentioned purposes, as clearly demonstrated in Fig. 2 to 6.

There have been many studies thus far (1, 2, 9, 13, 22) demonstrating the applicability of the FTA-based technology for the sampling and molecular analysis of different biological materials. In general, the FTA cards are made of a chemically treated solid phase where the biological tissues and cells are instantly lysed and DNA is captured within the matrix. The FTA cards are coated (or impregnated) with a patented chemical formula that denatures proteins, including damaging nucleases (www.whatman.com). Nevertheless, the exact mechanism(s) of cell and tissue lysis and the capture of intact DNA is obfuscated by intellectual property concerns.

At present, there is no evidence for the use of an FTA-based strategy in molecular plant nematology. In general, plant-parasitic nematodes are multicellular organisms that possess a complex anatomical organization (12). Their surface layer, known as the cuticle, has been shown to be highly resistant to chemical and mechanical disruption (3). For this reason, most conventional techniques for the preparation of nucleic acids from these nematodes use various combinations of mechanical (hand homogenization, freezing in liquid nitrogen, etc.) and chemical/biochemical (detergents, proteinase K, etc.) disruption. We were surprised to discover that the FTA technology shown here was fully functional for the sampling and analysis of the tested phytonematode species (Fig. 2 to 6). We found that the FTA-based approach was comparable to conventional organic chemical-based DNA purification procedures, if not more efficient, as measured by the reliability of the PCR assays (Fig. 2 to 4). In addition, we demonstrated that the FTA methodology provided more consistent results when a target low-copy gene was analyzed (Fig. 5B).

These findings open the door for new methods of experimental research and DNA-diagnostics involving plant-parasitic nematodes. Such FTA-based assays are not time-

consuming and are based on non-toxic aqueous solutions, unlike other conventional DNA purification methods that utilize toxic reagents. This significantly simplifies field sampling and the genomic analysis of plant-parasitic nematodes and reduces the health hazards faced by laboratory personnel.

Among other exciting findings, we demonstrated that the FTA-captured nematode samples could be archived for many years at room temperature without an observable decrease in the anchored DNA molecules. In our long-term experiment, we sampled *D. dipsaci* specimens either in the form of individual nematodes or from the mechanical printing of nematode-infested plant tissues; these FTA cards were stored at laboratory temperatures for seven years. After this period, we purified the DNA using the FTA protocol and performed PCR amplification of the selected genes. As shown in Fig. 6B, both the high-copy ITS-rDNA gene region and the low-copy SCAR marker gene were successfully amplified and detected. We predict that the FTA-captured samples can be practically stored for far beyond the seven-year period tested in our experiment. This would be highly valuable for molecular plant nematology research, phytosanitary diagnostics and plant breeding technologies, as it significantly reduces the energy consuming storage of nematode samples in freezers and refrigerators.

Together, our data show that the FTA-based technology is a promising, highly reliable tool for the collection, storage and DNA-based analysis of plant-parasitic nematodes.

Acknowledgements

This research was financed by a research grant from the Ministry of Agriculture of The Czech Republic (MZE-QF4156) and by a research grant from the Ministry of Education of The Czech Republic (MSM-604607901).

Literature cited

1. Ahmed, H. A., MacLeod, E. T., Hide, G., Welburn, S. C., and Picozzi, K. 2011. The best practice for preparation of samples from FTA[®] cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system. *Parasites and Vectors* 4.
2. Allgeier, L., Hemenway, J., Shirley, N., Lanier, T., and Coyle, H. M. 2011. Field testing of collection cards for *Cannabis sativa* samples with a single hexanucleotide DNA marker. *Journal of Forensic Sciences* 56:1245-1249.
3. Davies, K. G., and Curtis, R. H. C. 2011. Cuticle surface coat of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 49:135-156.
4. De Bie, R. P., Schmeink, C. E., Bakkers, J. M. J. E., Snijders, P. J. F., Quint, W. G. V., Massuger, L. F. A. G., Bekkers, R. L. M., and Melchers, W. J. G. 2011. The indicating FTA elute cartridge: A solid sample carrier to detect high-risk HPV and high-grade cervical lesions. *Journal of Molecular Diagnostics* 13:371-376.
5. Doua, O., Marek, M., Zouhar, M., and Rysanek, P. 2013. Insights into the structure and phylogeny of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 of the plant-infecting nematodes from the genus *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). *Phytopathologia Mediterranea* 52:84-97.
6. Eamsobhana, P., Lim, P. E., Solano, G., Zhang, H., Gan, X., and Yong, H. S. 2010. Molecular differentiation of *Angiostrongylus* taxa (Nematoda: Angiostrongylidae) by cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene sequences. *Acta Tropica* 116:152-156.
7. Ellis, R. E., Sulston, J. E., and Coulson, A. R. 1986. The rDNA of *C. elegans*: sequence and structure. *Nucleic Acids Research* 14:2345-2364.

8. Green, J., Wang, D., Lilley, C. J., Urwin, P. E., and Atkinson, H. J. 2012. Transgenic potatoes for potato cyst nematode control can replace pesticide use without impact on soil quality. *PLoS ONE* 7:e30973.
9. Grund, E., Darissa, O., and Adam, G. 2010. Application of FTA[®] cards to sample microbial plant pathogens for PCR and RT-PCR. *Journal of Phytopathology* 158:750-757.
10. Hu, M. X., Zhuo, K., and Liao, J. L. 2011. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology* 101:1270-1277.
11. Kikuchi, T., Cotton, J. A., Dalzell, J. J., Hasegawa, K., Kanzaki, N., McVeigh, P., Takanashi, T., Tsai, I. J., Assefa, S. A., Cock, P. J. A., Da Otto, T., Hunt, M., Reid, A. J., Sanchez-Flores, A., Tsuchihara, K., Yokoi, T., Larsson, M. C., Miwa, J., Maule, A. G., Sahashi, N., Jones, J. T., and Berriman, M. 2011. Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS Pathogens* 7:e1002219.
12. Krusberg, L. R. 1962. Biology of plant-parasitic nematodes. *The Journal of parasitology* 48:826-829.
13. Lin, J. J., Fleming, R., Kuo, J., Matthews, B. F., and Saunders, J. A. 2000. Detection of plant genes using a rapid, nonorganic DNA purification method. *BioTechniques* 28:346-350.
14. Liu, S., Kandoth, P. K., Warren, S. D., Yeckel, G., Heinz, R., Alden, J., Yang, C., Jamai, A., El-Mellouki, T., Juvale, P. S., Hill, J., Baum, T. J., Cianzio, S., Whitham, S. A., Korkin, D., Mitchum, M. G., and Meksem, K. 2012. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature* 492:256-260.

15. Marek, M., Zouhar, M., Douda, O., Gaar, V., and Ryšánek, P. 2013. Comparative molecular analysis of *Bursaphelenchus vallesianus*, a wood-inhabiting nematode isolated from declining pine trees in the Czech Republic. *Plant Pathology*:doi: 10.1111/ppa.12071.
16. Marek, M., Zouhar, M., Douda, O., Mazakova, J., and Rysanek, P. 2010. Bioinformatics-assisted characterization of the ITS1-5.8S-ITS2 segments of nuclear rRNA gene clusters, and its exploitation in molecular diagnostics of European crop-parasitic nematodes of the genus *Ditylenchus*. *Plant Pathology* 59:931-943.
17. Marek, M., Zouhar, M., Rysanek, P., and Havranek, P. 2005. Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. *Helminthologia* 42:49-56.
18. Maroteaux, L., Herzog, M., and Soyer-Gobillard, M. O. 1985. Molecular organization of dinoflagellate ribosomal DNA: evolutionary implications of the deduced 5.8 S rRNA secondary structure. *BioSystems* 18:307-319.
19. McK Bird, D., Williamson, V. M., Abad, P., McCarter, J., Danchin, E. G. J., Castagnone-Sereno, P., and Opperman, C. H. 2009. The genomes of root-knot nematodes, p. 333-351. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 47.
20. Ndunguru, J., Taylor, N. J., Yadav, J., Aly, H., Legg, J. P., Aveling, T., Thompson, G., and Fauquet, C. M. 2005. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. *Virology Journal* 2.
21. Opperman, C. H., Bird, D. M., and Schaff, J. E. 2009. Genomic analysis of the root-knot nematode genome, p. 221-237. *Plant Cell Monographs*, vol. 15.

22. Osman, F., and Rowhani, A. 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* 133:130-136.
23. Reid, A. 2009. PCR detection of potato cyst nematode. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 508:289-294.
24. Sultana, T., Kim, J., Lee, S. H., Han, H., Kim, S., Min, G. S., Nadler, S. A., and Park, J. K. 2013. Comparative analysis of complete mitochondrial genome sequences confirms independent origins of plant-parasitic nematodes. *BMC Evolutionary Biology*:12.
25. Xue, B., Hamamouch, N., Li, C., Huang, G., Hussey, R. S., Baum, T. J., and Davis, E. L. 2013. The 8D05 parasitism gene of *Meloidogyne incognita* is required for successful infection of host roots. *Phytopathology* 103:175-181.
26. Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazakova, J., and Rysanek, P. 2007. Conversion of sequence-characterized amplified region (SCAR) bands into high-throughput DNA markers based on RAPD technique for detection of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* in crucial plant hosts. *Plant, Soil and Environment* 53:97-104.
27. Zouhar, M., Rysanek, P., and Tesarova, B. 2003. Occurrence of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* in the Czech Republic. *Plant Disease* 87:98-98.

Figure 1

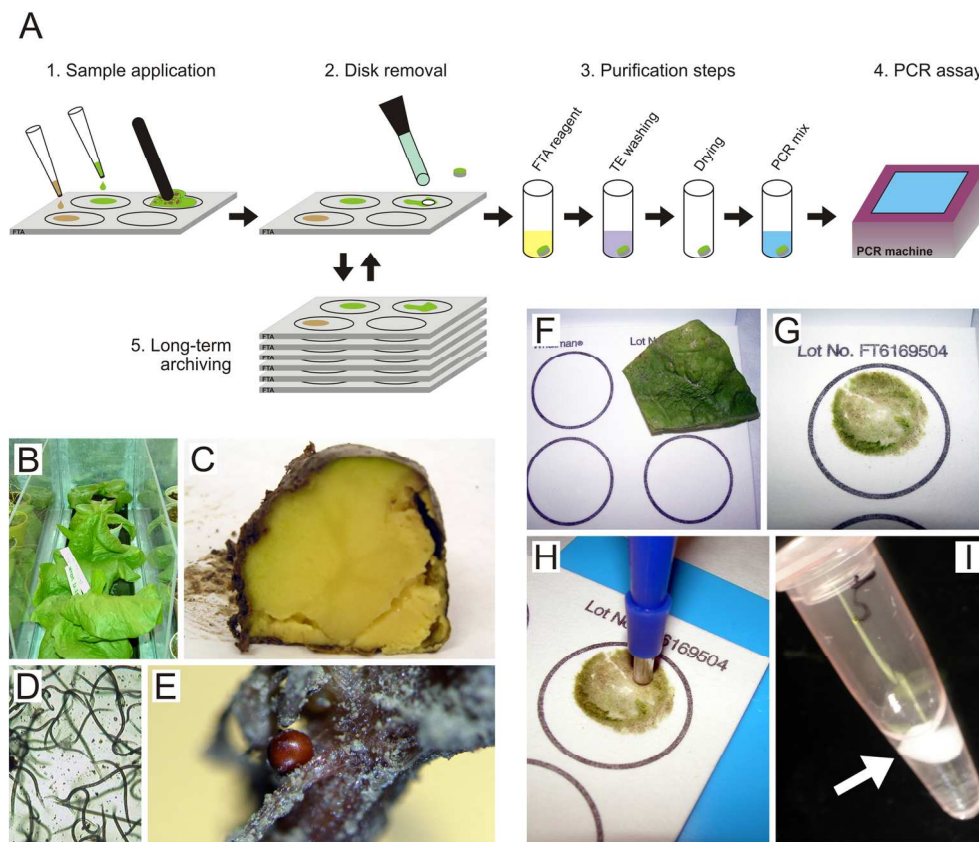


Fig. 1 Overview of the FTA-based technology.

(A) Cartoon scheme showing all steps of the FTA method, including sample application (1), punch-based disk removal (2), purification (3) and direct placing of the FTA-captured DNA into the PCR assay (4). Alternatively, the long-term archiving of FTA cards containing captured biological samples at room temperature can be intercalated as an additional step (5). A sample gallery including images of nematode-infested plants (B, C), a nematode-rich suspension eluted from Baermann funnel (D), and cysts of sedentary nematodes (*Globodera rostochiensis*) (E) that can be used for FTA-based analysis. Sequential illustration of the sampling of chicory leaves infested with stem nematodes (*Ditylenchus dipsaci*); apposition of the infected leaf onto the four-spot FTA card preceding the mechanical imprinting (F), dried FTA card after chicory leaf printing (G), punch-based disk removal (H), and the purification of DNA present in the disk (I). White arrow points to the area of the FTA disk from which the DNA from the captured biological material is recovered and purified for subsequent molecular analysis.

159x142mm (300 x 300 DPI)

Figure 2

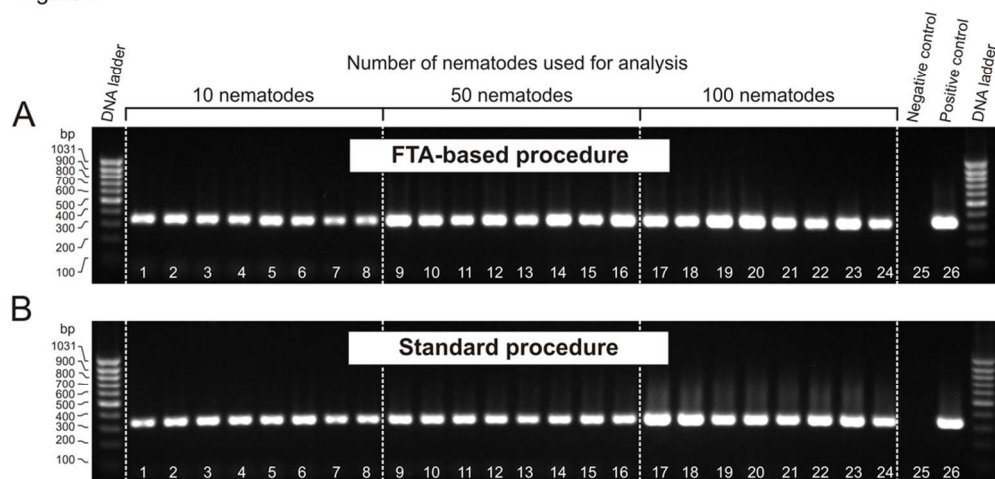


Fig. 2 The FTA-based analysis of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. PCR-based detection of a high-copy ITS-rDNA target gene using the FTA technology (A) and the standard DNA purification procedure (B). The indicated number of nematodes (lines 1 to 8, 10 nematodes per assay; lines 9 to 16, 50 nematodes per assay; and lines 17 to 24, 100 nematodes per assay) were used for the analyses, as explained in the top legend. The expected length of the DNA fragment amplified using the species-specific primers PF1 and PR1 was 327 bp. Lanes 25 and 26 are PCR controls, where either sterile distilled water (negative control) or well-defined *D. dipsaci* genomic DNA (positive control) were used. The DNA ladder used was the GeneRuler 100-bp DNA ladder (Fermentas).
94x49mm (300 x 300 DPI)

Figure 3

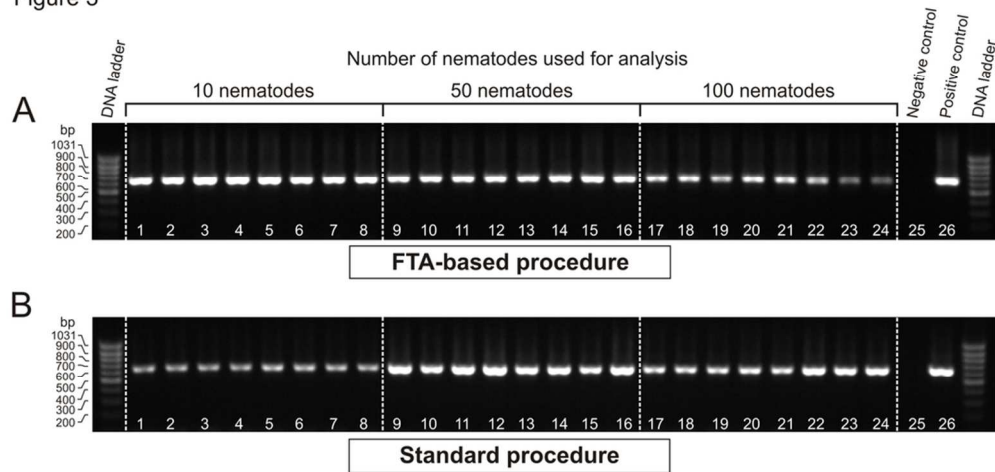


Fig. 3 FTA-based analysis of the sugar beet nematode *Heterodera schachtii*. PCR-based detection of the high-copy ITS-rDNA target gene using the FTA technology (A) and the standard DNA purification procedure (B). The indicated number of nematodes (lines 1 to 8, 10 nematodes per assay; lines 9 to 16, 50 nematodes per assay; and lines 17 to 24, 100 nematodes per assay) were used for analyses, as explained in the top legend. The expected length of the DNA fragment amplified with the species-specific primers HSF-2 and HSR-2 was 621 bp. Lanes 25 and 26 are PCR controls, where either sterile distilled water (negative control) or well-defined *D. dipsaci* genomic DNA (positive control) were used. The DNA ladder used was the GeneRuler 100-bp DNA ladder (Fermentas).
91x45mm (300 x 300 DPI)

Figure 4

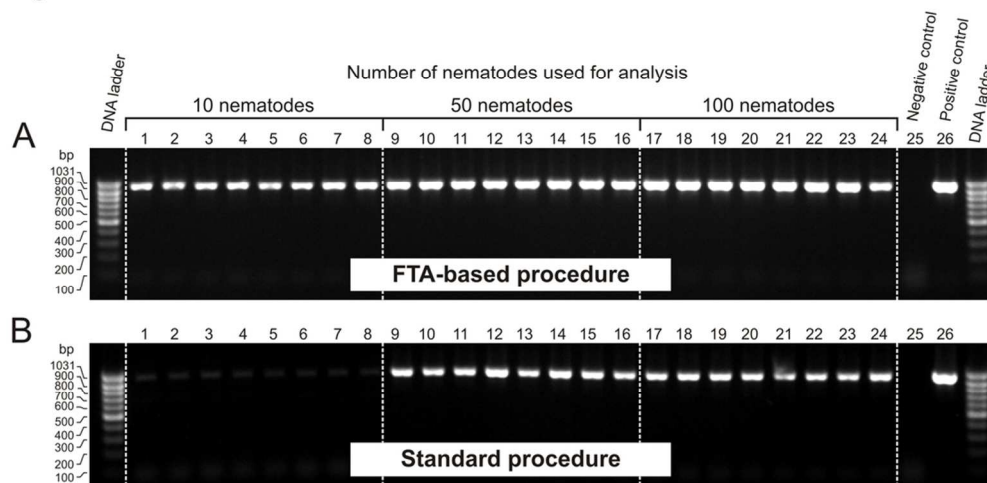


Fig. 4 FTA-based analysis of the Northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. PCR-based detection of the high-copy ITS-rDNA target gene using the FTA technology (A) and the standard DNA purification procedure (B). The indicated number of nematodes (lines 1 to 8, 10 nematodes per assay; lines 9 to 16, 50 nematodes per assay; and lines 17 to 24, 100 nematodes per assay) were used for the analyses, as explained in the top legend. The expected length of the DNA fragment amplified with the species-specific primers MH0F and MH1R was 960 bp. Lanes 25 and 26 are PCR controls, where either sterile distilled water (negative control) or well-defined *D. dipsaci* genomic DNA (positive control) were used. The DNA ladder used was the GeneRuler 100-bp DNA ladder (Fermentas).
95x50mm (300 x 300 DPI)

Figure 5

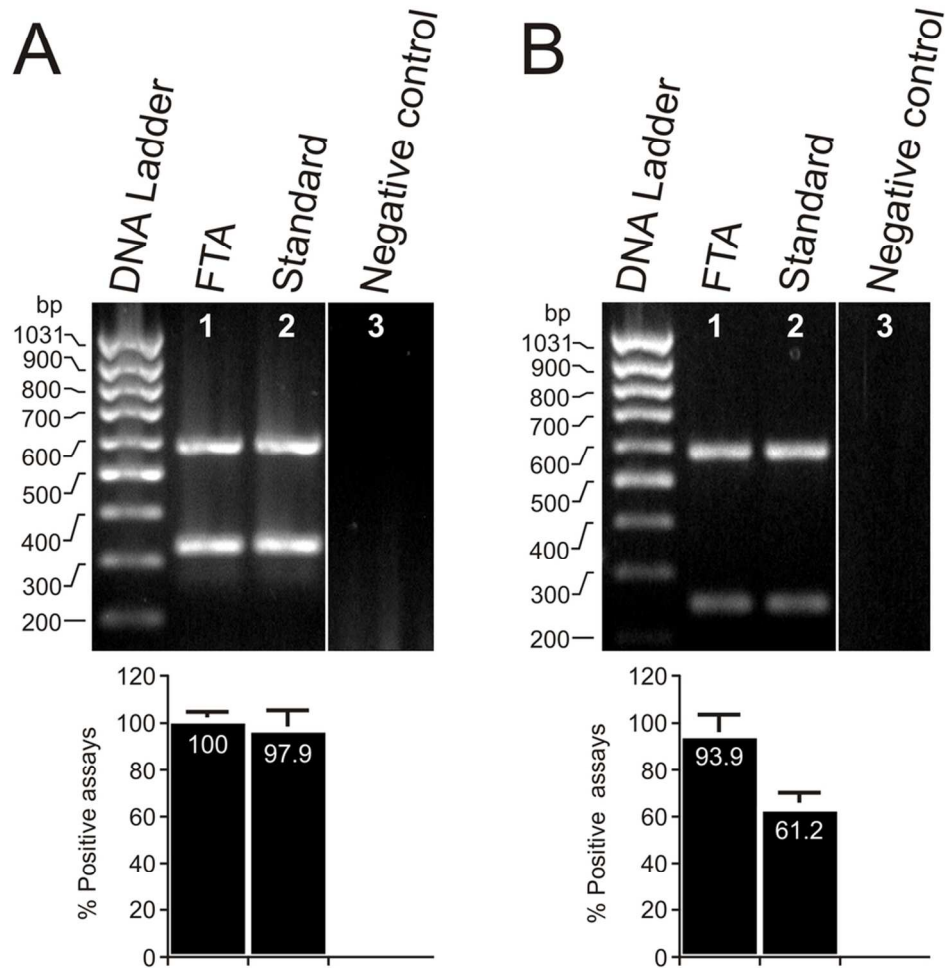


Fig. 5 PCR-based amplification of the high-copy (A) and low-copy (B) nematode gene from naturally nematode-infested plant tissues. A comparison between the FTA-based technology (line 1) and the standard DNA purification procedure (line 2). For the FTA analysis, *D. dipsaci*-infested chicory leaves were mechanically printed onto the FTA matrix. A region of the high-copy gene ITS-rDNA was amplified (327 bp), while the SCAR-derived marker (245 bp) was used as a low-copy gene target. The host-specific gene ribulose-1,5-(bis)-phosphate-carboxylase (RuBisCO) was used as an internal control (the expected length the plant DNA fragment is 582 bp). Sterile distilled water served as a negative control in all PCR assays (line 3). The DNA ladder used was the GeneRuler 100-bp DNA ladder (Fermentas). The lower graphs show the percent (%) of positive PCR assays ($n=34$). The results of three independent assays, with error bars representing the standard deviations, are shown.

91x95mm (300 x 300 DPI)

Figure 6

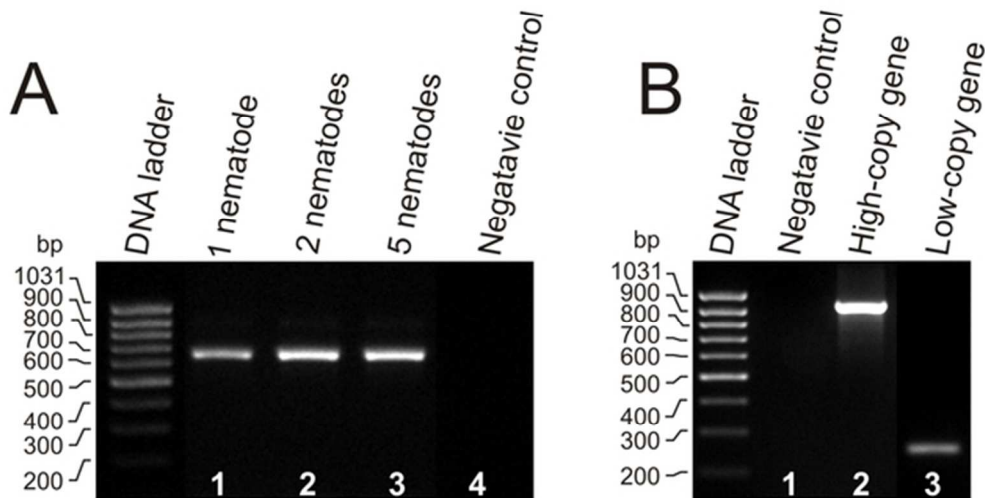


Fig. 6 Sensitivity of detection and long-term storage of FTA-captured nematode DNA.

(A) PCR-based detection of *Heterodera schachtii* DNA where only one nematode (line 1), two nematodes (line 2), or five nematodes (line 3) were loaded onto FTA discs. Sterile distilled water served as a negative control in PCR assay (line 4). The expected length of the DNA fragment that was amplified with the species-specific primers HSF-2 and HSR-2 was 621 bp.

(B) Amplification of the high-copy ITS-rDNA (line 2) and the low-copy SCAR-derived (line 3) *D. dipsaci* genes. Specimens were applied to the FTA matrix by the mechanical printing of naturally infested chicory leaves. The FTA cards were then stored at room temperature for seven years prior to molecular analysis. Sterile distilled water served as negative control in the PCR assays (line 1). The ITS-rDNA region served as a high-copy gene (967 bp), while the SCAR-derived marker (245 bp) was used as a low-copy gene. The DNA ladder used was the GeneRuler 100-bp Plus DNA ladder (Fermentas).
54x33mm (300 x 300 DPI)

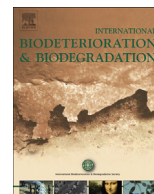
Table 1 Nematode species used in this study.

Nematode species	Host (common name)	Country of origin	Source and/or reference
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	<i>Cichorium inthybus</i> (Leaf chicory)	Slovenia	G. Urek, Marek <i>et al.</i> , 2005
<i>Heterodera schachtii</i>	<i>Beta vulgaris</i> (Sugar beet)	Czech Republic	M. Zouhar
<i>Meloidogyne hapla</i>	<i>Daucus carota</i> (Carrot)	Czech Republic	M. Zouhar, Zouhar <i>et al.</i> , 2003

Table 2 PCR primers used in this study.

Target organism	Primer name	Sequence (5'-3')	Sense ^a	PCR product size (bp)	Target gene	Author/Reference
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	PF1	AACGGCTCTGTTGGCTTCTAT	F	327	ITS-rDNA	Marek <i>et al.</i> , 2005
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	PR1	ATTACGACCCTGAGCCAGAT	R	327	ITS-rDNA	Marek <i>et al.</i> , 2005
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	S18	TTGATTAGGTCCCTGCCCTTT	F	967	ITS-rDNA	Marek <i>et al.</i> , 2005
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	S26	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG	R	967	ITS-rDNA	Marek <i>et al.</i> , 2005
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	DIT5F	GAAAACCAAGAGGCCGTAAAC	F	245	SCAR marker	Zouhar <i>et al.</i> , 2007
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	DIT5R	ACCTGATTCTGTACGGTGCAA	R	245	SCAR marker	Zouhar <i>et al.</i> , 2007
<i>Heterodera schachtii</i>	HSF2	CACATGTGAAAGCCTGTGGA	F	621	ITS-rDNA	This study
<i>Heterodera schachtii</i>	HSR2	GCCGAGCTGAGCAAGTAAAG	R	621	ITS-rDNA	This study
<i>Meloidogyne hapla</i>	MH0F	CAGGCCCTTCCAGCTAAAGA	F	960	ITS-rDNA	Zouhar <i>et al.</i> , 2003
<i>Meloidogyne hapla</i>	MH1R	CTTCGTTGGGGAAGTGAAGA	R	960	ITS-rDNA	Zouhar <i>et al.</i> , 2003
<i>Cichorium intybus</i>	Rbcl-F	AGTCATGCATTACGATCCGAA	F	582	RuBisCO gene	Marek <i>et al.</i> , 2010
<i>Cichorium intybus</i>	Rbcl-R	CCAGTCTTGATCGT TACAAA	R	582	RuBisCO gene	Marek <i>et al.</i> , 2010

^a F, forward; R, reverse



Wood penetration ability of hydrogen cyanide and its efficacy for fumigation of *Anoplophora glabripennis*, *Hylotrupes bajulus* (Coleoptera), and *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda)



V. Stejskal^{a,*}, O. Douša^a, M. Zouhar^b, M. Manasova^b, M. Dlouhy^c, J. Simbera^c, R. Aulický^a

^a Crop Research Institute Prague, Division of Plant Health, Drnovska 507, 161 06 Prague 6, Czech Republic

^b Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Plant Protection, Czech Republic

^c Lucebni zavody Draslovka a.s. Kolin, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 May 2013

Received in revised form

12 July 2013

Accepted 20 August 2013

Available online 12 November 2013

Keywords:

Wood

Pests

Fumigation

HCN

Penetration

Efficacy

Absorption

ABSTRACT

Pinewood nematodes (*Bursaphelenchus xylophilus*) and Asian longhorned beetles (*Anoplophora glabripennis*) are the primary regulated pests for packaging wood and timber in the EU, while the house longhorned beetle (*Hylotrupes bajulus*) is the most important cosmopolitan pest of construction wood. Gaseous hydrogen cyanide (HCN) is one of the few fumigation alternatives to the banned ozone-depleting chemical methyl bromide (MBr). This study reports the results of HCN fumigation experiments in a hermetically sealed steel chamber regarding (1) the penetration and absorption rates of HCN in wooden blocks, and (2) the biological efficacy of HCN against the wood-infesting pests *B. xylophilus* (in sawdust), *A. glabripennis*, and *H. bajulus* (in wooden blocks). A concentration equilibrium for HCN (at 20 g m⁻³) between the fumigation chamber headspace and the center of the treated spruce blocks (100 × 100 × 120 mm) was reached after 48 h in the saturated atmosphere. A dose of 10 g m⁻³ in the center of the spruce blocks was reached for both saturated and non-saturated atmospheres after 24 h of fumigation. The wood tested absorbed approximately 40–45% of the HCN, until equilibrium was reached. The highest tested HCN dose (20 g m⁻³) led to 100% mortality of the *A. glabripennis* and *H. bajulus* larvae after less than 1 h of exposure. For 20 g m⁻³ and 1 h exposure the Ct product was <18.66 g*h/m³ for *H. bajulus* and <17.67 g*h/m³ for *A. glabripennis*. Hydrogen cyanide doses of 10 g m⁻³ and 20 g m⁻³ led to 100% *B. xylophilus* mortality in 40 and 18 h, respectively. For *B. xylophilus* the Ct product was <424.00 g*h/m³ for 20 °C and 10 g m⁻³ and <349.51 g*h/m³ for 25 °C and 20 g m⁻³. The initial results are promising in terms of establishing an alternative technology and protocol to MBr for timber fumigation.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Numerous pests deteriorate wooden construction, historical artifacts, and packaging wood. The house longhorn beetle, *Hylotrupes bajulus* L., is the most important cosmopolitan pest of construction wood and historical buildings. Leading EU authorities on plant health and pest risk assessment (EFSA and EPPO) have listed the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis* Motschulsky) and the pinewood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus* s/ Steiner & Buhner/Nickle) among the most serious regulated pests and as major threats to wood quarantine in Europe (OEPP/EPPO, 1986; Macleod et al., 2002; Cermak et al., 2013).

The regulated beetle *A. glabripennis* (EPPO Code: ANOLGL) is an EPPO 1 pest and is native to China and Korea. The regulated

nematode *B. xylophilus* (EPPO Code: BURSXY) is also an EPPO A1 pest (list: No. 158) that was first described in the U.S. as *Aphelenchoides xylophilus* (Steiner and Buhner, 1934). Eradication programs, based primarily on physical removal and the destruction of infested plants, have been established in several European countries, e.g., for *B. xylophilus* in Portugal and for *A. glabripennis* in Italy (Herard et al., 2009). Quarantine measures and techniques to slow the range expansion and exterminate these pests are limited. At present, heat treatment of wood originating in the areas of occurrence of *A. glabripennis* and *B. xylophilus* is the only available option, according to the International Standards for Phytosanitary Measures, Publication No. 15 (ISPM 15). However, this technique is time-consuming and presents the danger of changing the mechanical characteristics of the treated wood. In addition, recent scientific opinions from EFSA have questioned the reliability of some of the heat treatment methods. For example, EFSA (2010) concluded that the technical requirements (presented in the Portuguese dossier) did not adequately demonstrate the effectiveness

* Corresponding author. Tel.: +420 330 22 217.

E-mail address: stejskal@vurv.cz (V. Stejskal).

and reliability of the proposed composting method as a treatment that would ensure that the treated pine bark was free from live *B. xylophilus*; the dossier did not provide evidence that all the bark particles within the lot had achieved a continuous core temperature of 56 °C for 30 min.

The EFSA Panel on Plant Health (EFSA, 2012) also expressed uncertainty when it was asked by the EC to provide an opinion on a technical file submitted by U.S. authorities in support of a request to list a new heat treatment (60 °C/60 min) among the EU import requirements for wood from beetle pest (*Agrius planipennis*/Fairmaire/) host plants. No alternative chemical treatment (including fumigants) has been available under ISPM 15 since the absolute ban on MBr by the EC (EC Regulation No. 2037/2000). Therefore, it behooves international commercial interests using wood packaging, as well as timber producers and processors, to extend the spectrum of active substances that can be applied against regulated wood-infesting pests.

Are there any alternative fumigants available for replacing MBr that have biological potential and industry support for industrial wood treatment and quarantine? According to Banks (2012), there are currently only four fumigants (sulfuryl fluoride, HCN, methyl iodide, and methyl isothiocyanate + sulfuryl fluoride = Ecotwin) under consideration as alternatives to MBr for the ISPM-15-approved treatment of wood-packaging materials. Among the chemicals listed, HCN is the only prospective wood-protecting fumigant produced in central Europe. Hydrogen cyanide was identified as an existing active substance under Directive 98/8/EC for product types 08, 14, and 18 (wood preservatives, rodenticides, insecticides, acaricides, and products to control other arthropods). It was evaluated by experts and authorities of member states of EEA and approved as an active substance for the above mentioned PT with date of inclusion to the Annex I of Directive 98/8/EC set on 1 Oct. 2014. This means that biocidal product(s) (BP) containing HCN as an active substance can be subject to authorization of BP under EU Regulation 528/2012. An application for such authorization is now being prepared by Lucebni závody Draslovka a.s. Kolin, to be submitted to Czech authorities as soon as possible.

Hydrogen cyanide is not a novel insecticide molecule; however, it offers several significant advantages. It occurs naturally in the environment, it features very high penetration properties, and it is highly reactive and therefore easily and quickly degradable, while leaving minimal undesirable residues. The risks associated with high toxicity can be decreased by proper cylinder formulation, use in a fumigation chamber, and application by professionally trained staff. Hydrogen cyanide is commercially available and is registered in some EU countries as a biocide for mill and airplane fumigation (Ducom, 2012). Outside Europe, HCN has been registered in India, New Zealand (Navarro, 2006), and South Korea. Misumi (2011), in his review of quarantine methods, documented that HCN has been used in Japan for the quarantine of apples (dose: 1.8 g m⁻³; exposure: 30 min).

Lindgren et al. (1954) and Aulicky et al. (2012) demonstrated significant HCN efficacy against beetle pests infesting important products stored at mills. Rambeau et al. (2001) reported that all of the life stages of significant pests in mills and food factories, including *Tribolium confusum* Jacquelin du Val, *Tribolium castaneum* (Herbst), and *Plodia interpunctella* (Hübner) could be controlled at a Ct product of 10 ghm⁻³, although to ensure HCN penetration and kill insects at a depth of approximately 10 cm in heaps of flour, the prevailing Ct product should be approximately 60 ghm⁻³. In the presence of minor leakage, initial HCN concentrations were proposed at 5 g m⁻³.

Although there are no current plans for HCN fumigation in the USDA-APHIS Treatment Manual (Neven, 2010), it has previously been employed to fumigate fresh fruits in the U.S. and Europe

(Bond, 1984). Hydrogen cyanide may be used for the fumigation of many dried foodstuffs, grains, and seeds (Emekci, 2010). Although HCN is strongly absorbed by many materials, this action is usually reversible when they are dry, and, given enough time, all of the fumigant vapors are desorbed (Navarro, 2006). Recent experiments performed in the Czech Republic (Manasova et al., 2012) demonstrated the nematocidal properties of HCN for the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* (Maupas). There have been long-term practical experiences with the structural treatment of wood (Rambeau et al., 2001) because HCN has been used as a biocide for controlling pests that are infesting wood in churches and museums in Europe. Hydrogen cyanide fumigation methods have been developed for treating parts of galleries as well as structural woodwork that had been infested by wood pests (Grosser and Roßmann, 1974; Emmerling, 1995). There are data published on the efficacy of HCN for controlling wood-infesting pests of the genera *Anobium* sp. and *Lyctus* sp. under various temperatures, concentrations, and exposures (Parkin and Busvine, 1937; Bletchly, 1953). Soma et al. (2001a), Soma et al. (2001b) compared the efficacy of several fumigants in controlling nematodes infesting wood. However, experimental data are lacking on the efficacy of HCN at controlling not only newly emerging wood-packaging pests (*A. glabripennis* and *B. xylophilus*) but also, surprisingly, some “old” wood-infesting pests, such as *H. bajulus*.

Because of the lack of existing fumigation treatments against significant EPPO 1 wood-packaging infesting pests, we explored the potential of gaseous HCN for their control. This study reports results on (1) the penetration ability of HCN into wooden blocks and its rate of absorption, and (2) the biological efficacy of two doses of HCN (10 g m⁻³, 20 g m⁻³) for both of the regulated pests *A. glabripennis* and *B. xylophilus* and for the significant cosmopolitan non-regulated structural wood-infesting pest *H. bajulus*.

2. Materials and methods

2.1. Fumigation chamber, HCN formulation, and concentration estimation

All of the experiments were performed in a hermetically sealed steel fumigation chamber (volume, 650 L) with forced air circulation and temperature regulation that is located at the Lucebni závody Draslovka a.s., Kolin (Czech Republic) (Fig. 1A). If there is an experimental need, the chamber allows for the continuous, non-invasive withdrawal of individual samples through an air-lock antechamber (Fig. 1B) during the required time intervals. The experimental HCN formulation was used in a cooled (5 °C) liquid form. It was stabilized with 0.1% phosphoric acid and with 0.9–1.1% sulfur dioxide. The HCN was introduced into the fumigation chamber using a syringe via a rubber septum (Figs. 1A and 2). Inside the fumigation chamber, the HCN vapor concentration (inside and outside/ = headspace/wooden spruce block) was estimated using the GC technique (Shimadzu GC-17A, RT-QPLOT, 30 m, ID 0.53 mm, GC Software Clarity DataApex). The GC method is based on comparing the detector response from the sample with an external standard with a known concentration. We used 0.5 vol.% HCN in nitrogen as the standard (Linde Gas).

2.2. HCN wood penetration

Spruce wood (*Picea alba* (L.) H. Karst.) was selected for the HCN penetration experiments because it is the most common material used for wooden pallet construction. Wooden Euro pallets are composed of top and bottom duckboards (1–3 cm in width) connected by stringers or blocks (100 × 100 × 10 mm). For the HCN penetration test, five wooden blocks (moisture 18.5% ± 0.44%;

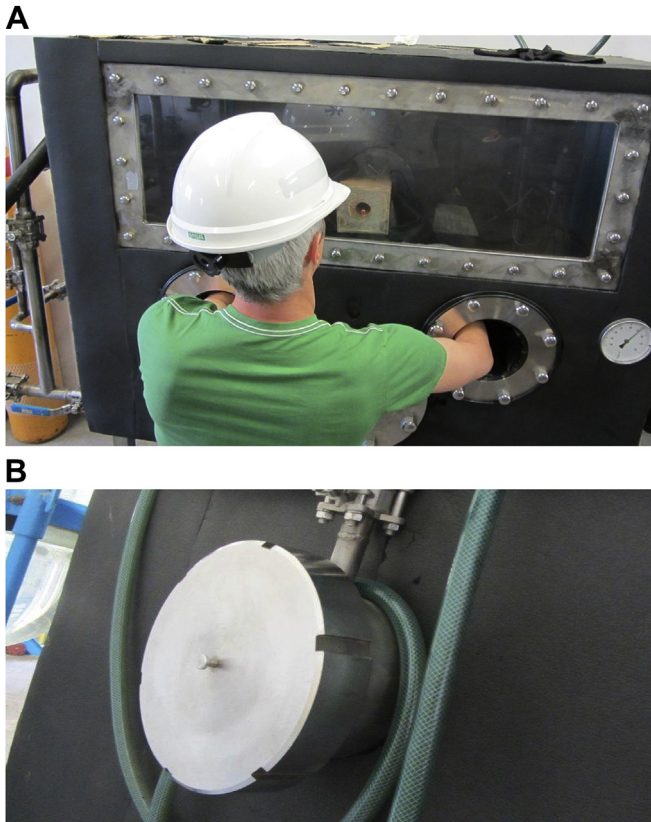


Fig. 1. Fumigation hermetic chamber equipped with frontal rubber septum and manipulation gloves (A) and a lateral air-lock antechamber (B).

Fig. 1) were used for each experiment inside the experimental fumigation chamber. Two designs were used for the experimental penetration: (1) a saturated atmosphere (i.e., after a single initial application of 20 g m^{-3} , small dosages were periodically applied to compensate for absorption; for saturation times and dose regimes see the table in Fig. 3), and (2) a non-saturated atmosphere (single initial application of 20 g m^{-3}). The required dose of HCN was injected into the fumigation chamber using a syringe via a septum in the front section of the fumigation chamber. Then, the rate of HCN penetration into the central cavity of each spruce block was measured at regular intervals over 50 h of exposure. Air samples were taken from the central cavity of the spruce block (see

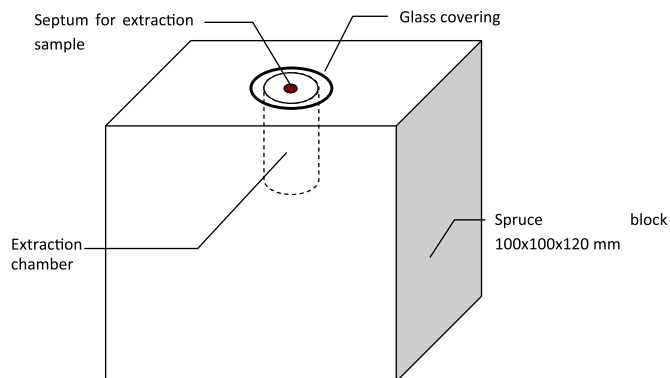


Fig. 2. Experimental spruce block ($100 \times 100 \times 120 \text{ mm}$). It is equipped with an extraction chamber and a rubber septum enabling continual air sampling for HCN concentration in the central portion of the block.

“extraction chamber” in Fig. 1; diameter: 25 mm, depth: 60 mm) via a rubber septum, as well as from the steel fumigation chamber headspace, and were immediately analyzed using the GC technique.

2.3. Coleoptera (cerambycids)

Tests were performed in the fumigation chamber (described above) with HCN concentrations of 10 and 20 g m^{-3} (at 24 and 40 h of exposure) at temperatures of $23\text{--}24 \text{ }^\circ\text{C}$ and with an HCN concentration of 20 g m^{-3} (at 1, 3, and 6 h of exposure) at temperatures of $20\text{--}21 \text{ }^\circ\text{C}$. Larvae of two species were tested: *H. bajulus*, originating from Materialprüfanstalt Brandenburg GmbH, and *A. glabripennis*, originating from the European Biological Control Laboratory, USDA, ARS. Exposure was performed on small wooden blocks that were delivered from the original cultures (1 larva/1 block). The moisture content of the wooden blocks ranged from 16.5% to 21%. The thickness of the experimental wooden blocks was approximately 30 mm narrower than the top/bottom deck-boards of wooden Euro pallets. The larvae of *H. bajulus* (size 15–25 mm) were attached to $70 \times 25 \times 40 \text{ mm}$ wooden blocks, and the larvae of *A. glabripennis* (size 25–40 mm) were attached to $90 \times 40 \times 40 \text{ mm}$ wooden blocks. For *H. bajulus*, three repetitions (five insect-infested wooden blocks per repetition) were performed for each concentration and exposure time. For *A. glabripennis*, only two repetitions were performed for each concentration and time, due to the limits on biological material supplies and the quarantine status. After 24 h of ventilation, the wooden blocks were gently opened, and the mortality measurement was performed. A control (blank) group was tested in the fumigation chamber without HCN.

2.4. Nematodes

The experimental nematodes (*B. xylophilus*) were obtained from a CULSin vitro-laboratory culture maintained on the fungus *Botrytis cynerea* (De Bary) Whetzel. Experiments were conducted in 50-ml polyethylene vials with modified lids. The lid modification consisted of perforating the lid and covering the opening with an $80\text{-}\mu\text{m}$ mesh size of Uhelon fabric, allowing for the free access of HCN to the vial. Infested wood sawdust (*Pinus sylvestris* L.) was used (Kinn, 1986). Twenty grams of sawdust (moisture content declined during the experiment from 30 to 7%) was placed into each vial. Subsequently, individuals of *B. xylophilus* were pipetted into each vial; different numbers of nematodes (inoculum) were applied in different experiments (Table 3). A magnetic stirrer was used, while pipetting, to ensure the homogeneity of the nematode inoculum.

The surviving nematodes were evaluated after six exposure intervals (6, 12, 18, 24, 30, and 40 h) and two temperatures and HCN concentrations ($25 \text{ }^\circ\text{C}$ and 20 g m^{-3} ; $20 \text{ }^\circ\text{C}$ and 10 g m^{-3}). Each experiment was repeated five times. Five untreated controls were kept at the relevant temperatures outside the chamber during the period of fumigation (40 h).

After fumigation, the chamber was actively ventilated to vent the HCN-containing atmosphere, and the nematodes were separated from the samples using a modified version of Baermann's method (utility model number CZ 24090 U1). The controls were evaluated in the same manner. After 12 h of extraction, the suspension of nematodes was transferred into embryonic dishes, and the numbers of nematodes in the individual samples were determined using a stereomicroscope.

2.5. Statistical evaluation

Statistical analysis of the data was conducted using the Kruskal–Wallis test. The analysis was performed using Statistica 10.0

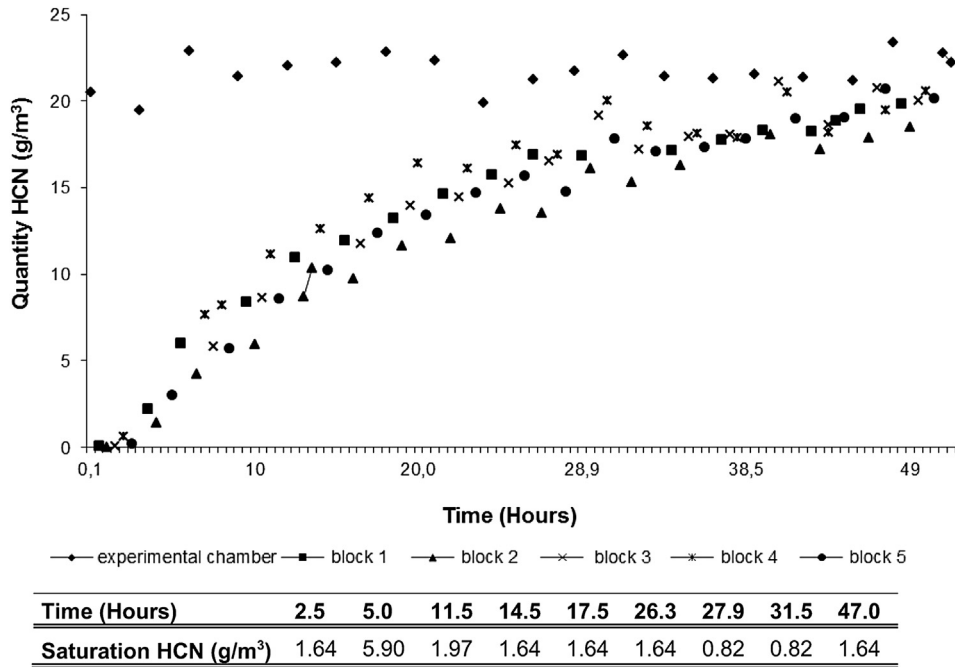


Fig. 3. Temporal dynamics of HCN concentration in the headspace of the hermetically sealed fumigation chamber (650 L) and in the center of the experimental spruce blocks (5) in a saturated HCN atmosphere (20 g/m³). The saturation of the headspace atmosphere was reached by repeated injections of compensatory HCN doses as shown in the attached table. Explanations: “experimental chamber” = HCN concentration in the headspace of the fumigation chamber; “block” = HCN concentration in the center of the spruce block (100 × 100 × 120 mm).

software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2011). The Ct product was estimated based on FAO methods (http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/new_fao/x5417e/x5417e0u.htm).

3. Results

3.1. HCN wood penetration

Fig. 3 shows the temporal rate of HCN penetration into the spruce blocks (100 × 100 × 120 mm) and the extent of variation among the treated wooden blocks under saturated HCN

atmospheric conditions (i.e., the headspace HCN was continually saturated to maintain the concentration near 20 g m⁻³). Under saturated conditions, the HCN concentration (20 g m⁻³) equilibrium between the headspace and the center of the wooden spruce blocks was reached after approximately 50 h Fig. 4 shows the HCN absorption (equilibrium was reached after approximately 24 h) and temporal penetration rates into the spruce blocks without HCN atmospheric compensation; the absorption of HCN by the wood represented approximately 40–45% of the initial dose. The Ct product for larvae of *H. bajulus* after 1 h exposure to an HCN concentration of 20 g m⁻³ was <18.66 g*h/m³, and for larvae of *A. glabripennis* it was <17.67 g*h/m³.

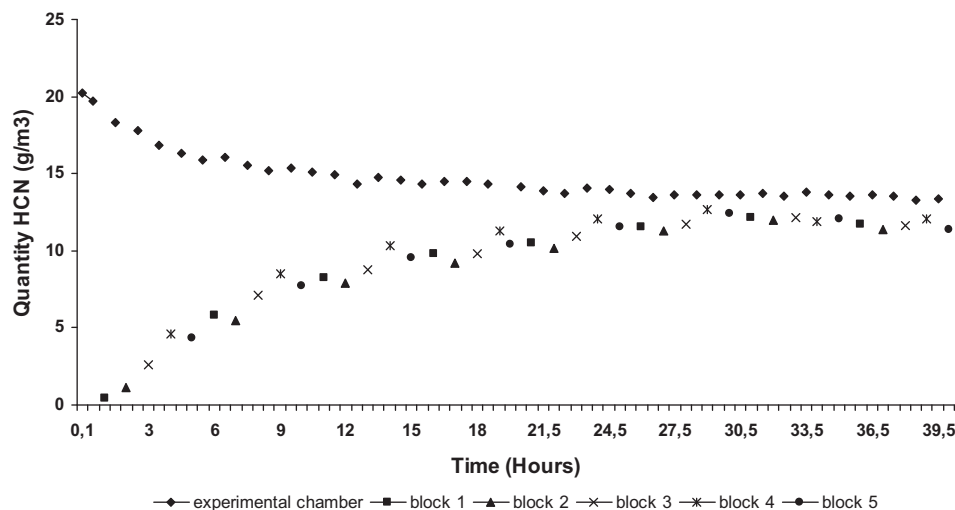


Fig. 4. Absorption and temporal dynamics of HCN concentrations in the headspace of the fumigation chamber and in the center of the experimental spruce blocks (initial dose 20 g/m³). Five blocks were used per fumigation chamber (650 L).

Table 1

Mortality (%) of larvae of *Hylotrupes bajulus* and *Anoplophora glabripennis* after 24 and 40-h exposure to two HCN doses (10 and 20 g m⁻³). Ct product for larvae of *H. bajulus* after 24 h exposure to HCN concentration 10 g m⁻³ was <215.38 g*h/m³ and for larvae of *A. glabripennis* was <236.33 g*h/m³.

	n	24 Hours			40 Hours		
		10 g/m ³	20 g/m ³	Control	10 g/m ³	20 g/m ³	Control
Longhorn beetle <i>Hylotrupes bajulus</i>	15	100 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	0 ± 0
Asian Longhorn beetle <i>Anoplophora glabripennis</i>	6	100 ± 0	100 ± 0	0 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	0 ± 0

Table 2

Mortality (%) of larvae of *H. bajulus* and *A. glabripennis* for HCN 20 g m⁻³ (1, 3 and 6-h exposure). Ct product for larvae of *H. bajulus* after 1 h exposure to HCN concentration 20 g m⁻³ was <18.66 g*h/m³ and for larvae of *A. glabripennis* was <17.67 g*h/m³.

	n	Exposure times			
		1 Hours	3 Hours	6 Hours	Control
Longhorn beetle <i>Hylotrupes bajulus</i>	15	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	0 ± 0
Asian Longhorn beetle <i>Anoplophora glabripennis</i>	8	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	0 ± 0

3.2. Cerambycids and nematodes

The results for cerambycids (*A. glabripennis* and *H. bajulus*) are summarized in Tables 1 and 2. The highest HCN dose (20 g m⁻³) led to 100% mortality of the *A. glabripennis* and *H. bajulus* larvae in less than 1 h of exposure. Table 3 shows the temporal dynamics of *B. xylophilus* mortality when they were exposed to the HCN atmosphere in the fumigation chamber.

Both HCN concentrations proved to be effective in reducing the number of live *B. xylophilus* (Table 3). A statistically insignificant difference ($p = 0.0005$) between the control and the treatment was achieved only for a 6-h exposure at 20 °C at a concentration of 10 g m⁻³. Total mortality was achieved after 18 h of HCN exposure at a concentration of 20 g m⁻³ and after 40 h of exposure at a concentration of 10 g m⁻³. The Ct product for nematodes under optimal conditions (25 °C; 20 g m⁻³) was <349.51 g*h/m³, and for suboptimal conditions (20 °C; 10 g m⁻³) it was <424.00 g*h/m³.

4. Discussion

4.1. HCN wood penetration

Although HCN has been employed for stored products and for structural wood fumigation in historical buildings for almost 100 years, only a few studies concerning rates of HCN wood penetration have been published. The oldest study, by Schwarz and Deckert (1930), claimed that wood can be penetrated easily by HCN: "The gas has very great penetrative power, and it is unimportant whether the material be coarse like rice or fine like potato flour. Penetration deep into the mass of a highly absorbent material is

slower than in a less absorbent one, and the gas is subsequently given up more slowly by the former material." However, Kunz et al. (1964) later described a slow rate of passive diffusion for HCN through a mass of grain sorghum, and slow penetration (and high absorption) was reported for mill-flour residues (Rambeau et al., 2001). Capoun and Krykorkova (2008) measured residues of HCN in various types of wood and at various depths in the fumigated wood. They discovered a considerably higher HCN content in the spruce wood than in the pinewood. The highest HCN residue content was recorded at a depth of approximately 1.5 cm, while there was low HCN content in the surface layer due to desorption. However, this study was performed in plastic barrels and did not provide any HCN measurements from the fumigation barrels' headspaces or the centers of the wood blocks. Our experiments were performed in a hermetically sealed steel chamber with air circulation, and they demonstrated (Fig. 3) that HCN required (under normal atmospheric pressure and room temperature) almost 50 h to reach the central portion of the exposed spruce blocks (100 × 100 × 150 mm) at a concentration that equaled the headspace concentration. With each addition of HCN a new equilibrium was set for "saturated HCN design." Because the last HCN addition took place at 47 h (Fig. 3), the final equilibrium is only reached afterward, i.e., 50 h, unlike the situation "without saturation." Ren et al. (2011) compared the rates of penetration of four industrial fumigants (SF, PH₃, C₂N₂, and CH₃Br) into pinewood (*Pseudotsuga menziesii*/Mirb./Franco) blocks (100 mm × 100 mm × 300 mm). Each fumigant penetrated into all parts of the block, but the speed and extent of penetration were different. The fumigants that most rapidly achieved an even concentration throughout the block and chamber were PH₃ and C₂N₂. However, we cannot simply compare our results on HCN penetration with those from the Ren et al. (2011) study because they used different types of wood and a different experimental design.

4.2. Biological efficacy of HCN on nematodes and beetles

Schwarz and Deckert (1930) were the first to experimentally demonstrate that HCN (released from solid tables) could penetrate wood in sufficient concentrations to kill *H. bajulus* developing inside. In our study, we confirmed not only that HCN can accomplish this but also that it can do so very quickly: 100% biological control efficacy after 24 exposure periods was reached in a relatively short

Table 3

Number of surviving nematodes after HCN treatment in hermetic fumigation chamber under optimal (25 °C; 20 g m⁻³) and suboptimal conditions (20 °C; 10 g m⁻³) for range for s6 time exposure intervals (6, 12, 18, 24, 30 and 40 h). Ct product for nematodes under optimal conditions (25 °C; 20 g m⁻³) was <349.51 g*h/m³ and for suboptimal conditions (20 °C; 10 g m⁻³) was <424.00 g*h/m³.

Temperature (°C)	HCN concentration (g m ⁻³)	Nematode inoculum	Number of surviving nematodes after HCN treatment (average ± SE)							
			Exposition time in hours							
			0	6	12	18	24	30	40	
25	20	50	22.8 ± 4.8	4.6 ± 2.2	1.4 ± 0.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
25	20	450	336.4 ± 24.9	31.8 ± 9.6	2.8 ± 1.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
20	10	450	216.8 ± 32.3	46.8 ± 8.7	8.0 ± 1.4	1.4 ± 0.5	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
20	10	200	115.8 ± 12.0	21.2 ± 8.0	13.0 ± 3.1	0.6 ± 0.6	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	

time (less than 1 h). This result is in agreement with the findings of other authors because rapid insecticidal activity for HCN had previously been demonstrated not only for wood-infesting beetles but also for the pests of stored products. For example, Lindgren et al. (1954) compared the sensitivities of eight significant stored-product pests to ten different fumigants, showing a relatively high performance for HCN after short exposure times. Nevertheless, a different speed of action was documented for HCN for nematodes. We clearly showed that the efficacy of HCN was dramatically faster for the beetles tested (1 h) than for the nematodes (18 h). The absence of specific breathing organs in nematodes or a different metabolism might be plausible explanations.

In previous work (Aulicky et al., 2012; Stejskal et al., 2012), we described significant efficacy for HCN against various developmental stadia of the wood-boring pest *H. bajulus* and the stored-product pest *T. castaneum*. In *T. castaneum*, 100% mortality was achieved for adults, larvae, eggs, and pupae after 180 min of HCN exposure. The most tolerant stadium of *T. castaneum* was the pupa; its survival was still recorded after 120 min of HCN exposure. Bletchly (1953) discovered that exposures ranging from 4.3 to 42.5 mg HCN/L/h provided 100% mortality for all stadia of the wood-infesting pest *Anobium punctatum*. He stated that eggs were more susceptible to HCN than were larvae. This result is surprising because the principal fumigants currently used (PH3, S2F3) are reported to have poor ovicidal activity (Ducom, 2012).

In addition to the factors discussed above, gas penetration ability, length of exposure, and concentration, as well as pest stadia, pest species, and temperature, are also usually listed among the factors significantly affecting fumigation efficacy (Navarro, 2006). Parkin and Busvine (1937) found that wood-infesting *L. brunneus* larvae were more susceptible to HCN than were adults or *A. punctatum* larvae. By contrast, we did not find any differences in larval sensitivity to HCN between the cerambycid species (*A. glabripennis* and *H. bajulus*) tested. Parkin and Busvine (1937) described a positive relationship between temperature and HCN efficacy for the larvae and adults of two wood-boring beetles (*L. brunneus* and *A. punctatum*). However, we have not found any effects of temperature on HCN efficacy for wood-infesting cerambycids over the range of temperatures tested (21–24 °C).

Previous experiments (Manasova et al., 2012) indicated nematocidal properties for HCN against the free-living nematode *C. elegans*; 100% mortality was achieved with 270 min of exposure at an HCN concentration of 7 g m⁻³. According to our results, HCN fumigation also possesses profound nematocidal potential against *B. xylophilus*. While living nematodes were still observed after 48 h of treatment with sulfuranyl fluoride (Buckley et al., 2010), we did not observe any surviving nematodes after 18 h of HCN (20 g m⁻³) fumigation. The performance of HCN as a nematocide is also comparable with other phyto-quarantine fumigants, such as MBr. For example, the results reported by Soma et al. (2001b) indicated that to achieve complete mortality for *B. xylophilus* infesting boards and lumber, the following treatments (all at 15 °C) could all be sufficient: MBr at 60 g m⁻³ for 24 h; MBr at 40 g m⁻³ for 48 h; methyl isothiocyanate at 40 g m⁻³ for 24 h, or methyl isothiocyanate at 20 g m⁻³ for 48 h. The efficacy of sulfuranyl fluoride was not sufficient, as survivors were observed (Soma et al., 2001a). It is important to note that the comparison of HCN with other fumigants is informative only due to the different experimental design used in both experiments. It is also necessary to stress that our data on *B. xylophilus* are only applicable to the HCN fumigation of wooden packing materials. For timber fumigation, research on the HCN treatment of naturally infested wood would be desirable. It seems that HCN possesses substantial potential as a nematode-killing agent when compared with other commonly used or proposed techniques for treating wood (Dwinell, 1997; Soma et al., 2001b).

5. Conclusions

This study demonstrated significant efficacy for HCN in controlling important wood-infesting pests (*B. xylophilus*, *H. bajulus*, and *A. glabripennis*) and described the temporal rate of penetration for HCN inside spruce blocks under typical atmospheric and temperature conditions. Few experiments concerning the biological efficacy of HCN on controlling pests have been performed in the past 25 years. Our renewed interest and experimental work demonstrated that the available but neglected fumigant HCN might be a promising alternative to timber fumigation technologies and protocols that use MBr.

Acknowledgments

These results were obtained with support from research grant Q111B065, provided by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. We would like to thank Dr. Herard for providing larvae of *A. glabripennis*, P. Rysanek and J. Wenzlova for their help and advice, and Z. Kucerova for critically reading the manuscript. We thank two anonymous reviewers for valuable comments and manuscript improvement.

References

- Aulicky, R., Stejskal, V., Liskova, J., Simbera, J., 2012. The efficacy of HCN fumigation on various developmental stages of stored product pests (In Czech; English abstract). *Uroda* 60, 45–47.
- Banks, J., 2012. Gas processes, CA and fumigation, for quarantine and biosecurity. In: Proceedings of 9th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, ARBER Professional Congress Services, Antalya, Turkey, pp. 687–693.
- Bond, E.J., 1984. Manual of Fumigation for Insect Control. FAO, Rome, p. 432.
- Bletchly, J.D., 1953. The effect of hydrogen cyanide on the eggs of the common furniture beetle, *Anobium punctatum* (Deg.). *Bull. Entomolog. Res.* 44 (03), 415–418.
- Buckley, S., Drinkall, M.J., Thoms, E.M., 2010. Review of research on the control of pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) using the fumigant sulphuryl fluoride and current status for inclusion in ISPM No. 15. In: 10th International Working Conference on Stored Product Protection, Julius-Kühn-Archiv, Berlin, vol. 425, pp. 1024–1030.
- Capoun, T., Krykorkova, J., 2008. Research of wood penetration with hydrogen cyanide (in Czech with English summary). *Sci. Popul. Prot.* 2, 1–6.
- Cermak, V., Vieira, P., Gaar, V., Cudejkova, M., Foit, J., Zouhar, M., Douda, O., Mota, M., 2013. On the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Nematoda: Parasitaphelenchinae) associated with wood and insects from declining forest trees in the Czech Republic. *For. Pathol.* 43, 306–316.
- Dwinell, L.D., 1997. The pinewood nematode: regulation and mitigation. *Ann. Rev. Phytopathol.* 35, 153–166.
- Ducom, P., 2012. Methylbromide alternatives. In: Proceedings of 9th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, ARBER Professional Congress Services, Antalya, Turkey, pp. 205–214.
- EFSA, 2010. Scientific opinion on a composting method proposed by Portugal as a heat treatment to eliminate pine wood nematode from the bark of pine trees. *EFSA J.* 8, 1717.
- EFSA, 2012. Statement on a heat treatment to control *Agrilus planipennis*. *EFSA J.* 10, 2646.
- Emekci, M., 2010. Quo vadis the fumigants?. In: 10th international working Conference on stored product Protection Julius-Kühn-Archiv Berlin, vol. 425, pp. 303–311.
- Emmerling, E., 1995. Holzschädlingsbekämpfung durch Begasung. In: Petzet, M. (Ed.), *Arbeitshefte des Bayerischen Landesamtes für Denkmalpflege*, Bd. 75. Lipp-Verlag, Munich, pp. 43–568.
- Grosser, D., Roßmann, E., 1974. Blausäuregas als bekämpfendes Holzschutzmittel für Kunstobjekte. *Holz als Roh Werkstoff.* 3, 108–114.
- Herard, F., Maspero, M., Ramualde, N., Jucker, C., Colombo, M., Ciampitti, M., Cavagna, B., 2009. *Anoplophora glabripennis* – eradication programme in Italy. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 39, 146–152.
- Kinn, D.N., 1986. Survival of *Bursaphelenchus xylophilus* in wood chips. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 16, 461–464.
- Kunz, S.E., Morrison, E.O., King, D.R., 1964. The effects of grain moisture content, grain temperature and dockage on the penetration of HCN. *J. Econ. Entomol.* 57, 453–455.
- Lindgren, D.L., Vincent, L.E., Krohne, H.E., 1954. Relative effectiveness of ten fumigants to adults of eight species of stored product insects. *J. Econ. Entomol.* 47, 923–926.

- Macleod, A., Evans, H.F., Baker, R.H.A., 2002. An analysis of pest risk from Asian longhorn beetle (*Anoplophora glabripennis*) to hardwood trees in the European community. *Crop Prot.* 21, 635–645.
- Manasova, M., Douda, O., Zouhar, M., Novakova, E., Mazakova, J., Rysanek, P., 2012. Gaseous hydrogen cyanide as an agent to control nematodes in plant materials. *Sci. Agri. Bohem.* 43, 53–57.
- Misumi, T., 2011. Treatments and techniques for pest control on the plant quarantine in Japan. *Urban Pest Manage.* 1, 135–146.
- Navarro, S., 2006. New global challenges to the use of gaseous treatments in stored products. In: Lorini, I., et al. (Eds.), *Proc. of the Ninth Int. Working Conf. on Stored Product Protection*, 15–18 October 2006, Campinas, Brazil. Brazilian Post-Harvest Association, Campinas, Brazil, pp. 495–509.
- Neven, L.G., 2010. Postharvest management of insects in horticultural products by conventional and organic means, primarily for quarantine purposes. *Stew. Postharv. Rev.* 4, 1–11.
- OEPP/EPPO, 1986. Data sheets on quarantine organisms No. 158, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 16, 55–60.
- Parkin, E.A., Busvine, J.R., 1937. The toxicity of hydrogen cyanide to certain wood-boring insects. *Ann. Appl. Biol.* 24, 131–143.
- Rambeau, M., Benitez, D., Dupuis, S., Ducom, P., 2001. Hydrogen cyanide as an immediate alternative to methyl bromide for structural fumigations. In: Donahaye, E.J., Navarro, S., Leesch, J.G. (Eds.), *Proceeding of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, 29 October – 3 November 2000, Fresno, Executive Printing Services, Clovis, CA, U.S.A, pp. 101–111.
- Ren, Y., Lee, B., Padovan, B., 2011. Penetration of methyl bromide, sulfuryl fluoride, ethanedinitrile and phosphine into timber blocks and the sorption rate of the fumigants. *J. Stored Prod. Res.* 4, 63–68.
- Schwarz, L., Deckert, W., 1930. On the penetrative capacity of hydrocyanic acid gas in practical fumigation work. *Zeitsch. Desinfek.* 22, 750–758.
- Soma, Y., Naito, H., Misumi, T., Mizobuchi, M., Tsuchiya, Y., Matsuoka, I., Kawakami, F., 2001a. Effects of some fumigants on pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, infecting wooden packages. *Res. Bull. Plant Prot. Serv. Jpn.* 37, 19–26.
- Soma, Y., Naito, H., Misumi, T., Mizobuchi, M., Tsuchiya, Y., Matsuoka, I., Kawakami, F., 2001b. Effects of some fumigants on pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, infecting wooden packages. 1. Susceptibility of pine wood nematodes to methyl bromide, sulfuryl fluoride and methyl isothiocyanate. *Res. Bull. Plant Prot. Serv. Jpn.* 37, 19–26.
- Steiner, G., Buhner, E.M., 1934. *Aphelenchoides xylophilus* n. sp. A nematode associated with bluestain and other fungi in timber. *J. Agri. Res.* 48, 949–955.
- Stejskal, V., Liskova, J., Ptacek, P., Kucerova, Z., Aulicky, R., 2012. Hydrogen cyanide for insecticide phytoquarantine treatment of package wood. In: *Proceedings of 9th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, ARBER Professional Congress Services, Antalya, Turkey, pp. 687–693.

GASEOUS HYDROGEN CYANIDE AS AN AGENT TO CONTROL NEMATODES IN PLANT MATERIALS*

M. Maňasová¹, O. Douda², M. Zouhar¹, E. Nováková¹, J. Mazáková¹, P. Ryšánek¹

¹*Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Plant Protection, Prague, Czech Republic*

²*Crop Research Institute, Prague, Czech Republic*

At present there is a lack of chemical agents on the market, which could be employed for protecting seed material, planting stock and wood against quarantine phyto-parasitic nematode species *Ditylenchus dipsaci* and *Bursaphelenchus xylophilus*. The object of this research consisted in the development of a new experimental system that would allow testing gaseous hydrogen cyanide for its possible use as an alternative fumigant to control phyto-parasitic nematodes. In this work the nematode species *Caenorhabditis elegans* was used as a model for testing. At the HCN concentration of 7 g.m⁻³ and the time of exposure of 270 minutes 100% mortality of the model species was achieved. Our future research activities should be aimed at establishing of the optimum ranges of temperature and relative humidity to be maintained in the fumigation chamber with a view to find the optimum process parameters, the concentration of HCN, air temperature and relative humidity in particular. It is expected that the use of hydrogen cyanide gas under favourable conditions will provide reliable elimination of phyto-parasitic nematodes in seed material, planting stock and wood.

gaseous hydrogen cyanide; plant protection; *Caenorhabditis elegans*; model organism; phytoparasitic nematodes

INTRODUCTION

Quarantine phyto-parasitic nematodes belong to the most significant plant pests. The current situation in this field is caused by the absence of efficient methods of chemical control. Nowadays, in the Czech Republic there is only one approved agent – Basamid late (containing Dazomet as an active ingredient) – of the required type. Therefore, it is in the interest of growers to extend the spectrum of applicable active substances that could be used to protect agricultural crops against this group of pests.

The nematodes *Ditylenchus dipsaci* (stem and bulb eelworm) and *Bursaphelenchus xylophilus* (pine wood nematode) belong to the phyto-parasitic nematodes of special importance. The first of them is deemed a very serious pest of vegetables and fodder crops. In the conditions prevailing in the Czech Republic the stem and bulb eelworm cause damage, particularly to the vegetables of the onion family. Heavy infestations will frequently lead to the total loss of the yield. The basic method of protection from the stem and bulb eelworm consists in the use of sound seed material. In case the growers want to be sure of the absence of the stem and bulb worm in seed, they have to resort to seed treatment. A sulphide-based pesticide (Sulka) has been used for the purpose up to now, however its performance is relatively low and, moreover, the term of its registration validity has already expired. That

is why only its quantities currently in stock may be used until exhaustion. The growers, therefore, have to rely on the treatment of seed with warm water, the method, that is relatively efficient, but its application to a higher amount of seed is difficult. Moreover, if it is not done properly, the whole treated quantity may suffer damage.

The harmfulness of the Pine Wood Nematode is a problem of global relevance. The species appears to be one of the worst pests of woody plants, particularly of those of the *Pinus* genus. The Pine Wood Nematode comes from North America, where it inhabits the local species of pines, without causing any significant harm to them. After it had been introduced into Japan and, later, into other East Asian countries, calamitous damage occurred to the domestic species of the *Pinus* genus (Mamiya, 1988). In 1999 the presence of pine wood nematode was discovered in Europe in Portugal (Mota et al., 1999) and in Spain in 2008 (Albelleira et al., 2011). Even in spite of extraordinary phytosanitary measures have been taken, the current situation, particularly in Portugal, does not support any assumption of successful eradication of the pine wood nematode in continental Europe. One of the basic extraordinary measures taken against the propagation of pine wood nematode consists in the heat treatment of timber coming from the areas at risk of occurrence of the pest. Other and significant problems in the field stem from the lack of suitable

* Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. QI111B065

active substances that could be used as nematocides, particularly since the absolute ban was put on the use of methylbromide by the European Commission (Regulation (EC) No 2037/2000).

Therefore, it is in the best interest of growers to extend the spectrum of active substances applicable to the protection of agricultural crops and other plant material from quarantine phyto-parasitic nematodes. Agents considered auspicious in this respect include gaseous hydrogen cyanide (HCN, marketed under its trade name 'Uragan D2' by Draslovka Kolín). The use of the substance offers significant advantages that may be gained by its application in practice, particularly the fact that the substance occurs naturally in the environment (even in minimum concentrations), features very high penetration properties, is highly reactive and, therefore, easily and quickly degradable, while leaving no undesirable residues. A problem can be seen in the extreme toxicity of the substance at higher concentrations. That is why its application should be carried out by qualified personnel only in official sealed systems. The substance is deemed very suitable for the treatment of plant material stored in large quantities, whether it comprises timber, seed crop or planting stock. In other words, there is a real chance to employ gaseous hydrogen cyanide as an agent for protecting plants and wood against infestation by the stem and bulb eelworm or the pine wood nematode.

At present time, the investigation of the effects of gaseous hydrogen cyanide on the stem and bulb eelworm and pine wood nematode is carried out within the framework of the NAZV project of the Ministry of Agriculture No. QI111B065. This paper presents the first results obtained by testing of gaseous hydrogen cyanide as affected the viability of the free-living model nematode *Caenorhabditis elegans* in a newly designed experimental system.

MATERIAL AND METHODS

An experimental system was designed to test the effect of gaseous hydrogen cyanide on nematodes, making it possible to evaluate the effects of treatment on the mortality and survival of nematodes.

Nematodes

The nematode species *C. elegans* (Fig. 1.) was selected as a model organism for testing the effects of gaseous hydrogen cyanide on nematodes. The species is commonly used in the studies of nematodes for the purpose. In order to obtain a sufficient number of nematodes, *C. elegans* nematodes were grown and reproduced using the procedure of Stiernagle (1999) in vitro on Petri dishes of 60 mm diameter, being fed with *Escherichia coli* (op-50 genotype) bacteria. First, the dishes with substrate were prepared

for nematode cultivation, in which 20 gravid female nematodes were transferred using sterile nematologic needles. The cultures prepared in that way were then incubated for seven days at the temperature of 23°C. Then, the nematodes were separated from the cultures employing the modified Baermann funnel method (Hooper, 1986) lasting four hours. The resulting dispersion of nematodes at various stages of development was placed in embryonal dishes and the larvae of the second and third stages of development were selected under a stereo-microscope and transferred in glass vials filled with physiologic solution. The nematodes prepared in this manner were immediately used for the following experiments.

System for testing the nematocidic activity of gaseous HCN

Sterile cultivation substrate (supplied by Stender) was used as a carrier of nematodes in the model system. On one side, it adequately simulated the natural life conditions of *Caenorhabditis elegans* allowing their problem-free survival, and, on the other side, it served as a suitable material for HCN penetration. The substrate was sterilised in advance in an autoclave at the temperature of 121°C for 25 minutes to eliminate any possible antagonistic organisms or naturally occurring nematodes. The substrate (5 g) was placed on the bottom of a 50 ml vial with a modified lid. Lid modification consisted in its perforation and covering its neck with the Uhelon fabric of 80 µm mesh size allowing free access of HCN to the vial. Nematodes were placed in the prepared substrate by means of a glass capillary and an automatic pipette. As determined, the number of nematodes per vial was within the range of 300 ± 20 individuals.

Fumigation

The fumigation of the prepared vials filled with nematodes was carried out by a specialised facility

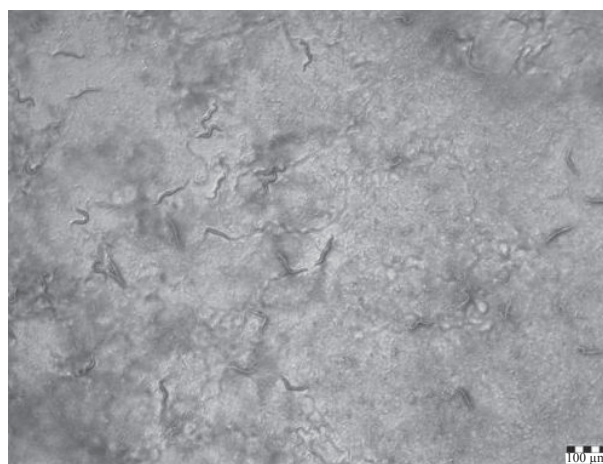


Fig. 1. Nematodes *C. elegans* in culture

(Draslovka Kolín) using a prototype experimental fumigation chamber. The chamber allows the continuous, non-invasive withdrawal of individual samples through an air lock antechamber in preset time intervals. The samples were taken from the fumigation chamber stepwise in the following intervals elapsing from the treatment start: 60, 120, 180, 240, 270, 300, 330, and 360 minutes; 6 parallel samples were taken for each time of exposure. The concentration of gaseous hydrogen cyanide in the chamber was monitored and maintained at the required level of 7 g.m^{-3} (this concentration was chosen according to amount of hydrogen cyanide used for treatment of plant material against insect pests) during the trial. A control (blank) experiment was carried out likewise but the samples were kept outside the chamber for the time of fumigation to see if non-hydrogen cyanide treatment mortality occurs to ensure that false positive results will be not recorded.

Evaluation

After the fumigation, chamber was cleared from the HCN containing atmosphere by ventilation; nematodes from the samples were separated by the modified Baermann method.

The design of vials allows the direct extraction of nematodes, which markedly facilitates the sample handling. It is then only required the container to be filled with distilled water and placed upside down in the Baermann funnel. The mesh size of the fabric covering the vial neck allows the live nematodes to migrate into the funnel, while the dead ones will be kept in the vial. The control variant was evaluated in the same manner.

After 12 hours of extraction the suspension of nematodes was transferred into an embryonal dish and the counts of nematodes in individual samples were determined by stereomicroscope.

The measured data were evaluated by statistical methods using the analysis of variance. In order to detect statistically significant differences among the results of individual fumigation times and the data of untreated control samples the Tukey's HSD test (Statistica Cz 10 software of StatSoft, Inc.) was employed.

RESULTS AND DISCUSSION

Samples taken at any time of fumigation showed statistically significant reduction in the number of nematodes ($p \leq 0.05$) when compared with an untreated control. As soon as after 60 minutes the exposure to HCN resulted in the reduction in the count of live nematodes by about 50%. Mortality of *C. elegans* showed a continuous growth and after 270 minutes of exposure it achieved 100% (Fig. 2). Any compari-

son of our results with published data is, however, very difficult, as there is a lack of information in the literature concerning the effect of hydrogen cyanide gas on nematodes. On the other hand, based on the obtained results we can state that the use of gaseous hydrogen cyanide appears to be a highly effective to cause the high death rate of the model nematode *C. elegans*. The relatively fast effect of the substance seems to be advantageous, taking into account a fact, e.g., that at exposure to Phospine the full (100%) mortality of *C. elegans* was achieved as late as after 24 hours (Zuryn et al., 2008). Gaseous hydrogen cyanide affects at a very low concentration compared to other agents. For instance, the treatment by means of sulfonyl fluoride at the concentration of 60 g.m^{-3} for 48 hours did not result in any reduction in the count of pine wood nematodes (Soma et al., 2001) and the concentration of about 100 g.m^{-3} of sulfuryl fluoride was required to cause 100% mortality of the same species (Dwinnell et al., 2003). It is also interesting to compare the effect of HCN with that of previously employed methyl bromide. To achieve the full (100%) mortality of pine wood nematode in wood blocks the above-mentioned agent should be applied at the concentration of 240 g.m^{-3} (Dwinnell, 1994).

It should be admitted that there are not too many alternative agents that could be used to control phyto-parasitic nematodes in replacement of methyl bromide, whose production and importation have been prohibited only recently. Out of the substances already tested in the protection of wood and other plant materials against insects or fungal diseases a few chemicals can be taken into account, including, e.g., carbon disulfide, carbonyl sulfide, ethyl formate, ethylene oxide, propylene oxide or the mentioned fosfane. The use of those compounds, however, entails numerous risks consisting mostly in the presence of after-treatment harmful residues, hazardous to human health, poor penetration into plant materials or environmental hazards (Banks, 2003). In this respect gaseous hydrogen cyanide seems to be one of the most promising substances. Of course, its application, too, is connected with certain risks stemming particularly from its high acute toxicity.

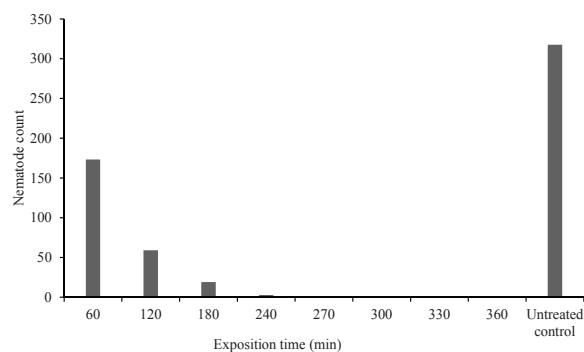


Fig. 2. Effect of the action of gaseous hydrogen cyanide on the *C. elegans*

Nevertheless, in comparison with the above-mentioned chemicals, taking into account its high performance, these risks are acceptable.

CONCLUSION

Within the framework of this research an original experimental system was proposed to test the effects of gaseous hydrogen cyanide on the model nematode of *C. elegans* species. The obtained data indicate the high efficiency of the tested substance, manifested in the high death rates of the model organism, achieved by treating it using relatively low concentrations of hydrogen cyanide in air and short exposure times. In the future the research will be aimed at the investigation of the direct action of gaseous hydrogen cyanide action on phyto-parasitic nematodes. Research activities will be focused particularly on the temperature and relative humidity of process atmosphere and the concentration of hydrogen cyanide to establish the optimum combination of process parameters for reliable elimination of nematodes in seed material, planting stock and wood.

REFERENCES

- ABELLEIRA, A. – PICOAGA, A. – MANSILLA, J.P. – AGUIN, O.: Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in Northwestern Spain. *Plant Disease*, 95, 2011: 776.
- BANKS, H.J.: Alternatives to methyl bromide for durables and timber. In: Proceedings of an International Conference on Alternatives to Methyl Bromide, 2002 Sevilla, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 69–74.
- DWINELL, L.D.: Evaluation of sodium borate for the control of nematodes and wood-borers in pine logs. In: Proceedings of the Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, 1994, 13–16.
- DWINELL, L.D. – THOMS, E. – PRABHAKARAN, S.: Effect of sulfuryl fluoride on the pinewood nematode in pine wood. In: Proceedings of the Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions, 2003, 94.
- HOOPER, D.J.: Extraction of nematodes from plant material. In: SOUTHEY, J.F. (ed.): *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. 6th Edition. LONDON, UK, HMSO, 1986, 51–59.
- MAMIYA, Y.: History of pine wilt disease in Japan. *Journal of Nematology*, 20, 1988: 219–226.
- MOTA, M. – BRAASCH, H. – BRAVO, M.A. – PENAS, A.C. – BURGERMEISTER, W. – METGE, K. – SOUSA, E.: The first report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, 1, 1999: 727–734.
- SOMA, Y. – NAITO, H. – MISUMI, T. – MIZOBUCHI, M. – TSUCHIYA, Y. – MATSUOKA, I. – KAWAKAMI, F. – HIRATA, K. – KOMATSU, H.: Effects of Some Fumigants on Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* Infecting Wooden Packages. 1. Susceptibility of Pine Wood Nematode to Methyl Bromide, Sulfuryl Fluoride and Methyl Isothiocyanate. *Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan*, 37, 2001: 19–26.
- STIERNAGLE, T.: Maintenance of *C. elegans*. In: HOPE, I.A. (ed.): *C. elegans*, a Practical Approach. Oxford, UK, Oxford University Press, 1999, 51–67.
- ZURYN, S. – KUANG, J. – EBERT, P.: Mitochondrial modulation of phosphine toxicity and resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Toxicological sciences*, 120, 2008: 179–186.

Received for publication on April 16, 2012

Accepted for publication on June 15, 2012

MAŇASOVÁ, M. – DOUDA, O. – ZOUHAR, M. – NOVÁKOVÁ, E. – MAZÁKOVÁ, J. – RYŠÁNEK, P. (Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha, Česká republika; Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, Česká republika)

Plynný kyanovodík jako prostředek pro ošetření rostlinného materiálu vůči háďátkům

Scientia Agric. Bohem., 43, 2012, 53–57

V současné době na trhu není dostatek chemických prostředků pro ochranu osiva, sadby a dřeva proti karanténním fytoparazitickým háďátkům druhů háďátka zhoubné (*Ditylenchus dipsaci*) a háďátka borovicové (*Bursaphelenchus xylophilus*). Cílem tohoto výzkumu byl vývoj nového experimentálního systému pro modelové testy účinnosti plynného kyanovodíku (HCN) jako alternativního fumigantu proti fytoparazitickým háďátkům. K pokusům byl použit modelový druh háďátka *Caenorhabditis elegans*. Při koncentraci 7 g.m^{-3} a expozici trvající 270 min. byla zjištěna 100% mortalita modelového druhu háďátka. Dalším cílem výzkumu bude optimalizace teploty a vlhkosti ve fumigační komoře se záměrem nalézt optimální kombinaci těchto parametrů a koncentrace kyanovodíku pro spolehlivou eradikaci fytoparazitických háďátek v osivu, sadbě i dřevu.

plynný kyanovodík; ochrana rostlin; *Caenorhabditis elegans*; modelový organismus

Contact Address:

Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D., Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra ochrany rostlin, Kamýcká 129, Praha 6-Suchbát, Česká republika, tel. +420 224 382 611, e-mail: zouhar@af.czu.cz
