Přírodovědecká fakulta

TQ03000647-V1 (NMetS)

Neinvazivní metoda hodnocení napadení kořenového sytému rostlin háďátkem řepným



Autoři: Alena Kadlecová, Tomáš Jirsa, Martin Hönig, Tadeáš Fryčák, Jan Humplík

Olomouc, 2025

Obsah

1. Cíl metodiky 3
2. Vlastní popis metodiky 4
2.1. Vybavení laboratoře 6
2.2. Materiály 6
2.2.1. Biologický materiál 6
2.2.2. Pomůcky 6
2.4. *In vitro* kultivace háďátka řepného 9
2.4.1. Příprava hořčice bílé 9
2.4.2. Zacházení s háďátky 10
2.5. *In vitro* pěstování řepy cukrové 12
2.5.1. Uchovávání 12
2.5.2. Sterilizace osiva 13
2.5.3. Pěstování semenáčků 13
2.5.4. Infekce 13
2.6. Pořizování obrazového materiálu a obrazová analýza 14
3. Srovnání novosti postupů 18
4. Uplatnění 18
5. Ekonomické aspekty 19

1. Cíl metodiky

Vyvinutá metodika slouží k hodnocení míry napadení kořenů cukrové řepy háďátkem řepným (*Heterodera schachtii*). Pěstování rostlin i parazitů probíhá *in vitro* za sterilních podmínek. Týden staré semenáčky jsou inokulovány 100 ks infekčních larev druhého stadia (J2). Pět týdnů po inokulaci je získán obrazový materiál pomocí kancelářského skeneru. Úroveň napadení je následně automaticky vyhodnocena pomocí kvantitativní obrazové analýzy.

The presented methodology enables quantitative assessment of root infestation in sugar beet (*Beta vulgaris*) by the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*). Both host plants and nematodes are maintained under sterile in vitro conditions. One-week-old seedlings are inoculated with 100 infective second-stage juveniles (J2). Five weeks post-inoculation, high-resolution images of the root systems are obtained using a standard office scanner. The extent of nematode infection is subsequently evaluated through automated quantitative image analysis.

2. Vlastní popis metodiky

Háďátko řepné (*Heterodera schachtii*) patří mezi významné patogeny napadající cukrovou řepu v České republice i v dalších oblastech mírného pásma. Poškozuje kořenový systém rostlin, narušuje příjem vody a živin a způsobuje celkové zpomalení růstu, vadnutí listů a snížení výnosu (obr 1) (Perry & Moens, 2006). Škodlivost háďátka je značná již při relativně nízké populační hustotě – podle údajů z praxe může dojít k významným výnosovým ztrátám při výskytu okolo 50 vajíček/ml půdy. Vyšší infestace mohou způsobit i ztráty přesahující 30 %, přičemž háďátko je schopné přežívat v půdě ve formě cyst i po dobu několika let (Douda et al., 2021).



Obrázek 1: Řepa cukrová nakažená háďátkem řepným (rostliny vpravo značené č. 2). Zdravá kontrolní rostlina pro srovnání je značena č. 1. Převzato z (Fatemy et al., 2017).

V podmínkách České republiky je cukrová řepa dlouhodobě významnou plodinou pěstovanou na přibližně 60 tisících hektarech ročně. S ohledem na její ekonomický význam a zvyšující se environmentální a regulatorní požadavky je nezbytné vyvíjet nové strategie ochrany proti půdním škůdcům, včetně háďátka řepného. Mezi perspektivní přístupy patří jak vývoj nových účinných a zároveň ekologicky šetrných ochranných prostředků, tak i šlechtění odrůd s genetickou rezistencí (Švachula & Pulkrábek, 2020). Rezistentní odrůdy představují dlouhodobě udržitelné řešení, nicméně jejich efektivita se může lišit v závislosti na genetické variabilitě populací háďátka. Podobně i účinnost chemických nebo biologických přípravků závisí na řadě faktorů včetně dávky, aplikačního způsobu a podmínek prostředí. Spolehlivé testování těchto nástrojů je proto klíčové jak pro základní výzkum, tak pro aplikovaný vývoj.

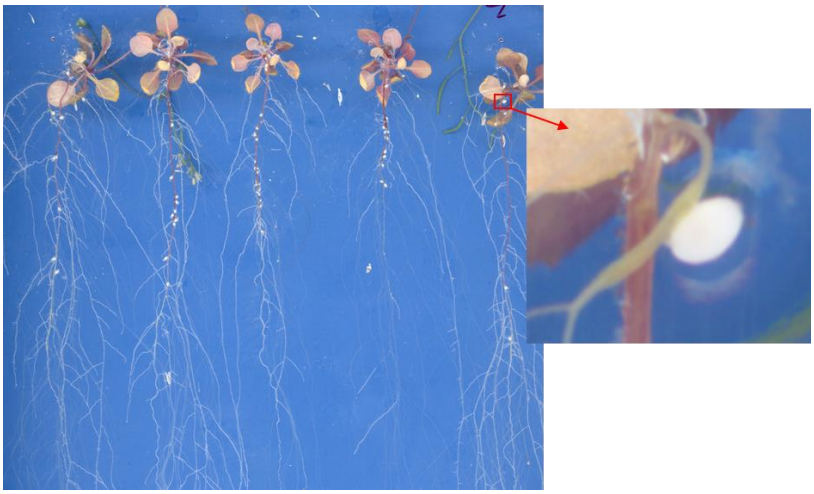
Hodnocení rezistence rostlin vůči háďátku řepnému (*Heterodera schachtii*) a účinnosti ochranných přípravků se v praxi provádí především dvěma základními způsoby: v květináčových pokusech a v polních experimentech. Květináčové pokusy probíhají ve skleníkových nebo růstových komorách, kde jsou rostliny pěstovány v kontrolovaných podmínkách a infikovány přesně definovaným množstvím háďátek (obr 2). Po uplynutí několika měsíců (typicky 3-4) se hodnotí míra napadení rostlin, nejčastěji počtem vytvořených cyst(Smith et al., 2004). Tyto pokusy jsou časově náročné, vyžadují velké množství inokula (často tisíce jedinců na rostlinu) a manipulace s půdou i cystami je pracná.



Obrázek 2: Květináče s mladými rostlinami řepy cukrové, jež byly inokulovány háďátkem řepným. Převzato z (Hussain et al., 2016).

Polní experimenty se provádějí na lokalitách přirozeně zamořených háďátky. Výhodou je hodnocení v reálných podmínkách, nevýhodou však bývá obtížná reprodukovatelnost výsledků, závislost na sezóně a prostorová variabilita napadení v rámci pozemku (Reuther et al., 2017).

V základním výzkumu se často využívají in vitro metody, které umožňují přesné sledování interakcí mezi rostlinou a parazitem v definovaném prostředí. Tyto metody jsou méně náročné na množství inokula, umožňují lepší standardizaci podmínek a rychlejší průběh experimentu. Typicky se však provádějí na modelové, hospodářsky nerelevantní rostlině *Arabidopsis thaliana*, jejíž malé rozměry a transparentní kořeny usnadňují analýzu (obr 3) (Sijmons et al., 1991).



Obrázek 3: Samice háďátka řepného na kořenech *Arabidopsis thaliana* přibližně 4 týdny po infekci.

Využití *in vitro* přístupů pro hospodářsky významné plodiny, jako je cukrovka, je dosud vzácné, a to zejména kvůli technickým výzvám – např. větším rozměrům rostlin či problematické sterilizaci osiva. Cílem našeho projektu proto bylo vyvinout a optimalizovat spolehlivou *in vitro* metodu právě pro cukrovku, která by umožnila efektivní, rychlé a reprodukovatelné hodnocení interakce rostliny s háďátkem řepným. Taková metoda může potenciálně sloužit pro předběžné testování nových ochranných látek, nástroj pro výběr potenciálně rezistentních genotypů v raných fázích šlechtění nebo pro testování rezistence existujících odrůd.

2.1. Vybavení laboratoře

- Stereomikroskop
- Laminární box
- Digestoř
- Vybavení potřebné na pěstování rostlin (fytotron/růstová komora)
- Inkubátor chlazený
- Kancelářský skener, například EPSON Perfection v850
- Počítač
- Standardní drobné laboratorní vybavení (lednice, mrazák, automatické pipety, mini centrifuga, kahan aj.)

2.2. Materiály

2.2.1. Biologický materiál

- Osivo hořčice bílé (*Sinapis alba* cv. Albatros)
- Osivo řepy cukrové (*Beta vulgaris ssp. vulgaris var. altissima*)
- Kultura háďátek *Heterodera schachtii*

2.2.2. Pomůcky

- Na přípravu nálevky
    - Kádinka 250 ml, 60 mm průměr
    - Nálevka, 55 mm průměr
    - silikonová hadička, 8 mm průměr
    - Sítka pro tkáňové kultury, průměr ok 100 µm
    - Kovová svorka
    - Alobal
- Na *in vitro* kultivaci rostlin a háďátek
    - Petriho misky kulaté (15 cm průměr a 10 cm průměr)
    - Petriho misky hranaté, 12 cm průměr
    - Odstředivé zkumavky (50 ml), mikrozkumavky (1,5 ml)
    - Bakteriologické kličky
    - Pipety a pipetovací pomůcky
- Další
    - Hodinářské pinzety
    - Stojany na petriho misky umožňující kultivaci pod úhlem 45 °C (například RINNIG stojany na talíře z IKEA)
    - Rukavice (latex, nitril)
    - Tmavě modrá pěnová guma moosgummi, případně modrý papír
    - Parafilm, případně papírová chirurgická náplast (3M Micropore)
    - Laboratorní sklo a plasty

2.3. Média a roztoky

Pokud není níže specifikováno jinak, na přípravu médií je možno používat chemikálie od libovolného dodavatele, dle zvyklostí dané laboratoře.

2.3.1. Modifikované KNOP médium (na přípravu 1l)

Složení média vychází z (Sijmons et al., 1991). Autoři ve své práci zoptimalizovali podmínky *in vitro* kultivace *Heterodera schachtii*.

- Do lahve o objemu 1l namíchat:
    - 20 g sacharóza
    - 9 g Daishin agar (Duchefa, D1004)
    - 2 ml zásobní roztok 1
    - 2 ml zásobní roztok 2
    - 2 ml zásobní roztok 3
    - 0,4 ml zásobní roztok 4
    - 0,2 ml zásobní roztok 5
- Doplnit destilovanou vodou do 1l
- S pomocí KOH srovnat pH roztoku na 6,4
- Autoklávovat; *od tohoto bodu dále pracovat ve sterilních podmínkách*
- Po zchladnutí média na přibližně 50 °C přidat 1 ml směsi vitaminů (Gamborg B5 vitamin mixture, Duchefa, G0415)
- Médium rozlít na petriho misky (plnit přibližně do ½)

- Příprava zásobního roztoku 1 (1 l):
    - Do lahve o objemu 1l namíchat:
        - 121,32 g KNO_3
        - 19,71 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$
    - Doplnit destilovanou vodou do 1l
    - Autoklávovat pro optimální promíchání, není ale nutné dále s roztokem pracovat sterilně
    - Skladovat v lednici

- Příprava zásobního roztoku 2 (1 l):
    - Do lahve o objemu 1l namíchat:
        - 120 g $Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$
    - Doplnit destilovanou vodou do 1l
    - Autoklávovat pro optimální promíchání, není ale nutné dále s roztokem pracovat sterilně
    - Skladovat v lednici

- Příprava zásobního roztoku 3 (1 l):
    - Do lahve o objemu 1l namíchat:
        - 27,22 g KH_2PO_4
    - Doplnit destilovanou vodou do 1l

    - Autoklávovat pro optimální promíchání, není ale nutné dále s roztokem pracovat sterilně
    - Skladovat v lednici

- Příprava zásobního roztoku 4 (1 l):
    - Do lahve o objemu 1l namíchat:
        - 7,34 g FeNaEDTA
    - Doplnit destilovanou vodou do 1l
    - Autoklávovat pro optimální promíchání, není ale nutné dále s roztokem pracovat sterilně
    - Skladovat v lednici

- Příprava zásobního roztoku 5 (1 l):
    - Do lahve o objemu 1l namíchat:
        - 2,86 g H_3BO_3
        - 1,81 g $MnCl_2$
        - 0,073 g $CuSO_4 \times 5\ H_2O$
        - 0,36 g $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$
        - 0,03 g $CoCl_2 \times 6\ H_2O$
        - 0,052 g H_2MoO_4
        - 2 g NaCl
    - Doplnit destilovanou vodou do 1l
    - Autoklávovat pro optimální promíchání, není ale nutné dále s roztokem pracovat sterilně
    - Skladovat v lednici

- Příprava směsi vitamínů
    - Prášek (Gamborg B5 vitamin mixture, Duchefa, G0415) rozpustit v destilované vodě dle instrukcí na obalu; *od tohoto bodu dále pracovat ve sterilních podmínkách*
    - Směs vysterilizovat přefiltrováním přes 0,2 µm stříkačkový filtr
    - Roztok rozalikvotovat po 1 ml do sterilních mikrozkumavek
    - Skladovat v lednici

2.3.2. Další média

- TSA médium (1 l)
    - Do lahve o objemu 1l namíchat:
        - 15 g casein
        - 5 g pepton
        - 5 g NaCl
        - 15 g agar
    - Autoklávovat; *od tohoto bodu dále pracovat ve sterilních podmínkách*
    - Médium rozlít na petriho misky
    - Skladovat v lednici

- Vodný agar
    - Do lahve o objemu 1 l navážit 10 g agaru
    - Autoklávovat; *od tohoto bodu dále pracovat ve sterilních podmínkách*
    - Médium rozlít na petriho misky
    - Skladovat v lednici

2.3.3. Roztoky

- $ZnCl_2$ 3 mM
- Sterilní destilovaná voda
- Etanol 70 %, etanol 96 %
- NaClO 1,3 %, NaClO 12 %
- Triton X
- H_2O_2 3 %
- HCl 35 %
- KOH 5 mM

2.4. *In vitro* kultivace háďátka řepného

Pokud není řečeno jinak, veškerá práce probíhá v laminárním boxu. Postup kultivace vychází z (Sijmons et al., 1991).

2.4.1. Příprava hořčice bílé

2.4.1.1. Sterilizace semen

- Semena nasypat do 50 ml sterilní centrifugační zkumavky; naplnit zhruba do 1/3.
- Zkumavku naplnit 70 % etanolem a 1 min třepat.
- Slít etanol, zkumavku naplnit 1,3 % NaClO a 5 min třepat.
- Slít NaClO, zkumavku naplnit 96 % etanolem a 1 min třepat.
- Slít etanol, naplnit zkumavku sterilní destilovanou H2O a třepat 2 min. Tento krok opakovat alespoň 3x.
- Slít vodu a s pomocí pipety odstranit co nejvíce tekutiny.
- Do sterilní petriho misky umístit sterilní filtrační papír. Mokrá semena přesypat do misky a nechat kompletně uschnout v boxu.
- Sterilní osivo skladovat v lednici.

2.4.1.2. Pěstování S. alba a infekce

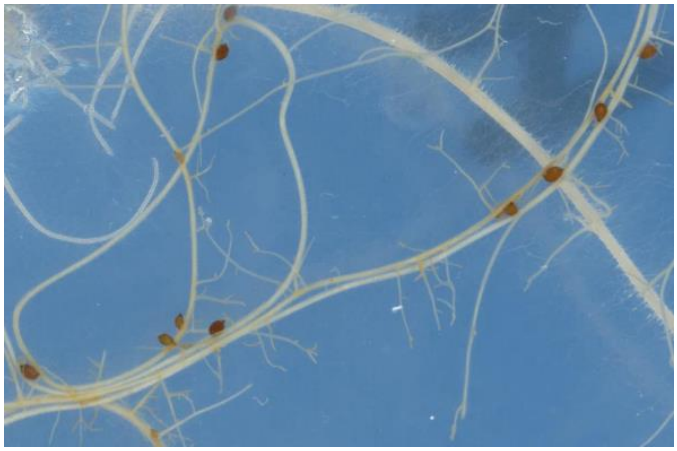
- Sterilní semena nasadit na vodný agar. Doporučení – nasadit o přibližně 25 % semen více, než je třeba.
- Nechat 2 dny klíčit ve tmě (inkubátor 20 °C).
- Zdravé semenáčky transferovat sterilní pinzetou na KNOP agar. Používat 15 cm kulaté petriho misky a sadit 3 rostliny na misku.

- Misky zajistit parafilmem a vrátit do inkubátoru. Rostliny mohou být po celou dobu pěstovány ve tmě a misky by měly být ponechány v horizontální pozici.
- Po 2-3 týdnech budou kořeny rostlin dostatečně narostlé (obr 4). Infikovat 100 háďátky na rostlinu. Nechat uschnout v boxu, zajistit parafilmem, a vrátit zpět do inkubátoru (20 °C).



Obrázek 4: Reprezentativní fotografie kořenů *Sinapis alba* připravených k infekci (2 týdny po nasazení na KNOP medium).

- Misky jsou připravené na izolaci háďátek, až je možno na kořenech pozorovat velké množství tmavých cyst (obr 5). První cysty je možno pozorovat přibližně po 2 měsících, ideální je dle našich zkušeností používat misky přibližně 5-6 měsíců po nákaze. Misky je možno po celou dobu skladovat v pokojové teplotě.



Obrázek 5: Reprezentativní fotografie cyst háďátka řepného na kořenech hořčice seté.

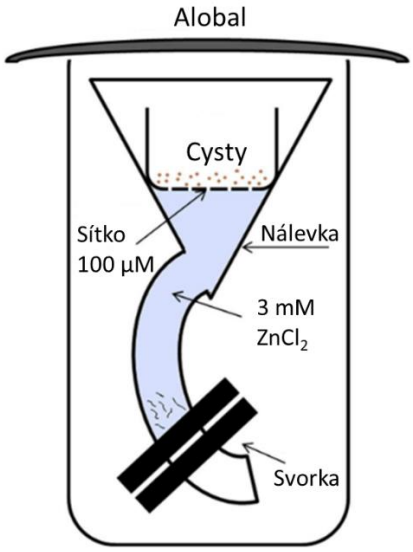
2.4.2. Zacházení s háďátky

Nálevku je možné používat opakovaně, pro získání ideálních výsledků by však měla být používána maximálně 14 dnů od sběru cyst. První odebrání larev může typicky proběhnout 3 dny po sběru cyst; je

vhodné vizuálně kontrolovat velikost pelety. Výtěžek je značně variabilní, typicky je možno očekávat přibližně 3 – 10 tisíc jedinců.

2.4.2.1. Příprava nálevky

- Na skleněný trychtýř navléknout přibližně 10 cm kousek silikonové hadičky a zajistit kovovou svorkou (obr 6).
- Do trychtýře umístit sítko s průměrem ok 100 µM (Poznámka: Je-li k dispozici sterilní sítko, vkládáme je do nálevky až těsně před sběrem cyst.)
- Pro ujištění, že svorka dobře těsní, nálevku naplnit vodou a zkusit tekutinu po kapkách upouštět.
- Sestavenou nálevku umístit do vysoké 250 ml kádinky a zajistit dvěmi vrstvami alobalu.
- Sterilizovat autoklávováním.



Obrázek 6: Schéma nálevky. Převzato od Christiane Matera (MPM protocols for Lab techniques; Molecular Phytomedicine, INRES, Univerzita v Bonnu).

2.4.2.2. Sběr cyst

- Z kádinky opatrně sundat alobal a nechat jej v laminárním boxu pro opětovné použití.
- Sterilní nálevku naplnit 3 mM ZnCl2. Sítko by mělo být napůl ponořeno. Dřívější práce ukázaly, že zinek stimuluje líhnutí *Heterodera* spp. (Steele et al., 1982; Tefft & Bone, 1984).
- Vytvoří-li se dole u spony bublina, jež by bránila by J2 vytvořit peletku, odstranit ji propipetováním případně ťuknutím. Před manipulací se součástmi nálevky je třeba dbát na důslednou sterilizaci rukavic.
- Z kořenů hořčice sesbírat sterilní hodinářskou pinzetou přibližně 300 cyst.
- Kádinku znovu zajistit sterilním alobalem a omotat parafilmem. Nálevku skladovat ve tmě (inkubátor 20 °C).
- Je vhodné připravit vždy alespoň 2 nálevky pro případ kontaminace jedné z nich.

2.4.2.3. Ověření sterility nálevky

- Sterilní bakteriologickou kličku namočit do tekutiny a provést roztěr na petriho misku s neselektivním živným médiem (TSA).
- Misky zajistit parafilmem a uložit v inkubátoru spolu s nálevkou.
- Postup opakovat po každém odběru larev a otevření nálevky.

2.4.2.4. Příprava infekčních larev J2

- Nálevku vytáhnout z kádinky.
- Konec hadičky umístit do sterilní mikrozkumavky, svorku opatrně povolit a nechat odkapat tekutinu s peletou larev.
- Nechat larvy klesnout ke dnu 1,5 ml mikrozkumavky (přibližně 3 minuty, možno urychlit krátkým stočením na mikrocentrifuze). Pipetou odebrat co nejvíce $ZnCl_2$.
- Přidat 1 ml sterilní destilované H_2O.
- Znovu nechat larvy klesnout ke dnu, tekutinu odebrat a nahradit čistou vodou. Postup zopakovat 3× pro důkladné odmytí $ZnCl_2$.
- Tekutinu s larvami důsledně promíchat. Na krycí sklo či petriho misku odebrat 3 kapky po 5 µl.
- S použitím stereomikroskopu spočítat počet larev v každé kapce. Neaktivní, natažené jedince nepočítat. Z průměrné hodnoty s pomocí trojčlenky vypočítat objem tekutiny, jež obsahuje potřebné množství larev (typicky 100 ks). V případě potřeby larvy naředit větším množstvím vody pro snazší nanášení.
- Nadbytečné larvy je možno skladovat ve sterilní vodě v lednici, pro ideální výsledky by však doba skladování neměla překročit 3 dny.

2.4.2.5. Povrchová sterilizace larev

Tento krok není nutný, je-li důsledně dbáno na sterilitu.

- Mikrozkumavku s J2 krátce stočit a pipetou odebrat co největší množství tekutiny.
- Do zkumavky přidat 0,5 ml 0,05% roztoku $HgCl_2$ a inkubovat 2 min za stálého míchání.
- Do zkumavky přidat 1 ml sterilní destilované vody.
- Zkumavku krátce stočit na mikrocentrifuze a odebrat co největší množství tekutiny.
- Přidat 1 ml sterilní destilované H_2O.
- Znovu nechat larvy klesnout ke dnu, tekutinu odebrat (toxický odpad) a nahradit čistou vodou. Postup zopakovat 5× pro důkladné odmytí $HgCl_2$.

2.5. *In vitro* pěstování řepy cukrové

2.5.1. Uchovávání

Osivo před sterilizací uchovávat v tmavém inkubátoru v 15 °C a chránit před vlhkostí uložením do vzduchotěsného sáčku a přidáním silikagelu. Sterilní, důkladně vyschlá semena skladovat ve tmě v lednici.

2.5.2. Sterilizace osiva

- Semena nasypat do 50 ml sterilní centrifugační zkumavky; naplnit zhruba do 1/3.
- Zkumavku naplnit destilovanou H_2O s přídavkem 0,01 % Triton X a inkubovat 5 min.
- Slít tekutinu, zkumavku naplnit 3 % H_2O_2 a 30 min třepat.
- Slít tekutinu, osivo promýt destilovanou H_2O, přesypat na filtrační papír a nechat usušit.
- *Tento krok musí být prováděn v digestoři.* Keramickou podložku exsikátoru překrýt filtračním papírem o patřičném průměru a na něj umístit osivo. Ve spodní části exsikátoru smísit 1,5 ml 35 % HCl a 100 ml 12 % NaClO. Nechat inkubovat do druhého dne. V případě, že je sterilizováno několik šarží osiva najednou, je možno využít namísto filtračního papíru jednorázové čajové pytlíky, aby se zabránilo neúmyslnému smíchání.
- Semena vyjmout z exiskátoru a umístit do sterilní centrifugační zkumavky.
- Zkumavku naplnit 3 % H_2O_2 a 30 min třepat.
- Slít tekutinu a zkumavku naplnit sterilní destilovanou H_2O. Opakovat 5×.
- Slít vodu a s pomocí pipety odstranit co nejvíce tekutiny.
- Do sterilní petriho misky umístit sterilní filtrační papír. Mokrá semena přesypat do misky a nechat kompletně uschnout v boxu.
- Sterilní osivo skladovat v lednici.

2.5.3. Pěstování semenáčků

- Sterilní semena nasadit na petriho misku s KNOP médiem. Doporučení – dle stáří a klíčivosti dané odrůdy sadit zhruba 2 – 4 × více semen, než je třeba.
- Semena rozdistribuovat na více misek pro případ kontaminace.
- Misky umístit do stojanu a pěstovat pod sklonem 45°. Nechat 2 dny klíčit ve tmě (inkubátor 25 °C).
- Zdravé semenáčky transferovat sterilní pinzetou na 15 cm hranaté petriho misky naplněné KNOP médiem. Sadit 3 rostliny na misku. Pro možnost adekvátního srovnání mezi podmínkami/kultivary je třeba dbát na výběr semenáčků přibližně stejné velikosti napříč podmínkami.
- Misky zajistit parafilmem a přesunout do zařízení uzpůsobeného k pěstování rostlin (růstová komora, fytotron aj.) nastaveného na podmínky dlouhého dne (22 °C, 16h světlo). Misky umístit do stojanu a pěstovat pod sklonem 45°.

2.5.4. Infekce

- Infekce probíhá 5 dní po transferu semenáčků, kdy délka hlavního kořene rostliny dosáhne délky přibližně 6-8 cm.
- Podél kořene napipetovat 2-3 kapky suspenze s J2 (připravených viz. 2.4.2.4.). Koncentrace larev a objem kapek by měla být takový, aby celkový počet infekčních larev byl 100 aktivních jedinců na 1 rostlinu.
- Infikované misky ponechat v horizontální pozici, dokud ve veškerá tekutina nevstřebá.
- Misky zajistit parafilmem a uložit zpět do růstové komory.

2.6. Pořizování obrazového materiálu a obrazová analýza

Focení by mělo probíhat 4-6 týdnů po infekci. Po dobu kultivace je vhodné misky pravidelně 1× týdně kontrolovat, v případě potřeby vyměnit poškozený parafilm a zbavovat se misek, na kterých se vyskytla kontaminace.

2.6.1. Pořizování obrazového materiálu

- Misky umístit na skener. Sklo je třeba udržovat čisté.
- V případě, že se v průběhu kultivace na víčku misky vytvořila kondenzace, misky otevřít víčka nechat oschnout v laminárním boxu. Alternativně je možné kondenzaci předcházet využíváním papírové chirurgické náplasti namísto parafilmu, ta však zvyšuje riziko vyschnutí misek v průběhu kultivace.
- Na víčko umístit tmavě modrou pěnovou gumu pro zajištění konzistentního pozadí. Alternativně je možné používat modrý papír, z důvodu delší životnosti a omyvatelnosti je však pěnová guma praktičtější.
- Pro dosažení nejlepších možných výsledků by skenování mělo probíhat v temné místnosti, případně doporučujeme skener přikrýt. (Obrazová analýza však byla optimalizována tak, aby poskytovala spolehlivé výsledky i pokud nasvícení fotografií není optimální.)
- Pořídit barevnou fotografii misky při rozlišení 600 dpi. Je-li používán skener EPSON Perfection v850, doporučujeme pro dosažení nejlepších výsledků nastavit kvalitu skenování na „vysoká“ a doostření „vysoké“ (Obr 4). (Obrazová analýza však byla optimalizována tak, aby poskytovala spolehlivé výsledky i pokud toto nastavení skener neumožňuje.)

2.6.2. Obrazová analýza

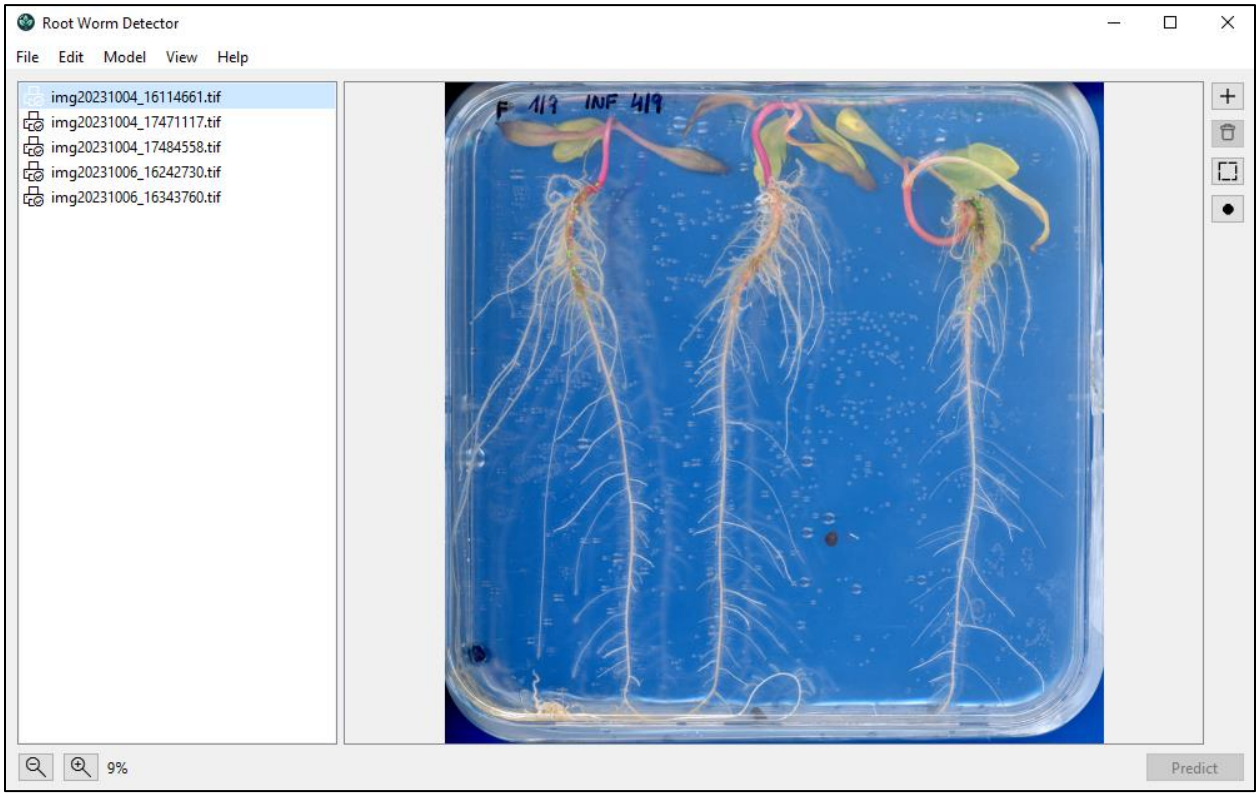
Obrazová analýza je prováděna pomocí specializovaného software Root Worm Detector vyvinutého pro tento účel. Software je založen na neuronové síti zprostředkovávající strojové učení. Z toho plyne, že software je trénován na obrazových datech, které byly nejprve anotovány zkušenými uživateli, kteří v trénovačích sadách snímků označovali jednotlivé objekty zájmu, tedy samice *H. schachtii* v kořenovém systému cukrovky. Tento princip rovněž umožňuje v budoucnu zpřesňování detekce samic pomocí zpětné vazby uživatelů software. Hlavní funkce software jsou:

1) Automatická detekce (predikce) samic háďátek na fotografiích (skenech) kořenového systému semenáčků cukrovky pěstovaných ve sterilních *in vitro* podmínkách.
2) Automatická kvantifikace samic háďátka na každém ze snímků.
3) Vizualizace detekovaných samic s možností manuální korekce uživatelem
4) Export dat v tabulkovém formátu (.csv)

Pro fungování software je potřeba mít v počítači nainstalován programovací jazyk Python verzi 3.11, nebo novější (nikoliv beta verzi). Python je zdarma dostupný na toto odkazu: https://www.python.org/downloads/. Software Root Worm Detector je volně dostupný ke stažení na odkaze: https://github.com/PalackyUniversity/root-worm-detector

Ke stažení software použijte tlačítko „Code“ a dále „Download ZIP“. Po stažení repozitář rozbalte do libovolné složky. Dále je u PC s Windows potřeba ze složky „models“ smazat soubor „v1_best.pt“.

V prohlížeči otevřete adresu: https://github.com/PalackyUniversity/root-worm-detector/blob/main/models/v1_best.pt a pomocí ikony šipky směřující dolů dejte stáhnout soubor s modelem („Download raw file“). Tento potom vložte do složky „models“ v adresáři souboru software („root-worm-detector-main“) ve vašem PC. Dále je třeba otevřít Příkazový řádek, ve kterém se přes příkaz „cd“ přepneme z kořenového adresáře (např: „C:\Users\mojepc>“) do složky se softwarem Root Worm Detector. Zadáme tudíž do příkazového řádku za znaménko > „cd C:\Users\mojepc\...\root-worm-detector“. Poté otevřeme soubor README.md a postupujeme dle pokynů pro „Install dependencies“ a po úspěšném nainstalování potřebných knihoven, dále na „Launching the GUI“. Takto spustíme grafické rozhraní pro samotnou analýzu snímků.



Obrázek 7: Ukázka software.

Přes „File“ a „Import“ vyberte, zda chcete k analýze nahrát jednotlivé snímky („Import Files“), nebo celou složku obsahující snímky („Import Folder“). Snímky lze rovněž nahrát jejich přetažením ze zdrojového adresáře do okna grafického rozhraní. Poté klikněte na tlačítko „Predict“, zelený progress bar ukazuje dobu do dokončení automatické analýzy nahraných snímků. Po dokončení analýzy se na nahraných snímcích zobrazují jednotlivé oblasti identifikované jako zájmové objekty – samice *H. schachtii*. Snímky lze zvětšovat a zmenšovat pomocí symbolů lupy v levém dolním okraji, případně užitím tlačítek + a – na numerické klávesnici počítače. Přiblížený snímek lze posouvat použitím šipek na klávesnici, nebo přidržením a táhnutím pomocí myši. Tímto způsobem lze překontrolovat všechny detekované objekty a v případě špatné detekce, ji lze manuálně opravit. Pomocí nástrojů na boční liště v pravém horním rohu lze nesprávně přiřazené kontury označit a odstranit. Případně lze nedetekované objekty nově označit a přidat do detekce. Označení objektu se provádí pomocí nástroje „Group Select“ (tlačítko čtverce), odstraňování kontur pomocí „Remove Contour“ (tlačítko popelnice), přidání nových kontur pomocí

tlačítka „Add Contour“ (tlačítko plus). Přidávání nových objektů do detekce lze provádět ve dvou módech: v módu využitelném pro analýzu snímků – pouze klikáním na objekty, případně v módu využitelném i pro dotrénování detekčního modelu – tažením myší a obkreslením kontury okolo objektu. Ve všech případech se uživatelem provedené změny automaticky ukládají do JSON souboru, který je softwarem vytvořen ve složce, ze které byly načteny vstupní snímky. Po dokončení analýzy lze veškerá data exportovat ve formě csv. souboru. Ve výstupní tabulce jsou vypsány parametry počtu samic (contour count) a dále parametry popisující plochu jednotlivých objektů a popisné statistiky kontur. Pro hodnocení počtu samic je klíčový parametr „contour count“.

2.7. Doporučení k návrhu a časování experimentů

K experimentům je typicky využíván náchylný kultivar cukrovky, v našem případě byl využíván především Forman (Strube). Jako kontrola je využíván rezistentní kultivar, spolehlivé výsledky poskytuje Eradica.

Upozornění – jednotlivé kultivary, ale i různé šarže stejného kultivaru, mohou mít různou klíčivost a sklony ke kontaminacím. Před začátkem testování doporučujeme provést pilotní experiment, při kterém je 30 ks sterilizovaných semen nasazeno na KNOP médium a počet klíčících semen, vzhled semenáčků a výskyt kontaminace je monitorován každé 2-3 dny po dobu 1 týdne.

Počet rostlin na každou podmínku – minimum 15 ks na 1 biologické opakování (5 misek po 3 ks), ideálně alespoň 18 ks (6 misek po 3 ks). Doporučujeme připravovat 21 ks (7 misek po 3 ks) a mít tak rezervu v případě kontaminace. Experiment by měl být opakován alespoň 3×. Finální analýza by měla být prováděna minimálně z 50 ks rostlin na podmínku.

V případě osiva s dobrou klíčivostí a nízkým sklonem ke kontaminaci doporučujeme na 1 experiment nasadit 60 ks semen na podmínku (3 misky po 20 ks). Pro hůře klíčící osivo připravujeme 80 ks semen na podmínku. Pro osivo s větším sklonem ke kontaminacím distribuujeme semena po menším počtu na více misek (6 misky po 10 ks, případně i 12 misek po 5 ks).

Pro nejefektivnější možné využití biologického materiálu doporučujeme provádět několik experimentů paralelně, umožňuje-li to kapacita pracoviště. Pro doporučené rozvržení jednotlivých úkolů do dní v týdnu viz obr 8.

	Příprava hlístic	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
PO		příprava médií a materiálů			
ÚT		sterilizace osiva			
ST		sterilizace osiva			
ČT					
PÁ		nasazení semen	…využít materiál z exp 1		
SO					
NE					
PO	příprava nálevek (D0)	transfer	nasazení semen		
ÚT				příprava médií a materiálů	
ST				sterilizace osiva	
ČT			transfer	sterilizace osiva	
PÁ	první sběr J2 (D4)	infekce		nasazení semen	…využít materiál z exp 3
SO					
NE					
PO	druhý sběr J2 (D6)	kontrola	infekce	transfer	nasazení semen
ÚT					
ST					
ČT					transfer
PÁ	třetí sběr J2 (D11)			infekce	
SO					
NE					
PO	poslední sběr J2 (D14)	kontrola	kontrola	kontrola	infekce
ÚT	likvidace nálevek				
ST					
ČT					
PÁ					
SO					
NE					
PO		kontrola	kontrola	kontrola	kontrola
ÚT					
ST					
ČT					
PÁ					
SO					
NE					
PO		kontrola	kontrola	kontrola	kontrola
ÚT					
ST					
ČT					
PÁ					
SO					
NE					
PO		kontrola	kontrola	kontrola	kontrola
ÚT					
ST					
ČT					
PÁ		focení			
SO					
NE					
PO		analýza dat a likvidace	focení	kontrola	kontrola
ÚT			analýza dat a likvidace		
ST					
ČT					
PÁ				focení	
SO					
NE					
PO				analýza dat a likvidace	kontrola
ÚT					
ST					
ČT					
PÁ					
SO					
NE					
PO					focení
ÚT					analýza dat a likvidace

Obrázek 8: Doporučené rozvržení úkolů do dní v týdnu.

3. Srovnání novosti postupů

Prezentovaná metodika je univerzální a může najít široké uplatnění – například při hodnocení rezistence nových odrůd, a to jak na Ústředním kontrolním a zkušebním ústavu zemědělském, tak i mezi šlechtiteli a producenty osiv. Dále je vhodná pro předběžné testování účinnosti nových ochranných přípravků nebo pro základní výzkum.

V současnosti se v České republice přímé hodnocení rezistence nových odrůd vůči háďátkům neprovádí. Podobné testy jsou nicméně realizovány například ve francouzské laboratoři GEVES (https://www.geves.fr/en/). Podle informací dostupných na jejích webových stránkách probíhají tyto experimenty v květináčích – rostliny jsou uměle infikovány háďátky, která se nechávají dorůst do stadia cyst. Ty se následně vyplavují a počítají. Tento postup je však ve srovnání s naší metodou výrazně časově, technicky a prostorově náročnější, prodlužuje experiment o týdny až měsíce a vyžaduje také zpravidla desetinásobné množství háďátek na 1 rostlinu.

Náš přístup vychází ze zavedených *in vitro* metod běžně využívaných v základním výzkumu (Sijmons et al., 1991). Tyto metody však téměř výhradně pracují s modelovou rostlinou *Arabidopsis thaliana*. Použití hospodářsky významné plodiny, jako je cukrovka, je podle našeho vědomí unikátní právě pro námi prezentovaný postup. Není překvapivé, že práce s cukrovkou *in vitro* není běžná – jde o velkou rostlinu, což přináší řadu technických komplikací. Naše metoda tímto není významně limitována díky využití mladých semenáčků a možnosti relativně rychlého ukončení experimentu, protože háďátka jsou počítána již ve stádiu samic, nikoli cyst. Další výzvu představuje vysoká náchylnost osiva cukrovky ke kontaminacím, pravděpodobně v důsledku členitého povrchu a tvrdých obalů, které ztěžují důkladnou povrchovou sterilizaci. Náš sterilizační protokol je výsledkem rozsáhlé optimalizace, během níž byly testovány různé postupy – nejen naše standardní, běžně používané pro jiná osiva (Kadlecová et al., 2024), ale také vzácně se vyskytující metody publikované specificky pro cukrovku (Kappel et al., 2022; Toldi et al., 1994) či pro jiná silně kontaminovaná osiva (Barampuram et al., 2014).

Další inovací naší metodiky je způsob vyhodnocování. Obvyklý postup spočívá ve vizuálním počítání samic háďátek na kořenech pomocí stereomikroskopu, což je nejen časově náročné, ale i náchylné k chybám. V literatuře existují pokusy o automatizaci tohoto kroku zaměřené na *Arabidopsis thaliana* (Kranse et al., 2022). K obrazové analýze jsou využívány skripty z ImageJ, které dle autorů fungují velice dobře pro automatizované počítání cyst, jejichž tmavé zbarvení zajišťuje dobrý kontrast. Počítání samic je ale možné pouze po nabarvení média, což s sebou nese riziko ovlivnění rostlin či háďátek barvivem. Není zřejmé, zda by tyto přístupy byly přenositelné na cukrovku. Malé kořeny huseníčku zajišťují lepší viditelnost. Publikovaný postup také obnáší potenciálně technicky komplikované sestavení speciálního hardware. V našem případě lze obrazový materiál pořídit pomocí běžného kancelářského skeneru bez nutnosti jakýchkoliv dalších modifikací, což výrazně usnadňuje zavedení této metody i v méně vybavených laboratořích. Existují také metody, jež si kladou za cíl automatizované počítání cyst na fotografiích vyplavených půdních vzorků (Chen et al., 2019). Tento postup může výrazně usnadnit pracnou analýzu experimentů prováděných v květináčích či na polích, s naší *in vitro* metodou však není kompatibilní.

4. Uplatnění

Prezentovaná metodika je univerzální a může najít široké uplatnění – například při hodnocení rezistence nových odrůd, a to jak na Ústředním kontrolním a zkušebním ústavu zemědělském, tak i mezi šlechtiteli a producenty osiv. Dále je vhodná pro předběžné testování účinnosti nových ochranných přípravků nebo pro základní výzkum.

5. Ekonomické aspekty

Prezentovaná metodika je určená pro zařízení, která mají k dispozici laboratoře a vybavení potřebné pro *in vitro* kultivaci rostlin a také personál trénovaný v těchto technikách. V zařízeních disponujících potřebným zázemím jsou náklady na zavedení metody prakticky nulové. Dále vyžaduje pouze počítač (cena řádově 15 tis. Kč) a kancelářský skener (cena Epson Perfection v850 cca 25 tis. Kč).

Cena chemikálií potřebných na přípravu 1 l médií je přibližně 15 Kč. Cena jednorázových plastových misek (hranaté a kulaté) se pohybuje okolo 10, respektive 25 Kč/ks. Celkové náklady na spotřební zboží potřebné na 1 experiment (40 misek s rostlinami) se pohybují okolo 650 Kč. Tyto informace vychází z aktuálních ceníků distributorů daného zboží. Experimenty probíhají 8 týdnů, realisticky se však časová dotace na provedení 1 experimentu se pohybuje okolo 25 člověkohodin. Při dobrém plánování experimentů (viz obr 8) lze připravené materiály a hlístice využívat pro několik souběžně probíhajících experimentů, čímž se čas potřebný na 1 experiment může zkrátit až o 5 hodin.

Jelikož je prezentovaný přístup unikátní, srovnání s relevantními alternativami není snadné. Metoda by, po rozsáhlejší validaci, mohla sloužit mimo jiné k hodnocení rezistence nových odrůd řepy cukrové. Tyto experimenty jsou prováděny v Geves. Dle ceníku z roku 2023 dostupného na jejich stránkách jsou náklady na panel testů (DHS), jež zahrnuje i biotesty na rezistenci vůči *Heterodera schachtii* (samostatná cena za pouze tento test není uvedena), pro cukrovou řepu 1090 EUR na rok. Testování probíhá dva roky a cena nezahrnuje administrativní poplatek (700 EUR) a daň (20 %). Celkové náklady na tyto testy se tedy mohou blížit 90 000 Kč.

6. Seznam použité literatury

Barampuram, S., Allen, G., & Krasnyanski, S. (2014). Effect of various sterilization procedures on the in vitro germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *118*(1).

Chen, L., Strauch, M., Daub, M., Jansen, M., Luigs, H. G., & Merhof, D. (2019). Instance segmentation of nematode cysts in microscopic images of soil samples. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*.

Douda, O., Maňasová, M., Zouhar, M., Novotný, D., Chochola, J., & Fridrich, P. (2021). Háďátko řepné - biologie a možnosti ochrany. *Agromanuál*, *16*(6), 48–49.

Fatemy, S., Eshaghi, R., Pedram, M., Barooti, S., & Taheri, Z. M. (2017). A molecular phylogenetic study of two species of the genus Heterodera Schmidt, 1871 (Nematoda, Heteroderidae) from Iran. *International Journal of Nematology*, *27*(2), 38–48.

Hussain, M., Zouhar, M., & Rysanek, P. (2016). Comparison between biological and chemical management of sugar beet nematode, Heterodera schachtii. *Pakistan Journal of Zoology*, *49*(1).

Kadlecová, A., Hendrychová, R., Jirsa, T., Čermák, V., Huang, M., Grundler, F. M. W., & Schleker, A. S. S. (2024). Advanced screening methods for assessing motility and hatching in plant-parasitic nematodes. *Plant Methods*, *20*(1).

Kappel, L., Kosa, N., & Gruber, S. (2022). The multilateral efficacy of chitosan and trichoderma on sugar beet. *Journal of Fungi*, *8*(2).

Kranse, O. P., Ko, I., Healey, R., Sonawala, U., Wei, S., Senatori, B., De Batté, F., Zhou, J., & Eves-van den Akker, S. (2022). A low-cost and open-source solution to automate imaging and analysis of cyst nematode infection assays for Arabidopsis thaliana. *Plant Methods*, *18*(1).

Perry, R. N., & Moens, M. (2006). Plant nematology. In *Plant Nematology*.

Reuther, M., Lang, C., & Grundler, F. M. W. (2017). Nematode-tolerant sugar beet varieties - Resistant or susceptible to the beet cyst nematode Heterodera schachtii? *Zuckerindustrie*, *142*(5).

Sijmons, P. C., Grundler, F. M. W., von Mende, N., Burrows, P. R., & Wyss, U. (1991). Arabidopsis thaliana as a new model host for plant-parasitic nematodes. *The Plant Journal*, *1*(2), 245–254.

Smith, H. J., Gray, F. A., & Koch, D. W. (2004). Reproduction of Heterodera schachtii schmidt on resistant mustard, radish, and sugar beet cultivars. *Journal of Nematology*, *36*(2).

Steele, A. E., Toxopeus, H., & Heijbroek, W. (1982). A comparison of the hatching of juveniles from cysts of Heterodera schachtii and H. trifolii. *Journal of Nematology*, *14*(4).

Švachula, V., & Pulkrábek, J. (2020). Budoucnost pěstování cukrové řepy. *Agromanuál*, *2*, 114–116.

Tefft, P. M., & Bone, L. W. (1984). Zinc-mediated hatching of eggs of soybean cyst nematode, Heterodera glycines. *Journal of Chemical Ecology*, *10*(2), 361–372.

Toldi, O., Gyulai, G., Preininger, É., Várallyay, É., Fári, M., & Balázs, E. (1994). Minibeet initiation from derooted sugarbeet (Beta vulgaris L.) seedlings in vitro. *Plant Science*, *97*(2).

7. Seznam publikací, které metodice předcházely

Žádné.

8. Jména oponentů a názvy jejich organizací

Ing. Václav Čermák, Ph.D. - ÚKZÚZ, Odbor diagnostiky škodlivých organismů rostlin Olomouc
Ing. Marek Renčo, Ph.D. - Parazitologický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i.

9. Dedikace

Metodika vznikla za finanční podpory Technologické agentury ČR, program TQ – Program na podporu aplikovaného výzkumu a inovací SIGMA. Je výstupem projektu TQ03000647 s názvem Metodika hodnocení rezistence rostlin vůči napadení háďátkem řepným a pilotní test ochranných technologií v rostlinné výrobě.