Přírodovědecká fakulta Karlovy univerzity v Praze

Katedra experimentální biologie rostlin

Kultivační systém pro *Malus domestica* k řízené inokulaci patogenem *Venturia inaequalis* a testování ochranných prostředků v laboratorních podmínkách

Iveta Zajícová, Lenka Havelková, Kateřina Schwarzerová

2019

ISBN 978-80-7444-073-1

Název:

Kultivační systém pro *Malus domestica* k řízené inokulaci patogenem *Venturia inaequalis* a testování ochranných prostředků v laboratorních podmínkách

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu podporovaného MZe prostřednictvím Národní agentury zemědělského výzkumu (NAZV) č. QJ1510353 - „Zvýšení efektivity ochrany jabloní proti strupovitosti“ a dále projektu MŠMT na rozvoj výzkumu na Katedře experimentální biologie rostlin PřF UK v rámci Národního programu udržitelnost I č. LO1417 – „Centrum experimentální biologie rostlin UK“. Metodika byla vypracována v rámci diplomové práce autorky (Zajícová, 2016).

Autoři:

Mgr. Iveta Zajícová

vivi.skrdlova@seznam.cz

RNDr. Lenka Havelková, Ph.D.

lenka.havelkova@natur.cuni.cz

RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

katerina.schwarzerova@natur.cuni.cz

Oponent z oboru:

RNDr. Dimitrij Tyč

tyc@ueb.cas.cz

Ústav experimentální botaniky AV ČR v.v.i.

Oponent státní správy:

Ing. Jitka Mašková

jitka.maskova@mze.cz

Ministerstvo zemědělství ČR

Obsah

Kultivační systém pro *Malus domestica* k řízené inokulaci patogenem *Venturia inaequalis* a testování ochranných prostředků v laboratorních podmínkách

Obsah ... 3

1 Úvod ... 5

2 Cíl metodiky ... 5

3 Dedikace ... 5

4 Shrnutí metodiky ... 5

5 Detailní popis metodiky ... 6

5.1 Rostlinný materiál a jeho kultivace ... 6

5.2 Používané laboratorní pomůcky, sklo a chemikálie ... 6

5.3 Přístroje a ostatní vybavení ... 6

5.4 Ochranné pomůcky ... 6

5.5 Příprava médií ... 6

5.6 Kultivační systém jabloní ... 7

5.6.1 Kultivace jabloní *in vitro* ... 7

5.6.2 Kořenění *in vitro* ... 8

5.6.3 Převod rostlin *ex vitro* a kultivace ... 8

5.7 Infekce ... 9

5.7.1 *Venturia* smývání a uchovávání inokula, test klíčivosti ... 9

5.7.2 Inokulace jabloní konidiemi *V. inaequalis* ... 10

5.7.3 Hodnocení infekce ... 11

5.8 Testování ochranných postřiků ... 11

5.8.1 Preventivní ... 11

5.8.2 Kurativní ... 12

6 Popis uplatnění certifikované metodiky ... 12

7 Srovnání novosti postupů 12

8 Ekonomické aspekty 12

9 Seznam použité literatury 13

10 Seznam publikací, které předcházely metodice 13

1 Úvod

Strupovitost jabloní je celosvětově nejrozšířenější a hospodářsky nejzávažnější chorobou jabloní, která znehodnocuje plody jabloní a působí tak velké finanční ztráty. Jejím původcem je houbový patogen *Venturia inaequalis*.

Hlavní metodou obrany proti strupovitosti je používání fungicidů cílených na zastavení choroby. Protože však dochází k vytváření rezistence *V. inaequalis* k účinným látkám fungicidů, je třeba hledat stále nové. Dalším problémem klasických fungicidů je jejich toxicita, proto jsou v současné době intenzivně testovány přírodní a netoxické substance s fungicidním účinkem.

Další metodou obrany proti strupovitosti jsou šlechtitelské programy, zaměřené na křížení citlivých a rezistentních odrůd. I zde však dochází k překonání genů rezistence některými kmeny *V. inaequalis* a je nutné přicházet se stále novými odrůdami.

Testování účinnosti nových ochranných prostředků i resistence nových odrůd je velice časově náročné vzhledem k sezonnímu růstu jabloní i výskytu infekce *V. inaequalis*.

2 Cíl metodiky

Cílem metodiky je umožnit časově, prostorově i finančně nenáročnou kultivaci jabloní, jejich spolehlivou infekci konidiemi patogena a testování preventivních i kurativních postřiků, to vše nezávisle na ročním období i klimatických podmínkách.

3 Dedikace

Tato metodika vznikla za podpory Ministerstva zemědělství České republiky - projekt č. QJ1510353 (Zvýšení efektivity ochrany jabloní proti strupovitosti) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky - projekt NPUI č. LO1417 (Centrum experimentální biologie rostlin UK).

4 Shrnutí metodiky

Rostliny jabloní jsou množeny a zakořeňovány v *in vitro* podmínkách, což umožňuje získání velkého množství geneticky uniformních rostlin v krátkém čase. Po zakořenění jsou převedeny do *ex vitro* podmínek a zasazeny do půdy. Po dosažení velikosti asi 20 cm (5 - 6 listů) jsou rostliny připraveny k infekci patogenem. Infekce *V. inaequalis* je provedena postřikem listů jabloní vodou s obsahem konidií patogena v plastovém boxu se 100% vlhkostí vzduchu při teplotě 18°C. Po infekci jsou rostliny přeneseny do běžné kultivační místnosti, kde jsou dále dopěstovány. Úspěšnost infekce se projeví po 7 - 14 dnech, kdy je tato vyhodnocena. Před infekcí je možné na rostliny aplikovat preventivní postřiky, po infekci kurativní a následně vyhodnotit jejich účinnost.

5 Detailní popis metodiky

5.1 Rostlinný materiál a jeho kultivace

V rámci metodiky jsou používány rostliny jabloní *Malus domestica* L. cv. Idared. Idared je odrůda citlivá k infekci patogenem *Venturia inaequalis*. Kultivace rostlin probíhá v podmínkách *in vitro* na pevném MS médiu (Murashige and Skoog, 1962), za teploty 21-24°C při dlouhodenní fotoperiodě (16 hod světla a 8 hod tmy). Složení média viz tabulka č. 1 a 2.

Rostliny jabloní jsou množeny na MS médiu s obsahem cytokininů (BAP) pomocí apikálních explantátů. Kořenění prýtových explantátů je indukováno na MS médiu s přídavkem auxinu (IBA).

5.2 Používané laboratorní pomůcky, sklo a chemikálie

- Automatické pipety, pinzety, nůžky, alobal, fólie Saran, gáza, rozprašovač 0,5 l, krycí a podložní skla, Bürkerova komůrka
- Kádinky různých velikostí, Erlenmeyerovy baňky - 100 ml, odměrný válec, láhve Duran, 1 l kelímky Sigma - Aldrich, plastové květináče (průměr 10cm), skleněné Petriho misky 15 cm, plastový box s víkem
- Chemikálie pro přípravu kultivačních médií (viz tab. 1 a 2), propařená zemina, Kristalon start

5.3 Přístroje a ostatní vybavení

- Elektromagnetické míchadlo, třepačka, pH metr, autokláv, mikrovlnná trouba, světelný mikroskop, flow box
- Kultivační místnosti s vhodnými podmínkami pro kultivaci rostlin *in vitro* a *ex vitro*

5.4 Ochranné pomůcky

- Laboratorní plášť a rukavice

5.5 Příprava médií

Do kádinky odvážíme odpovídající množství MS solí a ostatních chemikálií dle tabulky 1 a 2. Vše rozpustíme v destilované vodě a z předem připravených zásobních roztoků přidáme vitamíny. Po doplnění vodou na požadovaný objem upravíme pH na hodnotu 5,8 pomocí 1M KOH. Nakonec přidáme agar, médium naplníme do lahví Duran a sterilizujeme v autoklávu. Takto připravená média je možné uchovávat při pokojové teplotě i několik měsíců.

Před samotným použitím média rozehřejeme v mikrovlnné troubě a ve flow boxu rozlijeme po 30 ml do předem připravených sterilních Erlenmeyerových baněk. Do polo vychladlých médií pipetujeme fytohormony dle účelu média, médium s fytohormony promícháme lehkým kroužením baňkou, baňky uzavřeme alobalem a médium necháme ztuhnout.

MS soli	4,300 g
agar	7,000 g
myo-inositol	0,100 g
sacharóza	30,000 g
glycin	0,002 g
thiamin	0,38 µM
pyridoxin	2,96 µM
kyselina nikotinová	4,06 µM
BAP	17,80 µM
pH	5,8 (1 mM KOH)

Tabulka 1 Složení kultivačního média pro M. domestica (1L). MS soli (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, M 5524 , Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); BAP, 6-benzylaminopurin

MS soli	4,300 g
agar	7,000 g
myo-inositol	0,100 g
sacharóza	30,000 g
glycin	0,002 g
thiamin	0,38 µM
pyridoxin	2,96 µM
kyselina nikotinová	4,06 µM
IBA	4,92 µM
pH	5,8

Tabulka 2 Složení média indukujícího kořenění (1L). IBA, kyselina indolyl-3-máselná

5.6 Kultivační systém jabloní

5.6.1 **Kultivace jabloní *in vitro***

5.6.1.1 Používané nástroje a pomůcky

- Kultivační média (s BAP) v Erlenmayerových baňkách, pinzety 20 cm, nůžky, sterilní Petriho misky o průměru cca 15 cm, flow box

5.6.1.2 Postup

Z *in vitro* pěstovaných explantátů jabloní sterilně na Petriho misce odstřihneme vrcholové řízky asi 1-2 cm dlouhé a přeneseme je pinzetou do čerstvého média, kde je spodní částí explantátu

zapíchneme do agarového média. Přenášíme vždy čtyři řízky do každé 100 ml Erlenmayerovy baňky. Baňky uzavřeme alobalem, sterilizovaným v plamenu kahanu. Kultivace probíhá po dobu 4 - 8 týdnů při fotoperiodě 16/8 a teplotě 21°C.

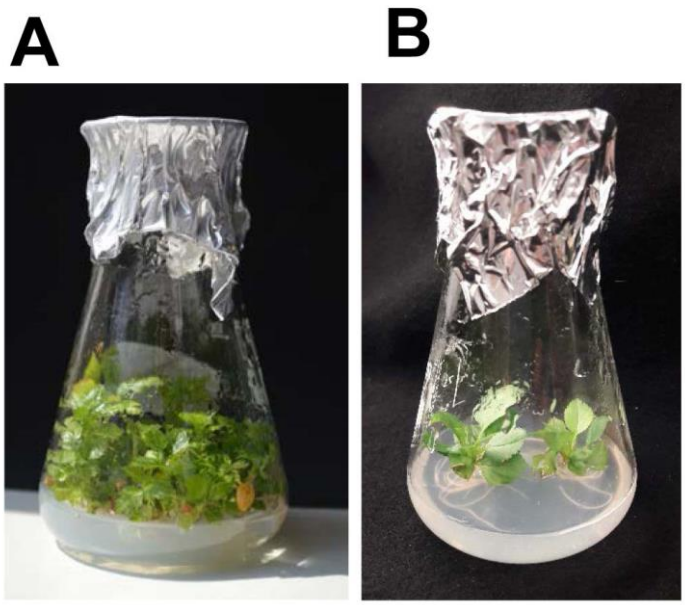
5.6.2 **Kořenění *in vitro***

5.6.2.1 Používané nástroje a další vybavení

• Napěstované explantátové kultury *Malus domestica* (obr. 1 A), kořenící média (s IBA) ve 100 ml Erlenmayerových baňkách, pinzety 20 cm, nůžky, sterilní Petriho miska o průměru cca 15 cm, flow box

5.6.2.2 Postup

Z *in vitro* pěstovaných rostlin jabloní sterilně na Petriho misce odstřihneme vrcholové řízky, asi 1-2 cm dlouhé a přeneseme je do média s IBA, vždy 2 explantáty na baňku a uzavřeme alobalem. Indukce kořenění probíhá po dobu 8 týdnů při fotoperiodě 16/8 a teplotě 21°C.



Obrázek 1 A, Kultivace explantátů jabloně cv. Idared *in vitro.* **B,** Kořenění rostlin jabloně *in vitro.*

5.6.3 **Převod rostlin *ex vitro* a kultivace**

5.6.3.1 Používané nástroje a další vybavení

Zakořeněné rostliny jabloní (obr. 1B), 1 l kelímky, rašelinové válečky Jiffy, pinzety, kádinka, fólie Saran, gáza, květináče, sterilizovaná zemina, hnojivo Kristalon start

5.6.3.2 Postup

Přenos zakořeněných rostlin do podmínek *ex vitro* provádíme nesterilně přesazením rostlin do Jiffy (rašelinové válečky od společnosti Jiffy Products International). Zakořeněné rostliny (obr.1B, 2A) pinzetou vyjmeme z Erlenmayerovy baňky, kořeny zbavíme zbytků média opláchnutím v kádince s vodou a opatrně je vsadíme do předem namočené rašelinové pelety Jiffy (obr 2B). Takto přesazené rostliny kultivujeme při fotoperiodě 16/8 a teplotě 21°C, v plastových 1l kelímcích (Sigma) překrytých fólií udržující 100% vzdušnou vlhkost po dobu 7 dní, poté je fólie nahrazena trojitou vrstvou gázy, dovolující částečnou výměnu plynů, po dobu 7 dní a poté jsou již rostliny kultivovány nepřikryté po dobu 7 dní. Po této době dojde k prorůstání kořenů ven z rašelinových válečků a rostliny přesadíme do květináčů se sterilizovanou půdou (obr. 2C). Rostliny pohnojíme Kristalonem start a nadále je pěstujeme v běžné kultivační místnosti.

Obrázek 2 Převod rostlin jabloní *ex vitro.* **A,** Kořenící rostlina jabloně cv. Idared. **B,** Rostlina v rašelinové peletě Jiffy. **C,** Rostlina v květináči**.**

5.7 Infekce

5.7.1 ***Venturia* - smývání a uchovávání inokula, test klíčivosti**

5.7.1.1 Používané nástroje a další vybavení

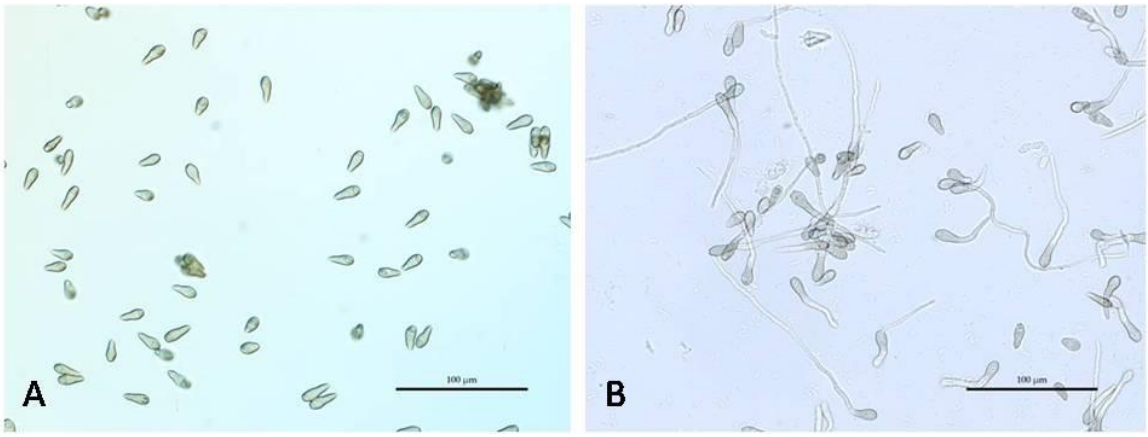
Kádinka 1l, pinzeta, třepačka, uzavíratelné plastové zkumavky 50ml, podložní skla, krycí skla, Bürkerova komůrka, světelný mikroskop

5.7.1.2 Postup

Pro inokulaci používáme konidie patogena *Venturia inaequalis* smyté z napadených listů jabloně. Přednostně je doporučeno využívat napadené jabloně z míst, kde bude testovaná látka využita pro ochranu jabloní z důvodu existence různých ras *Venturia inaequalis* s rozdílnou rezistencí. Konidie

smyjeme tak, že napadené listy jabloně vložíme do kádinky, zalijeme pitnou vodou a ponecháme na třepačce po dobu 30 minut. Rostlinný materiál odfiltrujeme přes cedník, získané inokulum zamrazíme a uchováváme při teplotě -20°C. Další namnožení konidií probíhá na listech citlivé odrůdy Idared, odkud jsou konidie dále smývány a používány k přípravě dalšího inokula. Koncentraci konidií spočítáme v Bürkerově komůrce nebo v přesně odměřeném objemu inokula (např. 10x10 µl) na běžném podložním sklíčku a měla by se pohybovat kolem $5x10^4$ spor na 1 ml.

Při každé inokulaci provedeme *in vitro* test klíčivosti konidií. Na podložní sklíčko naneseme kapku inokula a sklíčko s konidiemi inkubujeme ve vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Konidie pozorujeme ve světelném mikroskopu (Olympus, Provis AX 70) a vypočítáme procento klíčivosti spor, které by mělo pro umělé infekce dosahovat minimálně 25 - 30%.



Obrázek 3 Konidie houbového patogena *V. inaequalis.* **A**, Konidie smyté z listů kultivaru Idared. **B**, Klíčící konidie po 48 hodinách ve stoprocentní vzdušné vlhkosti.

5.7.2 Inokulace jabloní konidiemi *V. inaequalis*

5.7.2.1 Používané nástroje a další vybavení

Plastové boxy s víkem o rozměru 53 x 36 x 28 cm (obr. 4), bavlněné ručníky, rozprašovač 0,5l

5.7.2.2 Postup

Pro inokulaci použijeme rostliny jabloní, čtyři týdny po přenesení do *ex vitro* podmínek. Na každé rostlině označíme druhý nesbalený list (např. proužkem papírové lepící pásky), který je pro infekci nejvnímavější. Rostliny umístíme do plastových boxů s víkem (obr. 4), jejichž dno je pokryto namočenou textilií pro udržení 100% vzdušné vlhkosti, důležité pro úspěšnost infekce. Inokulaci provedeme postřikem inokula na listy rostlin tak, aby jejich svrchní strany byly důkladně navlhčené. Tyto rostliny poté kultivujeme po dobu 48 hodin v uzavřeném boxu, tedy ve vysoké vzdušné vlhkosti (95 – 100 %), při teplotě 18°C.

Po 48 hodinách rostliny vyjmeme z plastových boxů a přeneseme do kultivační místnosti., V následujících čtrnácti dnech dojde k rozvinutí infekce, jejíž úspěšnost zhodnotíme.

Obrázek 4 Plastový box pro inokulaci rostlin jabloně konidiemi *V. inaequalis.*

5.7.3 Hodnocení infekce

Úspěšnost infekce je hodnocena 14 dní po inokulaci dle stupnice v tabulce 3 a to na prvních pěti listech každé rostliny, přičemž první list je list předcházející listu označenému. Závažnost infekce (DS; disease severity) následně vypočítáme dle níže uvedeného vzorce (Townsend and Heuberger 1943).

DS (%) = ∑(nv)/NV x 100

n – stupeň napadení listů
v – počet listů v kategorii
V – celkový počet hodnocených listů
N – nejvyšší dosažený stupeň infekce

Stupeň napadení listů	
0	bez napadení
1	1-2 malé skvrny
2	3-4 malé skvrny nebo 1 velká
3	5 a více malých skvrn nebo 2 velké
4	napadeno více než 4 cm^2 listové plochy

Tabulka 3 Stupnice napadení listů jabloně *V. inaequalis*

5.8 Testování ochranných postřiků

5.8.1 Preventivní

Rostliny jabloní v kultivační místnosti ošetříme prostředkem s preventivním působením proti napadení *Venturia inaequalis,* necháme je oschnout a postřik případně opakujeme, přičemž počet ošetření a jejich interval se liší dle testované látky. Poté rostliny inokulujeme konidiemi *V. inaequalis* a

rozvinutou infekci po čtrnácti dnech zhodnotíme. Kontrolní skupina rostlin je stříkána destilovanou vodou dle stejného schématu.

5.8.2 Kurativní

Rostliny jabloní po inokulaci (48 hodin v plastovém boxu) umístíme do běžné kultivační místnosti a necháme do druhého dne oschnout. Následně je ošetříme testovaným kurativním prostředkem. Doba a počet ošetření se liší dle testované látky. Kontrolní skupinu rostlin stříkáme destilovanou vodou dle stejného schématu. Po čtrnácti dnech zhodnotíme závažnost infekce a porovnáme s kontrolní skupinou

6 Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena jednak pro pracoviště zabývající se teoretickým výzkumem interakce *Malus* x *Venturia*, dále pak pro šlechtitelské programy i pro aplikovaný zemědělský výzkum. Metodika umožňuje studium problematiky i v klimaticky nepříznivých částech roku či v období vegetačního klidu. Vzhledem k tomu, že metodika využívá rostliny Idared s vysokou citlivostí vůči *Venturia inaequalis*, je možno též testovat citlivost různých ras tohoto houbového patogena vůči ochranným látkám bez vlivu genotypu jabloní.

7 Srovnání novosti postupů

Ochranné prostředky proti strupovitosti jabloní jsou obvykle testovány v sadech, kde je limitujícím faktorem počasí a roční doba. Další možností je využití mladých stromů pěstovaných ve sklenících, kde je vliv prostředí (délka dne, teplota, další patogeny) omezen jen částečně. Využívány jsou i semenáčky jabloní kultivované v laboratorních podmínkách, kde však jednotlivé rostliny nejsou geneticky homogenní a výsledek může ovlivňovat různý genotyp rostlin v testované skupině. V laboratorních podmínkách jsou využívány kultivační boxy s kontrolovanou teplotou a vlhkostí, které jsou finančně náročné na pořízení.

Tato metodika přináší inovaci ve formě využití *in vitro* předpěstovaného materiálu, což umožňuje získání libovolně velkého počtu geneticky homogenních testovacích rostlin během 3 – 4 měsíců. K rozvoji infekce pak využívá cenově dostupných plastových boxů umístěných do prostor s vhodnou teplotou.

8 Ekonomické aspekty

Metoda předpokládá zavedenou laboratoř pro práci s kulturami *in vitro* s běžným vybavením a kultivačním zázemím. Pro takto vybavená pracoviště potom nevznikají žádné další náklady.

Plastové boxy s víkem pro inokulaci jabloní stojí přibližně 200 - 500 Kč - dle výrobce a rozměru.

9 Seznam použité literatury

Murashige, T. and Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 1962, 15(3), 473-497.

Townsend, G. R. and Heuberger, J. W.: Methods for estimating losses caused by diseases in fungicides experiments. Plant Disease Reporter. 1943, 27: 340-343.

10 Seznam publikací, které předcházely metodice

Zajícová, I.: Vizualizace buněčných struktur listu *Malus domestica* pro účely studia interakce s patogenem *Venturia inaequalis.* Praha, 2016. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta UK, Katedra experimentální biologie rostlin.

Zajícová, I., Tihlaříková, E., Cifrová, P., Kyjaková, P., Neděla, V., Sechet, J., Havelková, L., Kloutvorová, J. and Schwarzerová, K.: Analysis of apple epidermis in respect to the *Venturia inaequalis* infection. Biologia Plantarum. 2019 (*in press*).