

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



Struktura populací *Meloidogyne hapla* na území ČR

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Eliška Spáčilová

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

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Struktura populací *Meloidogyne hapla* na území ČR" jsem vypracovala samostatně a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsem řádně citovala a uvedla v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka této diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Miloslavu Zouharovi, Ph.D. za jeho mimořádnou ochotu, trpělivost, odborné rady a připomínky při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janě Wenzlové za pomoc při laboratorních pokusech.

Struktura populací *Meloidogyne hapla* na území ČR

Souhrn

Kořenová hálkotvorná hád'átka rodu *Meloidogyne* jsou endoparazité rostlin. Výskyt těchto druhů byl zaznamenán v mnoha částech světa, kde způsobují značné ztráty na výnosech. Některé druhy *M. hapla*, *M. chitwoodi* a *M. fallax* žijí v polních podmínkách západní a střední Evropy. *Meloidogyne hapla* se vyskytuje v České republice a oblasti Polabí, způsobuje nejzávažnější škody převážně u porostů mrkve.

Cílem této práce byl monitoring výskytu populací *Meloidogyne hapla* v různých lokalitách České republiky. Bylo odebráno 78 půdních vzorků a do nich byly vysety lapací rostliny (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw.). Celkem na 13 lokalitách byl potvrzen výskyt hád'átek rodu *Meloidogyne*. Z těchto vzorků byla izolována DNA a ta byla podrobena sekvenaci dvou částí cistronu rDNA. Získaná data byla podrobena bioinformatické analýze. Dále bylo přistoupeno k porovnání sekvencí a konstrukci fylogenetických stromů.

Výsledkem této práce bylo nalezení nových lokalit s výskytem *M. hapla* a zjištění dalších zajímavých bioinformatických dat, které se stanou cílem pro další výzkum. V 78 vzorcích nebyl nalezen ani jeden z karanténních druhů *M. chitwoodi* a *M. fallax*.

Klíčová slova: hálkotvorná hád'átka, *Meloidogyne hapla*, DNA, PCR, struktura populací

Structure of *Meloidogyne hapla* populations in the area of the Czech republic

Summary

Root knot nematodes of the genus *Meloidogyne* are endo-parasites of plants. The occurrence of these species has been recorded in many parts of the world, where they cause considerable yield losses. Some species *M. hapla*, *M. chitwoodi* and *M. fallax* living in field conditions of Western and Central Europe. *Meloidogyne hapla* occurs in the Czech Republic in the Polabí area, causing the most severe damage mainly in crops of carrots.

The aim of this work was to monitor the occurrence of *Meloidogyne hapla* populations in different localities of the Czech Republic. Were collected 78 soil samples and these were seeded catching plants (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw.). A total of 13 samples were confirmed occurrence of nematodes of the genus *Meloidogyne*. From these samples DNA was isolated, and it was subjected to sequencing the two parts cistron rDNA. Obtained data were subjected to bioinformatic analysis. Furthermore, it was decided to compare the sequences and construction of phylogenetic trees.

We have found new locality with the occurrence of *M. hapla* was obtained and other interesting bioinformatics data that become targets for further research. In 78 samples was found neither of quarantine species *M. chitwoodi* and *M. fallax*.

Keywords: root knot nematode, *Meloidogyne hapla*, DNA, PCR, population structure

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE.....	9
3	PŘEHLED LITERATURY	10
3.1	Zařazení háďátek rodu <i>Meloidogyne</i> do systematických kategorií.....	10
3.2	Morfologie a anatomie háďátek rodu <i>Meloidogyne</i>	10
3.3	Význam	11
3.4	Symptomy	12
3.5	Biologie	13
3.5.1	Hostitelské rostliny	13
3.5.2	Vývojový cyklus rodu <i>Meloidogyne</i>	14
3.5.3	Ekologie	16
3.6	Metody ochrany	16
3.6.1	Nepřímá ochranná opatření.....	16
3.6.2	Přímá ochranná opatření	17
3.6.3	Biologická ochrana	18
3.7	Popis jednotlivých druhů rodu <i>Meloidogyne</i>	19
3.7.1	<i>Meloidogyne exigua</i>	20
3.7.2	<i>Meloidogyne arenaria</i>	21
3.7.3	<i>Meloidogyne hispanica</i>	21
3.7.4	<i>Meloidogyne naasi</i>	22
3.7.5	<i>Meloidogyne artiellia</i>	23
3.7.6	<i>Meloidogyne incognita</i>	23
3.7.7	<i>Meloidogyne chitwoodi</i>	24
3.7.8	<i>Meloidogyne fallax</i>	24

3.7.9	<i>Meloidogyne javanica</i>	25
3.7.10	<i>Meloidogyne graminis</i>	25
3.7.11	<i>Meloidogyne hapla</i>	26
3.8	Způsoby diagnostiky	27
3.8.1	Determinace morfologická	27
3.8.2	Molekulární genetické metody diagnostiky – metody založené na PCR	28
3.8.3	Sekvenační techniky	30
3.9	Bioinformatická analýza dat	31
4	MATERIÁL A METODY	32
4.1	Biologický test přítomnosti háďátek rodu <i>Meloidogyne</i>	32
4.2	Izolace DNA.....	33
4.3	PCR.....	34
4.4	Příprava PCR produktů pro nanášení do gelu	38
4.5	Sekvenace a bioinformatická analýza	38
5	VÝSLEDKY.....	40
5.1	Biologický test přítomnosti háďátek rodu <i>Meloidogyne</i>	40
5.2	Izolace DNA.....	40
5.3	Příprava PCR fragmentů pro sekvenaci	41
5.4	Sekvenace a bioinformatická analýza	44
6	DISKUZE.....	48
7	ZÁVĚR.....	50
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
9	PŘÍLOHY	57

1 ÚVOD

Kořenová hálkotvorná háďátka *Meloidogyne ssp.* jsou sedentérní endoparazité rostlin. Čtyři nejběžnější druhy *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* a *M. javanica* mají široký hostitelský okruh. V současnosti je popsáno téměř 100 druhů rodu *Meloidogyne* (Bridge and Starr, 2007).

Kořenová hálkotvorná háďátka z rodu *Meloidogyne* jsou rozšířena v mnoha částech světa, značné ztráty na výnosech způsobují především v tropických a subtropických oblastech (Tesařová et al., 2003). Hospodářské ztráty způsobené háďátky rodu *Meloidogyne* byly celosvětově vyčísleny na 100 miliard USD/rok (Douda a Zouhar, 2008). Háďátky napadené rostliny tvoří ohniska pomaleji rostoucích rostlin. Na kořenech rostlin se tvoří nepravidelné, několik milimetrů silně ztloustlé háčky (Rod a kol., 2005). Poškození rostlin, pokud jsou pěstované na silně zamořených půdách, je tak velké, že dochází až k odumření celé rostliny. Většina druhů rodu *Meloidogyne* žije v tropických oblastech, ale pouze některé z nich, jako například *M. fallax*, *M. chitwoodi* a *M. hapla* žijí v polních podmínkách západní a střední Evropy. *Meloidogyne incognita* je jedním z druhů žijící ve střední Evropě, ale pouze ve sklenících s celoročním pěstováním rostlin. *M. incognita* bylo prokázáno i ve sklenících v ČR (Tesařová et al., 2003).

Na území České republiky v současné době způsobuje nejzávažnější škody druh *Meloidogyne hapla*. Škodlivost tohoto háďátka je taková, že jeho přítomnost se stává limitujícím faktorem pěstování zejména kořenové zeleniny na písčitéch půdách v oblasti Polabí. Na těchto lokalitách byly zaznamenány intenzivní příznaky způsobené tímto druhem na raných bramborách, což vypovídá o přítomnosti velmi četné a velmi agresivní populace (Douda a kol., 2011). Výrazné ztráty na výnosech jsou hlášeny zvláště z porostů mrkve a petržele (Douda a Zouhar, 2008).

Významnými druhy jsou pak *Meloidogyne chitwoodi* a *Meloidogyne fallax*, které jsou řazeny do skupiny zvláště nebezpečných škůdců a jsou uvedeny i na seznamech karanténních organismů EPPO (Zouhar a kol., 2002). I když na území České republiky jejich výskyt nebyl prokázán, můžeme tyto druhy najít například v Německu, Rakousku, Belgii, Francii a Holandsku. Případný výskyt těchto karanténních háďátek v ČR je možný a to zejména z důvodu nekontrolovatelné introdukce necertifikované sadby od našich sousedů, a dále i pohybem zemědělských komodit v rámci EU (Zouhar a Douda, 2007).

2 VĚDECKÁ HYPOTÉZA A CÍL PRÁCE

Hypotéza: Populace *Meloidogyne hapla* vyskytující se na území ČR jsou z hlediska svého původu variabilní, protože zde není původní, ale došlo k jejímu zavlečení z různých částí světa.

Cílem této diplomové práce je určení původu populací hád'átka *Meloidogyne hapla* získaných z lokalit v ČR.

3 PŘEHLED LITERATURY

3.1 Zařazení háďátek rodu *Meloidogyne* do systematických kategorií

Kmen: Nematoda

Řád: Tylenchida

Podřád: Tylenchina

Nadčeleď: Tylenchoidea

Čeleď: Heteroderidae

Rod: *Meloidogyne* (Agrios, 2005)

3.2 Morfologie a anatomie háďátek rodu *Meloidogyne*

Samečci jsou nesedentérní, nitkovitého tvaru o délce v rozmezí mezi 600 – 2500 μm . Jsou bezbarví a průsvitní, takže stavba a umístění vnitřních orgánů jsou pod mikroskopem dobře rozpoznatelné (obr. 3 v přílohách).

Samičky (obr. 8 v přílohách) kořenových hálkotvorných háďátek rodu *Meloidogyne* jsou sedentérní, hruškovitého tvaru těla a perleťově bílé barvy. Nemají stádium cysty. Délka samic je 350 μm až 3 mm a maximální šířka je 300 až 700 μm (Perry and Moens, 2006). Povrch těla kořenových hálkotvorných háďátek je kryt kutikulou, která je převážně hladká nebo kroužkovaná. Během vývoje dochází k jejímu svlékání a k vytvoření nové kutikuly (Agrios, 2005). Pod kutikulou se nachází hypodermis, která tvoří čtyři podélné lišty v tělní dutině a to hřbetní (dorzální), břišní (ventrální) a dvě boční (laterální), jimiž probíhají nervové provazce. V bočních lištách se nachází i exkreční kanálky. Pruhy svalstva jsou uloženy mezi hypodermálními lištami napojenými na spodní stranu hypodermis.

Funkční celek – kutikula, svalstvo a hypodermis – tvoří kožně svalový vak plnící funkci pohybového ústrojí a tělního pokryvu zajišťujícího styk s okolním prostředím. Mimo

jiné mají vyvinuté speciální svaly, které napomáhají pohybu ústního bodce, roztahování jícnu, stahování a aktivaci pářící jehlice samců při kopulaci. V kožně svalovém vaku se nacházejí vnitřní orgány: pohlavní ústrojí, zažívací soustava a části nervového systému (Decker, 1969). Trávicí soustava začíná ústní dutinou, pokračuje jícnem, střevem a je zakončena konečníkem s řitním otvorem. Dutina ústní začíná ústním otvorem tvořeným šesti pysky, které ho obklopují. Dutina ústní dále obsahuje dutý stylet, který slouží k vytvoření otvorů v rostlinných buňkách a k injektáži trávících a modifikujících enzymů a v neposlední řadě zejména k následnému získání živin. Pohlavní orgány jsou dobře vyvinuty. Samičky mají jeden nebo dva vaječníky, po nichž následuje vejcovod, děloha a vulva. Samčí pohlavní orgány tvoří dvě varlata, semenný váček a jedna nebo dvě pářící jehlice (Agrios, 2005).

3.3 Význam

Kořenová hálkotvorná hád'átka rodu *Meloidogyne* a patří k poměrně malé, ale velmi významné polyfágní skupině vysoce přizpůsobených obligátních rostlinných škůdců. Jsou rozšířena po celém světě a parazitují téměř na každém druhu vyšších rostlin. Vzhledem k jejich endoparazitickému způsobu života a výživě, kořenová hálkotvorná hád'átka narušují fyziologii rostlin a mohou snížit výnos plodin a kvalitu komodit, a proto mají velký hospodářský význam.

Výskyt těchto hád'átek ve větším měřítku je lokální, obzvláště na plochách s úzkým osevním postupem a v teplých letech. Druh *Meloidogyne incognita* se v podmínkách střední Evropy vyskytuje pouze ve sklenících (Rod a kol., 2005). Hospodářské ztráty způsobené hád'átky rodu *Meloidogyne* byly celosvětově vyčísleny na 100 miliard USD/rok (Douda a Zouhar, 2008).

Na území České republiky v současné době způsobuje nejzávažnější škody hálkotvorný druh *Meloidogyne hapla*. Škodlivost tohoto druhu je taková, že jeho přítomnost se stává limitujícím faktorem pěstování zejména kořenové zeleniny na písčitých půdách v oblasti Polabí. Na těchto lokalitách byly zaznamenány intenzivní příznaky způsobené tímto druhem na raných bramborách, což vypovídá o přítomnosti velmi četné a velmi agresivní populace (Douda a kol., 2011). Ztráty na výnosech jsou hlášeny zvláště z porostů mrkve a petržele (Douda a Zouhar, 2008). Význam hád'átek rodu *Meloidogyne* podtrhuje i problematika diagnostika.

Pro spolehlivou detekci a determinaci kořenových hátkotvorných háďátek je nejlepším přístupem jednak morfologická diagnostika a dále pak další technika a to jak na úrovni isozymů, tak polymorfie DNA. Nemalou úlohu může hrát i biologický test a příznaky na hostitelských rostlinách (Perry and Moens, 2006).

Pokud jsou rostliny napadeny háďátkou již ve stádiu klíčnicích rostlin, ztráty jsou fatální. V mnoha případech má toto časně napadení za následek i úplné zničení porostu. V případě napadení starších rostlin nejsou dopady na úplné zničení porostu tak dramatické, nic méně výnos je vždy negativně ovlivněn (Agrios, 2005).

3.4 Symptomy

Příznakem napadení nadzemních částí rostlin jsou ohniska s pomaleji rostoucími rostlinami (obr. 9 v přílohách). Tyto rostliny jsou zakrnělé ve svém růstu a mají světle zelené nebo nažloutlé listy. Za sucha tyto napadené rostliny vadnou a případně odumírají (Rod a kol., 2005). Pokud dojde ke slabému napadení kořenů, příznaky na nadzemních částech rostlin se neprojeví. Z tohoto důvodu může dojít k přehlédnutí lokality s napadenými rostlinami (Decker, 1969).

Charakteristické příznaky onemocnění se objevují zejména na podzemních částech rostlin. Infikované kořeny tvoří typické háčky (obr. 6 v přílohách), které jsou dvakrát i vícekrát větší v průměru než je zdravý kořen. Na povrchu jsou některé háčky hrubého vzhledu. Kořeny vytváří hustý svazčitý kořenový systém (obr. 10 v přílohách). Když jsou napadeny hlízy nebo jiné podzemní orgány rostlin, vytváří se malé zduřeniny na jejich povrchu, které se zvětšují a tím způsobí deformaci nebo prasknutí hlízy (cibule) (Agrios, 2005). Mladé rostliny, u kterých došlo k silnému napadení, většinou hynou, aniž by došlo k vytvoření hálek.

Velikost a tvar hálek na kořenech je více či méně závislý na druhu háďátek rodu *Meloidogyne*, druhu napadené rostliny a na dalších faktorech. Velikost hálek se pohybuje v rozmezí od několika milimetrů do několika centimetrů.

Kořenové háčky se na hlízách a cibulích netvoří a samičky s vajíčky jsou patrné jen na průřezu ve zhnědlých částech pletiv, případně se tvoří jen zduřeniny (Decker, 1969).

I v případě *Meloidogyne hapla* ovlivňuje mnoho faktorů intenzitu příznaků. Na lehkých půdách chudých na organickou složku množství symptomů roste. Zatímco v těžkých půdách dochází k redukci velikosti hálek, tak i ve tvaru, který může být omezen na ploché zdvojení kořínku. Nadále se tak mohou háďátka množit, aniž by byl patrný výskyt hálek. Jelikož se jedná o druh, který napadá rostliny v chladnějších oblastech světa, tak i zde platí, že se zvyšující se teplotou stoupá intenzita napadení. Vlivem napadení dochází v rostlinách také k určitým fyziologickým změnám, tím se tak stávají atraktivní pro některé další škodlivé organismy (Nováková a Zouhar, 2009).

3.5 Biologie

3.5.1 Hostitelské rostliny

K hostitelským rostlinám *Meloidogyne* ssp. patří více než 3000 rostlinných druhů z různých čeledí (Ardakani and Mirinejad, 2013).

Z kulturních plodin v podmínkách mírného klimatického pásma jsou to především brambory (*Solanum tuberosum* L.), cukrová řepa (*Beta vulgaris* L.), vojtěška setá (*Medicago sativa* L.), petržel obecná (*Petroselinum crispum* (Mill.) A. W. Hill.), kapusta hlávková (*Brassica oleracea* L.), slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.), len setý (*Linum usitatissimum* L.), okurka setá (*Cucumis sativus* L.), pastinák setý (*Pastinaca sativa* L.), jahodník (*Fragaria vesca* L.), pór zahradní (*Allium porrum* L.), hrách setý (*Pisum sativum* L.), salát hlávkový (*Lactuca sativa* L.), mrkev obecná (*Daucus carota* L.), celer (*Apium graveolens* L.) a rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L.), pšenice špalda (*Triticum spelta* L.) (Decker, 1969). vikev setá (*Vicia sativa* L.), oves setý (*Avena sativa* L.) a pšenice setá (*Triticum vulgare* L.) a další (Karssen, 2002).

Z okrasných rostlin jsou to begonie, gerbery, gladioly, sasanky, dřívěš, plamének, kosatce, růže a řada dalších jednoletých i vytrvalých druhů (Gaar a Čermák, 2012). Dále astra čínská (*Callistephus chinensis* (L.) Nees), chryzantémy *Chrysanthemum* sp., fuchsie *Fuchsia* sp., hrachor vonný (*Lathyrus odoratus* L.), čajovník čínský (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), pelargonie páskatá (*Pelargonium zonale* (L.) Ait.), prvosenka žahavá (*Primula malacoides* Franch.), kávovník (*Coffea* L.), ambrosie (*Ambrosia* spp.) a další.

Z léčivých a aromatických rostlin například bazalka pravá (*Ocimum basilicum* L.), fenykl obecný (*Foeniculum vulgare* Mill.), kopr vonný (*Anethum graveolens* L.), heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla* L.), máta peprná (*Mentha piperita* L.), komonice lékařská (*Melilotus officinalis* (L.) Pallas) a řada dalších (Decker, 1969).

Z plevelných rostlin sem patří většina plevelů, například sedmikráska obecná (*Bellis perennis* L.), hledík větší (*Antirrhinum majus* L.), merlík bílý (*Chenopodium album* L.), ptačinec žabinec (*Stellaria media* (L.) Vill.), durman obecný (*Datura stramonium* L.), pýr plazivý (*Agropyron repens* L.), merlík bílý (*Chenopodium album* L.), šťovíky (*Rumex* sp.), jitrocele (*Plantago* sp.) (Decker, 1969). Dále lilek černý (*Solanum nigrum* L.), sporýš lékařský (*Verbena officinalis* L.), laskavec zelenoklasý (*Amaranthus chlorostachys* (L.) Willd.), laskavec ohnutý (*Amaranthus retroflexus* L.), mochně židovská (*Physalis alkekengi* L.) (Ardakani and Mirinejad, 2013). Srha laločnatá (*Dactylis glomerata* L.), lipnice roční (*Poa annua* L.), lipnice obecná (*Poa trivialis* L.), kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.), jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.), ovsík vyvýšený (*Arrhenatherum elatius* (L.) J. & C. Presl) (Decker, 1969).

3.5.2 Vývojový cyklus rodu *Meloidogyne*

Samečci a samičky háďátek rodu *Meloidogyne* jsou snadno morfologicky rozpoznatelní.

Každá samička naklade za svůj život přibližně 500 vajíček do rosolovitého vaječného vaku na posteriární části těla (Agrios, 2005). Vajíčka (obr. 1 v přílohách) mají tvar oválný, jejich obsah je zpočátku zrnitý a následuje diferenciací přes různé vývojové stupně až k vytvoření larvy prvního vývojového stupně (Decker, 1969). První a druhé vývojové stádium (obr. 2 v přílohách) je červovitého tvaru vyvíjející se uvnitř každého vajíčka. Larva druhého vývojového stupně se uvolní z vajíčka do půdy, k prvnímu svlékání tedy dojde ještě uvnitř vajíčka (obr. 7 v přílohách), což představuje jediné infekční stádium háďátek rodu *Meloidogyne*. Pokud háďátka nalezne citlivého hostitele a jeho kořenový systém, což je podmínkou pro jeho následující vývoj, usadí se v něm a vývojový cyklus může pokračovat.

Háďátka po ataku rostliny získávají výživu z buněk nacházejících se kolem jejich hlavy za pomoci styletu, kterým rovněž a injikují enzymatický koktejl do těchto buněk.

Enzymy stimulují jejich zvětšení a tvorbu tzv. obřích buněk, vzniknou tak mnohojaderné buňky s vysokým obsahem vakuol a vytvoří se tak vhodné prostředí pro získávání živin. Třetí vývojová fáze je velmi krátká, následuje čtvrtá vývojová fáze, ve které se larvy diferencují podle pohlaví. V tomto posledním vývojovém stádiu dospělí samečci červovitého tvaru opouštějí kořeny a volně žijí v půdě a pochopitelně hledají samičky.

Samičky hruškovitého tvaru pokračují ve zvětšování a po oplodnění, kladou vajíčka, která jsou uložena v rosolovité hmotě uvnitř nebo vně kořenových pletiv v závislosti na poloze samičky. Některé druhy tohoto rodu jsou schopné i partenogenetického vývoje.

Vajíčka se mohou vylíhnout okamžitě, některé z nich mohou přezimovat a vylíhnout se až na jaře. Životní cyklus je dokončen po 25 dnech při teplotě 27 °C, ale může trvat i déle při nižších nebo vyšších teplotách.

Většina kořenových hálkotvorných háďátek se nachází v kořenové zóně 5 až 25 cm pod povrchem půdy (obr. 4 a 5 v přílohách). Kořenová hálkotvorná háďátka se šíří především půdou ulpívající na zemědělských strojích a zařízeních, infikovaným rostlinným materiálem a případně i závlahovou vodou, či vodou a kaly pocházejícími z myček kořenové zeleniny (Agrios, 2005). Délka vývoje závisí především na teplotě. Většina druhů rodu *Meloidogyne* vyžaduje pro svůj vývoj relativně vysokou teplotu, i když některé druhy jako *M. hapla*, *M. naasi* a *M. artiellia* se mohou vyvíjet i v chladnějších podmínkách. V oblastech střední Evropy je jejich výskyt možný i ve volné přírodě. Většina ostatních druhů s vyššími nároky na teplotu je v těchto podmínkách vázána na skleníky. Délka vývoje jedné generace *M. incognita* při průměrné teplotě 23,3 °C je 26 dní, *M. javanica* při 26 °C 21 dní, při 14,3 °C 56 dní. Počet generací je rovněž značně závislý na přírodních podmínkách. Například v tropech se může vyvinout 10 – 12 generací, v jižních oblastech 4 – 5 generací, ve sklenících až 12 generací. Vlhkostní podmínky neovlivňují podstatně vývoj, pokud není příliš překročen rozsah 40 – 80 % vodní kapacity půdy a pokud nedochází v průběhu vegetace k periodám s vysokým přísuškem (Decker, 1969).

3.5.3 Ekologie

Důležitými ekologickými faktory pro aktivitu a vývoj háďátek jsou klima a povětrnostní podmínky, půdní druh, přítomnost hostitelské rostliny, šíře osevního postupu a s tím související dostupnost živin (Ravichandra, 2008).

Povětrnostní podmínky, klima a především teplota a vlhkost nejvíce ovlivňují vývoj a aktivitu háďátek. Většina háďátek vyžaduje vyšší teplotu, proto jsou svým výskytem vázána na tropické a subtropické oblasti.

Vlhkost je nezbytná pro pohyb háďátek v půdě. Za suchého počasí aktivita ustává, dochází k úhynu nebo háďátka upadají do anhydrobiózy. V mírném pásmu za teplého léta háďátka nehynou, ale sníží se jejich aktivita.

Dalším abiotickým faktorem je světlo, které působí na háďátka jen omezeně. Byl ale zjištěn nepatrný vliv světla u háďátka *Meloidogyne incognita* ovlivněním látkové výměny hostitelských rostlin a samičky tohoto druhu produkují více vajíček při prodloužení doby osvětlení.

Pohyb háďátek v půdě je závislý na její pórovitosti, vodním filmu a půdní reakci. (Ravichandra, 2008; Decker, 1969).

3.6 Metody ochrany

3.6.1 Nepřímá ochranná opatření

Proti šíření háďátek půdou, napadenou sadbou, pracovními nástroji nebo pneumatikami zemědělské techniky jsou nutná preventivní ochranná opatření jako základ pro omezení zavlečení a šíření háďátek na pozemek, kde se zatím nevyskytovala. Nutné je dále aplikovat široké osevní postupy. Nehostitelskými rostlinami pro *Meloidogyne hapla* může být většina jednoděložných rostlin z čeledi lipnicovité. Z dvouděložných rostlin jsou to zástupci z rodů *Aster* a *Rudbeckia* (Nováková a Zouhar, 2009).

K prevenci dále přispívá dostatečné organické hnojení, používání rezistentních či tolerantních odrůd a likvidace napadených kořenů. Ve vnitřních prostorách, jako jsou skleníky, je nutno udržovat teplotu půdy co nejnižší (Rod a kol., 2005).

Hádčátka rodu *Meloidogyne* mohou být také dále šířena prostřednictvím zemědělských strojů nebo vozidel, které byly ve styku s kontaminovanou půdou. Proto se doporučuje čistit stroje před a po použití (Perry and Moens, 2006). Zvláštní skupinu, pro kterou jsou preventivní opatření alfou a omegou v ochraně rostlin jsou karanténní druhy. V případě rodu *Meloidogyne* se jedná o *Meloidogyne chitwoodi* a *Meloidogyne fallax* (Zouhar a kol., 2002). I když na území České republiky jejich výskyt nebyl prokázán, můžeme tyto druhy najít například v Německu, Rakousku, Belgii, Francii a Holandsku. (Zouhar a Douđa, 2007).

3.6.2 Přímá ochranná opatření

Nematocidy jsou přípravky určené k ochraně rostlin proti hádčátkům (Luc et al., 1990). Tyto látky jsou často velmi toxické a vykazují dlouhou reziduální účinnost. Při snaze o účinný zásah pomocí příslušných chemických prostředků je nutno na tuto skutečnost brát ohled. Proto je důležité použití maximálních přípustných dávek chemické látky a její kvalitní zapravení do půdy. Sortiment nematocidů, v registru povolených přípravků na ochranu rostlin, také komplikuje účinnou ochranu proti fytoparazitickým hádčátkům (Douđa a kol., 2011). Jediný registrovaný přípravek v kategorii nematocidů je Basamid granulát s účinnou látkou Dazomet (Agromanuál, 2013). Aplikace tohoto přípravku s sebou nese riziko kontaminace spodních vod a nevhodnost použití v systémech produkce biopotravin (Douđa a kol., 2011). Fumiganty typu nematocidů jsou sice vysoce účinné, ale pro necílové organismy také velmi toxické, navíc užívání fumigantů ve vysokých dávkách vede k obavám z jejich škodlivosti na lidské zdraví a životní prostředí, jsou i velmi nákladné (Gugino et al., 2006), nehledě na to, že v ČR tyto prostředky nelze používat. Další přímou metodou, kterou je možné uplatnit v boji s hádčátkem je půdní solarizace. Tato metoda spočívající ve zvýšení teploty půdy pomocí vlivem slunečního záření a zakrytí půdy pomocí polyethylenové fólie. Metoda má smrtící účinek pro škodlivé organismy, které se vyskytují v půdě do hloubky cca 15 cm. Tato technika je účinná pouze v oblastech, kde je po dlouhou dobu dostatek sluneční

energie, střední Evropa tedy oblastí s možností využití této techniky není. Limitujícím faktorem této metody mohou být nejen klimatické podmínky v dané lokalitě, ale i náklady na aplikaci této metody včetně nákladů na polyethylenovou fólii (Luc et al., 1990).

Další přímé metody jako je ozonizace či propařování půdy jsou použitelné a rentabilní jen u malých ploch a objemu půdy, při polním pěstování jsou z ekonomického hlediska nemožné (Douda a kol., 2011).

3.6.3 Biologická ochrana

Hád'átka rodu *Meloidogyne* mají mnoho přirozených nepřátel v půdě, kteří se mohou podílet na snižování populační hustoty. Počet organismů, které mohou být použity pro biologickou ochranu, je omezený (Perry and Moens, 2006).

Půdní hád'átka představují důležitou součást půdní fauny. Tato skupina bezobratlých obsahuje zástupce většiny trofických skupin, včetně druhů, které zpracovávají rozkládající se organický materiál (bakterie, jiné půdní bezobratlé včetně dalších hád'átek a rostlinného materiálu). Hád'átka slouží jako zdroj energie pro početné půdní organismy, mezi něž patří roztoči (Acarina), chvostokoci (Collembola), dokonce i kořeny masožravých vyšších rostlin. Nicméně, nejdůležitější skupinou půdních organismů živičích se hád'átky jsou houby v půdě. Tato skupina organismů vyvinula širokou škálu různých strategických pastí, specializovaných orgánů – například konstriktivní a nekonstriktivní prstence, lepidivé knoflíky, lepidivé větve a stahující oka. Biologická ochrana na základě nematofágních půdních hub se v nedávné době stala komerčně dostupnou (Zouhar et al., 2013).

Pochonia chlamydosporia (Goddard) Zare & W. Gams 2001 se vyskytuje v půdě a kolonizuje kořeny rostlin. Houba následně napadá vaječné vaky kořenových hádkotvorných hád'átek rodu *Meloidogyne*, tím jsou vajíčka zničena a životní cyklus hád'átka je přerušeno. Význam aplikace nematofágní houby nemusí spočívat pouze v eradikaci fytoparazitických hád'átek, ale pro pěstitele může být důležitým efektem pouhé zpomalení nástupu napadení pěstované plodiny hád'átky.

Arthrobotrys oligospora Fresen. 1850 patří k nejběžnějším a zároveň kosmopolitně vyskytujícím se druhem nematofágních hub. Tento druh se vyskytuje v půdách lesostepí, v půdách různých typů lesů, pastvin, trávníků a v obdělávaných půdách (Douda a kol., 2011).

Byla izolována z mnoha různých substrátů, kompostů, tlejícího dřeva a živočišných výkalů (Zouhar a kol., 2010). *Arthrobotrys oligospora* patří do skupiny nematofágních hub vytvářející lapací struktury patřící do skupiny takzvaných dravých hub. Tento druh není hostitelsky specializován na konkrétní druhy háďátek. Jako zdroj výživy používá volně žijící, zooparazitické i fytoparazitické druhy háďátek. *Arthrobotrys oligospora* nepoškozuje rostliny, naopak zvyšuje obranné reakce rostlin a může podpořit rezistenci rostlin k háďátkům nebo patogenům (Douda a kol., 2011).

Arthrobotrys dactyloides Drechsler 1937 zachycuje háďátka pomocí škrtících ok. Vykazuje pomalejší růst hyf oproti podobným druhům (např. *A. oligospora* a *A. superba*).

Hirsutella rhossiliensis Minter & B. L. Brady 1980 má široký hostitelský okruh včetně rostlinných parazitických háďátek, volně žijících háďátek a roztočů. Tato houba tvoří nepohyblivé konidie přichycující se na kutikulu háďátek. Klíčící hyfa houby penetruje kutikulu háďátka a v něm se vytvoří bulbus, z něhož vyrůstají hyfy asimilující živiny z hostitele a zároveň prorůstají tělní dutinou háďátka. *Dactylellina candida* (Nees) Yan Li 2005 patří do skupiny nematofágních hub. Hustota mycelia a rychlost růstu je srovnatelná s *A. dactyloides*, avšak její mycelium je jemnější. *Dactylella lysipaga* Drechsler 1937. Tato houba parazituje na saprofytických nebo parazitických háďátkách. *Monacrosporium phymatopagum* (Drechsler) Subram. 1964 je saprofytický druh žijící v půdě, na dřevě nebo parazituje na háďátkách. Další nematofágní houbou je *Monacrosporium elliposporum* (Preuss) R. C. Cooke & C. H. Dickinson 1965 (Zouhar a kol., 2010).

3.7 Popis jednotlivých druhů rodu *Meloidogyne*

Kořenová hálkotvorná háďátka jsou široce rozšíření parazité rostlin. Do roku 1998 bylo popsáno více než 80 druhů. Rod těchto rostlinných parazitů rozpoznáme snadno, ale jejich identifikace na úrovni druhu se vzhledem k relativně malé specifické morfologické variabilitě určuje obtížně. V posledních letech se ukázalo, že některé popsané druhy jsou v podstatě směsné populace několika druhů (Karssen, 2002).

V následujícím chronologickém uspořádání jsou uvedeny druhy *Meloidogyne*, které byly popsány nebo zjištěny v Evropě (Karssen, 2002):

M. marioni (Cornu, 1879) Chitwood & Oteifa, 1952 (species inquirenda).

M. artiellia Franklin, 1961.

M. naasi Franklin, 1965.

M. kirjanovae Terenteva, 1965.

M. ardenensis Santos, 1968.

M. deconincki Elmiligy, 1968.

M. litoralis Elmiligy, 1968.

M. megriensis (Poghossian, 1971) Esser, Prry & Taylor, 1976.

M. kralli Jepson, 1983.

M. hispanica Hirschmann, 1986.

M. maritima (Jepson, 1987) Karssen, van Aelst & Cook, 1998.

M. lusitanica Abrantes & Santos, 1991.

M. fallax Karssen, 1996.

M. duytsi Karssen, van Aelst & van der Putten, 1998.

M. chitwoodi Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980.

M. graminis (Sledge & Golden, 1964) Whitehead, 1968.

M. hapla Chitwood, 1949.

M. incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949.

M. exigua (Göldi, 1892) Chitwood, 1949.

M. arenaria (Neal, 1889) Chitwood, 1949.

M. javanica (Treub, 1885) Chitwood, 1949 .

3.7.1 *Meloidogyne exigua*

Meloidogyne exigua (Göldi, 1892) Chitwood, 1949 je častým škůdcem pro většinu odrůd pěstované kávy (*Coffea arabica* L.). Představuje vážné agronomické omezení, poněvadž je široce rozšířeno ve Střední a Jižní Americe. *M. exigua* způsobuje všeobecné oslabení kávovníků spojené s poklesem výnosu, který je odhadován na 10 až 20 %. Celý životní cyklus

trvá 32 až 42 dnů při teplotě 25 – 30 °C u vnímavého kultivaru (Anthony et al., 2005). *M. exigua* byla rovněž hlášena i v Evropě, a to z Itálie a Řecka. Neexistuje žádný náznak, že by se šířila z jižní Evropy. Pravděpodobnější výklad jejího výskytu v Evropě je takový, že zde byla zavlečena s popínavými rostlinami pocházejícími z Brazílie, kde je *M. exigua* široce rozšířena (Karssen, 2002).

3.7.2 *Meloidogyne arenaria*

Meloidogyne arenaria (Neal, 1889) Chitwood, 1949 parazituje téměř na každé rostlinné čeledi, včetně hospodářsky významných plodin a okrasných rostlin. Velikost hálek se pohybuje od malých až po relativně velké, někdy jsou uspořádány jako šňůra perel, což je pro tento druh typické. V jižních zemích Evropy, např. Portugalsko, jižní Francie, Španělsko, Itálie, Řecko, se na poli *M. arenaria* vyskytuje jen omezeně. V severní Evropě bývá často detekována ve sklenících (Karssen, 2002).

Tento druh se vyskytuje v Severní, Jižní a Střední Americe, Indii, Izraeli, Jižní Africe, Belgii, Velké Británii, Holandsku, Německu, Polsku, Bulharsku, Maďarsku a v dalších zemích. Jako hostitelské rostliny využívá rajčata, salát, okurky, mrkev, petržel, zelí, celer, hrách, z okrasných rostlin pak například *Antirrhinum*, *Begonia*, *Cactus*, *Chrysanthemum*, *Gerbera*, *Iris*, *Pelargonium*, *Primula*, *Rosa*. Z polních plodin jsou to žito, oves, pšenice, ječmen, řepa, brambory, vaječná, kukuřice a další. Naopak odolné jsou některé odrůdy jahodníku, kávovníku, bavlníku a batátů. *M. arenaria* může napadat také různé dřeviny *Prunus persica* (L.), *Psidium guajava* L., *Ficus*, *Philadelphus* a *Philodendron* (Decker, 1969). *Meloidogyne arenaria* je v mnoha částech světa považováno za jednoho z nejzávažnějších škůdců podzemnice olejné. V silně zamořených oblastech tak způsobuje velké ztráty na výnosech (Korayem and Bondok, 2013).

3.7.3 *Meloidogyne hispanica* (Hirschmann, 1986)

Tento druh byl poprvé nalezen v Seville v jižním Španělsku na kořenech podnože broskve (*Prunus persica* (L.)) (Karssen, 2002). Od té doby způsobovala velké ztráty na

výnosech a kvalitě na rodu *Prunus spp.* v mnoha zemích, obzvláště v oblastech Středomořského klimatu. Původně se zdálo, že výskyt *M. hispanica* je omezen na jižní část Španělska, ale její distribuce je potvrzena po celém světě. Byla hlášena na cukrové třtině (*Saccharum officinarum* L.), révě vinné (*Vitis vinifera* L.), hledíku větším (*Antirrhinum majus* L.), pelargonii (*Pelargonium notatum* (L.) L'Herit), cukrové řepě (*Beta vulgaris* L.), rajčeti (*Solanum lycopersicum* L.), fíkovníku (*Ficus carica* L.) a banánovníku (*Musa* sp.).

Podle morfologických znaků se *M. hispanica* velmi obtížně odlišuje od *M. arenaria*. Oba druhy jsou totiž velmi podobné jak v morfologických a biologických vlastnostech, tak i v hostitelském okruhu (Landa et al., 2008).

3.7.4 *Meloidogyne naasi* (Franklin, 1965)

Tento druh byl popsán v Anglii na jílku mnohokvětém (*Lolium multiflorum* Lamk.) (Decker, 1969). Široce rozšířený je v Evropě, hlášen byl z Walesu, Anglie, Holandska, Německa, Ruska, Belgie, Francie, Itálie a bývalé Jugoslávie (Karssen, 2002). Mimo Evropu se objevuje v Severní a Jižní Americe, příležitostně i v Asii.

M. naasi se vyskytuje na několika druzích trav (včetně golfových hřišť a trávníků) a obilovin (Perry and Moens, 2006). Příkladem je pšenice, ječmen, srha říznačka (*Dactylis glomerata* L.), lipnice luční (*Poa pratensis* L.), kostřava luční (*Festuca pratensis* Huds.), jílek vytrvalý (*Lolium perenne* L.), ovsík vyvýšený (*Arrhenatherum elatius* (L.) Presl.), pýr plazivý (*Elytrigia repens* (L.) Nevski.), z dvouděložných plevelů jitrocel (*Plantago* sp.), šťovík (*Rumex* sp.), ptačinec žabinec (*Stellaria media* L.), rdesno červivec (*Polygonum persicaria* L.), merlík mnohosemenný (*Chenopodium polyspermum* L.), dále je napadán mangold a cukrovka. Pro *M. naasi* jsou charakteristické obloukovitě zahnuté háčky, které tvoří samičky na špičkách kořenů (Decker, 1969).

3.7.5 *Meloidogyne artiellia* (Franklin, 1961)

Tento druh byl nejprve nalezen v Anglii na ovsu. Později byl zjištěn v Řecku na pšenici, kdy docházelo ke ztrátám na výnosech, a následně na cizrně (*Cicer arietinum* L.) ve Španělsku, Itálii a Sýrii (Vito and Greco, 1988). Dalšími hostitelskými rostlinami jsou řepka olejka (*Brassica napus* L.), brukev zelná (*Brassica oleracea* L.), vikev setá (*Vicia sativa* L.), oves setý (*Avena sativa* L.) a pšenice setá (*Triticum vulgare* L.). Experimentálními hostiteli jsou i další druhy z čeledi *Brassicaceae*, *Fabaceae* a *Poaceae* (Karszen, 2002). Hálky samičky *M. artiellia* jsou malé (výjimečně 1cm) a tvoří se převážně na postranních kořincích (Decker, 1969).

3.7.6 *Meloidogyne incognita*

Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 se vyskytuje na všech pěti kontinentech. Hlavními oblastmi výskytu jsou jih USA, Afrika, Austrálie, Indie a Střední a Jižní Amerika, ale tento druh se rovněž objevuje v Turecku, Izraeli, Japonsku, Indonésii, Itálii, Francii, Španělsku, Anglii, Belgii, Holandsku, Německu, Švédsku, Bulharsku, Polsku a Maďarsku (Decker, 1969). Ve střední Evropě přežívá *Meloidogyne incognita* pouze ve sklenících. Přítomnost byla prokázána i v České republice (Tesařová et al., 2003). K pěstovaným hostitelským rostlinám ve sklenících patří rajčata, okurky, salát, celer, zelí, mrkev, z okrasných rostlin *Begonia*, *Cactus*, *Chrysanthemum*, *Fuchsia*, *Gerbera*, *Iris*, *Petunia*, *Rosa*, *Monstera* a další. Mezi rezistentní rostliny patří pýr plazivý (*Elytrigia repens* (L.) Nevski.), pšenice špalda (*Triticum spelta* L.), *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill., *Chrysanthemum morifolium* Ram., *Prunus persica* (L.) Batsch., jahodník obecný (*Fragaria vesca* L.), kávovník (*Coffea* L.) a ambrosie (*Ambrosia* spp.) (Decker, 1969).

3.7.7 *Meloidogyne chitwoodi*

Meloidogyne chitwoodi Golden, O' Bannon, Santo & Finley, 1980 je hlavním škůdcem v oblasti severozápadního Pacifiku v USA, známý v osmi dalších státech USA a Mexiku. V Evropě se vyskytuje v Belgii, Francii, Německu, Portugalsku, Švýcarsku a Nizozemí. Dále v Jižní Africe, Austrálii a Jižní Americe (Argentina) (Perry and Moens, 2006). *Meloidogyne chitwoodi* způsobuje problémy v pěstování brambor *Solanum tuberosum* L., protože negativně ovlivňuje kvalitu brambor, a tím i jejich prodejnost (Powers et al., 2005). Napadá široké spektrum hostitelů, k nimž se řadí jednoděložné a dvouděložné rostliny včetně ekonomicky důležitých plodin jako jsou brambory, pšenice a kukuřice. Tento druh způsobuje relativně malé háčky (Perry and Moens, 2006). *M. chitwoodi* bylo v roce 1998 přidáno do seznamu karanténních organismů, aby se zabránilo dalšímu šíření v rámci Evropy (Karssen, 2002).

3.7.8 *Meloidogyne fallax*

M. fallax a *M. chitwoodi* Karssen, 1996 jsou blízce příbuzné druhy parazitující na jednoděložných a dvouděložných rostlinách, včetně několika významných plodin jako jsou brambory, mrkev a rajčata. *M. fallax* bylo poprvé zjištěno v roce 1992 v oblasti severně od Baexemu (Nizozemsko) a původně identifikován jako odlišná populace *M. chitwoodi*. Po této první zprávě byl zaznamenán na bramborách na několika místech v jižní a jihovýchodní části Nizozemska. Následně byl popsán jako samostatný druh (Perry et al., 2009).

Dalšími oblastmi výskytu tohoto druhu v Evropě je Belgie, Francie, Německo, Švýcarsko, Nizozemsko. Mimo Evropu se objevuje v Jižní Africe, Austrálii a na Novém Zélandu, kde je velice rozšířené (Perry and Moens, 2006). Oba tyto druhy - *M. fallax* a *M. chitwoodi* – se často vyskytují v oblastech mírného pásma (Castagnone-Sereno et al., 1999). Stejně jako *M. chitwoodi* je i *M. fallax* v mnoha zemích uveden jako karanténní organismus (Perry and Moens, 2006).

3.7.9 *Meloidogyne javanica*

M. javanica (Treub, 1885) Chitwood, 1949 je rozšířeno v USA, Střední a Jižní Americe, Austrálii, Indonésii, Indii, Jižní Africe a na Madagaskaru. Tento druh se vyskytuje i v Egyptě, Izraeli, Turecku, Itálii, Španělsku, Holandsku, Belgii a Polsku (Decker, 1969). *M. javanica* má schopnost reprodukce na mnoha jednoděložných a dvouděložných rostlinách (Perry and Moens, 2006). Mezi rostliny, které *M. javanica* napadá ve sklenících, patří rajčata, okurky, salát, mrkev, špenát. Z okrasných rostlin jsou napadány *Cactus*, *Freesia*, *Begonia*, *Gerbera*, *Gladiolus*, *Pelargonium*, *Petunia*, *Primula*, *Viola*, *Rosa*, *Phlox* a *Lathyrus* a z obilovin proso, kukuřice, brambory, řepa, slunečnice, řepka, len, vojtěška, rýže, jetel, lupina, sója, hrách, fazole, vikev, petržel, cibule, zeli, rebarbora, bazalka, fenýkl, levandule, broskvoň a další. Za rezistentní se považuje paprika, některé odrůdy ovesa a ječmene, jahodník, kávovník, bavlník (Decker, 1969). Spolu s *M. arenaria* a *M. incognita* patří *M. javanica* k nejběžnějším kořenovým hálkotvorným háďátkům. Je známo po celém světě, v oblastech mírného pásma je omezeno na skleníky. Na kořenech rostlin vyvolává obvykle poměrně velké háčky (Perry and Moens, 2006).

3.7.10 *Meloidogyne graminis*

Meloidogyne graminis (Sledge & Golden, 1964) Whitehead, 1968. Tento druh parazituje na travách, včetně různých kultivarů obou druhů troskut prstnatých (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) a *Zoysia japonica* Steud., *Paspalum notatum* Fluegge, *Stenotaphrum secundatum* (Walter) Kuntze, *Oryza sativa* L., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. a *Ammophila arenaria* (L.) Link. Detekován byl také na obilovinách *Sorghum vulgare* Pers. a *Zea mays* L. V Evropě byl hlášen z pobřežních dun v Německu a Nizozemsku (Karssen, 2002).

3.7.11 *Meloidogyne hapla*

Meloidogyne hapla Chitwood, 1949 patří mezi nejvýznamnější háďátka ve střední Evropě včetně České republiky, kde představuje hrozbu kultur kořenové zeleniny (Zouhar et al., 2010). Ztráty na výnosech v důsledku tohoto poškození mohou dosahovat 50 až 90 % (Nováková a Zouhar, 2009). *Meloidogyne hapla* bylo zjištěno na několika polích s komerčně pěstovanou zeleninou ve středních Čechách. K napadeným plodinám v oblastech s výskytem patří pórek, cibule, květák, brambory rané a mrkev (Zouhar et al., 2003). V České republice byl proveden monitoring v roce 2001 v několika zelinářských oblastech. V důsledku tohoto monitoringu na několika místech v Polabí byla zjištěna ohniska výskytu *M. hapla* o výměře zhruba 2 ha. Příznaky napadení se projevují od jednotlivých zduřenin na kořenech až po deformace, nevyvinutí hlíz, bulvů nebo hlavního kořene. To mělo za následek doporučení prodloužení osevního postupu mrkve a zařazení obilnin. Celkové ztráty za poslední dva roky vykazovaly nutnost vyloučit z osevního postupu na několik let mrkev, celer, rané brambory. V České republice i celosvětově je nejvíce napadanou plodinou mrkev. Výskyt *M. hapla* byl zjištěn i na Slovensku v roce 1998 (Nováková a Zouhar, 2009). V říjnu v roce 2002 byl poprvé zjištěn výskyt *Meloidogyne hapla* na poli ve Slovinsku, který byl izolován z hálek na sladkých paprikách z polí v Lublani (Širca et al., 2004).

V Evropě je *M. hapla* nepochybně nejběžnější a široce rozšířené kořenové hálkotvorné háďátko v zemědělských oblastech, ale také na přírodních stanovištích jako jsou pobřežní duny, lesy a řeky (Karssen, 2002). Výskyt *M. hapla* je zaznamenán po celém světě jak v oblastech mírného pásma, tak i v tropických a subtropických oblastech ve vyšších nadmořských výškách (Perry and Moens, 2006).

Příkladem zemí, kde se *M. hapla* vyskytuje, je Belgie, Anglie, Holandsko, Dánsko, Švédsko, Francie, Španělsko, Polsko a Německo. Dále pak Japonsko, Austrálie, severní, střední a jižní Afrika, Severní a Jižní Amerika, Turecko a Izrael. Hostitelských rostlin *M. hapla* je více než 350 druhů z různých čeledí (Decker, 1969). Jako hostitelské rostliny jsou popisovány zejména dvouděložné rostliny a to včetně hospodářsky významných plodin a okrasných rostlin, jednoděložné rostliny jsou uváděny jako hostitelské s výrazným dopadem na kvalitu a výnos jen okrajově (Perry and Moens, 2006). V našich klimatických podmínkách se jedná především o brambory, cukrovou řepu, jetel, vojtěšku zelí, bob, petržel, kapustu, slunečnici, len, vlní bob, vikev, pastiňák, jahody, pórek, hrášek, salát, mrkev, celer a rajčata a další (Decker, 1969). Z okrasných rostlin jsou to begonie, gerbery, gladioly, sasanky, dříví, šal, a další (Decker, 1969).

plamének, kosatce, růže a řada dalších jednoletých i vytrvalých druhů (Gaar a Čermák, 2012); z léčivých a aromatických rostlin bazalka pravá (*Ocimum basilicum* L.), fenykl obecný (*Foeniculum vulgare* Mill.), kopr vonný (*Anethum graveolens* L.), heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla* L.), máta peprná (*Mentha piperita* L.), komonice lékařská (*Melilotus officinalis* (L.) Pallas) a řada dalších; z plevelných rostlin sedmikráska obecná (*Bellis perennis* L.), hledík větší (*Antirrhinum majus* L.) a další (Decker, 1969).

3.8 Způsoby diagnostiky

3.8.1 Determinace morfologická

K diagnostice samiček rodu *Meloidogyne* ssp. se využívá rozdílů v kresbě kutikuly tzv. *perinea* (oblast vulvy a análního otvoru). Perineální vzor (obr. 11 v přílohách) je variabilní u většiny druhů (Jepson, 1983). Vulva a anální otvor jsou obklopeny četnými kutikulárními liniemi, které se svým vzhledem podobají otisku prstu. Tyto linie jsou převážně zvlněné a po stranách příčně přerušené. *Fasmidy* v této oblasti mohou být často viděny jako malé lesklé tečky (Decker, 1969). *Perineum* je složeno z konce ocasu, fasmid, křídla, rýhy, hřbetního oblouku, boční linie, tečkování, anusu, vulvy, hřbetní části a břišní části (Kúdela a kol., 2007). Použití morfologických znaků hlavové části sameček je důležité pro jejich identifikaci (Jepson, 1983). Klíč k určování samiček je založen na rozdílnosti *perinea* jednotlivých druhů. K rozlišení sameček je uvedena jejich délka, délka ústního bodce, délka spikuly a vzdálenost vyústění dorzální jícnové žlázy do dutiny jícnu od báze ústního bodce (Decker, 1969).

Klasickou metodou pro identifikaci a stanovení počtu háďátek je tedy světelná mikroskopie a to jak nativních tak trvalých preparátů. (Mekete et al., 2012).

3.8.2 Molekulární genetické metody diagnostiky – metody založené na PCR

V současné době existuje několik metod PCR (polymerázová řetězová reakce) používaných k diagnostice hád'átek. PCR – RFLP, PCR se specifickými primery, PCR – SSCP – konformační polymorfismus jednovláknové DNA (Punja et al., 2007).

PCR je metoda, kterou se *in vitro* amplifikují pro enzymatickou syntézu definované DNA sekvence. Metoda se nazývá polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction). Podstatou je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA, ke které dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'OH – konce směřují proti sobě. Jako primery se používají dva uměle připravené krátké oligonukleotidy o délce 18 – 30 bází, odvozené z koncových sekvencí DNA určené k amplifikaci (Zouhar a kol., 2002). Tato technika využívá vlastností termostabilních DNA polymeráz (Raclavský, 1998). Ty byly původně izolovány z bakterie *Thermus aquaticus* žijících v podmínkách extrémně vysokých teplot termálních pramenů (70 – 75 °C) Yellowstonekého národního parku v roce 1969. Reakční směs pro amplifikaci specifického fragmentu DNA se skládá z pufru pro danou polymerázu, MgCl₂, templátové DNA, dvou nebo více primerů, DNA polymerázy a směsi deoxyribonukleotidů.

V současné době je na trhu celá řada polymeráz izolovaných z různých bakterií (*Pfu*, *Tfl*, Dynazyme, *Taq gold*) a řada dalších.

Běžně používaným objemem pro jednu reakci je 25 – 50 µl. Amplifikace DNA u PCR probíhá v tepelně a chemicky inertních mikrozkmavkách nebo v jamkách speciálních destiček (Zouhar a kol., 2002).

Samotná reakce probíhá formou 30 i více cyklů, v závislosti na teplotě reakční směsi se opakují tři následující kroky: (1) zahřátí na teplotu 94 – 96 °C vede k denuraci templátové DNA, čímž se rozdělí komplementární řetězce DNA, (2) ochlazení, snížení teploty na 30 °C – 65 °C umožní nasednutí primerů (annealing) k jednovláknovým DNA řetězcům, a (3) zahřátí na teplotu (65 – 75 °C) vede k aktivaci termostabilní polymerázy, která rozpozná volné 3' - konce a syntetizuje nový řetězec ve směru 5' → 3' podle denaturované templátové DNA. Výslednými produkty jsou fragmenty DNA přesně definované délky, které jsou vymezené vazebnými místy primerů. Opakování jednotlivých cyklů umožňují speciální PCR termocykléry.

Po skončení reakce se produkty PCR analyzují pomocí horizontální agarozové elektroforézy (Raclavský, 1998; Zouhar a kol., 2002). Agaróza je polysacharid složený 3,6 –

anhydro-L-galaktosy a D-galaktosy. Připravuje se z agaru o vysokém stupni čistoty. Ve vroucí vodní lázni se rozpouští v pufru a při teplotě 50 – 60 °C se nalévá do vodorovné formy a následně se do ní zasune šablona, jež vytvoří jamky. Po ztuhnutí gelu se plastová nádoba vloží do elektroforetického aparátu, který se naplní puftrem. Ke vzorkům rozpuštěných nukleových kyselin se přidávají barviva. Nízkonapětovou elektroforézou při potenciálovém spádu 5 – 10 V/cm délky gelu se dělí nukleové kyseliny. Průběh elektroforézy je možné sledovat pomocí pohyblivosti přidaného barviva. Pokud byl do gelu přidán ethidiumbromid, látka, která červenooranžově fluoreskuje v ultrafialovém světle, lze nukleové kyseliny zviditelnit pod dlouhovlnným ultrafialovým světlem již v průběhu elektroforézy (Křemen a kol., 1998). Ethidium bromid je látka s mutagenním účinkem, proto je potřeba zvýšené opatrnosti a používat ochranná opatření (Zouhar a kol., 2002). PCR metoda byla využita jako rychlý PCR test pro identifikaci *M. hapla*, *M. chitwoodi* a *M. fallax* a její citlivé rozlišení od sebe navzájem a od *M. incognita* ve směsích (Zijlstra, 1997).

PCR – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) polymorfismus délky štěpných fragmentů. Tato metoda se používá k diagnostice monospecifických vzorků a má dva kroky: enzymatické štěpení molekul DNA ve specifickém štěpném restriční místě enzymem zvaným restriční endonukleáza a amplifikaci specifického úseku genové DNA univerzálních primerů. Techniky založené na PCR se používají pro diagnostiku různých zemědělsky významných druhů kořenových hádkotvorných háďátek na základě jejich rozlišení (Punja et al., 2007). PCR metoda RFLP byla použita v Koreji pro identifikaci tří hlavních druhů *Meloidogyne*. Poskytla tak diskriminační profil použitelný pro tři hlavní *Meloidogyne* druhy, *M. hapla*, *M. incognita*, a *M. arenaria* (Han et al., 2004).

PCR se specifickými primery. Tento typ PCR představuje nový krok ve vývoji DNA diagnostiky a umožňuje detekci jednoho nebo více druhů háďátek ve směsi jednoho testu PCR. Tím se sníží čas pro diagnostiku i náklady.

Diagnostika pomocí PCR se specifickými primery byla vyvinuta pro široké spektrum rostlinných parazitických háďátek. V multiplexní PCR se sada několika primerů používá pro amplifikaci několika cílových genů. Nested PCR v multiplexním testu se specifickými primery pocházejícími ze SCAR byl vyvinut pro diagnostiku několika druhů kořenových

hátkotvorných háďátek (Punja et al., 2007). Metoda byla použita pro identifikaci *M. hapla*, *M. chitwoodi* a *M. fallax* jako účinný způsob umožňující spolehlivou identifikaci populace nebo jedinců, kteří sdílejí společné znaky a patří tedy k jednomu druhu (Zijlstra, 2000).

Metoda PCR – SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) slouží k detekci mutací typu záměny jedné báze (mutace, která nemění délku řetězce nukleových kyselin). Tato metoda je založena na principu různé migrace jednovláknových molekul DNA (ssDNA). Ty se liší svou sekundární strukturou v nativním polyakrylamidovém gelu. Konformace jednovláknového DNA fragmentu je dána intramolekulárními interakcemi uvnitř sekvence DNA. Před zahájením elektroforézy je nutné získaný fragment denaturovat a následně nechat nukleové kyseliny v podmínkách vhodných pro vytvoření jednovláknové prostorové konformace. Tato technika je jednoduchá, velice citlivá a zároveň efektivní (Zouhar a kol., 2002). Metoda byla použita pro rychlou identifikaci kořenových hátkotvorných háďátek rodu *Meloidogyne* spp. na základě ITS2 sekvenční variace detekované pomocí PCR – SSCP v kulturách a polních vzorcích (Clapp et al., 2000).

3.8.3 Sekvenační techniky

Nejpoužívanější metodou pro stanovení sekvence DNA je Sangerova dideoxy terminační metoda, která využívá modifikovanou tzv. asymetrickou PCR k syntéze kopií DNA. Tato modifikovaná PCR využívá na rozdíl od klasické PCR pouze jeden primer. Amplifikace PCR produktu tedy probíhá pouze na jednom řetězci DNA, na který se tento primer specificky váže a kopie molekul DNA nepřibývají exponenciální řadou. Kromě deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP) jsou do PCR reakce použity i dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP), které postrádají hydroxylovou skupinu na 3' – konci, na kterou by se mohl navázat další nukleotid v nově vznikajícím řetězci. Tyto ddNTP tedy slouží jako terminátory syntézy. Dříve se samotná syntéza DNA pomocí PCR prováděla odděleně ve čtyřech vzorcích, přičemž každý z nich obsahoval jiný dideoxynukleosidtrifosfát (A, T, G, nebo C). Pro detekci nově syntetizovaných řetězců je fluorescenční značení nukleotidů, kterého se využívá při automatickém sekvenování. Detekce PCR produktů probíhá během kapilární elektroforézy pomocí laserového detektoru napojeného na počítač. Elektroforéza probíhá v tenké kapiláře naplněné

gelem (Křemen a kol., 1998). Metoda sekvenace je v současné době používána nejen pro diagnostiku, ale i pro studium evoluce organismu. Vzhledem k automatizaci a rozšíření této techniky do komerční sféry se stává rutinně používanou technikou zejména v humánní medicíně, ale i ve fytopatologické praxi (Abad et al., 2008).

3.9 Bioinformatická analýza dat

Rozvoj a ekonomická dostupnost sekvenačních technik vedl v posledních dvou dekadách k značnému rozvoji i na poli bioinformatické analýzy získaných dat. Celá řada genomů je známá a to dává dobrý předpoklad studia nově získaných populací hád'átek. Bioinformatická analýza se tak stává jedním z fertálních klíčů pro analýzu biologických dat, která jsou při výzkumu získána a to jak na úrovni RNA, DNA tak proteinů (Lesk, 2008). Bioinformatická analýza byla použita v mnoha pracích pro objasnění příbuznosti populací hád'átek a komparaci jejich řazení v taxonomickém systému vytvořeném na základě morfologických biologických dat. Jako příklad lze uvést práci Douda et al., (2013), kdy byly porovnávány populace *D. dipsaci* a *D. destructor* s dalšími dostupnými daty v genobance a kde autoři přímo upozorňují na nutnost provést revizi stávajícího řazení studovaných druhů hád'átek v současném taxonomickém systému. Jsou tu ale i práce kde molekulární analýza napomohla při objasnění druhové příslušnosti nově objevených hád'átek, jako je to v případě práce Marek et al. (2014).

4 MATERIÁL A METODY

Práce byla rozdělena do čtyř posloupných kroků:

1. Biologický test a získání háďátek pro izolaci DNA.
2. Izolace DNA v dostatečném množství a kvalitě.
3. Amplifikace dnou vybraných úseků DNA pro sekvenaci a následnou bioinformatickou analýzu.
4. Sekvence a bioinformatická analýza.

4.1 Biologický test přítomnosti háďátek rodu *Meloidogyne*

Z náhodných lokalit na území České republiky byly odebrány pomocí vzorkovací lopatky přibližně 2 kilogramy půdy z hloubky 15 centimetrů. Takto získané vzorky půdy byly umístěny do jednotlivých kontejnerů o objemu 500 ml, aby nedocházelo ke kontaminaci s jinými vzorky půdy. Do jednotlivých kontejnerů byly vysazeny hostitelské rostliny rajčete (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw.) – odrůda Tornádo v množství jedna v každém jednotlivém kontejneru. Tyto rostliny byly použity jako biologická past na háďátka rodu *Meloidogyne*. Po čtyřech měsících kultivace v řízených podmínkách, byly vzorky prověřeny na přítomnost symptomů napadení háďátky, jako kritérium napadení byly stanoveny hálky nebo zduřeniny na kořenech. Rostliny bylo nutné vyjmout z půdy v kontejnerech tak, aby nedošlo o odtržení postranních kořenů a následně vizuálně zhodnotit přítomnost hálek na kořenovém systému. Odebrané hálky z kořenů rostlin byly uchovány v mikrozkuhavce při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pomocí stereo-mikroskopu SZX7 a mikroskopu BX51 proběhla fotodokumentace.

4.2 Izolace DNA

Byla zvolena metoda izolace DNA, která je za tímto účelem na KOR běžně používána. Extrakce DNA z hálek pomocí fenolu, postup:

Použité chemikálie

fenol, chloroform, izoamylalkohol, CTAB extrakční pufr, isopropanol, etanol, TE pufr

1. Háčky rozdrtit v tekutém dusíku ve třecí misce.
2. Poté přidat 500 μ l do třecí misky extrakčního pufru CTAB a homogenizovat. Homogenát odsát pipetou a vložit do mikrozkušavky.
3. Znovu přidat 500 μ l extrakčního pufru CTAB opět rozetřít a odsát.
4. Homogenát inkubovat 1h při teplotě 65 °C ve vodní lázni.
5. Přidat 800 μ l směsi fenol : chloroform : izoamylalkohol (25 : 24 : 1).
6. 10' třepat na vortexu (IKA – VIBRAX – VXR).
7. 10' odstředit při 9000 g (CENTRIFUGA – UNIVERSAL 320 R).
8. Po centrifugaci horní fázi odsát a dát do nové mikrozkušavky.
9. Přidat 800 μ l směsi chloroform: izoamylalkohol (24 : 1).
10. 10' třepat na vortexu (IKA – VIBRAX – VXR).
11. 10' odstředit při 9000 g (CENTRIFUGA – UNIVERSAL 320 R).
12. Po centrifugaci horní fázi odsát a vložit do nové mikrozkušavky.
13. Přidat stejný objem isopropanolu.
14. Precipitovat DNA v tekutém dusíku 3 \times po sobě, vždy nechat rozmraznou 9 – 12 h při teplotě – 25 °C.
15. Odstředit při 10 000 g po dobu 10'.
16. Následně slít tekutinu.
17. Přidat 200 μ l 70% etanolu.
18. Přepat 10' na (IKA – VIBRAX – VXR) při 600 rpm.
19. Odstředit při 10 000 g po dobu 10'.

20. Slít supernatant a peletu sušit na stole přibližně 30 minut.
21. Následně přidat 50 μ l TE pH 8,0 a 30' třepat na (IKA – VIBRAX – VXR).
22. Resuspendovat a změřit koncentraci.

Měření čistoty DNA

Čistota a koncentrace vzorků byly přeměřeny na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Pro měření na tomto přístroji je zapotřebí jen 1 μ l studovaného vzorku a 2 μ l TE pH 8,0.

Dle stanovených parametrů bylo rozhodnuto o vhodnosti izolovaného vzorku pro další molekulárně biologické analýzy, pokud čistota nebo kvantita byla nedostačující, izolace byla opakována.

- a) $R_{260/280} = 1,8$ do 2,0 čistá DNA
- b) $R_{260/280} < 1,8$ kontaminace proteiny
- c) $R_{260/280} > 2,0$ kontaminace organickými sloučeninami (fenol, chloroform)
- d) $R_{260/230} > 2,0$ optimum
- e) $R_{260/230} < 2,0$ kontaminace sacharidy

4.3 PCR

Pro tuto práci byly vybrány dva úseky pro amplifikaci evolučně stálých nic méně druhově polymorfních fragmentů cistronu rDNA (region mezi geny S18 a S28 a část genu S28) a dále pak specifické primery pro detekci *M. hapla*. Amplifikace probíhaly v termocykléru Biorad C1000. V první fázi experimentu byla amplifikovatelnost očekávaných fragmentů ověřena pomocí levné *Taq* polymerázy a u vybraných, vhodných vzorků pak

proběhla příprava fragmentů pro sekvenaci pomocí *Pfu* polymerázy a to za účelem snížení chybovosti zařazování nukleotidů v průběhu amplifikace.

Celkový objem reakční směsi pro PCR byl 25 μ l a byly použité primery S 18 – S 21, MH1 R, MHO.

Primery: S 18 – S 21.

S 18 – 5' – TTGATTAGGTCCCTGCCCTT – 3'

S 21 – 5' – TTCACTCGCCGTTACTAAG – 3'

Složení PCR master mixu:

1. ddH ₂ O	17,1 μ l
2. pufr pro <i>Taq</i> DNA polymerázu (10 x), (Fermentas)	2,5 μ l
3. hořečnaté soli MgCl ₂ (25 mM), (Fermentas)	3,0 μ l
4. dNTP (25 mM), (Fermentas)	0,5 μ l
5. primer – mix (25 μ M), (Sigma)	0,4 μ l
6. <i>Taq</i> DNA polymeráza, (Fermentas)	0,5 μ l
7. izolovaná DNA	1,0 μ l

PCR program:

1. počáteční denaturace	94 °C	3:00
2. denaturace	94 °C	1:00
3. annealing	60 °C	0:30
4. elongace	72 °C	1:00
5. 35× od kroku 2.		
6. konečná elongace	72 °C	5:00
7. chlazení	12 °C	

Primery: MH1 R, MHO.

MHO – 5' – CAGGCCCTTCCAGCTAAAGA – 3'

MH1 R – 5' – CTTCGTTGGGGAAGTGAAGA – 3'

Mastermix pro PCR:

1. ddH ₂ O	17,1 µl
2. pufr pro <i>Taq</i> DNA polymerázu (10 x), (Fermentas)	2,5 µl
3. hořečnaté soli MgCl ₂ (25 mM), (Fermentas)	3,0 µl
4. dNTP (25 mM), (Fermentas)	0,5 µl
5. primer – mix (25 µM), (Sigma)	0,4 µl
6. <i>Taq</i> DNA polymeráza, (Fermentas)	0,5 µl
7. izolovaná DNA	1,0 µl

PCR program:

1. počáteční denaturace	94 °C	2:00
2. denaturace	94 °C	0:30
3. annealing	58 °C	1:00
4. elongace	72 °C	1:00
5. 35× od kroku 2.		
6. konečná elongace	72 °C	5:00
7. chlazení	12 °C	

Celkový objem reakční směsi pro PCR byl 25 µl a byly použité primery D2A, D3B, S18 – S 21.

Primery: D2A, D3B.

D2A – 5' – ACAAGTACCGTGAGGGAAAG – 3'

D3B – 5' – TCGGAAGGAACCCAGCTACTA – 3'

Reakční směs obsahovala:

1. pufr (EUR _x)	2,5 μl
2. dNTP (5 μM), (EUR _x)	1,0 μl
3. primer	0,4 μl
4. <i>PfuUltra</i> (5 U/μ), (EUR _x)	0,25 μl
5. DNA	1,0 μl
6. ddH ₂ O	19,85 μl

PCR program:

1. počáteční denaturace	95 °C	5:00
2. denaturace	95 °C	1:00
3. annealing	53 °C	0:30
4. elongace	72 °C	2:00
5. 40× od kroku 2.		
6. konečná elongace	72 °C	15:00
7. chlazení	12 °C	

Primery: S18 – S21.

S 18 – 5' – TTGATTAGGTCCCTGCCCTT – 3'

S 21 – 5' – TTTCACTCGCCGTTACTAAG – 3'

Reakční směs obsahovala:

1. pufr (EUR _x)	2,5 μl
2. dNTP (5 μM), (EUR _x)	1,0 μl
3. primer	0,4 μl
4. <i>PfuUltra</i> (5 U/μ), (EUR _x)	0,25 μl
5. DNA	1,0 μl
6. ddH ₂ O	19,85 μl

PCR program:

1. počáteční denaturace	95 °C	3:00
2. denaturace	95 °C	1:00
3. annealing	60 °C	0:30
4. elongace	72 °C	3:00
5. 40× od kroku 2.		
6. konečná elongace	72 °C	15:00
7. chlazení	12 °C	

4.4 Příprava PCR produktů pro nanášení do gelu

Z PCR mikrozkušavek s produktem se odpipetovalo 5 μ l a smíchalo s 1 μ l barvy (6× Orange Loading Dye (Fermentas)). Tento vzorek se vložil do prostředních jamek v agaróze a do okrajových jamek se napipetoval marker (Mass RulerTM DNA Ladder Low Range) o objemu 2 – 3 μ l, pomocí něhož je možné odhadnout délku amplifikovaného fragmentu.

Elektroforéza (Cleaver) byla spuštěna po dobu 30 až 45 minut při konstantním napětí 85 voltů. Po ukončení elektroforézy se separované kyseliny na gelu zviditelnily pomocí UV transiluminátoru (Infinity). Obraz vzniklý fluorescencí molekul nukleové kyseliny v gelu, byl snímán videokamerou a byl zobrazen na monitoru osobního počítače. Jednotlivé obrazy bylo možné ukládat v různých formátech nebo tisknout přímo na tiskárně.

4.5 Sekvence a bioinformatická analýza

Před sekvenací byl produkt PCR vyříznut z agarozového gelu a purifikován pomocí GelJet purification kit (Fermentas) a to přesně podle návodu výrobce. Po purifikaci byla opět změřena koncentrace produktu, produkt byl naředěn na požadovanou koncentraci 50ng/ μ l a rozdělen do dvou mikrozkušavek 1,5 ml v objemu 5 μ l a ke každé části bylo připipetováno 5 μ l primeru o koncentraci 5pmol/ μ l. Takto připravené produkty byly opatřeny zakoupeným barkodem a zaslány k sekvenaci (firma GATC Biotech). Po získání sekvencí byly tyto použity

pro bioinformatickou analýzu a konstrukci fylogenetických stromů a to pomocí volně dostupných aplikací tak jak je popsáno v kapitole výsledky.

5 VÝSLEDKY

5.1 Biologický test přítomnosti háďátek rodu *Meloidogyne*

Výskyt populací háďátek rodu *Meloidogyne* na území ČR byl sledován na 78 lokalitách. Cílem výzkumu bylo zjišťování výskytu *Meloidogyne hapla* nebo jiných druhů rodu *Meloidogyne*. Ze 78 odebraných vzorků uložených do kontejnerů vykazovalo pouze 13 vzorků pozitivní symptomatické napadení. Vzhledem k obtížné diagnostice by bylo nutné provést morfologickou determinaci samičího perinea, ovšem nedostatek biologického materiálu tuto diagnostiku znemožnil. Tato problematika bude otázkou pro další výzkum. Přínosem tohoto výzkumu v této fázi bylo zjištění výskytu nových lokalit napadených *Meloidogyne* (viz přílohy).

5.2 Izolace DNA

Tab. 1 – Čistota a koncentrace DNA izolovaných vzorků z pozitivních lokalit

#	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	Hradištko	68.2	ng/μl	1.364	0.740	1.84	1.50	DNA	50.00
2	Valenka	15.4	ng/μl	0.308	0.185	1.66	1.41	DNA	50.00
3	188	61.8	ng/μl	1.236	0.809	1.53	1.27	DNA	50.00
4	191	132.7	ng/μl	2.654	1.421	1.87	1.79	DNA	50.00
5	196	64.9	ng/μl	1.298	0.934	1.39	0.94	DNA	50.00
6	211	122.8	ng/μl	2.456	1.270	1.93	1.84	DNA	50.00
7	213	16.8	ng/μl	0.336	0.214	1.57	2.25	DNA	50.00
8	214	50.0	ng/μl	0.999	0.589	1.70	1.47	DNA	50.00
9	12-	46.9	ng/μl	0.938	0.634	1.48	1.25	DNA	50.00
10	3+	14.0	ng/μl	0.279	0.170	1.65	0.97	DNA	50.00
11	10+	44.2	ng/μl	0.885	0.520	1.70	1.13	DNA	50.00
12	11+	31.3	ng/μl	0.626	0.434	1.44	1.22	DNA	50.00
13	14+	26.6	ng/μl	0.533	0.341	1.56	1.12	DNA	50.00

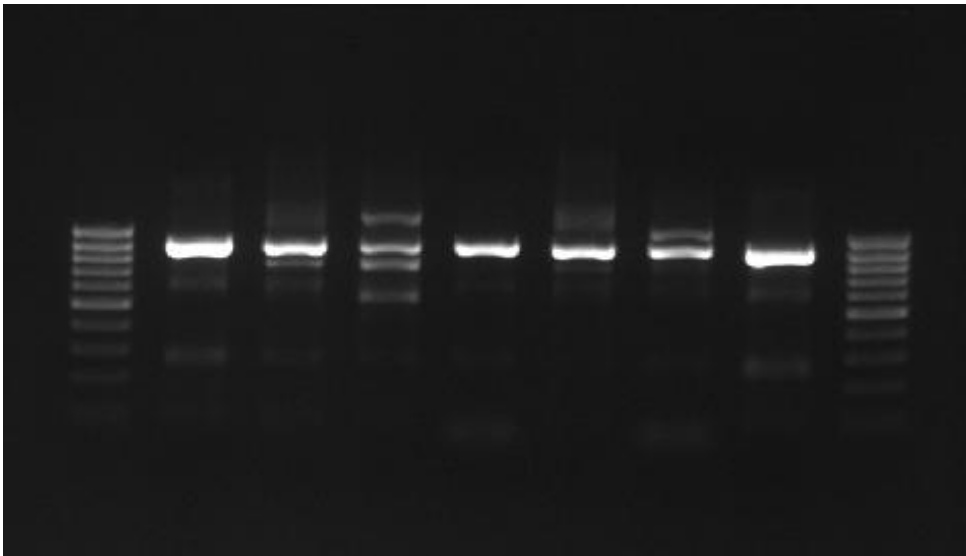
I v případě nízké čistoty se potvrdila amplifikovatelnost získané DNA.

5.3 Příprava PCR fragmentů pro sekvenaci

V některých případech došlo k amplifikaci semi-nespecifických produktů, tato skutečnost byla zohledněna při výběru produktu pro sekvenaci a to tak, že byl vybrán fragment predikované délky.

Elektroforeogram produktů PCR s použitím primerů S18, S21

bp M 1 2 3 4 5 6 7 M



M – molekulární marker

1 – DNA izolovaná z hálek z lokality 213 (obr. 21 v přílohách)

2 – DNA izolovaná z hálek z lokality 14+ (obr. 20 v přílohách)

3 – DNA izolovaná z hálek z lokality 3+ (obr. 18 v přílohách)

4 – DNA izolovaná z hálek z lokality 214 (obr. 22 v přílohách)

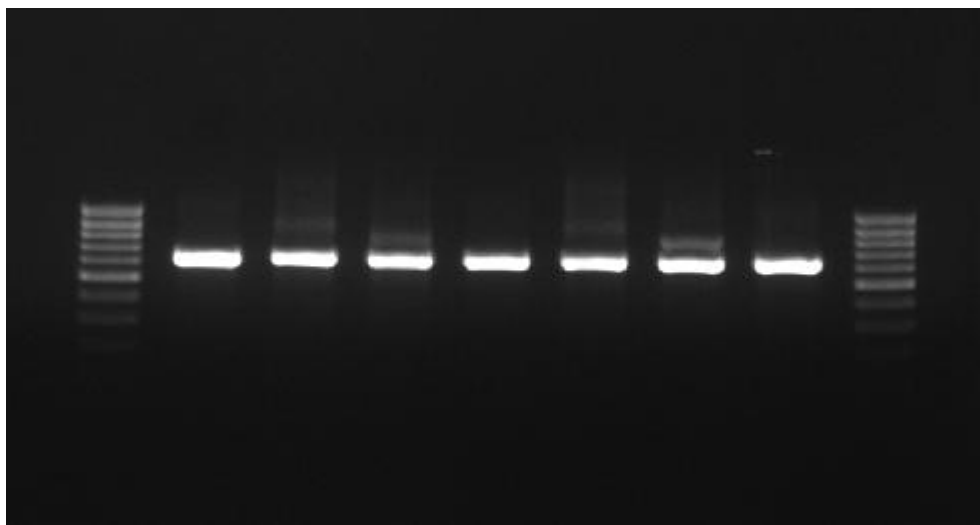
5 – DNA izolovaná z hálek z lokality 211 (obr. 23 v přílohách)

6 – DNA izolovaná z hálek z lokality 10+ (obr. 19 v přílohách)

7 – DNA izolovaná z hálek z lokality Valenka (obr. 13 v přílohách)

Elektroforeogram produktů PCR s použitím primerů D2A, D3B

bp M 1 2 3 4 5 6 7 M



M – molekulární marker

1 – DNA izolovaná z hálek z lokality 213 (obr. 21 v přílohách)

2 – DNA izolovaná z hálek z lokality 14+ (obr. 20 v přílohách)

3 – DNA izolovaná z hálek z lokality 3+ (obr. 18 v přílohách)

4 – DNA izolovaná z hálek z lokality 214 (obr. 22 v přílohách)

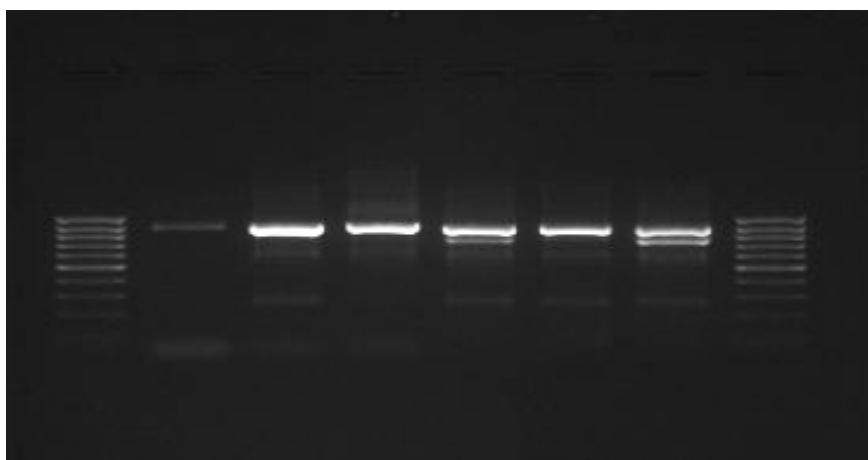
5 – DNA izolovaná z hálek z lokality 211 (obr. 23 v přílohách)

6 – DNA izolovaná z hálek z lokality 10+ (obr. 19 v přílohách)

7 – DNA izolovaná z hálek z lokality Valenka (obr. 13 v přílohách)

Elektroforeogram produktů PCR s použitím primerů S18, S21

bp M 1 2 3 4 5 6 M



M – molekulární marker

1 – DNA izolovaná z hálek z lokality 188 (obr. 12 v přílohách)

2 – DNA izolovaná z hálek z lokality 191 (obr. 16 v přílohách)

3 – DNA izolovaná z hálek z lokality 196 (obr. 17 v přílohách)

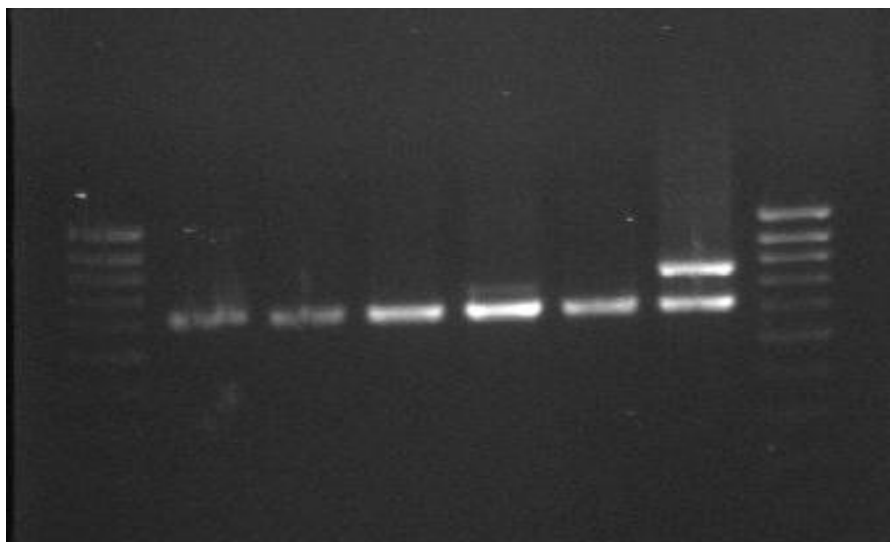
4 – DNA izolovaná z hálek z lokality 12- (obr. 14 v přílohách)

5 – DNA izolovaná z hálek z lokality 11+ (obr. 15 v přílohách)

6 – DNA izolovaná z hálek *Meloidogyne hapla* (skleník ČZU)

Elektroforeogram produktů PCR s použitím primerů D2A, D3B

bp M 1 2 3 4 5 6 M



M – molekulární marker

1 – DNA izolovaná z hálek z lokality 188 (obr. 12 v přílohách)

2 – DNA izolovaná z hálek z lokality 191 (obr. 16 v přílohách)

3 – DNA izolovaná z hálek z lokality 196 (obr. 17 v přílohách)

4 – DNA izolovaná z hálek z lokality 12- (obr. 14 v přílohách)

5 – DNA izolovaná z hálek z lokality 11+ (obr. 15 v přílohách)

6 – DNA izolovaná z hálek *Meloidogyne hapla* (skleník ČZU)

5.4 Sekvence a bioinformatická analýza

Každý fragment byl sekvenován z obou stran tedy sence a anti sence. Sekvence byly po zaslání otevřeny v programu Sequence scanner, byla posouzena kvalita sekvence a báze, které byly „nejasné“, byly dle obdržného elektroforeogramu (obr. 26 v přílohách) opraveny, dále byly složeny sekvence sence a antisence tak, aby vznikla jedna sekvence, pro transformace sekvencí byl použit volně přístupná program (reverse and complement tool). Sekvence byly v prvním, případě použity pro diagnostiku a to pomocí algoritmu BLAST nucleotide blast. Ve všech případech byla nalezena nejvyšší podobnost s *M. hapla*. Dále bylo přistoupeno k porovnání sekvencí a konstrukci fylogenetického stromu. Pro aligment a konstrukci fylogenetického stromu byl použit program ClustalW omega (obr. 28 v přílohách). Byla použita metoda UPGMA a byl vytvořen nezakořeněný fylogenetický strom. Který byl dále upraven v programu FigTree1.4.0. Pro konstrukci matice podobností byly zařazeny i data z databáze NCBI a to jmenovitě (*M. fallax*, *M. chitwoodi*, *M. minor* a *M. hapla*) Byla získána následující bioinformatická data o genetické vzdálenosti mezi populacemi z jednotlivých lokalit.

Vybraná data z matice podobnosti sekvencí úseku cistronu rDNA s použitím primerů S18, S21 (obr. 25 v přílohách).

3+	podobnost s lok. Hradištko z 99,61 %
188	podobnost se 191 z 99,22 %
211	podobnost s Valenkou z 99,22%
213	podobnost se 191, 214 z 99,47%
11+	podobnost s 10+ z 99,55%

Vybraná data z matice podobností D23 (obr. 24 v přílohách).

1) lok 11+	podobnost s Hradištko, Valenka, <i>M. hapla</i> z 99,40%
2) lok 188	podobnost s Hradištko z 99,18 %

Analýza dat:

Sekvence použité jako standardy pro ITS (S18/S21)

M.chitwoodi gi|359300691|gb|JN157868.1|

M.fallax gi|544183281|gb|KC241958.1|

M.hapla gi|388850736|gb|JX024148.1|

M.minor gi|519766939|gb|KC545879.1|

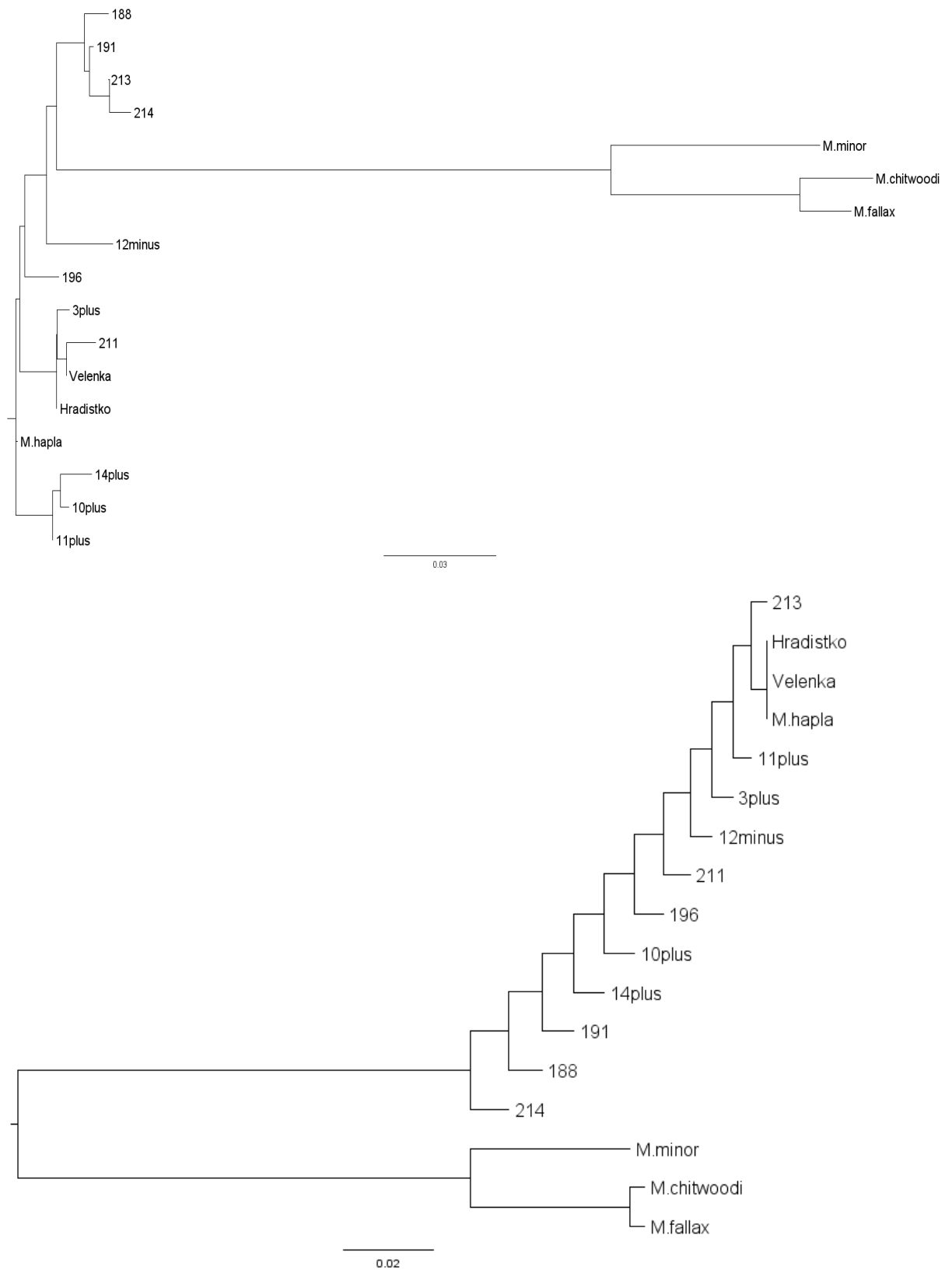
Sekvence použité jako standardy pro ITS (D2/3)

M. hapla gi|84794916|gb|DQ328685.1|

M.chitwoodi gi|544183304|gb|KC241981.1|

M.fallax gi|544183297|gb|KC241974.1|

M.minor gi|544183301|gb|KC241978.1|



Obr. 1 – Fylogenetický strom podobností druhů *Meloidogyne* z jednotlivých lokalit (nahore (S18, S21, dole D2/3).

Po provedení BLAST analýzy (obr. 27 v přílohách) nebylo překvapující, že i v případě konstrukce fylogenetických stromů byly populace získané na území ČR shlukovány k *M. hapla* a ostatní použité sekvence tedy *M. fallax*, *M. chitwoodi*, *M. minor* vykazují nejbližší vztah. Co je překvapující, je fakt, že při použití sekvencí genu S18 byly všechny populace striktně blíže *M. hapla* ovšem v případě použití obou ITS regionů včetně genu 5,8S byly populace 196, 12- , 214, 213,191 a 188 blíže skupině *M. fallax*, *M. chitwoodi*, *M. minor*.

6 DISKUZE

Na území České republiky v současné době způsobuje nejzávažnější škody hálkotvorný druh *Meloidogyne hapla*. Po jeho prvním publikovaném výskytu Zouhar et al., (2003) na území ČR nebyl provedena širší monitoring tohoto významného škůdce zeleniny. Byly pouze popsány další lokality v oblasti Polabí, kde se tento škůdce rozšířil a doposud způsobuje obrovské ztráty a to jak na kvalitě produkce kořenové zeleniny, tak na jejich výnose. Škodlivost tohoto druhu je taková, že jeho přítomnost se stává limitujícím faktorem pěstování zejména kořenové zeleniny na písčitých půdách v této oblasti (Zouhar et al., 2010). Na těchto lokalitách byly zaznamenány intenzivní příznaky způsobené tímto druhem na raných bramborách, což vypovídá o přítomnosti četné a velmi agresivní populace (Douda a kol., 2011). Ztráty na výnosech jsou hlášeny zvláště z porostů mrkve a petržele (Douda a Zouhar, 2008). Tato práce tedy rozšiřuje oblast pátrání po *M. hapla* i na dalších 11 lokalit, kde v minulosti nebylo toto háďátko detekováno. Tato práce se stane zdrojovým materiálem pro další studium rozšíření a nebezpečnosti tohoto škůdce. Lokality, kde bylo háďátko prokázáno, nebyly ještě studovány a je tedy nezbytně nutné provést podrobný monitoring konkrétních lokalit, tak aby bylo možné stanovit jeho místní rozšíření a případnou škodlivost. Je rovněž možné, že v lokalitách v okolí Hradce králové a v oblasti Havlíčkova brodu působí háďátko tak malé škody, které nejsou patrné, protože se v dané oblasti nepěstuje tak často kořenová zelenina. To může být vysvětlení toho, že zemědělská veřejnost nezaznamenala tohoto škůdce. Z literatury jsou známy případy, kdy zcela obyčejná náhoda vedla k objevení háďátka, které později zaujalo odbornou veřejnost a získalo celospolečenský význam. Tento příklad lze dokumentovat na *B. xylophylus* a jeho prvnímu popisu v Evropě (Mota et al., 1999). Tento dílčí výsledek lze považovat za velmi významný a to i vzhledem k naplnění cíle této práce a tou bylo mapování struktury populací *Meloidogyne hapla* na území ČR. Pakliže by v rámci monitoringu nebyly nalezeny další populace, bylo by možné porovnat již známé a geograficky velmi blízké populace. Je pravdou, že dvě původní geograficky blízké populace byly zařazeny i do tohoto testování v rámci mé práce a jak je vidět, ze získaných dat, opravdu jsou si i geneticky blízké. Lze tedy usuzovat na jejich společný původ.

Pro molekulárně biologickou studii příbuznosti získaných populací háďátka *Meloidogyne hapla* byly vybrány dva úseky cistronu rDNA a to na základě jednak dostupných dat v databázi NCBI a v neposlední řadě podle údajů v literatuře (Marek et al., 2010, Coleman

and May, 1997, Ellis et al., 1986, Kane et al., 1996, Subotin et al., 2006, Subotin et al., 2005, Vogler and DeSalle, 1994). Tyto dva úseky jsou široce používány pro podobné studie a bylo vhodné je použít také. Izolovaná DNA z jednotlivých lokalit byla amplifikována pomocí vybraných primerů a fragmenty sekvenovány. Získané sekvence byly analyzovány a byly vytvořeny aligmenty a z nich po té fylogenetické stromy. Do hodnocení byly přiřazeny i dostupná data o hád'átcích, která by se mohla na území ČR vyskytovat, jmenovitě *M. chitwoodi*, *M. fallax* a *M. minor*. Po provedení analýzy pomocí BLAST bylo zjištěno, že všechny studované populace jsou *M. hapla*. Bohužel nebyl dostatek biologického materiálu ani půdy pro namnožení hád'átek tak, aby bylo možné provést detailní morfologickou studii. Získaná sekvenční data byla použita pro mapování příbuznosti populací podobně, jako tomu bylo v publikaci Subotin et al., (2006) až na predikci 2-d struktur a jejich aligmentu. Nic méně i tato data dala odpověď na otázku, jsou li populace na území příbuzné a jak. Vzhledem k nedostatku informací v otevřené databázi NCBI nebylo možné přiblížit původ český populací, ale sekvenční údaje genu 28S jasně naznačují, že lokality Hradištko a Velenka jsou si nejpříbuznější. Pokud porovnáme tuto skutečnost s geografii, je tato příbuznost logická. Stejně tak tato data vypovídají o velké genetické vzdálenosti českých populací od karanténních druhů. I když na území České republiky jejich výskyt nebyl prokázán, můžeme tyto druhy najít například v Německu, Rakousku, Belgii, Francii a Holandsku. Výskyt těchto karanténních hád'átek vlivem introdukce do České republiky je možný nejen z těchto lokalit, ale i pohybem zemědělských komodit v rámci EU (Zouhar a Douda, 2007). Situace je ovšem poněkud odlišná v případě sekvenčních údajů pocházejících z ITS regionů. Tyto úseky jsou velmi variabilní, ale je ověřeno, že jsou i evolučně stále (Hugall et al., 1999, Subotin et al., 2001). Nezůstává bez povšimnutí, že Lokality Hradištko a Velenka vykazují opět vysokou příbuznost, ovšem na jedné větvi se společně s vybranými karanténními druhy nacházejí i populace z lokalit 196, 12-, 214, 213, 191 a 188. Tato informace je poněkud znepokojující a dává důvod pro znovu prověření daných lokalit na výskyt případných směsných populací. Jak již bylo uvedeno Karsen (2002) často dochází k popisu nového druhu na lokalitě, kde byl původně popsán jiný, příbuzný druh. Alarmující je zejména fakt, že populace z lokality 12- je geograficky oblastí pěstování brambor a mnoho odrůd brambor je introdukováno právě z oblastí s výskytem například *M. fallax*. Tyto údaje otevřely celou řadu otázek a bezpochyby se tedy stanou základem budoucího výzkumu.

7 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo určení původu populací háďátka *Meloidogyne hapla* získaných z lokalit v ČR, respektive jejich příbuznosti a případné rodové příbuznosti. Pro naplnění tohoto cíle byla stanovena vědecká hypotéza: Populace *Meloidogyne hapla* vyskytující se na území ČR jsou z hlediska svého původu variabilní, protože zde není původní, ale došlo k jejímu zavlečení z různých částí světa. Přínosy této práce lze shrnout do následujících bodů:

- Z testovaných 78 půdních vzorků byla prokázána přítomnost háďátek rodu *Meloidogyne* ve 13 případech.
- Bylo popsáno 11 nových lokalit s výskytem háďátka *M. hapla*.
- Byly získány sekvenční údaje dvou oblastí cistronu rDNA a to 13 populací *M. hapla*.
- Byla provedena bioinformatická analýza dat a byly clusterovány populace nalezené na území ČR.
- V případě analýzy ITS1, 53,8S, ITSII regionu byly u populací pocházejících z lokalit 196, 12- , 214, 213, 191 a 188 popsána příbuznost se skupinou karanténních druhů rodu *Meloidogyne*.

Výsledky získané při řešení této diplomové práce jsou původní vědecké výsledky, které dosud nebyly publikovány. Data, která byla získána, dají základ budoucí podrobné vědecké studii.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abad P, Gouzy J, Aury JM, Castagnone-Sereno P., Schiex T, Smant G, Weissenbach J, Wincker P. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. NATURE BIOTECHNOLOGY 26(8). 909-15.
- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology – Fifth edition. Elsevier Academic Press. USA. p. 928. ISBN: 9780120445653.
- Anonym, 2013. Katalog přípravků na ochranu zeleniny 2013. Kurent s. r. o. České Budějovice. 128 s. ISBN: 9788087111376.
- Anthony, F., Topart, P., Martinez, A., Silva, M., Nicole, M. 2005. Hypersensitive-like reaction conferred by the Mex-1 resistance gene against *Meloidogyne exigua* in coffee. Plant Pathology. 54. 476-482.
- Ardakani, A. S., Mirinejad, S. 2013. Susceptibility of weeds and vegetable crops of Iran to *Meloidogyne incognita*. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 5 (12). 1324-1327.
- Bridge, J., Starr, J. L. 2007. Plant Nematodes of Agricultural Importance – A Colour Handbook. Manson Publishing Ltd. London. p. 152. ISBN: 9781840760637. Dostupný také z: <[http://www.Plant Nematodes of Agricultural Importance.com](http://www.PlantNematodesofAgriculturalImportance.com)>.
- Castagnone-Sereno, P., Leroy, F., Bongiovanni, M., Zijlstra, C., Abad, P. 1999. Specific Diagnosis of Two Root-Knot Nematodes, *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*, with Satellite DNA Probes. Phytopathology. 89 (5). 380-384.
- Clapp, J. P., Stoel, C. D., Putten, W. H. 2000. Rapid identification of cyst (*Heterodera* spp., *Globodera* spp.) and root – knot (*Meloidogyne* spp.) nematodes on the basis of ITS2 sequence variation detected by PCR – single – strand conformational polymorphism (PCR – SSCP) in cultures and field samples. Molecular Ecology. 9 (9). 1223-1232.
- Coleman, A., Mai, J., 1997. Ribosomal DNA and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. Journal of Molecular Evolution 45. 168-77.

- Decker, H. 1969. Phytonematologie - Biologie und Bekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden. Veb Deutscher Landwirtschaftsverlag. Berlin. p. 528.
- Douda, O., Zouhar, M. 2008. Alternativní ochrana zeleniny vůči fytoparazitickým háďátkům rodu *Ditylenchus* a *Meloidogyne*. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 25 s. ISBN: 9788074270048.
- Douda, O., Zouhar, M., Mazáková, J., Nováková, J. 2011. *Arthrobotrys oligospora* jako alternativní bioagens proti *Meloidogyne hapla* (certifikovaná metodika). Česká zemědělská univerzita. Praha. 36 s. ISBN: 9788074270895.
- Douda, O.; Marek, M.; Zouhar, M.; P. Ryšánek 2013. Insights into the structure and phylogeny of the 28S rRNA expansion segments D2 and D3 of the plant-infecting nematodes from the genus *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). PHYTOPATHOLOGIA MEDITERRANEA 52 (1). 84-97.
- Ellis, R. E., Sulston, J. E., Coulson, A. R., 1986. The rDNA of *C. elegans*: sequence and structure. Nucleic Acids Research. 14. 2345-64.
- Gaar, V., Čermák, V. 2012. Háďátka v produkci okrasných rostlin. Zahradnictví. 11 (5). 66-68.
- Gugino, B. K., Abawi, G. S., Ludwig, J. W. 2006. Damage and Management of *Meloidogyne hapla* Using Oxamyl on Carrot in New York. The Journal of Nematology. 38 (4). 483-490.
- Han, H., Cho, M. R., Jeon, M. Y., Lim, K. Ch., Jang, H. 2004. PCR – RFLP Identification of Three Major *Meloidogyne* Species in Korea. J. Asia – Pacific Entomol. 7 (2). 171-175.
- Hugall, A., Stanton, J., and Moritz, C. 1999. Reticulate evolution and the origins of Ribosomal internal transcribed spacers diversity in apomictic *Meloidogyne*. Mol. Biol. Evol. 16. 157-164.
- Jepson, S. B. 1983. Identification of *Meloidogyne* : a general assessment and a comparison of male morphology using light microscopy, with a key to 24 species. 6 (2). 291-309.

- Kane, R. A., Ridgers, I. L., Johnston, D. A., Rollinson, D., 1996. Repetitive sequences within the first internal transcribed spacer of ribosomal DNA in schistosomes contain a Chi-like site. *Molecular and Biochemical Parasitology* 75. 265-9.
- Karszen, G. 2002. The plant-parasitic nematode genus *Meloidogyne* Göldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Koninklijke Brill NV. USA. p. 158. ISBN: 9004127909.
- Korayem, A. M., Bondok, M. M. 2013. Damage threshold of root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria* on peanut in relation to date of planting and irrigation system. *Canadian Journal of Plant Protection*. 1 (4). 117-124.
- Křemen, J., Pohlreich, P., Stříbrná, J. 1998. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Karolinum. Praha. 118 s. ISBN: 8071845043.
- Kůdela, V., Braunová, M. 2007. *Česko-anglická rostlinolékařská terminologie*. Academia. Praha. 876 s. ISBN: 9788020015501.
- Landa, B. B., Palomares Rius, J. E., Vovlas, N., Carneiro, R. M. D. G., Maleita, C. M. N., Abrantes, I. M. de O., Castillo, P. 2008. Molecular characterization of *Meloidogyne hispanica* (Nematoda, Meloidogynidae) by phylogenetic analysis of genes within the rDNA in *Meloidogyne* spp. *Plant Dis.* 92 (7). 1104-1110.
- Lesk, A. 2008 *Introduction to Bioinformatics* Oxford university press p. 475 ISBN-10: 0199208042
- Luc, M., Sikora, R. A., Bridge, J. 1990. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. C. A. B International. London. p. 628. ISBN: 0851986307.
- Marek, M.; Zouhar, M.; Douda, O.; V. Gaar, P. Ryšánek 2014. Comparative molecular analysis of *Bursaphelenchus vallesianus*, a wood-inhabiting nematode isolated from declining pine trees in the Czech Republic. *PLANT PATHOLOGY*. 63 (1). 232-242.
- Mekete, T., Dababat, A., Sekora, N., Akyazi, F., Abebe, E. 2012. Identification key for agriculturally important plant-parasitic nematodes Prepared for the International Nematode Diagnosis and Identification Course 2012 - A manual for nematology. Cimmyt. Mexico. p. 23. ISBN: 9786078263028. Dostupný také z: <

http://www.spipm.cgiar.org/c/document_library/get_file?p_l_id=17829&folderId=18466&name=DLFE-6184.pdf >.

Mota, M. M., Braasch, H., Bravo, M. A., Penas, A. C., Burgermeister, W., Metge, K., Sousa 1999. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe Nematology. 1 (7-8). 727-734.

Nováková, E., Zouhar, M. 2009. *Meloidogyne hapla* – škůdce, kterého možná neznáte. Zahradnictví. 9 (8). 42-48.

Perry, R. N., Moens, M. 2006. Plant Nematology. Cabi North American Office. USA. p. 448. ISBN: 1845930568.

Perry, R. N., Moens, M., Starr, J. L. 2009. Root-knot nematodes. Cabi North American Office. USA. p. 488. ISBN: 9781845934927. Dostupný také z: <http://books.google.cz/books/about/Root_knot_Nematodes.html?id=ACmHXeF8SHQC&redir_esc=y>.

Powers, T. O., Mullin, P. G., Harris, T. S., Sutton, L. A., Higgins, R. S. 2005. Incorporating Molecular Identification of *Meloidogyne* spp. into a Large-scale Regional Nematode Survey. Journal of Nematology. 37 (2). 226-235.

Punja, Z., De Boer, S. H., Sanfacon, H. 2007. Biotechnology and plant disease management. Cabi. USA. p. 574. ISBN: 9781845932886. Dostupný také z: <<http://books.google.cz/books?id=tI3vDlNbZ8cC&pg=PA197&dq=serological+methods+Meloidogyne&hl=cs&sa=X&ei=SpEsU4Qkp8HsBsHBgOAG&ved=0CDkQ6AEwAQ#v=onepage&q=serological%20methods%20Meloidogyne&f=false>>.

Raclavský, V. 1998. Úvod do základních metod molekulární genetiky. Univerzita Palackého v Olomouci. Olomouc. 46 s. ISBN: 8070678925.

Ravichandra, N. G. 2008. Plant Nematology. I. K. International. India. p. 720. ISBN: 9788189866617. Dostupný také z: <http://books.google.cz/books?id=JPMPM3PRbQwC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>.

- Rod, J., Hluchý, M., Zavadil, K., Prášil, J., Somssich, I., Zacharda, M. 2005. *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy – Ochrana zeleniny v integrované produkci včetně prostředků biologické ochrany rostlin*. Biocont Laboratory. Brno. 400 s. ISBN: 8090187439.
- Subbotin, S. A., Madani, M., Krall, E., Sturhan, D., Moens, M., 2005. Molecular diagnostics, taxonomy, and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA. *Phytopathology*. 95. 1308-15.
- Subbotin, S.A., Vierstraete, A., De Ley, P 2001. Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA *MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION* 21(1): 1-16.
- Subbotin, S. A., Vovlas, N., Crozzoli, R., Sturhan, D., Lamberti, F., Moens, M., Baldwin, J. G., 2005. Phylogeny of Criconematina Siddiqi, 1980 (Nematoda: Tylenchida) based on morphology and D2 – D3 expansion segments of the 28S-rRNA gene sequences with application of a secondary structure model. *Nematology*. 7. 927-944.
- Širca, S., Urek, G., Karssen, G. 2004. The incidence of the root – knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* in Slovenia. *Acta agriculturae slovenica*. 83 (1). 15-22.
- Tesařová, B., Zouhar, M., Ryšánek, P. 2003. Development of PCR for specific determination of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Protect. Sci.* 39 (1). 23-28.
- Vito, M. D., Greco, N. 1988. Investigation on the biology of *Meloidogyne artiellia*. *Revue Nématol.* 11(2). 223-227.
- Vogler, A. P., DeSalle, R., 1994. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution*. 11. 393-405.

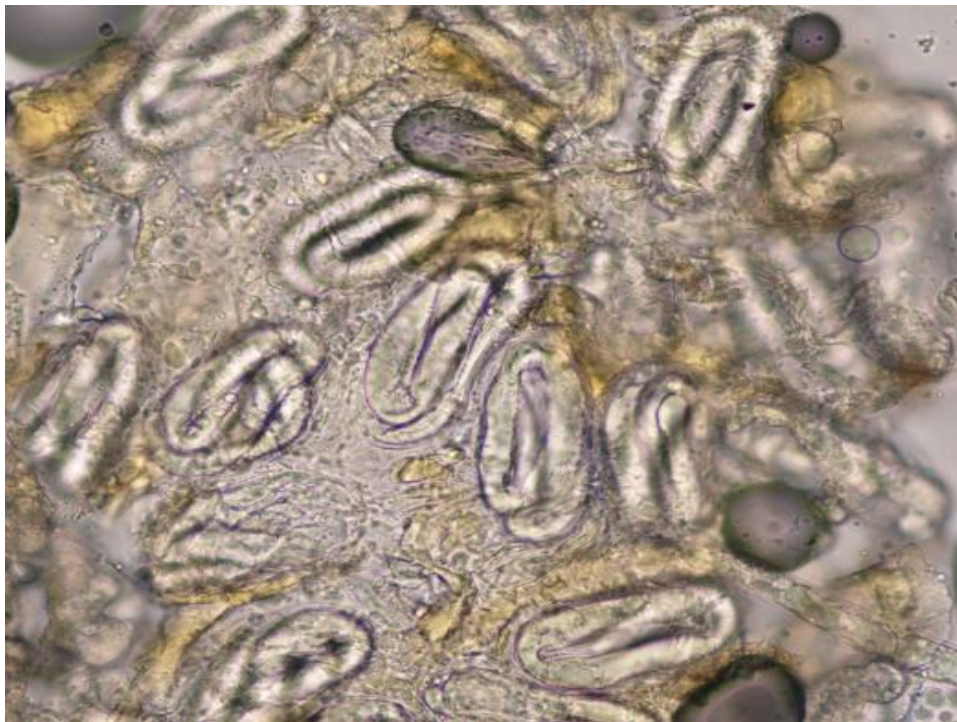
- Zijlstra, C. 1997. A fast PCR assai to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi*, and *M. fallax* and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. *Fundam. appl. Nematol.* 20 (5). 505-511.
- Zijlstra, C. 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR: a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. *European Journal of Plant Pathology.* 106. 283-290.
- Zouhar, M., Douda, O. 2007. Axenizace fytoparazitických háďátek rodu *Ditylenchus* a *Meloidogyne* a jejich chov v in vitro podmínkách (Metodika pro praxi). Česká zemědělská univerzita. Praha. 31 s. ISBN: 9788021317673.
- Zouhar, M., Douda, O., Mazáková, J., Nováková, J., Urban, J. 2010. Predikce nematofágní aktivity půdních hub (Certifikovaná metodika). Česká zemědělská univerzita. Praha. 32 s.
- Zouhar, M., Douda, O., Nováková, J., Doudová, E., Mazáková, J., Wenzlová, J., Ryšánek, P., Renčo, M. 2013. First report about the trapping activity of *Stropharia rugosoannulata* acanthocytes for Northern Root Knot Nematode. *Helminthologia.* 50 (2). 127-131.
- Zouhar, M., Douda, O., Novotný, D., Nováková, J., Mazáková, J. 2010. Evaluation of the pathogenicity of selected namatophagous fungi – *CZECH Mycol.* 61 (2). 139-147.
- Zouhar, M., Ryšánek, P., Tesařová, B. 2003. Occurrence of the Root – Knot Nematode *Meloidogyne hapla* in the Czech Republic. *Plant diseases.* 87 (1). 98.
- Zouhar, M., Ryšánek, P., Tesařová, B., Marek, M. 2002. Metodická příručka pro diagnostiku karanténních háďátek rodů *Globodera*, *Meloidogyne* a *Ditylenchus*. Česká zemědělská univerzita. Praha. 44 s. ISBN: 8021308737.

9 PŘÍLOHY



Obr. 1 – Vajíčka *Meloidogyne hapla*.

Foto: E. Spáčilová, 2013



Obr. 2 – Juvenilní stádia *Meloidogyne hapla*.

Foto: E. Spáčilová, 2013



Obr. 3 – Larva *Meloidogyne hapla* se zvýrazněnou vnitřní stavbou těla.

Foto: E. Spáčilová, 2013



Obr. 4 – *Meloidogyne hapla* L2 v kořenech rostlin.

Foto: E. Spáčilová, 2012



Obr. 5 – Naměřená celková délka háďátka L2.

Foto: E. Spáčilová, 2012



Obr. 6 – Háčka s vaječným vakem na kořenu rajčete (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karsten ex Farw.). Foto: E. Spáčilová, 2013



Obr. 7 – Dospělá samička s vajíčky.

Foto: E. Spáčilová, 2012



Obr. 8 – Hálky *Meloidogyne hapla* se samičkami v kořenech rostlin.

Foto: E. Spáčilová, 2013



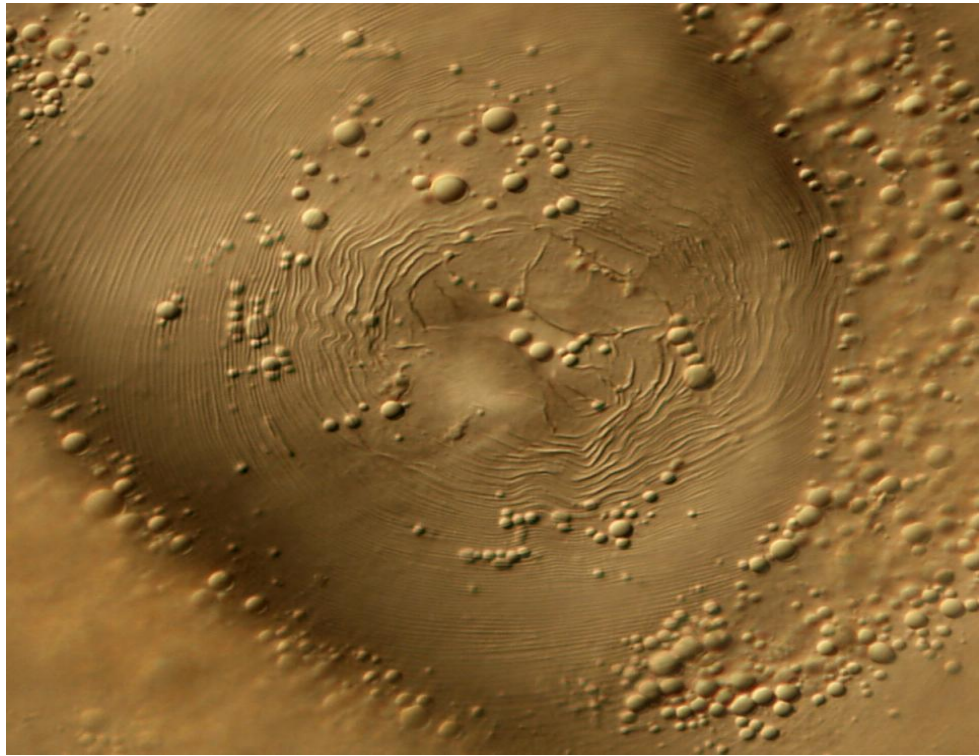
Obr. 9 – Ohnisko napadení háďátkem *Meloidogyne hapla* v porostu mrkve.

Foto: E. Doudová, 2006



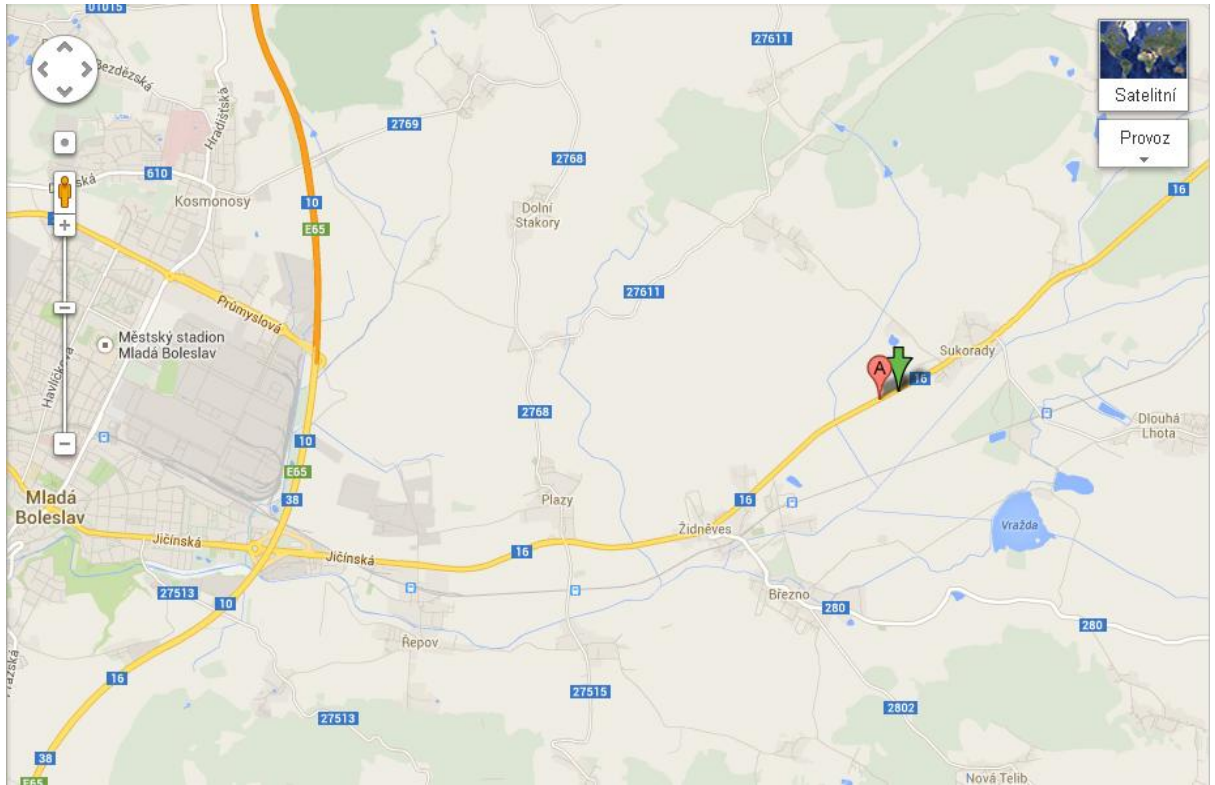
Obr. 10 – Napadení mrkve háďátkem *Meloidogyne hapla*.

Foto: M. Zouhar, 2008

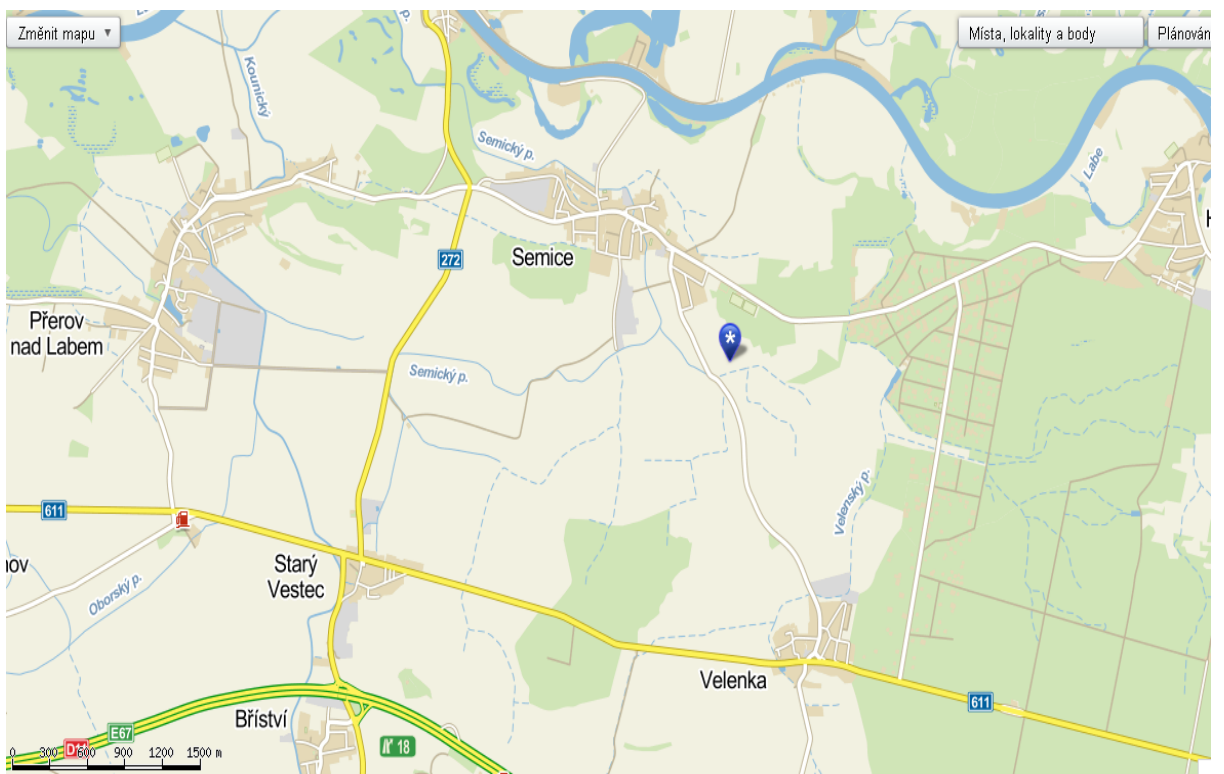


Obr. 11 – Perineum *Meloidogyne hapla*.

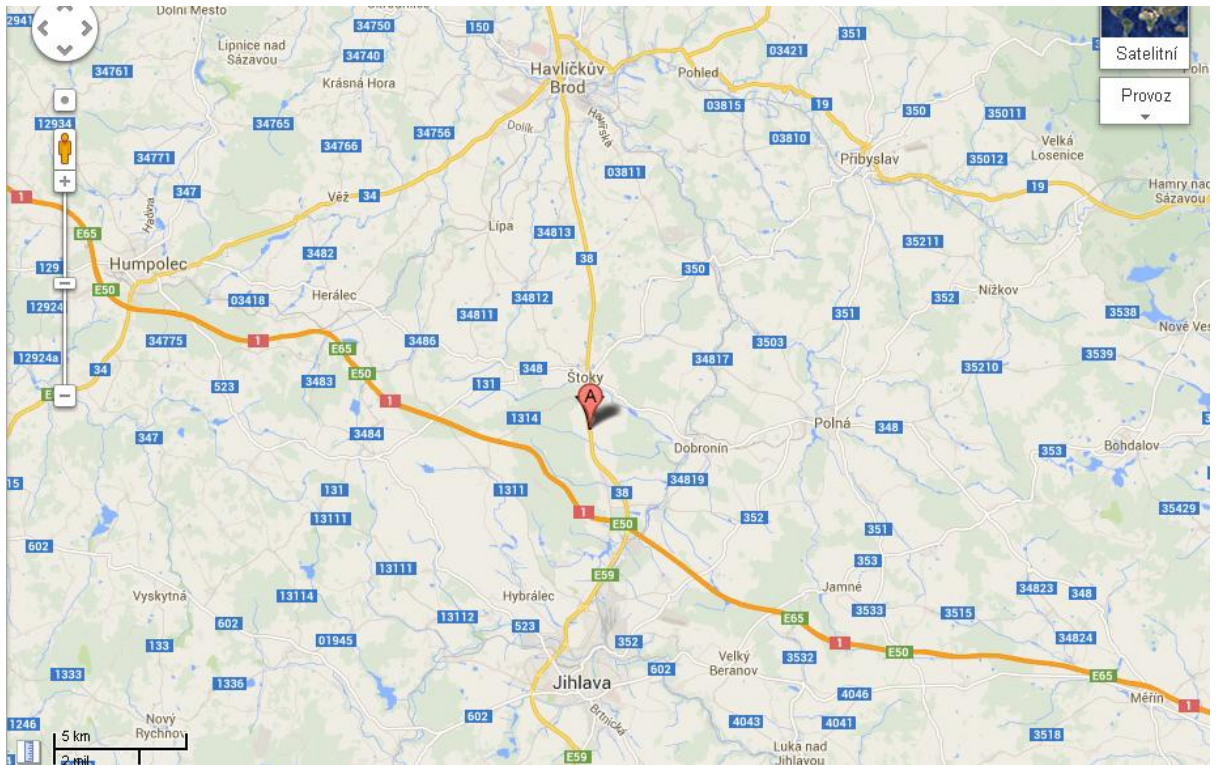
Foto: M. Zouhar, 2011



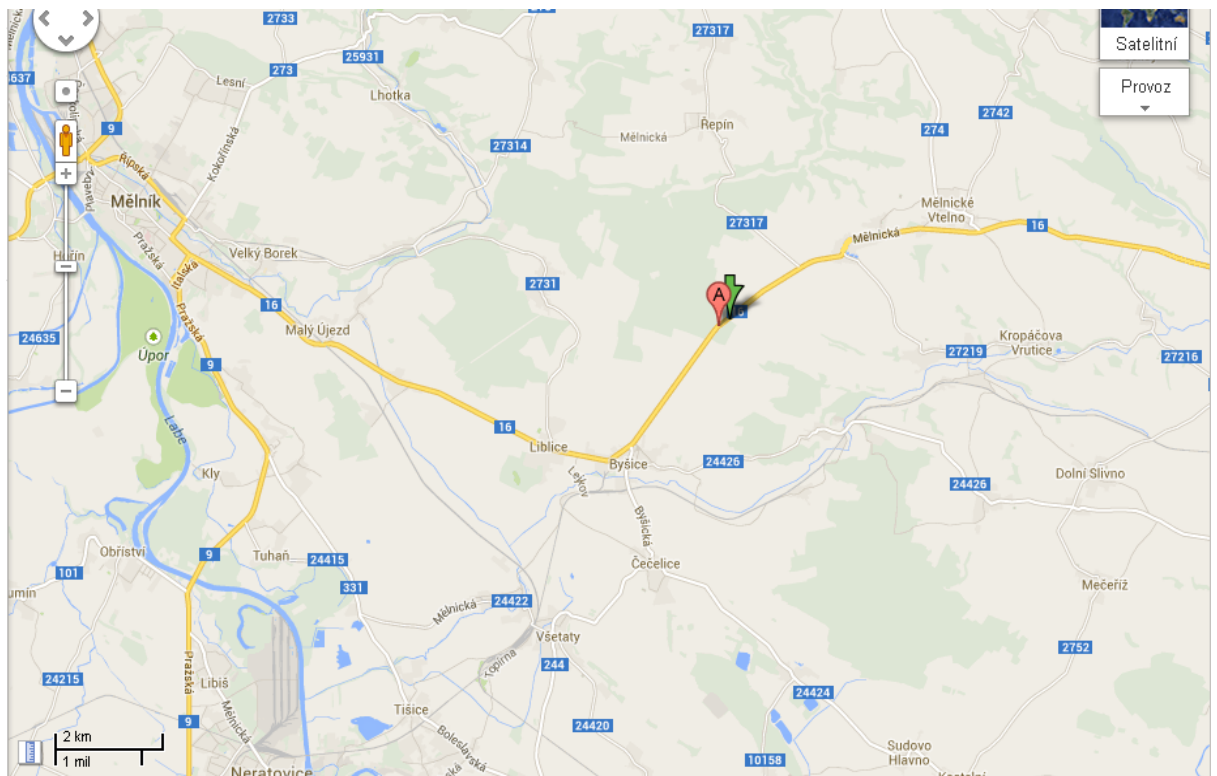
Obr. 12 – Lokalita 188, N50 25.371 E15 01.191



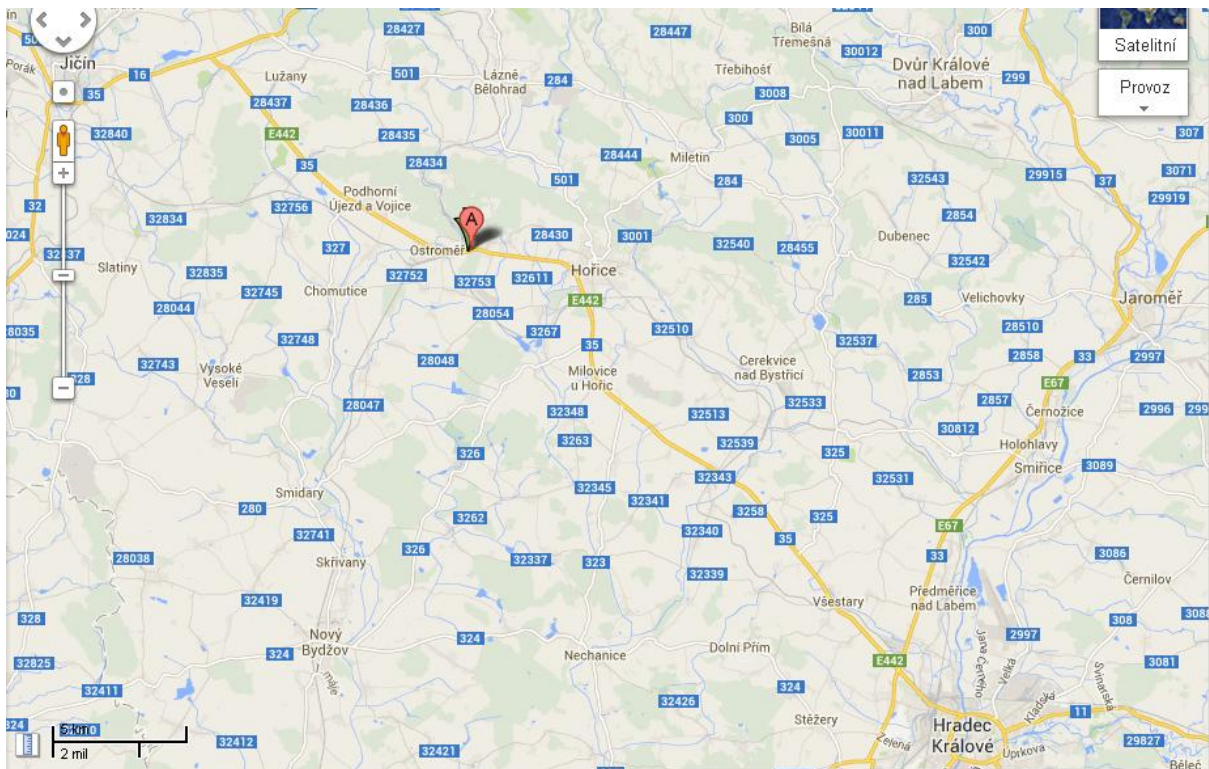
Obr. 13 – Lokalita Valenka, 50°9'21.830"N, 14°53'11.040"E
64



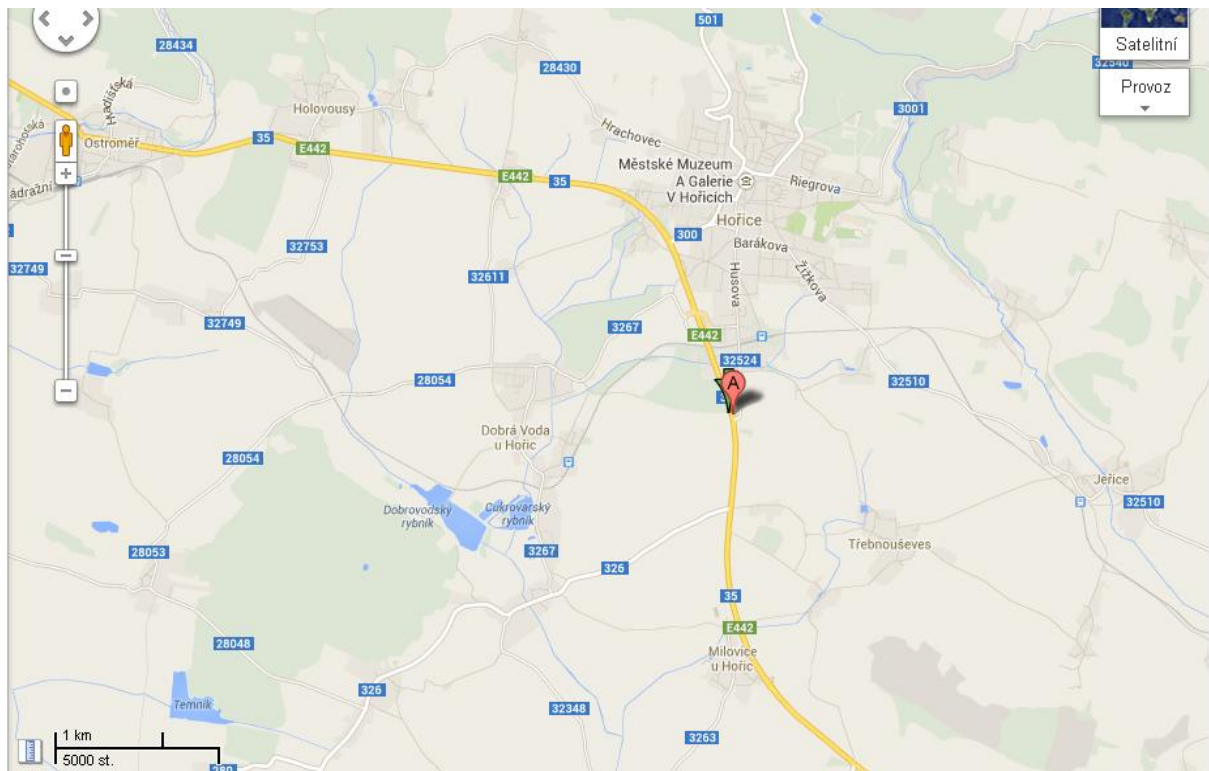
Obr. 14 – Lokalita 12-, N49 29.073 E15 35.475



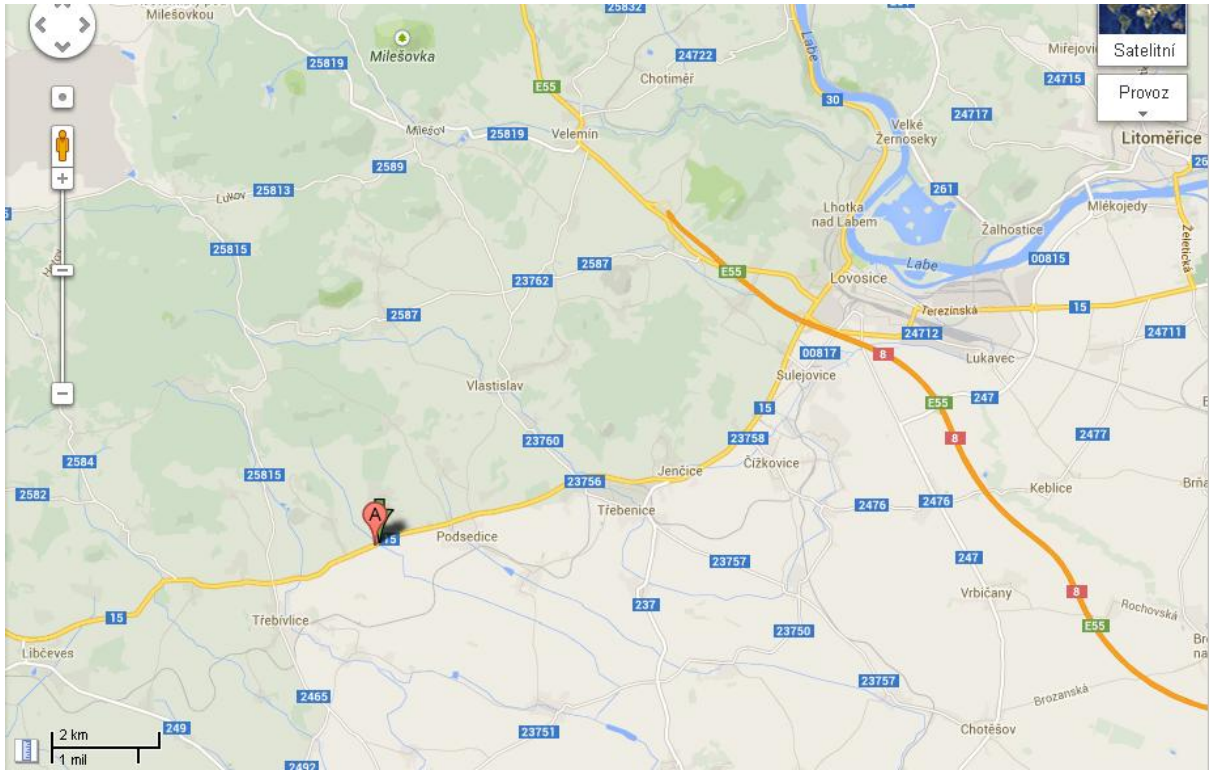
Obr. 15 – Lokalita 11+, N50 20.063 E14 38.267



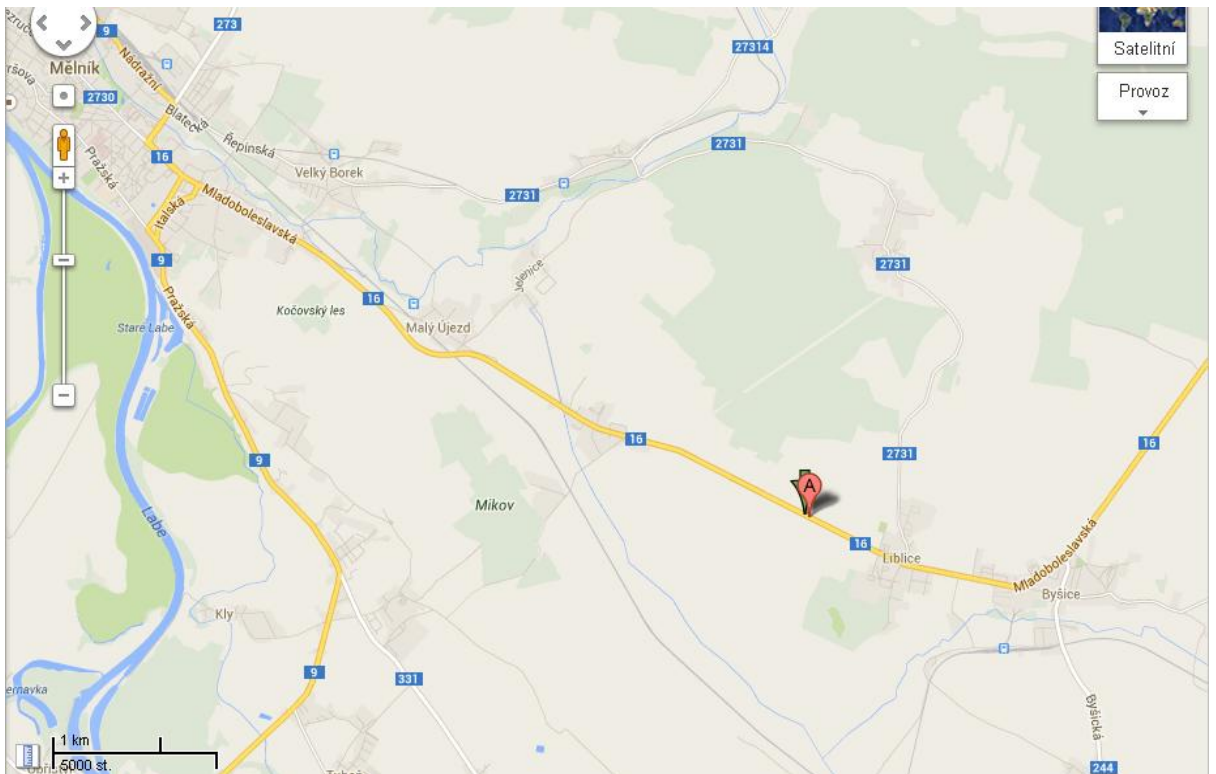
Obr. 16 – Lokalita 191, N50 22.332 E15 33.937



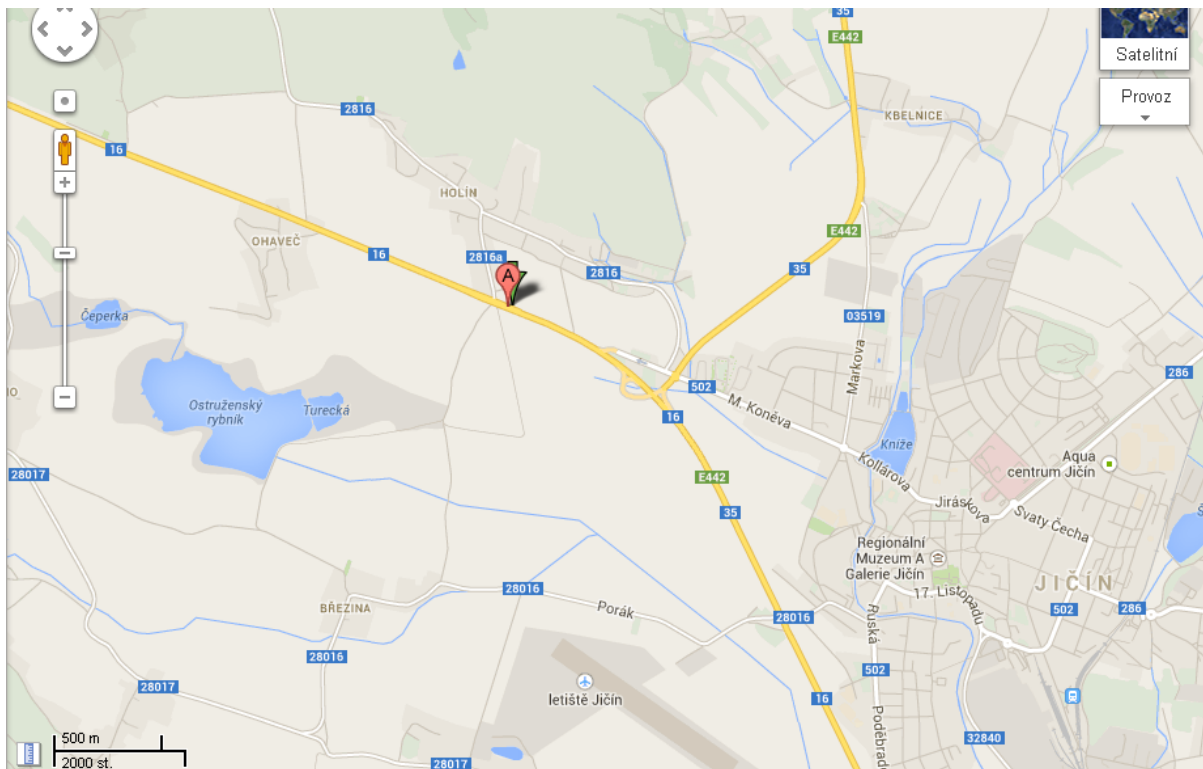
Obr. 17 – Lokalita 196, N50 21.005 E15 37.830



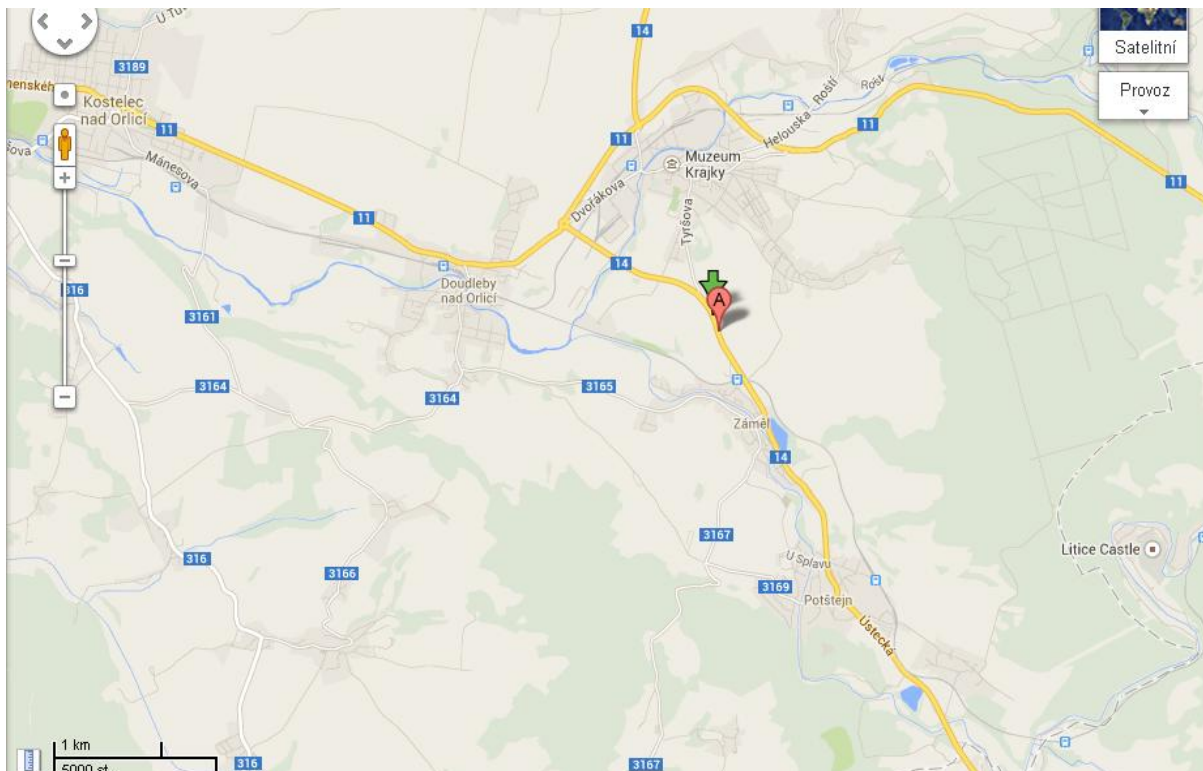
Obr. 18 – Lokalita 3+, N50 28.245 E13 55.509



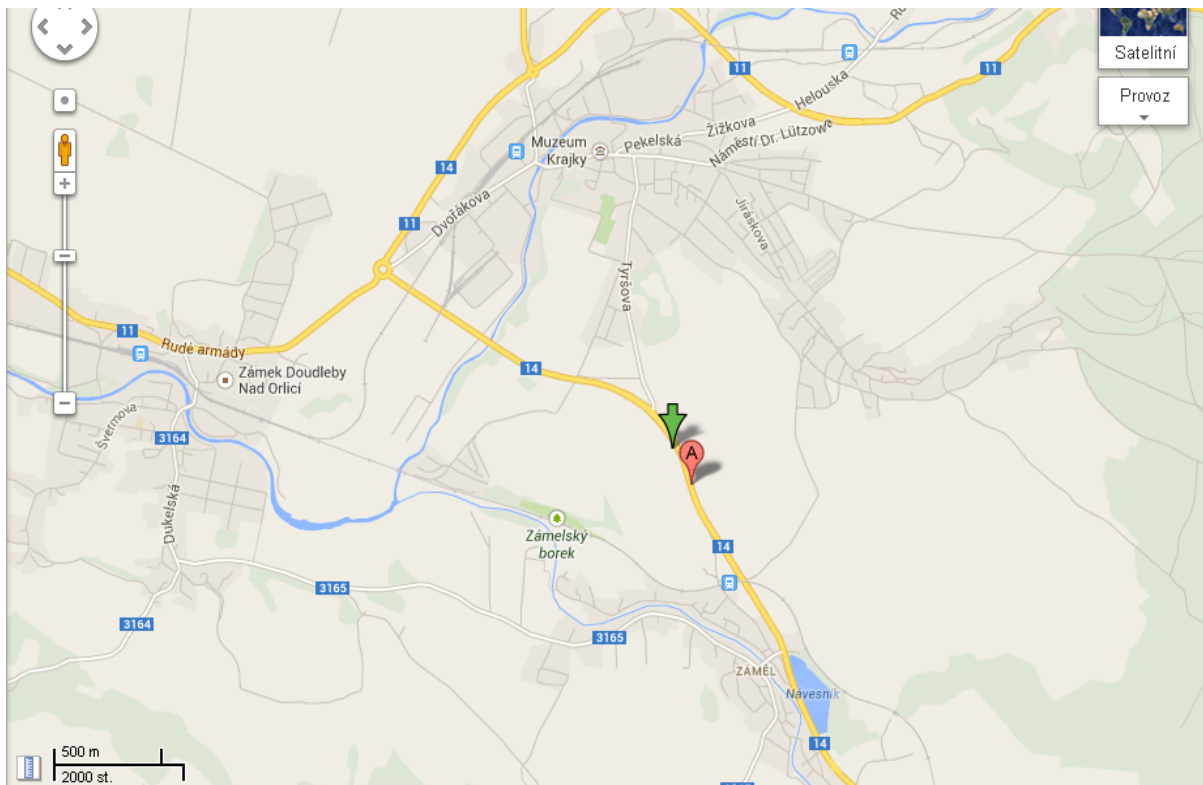
Obr. 19 – Lokalita 10+, N50 19.020 E14 34.658



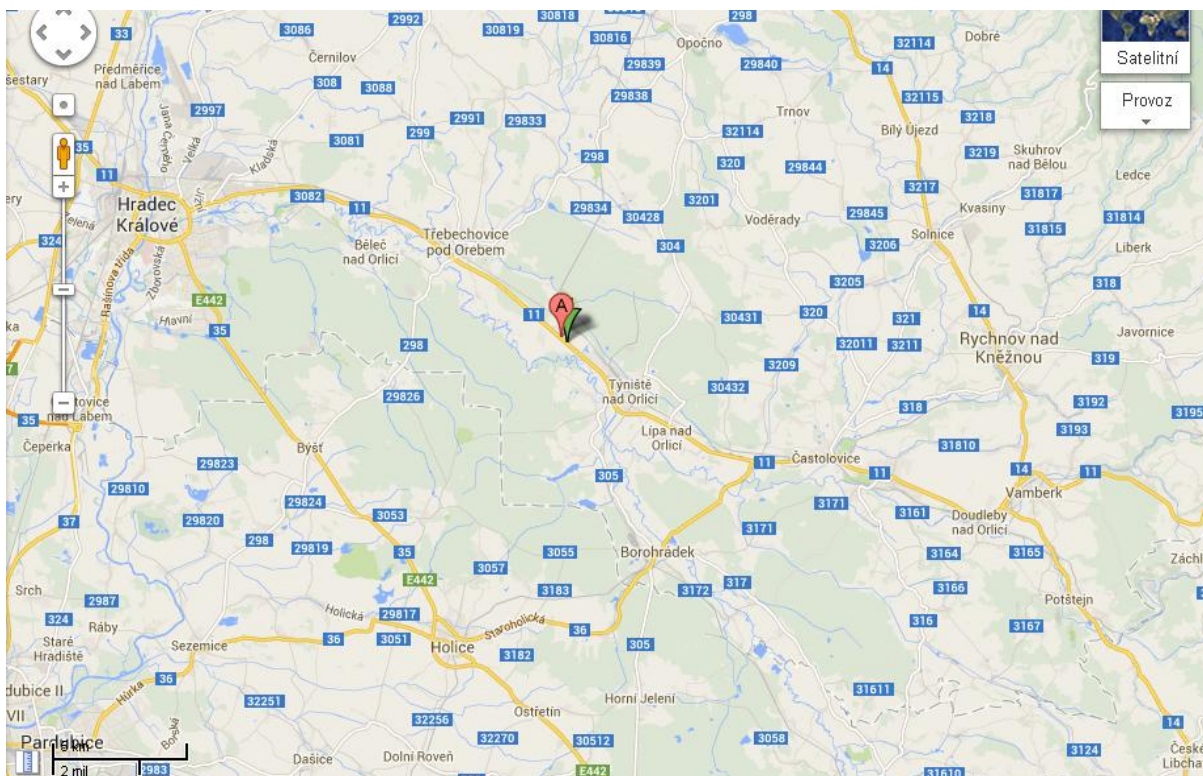
Obr. 20 – Lokalita 14+, N50 26.814 E15 19.454



Obr. 21 – Lokalita 213, N50 06.331 E16 17.623



Obr. 22 – Lokalita 214, N50 06.341 E16 17.596



Obr. 23 – Lokalita 211, N50 10.052 E16 02.723

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

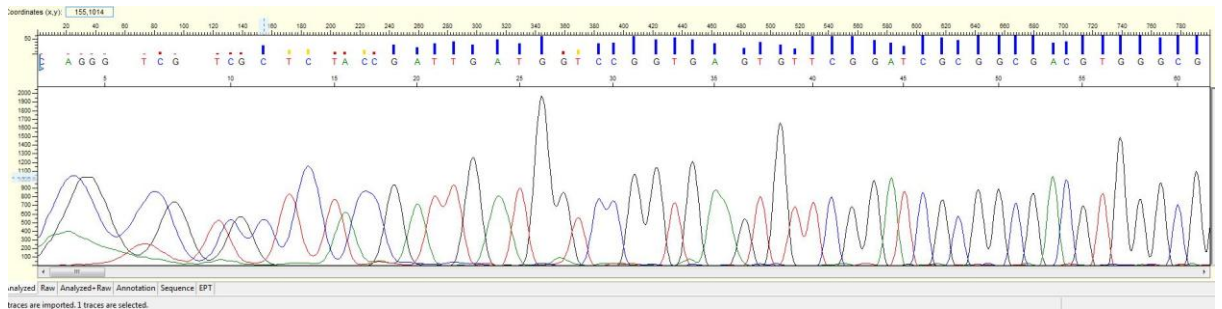
1: 213	100.00	96.52	96.73	98.30	96.48	96.53	96.53	96.73	96.53	96.53	97.35	97.35	97.35	96.73	80.04	80.37	80.66
2: 196	96.52	100.00	98.58	98.08	98.36	98.38	98.79	98.38	98.38	98.38	99.19	99.19	99.19	98.57	82.45	82.96	83.27
3: 11plus	96.73	98.58	100.00	98.30	98.57	98.59	98.59	98.59	98.59	98.59	99.40	99.40	99.40	98.78	82.35	82.46	82.76
4: 214	98.30	98.08	98.30	100.00	98.28	98.09	98.09	98.30	98.09	98.09	98.94	98.94	98.94	98.30	80.94	81.28	81.58
5: 188	96.48	98.36	98.57	98.28	100.00	98.36	98.36	98.36	98.36	98.36	99.18	99.18	99.18	98.55	82.51	82.62	82.92
6: 10plus	96.53	98.38	98.59	98.09	98.36	100.00	98.39	98.59	98.59	98.59	99.19	99.19	99.19	98.57	82.32	82.63	82.93
7: 211	96.53	98.79	98.59	98.09	98.36	98.39	100.00	98.79	98.39	98.39	99.19	99.19	99.19	98.57	82.32	82.83	83.13
8: 3plus	96.73	98.38	98.59	98.30	98.36	98.59	98.79	100.00	98.59	98.39	99.19	99.19	99.19	98.57	82.11	82.42	82.72
9: 14plus	96.53	98.38	98.59	98.09	98.36	98.59	98.39	98.59	100.00	98.39	99.19	99.19	99.19	98.57	82.11	82.42	82.72
10: 191	96.53	98.38	98.59	98.09	98.36	98.59	98.39	98.39	98.39	100.00	99.19	99.19	99.19	98.57	82.32	82.63	82.93
11: Hradistko	97.35	99.19	99.40	98.94	99.18	99.19	99.19	99.19	99.19	99.19	100.00	100.00	100.00	99.39	82.93	83.23	83.54
12: Velenka	97.35	99.19	99.40	98.94	99.18	99.19	99.19	99.19	99.19	99.19	100.00	100.00	100.00	99.39	82.93	83.23	83.54
13: M.	97.35	99.19	99.40	98.94	99.18	99.19	99.19	99.19	99.19	99.19	100.00	100.00	100.00	99.39	84.52	83.99	85.31
14: 12minus	96.73	98.57	98.78	98.30	98.55	98.57	98.57	98.57	98.57	98.57	99.39	99.39	99.39	100.00	82.14	82.45	82.75
15: M.minor	80.04	82.45	82.35	80.94	82.51	82.32	82.32	82.11	82.11	82.32	82.93	82.93	84.52	82.14	100.00	92.75	93.94
16: M.chitwoodi	80.37	82.96	82.46	81.28	82.62	82.63	82.83	82.42	82.42	82.63	83.23	83.23	83.99	82.45	92.75	100.00	97.13
17: M.fallax	80.66	83.27	82.76	81.58	82.92	82.93	83.13	82.72	82.72	82.93	83.54	83.54	85.31	82.75	93.94	97.13	100.00

Obr. 24 – Matice podobností D2/3.

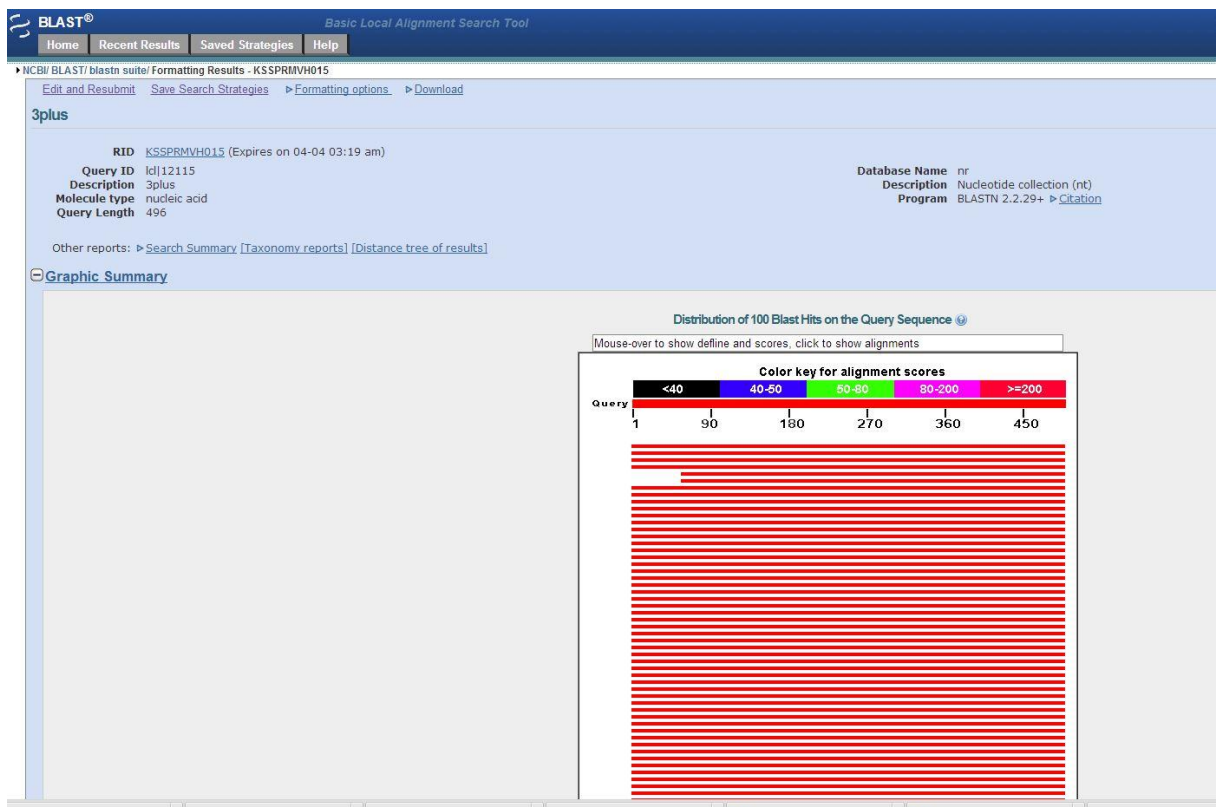
Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: 188	100.00	99.22	98.67	97.90	96.19	96.31	95.53	96.58	96.32	96.69	97.50	95.29	96.35	96.10	78.19	76.69	77.03
2: 191	99.22	100.00	99.47	98.69	96.58	96.70	95.93	96.98	96.71	97.09	97.90	95.73	96.78	96.55	78.45	76.99	77.33
3: 213	98.67	99.47	100.00	99.47	95.99	96.25	95.59	96.66	96.40	96.79	97.46	95.44	96.50	96.25	78.64	76.42	77.11
4: 214	97.90	98.69	99.47	100.00	95.13	95.64	95.00	96.05	95.79	96.17	96.58	95.15	96.20	95.95	77.76	76.11	76.66
5: 12minus	96.19	96.58	95.99	95.13	100.00	96.19	95.56	96.60	96.34	96.57	97.65	95.16	96.22	95.96	77.62	76.99	77.18
6: 3plus	96.31	96.70	96.25	95.64	96.19	100.00	98.69	99.61	99.34	97.49	98.43	96.62	97.66	97.15	77.21	76.11	76.46
7: 211	95.53	95.93	95.59	95.00	95.56	98.69	100.00	98.96	99.22	96.84	97.78	95.61	96.66	96.13	76.90	75.77	76.13
8: Hradistko	96.58	96.98	96.66	96.05	96.60	99.61	98.96	100.00	99.74	97.89	98.83	96.78	97.82	97.32	77.69	76.38	76.73
9: Velenka	96.32	96.71	96.40	95.79	96.34	99.34	99.22	99.74	100.00	97.63	98.57	96.49	97.53	97.02	77.69	76.38	76.73
10: 196	96.69	97.09	96.79	96.17	96.57	97.49	96.84	97.89	97.63	100.00	98.82	96.78	97.82	97.31	78.31	76.69	77.04
11: M.hapla	97.50	97.90	97.46	96.58	97.65	98.43	97.78	98.83	98.57	98.82	100.00	97.81	98.84	98.36	78.24	76.84	77.18
12: 14plus	95.29	95.73	95.44	95.15	95.16	96.62	95.61	96.78	96.49	96.78	97.81	100.00	98.98	98.95	75.41	74.06	75.12
13: 11plus	96.35	96.78	96.50	96.20	96.22	97.66	96.66	97.82	97.53	97.82	98.84	98.98	100.00	99.55	76.61	75.04	75.93
14: 10plus	96.10	96.55	96.25	95.95	95.96	97.15	96.13	97.32	97.02	97.31	98.36	98.95	99.55	100.00	75.83	74.12	75.04
15: M.minor	78.19	78.45	78.64	77.76	77.62	77.21	76.90	77.69	77.69	78.31	78.24	75.41	76.61	75.83	100.00	87.54	87.76
16: M.chitwoodi	76.69	76.99	76.42	76.11	76.99	76.11	75.77	76.38	76.38	76.69	76.84	74.06	75.04	74.12	87.54	100.00	96.69
17: M.fallax	77.03	77.33	77.11	76.66	77.18	76.46	76.13	76.73	76.73	77.04	77.18	75.12	75.93	75.04	87.76	96.69	100.00

Obr. 25 – Matice podobností S18, S21.



Obr. 26 – Příklad výstupu (elektroforeogram sekvenční reakce).



Obr. 27 – Příklad výstupu (analýza podobností BLAST).

Clustal Omega

[Input form](#) | [Web services](#) | [Help & Documentation](#)[Tools](#) > [Multiple Sequence Alignment](#) > [Clustal Omega](#)

Results for job clustalo-l20140402-202610-0930-57969536-oy

[Alignments](#) | [Result Summary](#) | [Phylogenetic Tree](#) | [Submission Details](#)[Download Alignment File](#) | [Send to ClustalW2_Phylogeny](#)

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

188      --TTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   58
191      --TTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   58
213      -----TTTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   55
214      -----TTTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   55
12minus  --TTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   58
3plus    --TTGATTACCTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   58
211      --TTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   58
Hradistko --TTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   58
Velenka   --TTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   58
196      -----TTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   54
M.hapla   --TTGATTACGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   58
14plus    -----ACTGACCCCAT   11
11plus    -----ACTGAGCCATT   11
10plus    -----ACTGAGCCATT   11
M.minor   --TTGATTACCGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   59
M.chitwoodi -----GTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   50
M.fallax  TTTGATTANCGTCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTGCCCGGGACTGAGCCATT   60

188      TCGAGAACTTGGAGACTGTTGTC--TAATTTTTTTACC----TTACTTTGATGGAAACC   112
191      TCGAGAACTTGGAGACTGTTGTC--TAATTTTTTTACC----TTACTTTGATGGAAACC   112
213      TCGAGAACTTGGAGACTGTTGTC--TAATTTTTTTACC----TTACTTTGATGGAAACC   109
214      TCGAGAACTTGGAGACTGTTGTC--TAATTTTTTTACC----TTACTTTGATGGAAACC   109
12minus  TCGAGAACTTGGGACTGTTGA-TCTAATTTTTTTAAG----AAACTTTGATGGAAACC   113
3plus    TCGAGAACTTGGAGACTGTTGA-TCTAATTTTTTTAAG----TTACTTTGATGGAAACC   113
211      TCGAGAACTTGGAGACTGTTGA-TCTAATTTTTTTAAG----TTACTTTGATGGAAACC   113
Hradistko TCGAGAACTTGGAGACTGTTGA-TCTAATTTTTTTAAG----TTACTTTGATGGAAACC   113
Velenka   TCGAGAACTTGGAGACTGTTGA-TCTAATTTTTTTAAG----TTACTTTGATGGAAACC   113
196      TCGAGAACTTGGAGACTGTTGTC-TCTAATTTTTTTAAG----TTACTTTGATGGAAACC   110
M.hapla   TCGAGAACTTGGAGACTGTTGA-TCTAATTTTTTTAAG----TTACTTTGATGGAAACC   113
14plus    TCGAGAACTTGGAGACTGTTGA-TCTAATTTTTTTAAG----TTACTTTGATGGAAACC   66
11plus    TCGAGAACTTGGAGACTGTTGA-TCTAATTTTTTTAAG----TTACTTTGATGGAAACC   66
10plus    -----ACTTGGAGACTGTTGA-TCTAATTTTTTTAAG----TTACTTTGATGGAAACC   48
M.minor   TCGAGAAATTTGGGACTGTTGATTTAACTTTTTTTTTAAAAAGTTTTTTTGGATGGAAACC   119
M.chitwoodi TCGAGAAATTTGGGACTGTTGATTTAACTTTTTTT-IAAAAAGTTTTTTTGGATGGAAACC   109
M.fallax  TCGAGAAATTTGGGACTGTTGATTTAACTTTTTTT--AAAAAGTTTTTTTGGATGGAAACC   118
          * **** *

```

Obr. 28 – Příklad výstupu (Clustal omega).