

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



Vliv rostlinných esencí na mortalitu hád'átka bramborového

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Eva Křest'anová

Obor studia: Rostlinolékařství

Vedoucí práce: Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv rostlinných esencí na mortalitu hád'átka bramborového" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. dubna 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Miloslavu Zouharovi, Ph.D., mému vedoucímu diplomové práce, za jeho odbornou pomoc a cenné rady při zpracování této práce.

Mé díky patří i paní Ing. Marii Maňasové, Ph.D. a paní Ing. Janě Wenzlové, které mi ochotně pomáhali při zpracování odborné části mé diplomové práce. Poděkování patří i celé mé rodině, která mě po celý čas studia i při psaní diplomové práce podporovala.

Vliv rostlinných esencí na mortalitu háďátka bramborového

Souhrn

Háďátko bramborové patří do skupiny významných škůdců brambor a řadí se mezi karanténní škůdce zapsané na seznamu A2 EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Je široce rozšířeno jak v České republice, tak po celém světě. Patří mezi cystotvorná háďátka a v silně zamořených oblastech může způsobit výrazné ztráty na výnosech brambor.

Cílem této práce bylo nejprve v literární rešerši popsat význam háďátka bramborového, jeho morfologii, životní cyklus a možnosti jeho diagnostiky. V neposlední řadě byly v teoretické části charakterizovány jednotlivé metody ochrany rostlin s přihlédnutím na využití způsobu ochrany, který je založen na rostlinných esencích. Dalším cílem bylo otestovat účinnost vybraných esenciálních olejů proti háďátku bramborovému.

Experimentální část této práce probíhala v řízených podmínkách skleníku, který je certifikován pro práci s karanténními organismy. Byl zde proveden kontejnerový test, kde bylo založeno devět variant (Kontrola, FV/B, FV/A, PA/A, PA/B, TVHŘ/A, TVHŘ/B, TAO/A, TAO/B), z nichž každá měla pět opakování. Celkem bylo použito pět esenciálních olejů s tím, že u jedné varianty byly použity dva esenciální oleje v kombinaci. V praktické části byla provedena také preparace cysty háďátka bramborového z důvodu demonstrace morfologických znaků, které jsou velmi důležité pro jeho správné určení. Dále byla provedena molekulární detekce a determinace háďátka bramborového pomocí PCR.

Z výsledků experimentu je zřejmé, že většina esenciálních olejů měla vliv na mortalitu háďátka bramborového. Dále bylo zjištěno, že každý esenciální olej má jinou účinnost. U některých druhů rostlinných esencí bylo pozorováno, že jejich účinnost je závislá na správně zvolené formulaci.

Klíčová slova: brambory, háďátko bramborové (*Globodera rostochiensis*), ochrana rostlin, rostlinné esence

Effect of essential oils on the mortality of potato cyst nematode

Summary

Globodera rostochiensis belongs to the group of major potato pests listed under the quarantine pests listed by EPPO A2 (European and Mediterranean Plant Protection Organization). It is widespread in the Czech Republic and all over the world. *Globodera rostochiensis* belongs to the cyst nematodes and in heavily infested areas can cause significant potato yield losses.

The aim of this study was to initially describe the importance of the potato cyst nematode, its morphology, life cycle, and the possibilities of its diagnostics. Finally, the theoretical section described the various methods of plant protection, taking into account the use of methods of protection that is based on plant essences. Another objective was to test the effectiveness of selected essential oils against potato cyst nematodes.

The experimental part of the work took place under controlled greenhouse conditions, which is certified to work with quarantine organisms. The container test was conducted in which nine variants (Check FV / B FV / A, PA / A, PA / B TVHR / A TVHR / B TAO / A, TAO / B) were set up. Five repetitions were used in total and in one variant a combination of two essential oils were used.

In the practical part preparation of potato cyst nematode was carried out because of the demonstration of morphological characters which are very important to its proper determination. Furthermore, a molecular detection and determination of potato cyst nematodes using PCR.

From the experiment results, it is clear that the majority of essential oils had an effect on mortality of potato cyst nematodes. It was found that each essential oil has a different effect. For a number of types of herbal essences, it was observed that their effectiveness is dependent on the correct choice of formulation.

Keywords: potatoes, potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*), plant protection, plant essences

OBSAH

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše.....	10
3.1	Taxonomické zařazení	10
3.2	Rozšíření háďátka bramborového v celosvětovém měřítku	10
3.3	Výskyt háďátka bramborového na území ČR.....	11
3.4	Význam a škodlivost.....	12
3.5	Anatomie, morfologie háďátka bramborového.....	12
3.6	Diagnostika háďátka	14
3.7	Životní cyklus	18
3.8	Hostitelské rostliny	20
3.9	Ochrana.....	23
3.10	Esenciální oleje	31
4	Materiály a metody	36
4.1	Kontejnerové testy	36
4.2	Extrakce cyst z půdy	37
4.3	Preparace cysty háďátka bramborového	39
4.4	Izolace DNA z cysty	39
4.5	Molekulární detekce a determinace háďátka bramborového pomocí PCR	41
4.6	Elektroforéza.....	43
4.7	Vyhodnocení výsledků a zpracování literární rešerše	44
5	Výsledky.....	45
5.1	Kontejnerové testy založené ve školním pokusném skleníku	45
5.2	Molekulární detekce a determinace háďátka bramborového pomocí PCR	47
6	Diskuze.....	48
7	Závěr	52
8	Seznam literatury.....	54
8.1	Odborná literatura	54
8.2	Webové stránky	63

9	Seznam příloh.....	65
10	Přílohy.....	67
10.1	Vyhlášky	67
10.2	Tabulky	78
10.3	Obrázky.....	82

1 Úvod

Hád'átka bramborové se řadí mezi významné škůdce brambor. Je široce rozšířené jak v České republice, tak po celém světě. Tento druh hád'átka pochází z Jižní Ameriky, konkrétně z horských oblastí And, podobně jako jeho hostitelská rostlina brambory. Patří mezi cystotvorná hád'átka z rodu *Globodera*. Na silně zamořených porostech může způsobovat snížení výnosů u poloraných odrůd brambor 50 % až 80 %, u pozdních odrůd o 30 %. Napadení porostů je většinou v ohniscích. Při jeho výskytu jsou uplatňována mimořádná karanténní opatření a je zařazeno do EPPO souboru A2 mezi karanténní škůdce světového významu.

V roce 2016 se na našem území brambory pěstovaly na 23 414 ha. Oproti minulému roku se výměra osázených ploch zvýšila o 734 ha. Na našem území jsou brambory považovány za tradiční plodinu, a proto jsou zařazeny do skupiny citlivých komodit ČR.

V případě, že výskyt hád'átka překročí ekonomický práh škodlivosti, musí být zvolena vhodná metoda ochrany rostlin. V současné době je v České republice registrován pouze jeden nematocid Basamid Granulát, jehož použití je ekonomicky velmi neefektivní. Obecně jsou nematocidy velmi toxické a představují riziko kontaminace podzemních vod.

Vzhledem k této skutečnosti se pěstitelé snaží využívat preventivní metody v ochraně brambor, kterými jsou tolerantní a rezistentní odrůdy. V případě hád'átka bramborového mají tyto metody velký význam. Do budoucna může ale dojít k prolomení rezistence popřípadě tolerance některých odrůd. Proto je snaha o vytvoření nových strategií pro regulaci hád'átek obecně. Trendem v zemědělství je v dnešní době využití přírodních látek, hlavně extraktů z aromatických rostlin v ochraně proti škůdcům. V rámci ochrany proti hád'átku bramborovému se využívají např. esenciální oleje získané z rostlin *Artemisia dracunculus*, *Thymus vulgaris*, *Eugenia caryophyllus*, *Pimpinella anisum* a *Foeniculum vulgare*. Tyto přípravky jsou výhodné především proto, že nejsou v porovnání s nematocidy škodlivé pro životní prostředí. Nevýhodou je však rychlé vytěkání z půdy a s tím spojená krátká doba jejich působení na škodlivý organismus.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Esenciální oleje z aromatických rostlin mají vliv na mortalitu hád'átka bramborového. Cílem této diplomové práce bylo otestovat účinnost vybraných esenciálních olejů proti hád'átku bramborovému (*Globodera rostochiensis*).

3 Literární rešerše

3.1 Taxonomické zařazení

Taxonomické zařazení háďátka bramborového bylo provedeno podle webových stránek National Center for Biotechnology Information.

Říše: *Metazoa*

Oddělení: *Ecdysozoa*

Kmen: *Nematoda*

Třída: *Chromadorea*

Řád: *Tylenchida*

Podřád: *Tylenchina*

Nadčeleď: *Tylenchoidea*

Čeleď: *Heteroderidae*

Podčeleď: *Heteroderinae*

Rod: *Globodera*

Druh: *Globodera rostochiensis* Wollenweber,
1923

Zvýšeným výskytem háďátka bramborového se začal zabývat v roce 1913 Zimmerman (1914). Populaci háďátka pozoroval v okolí města Rostock, v Německu. Současně byl zkoumán tento škůdce i ve Skotsku. V roce 1923 ho popsal Wollenweber (1923) a následně ho označil jako *Heterodera schachtii* var. *rostochiensis*. Až od roku 1940 se považuje háďátko bramborové za samostatný druh.

3.2 Rozšíření háďátka bramborového v celosvětovém měřítku

Háďátko bramborové je nebezpečný škůdce brambor pěstovaných v Evropě i v jiných částech světa. Za jeho domovinu je považováno Peru, konkrétně oblast And, kde bylo háďátko rozšířeno na planě rostoucích lilkovitých rostlinách. Z těchto oblastí bylo šířeno do Evropy a dále na východní pobřeží USA, do Indie a Dálného východu (Siddiqi, 2000).

V 16. století se háďátka společně s brambory dostává z jižní Ameriky do Evropy. Nedostatečná informovanost společnosti o tomto škůdci způsobilo jeho pomalé hromadění na území Evropy. K rozšíření háďátka přispěl také hladomor v Irsku v roce 1800, v důsledku něhož se začaly do Evropy dovážet nové kultivary brambor, které byly náchylné k tomuto škůdci (Spears, 1968).

Cannon (1941) ve své publikaci uvádí, že v severní Americe se háďátka bramborové poprvé objevilo v roce 1941 v oblasti Long Island, New York, konkrétně v okrese Nassau Country. K dalšímu výskytu tohoto škůdce došlo v roce 1970 v Mexiku ve státě Guanajuato (Iverson, 1972).

V roce 2006 byly zaznamenány další dvě ohniska, která se nacházejí v kanadském Quebecu (Sun et al., 2007) a na Island Mallorca ve Španělsku zaznamenává další výskyt ve své publikaci Andrés et al. (2006).

3.3 Výskyt háďátka bramborového na území ČR

První výskyt tohoto škůdce byl na území České republiky zaznamenán v roce 1954. Na webových stránkách Eppo Global Database se uvádí, že v roce 1999 je na našem území háďátka přítomno, ale šíří se pouze omezeně. Státní rostlinolékařská správa prováděla v roce 2008 průzkum háďátka bramborového na území ČR celkem v 367 podnicích a nebyly zjištěny žádné nové výskyty (Anonym 1). Populace háďátka bramborového se v České republice nacházejí ve Šluknově a v Kašperských Horách (Vejl et al., 2002).

Potoček a kol. (1991) zkoumali v letech 1983 až 1989 vznik nových patotypů *Globodera rostochiensis* a *Globodera pallida* zhruba na 1200 zamořených pozemcích v České republice. Pouze u osmi populací měli podezření na další patotypy než Ro1. Jedna populace odpovídala patotypu Ro5. Míra výskytu patotypů jiných než Ro1 se odhaduje na 0,3 až 0,4 % ze všech zamořených pozemků. Hamouz (1994) ve své publikaci uvádí, že se na území České republiky nachází přibližně 1000 pozemků zamořených háďátkem.

3.4 Význam a škodlivost

Decker (1969) ve své publikaci označuje háďátka bramborové jako velmi nebezpečného škůdce vyskytujícího se na porostech brambor. V silně zamořených oblastech raných a středně raných odrůd brambor může způsobovat ztráty 50 až 80 %, na pozdních odrůdách jsou škody menší, zhruba 30 %. Existuje vztah mezi počtem škůdce a ztrátou na výnosech brambor. Tento vztah popisuje například ve své publikaci Jones (1966). Uvádí, že je rostlina schopna kompenzovat škody do té doby, dokud není překročena kritická hranice, která se v závislosti na okolních podmínkách pohybuje v rozmezí od 10 a 50 vajíček v jednom gramu půdy. V případě překročení této kritické hranice poté dochází ke snížení výnosů a hospodářským ztrátám. Také uvádí, že další ztráty jsou způsobené karanténním opatřením, které omezuje možnost obchodu.

Tento druh háďátka patří mezi nejznámější a velmi významné karanténní škůdce. Může způsobovat značné škody na výnosech.

Háďátka bramborové napadá kořenový systém brambor. Škodí především larvy a dospělci, které sají na kořenech. Při silném napadení kořeny odumírají. Nad místem, které bylo poškozeno sáním, se vytváří nové vlasové kořeny tzv. mrcasatost (Čepl a kol., 2009). Když nejsou háďátka v půdě přemnožena, tak nedochází ke snížení výnosu, ale rostlina redukuje své kořeny. Mladé rostliny mohou následně trpět nedostatkem vody a živin (Marks & Brodie, 1998).

3.5 Anatomie, morfologie háďátka bramborového

Tělo háďátka je kryto vícevrstevnou kutikulou, která ho chrání, zajišťuje jeho styk s okolním prostředím a má např. funkci exkreční. Tělní dutinu ohraničuje kožněsvalový vak, který je tvořen výše zmíněnou kutikulou, svalstvem a hypodermis (Zouhar a Gaar, 2003).

Zaživací soustava je tvořena ústním otvorem, dutinou ústní, jícnem, středním střevem, zadním střevem a řitním otvorem. Typický pro fytoparazitická háďátka je stylet, který se nachází v ústní dutině, je dutý a má jehlicovitý tvar. Pohybuje se prostřednictvím svalů a slouží háďátkům k získávání potravy (Nickle, 1991).

Na břišní straně se nachází řitní otvor a část těla za ním se nazývá ocas. Dýchání stejně jako funkci cév zajišťuje tělní tekutina a kutikula. Nervový systém je koncentrován do nervového

prstence, ze kterého vycházejí anteriárně i posteriárně nervové provazce. Většinu těla hád'átka vyplňuje střevo společně s pohlavními orgány, které jsou typické pro tento druh, a proto se řadí mezi důležité diagnostické znaky (Decker, 1969).

3.5.1 Cysty

V cystu se přeměňují oplodněné samičky. Takto přeměněná samička může obsahovat až 500 mikroskopických larviček, které po uvolnění z cyst sají na kořenech brambor. Cysty mají kulovitý tvar s typickým krčkem na pólu. Značně odolávají chemikáliím, půdním a klimatickým vlivům, protože jsou na povrchu obaleny sklerotizovanou vrstvou (Čepl a kol., 2009). Průměrná velikost cyst se pohybuje od 0,5 milimetrů do 0,8 milimetrů (Decker, 1969).

Cysty mají nejprve světlou barvu, poté žlutnou a po dozrání jsou zbarveny do tmavě hnědé. Kazda (2014) ve své publikaci uvádí, že jsou cysty v půdě schopné přetrvávat živé až deset let. V důsledku vysokého napadení, v těžkých půdách v suchých létech nebo po pěstování rezistentních odrůd se v půdě mohou objevovat i mikrocysty. Příčiny vzniku nejsou experimentálně prokázány, ale Decker (1969) se domnívá, že vznikají vlivem předčasného dozrávání.

Fenestra cysty je cirkumfenestrálního typu, což znamená, že vulva je kulovitého tvaru, nejčastěji lesklá a anální otvor je na rozdíl od vulvy menší. Vzdálenost mezi nimi je průměrně více než dvojnásobně velká než průměr vulválního okénka. Vulva se nachází na zadním konci cysty, u mladých samiček je nejdříve vřetenovitá, postupem času se rozšiřuje a vzniká kruhový otvor, kolem něhož je okénko (Zouhar a kol., 2002).

Potoček (1992) uvádí, že průměr cysty je 382 μm ($\pm 61 \mu\text{m}$), střední průměr okénka je roven zhruba 18,8 μm a vzdálenost řitního otvoru od okénka je rovna 66,5 \pm 10,3 μm . Dle Marks & Brodie (1998) se nachází mezi vulvou a anusem 12 až 31 kutikulárních linií. V publikaci od Potočka (1992) se uvádí přesnější údaj a to je 21,6 \pm 3,5 kutikulárních linií.

3.5.2 Larvy

Larvy obvykle procházejí čtyřmi vývojovými stádii, z nichž nejvýznamnější je druhé stádium (L2). Dle Potočka (1992) je tělo larvy dlouhé přibližně 468 μm , délka styletu se

pohybuje okolo $21,5 \pm 0,9 \mu\text{m}$ a ocas je dlouhý zhruba $43,9 \mu\text{m} \pm 11,6 \mu\text{m}$. Tvar bazální části styletu je zaoblený a zahnutý dozadu.

3.5.3 Dospělci

Zouhar a Gaar (2003) uvádí, že má háďátko dlouze protáhlé, nečláňované tělo, které je směrem k jeho koncům štíhlejší. Samičky se v průběhu vývoje po oplození, jak už bylo zmíněno, přeměňují v cystu. Jejich stylet je dlouhý přibližně $22,9 \mu\text{m}$, střední průměr vulvy je roven $22,4 \pm 2,8 \mu\text{m}$, vulvální štěrbina je dlouhá přibližně $9,7 \mu\text{m}$ a vzdálenost vulvy od anusu je rovna $60 \pm 10,1 \mu\text{m}$ (Potoček, 1992).

3.6 Diagnostika háďátka

Globodera rostochiensis patří stejně jako *Globodera pallida* do skupiny cystotvorných sedentérních háďátek, které se řadí do rodu *Globodera*. Tyto dva druhy lze odlišit především na základě morfologických znaků (Zouhar a kol., 2002). Dále lze jejich diagnostiku a determinaci provést na úrovni nukleových kyselin nebo prostřednictvím imunochemických metod, konkrétně Elisy. Správné určení druhu škodlivého organismu je následně základem pro účinnou ochranu rostlin (Zouhar a Gaar, 2003). Douda et al. (2014) uvádějí, že velmi důležité je rozlišení těchto dvou druhů háďátek i proto, že neexistuje v dnešní době dostatečné množství odolných odrůd brambor proti *Globodera pallida* na rozdíl od *Globodera rostochiensis*, kdy je většina odrůd brambor odolných a proto nepůsobí tak velké škody v porovnání s *Globodera pallida*. Výběr konkrétní metody závisí na daných okolnostech. Ve standardech EPPO se uvádí, že například při úřední kontrole je vyžadováno rutinní testování pomocí molekulárních metod diagnostiky a naopak při testování dovezených materiálů je na místě identifikace na základě morfologických znaků, kterou provádí zkušený nematolog dle diagnostických postupů EPPO.

3.6.1 Získávání půdních vzorků

Decker (1969) uvádí, že v roce 1961 v tehdejší NDR byla vydána směrnice, podle které muselo být prováděno vzorkování půd, kde byl zaznamenán výskyt háďátek. Na jednom hektaru půdy se odebíralo 200 půdních vzorků ve vzdálenosti 6×8 metrů. Odběr vzorků začínal na podélné straně tři metry od okraje pole a dále ve vzdálenosti osm metrů. Napříč byly odebírány

další vzorky ve vzdálenosti šest metrů. Hloubka penetrace se rovnala pěti centimetrům. Vzorky byly dále uloženy do krabic pro standartní odběry půdy.

Jelikož je ruční odběr vzorků velice pracný, v tehdejší NDR bylo vyvinuto na tuto činnost mechanické zařízení. Bylo složeno z trubky dlouhé přibližně 40 centimetrů a široké 1,5 centimetru, která obsahovala vnitřní a vnější kuželovitý vrták. Tato trubka byla upevněna na vnitřní straně kola. Vyčnívala nad kolo asi 5 až 6 centimetrů a vzorky poté byly přiváděny do sběrné krabice. Stroj vytvořil 450 vpichů na jednom hektaru. Za hodinu byl schopen udělat vpichy na 4 až 5 ti hektarech. Na zmíněném principu pracují i novější zařízení. Je snaha instalovat toto zařízení i za traktor.

Proto, aby byl získán reprezentativní půdní vzorek, je třeba vědět, že pro cystotvorná hád'átka vyskytující se na bramborách je typický ohniskovitý výskyt na pozemku. V rámci ohniska se koncentrace cyst snižuje směrem k jeho okraji. Pozemek musí být pokryt dostatečným množstvím sond, které zajistí co nejmenší chybu při vzorkování. V současné době se nejčastěji využívají dva typy vzorkování půd. Odběr půdních sond a odběr rostlin i s kořeny. Druhou metodou lze určit vývojové stádium hád'átek. Na pozemku však musí být přítomny odrůdy brambor, které jsou náchylné na přítomný patotyp hád'átka. Půdní vzorky se mohou odebírat jak ručně, tak automaticky. V dnešní době jsou vyvinuty i systémy GPS, které umožňují mapování výskytu hád'átek a současně jsou vybaveny i automatickými sběrači vzorků půdy. Největší výhoda těchto systémů spočívá v tom, že může být proveden cílený zásah přímo do ohniska výskytu hád'átek (Zouhar a Gaar, 2003).

V České republice se v dnešní době postupuje při odběru vzorků půdy dle vyhlášky č. 75/2010 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření hád'átka bramborového a hád'átka nažloutlého a o změně vyhlášky č. 332/2004 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření původce rakoviny brambor, hád'átka bramborového a hád'átka nažloutlého, která je blíže popsána v příloze.

3.6.2 Extrakce cyst z půdy

Extrakce cyst z půdy je velmi důležitá pro identifikaci jednotlivých druhů cystotvorných hád'átek. Pro oddělení cyst od půdních částic se využívají různé postupy, které jsou však

nejčastěji založeny na principu flotace. Decker (1969) uvádí, že nejprve jsou vzorky půdy vysušeny buď při teplotě 35 až 40 stupňů v sušárně nebo jsou ponechány na vzduchu po delší dobu. Dle EPPO standardu PM 7/40 (3) existují různé způsoby extrakce cyst z odebraných půdních vzorků, které fungují na principu flotace, jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole.

Decker (1969) ve své publikaci dále uvádí několik metod extrakce, jako jsou například nálevková metoda dle Kirchnera, Fenwickova konev, Oostenbrinkova metoda, Wilkeho metoda nebo proužková metoda. V České republice se k extrakci cyst využívá flotační metoda s použitím Fenwickovy konve, jak uvádí ve své publikaci Zouhar a Gaar (2003).

3.6.3 Detekce a determinace

Hád'átka bramborové stejně jako další druhy hád'átek nezpůsobují specifické příznaky poškození rostlin. Zpočátku vykazují rostliny menší vzrůst v porovnání se zdravými, to však nemusí být způsobeno hád'átkem, ale jiným škodlivým činitelem. Později se mohou objevovat chlorózy na listech a rostliny chřadnou. Poškození rostlin se nejčastěji pozná až po sklizni, kdy jsou zaznamenány ztráty na výnosech a hlízy menší velikosti než obvykle. Nejpřesněji je zjištěn jeho výskyt a stupeň napadení pozemku pomocí rozboru půdy. Mohou se odebírat i rostliny, které vykazují příznaky napadení tímto škůdcem. Následně je provedena detekce na základě morfologických nebo molekulárních metod, které jsou popsány ve standardech EPPO.

3.6.4 Metoda využívající k diagnostice světelnou mikroskopii

V rámci této metody se postupuje podle určovacích klíčů. Mezi základní rozlišovací znaky se řadí tvar cyst, zbarvení cyst během vývoje, struktura povrchu a jejich morfometrické znaky. Dalším znakem je vzhled larev a dospělců. Významnými znaky, kterými se od sebe rozlišují cysty, jsou barva, počet zvrásněných linií, vzdálenost análního otvoru od okénka, střední průměr okénka a jejich průměr. Larvy se od sebe odlišují ve druhém stupni vývoje a porovnává se u nich zejména délka těla, délka ocasu, délka styletu a tvar jeho bazální části. Hád'átka lze rozlišit i na úrovni dospělé, konkrétně samičky. V tomto případě jsou nejdůležitějšími znaky délka styletu, střední průměr vulvy, délka vulvální štěrbin a vzdálenost vulvy od anusu (Zouhar a kol., 2002).

Velmi důležitá je správná diagnostika znaků zejména u karanténních druhů hád'átek jako jsou *Globodera rostochiensis* a *Globodera pallida*, u kterých je nutné stanovit vnitřní nebo vnější

karanténu. Podrobnější morfologické a morfometrické rozdíly těchto dvou druhů háďátek jsou uvedeny v příloze na obrázku č. 1 až 5 a v tabulce č. 1.

Diagnostiku na základě morfologických znaků provedl například Douda et al. (2014), kdy byly pod světelným mikroskopem zkoumány cysty a larvy druhého vývojového stádia háďátka. Hlavním diagnostickým znakem cyst byla fenestrální část cysty, kde se zjišťovala například vzdálenost anusu od vulvy, průměr okénka nebo počet zvrásněných linií. Hlavními diagnostickými znaky pro larvy druhého vývojového stádia byly délka jejich těla a ocasu.

3.6.5 Diagnostika na úrovni nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jsou složeny z mnoha stavebních jednotek, kterým se říká nukleotidy. Díky nim je zajištěn přenos dědičné informace a jejich nejdůležitější vlastností je replikace (Anonym 2). Pro diagnostické účely se využívají především proto, že se snadno replikují a jsou stabilní (Krčmář a Břicháček, 1993).

Ještě před tím, než můžeme nukleové kyseliny použít pro diagnostiku je nutná jejich izolace z přirozeného materiálu v neporušeném stavu, v dostatečném množství a odpovídající čistotě. Toho je docíleno porušením buněk, popřípadě jejich kompartmentů, nejčastěji v pufru obsahujícím chelatační činidlo. To zabrání degradaci nukleových kyselin vlivem působení nukleáz (Rosypal, 2000).

Pro následnou studii struktury nukleových kyselin jsou využívány metody Elektroforéza, PCR (Polymerázová řetězová reakce), multiplex PCR, RAPD a RFLP. Elektroforéza je metoda, která umožňuje vizuální znázornění replikovaných řetězců nukleové kyseliny. Funguje na principu stejnosměrného elektrického pole, kdy se nukleová kyselina pohybuje směrem ke kladnému náboji. Pohybuje se v agarózovém gelu a průběh celé elektroforézy lze sledovat díky barvivu, které se váže na nukleovou kyselinu. Jako barvivo se používá ethidium bromid nebo Syber green.

Metoda PCR je založena na opakující se enzymové syntéze nových řetězců konkrétní dvouřetězcové DNA. K syntéze dochází v tom okamžiku, kdy jsou připojeny dva primery, které se váží na protilehlé řetězce DNA. Pro syntézu DNA se používají termostabilní polymerázy, nejčastěji se jedná o Taq DNA polymerázu. Celý proces syntézy DNA se odehrává v tak zvaném

PCR termocyklieru a je opakován třicet a vícekrát. Při každém opakování probíhají tři fáze a to: denaturace templátové DNA, připojení primerů a polymerizační reakce. Multiplex PCR je citlivější a v některých případech i praktičtější metoda PCR, kdy je do reakční směsi připojeno několik primerů. Jeden z nich je většinou univerzální a ostatní specifické pro určitý organismus. Touto metodou jsou identifikovány zejména taxonomicky blízcí jedinci. Je vhodná například pro rozlišení *Globodera pallida* a *Globodera rostochiensis* (Zouhar a Gaar, 2003).

RAPD je metoda náhodné amplifikace polymorfie DNA. K amplifikaci jsou využívány náhodné primery o délce 8 až 10 bází, které nasedají náhodně, avšak komplementárně na cílovou DNA.

RFLP je metoda využívající restriční endonukleázu. Tato endonukleáza rozpozná sekvenci nukleotidů tzv. palindromatickou strukturu, kterou následně rozštěpí. Toto místo se také nazývá restriční místo (Zouhar a Gaar, 2003).

Dle EPPO standardu PM 7/40 (3) se doporučuje použít pro identifikaci izolovaných cyst následující metody PCR: multiplex PCR s použitím primeru na základě ribozomální sekvence 18 S a ITS 1 sekvence podle autorů Bulman & Marshall (1997), ITS- RFLP PCR testy Fleminga et al. (2000) nebo Thiéra & Mugniéra (1996) založené na primerech popsaných dle Vrain et al. (1992). Dále se také doporučuje metoda real- time SYBR- green, která je komerčně dostupná.

Douda et al. (2014) izolovali DNA ze suspenze embryonů hád'átek a dále získanou DNA podrobili amplifikaci za použití multiplexní PCR (Zouhar et al., 2010). Touto metodou lze rozlišit *Globodera pallida* a *Globodera rostochiensis* i když se nacházejí ve stejné zkumavce, protože jsou použity dva specifické primery pro jednotlivý druh hád'átka a jeden univerzální. Pro tuto metodu je velmi důležitá ribozomální DNA, na základě které se tyto dva druhy rozpoznají.

3.7 Životní cyklus

Životní cyklus hád'átka bramborového probíhá v několika stádiích. První je vajíčko, z vajíčka se vyvíjí v průběhu čtyř stádií larva a z ní se poté stává dospělec (Zouhar a Gaar, 2003).

Larvy se začínají líhnout pouze tehdy, jsou-li v půdě přítomny kořenové difuzáty rostlin z čeledi *Solanaceae*. Proces líhnutí je zahájen změnou struktury lipidů lipoproteinové membrány

vaječného obalu, kterou způsobují vápenaté ionty obsažené v difuzátech kořenů. Larva je poté schopna přijímat vodu. Nejpozději za jeden den po působení difuzátů dochází ke změně propustnosti vaječného obalu. Tyto látky jsou také schopny stimulovat pohyb larev

Nejprve je larvou proražena pokožka vaječné schránky v oblasti hemisféry a dochází tak k přísunu vody, která následně způsobuje hydrataci larev druhého vývojového stupně. Tyto larvy následně aktivně hledají kořeny hostitelských rostlin, napadají je a zaujímají v nich specifickou polohu. Jsou nehybné a ve směru centrálního válce kořenového vlásku. Ibrahim a Haydock (1999) uvádí, že v důsledku napadení rostlina tvoří buňky velkých rozměrů tzv. syncytia, která jsou zdrojem jejich výživy.

Larvy, které mají dostatek výživy a optimální podmínky se při svlékání diferencují na samičky a ostatní poté na samečky. Dospělé samičky přibližně po třech týdnech od napadení kořenů začínají pronikat zadní částí ven z kořenů a dochází ke kopulaci se samečkou. Samečci už dříve kořeny opustili. Samičky po oplození stále zůstávají přichyceny hlavovou částí v kořínku a následně po dozrání vajíček ukončují svůj vývoj tak, že se přemění v kulovité cysty. Robinson et al. (1987) uvádí, že hád'átka bramborové má v České republice jednu generaci do roka, ale za příznivých podmínek může mít i více generací.

3.7.1 Faktory ovlivňující životní cyklus

Vývoj hád'átka je velmi závislý na vnějších podmínkách, zejména na teplotě. Optimální teplota pro líhnutí larev je 15 až 16 °C. Spodní hranice pro vývoj je 11 °C a horní hranice se pohybuje v rozmezí 30 až 38 °C (Decker, 1969). Dle Robinsona et al. (1987) je pro vývoj larev velmi příznivá vlhkost půdy 72 %. Pozitivní vliv na přítomnost hád'átka bramborového mají i chemické a fyzikální vlastnosti půdy. Více se hád'átka vyskytuje na lehkých písčitéch půdách na rozdíl od těžkých. Tuto skutečnost prokázal i Reinmuth (1929), když do původně těžké půdy přidal 28,6 % písku a poté zaznamenal zvýšení počtu cyst až o 80 %.

3.7.2 Způsob rozšiřování

Kazda (2014) uvádí, že nejčastěji se hád'átka bramborové přenáší sadbou, kdy jsou cysty přichyceny většinou na hlízách v úžlabí oček. Dalším velmi častým způsobem šíření je společně s půdou, která zůstává na zemědělských strojích. Méně častý způsob je přenos prostřednictvím

větrné nebo vodní eroze. Standardy EPPO uvádí, že háďátka bramborové, konkrétně 2. infekční vývojové stádium larvy, je schopno pohybovat se v půdě na vzdálenost maximálně cca 1 metr. Nejčastější šíření je tak způsobeno tzv. pasivní dopravou. Hlavní zdroje šíření jak uvádí EPPO jsou sadbové brambory a kontaminovaná zemina, která se již zmíněnou pasivní dopravou šíří do nezamořených oblastí.

3.8 Hostitelské rostliny

Larvy háďátka mohou pronikat do kořenů různých druhů rostlin, jejich vývoj byl však prokázán jen u rostlin z čeledě lilkovitých (Zouhar a Gaar, 2003). Decker (1969) uvádí, že hostitelský okruh rostlin u háďátka bramborového je omezen. Nejvýznamnějšími hostitelskými plodinami podle něho jsou brambory (*Solanum tuberosum*) a rajčata (*Solanum lycopersicum*). Z plevelných rostlin do této skupiny řadí například lilek potměchut' (*Solanum dulcamara*), lilek černý (*Solanum nigrum*) a méně významný blín černý (*Hyoscyamus niger*). Dříve byl považován za hostitelskou rostlinu i hledík větší (*Antirrhinum majus*), což se později vyvrátilo.

3.8.1 Brambory (*Solanum tuberosum* L.)

3.8.1.1 Historie pěstování

Brambory jsou podobně jako kukuřice nebo tabák rostliny „Nového světa“. Nestaly se však tak brzo oblíbenou a známou plodinou jako byla již zmíněna kukuřice a tabák. Bylo to nejspíše proto, že jejich konzumní části, hlízy, se vytvářely pod zemí, a proto u obyvatel Evropy budily odpor.

Za původní oblast výskytu je považována západní část Jižní Ameriky. Konkrétně byly soustředěny na území dnešní Kolumbie, Peru, Bolívie až po střední Chile. Na tomto území se v průběhu let vyvinuly dva základní botanické druhy a to *Solanum andigenum* a *Solanum tuberosum*, který vznikl později v Chile vlivem působení nových podmínek. Brambory začali pěstovat již Inkové v dnešním Peru a sloužily jim jako hlavní zdroj potravy. Dobyvatelé ze Španělska se s rostlinou bramboru setkali pravděpodobně v šedesátých letech 16. století na území dnešního Peru, když dobyli stát Inků a následně je dovezly přes Atlantický oceán do Evropy.

První popis brambor byl zaznamenán v latinském botanickém díle *Rariorum plantarum historia* od Clusia, který v něm pojmenoval brambory *Papas Peruanorum*. Pěstoval je také jako vzácnou rostlinu ve vídeňských botanických zahradách. Přes Švýcarsko se dostaly brambory z Itálie do Francie a později do Německa. V roce 1596 pojmenoval rostlinu bramboru Kaspar Bauhin v botanickém díle *Phytopinax* latinským názvem *Solanum tuberosum esculentum*. Bauhin později spolupracoval při tehdy nejobsáhlejšímu popisu rostliny a jejího užitku v herbáři Jakuba Teodora Tabernaemontana z roku 1625.

Do České republiky se brambory pravděpodobně dostaly v 17. století. V roce 1632 je dostal darem jihočeský velmož Vilém Slavata z Chlumu patrně od františkánů, kteří si rostlinu přivezli z alpských cest, což znamená, že se k nám brambory dostaly pravděpodobně z Rakouska. Jiné tradice říkají, že brambory se v našich zemích začaly používat za třicetileté války, kdy je zaslal holandský důstojník českému šlechtici. Postupem času v Čechách rostlina zdomácňuje v klášterních, šlechtitelských i městských zahradách. V 18. století se začíná rozšiřovat polní pěstování brambor na Klatovsku, Chebsku a např. na Žatecku i Litoměřicku. V roce 1771 až 1773 přišla na území Čech velká neúroda obilí vlivem vytrvalých dešťů, která způsobila hladomor, a následkem toho se pěstování brambor rozšířilo na celé území ČR. V 19. století se staly brambory kulturním majetkem lidu a staly se také významnou složkou krmiva a průmyslovou surovinou (Kutnar, 2005).

3.8.1.2 Nároky na stanoviště

Brambory se mohou pěstovat ve všech výrobních oblastech České republiky. Typické jsou pro ně však bramborářské oblasti, kde jsou nejčastěji lehčí až středně těžké půdy, dobře propustné, slabě kyselé a pravidelně hnojené organickými hnojivy. Nevhodné jsou pro ně půdy hlinitojílovité až jílovité, zamokřené či příliš lehké. Bramborám také nevyhovují silně kamenité pozemky a svažité pozemky nad 8°. Nejvyšších výnosů brambor bez závlahy je v ČR dosahováno v nadmořské výšce 450 až 550 m, oproti tomu nejstabilnějších výnosů se dosahuje v oblastech s ročním úhrnem srážek 650 až 800 mm (Hamouz, 1994).

3.8.1.3 Morfologická charakteristika

Brambory se řadí do čeledi lilkovité (*Solanaceae*). Jsou to víceleté rostliny, které však v České republice nepřezimují a proto jsou vegetativně množeny každý rok. Tvoří hlízy, které

vznikají za příznivých podmínek tloušťnutím podzemních stonků, tzv. stolonů. Jsou velmi významné pro výživu člověka, jelikož obsahují bílkoviny, škrob, antioxidanty, vitamíny a minerální látky.

Nadzemní část rostliny bramboru je tvořena lodyhou a listy, které mají charakter trsu. Listy bramboru jsou přetřhaně lichozpeřené a jejich středem vede vřeten. Obvykle mají jeden až tři jařma. V úžlabí lístků vyrůstají úžlabní mezilístky, které jsou ochmýřené. Květní stopka vyrůstá na vrcholu lodyhy nebo z paždí posledního či bočního listu. Květenství se nazývá dvojvijan a jednotlivé květy jsou bílé s pruhy od základů korunních lístků nebo bílé ve středu koruny s hvězdou. Barva je z velké části ovlivněna vnějším prostředím. I přesto, že je barva ovlivněna vnějším prostředím se považuje za nejstálější znak u rostlin bramboru. Plodem je dvojpouzdrá bobule, která má oválný či kulatý tvar. Uvnitř jsou bílá semena, která mají vejčité tvar, a jejich velikost se pohybuje od jednoho do dvou mm (Vokál s kol., 2013).

3.8.2 Rajčata (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw.)

Tento druh zeleniny patří do čeledi lilkovité (*Solanaceae*). Patří mezi nejoblíbenější zeleninu u nás i ve světě. Významné jsou obzvláště nutriční látky, jako jsou např. antioxidanty.

Je to jednoletá rostlina s bohatým kořenovým systémem. Stonek je na začátku růstu rostliny nejprve bylinný a během vývoje postupně dřevnatí. Je pokryt žláznatými chloupky vylučující látku, která na vzduchu tuhne a má specifický zápach. Listy obsahují specifickou látku tomatin a tomatidin, které mají antibakteriální účinky. Květenstvím je vijan složený nebo jednoduchý. Jednotlivé květy jsou pětičetné a mají žlutou barvu. Plodem rajčete jsou dužnaté bobule.

Rajčata jsou teplomilné rostliny. Nejvhodnější jsou pro ně záhřevné, humózní a hlinitopísčité až písčitohlinité půdy. Nevhodné jsou naopak zamokřené těžké nebo příliš lehké půdy. Mají vysoké nároky na vláhu (Petříková a kol., 2012).

3.8.3 Lilkovité plevely a lilek jedlý (*Solanum melongena* L.)

Mezi hostitelské rostliny háďátka bramborového, které patří do skupiny plevelných rostlin, patří lilek černý nebo méně významný blín černý. Oba tyto druhy se jako výše zmíněné rostliny řadí do čeledi lilkovité.

Lilek černý je významný plevel v České republice škodící především v širokořádkových plodinách jako je například cukrovka, kukuřice a brambory. Mikulka (2014) ještě uvádí, že se vyskytuje i na nezemědělské půdě například na rumišťích, zahradách a okrajích cest. Je škodlivý hlavně na půdách, které jsou bohaté na živiny a vláhu. Je to hostitelská rostlina nejen pro škůdce, ale i pro choroby (Jursík a kol. 2011).

Blín černý je málo významný plevel. V současné době se ale začíná více objevovat na nezemědělské půdě a proto stoupá riziko zavlečení tohoto plevele i na zemědělskou půdu. Tato rostlina je jedovatá stejně jako lilek černý. Roste především v teplejších oblastech v nížinách, objevuje se i v pahorkatinách tam, kde jsou hluboké, výživné půdy (Mikulka, 2014).

Lilek jedlý se v Evropě pěstuje od 14. století jako jednoletá zelenina. Tato zelenina hluboko koření. Je velmi náročná na teplo, proto se pěstuje v teplých oblastech, které jsou chráněny před větry. Vyhovují jí humózní vlhké půdy (Petříková, 2012).

3.9 Ochrana

Decker (1969) uvádí, že ekonomicky významné škody mohou způsobovat karanténní i nekaranténní škůdci, zejména když nejsou aplikovány správné metody ochrany. Fytoparazitická hád'átka jsou z hlediska ochrany velmi problematická, protože přežívají po dlouhou dobu v půdě a negativně ovlivňují kvalitu i výnos plodin. Dle Douady a kol. (2011) patří do skupiny nejvýznamnějších hád'átek druhy vytvářející cysty, jako je například hád'átka bramborové a hád'átka nažloutlé. V současné době není hád'átka bramborové příliš rozšířeno na území ČR, ale je důležité provádět ochranu dodnes nezamořených oblastí či pozemků, aby nedocházelo k jeho dalšímu rozšiřování (Hamouz, 1994).

Ochrana proti fytoparazitickým hád'átkům je ztížena také proto, že není možné přesně lokalizovat jejich výskyt v půdě. Obecně lze však říct, že se většina jedinců v půdě vyskytuje zhruba v hloubce 25 cm. Tato skutečnost je důležitá z hlediska použití chemických látek a jejich zapravení do půdy (Douda a kol., 2011).

3.9.1 Preventivní

Dušková a kol. (2009) publikovala, že pokud mají rostliny kvalitní životní prostředí, jsou schopné lépe čelit chorobám a škůdcům. Nevhodné pěstitelské podmínky v mnohých případech způsobí následné napadení patogeny.

Nejúčinnější ochrana proti fytoparazitickým hád'átkům je prevence. Díky ní lze zabránit šíření hád'átek na nezamořené lokality. Velmi důležité je používat certifikovanou sadbu a osivo, dezinfikovat zemědělskou mechanizaci a omezovat vstupy na infikované lokality. Nezbytný je přesný monitoring hád'átek, který je založen na precizním odebrání reprezentativních vzorků. Je však poměrně složitý, protože výskyt hád'átek na pozemku je ohniskovitý (Douda a Zouhar, 2008).

3.9.1.1 Agrotechnická opatření

Pro snížení zamoření půdy je nutné odstranit hostitelskou rostlinu z osevního postupu na dobu nezbytně nutnou. Tábořský a Šedivý (1997) ve své publikaci uvádí, že by se měl dodržovat čtyřletý odstup v pěstování brambor na dané lokalitě. Mělo by se také zabránit tomu, aby zůstávaly po sklizni bramborové hlízy na pozemku, prostřednictvím kterých se mohou vytvářet další generace hád'átek (Zouhar a Gaar, 2003). Vhodná je také pravidelná ochrana proti plevelům, které mohou být zdrojem infekce hád'átek. Velmi důležité je to především u druhu *Ditylenchus dipsaci* a *Aphelenchoides fragariae* (Vondrášková, 2005). V případě hád'átka bramborového je účelná likvidace plevelů z čeledi *Solanaceae*.

3.9.1.2 Karanténa

Karanténa je jednou z metod, které zabraňují dalšímu šíření hád'átka bramborového do nezamořených oblastí. Jsou stanoveny právní předpisy jak na úrovni mezinárodní, tak na úrovni národní. Karanténní opatření na mezinárodní úrovni stanovuje European and Mediterranean Plant Protection Organization. V České republice vyplývají karanténní předpisy ze zákona č. 147/1996 Sb. o rostlinolékařské péči. Konkrétně tyto předpisy upravují vyhlášky č. 215/2008 Sb., o opatřeních proti zavlékání škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů a vyhláška č. 75/2010 S., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření hád'átka bramborového a hád'átka nažloutlého a o změně vyhlášky č. 332/2004 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany

proti zavlékání a šíření původce rakoviny bramboru, háďátka bramborového a háďátka nažloutlého.

3.9.1.3 Rezistentní odrůdy

Při výběru vhodné odrůdy brambor se řídíme listinou povolených odrůd, která je každoročně vydávána Ministerstvem zemědělství a informacemi o odrůdách vydávané Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským v Brně a Výzkumným ústavem bramborářským v Havlíčkově Brodě.

Při výběru odrůdy se také musí respektovat její požadavky na dané stanoviště. Rezistentní odrůdy však problém s háďátkem zcela neřeší. Při pravidelném pěstování totožných odrůd rezistentních k háďátku může dojít k selekci jeho agresivnějších patotypů, a proto se musí rezistentní odrůdy střídat (Hamouz, 1994). Vokál et al. (2000) publikoval, že v ČR se pěstuje až 75 % rezistentních odrůd proti háďátku bramborovému, konkrétně jeho patotypu Ro1. Odrůdy bramboru odolné proti háďátku bramborovému pro rok 2017 jsou uvedeny v příloze, v tabulce č. 2.

Rezistentní odrůdy bramboru vylučují kořenový difuzát, který vyvolává líhnutí larev háďátka bramborového, které napadají kořeny brambor, avšak nejsou schopny dokončit svůj vývojový cyklus. Rezistenci způsobují tak zvané major geny, v tomto případě se jedná o gen H1 (Zouhar a Gaar, 2003). Podle Pineda et al. (1993) byl tento gen získán z rostliny *Solanum tuberosum* spp. andigena a je zodpovědný za vysokou úroveň odolnosti brambor vůči háďátku bramborovému. Také byl popsán gen H3, který však nespadá do skupiny major genů. Odrůdy obsahující tyto geny jsou schopny snížit výskyt háďátka až o 80 % v průběhu jednoho roku pěstování. V případě, že je stejná odrůda pěstována po dobu více let, snižuje výskyt až o 99 %, ale v tom případě může dojít k selekci agresivnějších patotypů háďátka, jak již bylo zmíněno výše (Zouhar a Gaar, 2003).

3.9.2 Kurativní

3.9.2.1 Chemická ochrana

Chemická ochrana je komplikovaná zejména z ekonomického hlediska a díky své vysoké toxicitě. V minulosti však její použití vedlo ke snížení velkého množství hád'átek. Velmi účinná je aplikace fumigantů na vlhkých písčitých půdách, které jsou přikryté polyetylenovou folií. S touto aplikací je však spojeno i nebezpečí kontaminace podzemních vod. V dnešní době je používání chemických látek velmi omezeno (Anonym 3).

Hád'átka jsou obecně velmi odolná chemickým látkám. Nejcitlivější jsou larvy a dospělí jedinci, protože účinná látka do nich proniká prostřednictvím přirozených otvorů. Vajíčka jsou oproti tomu velmi odolná, protože jsou chráněna několikavrstevnou kutikulou (Decker, 1969). Zouhar a Gaar (2003) ve své publikaci zmiňují, že chemická ochrana by se měla používat jen v nejkrajnějších situacích. Její velkou nevýhodou je vysoká toxicita jak pro životní prostředí, tak pro samotnou rostlinu. Také uvádějí, že její efektivnost je srovnatelná s účinností rezistentních odrůd.

V minulosti byla používána například účinná látka abamectin. V současnosti je registrována jen pro okrasné rostliny, zeleninu a ovoce (Vondrášková, 2005).

V České republice je v současné době registrovaný pouze jeden chemický přípravek a to Basamid Granulát s účinnou látkou dazomet. Je určený pro dezinfekci půdy a substrátů. Hubí jak kořenová hád'átka, tak patogenní houby či plevele. Používá se v dávce 20 až 60 g/m² nebo 200 g/m³. Představuje riziko pro včely i životní prostředí. Jeho uvádění na trh má však skončit již 31. května 2017 (Anonym 3). Je to půdní fumigant, který se používá před výsevem nebo výsadbou venkovních nebo chráněných kultur. Účinná látka se rozkládá na MITC, což je biocid přirozeně se vyskytující například v brukvovitých rostlinách (Vondrášková, 2005).

3.9.2.2 Fyzikální metody ochrany

Jednou z fyzikálních metod ochrany brambor proti hád'átku bramborovému je sterilizace půdy, kdy se půda překryje několika vrstvami polyetylenové průhledné folie. Tuto metodu lze provádět především na menších plochách a je určena pro lokality s teplým klimatem nebo pro

pěstební plochy ve sklenících (Zouhar a Gaar, 2003). Engelmann (1943) testoval, při jaké teplotě zahynou cysty hádátka bramborového v půdě a zda má na úhyn vliv také vlhkost půdy. Zjistil, že v suchých půdách je třeba k zahubení cyst až 90 °C, kdežto ve vlhkých půdách stačí 60 °C. Stelter a Möller (1961) podobně jako Engelmann zkoumali jaký má vliv na cysty hádátka bramborového teplota a vlhkost půdy s ohledem na dobu působení vysokých teplot. Zjistili, že když byla po dobu jedné hodiny ošetřena suchá půda teplotou 90 °C, nedošlo k usmrcení všech vajíček ani larev. Na rozdíl od ošetření vlhké půdy, kdy došlo k usmrcení téměř všech vajíček i larev po půl hodině. Mezi fyzikální metody ochrany proti hádátkům patří například i vliv UV záření, gama záření nebo ultrazvuku (Decker, 1969).

3.9.2.3 Biologická ochrana

Biologická ochrana zahrnuje nechemické prostředky, které jsou aplikovány samostatně nebo v kombinaci s rostlinami, které potlačují či cíleně hubí škodlivé organismy. Nejvyšší uplatnění biologické ochrany lze nalézt v ekologickém systému pěstování a v systému integrované ochrany rostlin (Kuthan a Trubská, 2017).

3.9.2.3.1 Botanické pesticidy

První zmínky o botanických pesticidech se datují nejméně do doby před třemi tisíci lety, kdy se ochrana pomocí těchto přípravků používala v Číně, Egyptě, Řecku a Indii. V Evropě se například v 18. a 19. století začaly rozvíjet rostlinné insekticidy, používal se konkrétně insekticidní prášek z květenství rostliny *Chrysanthemum* sp., kořene *Derris* sp. a extrakt z listů rostliny *Nicotiana* sp. Ve 20. století došlo k intenzivnějšímu pěstování kulturních plodin, byly na ně kladeny vyšší nároky, především na jejich výnosy a kvalitu. Začaly se proto jednostranně šlechtit a to vedlo následně ke snížení jejich odolnosti k chorobám a škůdcům. Tyto problémy byly řešeny pomocí synteticky vyrobených pesticidů, jako bylo například DDT, organofosfáty, karbamáty, pyretroidy či rtuťnaté fungicidy.

Nadměrné používání těchto přípravků však vedlo v druhé polovině minulého století k rozvoji rezistentních populací škůdců, zjistil se výskyt škodlivých reziduí v potravinách nebo negativní vliv na necílové organismy. Z toho důvodu se na konci 20. století začaly hledat nové

alternativní směry v ochraně rostlin, které nemají negativní vliv jak na zdraví člověka, tak na necílové organismy a životního prostředí. Jedním z nich je využití již zmíněných botanických pesticidů. Lze je rozdělit do tří skupin a to botanické pesticidy první generace, druhé generace a třetí generace (Pavela, 2011).

Botanické pesticidy první generace vznikly původně z rostlin u nás nepůvodních, které byly využívány zvláště v Asii a Americe. V Evropě se nejprve používaly extrakty jednoduše vyrobené laickou veřejností a až postupem času dostaly komerční podobu. Extrakty jsou získávány z rostlin rodu *Nicotiana*, *Ryania speciosa*, *Chrysanthemum* spp. a rostlinných olejů (Pavela, 2006).

Botanické pesticidy druhé generace jsou vyráběny především z léčivých rostlin, u kterých je již z historie známo, že nemají žádné negativní účinky jak na zdraví člověka, tak na zdraví zvířat. Koul et al. (2008) také uvádějí, že jsou bezpečné, ekologicky šetrné a kompatibilní s životním prostředím. Botanické pesticidy této generace byly vyvíjeny tak, aby byly selektivní k přirozeným nepřítelům a zdravotně nezávadné. Tyto přípravky působí nejen kurativně, ale mnohdy i preventivně. Jejich selektivnost spočívá v tom, že jsou používány extrakty, které obsahují látky s inhibičním účinkem. Rezidua s tím spojená jsou následně považována za neškodná.

Nejobsáhlejší skupinou botanických pesticidů druhé generace jsou aromatické rostliny. V dnešní době je jich zhruba 10 000 druhů a z toho přibližně 3000 z nich je popsáno podrobněji. Velice pozitivní u těchto olejů je jejich nízká toxicita. Většinou jsou získávány z léčivých rostlin, a proto je jejich vliv na člověka známý. Lze také říci, že jejich rezidua jsou pro člověka naprosto neškodná, v některých případech působí i pozitivně na jeho zdraví (Pavela, 2011).

Obsahují velké množství biologicky aktivních látek, mezi které patří například terpeny, alkaloidy a však nejdůležitější z nich jsou aromatické uhlovodíky, které jsou jinak nazývány esenciální oleje (Pavela, 2011). Vykazují široké spektrum aktivity proti hmyzím škůdcům i patogenním houbám rostlin. Nedávné výzkumy prokazují, že některé složky těchto olejů působí na nervový systém hmyzu, avšak nepůsobí na savce a ryby. Sangwan et al.(1990) také tvrdí, že některé éterické oleje a jejich složky, například eugenol jsou považovány za insekticidní. Avšak

již dříve bylo zjištěno, že účinkují i na některé druhy hád'átek napadající rostliny. Například na tuto skupinu škůdců působí esenciální oleje z rostlin *Ocimum basilicum*, *Mentha piperata*, *Eugenia caryophyllata*, *Callistemon lanceolatus* a *Cymbopogon caesius* a jejich hlavní složky linalool, eugenol, mentol, cineol a geraniol.

Ve velké míře jsou používány i v potravinářství a parfumerii. Na rozdíl od jiných pesticidů nepodléhají registraci a ve spojení s dostupností esenciálních olejů se staly velmi oblíbenými jak u laické veřejnosti, tak v zemědělství především v ekologické produkci potravin a v integrované ochraně rostlin (Koul et al., 2008). Esenciální oleje jsou složeny z několika desítek látek, ale často obsahují jeden až pět látek, které jsou zastoupeny v největší míře a jsou pro daný druh rostliny typické.

Botanické pesticidy třetí generace jsou úplně novou kategorií, která je zkoumána v několika posledních letech. Jsou určeny především k preventivní ochraně rostlin a jsou považovány spíše za podpůrné látky. V současné době je u nás na trhu jediný přípravek, a to extrakt z kopřivy dvoudomé a břízy bělokoré. Tento přípravek podporuje růst kořenů rostlin. Je určen pro zeleninu, drobné ovoce, balkonové a pokojové rostliny (Pavela, 2011).

3.9.2.3.2 Bakterie

Cronin et al. (1997a; 1997b) testoval, jaký mají vliv na mortalitu vajíček hád'átka bramborového bakterie, které produkují do půdy chitinasy. Prokázalo se, že v rámci testování díky těmto bakteriím došlo ke snížení počtu vajíček u patotypu hád'átka bramborového Ro1 o 70 % na rozdíl od kontrolní varianty. Bylo testováno celkem 3200 bakteriálních izolátů a pouze 137 z nich bylo pozitivních. V další publikaci pro změnu zkoumali, jaký má vliv bakterie *Pseudomonas fluorescens* F113 na mortalitu téhož druhu hád'átka. Uvádějí, že tento druh produkuje 2, 4- diacetylphloroglucinol jinak značený DAPG. Účinky této bakterie se ověřovaly jak v in vitro podmínkách, tak v půdě. Prokázalo se, že DAPG zdvojnásobila schopnost líhnutí larev z cyst, ale také způsobila, že mobilita nově vylíhnutých larev se zhruba třikrát snížila. Zkoumalo se také působení syntetického DAPG, jehož účinnost se také prokázala, a proto byl navržen jako potencionální nástroj k biologické regulaci v ochraně brambor proti hád'átku bramborovému.

Insunza et al. (2002) zkoumal účinnost 44 bakteriálních izolátů na *Trichodorus primitivus* a *Paratrachodorus pachydermus*, což jsou háďátka přenášející Tobacco rattle virus na bramborách. Zjistili, že šestnáct izolátů snižovalo v půdě hustotu těchto háďátek o 50 až 100 %. Testované byly rostliny bramboru, které se nacházely na pozemku zamořeném jak výše zmíněnými háďátky tak Tobacco rattle virem. Čtyři bakteriální izoláty trvale snížily hustotu háďátka o zhruba 56 až 74 % bez vizuálního vlivu na růst rostlin. Tyto izoláty byly identifikovány jako *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus mycoides*, *Pseudomonas* spp. a další neidentifikovatelný druh. Tyto izoláty pocházejí z následujících rostlin ve stejném pořadí: *Plantago major*, *Thymus vulgaris*, *Asparagus officinalis*. Již zmíněné bakterie vykazují nematocidní účinky hlavně proto, že produkují hydrolytické enzymy, kyanovodík a například fenoly.

3.9.2.3.3 Nematofágní houby

Můžeme je definovat jako mikroskopické organismy, které se živí zejména vajíčky nebo jinými vývojovými stádii háďátek. Považují se proto za jejich přirozené nepřátele a lze je využít v rámci biologické ochrany (Morton et al., 2004). Důležité je zohlednit, že množství nematofágních hub v půdě je ovlivněno několika faktory, z nichž nejvýznamnější je teplota a vlhkost půdy (Douda a kol., 2011). Nematofágní houby se vyskytují ve většině půdních ekosystémů, ale preferují nejčastěji půdy s vysokým obsahem organických látek. Douda a kol. (2010) publikovali, že v současnosti je popsáno zhruba 150 druhů mikroskopických hub s nematofágní aktivitou.

Skupina nematofágních hub zahrnuje velké množství druhů jak obligátních, tak fakultativních. Zahrnují také dravé či endoparazitické houby (Morton et al., 2004). Dravé houby patří nejčastěji do oddělení *Fungi imperfecti* a *Ascomycota*. Háďátka zachytávají prostřednictvím přeměněných lapacích struktur. Většina endoparazitických hub spadá do oddělení *Zygomycota*, *Basidiomycota* a *Chytridiomycota*. Na rozdíl od dravých parazitují endoparazitické houby pomocí spor a zoospor. Nematofágní houby nejsou významné jen v biologické ochraně proti háďátkům, ale jsou podstatné z hlediska rozkladu uhlíku, dusíku a dalších prvků, které pochází z těl háďátek. Tvoří tak nepostradatelnou složku v koloběhu těchto prvků v přírodě (Zouhar a kol., 2010a). Využívají se také proto, že některé druhy mohou zpomalovat nástup napadení pěstovaných plodin, jako je například druh *Pochonia chlamydosporia*. Tento druh houby infikuje vaječné vaky tvořené

hátkotvornými fytoparazitickými háďátku rodu *Meloidogyne*. Vajíčka jsou zničena a následně je tak přerušeno jejich vývojový cyklus (Douda a kol., 2011).

Paecilomyces lilacinus je půdní houba, která je běžná v tropických a subtropických oblastech a je známá především svými nematofágními účinky (Gökçe and Kubilay, 2005). Mendoza et al. (2007) uvádí, že *Paecilomyces lilacinus* konkrétně kmen 251 (PL 251) byl registrován a uveden na trh v několika zemích jako prostředek Bioact WG, který účinkuje například na *Meloidogyne* spp. u rajčat a na *Globodera rostochiensis* u brambor. V USA byl tento kmen použit v biologickém nematocidu, který se prodává pod obchodním názvem Melocon WG jak uvádí publikace od Kiewnick and Sikora (2006). Zmiňují také, že tento kmen byl původně izolován právě z háďátka *Meloidogyne* na Filipínách.

Arthrobotrys oligosporum Fresen. 1850 je půdní houba, která využívá schopnost chemotropicky reagovat na přítomnost kořenů pro ni vhodných rostlin a používá ji k jejich následné kolonizaci. Tento druh houby žije běžně v rhizosféře rostlin, které však nepoškozuje, naopak zvyšuje odolnost k háďátkům a jiným patogenům. Houba pomocí apresoria kolonizuje rhizodermis a kůru kořene, neproniká však do středního válce, kde jsou cévní svazky (Douda a kol., 2011). *Arthrobotrys oligosporum* má vývojově nejvyvinutější lapací struktury v podobě tak zvaných lapacích ok. Tyto lapací struktury mají houby také z rodu *Dactylella*. Princip lapacích ok je následující, pokud jsou buňky lapacích ok stimulovány tělem háďátka, tak dojde k prudkému rozšíření těchto buněk, které následně zachytí háďátko (Douda a kol., 2010).

Zouhar a kol. (2010b) testovali nematofágní účinky této houby u háďátek *Globodera rostochiensis*, *Meloidogyne hapla* a *Ditylenchus dipsaci*. Zkoumali také nematofágní aktivitu hub z rodů *Dactylaria* a *Monacrosporium*. Závěrem tohoto experimentu bylo, že *Arthrobotrys oligosporum* byla nejvíce patogenní ke všem testovaným druhům háďátek. Nejvyšší úhyn způsobila tato houba u *Globodera rostochiensis* (100 %), dále u *Ditylenchus dipsaci* způsobila mortalitu 97 % jedinců a u *Meloidogyne hapla* 80 %.

3.10 Esenciální oleje

Zdrojem esenciálních olejů jsou různé aromatické rostliny, které se nacházejí jak ve Středomoří, tak v tropických oblastech. Jsou získávány z pupenů, květů, listů, stonků, větví,

semen, plodů, kořenů, mohou být obsaženy i v kůře nebo dřevu. V přírodě jsou využívány především k odpuzování býložravců, mají antibakteriální, antimykotické či insekticidní účinky. Získávají se nejčastěji hydro- destilací, a destilací prostřednictvím páry.

Esenciální oleje jsou široce využívány díky svým specifickým vlastnostem, jako jsou například chuť a vůně, v potravinářství a parfumerii. Poměrně dlouhou dobu jsou již známé i jejich inhibiční účinky vůči hmyzu. Výzkumy v posledních letech prokázaly nejen účinnost vůči hmyzu, ale i jiným významným patogenům rostlin (Bakkali et al., 2008).

Bakkali et al. (2008) popsali esenciální oleje jako velmi složité sloučeniny obsahující zhruba 20 až 60 složek, které mohou být ve zcela rozdílných koncentracích. Obsahují však zpravidla dvě nebo tři majoritní komponenty. Příkladem může být esenciální olej z rostliny *Origanum compactum*, ve kterém je nejvíce zastoupen karvakrol (30 %) a thymol (27 %).

Pro bližší popis bylo vybráno pět následujících rostlin obsahující esenciální oleje, které byly v rámci této diplomové práce použity.

3.10.1 *Artemisia dracunculus* L.

Jedná se o silně aromatickou bylinu, která je řazena i do skupiny léčivých rostlin (Arabhosseini et al., 2009). Lidově se jí říká estragon a patří do čeledi *Asteraceae*. Esenciální olej se získává většinou z nadzemní části rostliny a je často využíván v lidovém léčitelství. Dále nachází široké uplatnění v potravinářském průmyslu díky své příjemné vůni, antibakteriálním a antimykotickým vlastnostem. V tomto odvětví se může používat i při zvýšení bezpečnosti potravin při skladování a během jejich zpracování (Preedy, 2015).

Z rostliny *Artemisia dracunculus* se získává esenciální olej Tarragon, který se využívá například při aromaterapii nebo při léčbě poruch svalů. Dle Adamse (2007) se skládá z devatenácti složek, z nichž nejvíce je zastoupen estragol (76,52 %) a limonen (6,55 %).

V minulosti byla prokázána široká antimikrobiální aktivita proti patogenním mikroorganismům a schopnost inhibice růstu například: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis* a *Bacillus subtilis*. Dále bylo zjištěno, že má vliv i na houbové patogeny jako jsou například *Pythium ultimum*, *Sclerotinia*

sclerotiorum, *Botrytis* sp., *Colletotrichu fragariae*, *Colletotrichum acutatum* (Obolskiy et al., 2011). Kordali et al. (2005) ve své publikaci popisují antibakteriální účinnost tohoto oleje například na *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Xanthomonas axanopodas* pv. *vesicatoria*, *Brevibacterium casei*, *Proteus vulgaris* a další.

3.10.2 *Foeniculum vulgare* Mill.

Jedná se o aromatickou rostlinu, která je v Evropě a Asii známá již od starověku (Özbek et al., 2003). Patří do čeledi *Apiaceae* a je široce používána k léčbě nejrůznějších onemocnění, například při poruchách trávení nebo při nadýmání. Často se využívá také v potravinářství jako koření. Mimo jiné je také známé jeho působení vůči patogenním mikroorganismům (Kaur et Arora, 2009).

Esenciální olej je většinou získáván ze semen této rostliny. Adams (2007) uvádí, že se skládá z patnácti složek. Majoritně obsahuje anethol (76,48 %) a limonen (5,68 %). Lo Cantore et al. (2004) zjišťovali antibakteriální aktivitu tohoto oleje v in vitro testech u 27 fytopatogenních bakterií a u dvou fytopatogenních hub. Jeho aktivita vůči zkoumaným škodlivým organismům byla prokázána. Využití tohoto oleje může být uplatňováno například v ekologickém zemědělství jako preventivní ošetření semen rostlin proti bakteriálním chorobám. U tohoto oleje byla prokázána i nematocidní účinnost vůči háďátku *Meloidogyne javanica*. Oka et al. (2000) testovali celkem 27 esenciálních olejů, z nichž mezi nejúčinnější patřil i esenciální olej z rostliny *Foeniculum vulgare*.

3.10.3 *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison

Patří do čeledi *Myrtaceae* a má významné antioxidační účinky, vyznačuje se také antimikrobiální aktivitou a působí například proti křečím (Lee et Shibamoto, 2001). Byla prokázána i její účinnost proti vší dětské. Běžně je používána v potravinářství jako koření (Khalaf et al., 2008). Kim et al. (1998) také uvádějí, že *Eugenia caryophyllus* se v Koreji úspěšně používá při léčbě astmatu a různých alergiích.

Esenciální olej je získáván především z pupenů *Eugenia caryophyllus*. Dle Adamse (2007) se skládá ze čtrnácti složek, z nichž nejvíce je zastoupen eugenol (85,6 %) a β -caryophyllen (8,75 %). Martini et al. (1996) uvádí, že již zmiňovaný eugenol je účinný proti některým druhům

houbovým patogenům. Pinto et al. (2009) také zkoumali účinnost tohoto esenciálního oleje na houbové patogeny a to konkrétně u rodu *Aspergillus*, *Candida* a *Dermatophyta* v Americe. Prokázalo se, že je účinný na všechny testované rody. Ho et al. (1994) prokázali u *Eugenia caryophyllus* i insekticidní účinky, konkrétně pak na skladištní škůdce *Tribolium castaneum* a *Sitophilus zeamais*. Meyer et al. (2008) v neposlední řadě uvádí, že tento olej účinný proti háďátkům, konkrétně k *Meloidogyne incognita*.

3.10.4 *Pimpinella anisum* L.

Pimpinella anisum je jednoletá rostlina, která se vyskytuje především v Turecku, Íránu, Indii, Egyptě a dalších teplých oblastech (Pourgholami et al., 1999). Tuto rostlinu řadíme do čeledi *Apiaceae* (Kosalec et al., 2005). Prokázalo se, že má několik léčivých účinků jako jsou například zažívací, gynekologické, neurologické a respirační poruchy (Gülçin et al., 2003).

Esenciální olej je získáván nejčastěji ze semen této rostliny (Al-Bayati, 2008). Dle Adamse (2007) je složen z 23 složek, z nichž nejvíce je zastoupen anethol (88,55 %) a estragol (4,38 %). Tunc et al. (2000) také zjistili, že esenciální olej *Pimpinella anisum* má ovicidní účinky na vajíčka skladištních škůdců, konkrétně na *Tribolium confusum* a *Ephestia kuehniella*. Al-Bayati (2008) testoval jeho antibakteriální účinky na několika druhích gram negativních a gram pozitivních bakterií, například na *Escherichia coli* a *Salmonella typhi*. V tomto experimentu se jeho antibakteriální účinky potvrdili.

3.10.5 *Thymus vulgaris* L.

Thymus vulgaris je významnou aromatickou a léčivou rostlinou z čeledi *Lamiaceae* (Reddy et al., 1998). Má antioxidační účinky a je velice oblíbená v potravinářství jako koření díky své chuti a výraznému aroma. Dále se také využívá v kosmetickém průmyslu nebo v lékařství například pro svou antibakteriální aktivitu a proti nadýmání (Lee et al., 2005). V Íránském lidovém léčitelství je využívána proti kašli, křečím nebo jako anthelmintikum (Al-Bayati, 2008).

Nejčastěji je olej z této aromatické rostliny získáván z listů. Podle Adamse (2007) se olej skládá z 23 složek, z nichž nejvíce je zastoupen thymol (48,07 %), p- cymen (16,4 %) a například β - caryophyllen (5,91 %). Reddy et al. (1998) testovali vliv esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* na houbové patogeny jahod, jako jsou *Botrytis cinerea* a *Rhizopus stolonifer* přičemž se jejich

účinnost potvrdila. Abd-Elgawad a Omer (1995) testovali nematocidní účinnost esenciálního oleje z *Thymus vulagris* a jeho účinnost potvrdili například u hád'átka *Meloidogyne incognita*.

4 Materiály a metody

4.1 Kontejnerové testy

Pokus byl založen ve školním pokusném skleníku s řízenými podmínkami prostředí, který je certifikovaný pro práci s karanténními organismy. Do každého květináče bylo odměřeno 50 ml perlitu, do něhož bylo předtím přimícháno vždy 7,5 ml daného formulovaného esenciálního oleje. Výsledná koncentrace formulovaného esenciálního oleje v emulzi se rovnala vždy 1 %. Byl formulován do mikrokapsulek z biopolymeru. Přesný postup však v této práci nemůže být popsán, protože je tento experiment ve fázi patentového řízení.

Experiment byl založen 25. února 2016. Pro kontejnerový test byly použity květináče o objemu 1000 ml (obr. č. 49). Na dno každého z nich byla vložena jedna vrstva netkané textilie bránící propadávání půdních částic a perlitu z květináče a následně byl do květináče vložen pytlíček s deseti cystami hád'átka bramborového (obr. č. 51), který byl poté zasypan směsí zeminy a perlitu zhruba do poloviny. Cysty hád'átka bramborového použité v tomto experimentu pocházely z populace Šluknov (patotyp Ro1 český standard pro testy rezistence nových odrůd brambor).

Do každého květináče byla pak vložena hlíza velmi náchylného křížence bramboru (HR23/495) k hád'átku bramborovému (obr. č. 50), která byla následně překryta směsí zeminy a perlitu. Všechny květináče byly pak důkladně zality. Během růstu brambor byl pokus pravidelně 2 krát týdně kontrolován a dle aktuální potřeby zaléván. Ve skleníku nebyly květináče přisvětlovány umělým světlem, působilo na ně přirozené světlo, které simulovalo přirozené podmínky pro pěstování na stanovišti. Experiment byl vyhodnocen po šesti měsících. Tato doba simulovala vegetační období pozdní odrůdy brambor v polních podmínkách. Celkem bylo založeno 9 variant pokusu, z nichž každá měla pět opakování. Jedna varianta byla pozitivní kontrola, do které byl přimíchán perlit bez esenciálního oleje. Ostatní varianty obsahovaly esenciální olej získaný z rostliny *Artemisia dracunculus* (TAO/A, TAO/B), *Foeniculum vulgare* (FV/A, FV/B), *Pimpinella anisum* (PA/A, PA/B), *Thymus vulgaris* a *Eugenia caryophyllus*, přičemž tyto dva poslední esenciální oleje byly použity v kombinaci (TVHŘ/A, TVHŘ/B).

Materiál a pomůcky:

- Cysty háďátka bramborového
- Hlízy náchylného křížence bramboru k háďátku bramborovému (HR23/495)
- Esenciální oleje od firmy Salus
- Tarragon oil od firmy SIGMA- ALDRICH
- Květináče o objemu 1000 ml
- Netkaná textilie
- Pytlíček použitý na cysty
- zemina
- Perlit
- Lžička
- Laboratorní váhy

4.2 Extrakce cyst z půdy

Při práci v laboratoři se postupovalo dle zásad práce s karanténními organismy na Katedře ochrany rostlin. Podrobný přehled zásad je uveden v příloze, obrázek č. 6.

Cysty háďátka bramborového byly extrahovány ze zeminy pocházející z květináčů použitých v kontejnerovém testu, který je blíže popsán v předchozí kapitole. Pro extrakci cyst z půdy je nutné, aby byla zemina vysušena. Květináče ve školním skleníku s řízenými podmínkami prostředí se tudíž přestaly zalévat, aby zemina dokonale vyschla (obr. č. 49). Poté byl obsah květináčů vyjmut společně s rostlinou bramboru i pytlíčkem, kde byly uloženy cysty. Rostliny bramboru společně s pytlíčkem na cysty a netkanou textílií byly ponechány v prázdném květináči a směs zeminy a perlitu byla přesypána do umělohmotných boxů, kde se nechala ještě dokonale doschnout (obr. č. 52). Po přesypání směsi perlitu a zeminy byly v umělohmotném boxu ještě dokonale rozdrceny hroudy zeminy, a každý box byl označen jmenovkou (obr. č. 11).

Po vysušení zeminy pak následovala samotná extrakce cyst z půdy pomocí Fenwickovi konve (obr. č. 10). Tato metoda je založena na tak zvané flotaci. Nejprve je obsah Fenwickovi konve naplněn po okraj vodou a následně je na síto o velikosti ok 2 mm vsypána lopatkou

vysušená zemina, která je rozmělněna a proudem studené vody proplavována tak dlouho, dokud neteče čirá voda (obr. č. 14).

Z Fenwickovi konve vytéká voda společně s lehkými částicemi půdy a cystami hád'átka bramborového, které jsou usměřovány tak zvaným límcem na umělohmotná sítká o velikosti ok 250 a 150 μm (obr. č. 9). Materiál je následně ze sítká o průměru ok 250 μm převedem pomocí stříčky na sítko o průměru ok 150 μm . Sítko o průměru ok 150 μm bylo použito z důvodu zachytávání mikrocyst. Materiál na sítku je dále umístěn na buničinu a vysušen při laboratorní teplotě přibližně 24 hodin (obr. č. 15, 16).

Fenwickova konev byla dokonale očištěna od zbytků zeminy a vyplavená zemina byla přesunuta do umělohmotného kýble, který byl určen pro karanténní organismy (obr. č. 13). Kýbl byl na závěr umístěn do sterilizátoru, kde byl zvolený vhodný program pro sterilizaci zeminy (obr. č. 17).

Vysušený materiál byl dále podroben tzv. proužkové metodě dle Buhra, která umožňuje snadnější počítání cyst pod stereomikroskopem (obr. č. 18). Vysušená zemina byla převedena ze sítká do kádinky s vodou, ve které byl po obvodu umístěn filtrační papír (obr. č. 21). Zemina byla dokonale promíchána a poté se do kádinky přidala kapka detergentu (jaru). Vzniklá suspenze byla rozvířena a díky detergentu se cysty společně s lehkými částicemi půdy přilepily na filtrační papír. Nejvíce cyst se nachází na rozmezí hladiny vody a filtračního papíru v proužku, proto se také této metodě říká proužková. Filtrační papír byl po 3 minutách vyjmut z kádinky, umístěn na buničinu (obr. č. 23) a přenesen pod stereomikroskop, kde se pomocí nematologické jehly a počítadla (obr. č. 19) počítaly namnožené cysty. Materiál, který byl spočítán, byl následně převeden do zkumavek o objemu 50 ml a řádně označen (obr. č. 26).

Materiály a pomůcky:

- Fenwickova konev
- nálevka
- kovové síto 2 mm
- Umělohmotná sítká (200, 150 μm)
- Stříčka s vodou

- Buničina
- Lopatka
- Stereomikroskop (Olympus SZ61)
- Sterilizátor (Sanyo MLS 3780)
- Nematologická jehla
- Počítadlo
- Zkumavky
- Kádinka
- Filtrační papír
- Skleněná tyčinka
- Jar

4.3 Preparace cysty hád'átka bramborového

Cysta hád'átka bramborového byla vložena na podložní sklíčko a umístěna pod mikroskop. Poté jí byla pomocí skalpelu odříznuta fenestrální část (obr. č. 53), kde byl sledován anální otvor a vulva. Preparát byl poté vyfocen a fotografii lze nalézt v přílohách, na obrázku č. 54, 55, 56.

4.4 Izolace DNA z cysty

DNA byla izolována celkem z 11 cyst. Nejprve bylo do každé mikrozkumavky, která byla označena čísly od 1 do 11, napipetováno 30 μl pufru CL. Poté se do každé z nich vložila vždy jedna cysta, která byla rozdrčena pomocí malého umělohmotného tloučku (obr. č. 29). K tomuto homogenátu bylo následně přidáno 170 μl pufru CL, 20 μl proteínasy K a 20 μl IM DTT. Objem mikrozkumavky byl poté promíchán na vortexu (obr. č. 34) a vložena na jednu hodinu do termobloku, kde bylo nastaveno 56 °C (obr. č. 30).

Po vyndání mikrozkumavek z termobloku bylo do každé z nich napipetováno 200 μl pufru BL, byly promíchány na vortexu a opět vloženy po dobu 10 minut do termobloku, ve kterém bylo však nastaveno 70 °C.

Do mikrozkumavek bylo dále napipetováno 200 μl absolutního etanolu a jejich obsah byl promíchán pomocí vortexu. Celý objem každé mikrozkumavky byl pipetován do speciálních centrifugačních kolonek pro izolaci DNA, které mají vazebnou kolonku DNA a sběrnou

zkumavku. Opět byly tyto kolonky důkladně označeny čísly od 1 do 11 a vloženy do centrifugy nastavené na 8000 g po dobu 1 minuty (obr. č. 35). Po centrifugaci byly sběrné zkumavky vyhozeny a vazebné kolonky přendány do nových sběrných zkumavek.

Do každé kolonky bylo napipetováno vždy 500 μ l pufru BW a opět byly vloženy do centrifugy na 1 minutu při stejných otáčkách jako v předešlém kroku. Sběrné kolonky byly opět vyhozeny a nahrazeny novými.

Do kolonek bylo poté napipetováno 700 μ l pufru TW a byly vloženy do centrifugy na 1 minutu při stejných otáčkách jako v posledním kroku. Po centrifugaci byl obsah sběrných kolonek vylit a opět do nich byly vloženy vazebné kolonky, které se poté umístily opět do centrifugy, která byla nyní nastavena na 3 minuty a 13000 g. Tento krok byl proveden proto, aby byly odstraněny zbytky promývacího pufru.

Vazebné kolonky byly po centrifugaci přemístěny do mikrozkušavek 1,5 ml a k jejich obsahu bylo přidáno 20 μ l pufru AE, který musel být aplikován přímo na plochu vazebné kolonky, aby tento krok splnil svůj účel. Obsah mikrozkušavek byl následně inkubován po dobu 3 minut při laboratorní teplotě a následně byl vložena na 1 minutu do centrifugy, kde bylo opět nastaveno 13000 g.

Vazebné kolonky po poslední centrifugaci mohly být odstraněny, neboť DNA už se nacházela ve sběrné zkumavce.

Materiály a pomůcky:

- 200 μ l pufr CL
- 20 μ l proteinasa K
- 20 μ l IM DTT
- 200 μ l pufr BL
- 200 μ l absolutní etanol
- 500 μ l pufr BW
- 700 μ l pufr TW
- 20 μ l pufr AE
- Cysty hád'átka bramborového (11Ks)

- 1,5 ml mikrozkušavky (22 Ks)
- Speciální centrifugační kolonky pro izolaci DNA (33 Ks)
- Umělohmotný tlouček (11Ks)
- Centrifuga (Universal 320 R)
- Vortex (IKA VORTEX GENIUS 3)
- Termoblok (Thermo Block TDB- 120, Biosan)
- Popisovčč
- Pipety
- Rukavice
- Podložka na mikrozkušavky

Poznámka: Množství chemikálií, které je uvedeno v materiálech a pomůckách je uvedeno pro jeden vzorek, celkové množství jednotlivých chemikálií musí být vynásobeno 11x)

4.5 Molekulární detekce a determinace hád'átka bramborového pomocí PCR

Prvním krokem pro PCR bylo připravit reakční směs. Nejprve bylo do mikrozkušavky napipetováno 182,4 μ l vody, poté 30 μ l pufru, 36 μ l $MgSO_4$, 4,8 μ l dNTP, 4,8 μ l primerMIX a na závěr bylo napipetováno 6 μ l Taq polymerázy. Celá reakční směs byla důkladně promíchána pomocí vortexu a vložena na pár vteřin do malé centrifugy (Microspin FV- 2400, Biosan), na obrázku č. 36. Mezi tím bylo připraveno 11 speciálních PCR zkumavek, které byly popsány čísly od 1 do 11. Do každé z nich bylo napipetováno 22 μ l reakční směsi a na víčko každé z nich byly napipetovány 3 μ l DNA. Tyto zkumavky byly vloženy do malé centrifugy (Wealtec , E-Centrifuge) na obrázku č. 41, z které byly po pár sekundách vyndány a přendány do termocykleru (obr. č. 33), který už byl přednastaven na speciální program, který bude uveden v následující tabulce. Pro PCR reakci byly použity dva primery, z nichž jeden je specifický pro druh hád'átka bramborového a druhý je specifický pro rod *Globodera*.

Tabulka č. 1: Program termocyklu

GRO3T calculated		
1.	95 °C	4 min
2.	94 °C	1 min
3.	62 °C	0,3 min
4.	72 °C	1 min
5.	Go to 2	35 krát
6.	72 °C	5 min
7.	4°C	Forever

Materiály a pomůcky:

Reakční směs pro všechny PCR zkumavky

- 182,4 µl vody
- 30 µl pufr
- 36 µl MgSO₄
- 4,8 µl dNTP
- 4,8 µl primerMIX

Specifický primer pro hád'átka bramborové:

Gro 5A 5' - ATGTTGTACGTGCCGTACCTT

Specifický primer pro rod *Globodera*:

UNIGlob 5' - GCAGTTGGCTAGCGATCTTC

- 6 µl Taq polymeráza
- 36 µl DNA izolovaných z cyst hád'átek
- Mikrozkušavky (1 Ks)
- PCR zkumavky (11 Ks)
- Podložka na PCR zkumavky
- Popisovač
- rukavice
- Termocykler (MJ Research PTC- 200)

- Vortex (IKA VORTEX GENIUS 3)
- Centrifuga (Microspin FV- 2400, Biosan)
- Centrifuga (Wealtec , E- Centrifuge)

4.6 Elektroforéza

Nejprve byla v mikrovlnné troubě dokonale rozvařena 1% agaróza v TBE pufru (1x). Poté byla skleněná nádoba s agarózovým gelem schlazena na zhruba 60 °C a byl přidán roztok ethidium bromidu (1 mg/ml). Obsah skleněné nádoby byl následně důkladně promíchán (obr. č. 42). V průběhu byla připravena elektroforetická forma (obr. č. 37), do které byl následně připravený gel nalit. Do formy byl ihned po nalití gelu vložen hřebínek, pomocí kterého se vytvářejí jamky. Gel se poté musel nechat ztuhnout po dobu přibližně 30 minut.

Po třiceti minutách byl z formy vyjmut hřebínek a vanička s gelem byla přesunuta do elektroforetické cely s 1x TBE elektroforetickým pufrem, který převrstvil gel (obr. č. 38). Každý vzorek DNA (5 µl) byl smíchán na speciální destičce (obr. č. 40) s 2 µl nanášecí barvy a napipetován do jamek v gelu. Pro odhad velikosti PCR produktu bylo napipetováno do první a poslední jamky 5 µl markeru (standard molekulových hmotností). Do jedné z jamek byla také napipetována pozitivní kontrola, která obsahovala DNA hád'átka bramborového.

Následně bylo spuštěno elektroforetické dělení při elektrickém poli 8 V/cm po dobu 15 minut. Po zhruba jedné hodině byl gel přemístěn z elektroforetické cely na UV transluminátor (obr. č. 39), kde byly pozorovány a zdokumentovány DNA fragmenty v gelu.

Materiály a pomůcky:

- TBE pufr (1x)
- 1% agaróza
- Ethidium bromid
- PCR produkt
- Nanášecí barva (6x DNA Loading Dye)
- Marker (MassRuler™ DNA Ladder Low Range)
- Pipeta
- Rukavice

- UV transluminátor (Cleaver Scientific Ltd)
- Elektroforetická cela
- Elektroforetická forma na gel
- hřebínek

4.7 Vyhodnocení výsledků a zpracování literární rešerše

Naměřené hodnoty z experimentu byly vkládány do tabulky vytvořené v programu Microsoft Excel 2010. V tomto programu byl vytvořený i graf účinnosti esenciálních olejů. Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu Statistika 12 pomocí analýzy rozptylu tak zvané ANOVY. Tato metoda umožňuje ověřit, zda mají zjištěné hodnoty pro jedince statisticky významný vliv či nikoli. Literární rešerše byla napsána v programu Microsoft Word 2010.

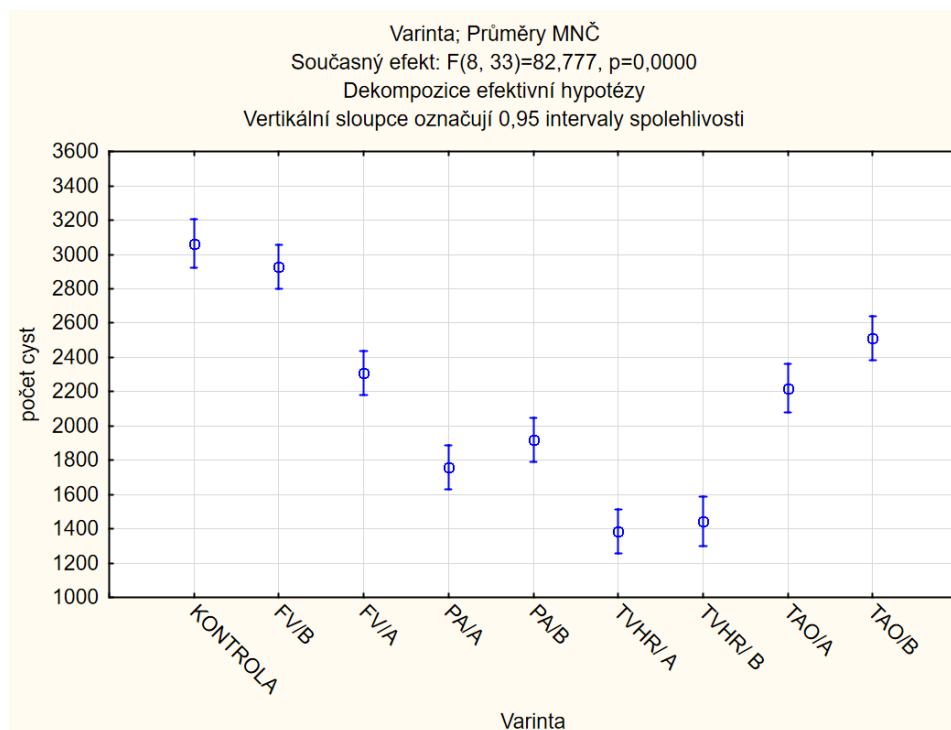
5 Výsledky

5.1 Kontejnerové testy založené ve školním pokusném skleníku

Celkem bylo založeno 9 variant pokusu, z nichž každá měla pět opakování. Jedna varianta byla pozitivní kontrola, do které byl přimíchán perlit bez esenciálního oleje.

Hodnoty, z kterých vychází tento graf, jsou uvedeny v příloze, v tabulce č. 4. Tento statistický výstup ukazuje, že na mortalitu hád'átka bramborového měly vliv všechny testované esenciální oleje. Největší vliv měla kombinace esenciálních olejů, které byly získány z rostlin *Thymus vulgaris* (TV) a *Eugenia caryophyllus* (HŘ). Nejmenší vliv na mortalitu měl esenciální olej získaný z rostliny *Foeniculum vulgare*, konkrétně jedna z jeho formulací (FV/A), dále také jedna formulace esenciálního oleje získaného z rostliny *Pimpinella anisum* (PA/B) a obě formulace Tarragon oil (TAO/A, TAO/B). Z tohoto výstupu nelze jednoznačně určit, zda jsou statistické rozdíly mezi variantami Kontrola, FV/B, FV/A, TAO/A, TAO/B a proto byl pro podrobnější testování použit Tukeyův test.

Graf č. 1: Statistický výstup vypovídající o působení esenciálních olejů a jejich formulací (hladina významnosti 0,05)



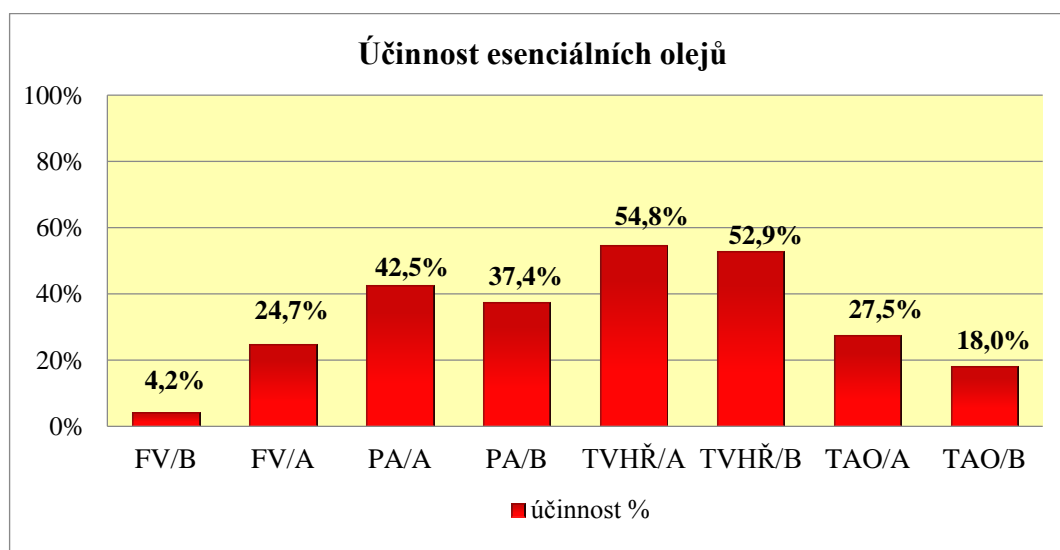
Tukeyův test jak už bylo výše zmíněno, umožňuje detailnější analýzu naměřených dat. Díky tomuto výstupu lze jednoznačně říci, že na účinnost některých esenciálních olejů má vliv i formulace, v jaké jsou aplikovány v květináčích. Tato skutečnost se potvrdila u esenciálního oleje FV, kdy formulace FV/A byla o poznání účinnější než formulace FV/B, u které nebyla prokázána žádná účinnost na mortalitu háďáčka bramborového. U esenciálního oleje PA, kombinace TVHŘ a TAO nebyl prokázán statisticky významný vliv formulace na účinnost esence. Dále byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi variantami PA/A a TAO/B, kdy byla PA/A účinnější. V porovnání s variantami TAO/A a PA/B, kde nebyl rozdíl v účinnosti zjištěn.

Tab. č. 2: Tukeyův test pro detailnější vyhodnocení účinnosti esenciálních olejů

Tukeyův HSD test; proměnná počet cyst (globodera krestanova)										
Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy										
Chyba: meziskup. PČ = 19780,, sv = 33,000										
Č. buňky	Varinta	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}
1	KONTROLA	3064,3	2927,2	2306,8	1759,6	1919,6	1385,6	1443,3	2220,5	2512,2
2	FV/B	0,868588	0,868588	0,000144	0,000144	0,000144	0,000144	0,000144	0,000144	0,000180
3	FV/A	0,000144	0,000145	0,000145	0,000144	0,000144	0,000144	0,000144	0,000144	0,001550
4	PA/A	0,000144	0,000144	0,000157	0,000157	0,003537	0,000144	0,000144	0,990535	0,365711
5	PA/B	0,000144	0,000144	0,003537	0,682595	0,682595	0,005249	0,045843	0,000879	0,000144
6	TVHŘ/ A	0,000144	0,000144	0,000144	0,005249	0,000166	0,000166	0,000597	0,066977	0,000146
7	TVHŘ/ B	0,000144	0,000144	0,000144	0,045843	0,000597	0,999442	0,999442	0,000144	0,000144
8	TAO/A	0,000144	0,000144	0,990535	0,000879	0,066977	0,000144	0,000144		0,083293
9	TAO/B	0,000180	0,001550	0,365711	0,000144	0,000146	0,000144	0,000144	0,083293	

Údaje, které byly použity pro následující graf, byly získány z tabulky, která se nachází v příloze v tabulce č. 4. Procentické hodnoty jsou průměrné.

Graf č. 2: Účinnost esenciálních olejů u jednotlivých variant v %



5.2 Molekulární detekce a determinace háďátka bramborového pomocí PCR

DNA byla izolována celkem z 11 cyst, které pocházely z populace háďátek ve Šluknově (patotyp Ro1 český standard pro testy rezistence nových odrůd brambor). Pro PCR reakci byly použity dva primery, z nichž jeden je specifický pro háďátka bramborové (GRO5A 5'- ATGTTGTACGTGCCGTACCTT- 3') a má sekvenci o 21 bázích. Druhý primer je specifický pro rod *Globodera* (UNIGlob 5'- GCAGTTGGCTAGCGATCTTC- 3') a má sekvenci o 20 bázích. Tyto dva primery tvoří produkt dlouhý 239 bp.

Obrázek č. 1 dokazuje přítomnost fragmentů DNA háďátka bramborového. Markery, které byly použity jako standart molekulových hmotností, jsou značeny písmenem M. Pozitivní kontrola (P) byla pipetována do agarozového gelu proto, aby se zjistilo, že experiment proběhl správně. Jednotlivé testované vzorky jsou pak označeny čísly od 1 do 11.

Fragmenty DNA jsou viditelné po ozáření UV paprsky proto, že došlo k absorpci záření molekulou DNA díky ethidium bromidu, který se úspěšně navázal mezi báze nukleové kyseliny.

Obrázek č. 1: Elektroforeogram znázorňující fragmenty DNA háďátka bramborového



6 Diskuze

V současné době jsou u rostlin brambor velmi významné dva karanténní druhy cystotvorných háďátek a to *Globodera rostochiensis* a *Globodera pallida*. *Globodera rostochiensis* je rozšířena v České republice i na Slovensku. *Globodera pallida* je však zastoupena v těchto dvou zemích jen omezeně. Poprvé byla popsána v ČR v roce 2003 Zouharem a kol., a na Slovensku Hubinskou et al., až v roce 2009. V současnosti je vyšlechtěno velké množství odolných odrůd proti *Globodera rostochiensis* a proto nepůsobí značné škody. Proti háďátku *Globodera pallida* však tolik odrůd vyšlechtěno není, a proto může způsobovat větší škody. Aby byla ochranná opatření účinná, je velmi důležitá diagnostika výše zmíněných druhů háďátek (Douda et al. 2014).

Háďátka jsou obecně poměrně odolná chemickým látkám. Nejcitlivější na chemický přípravek jsou larvy a dospělí jedinci, protože účinná látka do nich snadněji proniká přes přirozené otvory. Vajíčka jsou oproti těmto stádiím velmi odolná, protože jsou chráněna několikavrstevnou kutikulou (Decker, 1969). Zouhar a Gaar (2003) ve své publikaci uvádějí, že chemická ochrana by se měla používat jen v nejkrajnějších situacích. Jejím velkým negativem je vysoká toxicita jak pro životní prostředí, tak pro samotnou rostlinu a další necílové organismy. V minulosti byla používána například účinná látka abamectin. V současnosti je registrována jen pro okrasné rostliny, zeleninu a ovoce (Vondrášková, 2005). V dnešní době je v České republice registrovaný pouze jeden chemický přípravek a to Basamid Granulát, který má účinnou látkou dazomet. Používá se pro dezinfekci půdy a substrátů. Hubí jak kořenová háďátka, tak patogenní houby či plevele (Anonym 3).

Ochrana například velmi nebezpečného háďátka *Meloidogyne* spp. je založena na chemických metodách, které jsou v dnešní době celosvětově velmi omezovány. Proto je trendem současnosti monitorovat přirozeně se vyskytující rostliny a jejich účinné látky, které zprostředkovávají interakci s dalšími organismy a mohou být využívány i v integrované ochraně rostlin. Středomoří je oblastí, kde se ve velké míře vyskytují rostliny, obsahují účinné látky například proti háďátkům, ale i obecně proti škodlivým organismům, které mohou být využívány v alternativní ochraně rostlin (Ntalli et Caboni, 2012). Ochrana háďátka bramborového je pro změnu v dnešní době založena na pěstování rezistentních odrůd, většinou k patotypu Ro1. V

budoucnu však může dojít vlivem opakovaného používání totožných odrůd k selekci jeho agresivnějším patotypům a jeho následné rezistenci. Z toho důvodu je také důležité vyvíjet další alternativní metody, jako jsou například esenciální oleje, které by mohly do budoucna tento problém vyřešit.

Alternativním způsobem ochrany brambor proti háďátku bramborovému mohou být nematofágní houby, což jsou mikroskopické organismy, které se živí zejména vajíčky nebo jinými vývojovými stádii háďátek. Jsou proto považovány za jejich přirozené nepřátele a lze je využít v rámci biologické ochrany (Morton et al., 2004). V rámci této metody ochrany rostlin může být použita například půdní houba *Paecilomyces lilacinus*, která je běžná v tropických a subtropických oblastech a je známá především díky svým nematofágním účinkům (Gökçe and Kubilay, 2005). Mendoza et al. (2007) uvádí, že *Paecilomyces lilacinus* konkrétně kmen 251 (PL 251) byl uveden na trh v několika zemích jako prostředek Bioact WG, který účinkuje například na *Meloidogyne* spp. u rajčat a na *Globodera rostochiensis* u brambor. V USA byl tento kmen použit v biologickém nematocidu, který se nazývá Melocon WG jak uvádí publikace od Kiewnick and Sikora (2006). Zouhar a kol. (2010b) pro změnu v České republice testovali nematofágní účinky houby *Arthrobotrys oligosporum* u háďátek *Globodera rostochiensis*, *Meloidogyne hapla* a *Ditylenchus dipsaci*. Testovali také nematofágní aktivitu hub k rodům *Dactylaria* a *Monacrosporium*. V tomto experimentu bylo zjištěno, že *Arthrobotrys oligosporum* byla nejvíce patogenní ke všem testovaným druhům háďátek. Nejvyšší úhyn však způsobila u háďátka *Globodera rostochiensis* (100 %), dále u *Ditylenchus dipsaci* způsobila mortalitu 97 % a u *Meloidogyne hapla* 80 %. Účinnost tohoto nematofágního druhu zkoumali například i Belder a Jansen (1994), kteří pozorovali nižší účinnost (mortalita cca 20 %) u druhu *Globodera rostochiensis* ve srovnání s výsledky od Zouhara a kol. (2010b).

Addabbo et al. (2012) zkoumali, jaký má vliv na háďátka rostlina *Medicago sativa*, konkrétně látky které obsahuje, což jsou saponiny. Zjistili, že mají biocidní účinky na různé půdní mikroorganismy, z nichž nejpodstatnější jsou háďátka. Testován byl vliv této rostliny konkrétně na háďátka *Meloidogyne incognita*, *Globodera rostochiensis* a *Xiphinema index*. Nejvíce náchylný druh háďátka byl *Globodera rostochiensis*, avšak u všech druhů háďátek byla zaznamenána účinnost této rostliny.

V dnešní době je pro zemědělce velká výzva používání alternativních způsobů ochrany rostlin zvláště vzhledem ke zvýšeným požadavkům na bezpečnost potravin, zvířat a ochrany životního prostředí. Velice pozitivní u botanických pesticidů, zejména pak u botanických pesticidů druhé generace, je jejich nízká toxicita. Lze také říci, že jejich rezidua jsou pro člověka naprosto neškodná, v některých případech působí i pozitivně na jeho zdraví (Pavela, 2011). Rozvoj tak zvaných přírodních pesticidů na bázi esenciálních olejů úzce souvisí s událostmi v roce 1996 v USA, kdy byl vydán zákon Food quality protection act. Ten způsobil výrazné omezení používání konvenčních insekticidů, zejména pak organofosfátů a karbamátů. Vzhledem k této skutečnosti se začaly rozvíjet již zmíněné alternativní metody ochrany rostlin na bázi esenciálních olejů (Isman, 2000).

Pesticidy druhé generace jsou vyráběny především z léčivých rostlin, u kterých je již z historie známo, že nemají žádné negativní účinky jak na zdraví člověka, tak na zdraví zvířat. Koul et al. (2008) také uvádějí, že jsou bezpečné, ekologicky šetrné a kompatibilní s životním prostředím. Byly vyvinovány tak, aby byly selektivní k přirozeným nepřítelům a zdravotně nezávadné. Tyto přípravky působí jak kurativně, tak často i preventivně. Jejich selektivnost spočívá v tom, že jsou používány extrakty, které obsahují látky s inhibičním účinkem. Rezidua s tím spojená jsou následně považována za neškodná. Nejobsáhlejší skupinou botanických pesticidů druhé generace jsou aromatické rostliny.

Aktivita esenciálního oleje například z rostliny *Foeniculum vulgare* byla vůči bakteriálním a houbovým patogenům prokázána, ale nebyla tak výrazná jako u esenciálního oleje získaného z rostliny *Coriandrum vulgare* (Lo Cantore et al., 2004). U tohoto oleje byla dokázána i nematocidní účinnost vůči háďátku. V této diplomové práci se esenciální olej z rostliny *Foeniculum vulgare* také příliš neosvědčil, vykazoval nejnižší účinnost ve srovnání s ostatními variantami. Oka et al. (2000) v experimentu zkoumal celkem 27 esenciálních olejů, z nichž dvanáct bylo účinných vůči háďátku *Meloidogyne javanica*. Byla testována koncentrace 1000 $\mu\text{l/l}$, při které většina olejů inhibovalo líhnutí háďátek. Nejúčinnější byly oleje z rostlin *Carum carvi*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha rotundifolia* a *Mentha spicata*. Tento experiment stejně jako tato diplomová práce prokazuje, že esenciální oleje mohou sloužit jako nematocidy. Prostřednictvím kontejnerových testů provedených v rámci této diplomové práce bylo zjištěno, že neúčinnější na háďátko bramborové byla použitá kombinace esenciálních olejů (TVHŘ/A,

TVHŘ/B) získaná z rostlin *Thymus vulgaris* a *Eugenia caryophyllus*. Abd-Elgawad a Omer (1995) testovali nematocidní účinnost esenciálního oleje z *Thymus vulagris* a jeho účinnost potvrdili například i u háďátka *Meloidogyne incognita*. Meyer et al. (2008) testovali vliv esenciálního oleje z rostliny *Eugenia caryophyllus* také u háďátka *Meloidogyne incognita*, přičemž byla jeho nematocidní účinnost také potvrzena.

7 Závěr

Hád'átka bramborové je řazeno mezi významné škůdce brambor. V případě, že je zjištěn jeho výskyt, jsou uplatňována mimořádná karanténní opatření. Tento druh je zapsán také na seznamu A2 EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Je široce rozšířeno jak v České republice, tak po celém světě. Patří mezi cystotvorná hád'átka a v silně zamořených oblastech může způsobit výrazné ztráty na výnosech brambor.

Cílem této práce bylo v literární rešerši charakterizovat hád'átka bramborové, jeho životní cyklus, význam a škodlivost, morfologii a možnosti jeho diagnostiky. Dále byly v teoretické části popisovány metody ochrany rostlin proti tomuto škůdci, z nichž nejdětalněji byly popsány nechemické metody včetně použití rostlinných esencí.

V praktické části této práce byl proveden kontejnerový test ve skleníku s řízenými podmínkami, který je certifikovaný pro práci s karanténními organismy. Bylo založeno celkem devět variant (kontrola, FV/A, FV/B, PA/A, PA/B, TVHŘ/A, TVHŘ/B, TAO/A, TAO/B), které byly vždy pětkrát opakovány. V kontejnerovém testu bylo zkoušeno celkem pět esenciálních olejů, z nichž dva oleje byly testovány v kombinaci a to ve dvou různých formulacích. Součástí praktické části bylo také provedení preparace cysty hád'átka bramborového, na jejímž základě jsou zjištěny nejdůležitější poznávací znaky tohoto druhu, které se následně využívají k diagnostice na základě morfologických znaků. V rámci praktické části byla provedena také PCR společně s elektroforézou, která prokázala, že se jedná skutečně o druh hád'átka bramborového.

Z výsledků experimentu je zřetelné, že většina esenciálních olejů měla vliv na mortalitu hád'átka bramborového. Každý esenciální olej měl jinou účinnost. Nejúčinnější byla však varianta, ve které byla použita kombinace dvou esenciálních olejů (TVHŘ/A, TVHŘ/B), které jsou získány z rostlin *Thymus vulgaris* a *Eugenia caryophyllus*. Byla zjištěna také velmi zajímavá skutečnost, že účinnost esenciálního oleje nezáleží jen na jeho druhu, ale i na formulaci, ve které je použit. Tato skutečnost se potvrdila u esenciálního oleje získaného z rostliny *Foeniculum vulgare* (FV), kdy formulace FV/A byla o poznání účinnější než formulace FV/B, u které nebyla prokázána žádná účinnost na mortalitu hád'átka bramborového.

Díky získaným výsledkům lze říci, že esenciální oleje mají velký potenciál jako alternativní ochrana vůči háďátku bramborovému. Nejsou však v současné době testovány na větších pěstebních plochách, což je způsobeno i díky tomu, že tento druh háďátka podléhá karanténním opatřením. Proto bych doporučila zaměřit se na výzkum dalších rostlinných esencí, u kterých byla dosud zjištěna účinnost například u jiných druhů háďátek. Dále by se měl výzkum zaměřit také na detailnější testování formulací jednotlivých esenciálních olejů, protože i ty mají významný vliv na jejich účinnost.

Nejdůležitější a zároveň nejúčinnější metodou ochrany brambor je v současné době pěstování rezistentních odrůd k háďátku bramborovému. V budoucnu však může dojít vlivem opakovaného používání totožných odrůd k selekci jeho agresivnějších patotypů a jeho následné rezistenci, proto je důležité vyvíjet další alternativní metody, jako jsou esenciální oleje, které by mohly do budoucna tento problém vyřešit.

8 Seznam literatury

8.1 Odborná literatura

- Abd-Elgawad, M. M., Omer, E. A. 1995. Effect of essential oils of some medicinal plants on phytonematodes. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*. 68(4). 82-84.
- Adams, R. P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation. USA. 804 p. ISBN: 9781932633214.
- Al-Bayati, F. A. 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of ethnopharmacology*. 116(3). 403-406.
- Andrés, M. F., Alonso, R., Alemany, A. 2006. First report of *Globodera rostochiensis* in Mallorca Island, Spain. *Plant Disease*. 90(9). 1262-1262.
- Arabhosseini, A., Huisman, W., Van Boxtel, A., Müller, J. 2009. Modeling of thin layer drying of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Industrial crops and products*. 29(1). 53-59.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils– a review. *Food and chemical toxicology*. 46(2). 446-475.
- Bulletin OEPP. PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. 2009. Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes/European and Mediterranean Plant Protection Organization. 20 p.
- Cannon, O. S. 1941. *Heterodera schachtii* found in a Long Island potato field. *Plant Disease Report*. 25. 408.
- Cronin, D., Moëgne-Loccoz, Y., Dunne, C., O'gara, F. 1997a. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chitinase-producing bacteria. *European Journal of Plant Pathology*. 103(5). 433-440.

- Cronin, D., Moenne-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D. N., O'gara, F. 1997b. Role of 2,4- diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(4). 1357-1361.
- Čepl, J., Čížek, M., Doležal, P., Domkářová, J., Hamouz, K., Hausvater, E., Kasal, P., Lachman, J., Rasocha, V., Urbancová, M., Vokál, B. 2009. Konzumní brambory na poli, zahradě a v kuchyni. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod. 206 s. ISBN: 978-80-86940-23-0.
- Česko. Vyhláška č. 215/2008 Sb., o opatřeních proti zavlékání škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů. In: Sbíрка zákonů České republiky. 2008. částka 68. s. 3062. Dostupné také z <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_Vyhlaska-2008-215-rostlinolekarskapece.html>
- Česko. Vyhláška č. 75/2010 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření hád'átka bramborového a hád'átka nažloutlého a o změně vyhlášky č. 332/2004 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření původce. In: Sbíрка zákonů České republiky. 2010. částka 27. s. 882. Dostupné také z <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2010-75.html>
- D'Addabbo, T., Carbonara, T., Leonetti, P., Radicci, V., Tava, A., Avato, P. 2011. Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. *Phytochemistry Reviews*. 10(4). 503-519.
- Decker, H. 1969. *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin. 526 s. ISBN: 10117510669.
- Douda, O., Zouhar, M. 2008. Alternativní ochrana zeleniny vůči fytoparazitickým hád'átkům rodu *Ditylenchus* a *Meloidogyne*. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 25 s. ISBN: 9788074270048.

- Douda, O., Zouhar, M., Nováková, J. 2010. Nematofágní mikroskopické houby. *Zahradnictví*. 9 (2). 28 – 29.
- Douda, O., Zouhar, M., Mazáková, J., Nováková, J. 2011. *Arthrobotrys oligospora* jako alternativní bioagens proti *Meloidogyne hapla* (certifikovaná metodika). Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. 36 s. ISBN: 9788021322509.
- Douda, O., Zouhar, M., Pavela, R., Gaar, V. 2014. Rostlinné extrakty jako alternativní nematocidy. *Úroda*. 62 (5). 68-70.
- Douda, O., Zouhar, M., Renčo, M., Marek, M. 2014. Molecular and morphological exploration of a mixed population of two potato-parasiting nematode species, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Helminthologia*. 51(1). 3-6.
- Dušková, L., Kopřiva, J. 2009. Ochrana rostlin proti chorobám a škůdcům. Grada Publishing. Praha 7. 95 s. ISBN: 9788024764627.
- Engelmann, C. 1943. Der Einfluss einiger Warmegrade auf die Bewegungs- und Befallsfähigkeit des Kartoffelnematoden. In: Decker, H. 1969. *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin. 526 s. ISBN: 10117510669.
- Gökçe, A., Er, M. K. 2005. Pathogenicity of *Paecilomyces* spp. to the glasshouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, with some observations on the fungal infection process. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 29 (5). 331-340.
- Grainger, J., Clark, M. R. M. 1963. Interactions of *Rhizoctonia* and potato root eelworm. In: Decker, H. 1969. *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin. 526 s. ISBN: 10117510669.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food chemistry*. 83(3). 371-382.
- Hamouz, K. 1994. Základy pěstování konzumních a průmyslových brambor. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR. Praha. 56 s. ISBN: 8071050903.

- Ho, S. H., Cheng, L. P. L., Sim, K. Y., Tan, H. T. W. 1994. Potential of cloves (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry) as a grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Postharvest Biology and Technology*. 4(1-2). 179-183.
- Ibrahim, S. K., Haydock, P. P. J. 1999. Cadusafos inhibits hatching, invasion, and movement of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Journal of nematology*. 31(2). 201.
- Insunza, V., Alström, S., Eriksson, K. B. 2002. Root bacteria from nematicidal plants and their biocontrol potential against trichodorid nematodes in potato. *Plant and Soil*. 241(2). 271-278.
- Isman, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*. 19(8). 603-608.
- Iverson, L. G. 1972. Golden nematode-infestation found in Mexico. *American Journal of Potato Research*. 49(7). 281-281.
- Jones, F. G. W. 1966. The population dynamics and population genetics of the potato cyst nematode *Heterodera rostochiensis* Woll. on susceptible and resistant potatoes. In: Decker, H. 1969. *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin. 526 s. ISBN: 10117510669.
- Jursík, M. 2011. *Plevelé: biologie a regulace*. Kurent. České Budějovice. 232 s. ISBN: 9788087111277.
- Kaur, G. J., Arora, D. S. 2009. Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC complementary and alternative medicine*. 9(1). 30.
- Kazda, J. 2014. *Škůdci polních plodin*. Profi Press. Praha. 116 s. ISBN: 9788086726618.
- Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., Farah, H. 2008. Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*. 32(1). 51-55.

- Kiewnick, S., Sikora, R. A. 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological control*. 38 (2). 179-187.
- Kim, H. M., Lee, E. H., Hong, S. H., Song, H. J., Shin, M. K., Kim, S. H., Shin, T. Y. 1998. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 60(2). 125-131.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53(24). 9452-9458.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Kustrak, D. A. N. I. C. A. 2005. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., *Apiaceae*). *Acta Pharmaceutica-Zagreb*. 55(4). 377.
- Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G. S. 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopestic*. 4(1). 63-84.
- Krčmář, M., Břicháček, B. 1993. Molekulárně biologické metody ve virologické diagnostice. In: Zouhar, M., Gaar, V. 2003. Základní metody diagnostiky a determinace karanténních druhů háďátek z rodu *Globodera* (*G. Rostochiensis* a *G. Pallida*) pro potřebu praxe (Metodika pro praxi). Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. 70 s. ISBN: 8021310871.
- Kutnar, F. 2005. Malé dějiny brambor. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod. 216 s. ISBN: 8090256791.
- Lee, K. G., Shibamoto, T. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chemistry*. 74(4). 443-448.
- Lee, S. J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K. G. 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*. 91(1). 131-137.

- Lo Cantore, P., Lacobellis, N. S., De Marco, A., Capasso, F., Senatore, F. 2004. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. vulgare (Miller) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52(26). 7862-7866.
- Marks, R. J., Brodie, B. B. (Eds.). 1998. Potato cyst nematodes: biology, distribution and control. CABI. Wallingford. 395 p. ISBN: 0851992749.
- Martini, H., Weidenbörner, M., Adams, S., Kunz, B. 1996. Eugenol and carvacrol: the main fungicidal compounds in clove and savory. *Italian journal of food science*. 8(1). 63-67.
- Mendoza, A. R., Sikora, R. A., Kiewnick, S. 2007. Influence of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 on the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* in banana. *Nematropica*. 37 (2). 203-214.
- Meyer, S. L., Lakshman, D. K., Zasada, I. A., Vinyard, B. T., Chitwood, D. J. 2008. Dose–response effects of clove oil from *Syzygium aromaticum* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Pest management science*. 64(3). 223-229.
- Mikulka, J. 2014. Plevelé polních plodin. Profi Press. Praha. 179 s. ISBN: 9788086726601.
- Morton, O. C., Hirsch P. R., Kerry B. R. 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi– a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology*. 6 (2). 161-170.
- Nickle, W. R. (Ed.). 1991. *Manual of Agricultural Nematology*. CRC Press. New York. 1064 p. ISBN: 0824783972.
- Ntalli, N. G., Caboni, P. 2012. Botanical nematicides in the mediterranean basin. *Phytochemistry reviews*. 11(4). 351-359.
- Obolskiy, D., Pischel, I., Feistel, B., Glotov, N., Heinrich, M. 2011. *Artemisia dracunculus* L. (tarragon): A critical review of its traditional use, chemical composition, pharmacology, and safety. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59(21). 11367-11384.

- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z., Spiegel, Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*. 90(7). 710-715.
- Özbek, H., Uğraş, S., Dülger, H., Bayram, I., Tuncer, I., Öztürk, G., Öztürk, A. 2003. Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoterapia*. 74(3). 317-319.
- Pavela, R. 2006. Rostlinné insekticidy: hubíme hmyz bez chemie. Grada Publishing. Praha 7. 76 s. ISBN: 8024710196.
- Pavela, R. 2011. Botanické pesticidy. Kurent. České Budějovice. 128 s. ISBN: 9788087111260.
- Petříková, K., Hlušek, J. 2012. Zelenina: pěstování, výživa, ochrana a ekonomika. Profi Press. Praha. 191 s. ISBN: 9788086726502.
- Pineda, O., Bonierbale, M. W., Plaisted, R. L., Brodie, B. B., Tanksley, S. D. 1993. Identification of RFLP markers linked to the H1 gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Genome*. 36(1). 152-156.
- Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. 2009. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of medical mikrobiology*. 58(11). 1454-1462.
- Potoček, J. 1992. Ochrana proti šíření rakoviny brambor a hád'átka bramborového. Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství. Praha. 24 s.
- Potoček, J., Gaar, V., Perlova, V. 1991. Problems of potato cyst nematode pathotypes in the Czech Republic. *EPPO Bulletin*. 21(1). 81-86.
- Pourgholami, M. H., Majzoob, S., Javadi, M., Kamalinejad, M., Fanaee, G. H. R., Sayyah, M. 1999. The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 66(2). 211-215.
- Preedy, V. R. (Ed.). 2015. Essential oils in food preservation, flavor and safety. Elsevier. London. 893. ISBN: 9780124166417.

- Reddy, M. B., Angers, P., Gosselin, A., Arul, J. 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*. 47(8). 1515-1520.
- Reinmuth, E. 1929. Der Krtoffelnematode (*Heterodera schachtii* Schm.). In: Decker, H. 1969. *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin. 526 s. ISBN: 10117510669.
- Robinson, M. P., Atkinson, H. J., Roland, N. 1987. The influence of temperature on the hatching, activity and lipid utilization of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Revue Nématol.* 10(3). 349-354.
- Rosypal, S. 2000. Úvod do molekulární biologie. Brno. 289 s. ISBN: 8009256252.
- Sangwan, N. K., Verma, B. S., Verma, K. K., Dhindsa, K. S. 1990. Nematicidal activity of some essential plant oils. *Pesticide Science*. 28(3). 331-335.
- Siddiqi, M. R. 2000. *Tylenchida: Parasites of Plants and Insects*. CABI Publishing. New York. 833 p. ISBN: 0851987583.
- Soukup, J., Holec, J., Vejl, P., Skupinová, S., Sedlák, P. 2002. Diversity and distribution of weed beet in the Czech Republic. *Zeitschrift für pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz-sonderheft*. 18. 67-74.
- Spears, J. F. 1968. *The golden nematode handbook*. U. S. Government Printing Office. Washington, D. C. 86 p.
- Stelter, H., Raeuber, A. 1959. Untersuchungen über den Kartoffelnematoden (*Heterodera rostochiensis* Wollenweber) Die Veränderung einer Nematodenpopulation unter dem Einfluß widerstandsfähiger und anfälliger Kartoffel-Varietäten in einjährigen Topfversuchen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten (Pflanzenpathologie) und Pflanzenschutz*. 572-582.

- Sun, F., Miller, S., Wood, S., Côté, M. J. 2007. Occurrence of potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, on potato in the Saint-Amable region, Quebec, Canada. *Plant Disease*. 91(7). 908-908.
- Táborský, V., Šedivý, J. 1997. Rostlinolékařství: učebnice pro střední zemědělské školy. Credit . Praha. 347 s. ISBN 8090229522.
- Tunc, I., Berger, B. M., Erler, F., Dağlı, F. 2000. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*. 36(2). 161-168.
- Vokál, B., Bárta, J., Bártová, V., Čepl, J., Čížek, M., Doležal, P., Domkářová, J., Dohanyos, M., Faltus, M., Greplová, M., Hamouz, K., Hausvater, E., Homolka, P., Horáčková, V., Hůla, J., Kasal, P., Kopačka, V., Koukalová, V., Mayer, V., Melzoch, K., Opatrný, Z., Patáková, P., Paulová, L., Polzerová, H., Rajchl, A., Rychtera, M., Šantrůček, L., Šárka, E., Ševčík, R., Tajovský, M., Vejchar, D., Zámečník, J. 2013. Brambory: šlechtění – pěstování – užití – ekonomika. Profi Press. Praha. 160 s. ISBN: 9788086726540.
- Vokál, B., Cvrček, M., Čepl, J. 2000. Brambory. Agrospoj. Praha. 245 s.
- Wollenweber, H. W. 1923. Krankheiten und Beschädigungen der Kartoffel. Arbeiten des Forschungsinstitutes für Kartoffelbau. In: Decker, H. 1969. *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin. 526 s. ISBN: 10117510669.
- Zimmerman, H. 1914, Bericht der Hauptstelle für Pflanzenschutz in Mecklenburg- Schwerin und Mecklenburg- Strelitz für das Jahr 1913. In: Decker, H. 1969. *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin. 526 s. ISBN: 10117510669.
- Zouhar, M. 2002. Metodická příručka pro diagnostiku karanténních háďátek rodů *Globodera*, *Meloidogzne* a *Ditylenchus*. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. 44 s. ISBN: 8021308737.
- Zouhar, M., Gaar, V. 2003. Základní metody diagnostiky a determinace karanténních druhů háďátek z rodu *Globodera* (*G. Rostochiensis* a *G. Pallida*) pro potřebu praxe (Metodika pro praxi). Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. 70 s. ISBN: 8021310871.

Zouhar, M., Ryšánek, P., Kočová, M. 2000. Detection and differentiation of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* by PCR. Plant Protection Science. 36(3). 81-84.

Zouhar, M., Douda, O., Mazáková, J., Nováková, J., Urban, J. 2010a. Predikce nematofágní aktivity půdních hub (certifikovaná metodika). Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. 32 s. ISBN: 9788021321526.

Zouhar, M., Douda, O., Novotný, D., Nováková, J., Mazáková, J. 2010b. Evaluation of the pathogenicity of selected nematophagous fungi. Czech Mycology. 61 (2). 139 - 147.

8.2 Webové stránky

Anonym 1: Eagri [online]. [cit. 2017- 01-12]. Dostupné z <<http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/dokumenty-a-publikace/vyrocnizpravy/vyrocnizpravy-cinnost/index-4.html>>

Anonym 2: Genetika- biologie [online]. [cit. 2017- 02-03]. Dostupné z <<http://www.genetika-biologie.cz/nukleove-kyseliny>>.

Anonym 3: Eagri [online]. [cit. 2017- 02-03]. Dostupné z <<http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx>>.

Anonym 4: Eagri [online]. [cit. 2017- 02-10]. Dostupné z <<http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/skodlive-organismy/vnitri-trh-eu/vnitri-trh-eu/odrudy-odolne-proti-skodlivym-organismum/odrudy-bramboru-cr-2011.html>>

Anonym 5: Nemaplex [online]. [cit. 2017- 02-10]. Dostupné z <<http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/images/Papp%20Golden%20Orig.jpg>>

Biolib [online]. [cit. 2017- 02-03]. Dostupné z <<http://www.biolib.cz/cz/taxon/id41129/>>

Cabi [online]. [cit. 2017- 02-03]. Dostupné z <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/27034>>.

EPPO Global Database [online]. [cit. 2017- 02-13]. Dostupné z <<https://gd.eppo.int/taxon/HETDRO>>.

Kuthan, A., Trubská. Biopesticidy u nás a ve světě [online]. Agromanuál. 15. února 2017 [cit. 2017- 03-01]. Dostupné z <<http://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/ochrana-obecne/biopesticidy-u-nas-a-ve-svete>>.

Vondrášková, Š. Ochrana proti hád'átkům v zahradnictví [online]. Agronavigátor. 14. července 2005 [cit. 2017- 02-15]. Dostupné z <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=1&typ=1&val=37676&ids=111>>.

9 Seznam příloh

Vyhláška 1	67
Vyhláška 2	71
Tabulka 1: Morfologické a morfometrické znaky <i>Globodera rostochiensis</i> a <i>Globodera pallida</i>	78
Tabulka 2: Seznam odrůd bramboru odolných proti háďátku bramborovému (anonym 4)	79
Tabulka 3: Procentuální složení použitých esenciálních olejů (adams, 2007)	78
Tabulka 4: Přehled napočítaných cyst háďátka bramborového v jednotlivých variantách kontejnerového testu	81
Obrázek 1: Stylet druhého vývojového stádia	82
Obrázek 2: Počet kutikulárních linií	82
Obrázek 3: Tvar hlavové části a ocasu L2	82
Obrázek 4: Cirkumfenestrální typ cysty	78
Obrázek 5: Odlišnosti v tvaru cysty	78
Obrázek 6: Zásady práce s karanténními organismy na Katedře ochrany rostlin	79
Obrázek 7: Životní cyklus háďátka bramborového	80
Obrázek 8: sítko na vyplavené cysty	81
Obrázek 9: 3 sítko s různou velikostí ok	81
Obrázek 10: Fenwickova konev	81
Obrázek 11: Vysušená zemina	81
Obrázek 12: stříčka	81
Obrázek 13: kýbl na karanténní zeminu	81
Obrázek 14: Proplavování zeminy	82
Obrázek 15: Vyplavená zemina	83
Obrázek 16: Vyplavená zemina	83
Obrázek 17: Sterilizátor Sanyo MLS 3750/3780	83
Obrázek 18: Stereomikroskop Olympus SZ61	83
Obrázek 19: počítadlo a nematologická jehla	83
Obrázek 20: pomůcky k proužkové metodě	83
Obrázek 21: kádinka s filtračním papírem	83
Obrázek 22: stereomikroskop SZ 61	84
Obrázek 23: filtrační papír s vyplavenými cystami a zeminou	84
Obrázek 24: Esenciální oleje od firmy Salus	84
Obrázek 25: Tarragon oil od firmy Sigma- Aldrich	84
Obrázek 26: Zkumavky se spočítanými cystami a vysušenou a vysušenou zeminou	84
Obrázek 27: pipeta	85
Obrázek 28: Podložka pro mikrozukumavky	85
Obrázek 29: umělohmotný tlouček	85
Obrázek 30: termoblok	85
Obrázek 31: chemikálie použité při izolaci DNA z cyst háďátka	85
Obrázek 32: PCR zkumavky v podložce	85
Obrázek 33: termocykler PTC 200	86

Obrázek 34: Vortex Genius 3	86
Obrázek 35: centrifuga UNIVERSAL 320 R	86
Obrázek 36: centrifuga MICROSPIN FV- 2400	86
Obrázek 37: elektroforetická forma na gel	87
Obrázek 38: elektroforetická cela	87
Obrázek 39: UV Transluminátor	87
Obrázek 40: destička, kde byla smíchána nanášecí barva s PCR produktem	87
Obrázek 41: centrifuga Wealtec , E- Centrifuge	87
Obrázek 42: rozvařený elektroforetický gel	87
Obrázek 43: Hád'átka bramborové- detail styletu	88
Obrázek 44: Hád'átka bramborové- celý jedinec	88
Obrázek 45: Embryony z jedné cysty hád'átka bramborového	89
Obrázek 46: cysty hád'átka bramborového nacházející se v zemině	89
Obrázek 47: Detail embryonů hád'átka bramborového	90
Obrázek 48: Detail hád'átka bramborového	90
Obrázek 49: Kontejnerový test	91
Obrázek 50: náchylný jedinec bramboru	91
Obrázek 51: Pytlíček na cysty hád'átka bramborového	91
Obrázek 52: Kontejnerový test ve skleníku certifikovaném pro práci s karanténními organismy	91
Obrázek 53: fenestrální část cysty (zadní vulvální konec)	92
Obrázek 54: vnitřní okénko vulvy přeměněné samičky hád'átka bramborového v cystu	92
Obrázek 55: Vnější okénko vulvy přeměněné samičky hád'átka bramborového v cystu	93
Obrázek 56: anus přeměněné samičky hád'átka bramborového v cystu	93

10 Přílohy

10.1 Vyhlášky

Vyhláška 1

Vyhláška č. 215/2008 Sb., o opatřeních proti zavlékání škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů

Nadřazeným předpisem pro tuto vyhlášku je Zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů.

§ 1

Předmět úpravy a základní pojmy

(1) Tato vyhláška zapracovává příslušné předpisy Evropské unie a upravuje opatření proti zavlékání a rozšiřování škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů.

(2) Pro účely této vyhlášky se rozumí

a) Patotypem geneticky ustálený soubor jedinců jednoho druhu škodlivého organismu, který se svými vlastnostmi liší od jiného geneticky ustáleného souboru jedinců téhož druhu.

§ 5

Povolování nakládání s karanténním materiálem

(K § 8 odst. 1, 2 a 4 zákona)

(1) Povolit dovoz, přemístění a přechovávání škodlivých organismů, rostlin, rostlinných produktů a jiných předmětů podle § 8 odst. 1 zákona (dále také jen „karanténní materiál“) a manipulaci s nimi může Ústav jedině za předpokladu, že je vyloučeno zjiřitelné nebezpečí šíření škodlivých organismů uvedených v § 3 odst. 1 až 3.

(2) Nebezpečí šíření škodlivých organismů uvedených v odstavci 1 při jejich dovozu, přemístování, přechovávání a manipulaci s nimi anebo při dovozu, přemístování, přechovávání rostlin, rostlinných produktů a jiných předmětů a manipulaci s nimi posuzuje Ústav na základě:

- a) dostupných současných vědeckých poznatků o příslušných škodlivých organismech, zejména o jejich biologii a schopnosti aktivního šíření,
- b) zhodnocení odborných a technických předpokladů dovozce nebo příjemce zásilky nebo dodávky nebo osoby, která příslušné škodlivé organismy dováží, přemísťuje nebo přechovává, k zamezení jejich rozšíření,
- c) šetření provedeného v případě potřeby v zemi původu zásilky,
- d) vyloučení možnosti skrytého napadení příslušnými škodlivými organismy vhodnými metodami včetně laboratorního testování.

(5) V místech a zařízeních, v nichž se karanténní materiál přechovává, rozmnožuje nebo se s ním jinak manipuluje, musí být zajištěno, aby všechny škodlivé organismy byly pod kontrolou a aby se zamezilo možnosti jejich úniku. Pro každou činnost uvedenou v žádosti podle odstavců 3 a 4 musí být Ústavem stanoveno riziko možnosti úniku škodlivých organismů uvedených v odstavci 1, vzhledem k typu karanténního materiálu a předpokládané činnosti, biologii škodlivých organismů, ke způsobům jejich šíření, k jejich interakci s okolím a k jiným důležitým faktorům spojeným s riziky, která vykazuje karanténní materiál.

§ 9

Oznamování výskytu škodlivých organismů Evropské komisi

(K § 10 odst. 5 zákona)

Ústav oznamuje Evropské komisi (dále jen „Komise“) a ostatním členským státům Evropské unie jakýkoliv výskyt

- a) škodlivých organismů uvedených v příloze č. 1 části A oddílu I a v příloze č. 2 části A oddílu I k této vyhlášce na území České republiky,
- b) škodlivých organismů uvedených v příloze č. 1 části A oddílu II nebo části B a v příloze č. 2 části A oddílu II nebo části B k této vyhlášce na té části území České republiky, na níž jejich výskyt dosud nebyl znám.

Příloha 1

Škodlivé organismy, jejichž zavlékání a rozšiřování je zakázáno

ČÁST A

Škodlivé organismy, jejichž zavlékání a rozšiřování na území Evropské unie je zakázáno

Oddíl II

Škodlivé organismy, které se vyskytují v Evropské unii a jsou závažné pro celou Evropskou unii

a) Hmyz, roztoči a hlístice ve všech stádiích vývoje

0.01. *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Bührer) Nickle et al.

1. *Globodera pallida* (Stone) Behrens

2. *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens

6.1. *Meloidogyne chitwoodi* Golden et al. (všechny populace)

6.2. *Meloidogyne fallax* Karssen

7. *Opogona sacchari* (Bojer)

8. *Popillia japonica* Newman

8.1. *Rhizoecus hibisci* Kawai & Takagi

9. *Spodoptera littoralis* (Boisduval)

10. *Trioza erythrae* Del Guercio

Příloha 5

Podmínky pro přechovávání a jiné manipulace se škodlivými organismy, rostlinami, rostlinnými produkty a jinými předměty, pro pokusné a vědecké účely nebo pro práci ve šlechtění odrůd

a) Obecné zásady pro zacházení s karanténním materiálem:

- 1) technická izolace od jiných rostlin nebo škodlivých organismů zahrnující i ochranu rostlin v přilehlé oblasti,
- 2) jmenování osoby odpovědné za veškeré činnosti spojené s manipulací s karanténním materiálem,
- 3) omezení přístupu do vymezených prostor a zařízení, popřípadě, je-li to účelné, i do přilehlé oblasti, který je povolen pouze oprávněným jmenovaným osobám,
- 4) vhodné označení vymezených prostor a zařízení udávající druh činnosti a osobní odpovědnost,
- 5) vedení záznamů o vykonaných činnostech a metodiky pracovních postupů, včetně postupů pro případ úniku škodlivých organismů,
- 6) vhodný bezpečnostní a poplachový systém,
- 7) vhodná ochranná opatření k zamezení proniknutí škodlivých organismů do vymezených prostor a zařízení a jejich šíření v nich,
- 8) ochranná opatření pro vzorkování karanténního materiálu a jeho přemísťování v rámci vymezených prostor,
- 9) ochranná opatření pro nakládání s odpadem, použitou zeminou a vodou, jsou-li potřebná, včetně zajištění vhodného vybavení k jejich likvidaci,
- 10) vhodné dezinfekční a hygienické postupy a vybavení pro osoby, prostory a zařízení,
- 11) vhodná opatření a vybavení pro likvidaci pokusného materiálu,
- 12) vhodné vybavení, prostory a postupy pro indexování, včetně testování.

Vyhláška 2

Vyhláška č. 75/2010 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření hád'átka bramborového a hád'átka nažloutlého a o změně vyhlášky č. 332/2004 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření původce rakoviny bramboru, hád'átka bramborového a hád'átka nažloutlého

Nadřazeným předpisem pro tuto vyhlášku je Zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů.

§ 1

Předmět úpravy

Tato vyhláška zapracovává právní předpisy Evropské unie a upravuje opatření, která se uplatňují na území České republiky proti zavlékání a šíření hád'átka bramborového (*Globodera rostochiensis* Woll.) a hád'átka nažloutlého [*Globodera pallida* (Stone) Behrens] (dále jen „hád'átko“).

§ 2

Pojmy

Pro účely této vyhlášky se rozumí

a) hostitelskými rostlinami - rostliny bramboru *Solanum tuberosum* L., rostliny s kořeny papriky *Capsicum* spp., rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L. a lilku vejcoplodého

Solanum melongena L.,

b) podezřením z výskytu hád'átka - stav po zjištění příznaků jeho možné přítomnosti na hostitelské rostlině anebo v zemině či jiném pěstebním substrátu (dále jen „zemina“) trvající do doby, než je výskyt potvrzen nebo vyvrácen odborným šetřením,

c) odborným šetřením - ověření výskytu hád'átka včetně ověření jeho patotypu, zjištění původu výskytu hád'átka, posouzení možností jeho šíření a případné provedení vymezení průzkumu,

- d) výskytem háďátka - zjištění přítomnosti alespoň jedné cysty háďátka ve vzorku zeminy, jejichž životnost byla prokázána biologickým testem nebo nálezem živých embryonů nebo larev tohoto háďátka v cystě, nebo zjištění alespoň jedné háďátkem napadené rostliny nebo její části,
- e) agresivním patotypem háďátka - patotyp háďátka, schopný napadat odrůdy brambor rezistentní proti háďátku bramborovému (*Globodera rostochiensis* Woll.) patotypu Ro1 a rozmnožovat se na nich,
- f) odrůdou bramboru rezistentní proti určitému patotypu háďátka - odrůda bramboru, která, je-li pěstována, způsobuje přirozený meziroční pokles populace tohoto patotypu,
- g) pozemkem - přirozená část zemědělské půdy vymezená druhem půdy nebo oddělená od sousedních pozemků rozhraním způsobu využití pozemku,
- h) zamořeným pozemkem nebo objektem - pozemek nebo objekt, na kterém nebo ve kterém byl zjištěn a ověřen výskyt háďátka,
- i) pozemkem nebo objektem podezřelým ze zamoření - pozemek nebo objekt, na který nebo do kterého se pravděpodobně rozšířila nebo mohou rozšířit háďátka,
- j) úředně stanovenou oblastí - katastrální území mimo uzavřenou pěstební oblast,
- k) velkým stravovacím střediskem - zařízení pro hromadné stravování osob, ve kterém při zužitkování konzumních brambor z území dotčeného mimořádným rostlinolékařským opatřením nařízeným z důvodu výskytu háďátka je zajištěno zpracování odpadů v souladu s bodem C písm. b) přílohy č. 6 k této vyhlášce.

§ 3

Preventivní opatření

(1) Rozmnožovací materiál bramboru, určený k uvádění na trh, je možno pěstovat jen na pozemku, na kterém byl v souladu s § 10 odst. 1 zákona v době od poslední sklizně brambor do výsadby porostu bramboru určeného k výrobě rozmnožovacího materiálu proveden průzkum výskytu háďátka s negativním výsledkem, a to odběrem a testováním vzorků zeminy z pozemku podle přílohy č. 2 k této vyhlášce. Provedení tohoto průzkumu a jeho negativní výsledek je

jedním z požadavků na vlastnosti pozemku, na kterém bude rozmnožovací materiál bramboru pěstován, a je podmínkou pro uznání množitelského porostu bramboru podle jiného zákona.

(3) Rostliny určené k pěstování uvedené v příloze č. 1 k této vyhlášce a určené k uvádění na trh je možno pěstovat jen na pozemku, na kterém byl v souladu s § 10 odst. 1 zákona v období mezi sklizní poslední plodiny na pozemku a výsadbou rostlin uvedených v příloze č. 1 k této vyhlášce proveden průzkum výskytu hád'átka s negativním výsledkem, a to odběrem a testováním vzorků zeminy z pozemku podle přílohy č. 2 k této vyhlášce. Průzkum může být proveden i dříve, je-li dokladován potvrzením, že výskyt hád'átka tímto průzkumem nebyl zjištěn a že hostitelské rostliny nebyly od doby provedení průzkumu na tomto pozemku pěstovány. U rostlin určených k pěstování uvedených v bodě 2 přílohy č. 1 k této vyhlášce může být tento průzkum nahrazen ověřením, že:

- a) za posledních 12 let neexistuje žádný záznam o výskytu hád'átka na uvedeném pozemku založený na výsledcích příslušného úředně schváleného testování, nebo
- b) existují záznamy o pěstování plodin, podle nichž na uvedeném pozemku nebyly za posledních 12 let pěstovány hostitelské rostliny.

(6) Přechovávání hád'átka je v souladu s § 7 odst. 1 zákona zakázáno s výjimkou přechovávání k vědeckým, šlechtitelským nebo diagnostickým účelům, které povoluje Ústav podle § 8 odst. 1 zákona, pokud tím nebudou narušena ochranná opatření při výskytu hád'átka ani nevznikne riziko jeho šíření.

§ 4

Zjišťování a evidence výskytu hád'átka

(1) Výskyt hád'átka zjišťuje Ústav průzkumem v souladu s § 10 odst. 1 zákona a soustavnou rostlinolékařskou kontrolou v souladu s § 15 odst. 2 zákona, a to:

- a) kontrolou porostů hostitelských rostlin, nebo
- b) odběrem a testováním vzorků zeminy.

(2) Rozsah a způsob prohlídky porostů hostitelských rostlin a způsob odběru vzorků rostlin a zeminy a metody jejich rozboru nebo testování a rozsah použití těchto metod stanovuje Ústav úředním sdělením ve Věstníku na základě vědeckých a statistických zásad a biologie hád'átka, s přihlédnutím k systémům produkce hostitelských rostlin a k aktuální situaci ve výskytu anebo k míře rizika zavlečení hád'átka. Na pozemcích, kde jsou pěstovány nesadbové brambory, musí rozsah průzkumu výskytu hád'átka dosahovat minimálně 0,5 % výměry nesadbových brambor v příslušném roce.

(3) Výsledky průzkumu výskytu hád'átka oznamuje Ústav písemně jednou ročně ostatním členským státům a Komisi v souladu s § 10 odst. 5 zákona. Výsledky průzkumu na pozemcích, kde byly pěstovány nesadbové brambory, oznamuje Ústav každoročně Komisi do 1. dubna za předcházející vegetační období.

(4) Podezření z výskytu nebo potvrzený výskyt hád'átka v důsledku selhání nebo změny účinnosti rezistence rezistentní odrůdy bramboru, která souvisí s výjimečnou změnou ve skladbě druhu, patotypu nebo skupiny virulence hád'átka, se oznamuje Ústavu v souladu s § 9 a 13 zákona. Ústav zajistí prozkoumání a potvrzení druhu hád'átka a případně daného patotypu nebo skupiny virulence. Podrobné informace o těchto výskytech se každoročně písemně předávají Komisi a ostatním členským státům do 31. Prosince.

Příloha 2

Odběr a testování vzorků

1. Odběr a testování vzorků v rámci průzkumu podle § 3 odst. 1 až 3

a) odběr vzorků zahrnuje vzorek zeminy o standardním objemu alespoň 1500 ml zeminy/ha odebraný z nejméně 100 dílčích vzorků (vrypů) na ha v pravoúhlé souřadnicové síti pokrývající celý pozemek o šířce nejméně 5 metrů a délce nejvíce 20 metrů mezi body odběru vzorků. Celý vzorek se použije pro další zkoumání, tj. pro extrakci cyst, identifikaci druhu a případně i určení patotypu/skupiny virulence; velikost standardního objemu odebraného vzorku se při menší výměře pozemku nemění;

b) testování zahrnuje metody extrakce hád'átka popsané v příslušných rostlinolékařských postupech nebo diagnostických protokolech pro

Globodera pallida a *Globodera rostochiensis*: EPPO standardy.

2. Odběr a testování vzorků v rámci průzkumu podle § 4 odst. 2 - průzkum pozemků nesadbových brambor

a) odběrem vzorků se rozumí:

- odběr vzorků popsáný v bodě 1 s minimálním objemem vzorku zeminy nejméně 400 ml/ha, nebo
- cílený odběr vzorků nejméně 400 ml zeminy po vizuální prohlídce kořenů s viditelnými příznaky, nebo
- odběr vzorků nejméně 400 ml zeminy spojené s hlízami brambor po sklizni za předpokladu, že pozemek, kde byly brambory pěstovány, lze vysledovat;

b) testováním se rozumí testování podle bodu 1.

3. Standardní objem vzorku uvedený v bodě 1 může být snížen na minimálně 400 ml zeminy/ha za předpokladu, že:

- a) existuje doklad, že v posledních šesti letech před průzkumem nebyly na pozemku pěstovány a přítomny brambory ani jiné hostitelské rostliny,
- b) ve vzorcích o objemu 1500 ml zeminy/ha nebyl během posledních dvou po sobě následujících průzkumech zjištěn výskyt hád'átka a po prvním průzkumu nebyly na pozemku pěstovány brambory ani jiné hostitelské rostliny s výjimkou těch, pro něž se podle § 3 vyžaduje průzkum, nebo
- c) při posledním průzkumu, který musel sestávat ze vzorku o objemu nejméně 1500 ml zeminy/ha, nebyl zjištěn výskyt hád'átka ani jeho cyst s živým obsahem a na pozemku nebyly od posledního průzkumu pěstovány brambory ani jiné hostitelské rostliny s výjimkou těch, pro něž se podle § 3 vyžaduje průzkum.

4. Objem vzorku uvedený v bodě 1 pro pozemky větší než 8 ha a vzorku uvedeného v bodě 3 pro pozemky větší než 4 ha může být snížen:

a) u standartního objemu uvedeného v bodě 1 se z prvních 8 ha odeberou vzorky o standartním objemu alespoň 1500 ml zeminy/ha, na každý další hektar lze tento objem snížit na nejméně 400 ml zeminy/ ha, nebo

b) u sníženého objemu uvedeného v bodě 3 se z prvních 4 ha odeberou vzorky o stanoveném objemu minimálně 400 ml zeminy/ha, na každý další hektar lze tento objem dále snížit na nejméně 200 ml zeminy/ha.

5. Vzorky o sníženém objemu uvedené v bodech 3 a 4 se mohou dále používat při následných průzkumech podle §3 odst. 1 až 3, dokud nebude na daném pozemku zjištěn výskyt hád'átka.

6. Standartní objem vzorku zeminy uvedený v bodě 1 lze snížit na nejméně 200 ml zeminy/ha, pokud se pozemek nachází v oblasti shledané prostou výskytu hád'átka a je označen, udržována zkoumán v souladu s příslušnými mezinárodními standardy pro fytozsanitární opatření. Podrobné údaje o takových oblastech se úředně oznámí Komisi a ostatním členským státům písemně.

7. Minimální objem vzorku zeminy musí být v každém případě 200 ml zeminy na pozemek.

Příloha 7

Hubení hád'átka v zamořené zemině

1. Hubení hád'átka se provádí po souhlasu a pod dohledem Ústavu, kterému vlastník nebo uživatel zamořené pozemku či objektu předem oznámí datum provádění jednotlivých zásahů a opatření.

2. Výběr metod hubení a jejich optimální kombinace závisí na místních podmínkách (intenzitě zamoření půdy, velikosti pozemku, nebezpečí dalšího šíření infekce, ekologické situaci, ekonomických možnostech pěstitele aj.). Základem je asanace půdy chemickými prostředky a pomocí rezistentních odrůd bramboru s nejvyšším stupněm rezistence podle oddílu I. přílohy č. 4. Metody hubení hád'átka zveřejňuje Ústav ve Věstníku a písemně předává Komisi a ostatním členským státům EU.

3. Účinnost hubení se ověřuje přezkoušením zamořenosti pozemku či objektu podle § 8.

4. Evidenci o hubení háďátka vede protokolárně Ústav. Protokol obsahuje popis a data všech provedených prací a zakládá se do evidence výskytu háďátka.

10.2 Tabulky

Tabulka 1: Morfologické a morfometrické znaky *Globodera rostochiensis* a *Globodera pallida*

Morfologické a morfometrické znaky <i>Globodera rostochiensis</i> a <i>Globodera pallida</i> dle Subbotin et al. (2010)									
	CYSTY				LARVA DRUHÉHO VÝVOJOVÉHO STUPNĚ				
	Délka	šířka	počet zvrásněných linií	Granekův poměr	vzdálenost anus- okénko	délka těla	stylet	tvár bazální části styletu	Ocas
<i>Globodera rostochiensis</i>	445–690	382–559	17–20	3- 4,5	51–70	392–468	20–22	zaoblený	44–51
<i>Globodera pallida</i>	510–675	451–648	12	2,1- 2,5	48–54	452–486	23–24	zaostřený	50–53

Poznámka: hodnoty jsou uvedeny v μm

Tabulka 2: Seznam odrůd bramboru odolných proti hád'átku bramborovému (Anonym 4)

Seznam odrůd bramboru odolných proti hád'átku bramborovému (patotyp Ro1) registrovaných v ČR pro rok 2017					
Adéla	Bropanna	Granada	Mariannka	Rosara	Verne
Adora	Camilla	Granola	Marketa	Sagitta	Verona
Alice	Capri	Janet	Milva	Saline	Victoria
Amado	Cecile	Jasmina	Miranda	Samantana	Vineta
Ambra	Colette	Jelly	Monika	Sanjava	Vitesse
Annabelle	Courage	Julinka	Mozart	Sarion* ** ***	Vladan
Arabela	Dagmar	Kariera	Nicola	Satina	Vlasta
Arnika	Dali	Karlina	Opal	Secura	Valkýra
Asterix	David	Karo	Panda	Sibu	Vysočina
Axa	Ditta	Koruna	Poutnik	Solara	Westamyl
Baccara	Dominátor	Krasa	Presto	Solo	Zuza
Belana	Dominika	Krumlov	Priamos	Suzan	
Bella	Everest	Lada	Primarosa**	Tomensa	
Bellarosa	Fabia	Laura	Quarta	Valetta	
Berber	Fanchette	Liliana	Rafaela	Valfi	
Bernard	Felsina	Lydia	Ramos	Valmont	
Bettina	Filea	Madona	Ramses	Valy	
Bionta	Finka	Marabel	Red Anna	Velox	
Bohemia	Flavia	Marcela	Red Scarlett	Vendula	
Borek*	Golf	Marena	Roberta	Verdi	
<p>Poznámky: * rovněž odolnost proti hád'átku bramborovému Globodera rostochiensis, patotypu Ro5 ** rovněž odolnost proti hád'átku nažloutlému Globodera pallida, patotypu Pa1 *** rovněž odolnost proti hád'átku nažloutlému Globodera pallida, patotypu Pa3</p>					

Tabulka 3: Procentuální složení použitých esenciálních olejů (Adams, 2007)

Compound	FV	PA	TEO	TV	Compound	HR
Tricyclene					Santene	
α -Thujene				0,35	Tricyclene	
α -Pinene ^C	3,21	0,35	1,70	1,27	β -Thujene	
Camphene	0,13		0,06	1,51	α -Pinene ^C	0,06
2-Hexyl hydroperoxide					d-Camphene	
Sabinene	0,08				Camphene	
β -Pinene ^C	0,36		0,42		2-Hexyl hydroperoxide	
1-Octen-3-ol				0,88	Benzaldehyde	
3-Octanone					Sabinene	
Myrcene ^C	0,53	0,04	0,13	1,34	β -Pinene ^C	0,03
Octanol-3					6-methyl-5-Hepten-2-one	
α -Phellandrene	1,50	0,26			Myrcene ^C	
3-Carene		0,11			Pseudolimonene	
Hexyl acetate					α -Phellandrene	
α -Terpinene ^C				1,09	3-Carene	0,02
Carvomenthene					p-Methylanisole	
p-Cymene ^C	0,16	0,05	0,05	16,40	p-Cymene ^C	
Limonene ^C	5,68	0,34	6,55	0,33	Limonene ^C	
Eucalyptol ^C		0,11		1,29	Eucalyptol ^C	
cis- β -Ocimene			3,87		cis- β -Ocimene	
trans - β -Ocimene			3,96		trans - β -Ocimene	
Dihydro tagetone					Bergamal	
γ -Terpinene ^C	0,12	0,04		5,74	γ -Terpinene ^C	
1-Octanol					Fenchone ^C	
cis-Linalool oxide					trans-Linalool oxide	
Fenchone ^C	5,51				Terpinolene	
trans-Linalool oxide					Linalool ^C	
Terpinolene					α -Thujone	
α -Pinene oxide					cis-Rose oxide	
Linalool ^C		1,00	0,04	4,68	β -Thujone	
2-Methylbutyl 2-methylbutyrate					trans-Rose oxide	
α -Thujone					trans-pinocarveol	
Amyl vinyl carbinol acetate					Camphor ^C	
Fenchol					cis- β -terpineol	
β -Thujone					Isopulegol ^C	
α -Campholenal					Menthone ^C	
3,4-Dimethyl-2,4,6-octatriene					β -Citronellal	
allo-Ocimene					Isomenthone	
trans-pinocarveol					Borneol ^C	
Camphor ^C	0,23			1,87	Menthol ^C	
Isopulegol ^C					Terpinen-4-ol	
Menthone ^C					Verbenol	
trans-Tagetone					Cryptone	
Isoborneol					α -Terpineol	
Isomenthone					Methyl salicylate	
Borneol ^C				1,76	Myrtenol	
Lavandulol					Estragole ^C	
Menthol ^C					Decanal	
Terpinen-4-ol		0,10		1,78	Fenchyl acetate	
Isomenthol					Nerol	

α -Terpineol		0,08	1,66	0,23
1-Hexyl butyrate				
Methyl salicylate				
Dihydrocarveol				
Myrtenol				
cis-Carvone, dihydro-				
γ -Terpineol				
Estragole ^C	4,75	4,38	76,52	
trans-Carvone, dihydro-				
trans-Carveol				
cis-Carveol				
Thymol methyl ether				0,58
Pulegone				
Hexyl isovalerate				
Carvacrol methyl ether				0,92
Carvone ^C				
Anisaldehyde	0,50	0,84	0,07	
Piperitone				
Linalyl acetate				
cis-Carvone oxide				
Bornyl acetate				0,15
Anethole ^C	76,48	88,55		
Lavandulyl acetate				
Menthyl acetate				
Thymol ^C				48,0 7
Carvacrol ^C				2,75
Isomenthol acetate ^T				
cis-2,3-Pinandediol				
Dihydrocarveol acetate				
δ -Elemene ^T				
Eugenol			0,10	0,23
cis- Carvyl acetate				
Neryl acetate				
α -Ylangene				
α -Copaene		0,09		
cis-Ethyl cinnamate				
trans-Methyl Cinnamate				0,13
Anisketone	0,08	0,11		
β -Bourbonene				
Geranyl acetate				
β -Elemene				
Longifolene				
Methyleugenol			0,41	
cis- α -Bergamotene		0,05		
β -Caryophyllene ^C		0,30	0,07	5,91
trans- α -Bergamotene		0,36		
α -Caryophyllene				
β -Farnesene		0,07		
Alloaromadendrene				
trans-Ethyl cinnamate				
Germacrene D				0,05
β -Selinene				

Citronello ^C				
Neral				
Carvotanacetone				
Chavicol			0,05	
Geraniol ^C				
Cyclofenchene				
Ethyl salicylate				
trans-Cinnamaldehyde				
Geranial ^C				
Citronellyl formate				
α -Pinene oxide				
Bornyl acetate				
Safrole				
(E,Z)-2,4-Decadienal ^T				
Geranyl formate				
(E,E)-2,4-Decadienal ^T				
α -Cubebene				
α -Terpinyl acetate				
Citronellyl acetate				
Eugenol				85,60
α -Copaene				0,04
β -Bourbonene				
Cedr-9-ene				
Geranyl acetate				
β -Elemene				
Vanillin				
Longifolene				
Methyleugenol				
α -Cedrene				
β -Caryophyllene ^C				8,75
β -Cedrene				
Thujopsene				
γ -Elemene				
Aromadendrene				
Citronellyl propionate ^C				
trans-Cinnamyl acetate				
trans-Isoeugenol				
α -Caryophyllene				2,60
β -Farnesene				
Acoradien				
α -Acoradiene				
Geranyl propionate				
β -Chamigrene				
γ -Muurolene				
Germacrene D				
β -Selinene				
α -Selinene				0,04
γ -Gurjunene				
Elemene isomer ^T				
Cedrene-V6 ^T				
α -Muurolene				0,04
α -Chamigrene				

Elemene, isomer ^T				
α -Farnesene		0,10		
γ -Cadinene				
Davana ether				
δ -Cadinene				0,26
β -Cadinene		0,06		
Davana ether, isomer ^T				
Davanone, isomer ^T				
Davanone, isomer ^T				
p-Methoxycinnamaldehyde				
Spathulenol			0,16	
Caryophyllene oxide				0,33
Globulol				
Davanone				
tau-Cadinol				
β -Eudesmol				
α -Cadinol		0,05		
Total identified compounds	99,33	97,43	96,10	99,59

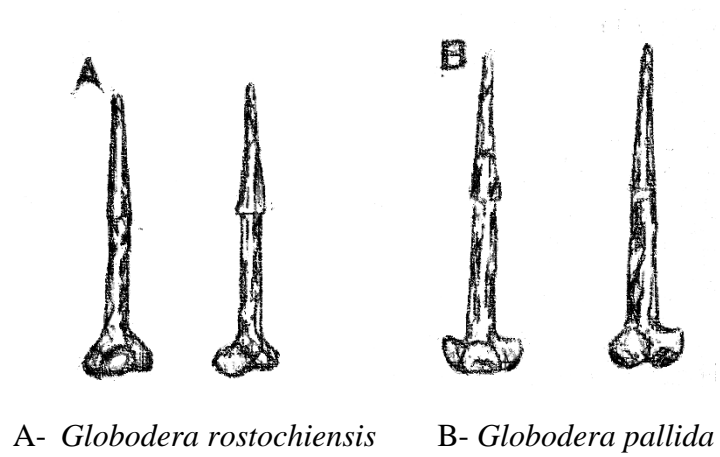
α -Bulnesene	0,05
NI	
Cuparene	
α -Farnesene	0,06
γ -Cadinene	
δ -Cadinene	0,48
β -Cadinene	
Citronellyl butyrate	
Eugenyl acetate	
Elemol	
Geraniol butyrate	
Germacrene D-4-ol	
Spathulenol	
Caryophyllene oxide	0,82
Phenethyl tiglate	
α -Cedrol	
Cedrenol	
trans-Longipinocarveol	
γ -Eudesmol	
Cubenol	
tau-Muurolol	
α -Muurolol	
β -Eudesmol	
Guaiol	
α -Cadinol	
Geranyl tiglate	
NI	
Farnesol	
Benzyl benzoate	
Farnesol acetate	
Benzyl salicylate	
Beyerene	
Cembrene	
Cembrene, isomer ^T	
Sclareol ^T	
NI	
NI	
NI	
NI	
NI	
NI	
Total identified compounds	98,69

Tabulka 4: Přehled napočítaných cyst hád'átka bramborového v jednotlivých variantách kontejnerového testu

VARIANTA	POČET CYST V 1 KVĚTINÁČI
Kontrola	2861
Kontrola	3088
Kontrola	3413
Kontrola	2895
Kontrola	3064
FV/B	3108
FV/B	2550
FV/B	2906
FV/B	3278
FV/B	2794
FV/A	2240
FV/A	2343
FV/A	2442
FV/A	2137
FV/A	2372
PA/A	1747
PA/A	1766
PA/A	1760
PA/A	1717
PA/A	1808
PA/B	1897
PA/B	1936
PA/B	1911
PA/B	1982
PA/B	1872
TVHŘ/ A	1309
TVHŘ/ A	1388
TVHŘ/ A	1449
TVHŘ/ A	1368
TVHŘ/ A	1414
TVHŘ/ B	1418
TVHŘ/ B	1340
TVHŘ/ B	1562
TVHŘ/ B	1453
TAO/A	2249
TAO/A	2123
TAO/A	2284
TAO/A	2226
TAO/A	2221
TAO/B	2476
TAO/B	2432
TAO/B	2642
TAO/B	2493
TAO/B	2518

10.3 Obrázky

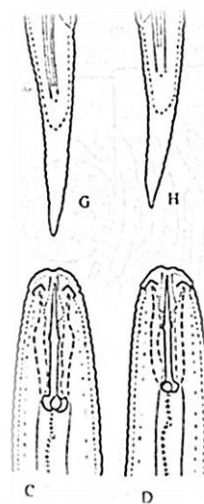
Obrázek 1: Stylet druhého vývojového stádia



Obrázek 2: Počet kutikulárních linií
Zdroj: Marks and Brodie (1998)

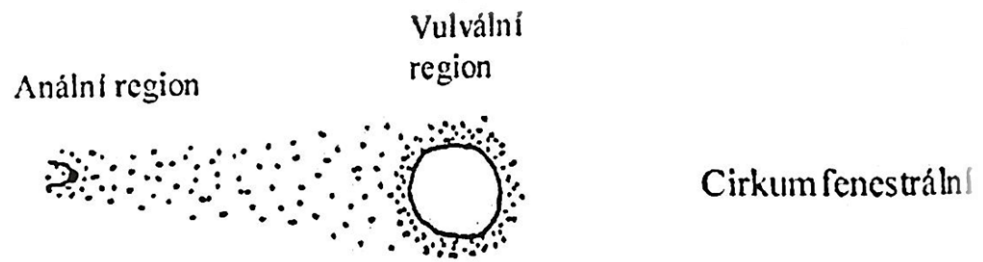


Obrázek 3: Tvar hlavové části a ocasu L2
Zdroj: Brzecki (1998)

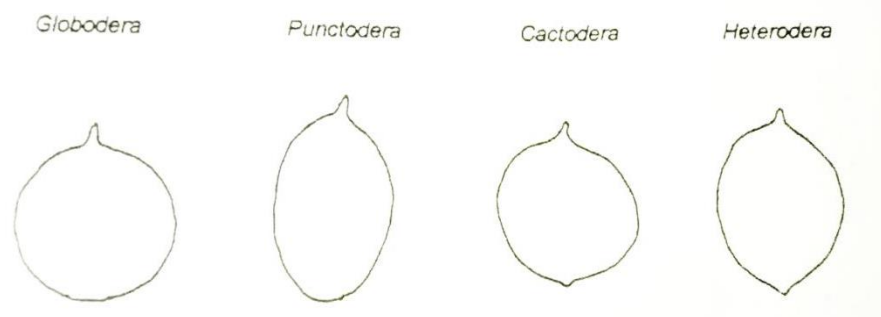


C, G- *Globodera pallida*
D, H- *Globodera rostochiensis*

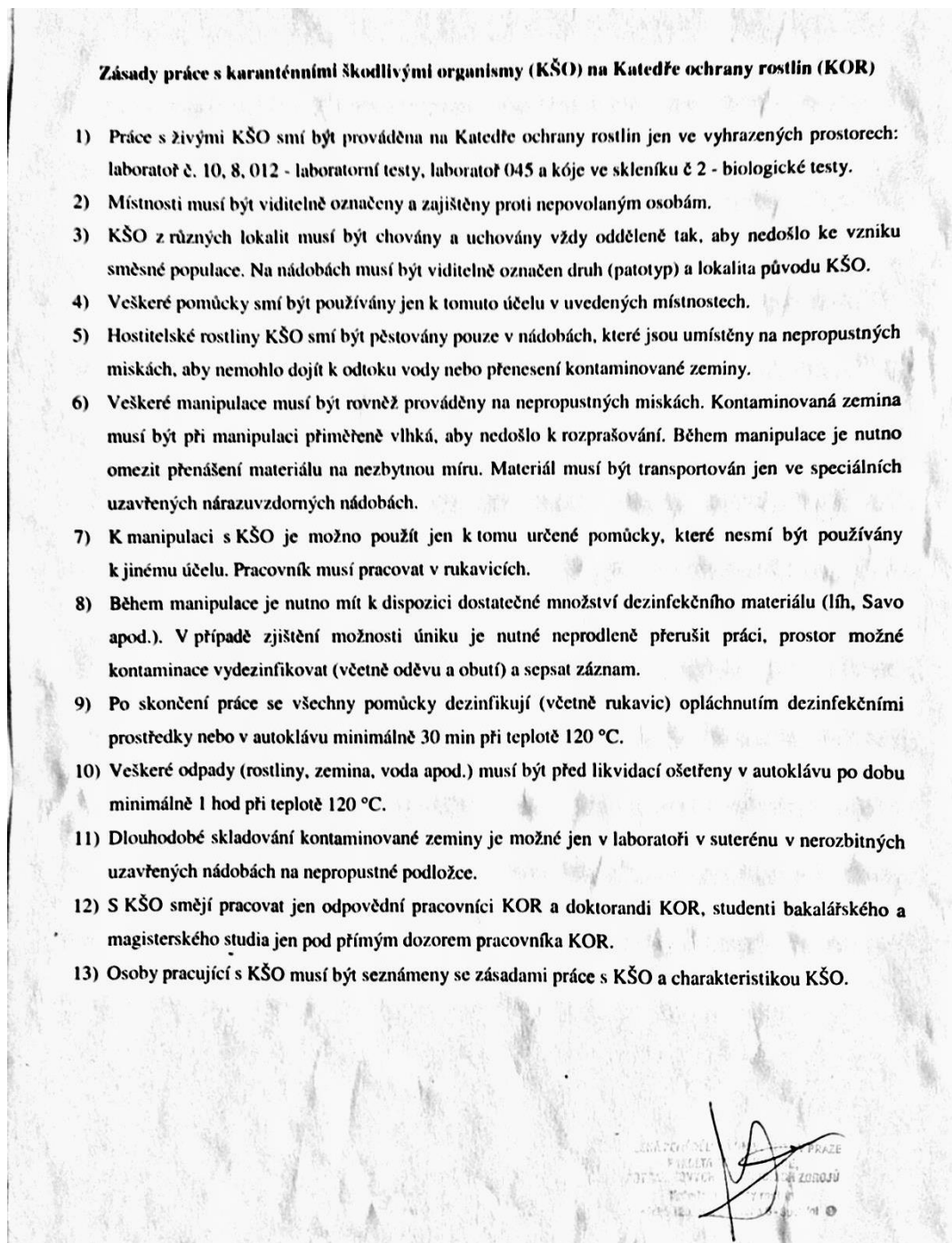
Obrázek 4: Cirkumfenestrální typ cysty
Zdroj: Marks and Brodie (1998)



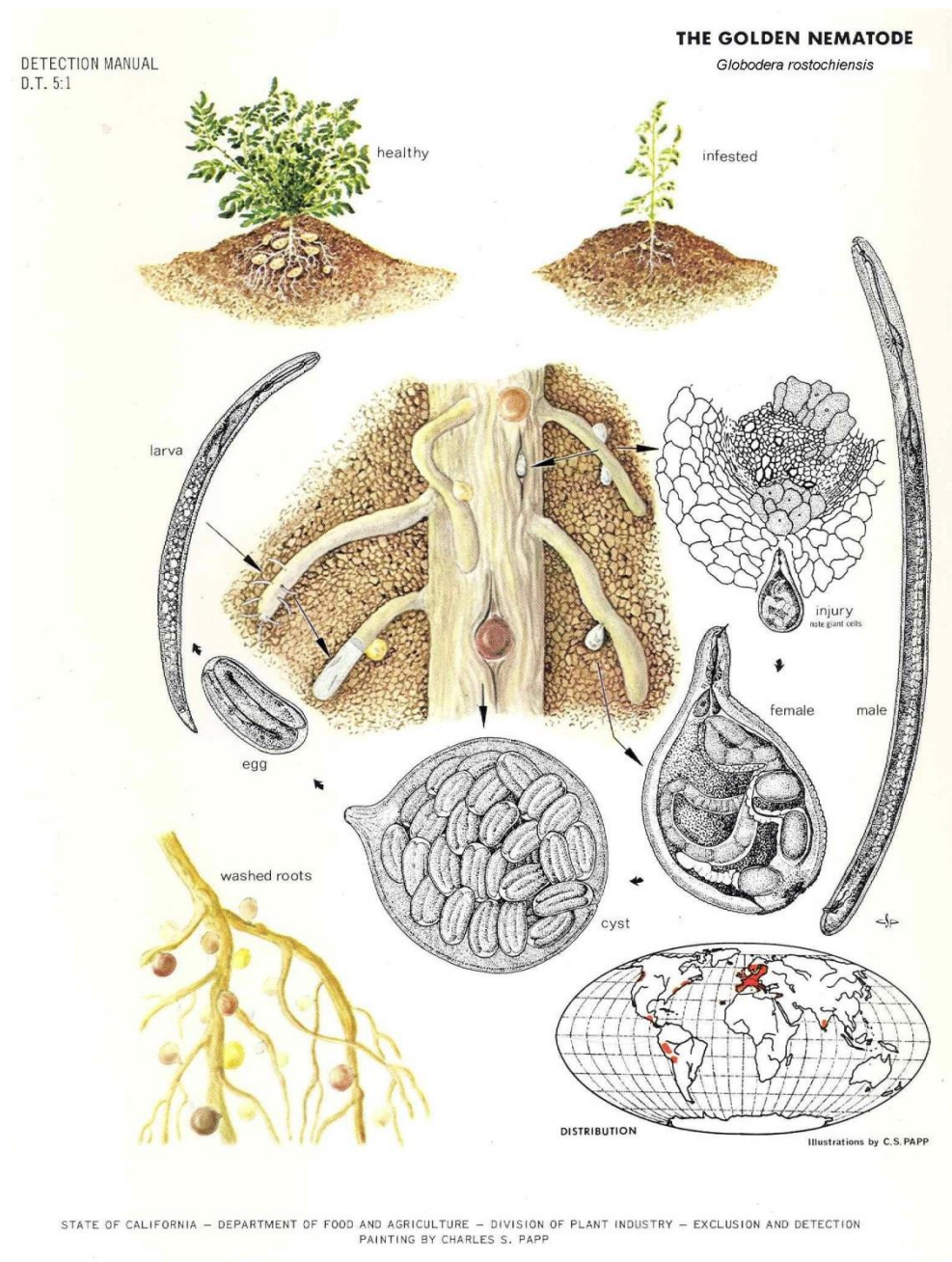
Obrázek 5: Odlišnosti v tvaru cysty
Zdroj: Marks and Brodie (1998)



Obrázek 6: Zásady práce s karanténními organismy na Katedře ochrany rostlin



Obrázek 7: Životní cyklus háďátka bramborového (Anonym 5)



Obrázek 8: sítko na vyplavené cysty



Obrázek 9: 3 sítka s různou velikostí ok



Obrázek 10: Fenwickova konev



Obrázek 11: Vysušená zemina



Obrázek 12: stříčka



Obrázek 13: kýbl na karanténní zeminu



Obrázek 14: Proplavování zeminy



Obrázek 15: Vyplavená zemina



Obrázek 16: Vyplavená zemina



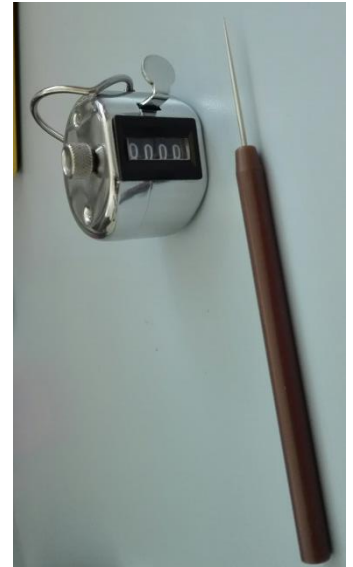
Obrázek 17: Sterilizátor
Sanyo MLS 3750/3780



Obrázek 18: Stereomikroskop
Olympus SZ61



Obrázek 19: počítadlo a
nematologická jehla



Obrázek 20: pomůcky k proužkové metodě



Obrázek 21: kádinka s filtračním papírem



Obrázek 22: stereomikroskop SZ 61 cystami a zeminou



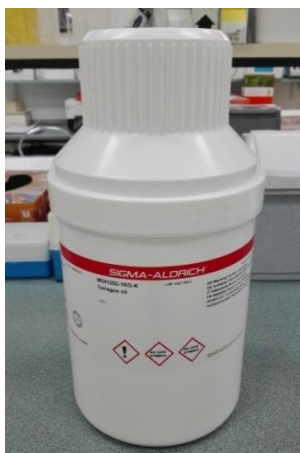
Obrázek 23: filtrační papír s vyplavenými



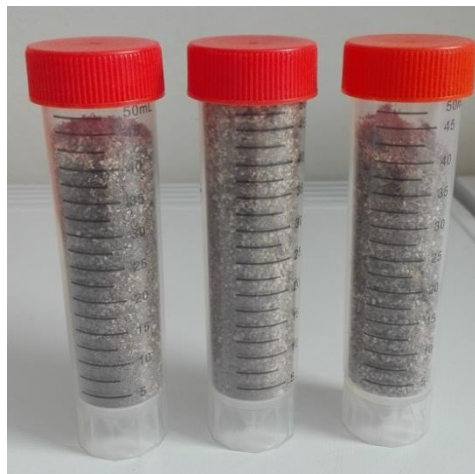
Obrázek 24: Esenciální oleje od firmy Salus



Obrázek 25: Tarragon oil od firmy Sigma- Aldrich vysušenou



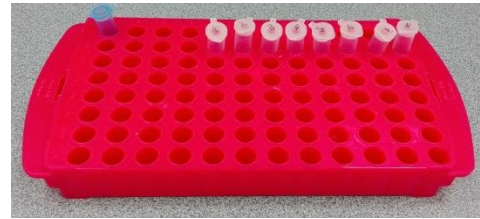
Obrázek 26: Zkumavky se spočítanými cystami a vysušenou zeminou



Obrázek 27: pipeta



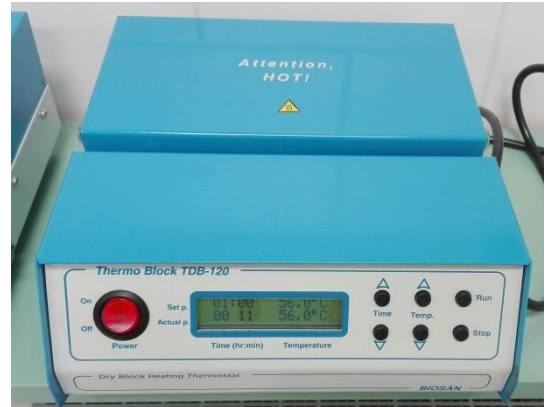
Obrázek 28: Podložka pro mikrozukmavky



Obrázek 29: umělohmotný tlouček



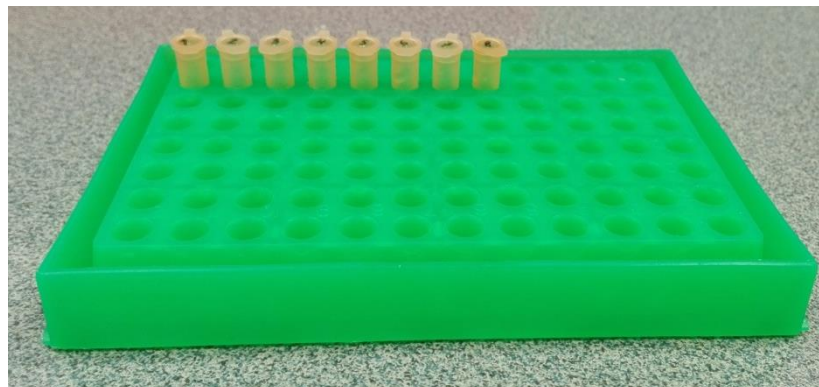
Obrázek 30: termoblok



Obrázek 31: chemikálie použité při izolaci DNA z cyst hádčátka



Obrázek 32: PCR zkumavky v podložce



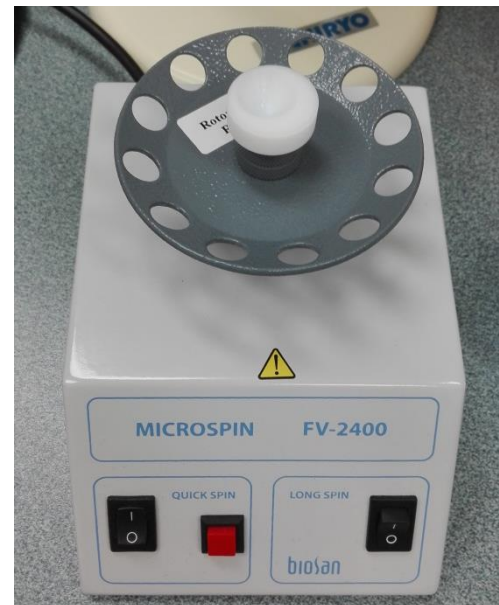
Obrázek 33: termocykler PTC 200



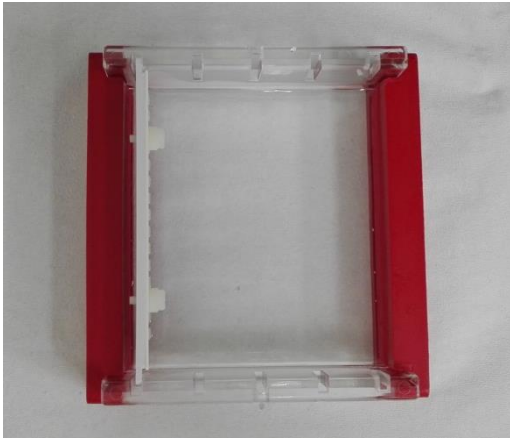
Obrázek 34: Vortex Genius 3



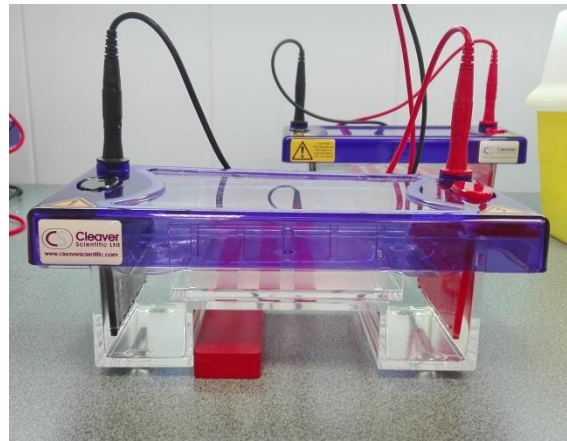
Obrázek 35: centrifuga UNIVERSAL 320 R Obrázek 36: centrifuga MICROSPIN FV- 2400



Obrázek 37: elektroforetická forma na gel



Obrázek 38: elektroforetická cela



Obrázek 39: UV Transluminátor



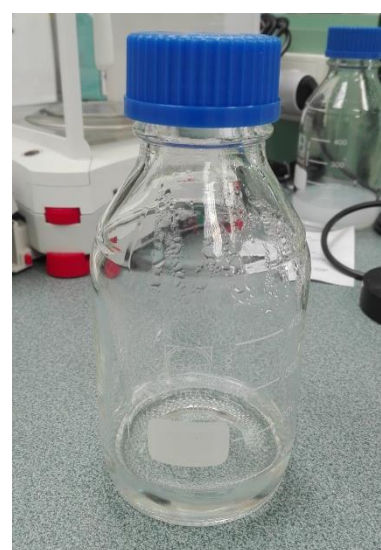
Obrázek 40: destička, kde byla smíchána nanášecí barva s PCR produktem



Obrázek 41: centrifuga Wealtec , E- Centrifuge



Obrázek 42: rozvařený elektroforetický gel



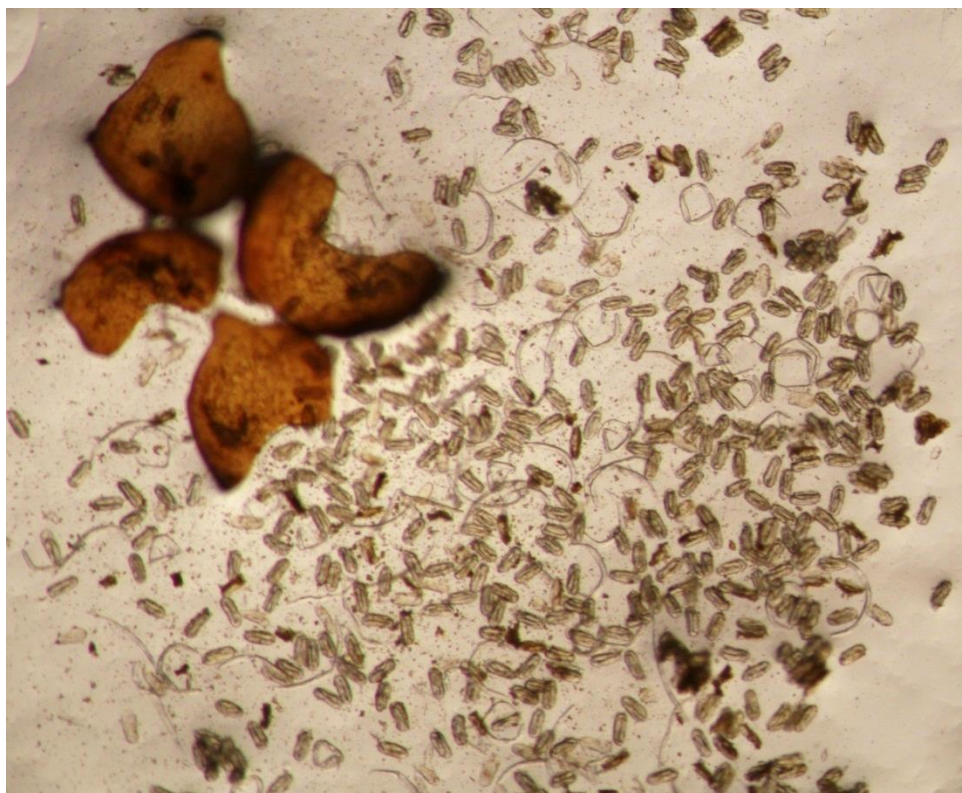
Obrázek 43: Hád'átko bramborové- detail styletu



Obrázek 44: Hád'átko bramborové- celý jedinec



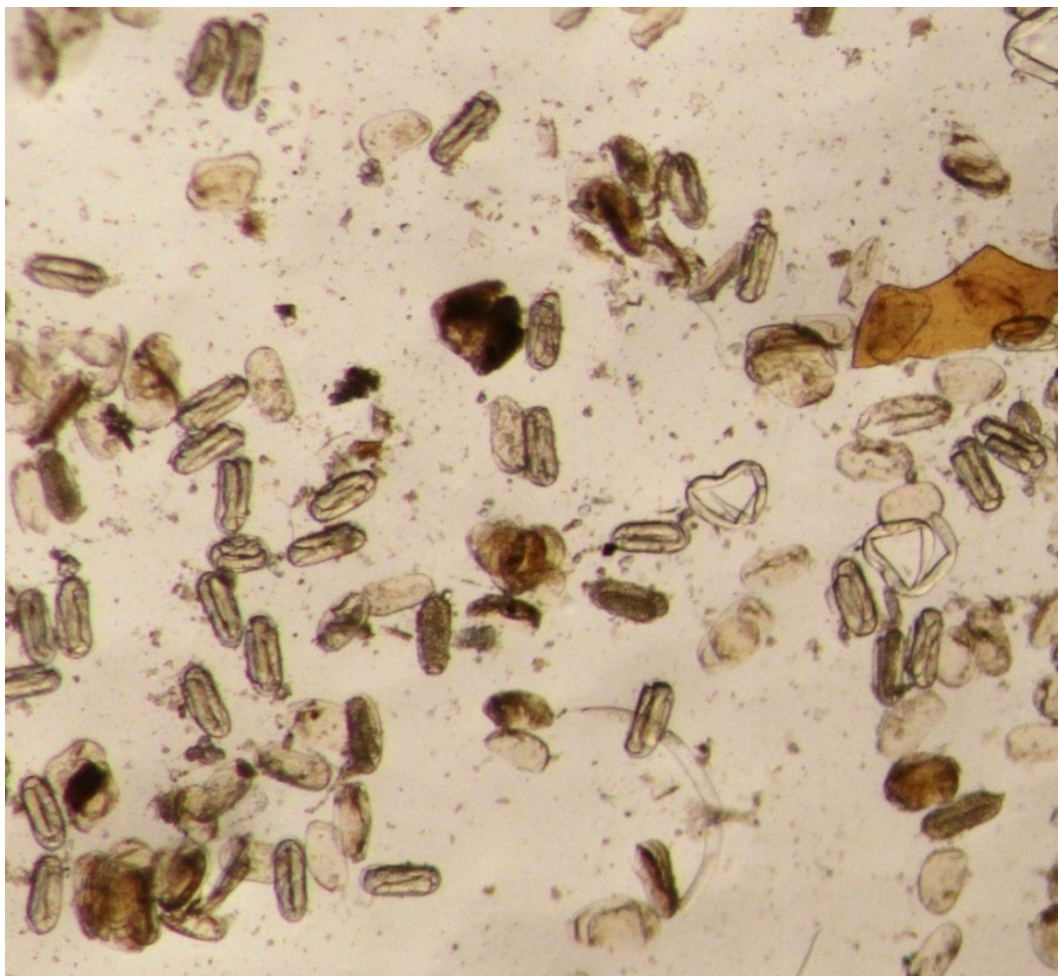
Obrázek 45: Embryony z jedné cysty háďátka bramborového



Obrázek 46: cysty háďátka bramborového nacházející se v zemině



Obrázek 47: Detail embryonů háďátka bramborového



Obrázek 48: Detail háďátka bramborového



Obrázek 49: Kontejnerový test



Obrázek 50: náchylný jedinec bramboru



Obrázek 51: Pytlíček na cysty háďátka bramborového

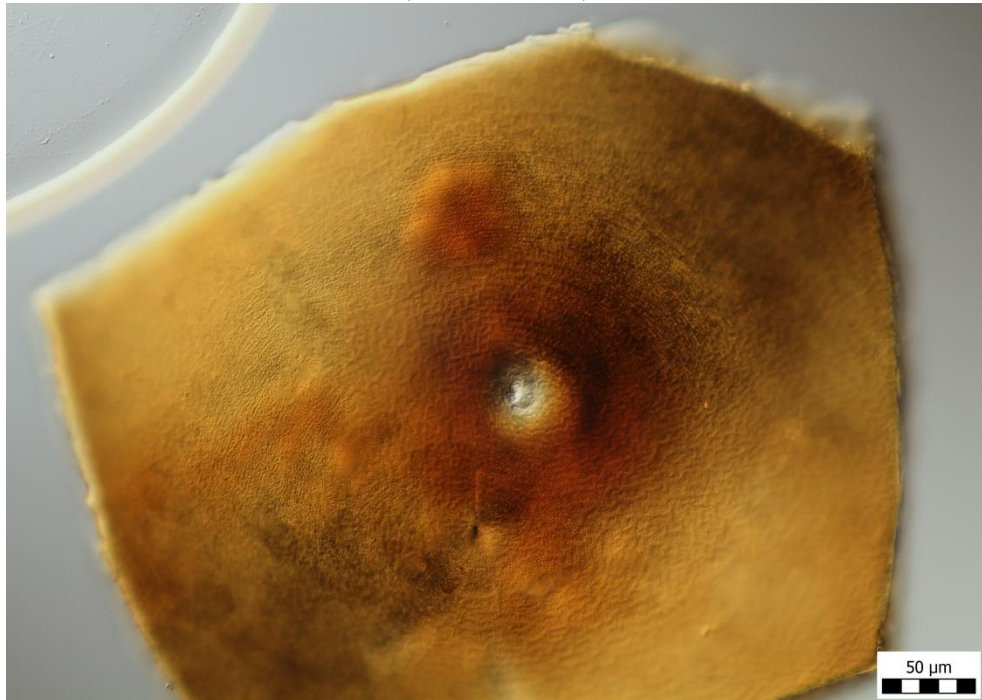


Obrázek 52: Kontejnerový test ve skleníku certifikovaném pro práci s karanténními organismy



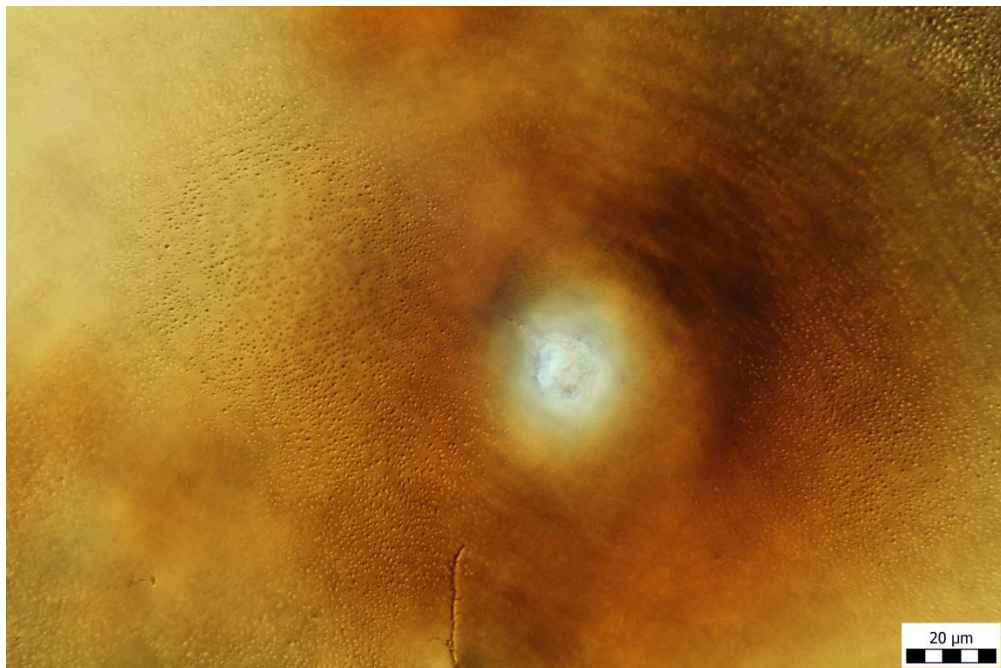
Obrázek 53: fenestrální část cysty (zadní vulvální konec)

(Zouhar, 2017)

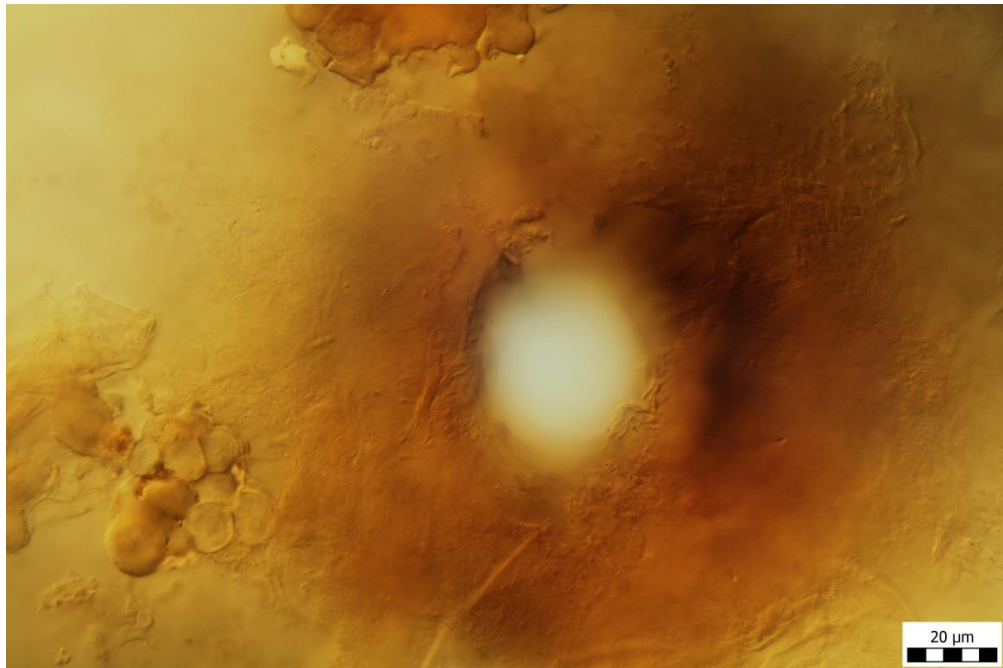


Obrázek 54: vnitřní okénko vulvy přeměněné samičky háďátka bramborového v cystu

(Zouhar, 2017)



Obrázek 55: Vnější okénko vulvy přeměněné samičky háďátka bramborového v cystu
(Zouhar, 2017)



Obrázek 56: anus přeměněné samičky háďátka bramborového v cystu
(Zouhar, 2017)

