

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů**

Katedra ochrany rostlin



**Význam fytoparazitických hád'átek pro produkci chmele v
ČR**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Jana Tamlerová

Vedoucí práce: Ing. Miloslav Zouhar, PhD.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Význam fytoparazitických hád'átek pro produkci chmele v ČR" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2017

Poděkování

Děkuji panu Ing. Zouharovi, Ph. D. za trpělivost a pomoc při vedení mé diplomové práce a jeho kolegyním v oboru, zejména paní Ing. Wenzlové a paní Ing. Maňasové, Ph. D. za získané znalosti v oblasti nematologie a cenné rady při laboratorních postupech. Dále jsem vděčná místním chmelařům, kteří mi poskytli informace o vlastních zkušenostech (pan Ing. Pokorný, pan Ing. Vostřel a pan Ing. Pirožek), panu Ing. Čermákovi, Ph. D. za poskytnuté fotografie a také panu Ing. Pochmanovi za vstřícnost. Můj velký dík patří i mým nejbližším za podporu při mém celoživotním vzdělávání.

Význam fytoparazitických háďátek pro produkci chmele v ČR

Importance of phytoparasitic nematodes for hop production in the Czech Republic

Souhrn

Fytoparazitická háďátka se řadí do kategorie speciálních škodlivých organismů. To z důvodu mnohdy závažné škodlivosti, avšak ne vždy je na první pohled jasně definovatelná příčina. U některých produkčně pěstovaných zemědělských plodin jsou tyto zástupci zcela zásadní. V mnohých zemích jsou zařazeni na seznam karanténních organismů. V literárním přehledu je obsažena charakteristika háďátek a jednotlivých druhů s ostatními souvislostmi. V této části také nemohl být opomenut chmel, jako významný prvek zemědělství v největší produkční oblasti této plodiny v České republice. Byl popsán historický vývoj chmelařství, účelem bylo přiblížit důležitost tradičního zemědělského odvětví v této historicky významné lokalitě. Tato diplomová práce je zaměřena na zjištění vlivu fytoparazitických háďátek pro produkci chmele v oblasti Žatecka. V praktické části byly odebrány vzorky půdy z chmelnic a zaneseny pomocí GPS do map z LPIS. Flotační metoda s využitím Fenwickovy konve byla použita ke stanovení množství cyst z půdních vzorků. Vybrané vzorky cyst byly podrobeny analýze pomocí molekulárně biologických metod. Ve výsledcích převažovala háďátka druhu *Heterodera humuli*, která jsou typická pro chmel *Humulus lupulus*. Potvrzen byl také výskyt háďátka *Heterodera schachtii*. Z jednotlivých pozemků byla zkompletována data o výnosu a obsahu alfa hořkých kyselin, z nichž byl vytvořen statistický rozbor korelace jednotlivých parametrů s výskytem cystotvorných háďátek. Pozorovaly se podezřelé příznaky přítomnosti háďátek *Ditylenchus dipsaci* a *D. destructor*. Odebrané vzorky neprokázaly výskyt těchto osních háďátek. Korelační analýzy nepotvrdily statistický význam mezi počtem cyst a výnosem či obsahem alfa hořkých kyselin.

Klíčová slova: *Heterodera humuli*, chmel, fytoparazitická háďátka, monitoring, diagnostika

Summary

Phytoparasitic nematodes are classified into the category of special harmful organisms. Because of the often serious harm, but not always, the cause is at first glance clearly definable. In some production of cultivated agricultural crops these nematodes are quite essential. In many countries they are included on the list of the quarantine organisms. In the literary overview there are contained characteristics of nematodes and individual species with the other context. In this part I also like to mention the hops as a significant element of the agriculture in the Czech Republic. This thesis is aimed at finding out the effect of the phytoparasitic nematodes for the production of hops in the Žatec area. In this practical part soil samples were taken from hop yards and recorded by using GPS into the map from the LPIS. A flotation method using of the Fenwick can was used to determine the number of cysts in soil samples. Selected samples of the cysts were subjected to the analyses by molecular-biological methods. In the results there were prevailing nematode species of the *Heterodera humuli*, that are typical for hops *Humulus lupulus* and it was also confirmed the appearance of the Sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*. From the individual plots were assembled data of the yield and content of alpha-bitter acids. The statistical analysis was created by means of the correlation of the individual parameters with the incidence of nematode cyst number. The suspicious signs of the presence of the nematodes *Ditylenchus dipsaci* and *D. destructor* were observed. The presence of these stem nematodes wasn't proved from the collected samples. The correlation analyses haven't confirmed any statistical important difference between the number of cysts and yield or between the number of cysts and the content of alpha-bitter acids.

Keywords: *Heterodera humuli*, hop, phytoparasitic nematodes, monitoring, diagnostics

Obsah

1 Úvod.....	10
2 Cíl práce	11
3 Literární přehled.....	12
3.1 Úvod do problematiky hád'átek.....	12
3.1.1 Zastoupení hád'átek v živočišné říši	12
3.1.2 Historie výzkumu hád'átek	13
3.2 Taxonomické zařazení hád'átek.....	14
3.3 Obecná charakteristika	15
3.3.1 Morfologie hád'átek.....	15
3.3.2 Rozmnožování a biologie hád'átek.....	17
3.3.3 Šíření hád'átek	20
3.3.4 Škodlivost hád'átek.....	20
3.3.5 Metody ochrany rostlin	21
3.3.5.1 Preventivní metody	21
3.3.5.2 Kurativní metody	21
3.3.6 Příznaky na rostlinách	23
3.3.6.1 Příznaky na podzemních částech.....	23
3.3.6.2 Příznaky na nadzemních částech rostlin.....	24
3.3.7 Vnější ekologické faktory	24
3.3.7.1 Vliv klimatu a povětrnostních podmínek	25
3.3.7.2 Půdní faktory	26
3.4 Rod <i>Ditylenchus</i> Filipjev 1936.....	26
3.4.1 <i>Ditylenchus dipsaci</i> (Kühn, 1857) Filipjev, 1936	27
3.4.1.1 Výskyt	27
3.4.1.2 Biologie	28
3.4.1.3 Morfologie.....	28
3.4.1.4 Hostitelský okruh	29
3.4.1.5 Symptomy	29
3.4.1.6 Ochranná opatření	29
3.4.2 <i>Ditylenchus destructor</i> Thorne, 1945	29
3.4.2.1 Výskyt	30
3.4.2.2 Biologie	30
3.4.2.3 Morfologie.....	30
3.4.2.4 Hostitelský okruh	31

3.4.2.5	Symptomy	31
3.4.2.6	Ochranná opatření	32
3.5	Cystotvorná háďátka	32
3.5.1	Morfologie a vývoj	32
3.5.2	Rod <i>Heterodera</i> Schmidt 1871	33
3.5.3	<i>Heterodera humuli</i> Filipjev, 1934	33
3.5.3.1	Výskyt	33
3.5.3.2	Biologie	34
3.5.3.3	Morfologie	34
3.5.3.4	Hostitelský okruh	35
3.5.3.5	Symptomy	35
3.5.3.6	Ochranná opatření	35
3.6	Diagnostické metody	36
3.6.1	Morfologická diagnostika	36
3.6.1.1	Háďátka <i>Ditylenchus spp.</i>	36
3.6.1.2	Cystotvorná háďátka	38
3.6.2	Molekulárně biologické metody	39
3.6.2.1	Extrakce DNA	39
3.6.2.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	39
3.6.2.3	Amplifikační techniky	39
3.6.2.4	Elektroforéza	40
3.6.2.5	Sekvenace DNA	41
3.6.2.7	Bioinformatické zpracování získaných sekvenačních dat	41
3.7	Chmel	41
3.7.1	Původ chmele v Evropě	41
3.7.2	Chmel otáčivý (<i>Humulus lupulus</i>)	42
3.7.3	Historie chmelařství	43
3.7.4	Pěstební podmínky	45
3.7.5	Charakteristika Žatecka a žateckého chmele	46
4	Materiál a metody	48
4.1	Cíl práce	48
4.2	Výběr lokality	48
4.3	Stanovení výskytu volně pohyblivých háďátek	48
4.3.1	Biologický materiál	48
4.3.2	Extrakce háďátek z rostlinných pletiv	49
4.4	Stanovení výskytu sedenterních háďátek	49
4.4.1	Biologický materiál	49

4.4.2 Extrakce cyst z půdních vzorků	49
4.4.3 Morfologická diagnostika	50
4.4.4 Extrakce DNA	51
4.1.2 Reakční směs	52
4.1.3 Teplotní fáze reakčního cyklu:	53
4.1.4 Příprava agarózového gelu	53
4.1.5 Extrakce DNA z agarózového gelu	55
5 Výsledky	57
5.1 Stanovení výskytu osních háďátek	57
5.2 Stanovení výskytu cystotvorných sedenterních háďátek	58
6 Diskuze	68
7 Závěr	74
8 Seznam literatury	75
9 Seznam použitých zkratk	82
10 Seznam v textu uvedených tabulek, obrázků a grafů	83
10.1 Seznam tabulek	83
10.2 Seznam obrázků	83
10.3 Seznam grafů	83
11 Přílohy	84
11.1 Seznam příloh	84

1 Úvod

Žatecká oblast, co se produkce chmele týče, patří k celosvětově nejvýznamnějším už jen ze své historické podstaty. V porovnání s rozlohou naší malé republiky lze přesto velikost naší pěstební plochy přeneseně přirovnat k produkci ostatních chmelařských velmocí. Však také Česká republika patří mezi první tři největší producenty chmele na světě.

V dnešní době se celkově podceňuje význam fytoparazitických háďátek, obzvláště na porostu trvalých kultur. Je obtížné vysledovat tyto účinky a dopady na produkci chmele vzhledem k množství ostatních fyziologických, klimatických a biologických faktorů a jiných činitelů, ale i vůči delší vegetativní, tím pádem i generativní době než u jednoletých plodin. Dalším průzkumům tohoto druhu navíc nepřidává relativní ojedinělost pěstování této plodiny v celosvětovém měřítku.

Na chmelu může parazitovat několik druhů háďátek. Nejznámější a nejběžnější druh adaptovaný na tuto plodinu je chmelové cystotvorné háďátko *Heterodera humuli*. Háďátka mohou ovlivnit vývoj chmelové rostliny přímo, parazitickým sáním nebo nepřímo, vytvářením infekčních míst pro další patogeny a také ohrožují rostliny přenosem virů. Navíc mohou setrvat dlouhou dobu na stanovišti v tzv. dormantním stavu.

Vytrvalost této plodiny, velikost kořenového systému a rapidní nárůsty během jara naznačují, že tyto rostliny mají velkou kapacitu k toleranci nematofágního poškození (Warner *et al.*, 2013).

2 Cíl práce

Hypotéza: Na území ČR v pěstebních oblastech se vyskytují fytoparazitická hád'átka napadající rostliny chmele.

Cílem této diplomové práce bylo uskutečnit detekční průzkum půd na chmelnicích v České republice. Byla k tomu vybrána oblast Žatecka, kde má chmelařství historicky pevné kořeny již po staletí. Detekční průzkum neboli průzkum prováděný ke zjištění, zda se škodlivý činitel vyskytuje na daném území, byl zaměřený na fytoparazitická hád'átka, která mají hostitelskou rostlinu chmel otáčivý (*Humulus lupulus*). Zpracovaly se vzorky půdy a zhodnotila se korelace mezi výskytem hád'átek a jednotlivými sesbíranými daty ohledně kvantity a kvality produkovaného chmele na jednotlivých pozemcích. Dále se provedl rozbor vybraných cyst sedentérních hád'átek pod mikroskopem i pomocí molekulárně biologických metod pro přesnou identifikaci.

Druhá část práce byla zaměřena na výskyt *Ditylenchus dipsaci* a *Ditylenchus destructor* v nadzemních částech rostlin. Cílem bylo potvrdit nebo vyvrátit jejich přítomnost v rostlinném pletivu metodou pomocí Baermanovy nálevky.

3 Literární přehled

3.1 Úvod do problematiky hád'átek

3.1.1 Zastoupení hád'átek v živočišné říši

Hád'átka tvoří početně nejobsáhlejší skupinu organismů, tvoří téměř 80 % všech mnohobuněčných organismů na celém světě z říše Animalia. Tito živočichové, včetně novitního tvaru, se vyskytují od nejspodnějších vrstev oceánského dna téměř po vrcholky nejvyšších hor, od polárních oblastí až po oblasti tropů (Karczmarek, 2006). Hlístice se objevují prakticky všude, ve všech vodních profilech, v každé půdě, v mořských vodách každé oblasti zeměpisné šířky, v rozkládajícím se pletivu rostlinných zbytků, také jako paraziti tkání většiny živočišných skupin, a to od jiných druhů hád'átek, žížal, přes hmyz, měkkýše, po různé druhy hospodářských zvířat, domácích mazlíčků i lidí (Shurtleff & Averre, 2000). Dosud je známo asi 100 000 druhů z kmene Nematoda, z nichž na rostlinách parazituje okolo 20 000 druhů. Odhadované množství je až do 100 milionů druhů (Karczmarek, 2006). Hlístice se dělí do 14 řádů. Jen asi 10 % všech popsanych hlísticovitých druhů parazituje na rostlinách, zhruba 15 % známých druhů jsou paraziti živočichů, 50 % je vodních a asi 25 % je volně žijících druhů (Shurtleff & Averre, 2000). Nejvýznamnější parazité rostlin jsou z řádu Hlístkové (Dorilaimida) a Hád'ata (Tylenchida). Způsobují celosvětově značné škody na produkci plodin (Karczmarek, 2006). Různé druhy fytoparazitických hád'átek obývají a infikují většinu částí rostlin, jako jsou pupeny, květy, listy, lodyhy, stonky a kořeny. Až 1,5 miliardy hád'átek se může vyskytovat současně na pozemku o velikosti jednoho akru (0,4 ha) do hloubky 20 cm (Poinar Jr., 2011). Mnoho druhů je přítomno ve svrchním půdním profilu do hloubky 30 cm, některé jsou však i v hlubších vrstvách. Zemina o hmotnosti 0,5 kg z obdělávaného úrodného pozemku obecně obsahuje 10 – 20 druhů patřících do různých rodů, včetně endo-, ektoparazitů a predátorů. Hád'átka se vyskytují na rostlinách pěstovaných na polích, v sadech, školkách, sklenících, lesích a trávnicích. Jejich celosvětový význam, jakožto hlavní příčina onemocnění pěstovaných plodin širokého rozsahu a ovlivnění jejich produkce, nebyl rozpoznán až do poloviny 40. let minulého století. Škody na úrodě způsobené hád'átky jsou připisovány častěji jiným limitujícím faktorům (např. půdním a klimatickým podmínkám, chorobám, škůdcům, roztočům, aj.). Hád'átka jsou často opomíjena jako hlavní škodlivý faktor v pěstované plodině, dokud nejsou jiné limitující vlivy na produkci odstraněny (Shurtleff & Averre, 2000).

Prakticky každá plodina má své druhy parazitických háďátek. Více než 150 druhů bylo zkoumáno k objasnění své role v rostlinné říši. Každým rokem je popsáno mnoho nových druhů. V pokusech se projevuje inverzní vztah hmotnosti rostlin k množství háďátek dodaného do půdy ke kořenům rostlin. Tento vztah se liší mezi jednotlivými druhy a je ovlivňován určitými faktory životního prostředí, jako je úrodnost, vlhkost, teplota a jiné půdní vlastnosti. Trvalé kultury poskytují stálý přísun obživy, a proto mohou být zranitelnější vůči poškození háďátky. Obdobně jednoleté plodiny pěstované jako monokultury podporují tento fenomén. Háďátka ovlivňují negativně jak výnos, tak kvalitu komodity. Rostlinám háďátka negativně ovlivňují přísun živin, tím pádem dochází k neefektivnímu využití nejen hnojiv. Další hrozbou je sekundární poškození rostlin jinými škodlivými organismy z řad bakterií a houbových patogenů. Nediagnostikované napadení rostlin háďátky může negativně ovlivnit pokusy navržené ke zkoumání jiných faktorů, které limitují růst rostlin (Handoo, 1998; Palm *et al.*, 1968).

3.1.2 Historie výzkumu háďátek

První poznatky o fytoparazitických háďátkách v oblasti mírného pásma pochází z přelomu 17. a 18. století, poté co byl vynalezen první mikroskop holandským vědcem panem Leeuwenhoekem. První záznam o pozorování fytoparazitického háďátka je z roku 1743, kdy jej badatel Needham pozoroval na pšenici, konkrétně se jednalo o *Anguina spp.* V roce 1855 bylo objevené háďátka způsobující škody na kořenech okurek. Později bylo objevené háďátka řepné a mnoho dalších (Handoo, 1998).

Skupina cystotvorných háďátek byla poprvé popsána roku 1859 na kořenech cukrovky v oblasti německého Magdeburgu botanikem Schachtem. Byla pojmenována až o pár let později Schmidtem, a to jako *Heterodera schachtii*, byla nalezena i na dalších plodinách, např. ovsu, ječmeni nebo bramborách. V té době se však spekulovalo jen o jednom a tom samém druhu (Vlk, 1985).

Následující století se vkládalo velké úsilí do aplikace vědy v zemědělství, především v Evropě. Do 40. let 20. století se vědomosti o jiných fytoparazitických háďátkách příliš nerozšiřovaly. V dalších letech se rozmohl chemický průmysl s fumiganty, které redukovaly populace nejen háďátek, ale i jiných škodlivých činitelů (Palm *et al.*, 1968).

První výzkumy fytoparazitických háďátek v tropických oblastech se však uskutečnily až na přelomu 19. a 20. století v Oceánii. Cobb (1891) učinil průzkum cca 30 druhů z půdy na plantáži banánovníků v rostlinných pletivech na Fidži. Jiný průzkum vedl k objevení

škodlivých hád'átek na ananasových polích na Havaji a v této souvislosti došlo k vývoji prvního efektivního půdního nematocidního fumigantu. V polovině 20. století vzrostl počet založených nematologických laboratoří ve všech částech světa, např. Indie, Keňa, Zair, Pobřeží slonoviny (Luc *et al.*,2005).

3.2 Taxonomické zařazení hád'átek

ŘÍŠE: ANIMALIA

Kmen: **Nematoda**

Třída: Adenophorea (Aphasmidea)

Řád: Hlístkové – Dorylaimida

čeleď: Dorylaimidae rod: *Dorylaimus*

čeleď: Longidoridae rody: *Longidorus*
Xiphinema
Paralongidorus

čeleď: Trichodoridae rody: *Trichodorus*
Paratrichodorus

Třída: Secernentea (Phasmidea)

Řád: Hád'ata – Tylenchida

- Nadčeleď: Tylenchoidea

čeleď: Hoplolaimidae rody: *Hoplolaimus*
Rotylenchus
Helicotylenchus
Rotylenchulus

čeleď: Tylenchidae rody: *Tylenchus* ,
Ditylenchus
Anquina
Psilenchus

čeleď:	Pratylenchidae	rody:	<i>Pratylenchus</i>
čeleď:	Heteroderidae	rody:	<i>Globodera</i> <i>Heterodera</i> <i>Punctodera</i> <i>Cactodera</i>
čeleď:	Meloidogynidae	rod:	<i>Meloidogyne</i>
čeleď:	Nacobbidae	rody:	<i>Nacobbus</i> <i>Rotylenchus</i>
čeleď:	Tylenchulidae	rod:	<i>Tylenchulus</i>
čeleď:	Paratylenchidae	rod:	<i>Paratylenchus</i>
čeleď:	Criconematidae	rody:	<i>Criconema</i> <i>Criconemoides</i> <i>Belonolaimus</i> <i>Dolichodorus</i>

Řád: Aphelenchida

- Nadčeleď: Aphelenchoidea

čeleď:	Aphelenchidae	rod:	<i>Aphelenchus</i>
čeleď:	Aphelenchoididae	rod:	<i>Aphelenchoides</i>

(Vlk, 1985).

3.3 Obecná charakteristika

3.3.1 Morfologie háďátek

Tyto organismy jsou většinou mikroskopičtí a zpravidla průsvitní a nitkovití, odsud pochází jejich výstižný název z řeckého „nema“ = vlákno a „iodes“ = podobný. S jejich délkou většiny z nich 1 – 2 mm je téměř nemožné vidět je pouhým okem. Výjimečně však dosahují i 5 až 6 mm, ale tyto druhy se objevují poměrně zřídka. Tento tvar platí o samečcích z rodu *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera* a ostatních pohyblivých kořenových háďátkách (Anonym 3, 2015; Vlk, 1985).

Samičky některých druhů však nemají typický nitkovitý tvar, jejich zduřelá těla nabývají tvarů odlišných, např. druhy rodu *Globodera* jsou zaoblené, rod *Heterodera* má typický

citronovitý tvar, rod *Meloidogyne* tvar hruškovitý. Samičky rodu *Heterodera* a *Globodera* se mění v tzv. cysty, po vytvoření vajíček odumírají a jejich tělo vytvoří ochranný obal pro vajíčka, popřípadě larvy 1. stadia. Jejich cysty jsou povětšinou hnědé, jen cysty samiček rodu *Meloidogyne* zůstávají bílé a měkké (Shurtleff & Averre, 2000).

Na povrchu nesegmentovaného těla je odolná 2 – 3 vrstvá, většinou průsvitná, kutikula, jež je tvořena směsí keratinu, proteinů, lipidů a polysacharidů. Mnohdy lze skrze ni spatřit jejich vnitřní orgány. Chrání celý organismus před nepříznivými podmínkami. Kutikula může být příčně kroužkovaná nebo hladká. Podél bočních částí těla jsou podélné linie sloužící jako významný morfologický znak. Ústní dutina, pochva a konečník jsou původu exodermálního a kryje je kutikula. Během vývoje dochází obvykle ke čtyřem svlékáním kutikuly, která je nahrazena novou vrstvou (Decker, 1989).

Pod kutikulou se nachází hypodermis, která po obvodu těla vytváří čtyři podélné lišty, dvě boční (laterální), břišní (ventrální) a hřbetní (dorzální). Bočními lištami probíhají nervové provazce a exkretční kanálky, které vyúsťují z těla právě v úrovni nervového prstence. Mezi těmito čtyřmi lištami v hypodermis probíhají podélně také pruhy svalstva. Tyto tři vrstvy – svrchní kutikula, hypodermis a pruhy svalů tvoří tzv. funkční celek kožně svalový vak. Hád'átka mají tělní pokryv a zároveň umožněný pohyb díky ohebné kutikule. Pohyb hád'átek, jak už název napovídá, je hadovitý, mrskavý, zajímavostí je, že hád'átkům je umožněn pohyb pouze dopředu. Popřípadě se umí stočit do spirály. V těle hád'átka jsou ještě další důležité svalové orgány, jimiž je ovládán stilet, lépe řečeno jeho rytmické pohyby. Dále svaly ovládají roztahování a stahování jícnu a také uvádějí do pohybu pářící jehlici samců. Kožně svalový vak obklopuje dutinu břišní, v níž jsou uloženy orgány trávicího ústrojí, zbytek nervového systému a pohlavní soustava (Lee, 2010; Vlk, 1985).

Největší část tělní dutiny zabírá trávicí soustava. Je to další determinační znak, má různé tvary i velikost. U fytoparazitických hád'átek je vybavena ústním bodcem (stylet), s nímž perforují stěny buněk rostlinných pletiv a vysávají jejich obsah. Málodky však může chybět úplně. Stylet je dutý jehlovitý útvar, jenž spodním dnem nasedá na přední část jícnu. Stylet může mít různé tvary podle druhu hád'átka, může být rovný, ohnutý, jehlovitý atd. (Lee, 2010). Po obvodu ústního otvoru jsou tři, šest a někdy jen čtyři pysky se smyslovými bradavkami, tzv. papily (Gaar, 2004). Jícen, *oesophagus*, je svalnatý trubicovitý několikadílný orgán, který je tvořen třemi částmi. První přední část je *corpus*. Má tvar válcovitý – dorylaimoidní typ, nebo může být rhabditoidní. Střední bulbus je rozdělen na dvě části – přední válcovitá – *procorpus* a zadní zduřelá – *metacarpus*. Druhá část jícnu se nazývá *istmus*, kolem něj je uložen nervový prsteneček. Je to ve skutečnosti zúžená část mezi

středníma terminálním bulbem neboli poslední část jícnu. Terminální, tzv. žlaznatý bulbus je rozšířený. Tvoří ho tři žlázy, jedna dorzální a dvě subventrální. Místo vyústění dorzální jícnové žlázy hraje důležitou roli v rozpoznávání druhů. Mezi jícnem a středním střevem (*intestinum*) je většinou chlopnovitý útvar zvaný *cardia* (Decker, 1989; Lee, 2010).

Několikadílné střevo vyplňuje velkou část těla. Střední střevo je obyčejná trubice propojující jícen se zadním střevem, což je konečná část zažívací soustavy, tedy konečník - *rectum*. Ten vyúsťuje análním otvorem – *anus*. Od středního střeva až po konečník je tato část průhlednější a nazývá se *prorectum*. Před konečníkem, do něhož ústí rektální žlázy, se nachází uzavírací sval. U samců ústí konečník společně s chánovodem do kloaky. Na konci těla za řitním otvorem je ocas – *cauda*. Vylučovací ústrojí zajišťují 1 - 2 exkrece kanálky v bočních lištách nebo v tělní dutině. Vyústění je umístěno poblíž nervového prstence (Decker, 1989; Vlk, 1985).

Nervová soustava je jednoduchá, tvořena centrální nervovým prstencem obepínající jícen nervovými uzlinami a provazci, které jsou napříč spojené spojkami – *komisury*. V přední části těla od nervového prstence jsou nervové kmeny, čtyři se rozvětvují trojmo a dva dvojmo. Inervují tak smyslové orgány v hlavové části – pyskové papily na špičkách všech pysků, které mají hmatovou funkci. Další dva nervové provazce spojují postranní smyslové orgány – *amphidy* s bočními uzlinami. Jsou to chemoreceptory, které informují jedince o okolním světě. Od nervového prstence směrem dozadu vybíhají další dva nepárové kmeny, břišní a hřbetní, které jsou zakončeny v pórovitých útvarech – *phasmidy*, poblíž řitního otvoru. Pohlavní papily, častěji přítomné u samečků, jsou na břišní straně nebo na bocích v oblasti kloaky. Mohou se však nacházet i podél břišní strany až k apikální části těla. Poblíž nervového prstence se nachází další útvary, např. *hemizonid* či *hemizonion* (Decker 1989). Smyslové orgány se vyskytují u háďátek v podobě smyslových štětin, které jsou navzájem propojeny a napojeny na nervovou soustavu a nejpočetnější jsou v oblasti vulvy a na zadním konci těla samečků (Vlk, 1985).

O oběhové a dýchací soustavě se u háďátek nedá hovořit v pravém slova smyslu. Tyto funkce zastává tělní tekutina vyplňující tělní dutinu (Decker, 1989).

3.3.2 Rozmnožování a biologie háďátek

Háďátka jsou převážně odděleného pohlaví, často s pohlavním dimorfismem. Pohlavní orgány slouží jako determinační znak. Samičí pohlavní ústrojí je složeno z 1 – 2 vaječnicků

(*ovarium*), děloha (*uterus*), pochvou – *vagina* a vulvou. Některé druhy mají spermatéku (*receptaculum seminis*) k uchování samčích pohlavních buněk.

- Monodelfické uspořádání vaječníků – vyvinut pouze jeden vaječník, který směřuje k hlavové části a vulva je na břišní straně v zadní části těla. Např. rod *Ditylenchus*, *Aphelenchoides*, *Pratylenchus*, *Paratylenchus*.
- Didelfické uspořádání – jsou vyvinuty dva vaječníky.
- Didelficko – amfidelfického uspořádání – vulva je uprostřed těla, kdy jsou vaječníky v protilehlém směru, např. rod *Tylenchorhynchus*, *Rotylenchus*.
- Didelficko – prodelfického uspořádání – soustava obou vaječníků obrácených dopředu směrem k hlavové části těla, např. u rodů *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidogyne*.

Samci mají rozmnožovací a trávicí soustavu ukončenou společným vývodem. Některé druhy mají vyvinutou spermatéku – zásobník samčích pohlavních buněk. U samců fytoparazitických druhů háďátek tvoří většinou pohlavní orgány jen jedno varle (*testis*). Háďátka některých rodů, např. *Meloidogyne*, mají však dvě. Další části jejich pohlavní soustavy jsou semenný váček – *vesicula seminalis*, chámovod (*vas deferens*) a jednu nebo dvě pářící jehlice (*spicula*), což je kutikulární útvar umístěný ve stěně kloaky ovládaný svalstvem. Tvar spikuly je důležitým determinačním znakem. Některé druhy mají navíc vyvinuté *gubernaculum*, což je vodící a kluzná lišta spikuly. Po stranách těla mohou být umístěné pářící plachetky (*bursa copulatrix*), sloužící k pevnému přichycení samiček při kopulaci a začíná obvykle před řitním otvorem. Končí buď před koncem ocasu (*bursa leptoderni*), (např. rod *Ditylenchus*, *Tylenchus*) nebo dosahuje až na jeho konec (*bursa peloderni*), (např. rod *Pratylenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Rotylenchus*). Dle tvaru a délky ocasu se dále determinují jednotlivé druhy. Samečci rodů jako je *Globodera*, *Heterodera* nebo *Meloidogyne* pářící plachetky nemají (Lee, 2010; Vlk 1985).

Většina fytoparazitických druhů háďátek má poměr pohlaví v populaci 1:1, jsou však výjimky, kdy 1 sameček je v poměru 10 000 samiček, z toho je zřejmé, že se takovýto druh rozmnožuje partenogeneticky, např. *Heterodera trifolii*. U některých druhů se však může jednat o hermafroditismus, a to u *Pratylenchus crenatus*. Samičky tohoto druhu mají buď orgány pro tvorbu spermií, tzv. spermogonie – agonický hermafroditismus, nebo se vajíčka i spermie vytváří v jedné gonádě – syngonický hermafroditismus (Vlk, 1985).

Oogonie zárodečného epitelu v apikálním konci vaječniku se mitoticky dělí a vyrůstají z nich oocyty. Prostupem vaječniku se oocyty zvětšují a pronikají do semenné schránky, kde jsou oplodněny. Poté se v děloze vytvoří vaječný obal, což jsou většinou tři blanky. Vnitřní

lipoidní, střední chitinózní a vnější obal proteinový, který se vytváří až po oplození a u některých druhů chybí (Lee, 2010; Decker, 1989).

Většina samiček klade vajíčka do okolí, některé druhy, např. *Meloidogyne*, kladou vajíčka do rosolovitého vaku. Jiné druhy některých zástupců rodu *Heterodera* část vajíček kladou do vaječného vaku, např. *H. schachtii*, *H. humuli* nebo *H. trifolii*, většina jich však zůstává v těle samičky, která se mění po odumření v cystu. Druhy jako *H. avenae* nebo *Globodera rostochiensis*, které mají všechna vajíčka v cystách, zde také prožívají fázi embrya. Tato strategie chrání vajíčka před rychlým vyschnutím a umožní jim tak přežít mnoho let za nepříznivých podmínek (Perry & Moens, 2006).

Uvnitř vajíček je granulovitá hmota, která zároveň obsahuje živiny. Po prvním dělení se jedná o stádia blastuly a gastruly s diferenciací tkání v ektoderm, mesoderm a endoderm. Poslední fáze je larvální a larva je ve vaječném obalu několikrát svinuta (Schutleff & Averre, 2000).

Délka embryonálního vývoje i počet vajíček závisí na jednotlivém druhu háďátek. Taktéž hraje významnou roli vnější prostředí. Samičky rodu *Heterodera*, *Meloidogyne* a *Globodera* vytváří až několik set vajíček. Samičky listových háďátek jen pár desítek. Embryonální vývoj trvá jen několik dní (Vlk, 1985). Líhnutí larev háďátek s následným opouštěním cyst je běžně podporováno difuzáty kořenů hostitelských rostlin, ale i jiných nehostitelských rostlin. Existují však případy, např. *Heterodera avenae* nebo *H. gottlingiana*, u kterých se aktivace líhnutí larev kořenovými exudáty nepotvrdila. Produkce exudátů je závislá na intenzitě růstu rostlin, exudáty jsou ve vodě rozpustné, termostabilní a mohou být absorbovány půdními koloidy. Velmi významné je však i spontánní líhnutí larev, především na jaře (*Heterodera schachtii*). Dále je tento proces ovlivňován teplotou. U *Heterodera avenae* se nejvíce larev líhne při teplotách kolem 20 °C, u *H. schachtii* při teplotě okolo 25 °C (Lee, 2010; Vlk, 1985).

Postembryonální vývoj má počátek v prvním larválním stádiu, svlékáním ve vaječných obalech, které po prasknutí díky rytmickým pohybům stiletu opouští larvy 2. stádia, larvy se svlékají během svého vývoje čtyřikrát. Těsně před svlékáním jsou larvy neaktivní a nepřijímají potravu. Svlékání představuje výměnu staré kutikuly za novou. Samičky některých druhů, jak již bylo zmíněno, s vývojem mění i tvar těla, který jim dle druhu zduří a změní se v cysty. Doba vývoje larválních stádií je různá, od 2 do 12 dnů. V posledním larválním stupni mají larvy pohlavní orgány plně vyvinuty a po 4. svlékáním jsou morfologicky dospělé. Avšak k dosáhnutí pohlavní dospělosti je ještě potřeba pár dní k úplnému dozrání orgánů, aby byly schopny kopulace. Ale již před úplným dozráním lze rozeznat pohlaví jedinců, např. u rodů *Heterodera* ve třetím stádiu (Vlk, 1985).

3.3.3 Šíření háďátek

Háďátka se v půdě pohybují velmi pomalu, od pár centimetrů do 1 metru během jedné vegetace. Spíše se šíří pasivně zemědělskou technikou, stejně tak se mohou šířit záplavami, závlahovou či drenážní vodou. Dokonce je mohou šířit živočichové nebo vanoucí vítr. Distribuce na větší vzdálenost se uskutečňuje infikovaným rostlinným materiálem či osivem, kontaminovanou půdou i zemědělskými produkty. Voda a vítr způsobují lokální šíření háďátek, ale právě člověk je zodpovědný za rozšíření na velké vzdálenosti, zejména introdukcí rostlin a mezinárodním obchodem rostlinných komodit (Shurtleff & Averre, 2000).

3.3.4 Škodlivost háďátek

Poškození rostlin, způsobené háďátkami, byla nalezena v každé oblasti, kde se průzkumy prováděly.

Ze škodlivých cystotvorných druhů převažují rody *Heterodera* a *Globodera*. Škodlivost háďátek se projevuje na porostech jak přímo, tak nepřímo. Přímé škody háďátka způsobují mechanickým poškozením rostlinných pletiv a rostlina ztrácí živiny a chřadne, což má přímý vliv na vitalitu rostlin, popřípadě na výnos. Nepřímá škoda může být však ještě větší, co se týče přenosu virů, možné otevření vstupu infekci do rostlinných pletiv, nákladů spojených se šlechtěním odrůd rezistentních proti háďátkům nebo eliminace dopadu karanténních opatření, vyhlášených v souvislosti s výskytem karanténních druhů a omezených možnostech pěstování určitých plodin. Každoroční ztráty na výnosech souvisí s hustotou populace háďátek v půdě během vegetace. Tato relace se poněkud liší v trvalých kulturách. Poškození několika háďátek není obvykle závažné, leč v časovém odstupu může být přeci jen zásadní pro následnou plodinu. Populace překračující práh ekonomické škodlivosti může poznamenat estetickou stránku, snížit úrodu nebo dokonce úplně zlikvidovat porost hostitelské plodiny. Odhady každoročních celosvětových ztrát zapříčiněné fytoparazitickými háďátkami se pohybují od 3,3 % na žito *Secale cereale* po 20,6 % na rajčatech *Lycopersicon esculentum*. V plodinách pěstovaných pro lidskou obživu jsou škody odhadnuté každoročně na 11 – 14 % v řádech miliard dolarů (Shurtleff & Averre, 2000).

3.3.5 Metody ochrany rostlin

3.3.5.1 Preventivní metody

Nejúčinnější ochranou je vždy kombinace přímých a nepřímých metod. K nepřímým metodám patří prevence, tedy zabránění dalšímu šíření hád'átek. Je nutné používat certifikovaný rostlinný materiál a dodržovat přísná legislativní opatření pro tyto komodity, s kterými se obchoduje jak mezinárodně, tak lokálně. Tyto zásadní postupy tvoří pilíře ochrany rostlin před několika závažnými škodlivými organismy, jako je *G. rostochiensis* nebo *G. pallida*. Důležitým preventivním opatřením proti přemnožení hád'átek je vhodný osevní postup, do kterého je nutno zařadit alternativní nepřátelské a nehostitelské plodiny, které zajistí zároveň případné spontánní líhnutí larev a přirozená úmrtnost způsobená nedostatkem vhodných hostitelů zredukuje množství populace pod práh ekonomické škodlivosti. Některá hád'átka mají celkem omezený hostitelský okruh, což usnadňuje možnost ochrany využitím právě osevního sledu. Např. hád'átka *G. rostochiensis* a *G. pallida* mají 1 – 3 hostitelské plodiny (brambor, rajče, lilek), *H. avenae* (ječmen, oves, pšenice), *H. zea* (kukuřice), *H. carotae* (mrkev).

Nejefektivnější je však použití rezistentních odrůd rostlin proti danému druhu hád'átka. Tato alternativa zůstává neekonomičtější a nejpraktičtější v rámci ochrany rostlin, ačkoliv nebývá vždy dostupná. Hostitelské plodiny byly vyšlechtěny na rezistenci vůči *G. rostochiensis*, *G. pallida*, *G. tabacum*, *H. avenae*, *H. glycines*, *H. schachtii*. Fungují tak, že nedochází k vytváření obřích buněk v okolí napadení a buňky zpočátku poskytují hád'átkům přísun živin. Postupně však nekrotizují a znepřístupní potřebné živiny a samičky svůj vývoj nedokončí. Tato metoda se hojně používá v bramborářství, kde je vedeno přes 70 odrůd rezistentních k hád'átku bramborovému, jehož populaci po zařazení do osevního postupu mohou snížit až o 90 % (Perry & Moens, 2006).

Jiné metody využívají např. vhodné agrotechnické lhůty. Dále je nutné zajistit optimální výživu rostlin a ochranu proti plevelům (Gaar, 2001).

3.3.5.2 Kurativní metody

Přímé metody, kam patří chemické, fyzikální či biologické způsoby ochrany, jsou většinou více náročné a méně účinné, a proto se v praxi používají jen omezeně (Gaar & Čermák, 2012).

Chemická ochrana je zastoupena nematocidními přípravky. Avšak několik z nejvíce účinných byly staženy kvůli možnému zdravotnímu a bezpečnostnímu riziku. Dalším faktorem je biologická degradace půdními organismy, jejichž počet může narůstat nepřiměřeným využitím nematocidů. Nematocidy jsou hojně aplikovány v rámci strategie ochrany rostlin, např. hád'átka druhů *G. rostochiensis* a *G. pallida* v bramborách a *H. goerringiana* na hrachu, jež mají 1 – 2 generace do roka. Druhy, které produkují několik generací za rok, jako např. *H. glycines* nebo *H. schachtii*, jsou náročnější na regulaci (Perry & Moens, 2006). V současné době jsou u nás v registru přípravků na ochranu rostlin registrovány tři přípravky, na bázi účinné látky oxamyl (Vydate 10 G), acetamiprid (CAREO Combi Granulát proti škůdcům) a dazomet (Basamid Granulát).

Fyzikální metody se používají pro ozdravení semen a sadby, např. mořením napadeného osiva a hlíz horkou vodou při teplotě 43,5 °C, substrátu při vysoké teplotě 90 °C. Další metoda je solarizace půdy, použitelná v teplejším klimatickém pásmu (Zouhar a kol., 2008).

Cystotvorná hád'átka by se zdála být perfektním cílovým organismem pro využití jako biologická agens v ochraně rostlin. Vajíčka jsou uvnitř cyst v rosolovitém obalu, takže by měly být velmi náchylné k houbovým nebo bakteriálním parazitům v rhizosféře. Byly uskutečněny početné empirické studie proti ekonomicky významným cystotvorným hád'átkům použitím nematofágních houbových organismů a bakterií (Perry & Moens, 2006). Podrobný výzkum byl veden pouze pro některé druhy organismů. Mezi nejlepší příklady patří metoda regulace *H. avenae* houbovým organismem *Nematophthora gynophila* a *Pochonia chlamydosporium*. Dalšími významnými nematofágními houbovými organismy jsou zástupci řádu Moniliales, které produkují smrtící toxiny. Existuje také možnost využít bakterie *Pausteria penetrans* jako bioagens, která zamezuje hád'átkům rozmnožovat se a penetrovat larválními stádii do kořenů. Zvýšená aktivita nematofágních hub byla zjištěna v kompostech a mulčích, proto je tedy vhodné zapravovat organickou hmotu do půdy, která přispívá k regulaci fytoparazitických hád'átek v půdě (Zouhar a kol., 2008)

Je nezbytné používat všechny možné dostupné metody ochrany, přímé i nepřímé. Obvykle se praktikuje vhodný osevní postup s dodatečným opatřením. Výhoda tohoto postupu spočívá v použití dílčích účinných strategií a ochranných opatření, které znemožňují adaptaci hád'átek, jako např. *G. rostochiensis* a *G. pallida* v Evropě nebo *H. glycines* v USA (Roberts, 1993).

3.3.6 Příznaky na rostlinách

Fytoparazitická hád'átka jsou obligátní parazité napadající živé rostlinné buňky, které potřebují ke svému životnímu cyklu. Příznaky napadení rostlin závisí na druhu parazita, stáří a druhu hostitelské rostliny i místu parazitace (Shurtleff & Averre, 2000).

3.3.6.1 Příznaky na podzemních částech

Nejběžnějším příznakem napadení kořenů fytoparazitickými hád'átkami je nespecifické chřadnutí rostlin. Poškození kořenových buněk způsobuje menší absorpci vody a živin rostlinou. Rostliny vadnou a zaostávají v růstu.

Kořenové hálky jsou typické útvary na kořenech o velikosti několika mm až po cm, jsou způsobeny hlavně druhy rodů *Meloidogyne spp.* a *Nacobbus spp.*, ale také *Anquina radicola*. Tyto hálky mohou vyvolat i ektoparazitické druhy, např. *Hemicycliophora arenaria*, *Xiphinema diversicaudatum*.

Léze jsou ohraničené nekrózy v různých pletivech (hypodermis, epidermis nebo v celé korové vrstvě). Jsou původem reakcí určitých látek na výměšky hád'átek. Jsou typické pro napadení kořenů endoparazity rodu *Pratylenchus* a *Radophulus similis*. Občas se tyto nekrózy objeví i vlivem napadení ektoparazitickými druhy rodů *Helicotylenchus* a *Criconemoides*. Nejprve se vytváří malé léze, které se ovšem přispěním sekundárních činitelů rozšiřují, a nakonec celé části kořenů odumřou. Nekrotické léze mohou vznikat i po vniknutí hád'átek do rezistentních odrůd, kde však hád'átka hynou.

Suchá hniloba je dalším možným symptomem přítomnosti hád'átek v rostlině. Vzniká sekundárně vlivem houbových patogenů po napadení dužnatých částí rostlin, jako jsou bulvy, hlízy, stolony. U bramborových hlíz je tento projev následován napadením *Ditylenchus destructor* a parazitací *D. dipsaci* na bulvách řepy.

Poškození kořenových špiček souvisí s přerušением růstu kořenů hlavních i postranních, kořenový systém má strohý tvar, kdy jemné postranní kořínky zcela chybí. Tyto příznaky způsobují kořenoví ektoparazité rodu *Trichodorus*, *Xiphinema*, *Longidorus* a *Hemicycliophora*.

Abnormální produkce postranních kořínků a větvení kořenů jsou způsobeny některými druhy hád'átek, které stimulují tvorbu postranních kořínků a celý kořenový systém se tak rozvětňuje. *Heterodera schachtii* způsobuje tzv. „vousatost“ řepy (Vlk, 1985; Shurtleff & Averre, 2000).

3.3.6.2 Příznaky na nadzemních částech rostlin

Některá hád'átka, např. *Heterodera glycines*, jako cystotvorný parazit sóji, mohou způsobit závažné výnosové ztráty, aniž by se projevíly nějaké příznaky na nadzemních částech rostlin.

Příznaky na výhonech rostlin napadených kořenovými hád'átky jsou např. zakrslost, špatný růst, žloutnutí, chlorózy, předčasné odumírání, chřadnutí.

Typické napadení plodiny hád'átky se mohou projevovat menšími (př. 4 – 8 m) ale i velkoplošnými ohnisky (20 – 30 m).

Přerušení růstu nadzemních částí rostlin může být způsobeno sedentárními kořenovými hád'átky nebo některými druhy osních hád'átek. (Shurtleff & Averre, 2000).

Deformace listů a osních částí rostlin způsobují např. hád'átka *Ditylenchus dipsaci* u mnoho rostlin, např. jahodník, vojtěška, cibule, řepa, aj. Projevem jsou zduřelé, pokroucené, zúžené a zakrslé listy. Dále mají tyto příznaky listová hád'átka, jako jsou *Aphelenchoides fragariae*, *A. ritzemabosi* nebo *Anquina tritici*.

Změny barvy a nekrózy mohou způsobovat hád'átka druhu *Ditylenchus dipsaci*. Mohou být patrné buď na průřezu napadené části, jako např. „kroužkovitost cibulí“. Nebo na povrchu jako zjevné skvrny. Např. listová hád'átka, *Aphelenchoides ritzemabosi*, *A. fragaria*, jenž způsobují převážně na okrasných rostlinách žlutavé, později červenohnědé skvrny a ostře ohraničené nervy listů.

Osní, listové, květní a semenné hálky, na těchto částech rostlin se v důsledku napadení hád'átkem především rodu *Anquina* vytváří několikamilimetrové tvrdé vrásčité hálky, např. *A. graminis*, *A. graminophila*, *A. tritici* (Vlk, 1985).

3.3.7 Vnější ekologické faktory

Populace hád'átek jsou ovlivněné mnoha ekologickými faktory, nejen diverzitou rostlinných druhů. Nejdůležitějšími z nich jsou klima a povětrnostní podmínky, fyzikální podmínky jako je půdní druh a struktura půdy, stav půdního edafonu a rostlin. Dále bylo zjištěno, že hrají roli i chemické faktory jako je pH. Tyto faktory působí na hád'átka vždy současně, a tedy jejich vliv je značně variabilní. Byla zjištěna větší hustota hád'átek, ale menší

diverzita v intenzivně obhospodařovaných agroekosystémech, než v přírodním ekosystému (Moreira *et al.*, 2006).

3.3.7.1 Vliv klimatu a povětrnostních podmínek

Vlhkost a teplota je zásadní pro vývoj a aktivitu háďátek. Působí na ně spíše prostřednictvím půdy a rostlin. Mnohé druhy vyžadují vyšší teplotu, s čímž souvisí jejich oblast výskytu. Tropické a subtropické druhy jsou např. *Tylenchulus semipenetrans*, *Rotylenchus reniformis*, *Rodopholus similis*, *Rhadinaphelenchus cocophilus*, i některé druhy rodu *Meloidogyne*, které se vyskytují i v mírném pásmu, avšak pouze ve sklenících. Oproti jiným, přizpůsobeným háďátkům na podmínky mírnějšího klimatu, např. *Ditylenchus dipsaci*, *Globodera rostochiensis*, *Heterodera avenae*, *Aphelenchoides fragariae*, *A. ritzemabosi*, *Pratylenchus crenatus*, *P. penetrans*, aj. Pro vývoj i aktivitu organismů existuje teplotní optimum. Pro *Heterodera schachtii* je optimální teplota pro pohyblivost 15 °C, pro líhnutí larev 25 °C a pro rozmnožování 27,5 °C. Příbuznost druhů ovšem není pravidlem pro podobnost nároků na teplotu. Optimální teplotní rozsah pro infekci je např. u *Globodera rostochiensis* 15 – 20 °C, u *Heterodera schachtii* je to 25 – 30 °C. I teplotní optimum se mění podle ostatních ekologických faktorů, třeba podle druhu hostitelské rostliny, např. teplotní optimum pro rozmnožování *Tylenchorhynchus claytoni* je u pšenice 21 – 27 °C, u tabáku až 29 – 35 °C. Limitující teplotní hranice se nazývají horní a spodní práh aktivity, za nimiž dochází k zastavení životních projevů. Např. *Globodera rostochiensis* má spodní práh aktivity mezi 5 – 10 °C, vývoje 11 °C a horní práh vývoje 30 °C. Nejdolnější proti teplotním vlivům jsou vajíčka nebo u některých druhů stádia larvy 2. a 4. stupně. Momentální stav aktivity háďátek ovlivňuje odolnost háďátek proti nepříznivým teplotním podmínkám. Inaktivní jedinci jsou odolnější než ti aktivní. Např. *Ditylenchus dipsaci* přežilo v anabiotickém stavu dvacetiminutové ochlazení až na -80 °C, přičemž aktivní jedinci zahynuli. Odolnost cyst proti nízkým teplotám je ovlivněna také vlhkostí. Suché cysty jsou podstatně odolnější oproti mrazům než ty vlhké (Shurtleff & Averre, 2000; Vlk, 1985).

Mrazy a vysoké teploty působí na populaci háďátek negativně. Rostliny s krátkým životním cyklem přezimují pomocí semen a neposkytují tak háďátkům obživu ani možnost reprodukce. Kde se pěstují takovéto druhy rostlin, populace háďátek klesá. Vyjma těch druhů, které mají následně schopnost vstoupit do stavu dormance jakožto jejich strategie přežití (Shurtleff & Averre, 2000).

3.3.7.2 Půdní faktory

Půda tvoří životní prostředí pro fytoparazitická hád'átka, buď po celou dobu života (ektoparazité) nebo jen v určité fázi vývoje (endoparazité). Její fyzikální vlastnosti ovlivňují do určité míry jejich výskyt a aktivitu. Samotná pohyblivost v půdě je dána velikostí pórů a vodního filmu. Optimální velikost půdních částic pro larvy *Heterodera schachtii* je 150 – 250 μm a pro *Ditylenchus dipsaci* je to 250 – 500 μm . Lehčí půdy jsou příznivější pro výskyt mnoha druhů, vyznačují se větší pórovitostí a lepší aerací. Např. *Meloidogyne hapla*, *Heterodera avenae* i *Globodera rostochiensis* dávají přednost těmto půdám stejně jako mnohé druhy pohyblivých kořenových hád'átek, např. *Pratylenchus penetrans*, *P. crenatus*, *P. zaeae*, *P. vulnus*, *P. brachyurus*. Dále druhy rodů *Tylenchorhynchus*, *Rotylenchus*, *Xiphinema*, *Longidorus* a *Trichodorus*. Těžší půdy jsou, narozdíl od již jmenovaných zástupců, vhodnější pro *Pratylenchus neglectus*, *P. thornei* nebo *P. pratensis* (Vlk, 1985).

3.4 Rod *Ditylenchus* Filipjev 1936

Zástupci rozsáhlého rodu *Ditylenchus* jsou celosvětově rozšířené, rod obsahuje kolem 80 druhů. Většina z nich je mykofágních. Tento rod obsahuje několik druhů s významnou škodlivostí na vyšších rostlinách. Ačkoliv existují určité druhy rostlin (např. *Beta vulgaris*), které mohou být napadeny oběma druhy jak *Ditylenchus dipsaci*, tak *Ditylenchus destructor*, jen stěží lze nalézt tyto dva druhy na stejné rostlině zároveň. Primárně fytoparazitická hád'átka z tohoto rodu jsou kromě dvou výše uvedených druhů také *Ditylenchus africanus* a *Ditylenchus angustus* (Anonym 1, 2015; Douda, 2008).

De Lay a Blaxter (2003) vytvořili nejaktuálnější klasifikační systém kombinující morfologické pozorování, molekulární výsledky a kladistickou analýzu. (De Lay & Blaxter, 2003).

Taxonomické zařazení:

Říše: Animalia

Kmen: Nematoda

Třída: Secernentea

Podtřída: Tylenchia

Řád: Tylenchida
Podřád: Tylenchina
Nadčeleď: Tylenchoidea
Čeleď: Anguinidae
Rod: *Ditylenchus*

Tyto dva významné druhy *Ditylenchus destructor* a *Ditylenchus dipsaci* mají oba následující společné příznaky napadení: zduření, pokroucení, diskolorace, zakrslost nadzemních částí rostlin, nekrózy a hniloba hlíz (Thorne, 1945).

3.4.1 *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936

Poprvé toto háďátko identifikoval Kühn v roce 1857, našel jej ve strboulech štetky soukenické (*Dipsacus sativus*), pojmenoval ho *Anquillula dipsaci*. V dalších letech bylo nalézáno i v jiných hostitelských rostlinách a určeno jako *Tylenchus harvesteinii*, *Tylenchus hyazinthi*, *Tylenchus alii*, aj. (Douda, 2008).

Tento druh má ekonomický vliv celosvětově a je široce rozšířen hlavně v mírném pásmu. *D. dipsaci* napadá přes 400 druhů rostlin, včetně mnoha plevelných. Mnoho plevelů a rostlin z čeledi *Poaceae* hraje důležitou roli v boji o přežití těchto háďátek během absence hostitelských polních plodin. Morfologické, biochemické, molekulární a karyologické analýzy odlišných populací tohoto druhu potvrdily, že se jedná o více než třicet bioras, některé z nich však mají omezený hostitelský okruh, mohou preferovat pouze skupinu nebo pouze jednotlivý druh. K jejich identifikaci však nestačí morfologická diagnostika, zde se uplatňují molekulárně biologické metody identifikace (Anonym 1, 2015; Tseng, 1966).

3.4.1.1 Výskyt

D. dipsaci se vyskytuje v mírném pásmu – Evropa a část Středomoří, Severní a Jižní Amerika, severní a jižní Afrika, Asie, Oceánie. Nejspíše tento duh není schopný setrvat v tropických oblastech vyjma vyšších nadmořských oblastí, kde je klima mírnější. Ve většině zemí jsou stanovena ochranná karanténní opatření k zabránění rozšíření tohoto druhu (Greco *et al.*, 1991).

3.4.1.2 Biologie

D. dipsaci je migratorní endoparazit. Do rostlin vstupuje skrze průduchy. Tento druh se živí parenchymatickým pletivem stonků, hlíz, oddenků, květů a porušuje střední lamely buněčné stěny. Snadno přečká desikaci a může být izolován i z úplně vyschlého rostlinného materiálu po navlhčení, rezistentní stádium je čtvrtý juvenilní stupeň. Samičky kladou 200 – 500 vajíček. Invazi háďátek podporuje vlhko a teploty 15 – 20 °C. Sucho a teploty pod 10 °C a nad 22 °C nepříznivě ovlivňují tato háďátka. Během těchto nevhodných podmínek jsou schopny přežít v semenech a hlízách. Může tak být pasivně rozšiřován pomocí těchto propagativních rostlinných orgánů na velké vzdálenosti. V mírném pásmu populace a s ní i způsobené škody vzrůstají na podzim a drasticky klesají v zimním období. Vývojová stádia, převážně larvy 4. stupně, přežívají na suchých rostlinných zbytcích i 20 let (Greco *et al.*, 1991; Anonym 2, 2008).

3.4.1.3 Morfologie

Štíhlé tělo háďátka *Ditylenchus dipsaci* je dlouhé 1,0 – 1,6 mm a široké 40 – 60 µm, v klidu téměř přímo rovné. Stylet je tenký, na bázi rozšířený a měří 9 – 13 µm. V porovnání s tělem je velmi krátký. Přední část jícnu je válcovitá, přechod na střední bulbus je zúžený. Úzký istmus obklopuje nervový prstenec. Kyjovitý terminální bulbus navazuje na začátek střeva. Pohlavní ústrojí je u samiček monodelfické. Vaječník pak přiléhá k terminálnímu bulbu koncovou částí. Uspořádání vajíček je jedno- či dvouřadé. Spermatéka se skládá z prodlouženého vaku z 16 buněk. Vulva je v poslední pětině délky těla. Přítomný postvulvální váček je v úrovni poloviční vzdálenosti od vulvy k řitnímu otvoru (*anus*). Koncovou část těla tvoří ostrá špička. Pářící plachetka sameček (*bursa copulatrix*) je leptoderní a začíná před pářící jehlicí. Dosahuje do ¾ délky ocasu. Pářící jehlice je krátká a silná. Vajíčka jsou oválná, rozměrově 70 – 100 µm x 30 – 40 µm. Larvy měří po opuštění vaječného obalu zhruba 300 µm. Morfometrické hodnoty závisí na stáří a druhu hostitele (Douda, 2008).

3.4.1.4 Hostitelský okruh

Škodí převážně na zelenině (česnek, cibule, mrkev), cukrové řepě, vojtěšce, hrachu a z obilovin na žitu, ovsu a kukuřici. Napadá často okrasné cibuloviny jako *Narcissus spp.*, *Hyacinthus orientalis*, *Allium spp.*, *Tulipa spp.*, *Phlox drumondii*, *P. paniculata* nebo *Hydrangea spp.* (Anonym 2, 2008; Douda, 2008).

3.4.1.5 Symptomy

Deformace a zduřelé listy a hlízy jsou nejběžnějšími příznaky vyvolané *D. dipsaci* na hlízotvorných rostlinách. V pozdním infekčním stádiu mohou rostliny hynout nebo je na nich patrná hniloba způsobená sekundárním napadením bakteriemi nebo houbovými patogeny. Jahodníky mají zkrácené květní stopky a mírně deformované květy a plody. U luskovin, jako např. hrách, způsobují háďátka nekrózy bazí lodyh, deformace listů a lusků. U vojtěšky způsobují deformace a chlorózy, zduření a ztrátu listů. Háďátka přežívají v semenech a v uschlých listech (Greco *et al.*, 1991).

3.4.1.6 Ochranná opatření

Dlouhá doba, po kterou háďátka přežívají na zamořených pozemcích v anabiotickém stavu je další komplikací pro ochranu před tímto druhem. Nejúčinnější ochranná opatření zahrnují použití rezistentních odrůd a střídání plodin. Je nezbytné, aby se dodržoval dostatečný odstup v pěstování jednotlivých plodin a zamezilo se tak dalšímu rozmnožení (Esquibet *et al.*, 2003; Douda, 2008).

3.4.2 *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945

Ditylenchus destructor napadá asi 70 druhů hostitelských rostlin a téměř stejný počet druhů hub. Před tím, než byl *D. destructor* popsán v roce 1945 jako nový samostatný druh, byl považován za rasu *D. dipsaci*. Háďátko se vyskytuje zejména v mírném pásmu, ale i v teplejších oblastech. Český název pro tento druh je háďátko hlízové (Douda, 2008; Chitambar, 2016).

3.4.2.1 Výskyt

Tento druh je rozšířen dle poznatků na všech kontinentech, převážně v mírném podnebí. *D. destructor* je téměř všudypřítomný v Evropě a Severní Americe. V Jižní Americe byl potvrzen pouze v Ekvádoru, v Africe v Jihoafrické republice. Dále v Austrálii, na Novém Zélandu a ve většině států Asie – od Japonska, Číny a Malajsie po Saudskou Arábii, Irák a Turecko (Chitambar, 2016; Anonym 4, 2017).

3.4.2.2 Biologie

Ditylenchus destructor má pět vývojových stupňů, vajíčko, čtyři larvální stádia a dospělec. Na rozdíl od svého blízkého příbuzného háďátka *D. dipsaci* není schopný odolávat nadměrnému suchu a z tohoto důvodu je jeho význam značný spíše ve vlhčích a studenějších půdách. Mimo odolné klidové stádium je schopný přezimovat v půdě pouze jako dospělec nebo larva a žít se na alternativních hostitelích a na myceliu hub. Nebo mohou přezimovat vajíčka, ze kterých se na jaře líhnou larvy a ty následně napadnou hostitele. V Jižní Africe bylo zjištěno, že optimální teplota pro líhnutí vajíček byla 28 °C (De Waele & Wilken, 1990). To je ale považováno za přizpůsobení druhu k různým klimatickým podmínkám, a předpokládá se, že požadavky na teplotu jsou v Evropě mnohem nižší. Vývoj z vajíčka do dospělého se pohybuje mezi 6 a 7 dny. Háďátka napadají podzemní i nadzemní části rostlin. Vstupují přes lenticely do hlíz brambor, a pak se začnou množit a napadat celé hlízy. Mohou i nadále žít a rozvíjet se prostřednictvím sklizených hlíz (Anonym 4, 2017).

3.4.2.3 Morfologie

Dospělci *D. destructor* jsou štíhlého červovitého tvaru těla, 0,8 – 1,4 mm na délku a 23 – 47 μm v průměru. Tělo je po usmrcení prohnuté na ventrální straně. Příčné kutikulární rýhy jsou od sebe vzdálené 1 μm. Boční pole je uprostřed šestkrát podélně rýhované. Tento počet se směrem k oběma koncům snižuje na pouhé dvě rýhy. Oblast pysků je nízká a plochá, jeví se hladká. Stylet je dlouhý 10 – 14 μm. Jícen žláznatého bulbu překrývá střevo zhruba v polovině délky těla. Vulva je jasně patrná, vaječník je prodloužený směrem dopředu. Může dosahovat do oblasti jícnu. Oocyty jsou v horní části uspořádány dvouřadě, směrem k děloze pouze v jedné řadě. Postvulvální váček dosahuje do $\frac{3}{4}$ vzdálenosti k řitnímu otvoru. Zadní

část dělohy je rudimentem a nebyla zjištěna funkce spermatéky. Spermatozoidy obvykle stoupají v děloze nahoru. Ocas je kuželovitého tvaru, mírně prohnutý na ventrální straně. Jeho délka je 3 – 5 krát větší než šířka těla u řitního otvoru, zakončení ocasu je mírně kulaté. Phasmidy nejsou pozorovatelné. Exkrece se nachází u spojení jícnu se střevem. U samce je přední část těla podobná samici. Ocas může být užší na konci zakulacený. Pářící plachetka dosahuje od předního konce pářící jehlice zhruba do $\frac{3}{4}$ délky ocasu. Pářící jehlice jsou ventrálně zahnuté, dopředu protažené a gubernákulum je krátké (Douda, 2008).

3.4.2.4 Hostitelský okruh

D. destructor napadá podzemní části rostlin, ale může se objevit i na nadzemních. Není schopný přežít nadměrné sucho. Hostitelský okruh zahrnuje více než 100 druhů rostlin z široké škály čeledí. Napadá hlavně ekonomicky významné plodiny *Solanum tuberosum*, *Trifolium spp.*, *Ipomea batatas*, *Humulus lupulus*, *Beta vulgaris*, *Petroselinum crispum*, *Daucus carota*, *Allium sativum*. Dále okrasné rostliny *Iris spp.*, *Tulipa spp.*, *Dahlia spp.*, *Gladiolus spp.*, z plevelů např. *Cirsium arvense*, *Mentha arvensis*, *Stachys palustris*. *D. destructor* je schopný se rozmnožovat i na houbových organismech. Je zaznamenáno dalších 70 druhů plodin, plevelů a podobný počet houbových druhů jako hostitelů (Anonym 1, 2015; Anonym 4, 2017).

3.4.2.5 Symptomy

Největší ztráty způsobuje toto hád'átko na porostech brambor. Na bramborách nebývají zjevné příznaky v nadzemních částech rostlin. Silně napadené hlízy obvykle vytvoří slabé rostliny, které obvykle hynou. Časné infekce mohou být rozpoznány loupáním hlíz, které mohou odhalit bílé skvrny jinak zdravé dužiny. Ty se později zvětší, ztmavnou a jsou zvlněné textury. Zasažené hlízy jsou propadlé, typicky popraskané s vrásčitým povrchem. Dužina je suchého a moučného vzhledu, různé barvy od šedavé až tmavě hnědé po černou. Toto zbarvení je způsobeno sekundárním napadením plísní, bakterií a volně žijících hád'átek. Na rozdíl od epitelu brambor napadených *D. dipsaci*, hlízy nejsou popraskané a hniloba tmavne směrem dovnitř hlízy. Tyto příznaky jsou více zřejmé na listech, které jsou zkrácené a zdeformované (Anonym 4, 2017).

3.4.2.6 Ochranná opatření

Jednou přítomné háďátko *Ditylenchus destructor* je téměř nemožné zlikvidovat, jelikož přežívá na dalších druzích hostitelských rostlin a půdních hub. Doporučení k omezení rozšíření a jeho redukci je vyhnout se přemístěním potencionálně infikovaných rostlinných zbytků a půdy zemědělskou mechanizací. Ošetření půdně aplikovanými nematocidy mohou zajistit vysokou úroveň regulace, avšak nevýhodou je vysoká pořizovací cena. Granulované nematocidy jako je karbofuran zaznamenaly efektivitu proti háďátkům (Anonym 5, 2013).

3.5 Cystotvorná háďátka

3.5.1 Morfologie a vývoj

Samičky těchto druhů mají tvar cyst hruškovitý až kulovitý. Zadní konec je zaoblený (rod *Globodera*) nebo citronovitý (rod *Heterodera*). Cysty jsou velké 0,2 – 1 mm, různého zabarvení podle druhu a stáří. Mají taktéž různou strukturu, od tečkované po vlnkovanou či zubatou. Uvnitř se nachází vajíčka, jež jsou podélně oválná. Nejmenší velikost mají vajíčka u *Heterodera humuli* a *H. cruciferae*, největší jsou vajíčka druhu *H. avenae* a *H. punctata*. Zpočátku je jejich obsah zrnitý a až postupně se vytváří larvální stádia. Embryonální vývoj probíhá v prvním larválním stádiu. Ve druhém stádiu larvy přezimují a poté jsou infekční a schopné napadat rostliny, mají hadovitý tvar, silný stilet a špičatý ocas. Do kořenů rostlin pronikají v růstové zóně. Nejspíše působením jejich slinných výměšků vznikají v bezprostřední blízkosti sání tzv. obří buňky. V metabolismu buněk neustává dělení jádra a jadérka a produkce nukleových a aminových kyselin. Tak poskytují parazitickým háďátkům neustálý příjem živin z rostliny. Buňky jsou stimulovány právě slinnými výměškami, a pokud se jejich produkce exkretů zastaví, tyto buňky hynou (Decker, 1989).

Larvy druhého stádia se po vniknutí do rostliny svlékají po zhruba 10 dnech. Ve třetím larválním stádiu zduří a jsou už patrné rodové znaky. Během několika dní se opět svlékají a stanou se z nich larvy 4. stádia. Samičí larvy nadále zduřují, kdežto samčí nabývají hadovitý tvar, avšak jsou uzavřeny v larvální pokožce a v jejím obalu jsou všelijak stočeny. Kopulační orgány samečků jsou funkční a po několika dnech opouští kořeny rostlin. Dospělci jsou dlouzí 1 – 1,5 mm s tupě zakončeným ocasem. Pářící jehlice je umístěna u ocasu a pářící plachetka není vyvinuta. Samečci hynou brzy po kopulaci. Některé druhy, např. *Heterodera trifolii*, se množí partenogeneticky a tedy význam i výskyt samců v populaci je ojedinělý. Samičky

těchto rodů se vyvíjejí déle než samci. Ve čtvrtém stádiu nabývají svou finální podobu. Jejich tělo zduří a narušují pokožku kořínků, v nichž jsou zachyceny jenom hlavovou částí. Jsou bílé barvy a zhruba měsíc po oplození se v nich vytváří vajíčka. Některé druhy samic vytváří na konci těla vaječný rosolovitý vak, do nichž kladou částečné množství vajíček, např. *Heterodera humuli*, *H. schachtii*. Když se všechna vajíčka vytvoří, začne se z těla samičky tvořit hnědá odolná a pevná cysta (Ferris & Bongers, 1999; Vlk, 1985).

3.5.2 Rod *Heterodera* Schmidt 1871

Tento rod zahrnuje přisedlá endoparazitická kořenová hád'átka, které vytvářejí cysty citronovitého tvaru. Významné druhy jsou *Heterodera avenae*, *H. carotae*, *H. cruciferae*, *H. glycines*, *H. goettingiana*, *H. humuli*, *H. schachtii*, *H. trifolii*. Do roku 2010 bylo popsáno přes 90 druhů v rámci rodu *Heterodera*, z nichž je 80 považováno za uznané. V České republice byly do roku 2012 publikovány nálezy jen 4 druhů (*H. avenae* Wollenweber, 1924, *H. humuli* Filipjev, 1934, *H. latipons* Franklin, 1969 a *H. schachtii* Schmidt, 1871) (Čermák & Gaar, 2013).

Taxonomické zařazení:

Říše: Animalia

Kmen: Nematoda

Třída: Secernentea

Podtřída: Tylenchia

Řád: Tylenchida

Podřád: Tylenchina

Nadčeleď: Tylenchoidea

Čeleď: Heteroderidae

Rod: *Heterodera*

3.5.3 *Heterodera humuli* Filipjev, 1934

3.5.3.1 Výskyt

Poprvé tento druh popsal Voigt (1894), hád'átka chmelové objevil na chmelu v oblasti Kent v Anglii a později ho pojmenoval Filipjev (1934). V Americe byl zjištěn v roce 1962

v Oregonu a Washingtonu, významné pěstitelské oblasti chmele ve Spojených státech (Sen, 1968). Cystotvorná hád'átka se vyskytují na většině produkčních ploch. Jsou považována za nejdůležitější fytoparazitická hád'átka na chmelu (Warner *et al.*, 2013).

Tento druh se vyskytuje ve všech produkčních chmelařských oblastech po celém světě. Byl nalezen v Britské Kolumbii v Kanadě, Washingtonu, Idahu a Oregonu v USA, dále v Evropě např. Belgie, Itálie, Bulharsko, Německo, bývalá Jugoslávie, Švýcarsko, jižní Anglie, Holandsko, Řecko. V Asii Indie, Rusko, ale i Austrálii a na Novém Zélandu (Mulvey & Golden, 1983).

3.5.3.2 Biologie

První bílé samičky se objevují v červnu, avšak mohou se objevovat až do podzimu. Po vyhřeznutí z kořínku je samička bílá a později světle hnědá. Hnědnutí cyst začíná koncem července. Běžně se u tohoto druhu cyst vyskytuje rosolovitý vaječný vak, do něhož kladou samičky vajíčka. Produkce vajíček je 2 – 55 ks. V laboratorních podmínkách však tento počet dosahuje až 230 vajíček. Larvy se uvolňují a líhnou převážně v dubnu a květnu. V červnu postupně jejich uvolňování klesá, ale přetrvává po další měsíce. *Heterodera humuli* má jednu generaci do roka. Někdy se však za příznivých podmínek může objevit i druhá nebo třetí generace v pozdním létě či na podzim. V řízených podmínkách, kdy teplota dosahovala okolo 20 °C 16 hodin denně, se životní cyklus každé generace vyvíjel po dobu okolo 6 týdnů. Líhnutí larev nejvíc prospívá právě teplota okolo 20 °C. Ve vlhké půdě druhé larvální stádium přežilo přes 44 dní a bylo stále schopné napadnout kořeny a rozmnožit se. Není jisté, jak dlouho vajíčka zůstanou životaschopná, ale je známo, že pouze kořenové difuzáty *Humulus lupulus* jsou schopné stimulovat líhnutí larev (Von Mende & McNama, 1995). Tento druh preferuje těžší půdy. Vyskytuje se nejčastěji ve svrchních 15 cm půdního profilu. Optimální teplota pro vývoj v kořenech rostlin je 15°C. Zamoření kořenů chmele hád'átkem chmelovým vede k poklesu výnosu až o 50 % a ke zhoršení jeho kvality. Výnosové ztráty závisí na jejich populační hustotě na jaře i na fázi růstu rostlin (Sen, 1968; Gus'kova, 2016; Vlk, 1985).

3.5.3.3 Morfologie

Samečci tohoto druhu jsou červovitého tvaru, dlouzí asi 1 mm a mají poměrně dlouhý ústní bodec (27 – 31µm). Cysta dospělých samiček má citronovitý tvar o délce 0,4 – 0,6 mm.

Vajíčka jsou oválná, jejich délka je dvakrát větší než šířka, 92 x 42 µm. Larvy druhého vývojového stupně jsou asi 410 µm dlouhé, červovité (Sen, 1968).

3.5.3.4 Hostitelský okruh

Hád'átka chmelové napadá kromě chmelu také další rostliny z čeledi *Cannabaceae* a *Urticaceae*. Z pěstovaných plodin je to konopí (*Cannabis sativa*) a z plevelných např. kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) a k. žahavka (*Urtica urens*). Pouze difuzáty chmele podporují líhnutí larev (Sen, 1968).

3.5.3.5 Symptomy

Poškození hád'átky se nejvíce projevuje na růstu mladých rostlin. Jiné faktory jako je sucho a horko mohou podpořit projev symptomů poškození těmito parazity. Typické příznaky se na chmelu projevují ohniskovým žloutnutím listů a ochablým růstem. Rostliny jsou zakrslé oslabené a mají zkrácený nárůst šlahounů. Lodyhy ztrácí schopnost ovíjet se, jsou pokřivené a listy jsou kopřivovité. Další autoři uvádí, že *Heterodera humuli* je příčinou blednutí listů chmele podobné tomu, který způsobuje deficit draslíku. Oproti tomu jiní uvádějí, že nezaznamenali při zamoření půdy 342 cystami na 100 g půdy či 500 cyst na 100 cm³ žádné patrné příznaky (Vlk, 1985).

3.5.3.6 Ochrana opatření

Hád'átka chmelové bylo zjištěno v hojnějším množství hlavně ve starších chmelnicích, proto je důležité při zakládání chmelnic nových dbát na jeho rozšíření. Používání chmelové sádky pouze ze školek na pozemky nezamořených chmelnic je zásadní (Vlk, 1985).

3.6 Diagnostické metody

3.6.1 Morfologická diagnostika

3.6.1.1 Hád'átka *Ditylenchus spp.*

Morfometrická diagnostika hád'átek pomocí optického mikroskopu využívá parametry různých částí těla a jejich rozměrů. Okulár s vyznačeným měřítkem se používá k měření rovných úseků. Zde nastává problém, pokud se hád'átka po usmrcení zkroutí (Hooper & Cowland, 1986). V poslední době se v této oblasti používá měření digitální analýzou obrazu a naměřené hodnoty se dosazují do vzorců. Tak se vypočítávají nematologické indexy, nazývány de Manovy. Tato metoda však není stoprocentní, jelikož nemusí být objektivní a jednotlivé naměřené hodnoty se překrývají. Dále může být tento typ diagnostiky komplikován kvůli vnitrodruhové variabilitě (Douda, 2008).

Rozdíly mezi *D. dipsaci* a *D. destructor* nejsou příliš velké, ale jsou zde i znaky, které se u těchto dvou druhů liší. Celková průměrná délka těla dospělců u *D. destructor* je menší než u *D. dipsaci*. Dalším rozdílným znakem je šikmé překrytí počáteční části střeva laloky jícnových žláz neboli tvar terminálního bulbu, odlišná struktura a délka vaječníku obsahující oocyty, velikost vajíček, délka postvulválního váčku a počet podélných rýh v postranním poli. U *D. destructor* prezimují vajíčka. Dále u hád'átka zhooubného neexistují rasy a celkový počet hostitelů je rozdílný (Anonym 4, 2017; Douda, 2008).

Pro diagnostiku hád'átek rodu *Ditylenchus* se používá měření následujících rozměrů:

- L (celková délka těla)
- největší šířka těla
- délka styletu o délka jícnu o vzdálenost od přední části jícnu ke středu středního bulbu
- délka ocasu
- šířka těla u řitního otvoru
- délka pářící jehlice
- vzdálenost od vulvy po řitní otvor
- vzdálenost od předního konce těla k vulvě

Naměřené rozměry jsou používány k výpočtu následujících nematologických indexů:

- a (celková délka těla/největší šířka těla)
- b (celková délka těla/délka jícnu)
- c (celková délka těla/délka ocasu)
- c' (délka ocasu/šířka těla u řitního otvoru)
- MB (vzdálenost od přední části jícnu ke středu středního bulbu/délka jícnu)*100
- VA/T (poměr vzdálenosti od vulvy po řitní otvor a délky ocasu)
- V (vzdálenost od předního konce těla k vulvě vyjádřená v % délky těla)
- V' (vzdálenost od předního konce těla k vulvě vyjádřená v % vzdálenosti od předního konce těla k řitnímu otvoru)

<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Brzeski (1998)	Thorne (1945)		Blake (1962)	
	♀	♀	♂	♀	♂
délka ocasu	71 - 108	-	65 - 72	-	72
délka pářící jehlice	22 - 28	-	-	-	-
délka jícnu	105 - 228	-	-	-	-
délka styletu	10 - 13	-	-	-	-
A	36 - 64	36 - 40	37 - 41	56 - 68	52 - 74
B	6,5 - 12	6,5 - 7,1	6,5 - 7,3	14 - 16	13 - 16
C	11 - 20	14 - 18	12 - 15	12 - 16	12 - 16
c'	36 - 64	-	-	-	-
MB	35 - 43	-	-	-	-
V	76 - 86	-	-	-	-
V'	84 - 90	-	-	-	-
VA/T	1,3 - 2,1	-	-	-	-

Tab. č.1: Morfometrické údaje *Ditylenchus dipsaci* (v µm) (Douda, 2008).

<i>Ditylenchus dipsaci</i>	Brzeski (1998)	Thorne (1945)		Blake (1962)	
	♀	♀	♂	♀	♂
L	690 - 1890	1000 - 1300	1000 - 1300	1291 - 1309	1283 - 1317
délka ocasu	62 - 89	-	65 - 72	-	72
délka pářící jehlice	24 - 28	-	-	-	-
délka jícnu	134 - 164	-	-	-	-
délka styletu	10 - 14	-	-	-	-
A	18 - 49	30 - 35	34 - 40	18 - 49	24 - 50
B	4 - 12	8 - 10	7 - 8	4 - 12	4 - 11

C	9 - 30	15 - 20	12 - 16	9 - 30	11 - 21
c'	3 - 5	-	-	-	-
V	73 - 84	-	-	-	-
V'	83 - 89	-	-	-	-
VA/T	1,5 - 1,6	-	-	-	-

Tab. č.2: Morfometrické údaje *Ditylenchus destructor* (v μm) (Douda, 2008).

3.6.1.2 Cystotvorná háďátka

	<i>H. vallicola</i>	<i>H. riparia</i>	<i>H. humuli</i>
L	383+-20	373+-2,1	375+-4,7
A	20+-1,4	21+-0,1	21+-0,2
B	3,5+-0,1	3,3+-0,03	3,5+-0,1
C	7,5+-1,7	8+-0,1	7,5+-0,1
délka styletu	25+-0,5	22+-0,1	23+-0,1
šířka ve středu těla	20+-1,5	18+-0,1	18+-0,2
šířka u řitního otvoru	12+-0,6	11+-10,1	12+-0,1
délka ocasu	49+-4,7	47+-0,4	50+-0,6

Tab. č. 3: Morfometrické údaje k J2 (v μm) (Eroshenko *et al.*, 2001).

	<i>H. vallicola</i>	<i>H. riparia</i>	<i>H. humuli</i>
Délka	468+-38	462+-7,9	515+-15,3
Šířka	419+-49	327+-5	367+-11,4
Délka/šířka	1,1+-0,08	1,4+-0,03	1,4+-0,02
fenestrální délka	46+-6,9	46+-0,8	58+-1,5
Střední semifenestrální šířka	21+-3,9	26+-0,7	25,9+-0,5
délka vulvální štěrbin	31+-3,6	34+-0,6	36,2+-0,5
šířka vulválního mostku	11+-1,1	11+-0,9	12+-0,5
délka pod mostkem	-	78+-2,3	88+-2,1
vzdálenost vulva-řitní otvor	53+-7,8	47+-1,4	46+-1,1

Tab. č. 4: Pohlavní determinace jednotlivých druhů cyst *Heterodera* (v μm) (Eroshenko *et al.*, 2001).

3.6.2 Molekulárně biologické metody

3.6.2.1 Extrakce DNA

PCR je relativně jednoduchá a dostupná metoda, která se používá každodenně k diagnózám nemocí, identifikaci organismů, v kriminalistice, k detekci specifických genů v jednotlivých buňkách, ale také k vyhledávání specifických mikroorganismů a fylogenetických skupin vzorků z přirozeného prostředí i v dalších odvětvích.

Základním předpokladem aplikace molekulárně biologických metod je získání dostatečného množství biologického materiálu izolací DNA ze zkoumaného vzorku. Pro zvýšení výnosu DNA jsou používány některé fyzické nástroje, jako je mechanické rozdrcení biologického materiálu nebo chemicky pomocí detergentů a lysozymů, uvolnit a oddělit ji z nadmolekulárních struktur. Během procesu se při centrifugaci oddělí spodní organická fáze (tvořená směsí fenolu s chloroformem), mezifáze, která je tvořená denaturovanými proteiny, a svrchní fáze, v níž jsou právě rozpuštěné nukleové kyseliny, proto se tedy odebírá jenom svrchní vrstva. Pomocí isopropanolu či etanolu se vysrážejí nukleové kyseliny (Block *et al.*, 1997; Donn *et al.*, 2008; Rosypal, 2000; Skantal & Carta, 2005).

3.6.2.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

Důležitým krokem po vyizolování DNA je orientační spektrofotometrické stanovení její koncentrace, případně dalších příměsí a zjištění kvality – celistvosti pomocí gelové elektroforézy na 1 % agarózovém gelu. Absorbance DNA se měří při vlnových délkách 260 - 280 nm. Zkoumané vzorky DNA se proměřují na přístroji SpectroPhotometer, který umožňuje stanovit koncentraci v ng/μl. Z poměru hodnot A260/A280 se stanoví čistota DNA. Poměr absorbancí čisté DNA se pohybuje v rozmezí 1,7 – 2,0. Obsahuje-li vzorek proteiny nebo reagentie, jako je např. fenol, je hodnota A260/A280 < 1,7, v případě obsahu RNA je poměr A260/A280 ≥ 2,0 (Dubernet *et al.*, 2002).

3.6.2.3 Amplifikační techniky

Cílová DNA bývá často ve vzorcích přítomna v tak nízkých koncentracích, že ji nelze při diagnostice organismů detekovat. Proto je nezbytné zvýšit analytickou sensitivitu její

mnohonásobnou replikací. PCR (Polymerase Chain Reaction) neboli polymerázová řetězová reakce je metoda, kterou se v *in vitro* podmínkách amplifikují specifické vybrané sekvence DNA. Tato metoda byla teoreticky popsána už roku 1971, ale K. Mullis byl první, kdo ji dokázal roku 1983 zrealizovat. A v roce 1993 za tento objev získal Nobelovu cenu za chemii. Význam této reakce spočívá v exponenciálním nárůstu cílového fragmentu díky replikaci pouze označeného fragmentu DNA v jednotlivých cyklech, tudíž ve finálním kroku bude reakční směs obsahovat téměř pouze požadovaný úsek DNA. Využívá annealingu oligonukleotidových primerů s navzájem protilehlou orientací, typické pro daný organismus či skupinu organismů. Dále se za určitých podmínek replikují, tedy komplemetují jednotlivé nukleotidy podle matrice a následně hybridizují s řetězcem DNA (Burlage *et al.*, 1998; Křemen a kol., 1998; Erlich, 1989; Miffin *et al.*, 1994; Šmarda, 2005; Shibata *et al.*, 1994).

V počátečních pokusech se využívala DNA polymeráza bakterie *Escherichia coli*, která však není teplotně rezistentní a při každém cyklu muselo dojít k jejímu doplňování do reakční směsi. Tento problém byl vyřešený roku 1988, kdy byla DNA polymeráza bakterie *E. colin* nahrazena DNA polymerázou bakterie *Thermus aquaticus*, která se vyskytuje v horkých pramenech Yellowstonekého národního parku a je rezistentní vůči vysokým teplotám (King *et al.*, 2006).

3.6.2.4 Elektroforéza

Elektroforéza je nutná k vizualizaci replikovaných řetězců nukleových kyselin. Další možností je chromatografická metoda, která však není tak častá. Gely jsou nejpoužívanější nosiče tzv. nosičové elektroforézy, které se používají k minimalizaci vlivu volné difúze relativně pevné látky, avšak nezabraňují elektromigraci dělených částic.

Nejdříve se produkty PCR separují ve stejnosměrném elektrickém poli. Výhoda agarózové elektroforézy spočívá ve snadné přípravě, je vhodná pro separaci fragmentů o délce stovky bází. Koncentrace agarózového gelu se pohybuje v rozmezí 0,5 – 3 %. Provádí se při nízkém napětí, jelikož mobilita DNA je přímo úměrná aplikovanému napětí. Průběh pohyblivosti fragmentů je rozeznatelný podle pohyblivosti přidaných barviv, např. ethidium bromid, který je však mutagenní, mimochodem způsobuje pomalejší mobilitu NA až o 15 %. EB se váže mezi báze nukleových kyselin a takto označená NA vystavená záření o vlnové délce 260 nm vyzařuje EB oranžovočervené záření v oblasti viditelného světla 560 nm. Lze použít i jiné způsoby barvení, např. Syber Green, který je až 10x citlivější než ethidium bromid (Chrambach *et al.*, 1987; Tizard, 1996).

3.6.2.5 Sekvence DNA

První sekvenaci DNA provedl Ray Wu v roce 1970 na Cornellské univerzitě. Byla to sekvence okrajových míst genomu lambda fága a byla složená jenom z dvanácti neukleotidů. Převrat zaznamenal tento obor v roce 1974, kdy tým vědců pod vedením Fredericka Sangera vyvinul originální sekvenační metodu, v témže roce navíc byla vyvinuta další metoda nezávisle na této Sangerově. Autory byli Allan Maxam a Walter Gilbert, po nichž se nazývá. O významu těchto vědeckých prací svědčí udělení Nobelovy ceny za tento objev roku 1980. Dnes se však více používá Sangerova metoda pro své praktické využití (King *et al.*, 2006).

Použitá metoda sekvenování službou firmy Biotech GATC byla Sangerova dideoxyterminační metoda. Sekvenování DNA je proces, který zjišťuje pořadí nukleotidových bází DNA vlákna. Zahrnuje syntézu nových komplementárních vláken k jednovláknové templátové DNA. Tato metoda se také nazývá dideoxy nebo enzymová sekvence. Detekuje se při ní ukončení prodlužujícího se vlákna DNA pomocí ddNTP (Perry & Moens, 2006; Roberts, 1993).

3.6.2.7 Bioinformatické zpracování získaných sekvenačních dat

BLAST je zkratka programu Basic Local Alignment Search Tool. Je schopný zjistit a vyhledat sekvenční podobnost, kterou porovnává mezi určitým nukleotidovým úsekem osekvenované části DNA z laboratoře a databází. Vypočítává statistickou významnost shod. BLAST může být použitý k odvození funkčních a evolučních vztahů mezi sekvencemi, stejně jako může pomoci identifikovat členy genové rodiny. Tento program je dostupný on-line na adrese: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Roku 1990 byl publikován v Journal of Molecular Biology v USA (Anonym 8, 2017).

3.7 Chmel

3.7.1 Původ chmele v Evropě

Chmel mohl být introdukovan do centrální Evropy migrujícím obyvatelstvem z východu nebo pouhou kultivací přirozeně se vyskytujícího divokého chmele.

V roce 2006 byl publikován vědecký článek o molekulární fylogenezi divokého chmele *Humulus lupulus*. Byly analyzovány vzorky chmele sesbírané z celé severní polokoule, byla zhodnocena genetická diverzita a geografické rozšíření haplotypů. Skupina vědců zkoumala evoluci a fylogenezi chmele. Výsledky ukázaly, že primární rozdělení na evropský a asijsko-severoamerický typ se odehrálo někdy před necelým milionem let. Avšak východní hranice pro výskyt v původním areálu evropského jaderného haplotypu nebyla objasněna kvůli nejasnému původu chmele pěstovaného v areálu severní Číny. Skupina evropského chmele ukázala široké geografické rozšíření napříč Eurásií od oblasti Altaj až po Portugalsko. Nízká genetická variace této skupiny dokládá teprve nedávnou rapidní expanzi. Severoamerická skupina chmele prokazuje vysokou diverzitu a předpokládá se, že zahrnuje chmel, který migroval z Asie. Japonský a čínský chmel byl identifikován jako geneticky vzdálený. Komerčně produkční kultivary se pěstují buď z evropské větve, nebo jsou vyšlechtěny z té severoamerické (Murakami *et al.*, 2006).

3.7.2 Chmel otáčivý (*Humulus lupulus*)

Chmel neboli *Humulus lupulus* je odvozen z latinského *humus* neboli půda a *lupus* znamená vlk, nejspíše kvůli svému bujnému růstu divoce rostoucího chmele v přírodních podmínkách.

Chmel je vytrvalá dvoudomá pravotočivá liánovitá rostlina. Pěstuje se pro své šišky, na chmelnicích tedy najdeme pouze samičí pohlaví. Systematické zařazení se v literatuře liší, převládá však názor, že patří do čeledi konopovitých *Cannabinaceae* (Basařová a kol., 2010). Na jednom pozemku se pěstuje až 20 let i více, avšak po 15. roku stáří rostlin začíná výnos klesat, a proto je důležité z hlediska ekonomického porost chmelnic obnovovat. Chmel dodává pivu hořkost, chuť a konzervační vlastnosti, pro které se prvotně začal do piva přidávat. Dnešní podoba tohoto nápoje se poprvé objevila již ve starověké Mezopotámii a Egyptě (Behre, 1999). Rod *Humulus* se sestává ze tří druhů, *Humulus lupulus*, *H. japonicus* a *H. scandens*. Areál pěstování chmele otáčivého (*Humulus lupulus*) se rozprostírá převážně v mírném pásmu. Chmel japonský je jednoletá rostlina mající původní areál ve východní Asii a je pěstována pro okrasu (Rybáček, 1980). Small (1978) klasifikoval chmel otáčivý na taxonomické variety, var. *lupulus* pro evropskou větev divokého chmele a jeho kultivarů, var. *cordifolius* pro japonský chmel a var. *neomexicanus*, *pubescens* a *lupuloides* pro severoamerický chmel. Variety se liší v morfologické charakteristice, jako je počet výběžků na listu nebo počet trichomů na výhoncích (Murakami *et al.*, 2006; Small, 1978).

Podzemní část chmelové rostliny se skládá z babky a kořenového systému. Základem babky je „staré dřevo“ nacházející se v hloubce 10 – 25 cm pod povrchem půdy, je dvou a víceleté. Na babce jsou založena očka, ze kterých na jaře raší nadzemní výhony a tvoří základ budoucí lodyhy. Část lodyhy mezi horní částí babky a povrchem půdy je jednoleté „nové dřevo“, to se při řezu každoročně odstraňuje. Z bočních oček babky vyrůstají podzemní oddenky, tzv. vlky, které mohou rovněž vytvářet nadzemní lodyhy, jejich přítomnost je však nežádoucí. Kořenový systém zahrnuje kořeny křehké (zasahující až do hloubky 8 m), postranní kořeny (v hloubce do 60 cm) a letní kořeny (v hloubce do 20 cm). Dle výškové se člení kořeny do tří skupin, kosterní neboli skeletové, které zahrnují všechny pokročilé, či druhotně ztloustlé kořeny, jenž tvoří kostru celé kořenové soustavy. Dále se dělí podle prostorového rozmístění na vertikální (křehké) a horizontální (postranní). Koncové aktivní kořinky, což jsou nejmladší kořinky na počátku druhotného tloustnutí, vznikají a zanikají během ročního cyklu. Kořenové hlízy se vytvářejí na vertikálních kořenech v hloubce 30–40 cm. Kořenové hlízy se neustále tvoří na mladých i starších kořenových větvích a staré hlízy se po vyčerpání rozpadají (Rybáček, 1980).

Nadzemní část zahrnuje révu, révové listy, pazochy, květenství a hlávky. Réva dorůstá výšky 7 – 8 m, je členěna na internodia a nody tzv. kolénka. Z každého nodu vyrůstají dva révové listy. Pazochy jsou postranní větévky révy dorůstající délky od 30 do 100 cm, na nich vyrůstají menší pazochové listy a květenství. Květenství samčích rostlin je rozvětvená lata, květenství samičích rostlin je šiřticovité a postupným vývojem vytváří chmelovou hlávku (Šnorbl a kol., 2011).

3.7.3 Historie chmelařství

Chmel byl používán jako léčivá bylina proti nespavosti, dnes se používá pro výrobu piva, má vliv na chuť a působí také jako konzervační látka (Táborský, 2017).

Nejstarším dokladem o pěstování chmele je listina knížete Břetislava I. (1034 – 1055) a listina prvního českého krále Vratislava II. (1061 – 1092), která dokládá výrobu piva (Basařová & Hlaváček, 1998). V r. 1101 se chmel začal vyvážet do Hamburku na „Forum humuli“. V době největšího rozmachu českých zemí, král Karel IV. zakázal vyvážet sádk žateckého chmele mimo české území. Chmel se v té době pěstoval na celém území Čech, teprve postupně se začala produkce chmele soustředit do nynějších pěstebních oblastí, Žatecko, Ústěcko, Tršicko. Později během 30leté války bylo české chmelařství značně poznamenáno, chmelnice byly vypalovány, ničeny anebo zůstaly opuštěné, toho využili

ostatní země např. Braniborsko, Slezsko, Bádensko, Rusko, kde se začaly vysazovat české sádky. Dalším důležitým mezníkem je období vlády Marie Terezie, která udělila povinnost pečeti chmel a opatřovat ho osvědčením o původu, roku 1769 vydává patent o známkování chmele, poptávka po žateckém chmelu se tak zvýšila. Roku 1840 byl vynalezen nový způsob spodního kvašení piva, o což se postaral vídeňský pivovarník Anton Dreher, za pomoci žateckého chmele. Jeho syn pak vlastnil v Žatci velký strojní pivovar, postavený roku 1898. Po roce 1860 se opět rozmohly pokusy o falšování chmele, a tak v Žatci v roce 1884 vznikla Známkovna chmele. V poslední dekádě 19. století se z 10 000 ha chmelnic rozmohlo pěstování chmele na 17 200 ha. Množství komínů, které jsou dodnes patrné v panoramatu Žatce, je z této doby. Využívaly se k šíření chmele. Tento postup sloužil ke konzervaci usušeného chmele, který si tak zachoval nejen svou svěží barvu ale i trvanlivost. V roce 1890 byla vynalezena žatecká drátěnka, což byla pevná trvanlivá konstrukce. Dříve byl chmel pěstován na tyčových chmelnicích. Bylo to však velmi fyzicky náročné. Kůlové pěstování bylo k vidění ještě po druhé světové válce. Žatec byl v 19. století tak vyspělý, že se uvažovalo o výstavbě tramvajové železniční sítě v centru města. Plány dokládají, jak bohatým městem Žatec byl. Chmel se začal vyvážet do Severní Ameriky a do Japonska. Během první světové války došlo k úbytku ploch chmelnic na polovinu na 8 000 ha. Klesly i výnosy, konkrétně 5q/ha. Hospodářská krize tak zasáhla i chmelařství. Ve 20. letech se stal Žatec hlavním městem světového obchodu chmele a Žatečané diktovali jeho ceny. Po první světové válce se stal Žatec hlavním městem světové produkce chmele, jelikož prodával zásoby chmele nahromaděné během války (Králová, 2005; Slonek, 2014).

Dnešní „Žatecký poloraný červeňák“ je výsledkem pozitivního výběru v krajské populaci žatecké. Zde začal doc. Karel Osvald v r. 1927 sledovat 276 rostlin. Roku 1929 u nás byly chmelnice nejrozlehlejší, a to až 17 264 ha. Posléze však dopadly na Žatecko důsledky celosvětové hospodářské krize, což byl další mezník v úpadku produkce chmele. Druhá největší synagoga České republiky, umístěna v samém centru města, byla před druhou světovou válkou vypálena a Židům byl zakázán vývoz chmele do Německa, což zapříčinilo úpadek ekonomiky Žatce. Prvorepublikové slávy město již nikdy nedosáhlo. Roku 1952 byly klony č. 31, 72 a 114 zaregistrovány k pěstování a dnes tvoří většinu českých a moravských chmelnic. Doc. Osvald se zaměřil hlavně na vyrovnanost hospodářských a kvalitativních ukazatelů v jednotlivých letech i na daných stanovištích (Táborský, 2017). Po druhé světové válce bylo zapotřebí zredukovat staré a neudržované chmelnice až o 30 %. Roku 1948 bylo vše znárodněno a vznikl „Výkupní sklad chmele“, pěstitelé byli nuceni vstoupit do JZD a vytvořily se velké plochy chmelnic. Z tohoto důvodu bylo nezbytné přejít z ručního sklizení

na mechanizované. V roce 1960 vznikl národní podnik Chmelařství Žatec, jehož skladovací budova je jediná nejvyšší s touto funkcí na světě s výškou 60 m (Hajšl, 2005).

Na menších plochách se od r. 1987 pěstují hybridní odrůdy Bor a Sládek. Jedná se o pokus zvýšení výnosu při zachování kvality. Roku 1991 se u nás i ve světě začaly pěstovat tzv. „meristémy“. Jsou to bezvirózní odrůdy vypěstované v aseptickém prostředí z dělivého pletiva viruprostých vrcholových výhonů. V roce 1993 se plocha chmelnic rozrostla na 10 547 ha. Avšak v následujících letech 1995-1998 byl opět zaznamenán hluboký propad a to o 43 %. Poté se produkce krátce ustálila. Pokles v devadesátých letech byl způsoben celosvětovou nadprodukcí chmele, a proto se plocha chmelnic redukovala nejen u nás ale i v ostatních zemích. Od roku 2000 se nadále trend pozvolně snižuje, což je zapříčiněno nejen zvyšující se věkovou strukturou chmelnic, ale i nepříznivými klimatickými podmínkami, které negativně ovlivnily produkci chmele. V roce 2006 vyhrálo Žatecké pivo na Mezinárodním pivním festivalu v Sydney první místo. (Králová, 2005).

K datu 20. 8. 2014 (v roce, kdy byl průzkum prováděn) registroval Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský nárůst sklizňových ploch chmelnic v České republice oproti předchozímu roku o 141 ha. Nastalo více jak 100 % navýšení nově vysázených chmelnic o 406 ha, na celkovou plochu 4 460 ha. V Žatecké oblasti se sklizňová plocha chmelnic navýšila o 93 ha, v Ústěcké oblasti o 17 ha a v Tršické o 31 ha. Díky zvýšené poptávce po českém chmelu se v rámci ČR zvýšila plocha Žateckého poloraného červeňáku na současných 3 894 ha. Významně se zvýšila plocha odrůdy Sládek a to o 30 ha na 270 ha. U odrůdy Premiant došlo ke snížení plochy o 14 ha na celkových 187 ha. Sklizeň chmele v roce 2014 (6 202 t) byla oproti předchozímu roku vyšší o 16,36 % (5 330 t). Česká republika je třetí největší pěstitelskou zemí na světě a stále největším producentem jemně aromatického chmele. Mezi největší pěstitele chmele patří Německo, USA, Česká republika a Čína (Slonek, 2014).

3.7.4 Pěstební podmínky

Pěstování chmele se v České republice vlivem historického vývoje soustředilo do tří vyhraněných pěstitelských oblastí. Chmelařská oblast Žatecko je největší, zahrnuje zejména okresy Louny, Rakovník a část okresu Kladno. Poskytuje chmel výborné kvality. Výnosy hlávek jsou zde však nižší než v ostatních chmelařských oblastech z důvodů nižšího úhrnu srážek během vegetace. Chmelařská oblast Ústěcko měla plochu chmele přibližně 500 ha zejména v okresech Litoměřice a Mělník. Chmelařská oblast Tršicko měla plochu přibližně

570 ha v okresech Olomouc, Přerov a Prostějov. Žatecký poloraný červeňák se pěstuje na 88 % plochy chmelnic v naší republice (Šnorbl a kol., 2011; Slonek, 2014).

Původní přirozená stanoviště chmele jsou vlhké křoviska, okraje lužních lesů, především však pobřežní pásy potoků a řek. Chmel vyžaduje půdu s dostatečnou vrstvou ornice, příznivými fyzikálními vlastnostmi a dobrou vodní jímavostí. Nejčastěji je pěstován na půdách hlinitých až jílovito-hlinitých. V Žatecké oblasti to jsou zejména tzv. červenky permského původu. Tato půda vzniká zvětráváním lupků a břidlic, které obsahují podstatné množství sloučenin železa (až 7 % Fe_2O_3). Bývají těžší, špatně propustné a chladné. Převládajícím typem je hnědozem, s neutrální reakcí půdy (pH okolo 6,5). Důležitý je obsah humusu (asi 3 %). Během vegetace vyžaduje chmel stejnou, postupně se zvyšující teplotu. Je citlivý na denní výkyvy teplot. Začíná růst při 4 °C. Ideální jsou mírně teplé a sušší teploty v dubnu, stejně postupně stoupající teploty od května do července a teplé a slunné počasí v červenci a srpnu, kdy má nejvyšší nároky na teplo při dozrání hlávek. V českých chmelařských oblastech činí průměrná roční teplota vzduchu 7,5 – 8,5 °C, tepelná vegetační konstanta 2 000 – 2 800 °C. Červnové teploty rozhodují o průběhu růstu, červencové a srpnové teploty spolu s vláhou o množství a kvalitě hlávek. Negativně působí letní tropické dny ($t_{\text{max}} > 30$ °C). Požadavky chmele na vláhu stoupají od zavedení rév, maxima dosahují v červenci až začátkem srpna, v době dozrání hlávek potřeba vody klesá. Pro dosažení dobrého výnosu i kvality hlávek je žádoucí i dostatečná intenzita slunečního svitu, během vegetace činí průměrně 1 300 hod (Horejsek & Zich, 1990).

Nejnáročnější je chmel na živiny, na 1 t hlávek spotřebuje 90 kg N, 17, 5 kg P, 83 kg K, 101 kg Ca, 16, 5 kg Mg a mnoho stopových prvků (jako jsou Mo, Cu, B, Mn, Fe, Zn, S). (Šnorbl a kol., 2011; Horejsek & Zich, 1990).

3.7.5 Charakteristika Žatecka a žateckého chmele

Žatecko je jedna ze tří oblastí produkce chmele v České republice, spolu s Úštěckou oblastí se nachází na severo-západě Čech (Anonym 6, 2016).

V rámci republiky je tato oblast nejsušší, jelikož se nachází ve srážkovém stínu Krušných a Doupovských hor. Průměrné roční srážky činí 500 – 650 mm. Tato lokalita je na sever od 50 ° severní šířky. Patří do řepařské výrobní oblasti. Reliéf terénu je rovinného rázu s mírným zvlněním. Převládají černozemní a hnědozemní půdy na spraších a sprašových hlínách, nivní půdy na nivních uloženinách. Nadmořská výška oblasti je kolem 250 – 350 m. n. m., průměrná roční teplota je 8 – 9 °C (Němec, 2001).

Žatecký chmel je díky svým výjimečným vlastnostem používán pivovary na celém světě. (Anonym 6, 2016).

Odrůdová skladba V České republice se v současné době pěstují 2 skupiny odrůd:

- Odrůdy typu Žateckého poloraného červeňáku (do roku 1993 výhradně pěstované jenom u nás) - z hospodářského hlediska se jedná o 9 pěstovaných klonů vzniklých výběrem (Blato, Blšanka, Lučan, Osvaldův klon č. 31, Osvaldův klon č. 72, Osvaldův klon č. 114, Podlešák, Siřem, Zlatan). Hlávky však měly nižší obsah α -hořkých kyselin (3 – 5 %) v porovnání se zahraničními vysokoobsažnými odrůdami. Výnos hlávek se pohyboval jen kolem 0,9 – 1,2 t z hektaru. Výsadbou těchto klonů po roce 1990 pomocí meristémové sadby (sadby ozdravené od virů a viroidů) se podařilo zvýšit výnosy v relativním vyjádření přibližně o 30 % a obsah α -hořkých kyselin přibližně o 50 %, což umožní stabilizovat výnos na úroveň 1,5 t/ha a obsah α -hořkých kyselin na 5 – 6 %.
- Hybridní odrůdy vznikly hybridizací chmele českého s anglickou odrůdou *Northern Brewer*. Habitus rostlin je mohutnější, řídce olistěný, obsah alfa hořkých látek se pohybuje okolo 8 %. Pěstují se od roku 1994 a jejich plocha se postupně rozšiřuje, v roce 2004 však činila zatím jen 320 ha. Současnými představiteli jsou odrůdy *Bor*, *Sládek*, *Premiant*, *Agnus* a *Harmonie*. Jejich výnosový potenciál činí 1,8 – 2,5 t suchých hlávek z 1 ha, vykazují vyšší obsah hořkých látek. Sládek a Harmonie jsou aromatický typ s průměrným obsahem α -hořkých kyselin 6 – 8 %. Odrůdy Bor a Premiant jsou obsažný typ (Bor 8 – 11 Premiant 7 – 10 %), Agnus je vysokoobsažný (11 – 15 %). Premiant byl zařazen na základě chemických analýz do skupiny hořkých chmelů, ale varné testy potvrdily, že z pivovarnického hlediska nelze přesně zařadit tuto odrůdu do uvedených skupin, že tvoří předěl mezi skupinami aromatických a hořkých chmelů (Šnorbl a kol., 2011).

4 Materiál a metody

4.1 Cíl práce

Byl proveden detekční průzkum půd pocházejících z chmelnic na území ČR. Vzorky byly odebírány a jejich poloha zaměřena pomocí GPS. Pro stanovení výskytu sedenterních háďátek byla použita flotační metoda s využitím Fenwickovy konve. Získané cysty byly spočítány, některé byly podrobeny determinaci s využitím morfologických znaků cyst pomocí světelné mikroskopie a molekulárně biologických metod. Výskyt háďátek z kategorie osní háďátka byl sledován v průběhu vegetace, kdy byly odebírány vzorky nadzemních částí rostlin s příznaky deformací. Ty byly podrobeny extrakci háďátek pomocí Baermanovy nálevky. Rovněž byl sledován celkový zdravotní stav porostů a byla získána data o kvalitě a kvantitě sklizeného chmele. Tato data byla komparována s výskytem háďátek.

4.2 Výběr lokality

Pro praktickou část své diplomové práce jsem si vybrala oblast Žatecka, jelikož má velký historický ale i současný význam v tomto zemědělském odvětví a je to také místo mého bydliště. Tato oblast je rozsáhlá, zahrnuje přes 3 500 ha chmelnic. Na většině této plochy se pěstuje odrůda Žatecký poloraný červeňák. Vzorky byly odebrány z následujících lokalit – Žatec, Staňkovice u Žatce, Běsno u Strojetic.

4.3 Stanovení výskytu volně pohyblivých háďátek

V této lokalitě byly pozorovány podezřelé příznaky na chmelu způsobené možným napadením háďátek *D. destructor* a *D. dipsaci*. Existuje málo informací o těchto symptomech, obrázků, fotografií i literatury. Avšak to nemění nic na tom, že jsou tato háďátka neméně významná i v tomto zemědělském odvětví jako je chmelařství.

4.3.1 Biologický materiál

Odběry vzorků se prováděly pomocí zahradních nůžek za vegetace (červen – srpen) z listových a stonkových částí rostlin a to na mladších částech rostlin. Vzorek se vložil do

navlhčeného igelitového pytlíku, aby si udržel vlhkost a neoschl, jelikož je důležité udržet rostlinný materiál čerstvý až do zpracování kvůli potenciální přítomnosti hád'átek a jejich životnosti.

4.3.2 Extrakce hád'átek z rostlinných pletiv

Extrakce hád'átek byla použita metoda pomocí Baermannovy nálevky. V laboratoři byly vzorky odebraných rostlin nakrájeny na malé kousky, zabaleny do papírového ubrousku a umístěné do nálevky, která byla na konci opatřena gumovou hadičkou uzavřenou tlačkou. Do nálevky se umístilo sítko, vložil se dovnitř vzorek a zalil se vodou. Nechal se přes noc máčet a vodní suspenze se druhý den vypustila do kádinky. Suspenze pak byla podrobena mikroskopickému vyhodnocení na přítomnost hledaných hád'átek.

4.4 Stanovení výskytu sedenterních hád'átek

Podle systému LPIS byly vytipovány lokality chmelnic, tedy pozemků, ze kterých se odebíraly půdní vzorky. Pro usnadnění práce se využila spolupráce zemědělců. Od nich byly získány mapy a informace o výnosu, hodnotě alfa hořkých kyselin a odrůdě.

4.4.1 Biologický materiál

Odběr vzorků půdy byl prováděn v březnu před začátkem vegetace, kdy je pohyb po chmelnici i teplota ideální. Ke vzorkování byla použita kovová zahradní lopatka, polythylénové sáčky, mapy a GPS. Na chmelnici byl každý sáček s odebraným vzorkem půdy označen číslem, zaznamenán do mapy a pomocí GPS zaevidovaná souřadnice místa odběru. Lopatkou byl odebírán půdní vzorek o hmotnosti 1 kg vpichem do půdního profilu. Na každý pozemek byly odebrány 3 dílčí vzorky. Na dvou chmelnicích byl podrobnější průzkum o 15 vzorcích.

4.4.2 Extrakce cyst z půdních vzorků

Nasbírané vzorky byly pozvolna zcela vysušeny za přítupu vzduchu o pokojové teplotě. Jednotlivé vzorky se po vysušení homogenizovaly na co nejmenější strukturu. Z každého

půdního vzorku se navázilo 300 g půdy a toto množství se proplavilo metodou pomocí Fenwickovy konve přes síto o velikosti ok 0,2 mm, na němž se zachytily větší částice převážně organického materiálu. Následně byly vzorky proplaveny ještě sítem o velikosti ok 100 μm , ze kterého se po vyschnutí vybíraly cysty pod binolupou pomocí mokrého štětečku do označených mikroskopavek. Jednotlivé cysty se spočítaly a jsou uvedeny v tabulce v sekci Výsledky.



Obr. č. 1: Fenwickova konev (Anonym 1b, 2017).

4.4.3 Morfologická diagnostika

K diagnostické metodě byly vybrány vzorky, které obsahovaly nejvíce cyst, což byla třetina ze všech odebraných vzorků. Z těchto mikroskopavek se vybírali tři vitální cysty, k usnadnění možné identifikace pod světelným mikroskopem. Příprava trvalých preparátů vyžadovala značné trpělivosti, citu a cviku. Dále k tomu byl zapotřebí laboratorní mikroskop. Na podložní sklíčko se nakapalo velmi malé množství destilované vody, do něhož se nematologickou jehlou přenesla jedna cysta. Následným přerізnutím cysty speciálním nematologickým skalpelem poblíž vulválního konce se tento ořez ve tvaru čtverce uložil do glycerolu a vznikl tak trvalý preparát. Zbytek cysty s vajíčky se uložil do označené Eppendorf

zkumavky s 20 μ l lysis buffer (LB). Tyto zkumavky se přechodně zamrazily. Po ořezání všech vzorků započala samotná extrakce DNA.

4.4.4 Extrakce DNA

Pokračovalo se extrakcí DNA z cyst, které byly využity jako trvalý preparát z předešlé kapitoly. Se zbylým živým biologickým materiálem se dále pracovalo následujícím postupem.

1. Nepipetování 20 μ l LB do Eppendorf zkumavky (EPZ)
2. Přidání cysty, drcení 3 minuty tloučkem
3. Připipetování 30 μ l LB, další 2 minuty drtit pomocí minishakeru (Pellet Pestle)
4. Opláchnout tlouček 50 μ l LB
5. Dvakrát zmrazit tekutým dusíkem, nechat roztát
6. Připipetovat 100 μ l LB +1 μ l proteinázy K, zvortexovat
7. Na 1 hod umístit EPZ do termobloku ThermoBlock TDB – 120 při teplotě 37 °C
8. Na 5 min umístit EPZ do termobloku při teplotě 85 °C
9. Připipetuj ekvivalentní množství fenolu a chloroformu s izoamylalkoholem (2:1:1)
10. Na 15 min umístit na vortex IKA – VIBRAX – VXR (1800 otáček/min)
11. Umístit do centrifugy Hettich Zentrifugen Universal 320 R na 10 min při 9000 g
12. Do nové mikrozkušavky odpipetovat svrchní vodnou fázi
13. Připipetuj ekvivalentní množství chloroformu isoamylalkoholu (200 μ l)
14. 15 min umístit na vortex přístroj
15. Centrifugovat při 9 000 g 10 min
16. Do nové EPZ odpipetovat svrchní vodnou fázi
17. Připipetovat ekvivalentní množství ledového (-20 °C) isopropanolu
18. Přes noc nechat v mrazáku při teplotě (-20 °C)
19. Centrifugace 10 min při 10 000 g
20. Propláchnout peletu 70 % etanolem
21. Centrifugace 10 min při 10 000 g
22. Sušit na buničině 15 - 30 min
23. Resuspendace pelety ve 20 μ l TE pufru pH 8, vortex 30 min

Krok č. 9 se provádí z důvodu, že směs fenolu s chloroformem denaturuje proteiny, rozpustí tuky a napomáhá k oddělení jednotlivých frakcí v následném kroku.

Složení Lysis bufferu (LB): 100 mM Tris-HCl pH8

5 mM EDTA

100 NaCl

0,2 % SDS

4 µg/ml proteinázy K

Koncentrace a čistota izolované DNA byla u všech vzorků stanovena pomocí spektrofotometrie. Měřila se absorbance DNA při vlnových délkách 260 – 280 nm. Zkoumané vzorky DNA byly proměřeny na přístroji SpectroPhotometer NANODROP 2000c, který umožňuje stanovit koncentraci v ng/µl. Měření se provádí proti slepému vzorku. Z poměru hodnot A260/A280 se zkontrolovala čistota DNA. Poměr absorbancí čisté DNA se musí pohybovat v rozmezí 1,7 – 2,0. Vzorky, které splňovaly tyto podmínky, byly nadále použity k dalšímu laboratornímu postupu. Bylo potřeba připravit reakční směs vhodnou pro následnou PCR reakci.

4.1.2 Reakční směs

Složení PCR Master Mix (na 25 µl):

- 1. ddH₂O 20,6 µl
- 2. Dream Taq buffer 2,5 µl
- 3. dNTP 0,25 µl
- 4. Primermix (S18.S21) 0,4 µl
- 5. Dream Taq 0,25 µl
- 6. DNA 1 µl

Master mix byl připraven tak, že se jednotlivé látky 1. - 5. aplikovaly do jedné zkumavky, aby vznikla vhodná reakční směs. Z té se pak Master Mix rozpipetovalna počet vzorků do jednotlivých mikrozkuavek, do nichž se poté přidával vzorek DNA - ideálně do víčka. Je nutné dbát sterilních podmínek, tedy používat sterilní špičky, rukavice. Dále se zkumavky centrifigovaly na cykleru Microspin FV-2400 pro dokonalé smíšení obsahu. Mikrozkuavky se poté vložily do termocycleru Pentier Thermal Cycler PTC – 200, kde jsou zkumavky

uložené v kovovém bloku, na němž se nastaví přesný cyklus. Mikrozkumavky pro toto použití musí mít tenké stěny, kvůli náhlým opakujícím se změnám teploty. Byly použity semispecifické primery z oblasti cistronu rDNA F (S18), R (S21). Taq polymeráza se uchovává tzv. „na ledu“, respektive v mrazicím bloku, aby se zabránilo její předčasné aktivitě. Mohlo by tak dojít ke vzniku zcela chybných produktů.

Označení primerů	Sekvenace 5' > 3'	Délka ampilifikovaného fragmentu	Teplota pro annealing
F (S18)	TTGATTAGGTCCTGCCCTTT	Různá pro každý druh	58 °C
R (S21)	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG		

Tab. č.5: Semispecifické primery (Tamlerová, 2017).

4.1.3 Teplotní fáze reakčního cyklu:

- Počáteční denaturace 94 °C, 2 min.
- 35x opakování:
 - denaturace 94 °C, 1 min
 - annealing 58 °C, 1 min
 - elongace 72 °C, 1 min
- konečná elongace 72 °C 20 min
- stop teplota 14 °C

Po proběhnutí PCR u jednotlivých vzorků se pokračovalo přípravou agarózového gelu pro gelovou elektroforézu.

4.1.4 Příprava agarózového gelu

Nutno použít rukavice, jelikož se pracuje s velmi škodlivou látkou ethidium bromid, která umožňuje následné zviditelnění jednotlivých frakcí UV zářením.

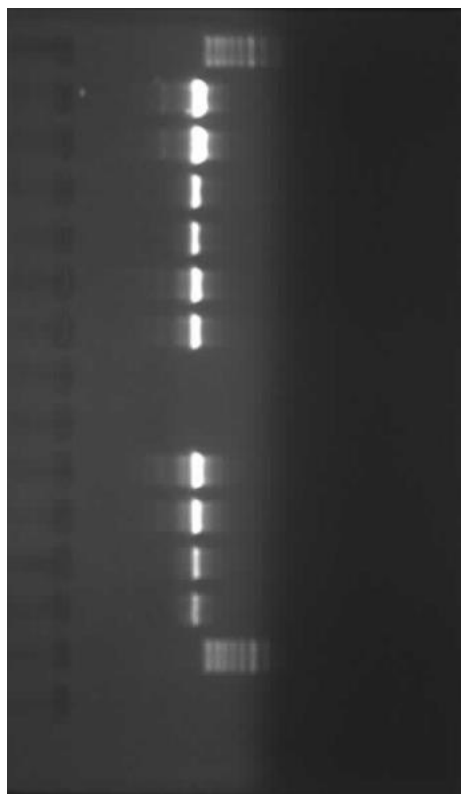
1. Navážilo se potřebné množství agarózy a ta se přidala do připraveného TBE (1,5 g agarózy / 100 ml TBE).

Složení TBE na 1 l:

- 54,5 g Tris base

- 27,5 g kyseliny borité
- 3,65 g EDTA

2. Promíchal se obsah a v mikrovlnné troubě speciálně určené pro tyto účely, po dobu 2 minut se vařil, agaróza musí být zcela rozpuštěná a mezi tím se jednou obsah promíchal, poté se vložil do vodní lázně 60 °C (Subaqua 5 Plus Grant).
3. Do 50 ml tekutého agarózového gelu (o teplotě okolo 50 °C) se přidaly 2 μ l roztoku ethidium bromid (EB) (5 mg/ml H₂O), promíchal se a nalil do vaničky horizontální elektroforézy, na rovném povrchu, kde se ponechal přes 20 min, aby ztuhl. Naléval se opatrně, aby se zabránilo vzniku bublinek, což by znesnadnilo mobilitu fragmentů skrze gelovou strukturu.
4. Po zatuhnutí se vyndal hřebínek, jednotlivé komůrky se naplnily TBE puřrem.
5. První a poslední jamka slouží jako kontrola a do nich se DNA nenanáší. První jamka byla ponechána pro pozitivní kontrolu – velikostní marker neboli standard molekulové váhy, pro odhad velikosti pozorovaných fragmentů, který je přesné specifické velikosti, slouží jako ukazatel, zda PCR proběhlo. Poslední jamka se nechala pro negativní kontrolu, jako potvrzení správného pipetování a jestli nedošlo ke kontaminaci vedlejších vzorků. Do zbylých jamek se nanasly jednotlivé vzorky produktů PCR mikropipetou (10-15 μ l na jamku).
6. Vanička se vložila do elektroforetické komůrky, jamky jsou u katody '-'. Zapojila se do elektrického pole (černý vodič '-', červený '+'). Negativně nabité molekuly DNA se pohybují od anody (-) ke katodě (+).
7. Nastavilo se na zdroji napětí na 80 V a elektroforetická separace probíhala 1,5 h.
8. Poté se zdroj vypnul a odpojila se elektroforetická komůrka od elektrického proudu. Gel se opatrně vyjmul, opláchnul se destilovanou vodou, umístil se na UV transparentní podložku a vložil se do UV transiluminátoru, kde se zviditelnily výsledky fragmentů. Výsledkem byly viditelné proužky „bandy“, které odpovídají velikostem segmentů vzniklým štěpením PCR produktu.



Obr. č. 4: Elektroforeogram (Tamlerová, 2017).

4.1.5 Extrakce DNA z agarózového gelu

Fragment DNA se vyjmul po elektroforetické separaci pod UV lampou za pomoci skalpelu. Vyřezaný bloček se zvážil a vložil se do 1,5 ml zkumavky. Na každý 1 mg váhy se přidalo 2,5 μ l roztoku NaI. Dále se bloček inkuboval v NaI při 55 °C po dobu 3 – 5 minut, za konstantního protřepávání, tak aby se agaróza rozpustila. K tomuto roztoku se po úplném rozpuštění přidalo promíchané silica milk a to podle množství DNA. Promíchaný roztok se nechal stát na ledu 5 – 15 minut a následně se krátce (10 s) centrifugoval. Silica milk se s navázanou DNA promýval ve 200 – 500 μ l promývacího roztoku, celkem třikrát za sebou. Při promývání se sediment rozmíchal špičkou, krátce se centrifugoval a supernatant se vylil. Závěrečným promýváním se roztok centrifugoval 30 s a zbytek supernatanu se odstranil. Přidalo se 10 μ l vody. Roztok se inkuboval při teplotě 55 °C během 3 minut. Centrifugoval se 1 min a odebral sesupernatant, tj. roztok s DNA.

Vzorky byly zaslány firmě Biotech GATC na sekvenci cistronu rDNA sangerovou dideoxyterminační metodou. Laboratoř zanalyzovala výsledky, které se pomocí Blast algoritmu vyhodnotily a zaznamenaly.

5 Výsledky

Cílem mé diplomové práce bylo provést detekční průzkum půd, zaměřený na výskyt fytoparazitických háďátek sedentérních cystotvorných, a druhý průzkum na přítomnost háďátek osních, dále porovnat výnosové parametry v korelaci s jejich výskytem. Podle toho určit význam fytoparazitických háďátek pro produkci chmele.

5.1 Stanovení výskytu osních háďátek

Cílem této praktické části bylo zjistit přítomnost háďátek *Ditylenchus spp.* na chmelu. Vzorky byly odebrány a podrobeny metodě pomocí Baermannovy nálevky. Tato praktická část měla negativní výsledky ohledně přítomnosti osních háďátek, *Ditylenchus destructor* a *Ditylenchus dipsaci*. Ve vegetačním období v průběhu pozdního jara a léta byly pozorovány příznaky, které uvádí literatura, např. pomalý růst, vadnutí, deformace a barevné změny či nekrózy. Žádný ze vzorků nepotvrdil nálezy těchto háďátek, což je z rostlinolékařského hlediska velmi pozitivní. Celkem bylo odebráno 25 vzorků rostlin z 19 chmelnic.

Půdní díl	počet vzorků	přítomnost háďátek
1607/1	2x	0
1607/2	1x	0
6314	1x	0
6315	1x	0
6201/8	1x	0
6323/2	2x	0
6326	1x	0
6324	1x	0
7405	1x	0
7407	1x	0
6405	2x	0
6318	1x	0
6310	2x	0
0504	1x	0
9523/2	1x	0
9523/3	2x	0
9505/5	2x	0
9503/4	1x	0
9503/15	1x	0

Tab. č. 6: Výsledky – osní háďátka (Tamplerová, 2017).

5.2 Stanovení výskytu cystotvorných sedenterních háďátek

Mapy z LPIS jsou uvedené v příloze. Jsou v nich zakresleny jednotlivé lokace odběru všech vzorků. Celkem bylo odebráno 160 vzorků půdy. V tabulce jsou uvedena data o GPS souřadnicích, výnosových a kvalitativních hodnotách, včetně odrůdy a počtu cyst v každém vzorku na 300 g půdy.

Č.	Počet cyst na 300 g	Souřadnice		LPIS	Vzorků na blok	Výnos q/ha	Alfa %	odrůda
1	0	50°20'50.14"S	13°33'26.75"V	0504	1	10,2	2,58	ŽPČ
2	31	50°20'51.50"S	13°33'26.73"V	0504	2			
3	0	50°20'53.41"S	13°33'26.50"V	0504	3			
4	0	50°20'47.77"S	13°33'16.49"V	9517	1	19,2	8,08	Premiant
5	35	50°20'46.24"S	13°33'15.10"V	9517	2			
6	35	50°20'46.24"S	13°33'15.10"V	9517	3			
7	9	50°20'48.58"S	13°33'27.41"V	9518	1			
8	56	50°20'47.41"S	13°33'27.63"V	9518	2			
9	0	50°20'46.18"S	13°33'26.57"V	9518	3			
10	28	50°20'44.75"S	13°33'28.59"V	9523/2	1	18,9	8,24	Premiant
11	41	50°20'44.04"S	13°33'30.58"V	9523/2	2			
12	35	50°20'43.06"S	13°33'30.26"V	9523/2	3			
13	40	50°20'43.39"S	13°33'14.35"V	9523/3	1			
14	7	50°20'41.94"S	13°33'14.15"V	9523/3	2			
15	0	50°20'40.98"S	13°33'14.84"V	9523/3	3			
16	23	50°21'5.30"S	13°33'33.72"V	9503/4	1	13,2	4,11	ŽPČ
17	14	50°21'8.77"S	13°33'35.80"V	9503/4	2			
18	20	50°21'0.15"S	13°33'35.70"V	9503/4	3			
19	0	50°21'8.85"S	13°33'39.24"V	9503/24	1	16,8	8,7	Premiant
20	7	50°21'5.27"S	13°33'42.81"V	9503/24	2			
21	24	50°21'7.17"S	13°33'42.44"V	9503/24	3			
22	2	50°21'3.21"S	13°33'38.54"V	9503/17	1			
23	8	50°20'59.98"S	13°33'38.81"V	9503/17	2			
24	21	50°20'59.93"S	13°33'42.79"V	9503/17	3			
25	27	50°20'56.68"S	13°33'38.62"V	9503/15	1			
26	6	50°20'54.55"S	13°33'40.17"V	9503/15	2			
27	17	50°20'52.48"S	13°33'42.49"V	9503/15	3			
28	19	50°20'53.80"S	13°33'45.35"V	9503/13	1			

29	0	50°20'51.70"S	13°33'45.40"V	9503/13	2			Premiant
30	12	50°20'48.88"S	13°33'45.93"V	9503/13	3			
31	16	50°20'53.24"S	13°33'50.73"V	9516/1	1	21,1	7,71	Premiant
32	16	50°20'51.78"S	13°33'50.02"V	9516/1	2			
33	19	50°20'49.09"S	13°33'50.51"V	9516/1	3			
34	41	50°21'15.17"S	13°33'56.11"V	9505/5	1	19,2	8,83	Premiant
35	27	50°21'12.65"S	13°33'54.02"V	9505/5	2			
36	14	50°21'10.97"S	13°33'54.44"V	9505/5	3			
37	23	50°21'10.80"S	13°33'50.71"V	9505/6	1			
38	6	50°21'8.53"S	13°33'51.19"V	9505/6	2			
39	15	50°21'7.04"S	13°33'49.16"V	9505/6	3			
40	4	50°11'5.72"S	13°29'40.06"V	6201/1	1	15,9	9,63	Premiant
41	7	50°11'6.12"S	13°29'38.37"V	6201/1	2			
42	8	50°11'7.06"S	13°29'35.74"V	6201/1	3			
43	4	50°11'3.83"S	13°29'45.83"V	6201/14	1			
44	30	50°11'3.27"S	13°29'47.41"V	6201/14	2			
45	29	50°11'4.79"S	13°29'43.85"V	6201/14	3			
46	16	50°11'1.96"S	13°29'52.71"V	6201/2	1	18,2	6,5	Premiant
47	7	50°11'1.03"S	13°29'55.64"V	6201/2	2			
48	22	50°11'0.29"S	13°29'56.95"V	6201/2	3			
49	10	50°10'59.77"S	13°29'59.46"V	6201/8	1	13,6	5,1	ŽPČ
50	35	50°10'58.87"S	13°30'2.11"V	6201/8	2			
51	7	50°10'58.22"S	13°30'4.53"V	6201/8	3			
52	40	50°10'55.61"S	13°30'12.49"V	6327	1	12	4,75	ŽPČ
53	6	50°10'56.38"S	13°30'10.07"V	6327	2			
54	0	50°10'57.18"S	13°30'7.38"V	6327	3			
55	7	50°10'53.41"S	13°30'19.94"V	6326	1	11,8	4,58	ŽPČ
56	0	50°10'54.43"S	13°30'18.07"V	6326	2			
57	24	50°10'55.65"S	13°30'16.10"V	6326	3			
58	7	50°10'51.75"S	13°30'23.96"V	6321	1	10	3,91	ŽPČ
59	23	50°10'52.83"S	13°30'23.16"V	6321	2			
60	57	50°10'54.13"S	13°30'22.44"V	6321	3			
61	10	50°10'51.86"S	13°30'18.75"V	6322	1	12,5	3,96	ŽPČ
62	46	50°10'52.25"S	13°30'16.65"V	6322	2			
63	29	50°10'53.05"S	13°30'14.24"V	6322	3			
64	27	50°10'54.20"S	13°30'11.37"V	6325	1			
65	22	50°10'55.10"S	13°30'8.65"V	6325	2			
66	20	50°10'55.86"S	13°30'6.46"V	6325	3			
67	31	50°10'56.44"S	13°30'3.44"V	6324	1			
68	22	50°10'57.40"S	13°30'1.10"V	6324	2			
69	7	50°10'58.45"S	13°29'58.31"V	6324	3			

70	2	50°10'35.73"S	13°30'15.58"V	6310	1	12,3	3,92	ŽPČ
71	5	50°10'36.97"S	13°30'18.73"V	6310	2			
72	11	50°10'39.75"S	13°30'17.34"V	6310	3			
73	5	50°10'42.14"S	13°30'16.57"V	6311	4			
74	13	50°10'44.10"S	13°30'15.50"V	6311	5			
75	15	50°10'44.13"S	13°30'11.75"V	6311	6			
76	7	50°10'42.71"S	13°29'42.14"V	6318	1	15,2	4,29	ŽPČ
77	8	50°10'44.39"S	13°29'41.37"V	6318	2			
78	14	50°10'46.45"S	13°29'40.00"V	6318	3			
79	33	50°10'45.49"S	13°29'47.93"V	6316	1			
80	19	50°10'47.79"S	13°29'46.55"V	6316	2			
81	14	50°10'46.22"S	13°29'45.72"V	6316	3			
82	6	50°10'49.45"S	13°29'54.05"V	6314	1			
83	18	50°10'48.04"S	13°29'54.78"V	6314	2			
84	10	50°10'51.00"S	13°29'52.55"V	6314	3	13,9	6,9	Saaz Late
85	2	50°10'44.42"S	13°30'0.73"V	6313	1			
86	17	50°10'45.80"S	13°30'4.56"V	6313	2			
87	8	50°10'47.48"S	13°30'4.06"V	6313	3	15,2	4,29	ŽPČ
88	2	50°10'45.09"S	13°29'57.03"V	6315	1			
89	12	50°10'43.56"S	13°29'57.81"V	6315	2			
90	0	50°10'46.44"S	13°29'56.37"V	6315	3			
91	5	50°10'40.42"S	13°29'46.93"V	6317	1			
92	15	50°10'39.42"S	13°29'48.27"V	6317	2			
93	18	50°10'43.47"S	13°29'49.66"V	6317	3			
94	9	50°10'37.51"S	13°29'45.16"V	6319	1			
95	13	50°10'39.25"S	13°29'44.69"V	6319	2			
96	3	50°10'40.96"S	13°29'43.55"V	6319	3			
97	10	50°10'24.19"S	13°29'19.09"V	7408/1	1			
98	3	50°10'25.71"S	13°29'22.63"V	7408/1	2			
99	3	50°10'27.31"S	13°29'25.85"V	7408/1	3			
100	14	50°10'17.48"S	13°29'22.53"V	7407	1			
101	38	50°10'14.96"S	13°29'23.99"V	7407	2			
102	12	50°10'13.23"S	13°29'24.77"V	7407	3			
103	28	50°10'11.11"S	13°29'26.11"V	7406	1			
104	9	50°10'9.34"S	13°29'27.47"V	7406	2			
105	28	50°10'7.54"S	13°29'27.71"V	7406	3	17,1	3,92	ŽPČ
106	10	50°10'28.66"S	13°29'28.67"V	7405	1			
107	9	50°10'30.31"S	13°29'33.36"V	7405	2			
108	12	50°10'27.66"S	13°29'34.69"V	7405	3			
109	32	50°10'20.07"S	13°29'32.86"V	7404/2	1			
110	29	50°10'20.92"S	13°29'35.48"V	7404/2	2			

111	11	50°10'21.47"S	13°29'38.35"V	7404/2	3			
112	26	50°10'8.53"S	13°29'36.02"V	7409	1	10,8	4,1	ŽPČ
113	1	50°10'12.55"S	13°29'38.06"V	7409	2			
114	19	50°10'14.39"S	13°29'37.29"V	7409	3			
115	25	50°10'33.58"S	13°29'44.51"V	6406/2	1	18,2	5,3	ŽPČ
116	1	50°10'35.54"S	13°29'48.96"V	6406/2	2			
117	11	50°10'31.02"S	13°29'51.69"V	6406/2	3			
118	4	50°10'45.29"S	13°30'17.98"V	6312	1	12,3	3,92	ŽPČ
119	12	50°10'45.73"S	13°30'21.73"V	6312	2			
120	30	50°10'42.82"S	13°30'23.16"V	6312	3			
121	6	50°10'40.95"S	13°30'24.13"V	6312	4			
122	43	50°10'31.84"S	13°30'5.79"V	6304	1	5,1	5,19	ŽPČ
123	29	50°10'34.30"S	13°30'11.37"V	6304	2			
124	10	50°10'37.07"S	13°30'10.36"V	6304	3			
125	6	50°10'39.95"S	13°30'9.22"V	6305	1	10,5	3,86	ŽPČ
126	9	50°10'42.91"S	13°30'7.47"V	6305	2			
127	4	50°10'42.03"S	13°30'1.58"V	6305	3			
128	7	50°10'28.00"S	13°29'53.46"V	6405	1	18,2	5,3	ŽPČ
129	21	50°10'24.98"S	13°29'55.22"V	6405	2			
130	7	50°10'22.32"S	13°29'54.87"V	6405	3			
131	8	50°20'22.27"S	13°31'53.48"V	1607/1	1	13,9	4,8	ŽPČ
132	12	50°20'22.49"S	13°31'55.94"V	1607/1	2			
133	26	50°20'22.71"S	13°31'58.73"V	1607/1	3			
134	16	50°20'22.98"S	13°32'1.35"V	1607/1	4			
135	30	50°20'23.10"S	13°32'4.17"V	1607/1	5			
136	19	50°20'24.25"S	13°32'4.02"V	1607/1	6			
137	28	50°20'25.33"S	13°32'0.17"V	1607/1	7			
138	9	50°20'25.12"S	13°31'57.18"V	1607/1	8			
139	17	50°20'24.35"S	13°31'52.96"V	1607/1	9			
140	12	50°20'26.41"S	13°31'55.45"V	1607/1	10			
141	3	50°20'26.41"S	13°31'56.24"V	1607/1	11			
142	34	50°20'25.35"S	13°31'57.45"V	1607/1	12			
143	27	50°20'25.67"S	13°31'59.79"V	1607/1	13			
144	16	50°20'25.45"S	13°32'1.58"V	1607/1	14			
145	21	50°20'26.53"S	13°32'4.06"V	1607/1	15			
146	16	50°20'27.50"S	13°31'52.92"V	1607/2a	1	14,4	4,3	
147	22	50°20'27.66"S	13°31'55.56"V	1607/2a	2			
148	26	50°20'27.84"S	13°31'58.31"V	1607/2a	3			
149	31	50°20'28.01"S	13°32'1.09"V	1607/2a	4			
150	2	50°20'28.17"S	13°32'3.52"V	1607/2a	5			
151	26	50°20'29.24"S	13°32'3.56"V	1607/2a	6			

152	112	50°20'29.19"S	13°32'0.98"V	1607/2a	7	ŽPČ
153	19	50°20'28.98"S	13°31'58.65"V	1607/2a	8	
154	24	50°20'28.59"S	13°31'55.40"V	1607/2a	9	
155	8	50°20'28.54"S	13°31'52.75"V	1607/2a	10	
156	5	50°20'30.06"S	13°31'52.28"V	1607/2a	11	
157	36	50°20'30.22"S	13°31'54.66"V	1607/2a	12	
158	21	50°20'30.12"S	13°31'57.97"V	1607/2a	13	
159	21	50°20'30.12"S	13°32'1.00"V	1607/2a	14	
160	3	50°20'30.75"S	13°32'3.13"V	1607/2a	15	

Tab. č. 7: Charakteristika odebraných půdních vzorků (Tamlarová, 2017).

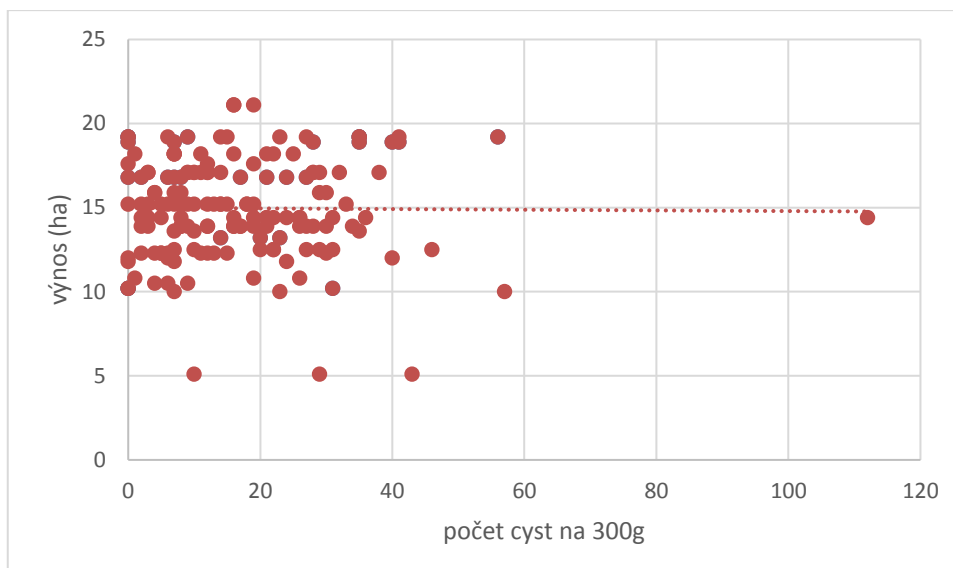
V této práci se zkoumaly 2 kvantitativní proměnné na sobě závislé (počet cyst a výnos). Ke statistickému vyjádření proto byla použita korelační analýza. V této korelační analýze důležité, jaký je vztah mezi 2 kvantitativními proměnnými. Pearsonův korelační koeficient popisuje jaká je míra závislosti v rozmezí od -1 do 1, kde -1 je negativní korelace, 0 je nulová korelace a 1 je pozitivní korelace. Pro výpočet korelačního koeficientu byl použit software SPSS.

Korelace: výnos x počet cyst		
		výnos ha
počet cyst na 300g	Pearsonův korelační koeficient	-0,009
	P-hodnota	0,906
	N	160

Tab. č. 8: Statistický výstup 1. (Tamlarová, 2017).

Z výstupu lze vidět, že korelace mezi výnosem a počtem cyst je -0,009, což je číslo velmi blízké 0. P-hodnota korelačního koeficientu je 0,906. Pokud je P-hodnota testu vyšší než 0,05 (5 % hladina významnosti), není korelace mezi proměnnými „počet cyst na 300 g“ a „výnos (ha)“ statisticky významná.

Následný graf prezentuje korelaci mezi proměnnými počtem cyst a výnos (ha).



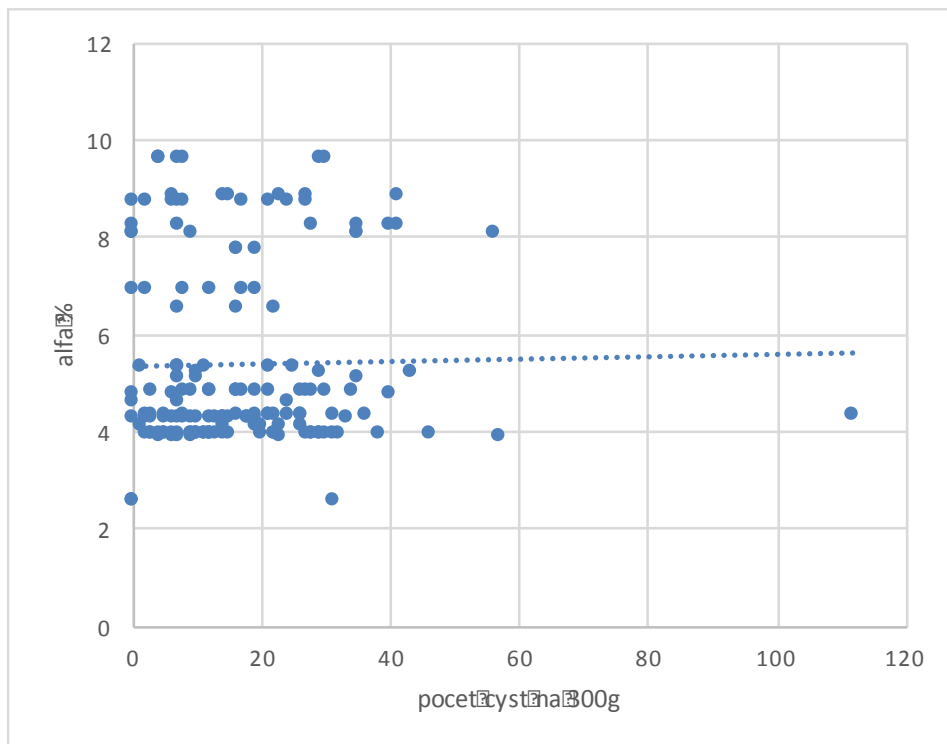
Graf č. 1: bodový graf – korelace mezi počtem cyst a výnosem (Tamlarová, 2017).

Bodový graf prezentuje na ose x „počet cyst“ a na ose y znázorňuje „výnos (ha)“. Tyto body jsou proloženy regresní přímkou, která je téměř úplně horizontální. To znamená, že není závislost mezi 2 proměnnými, což ukázal i korelační koeficient.

Korelace: alfa x počet cyst		
		alfa %
počet cyst na 300g	Pearsonův korelační koeficient	0,017
	P-hodnota	0,828
	N	160

Tab. č. 9: Statistický výstup 2. (Tamlarová, 2017).

Korelační koeficient je 0,017, opět číslo velmi blízké nule. P-hodnota korelačního koeficientu je 0,828. Pokud je P-hodnota testu vyšší než 0,05 (5% hladina významnosti), není korelace mezi proměnnými („počet cyst“ a „hodnota obsahu alfa hořkých kyselin“) statisticky významná.

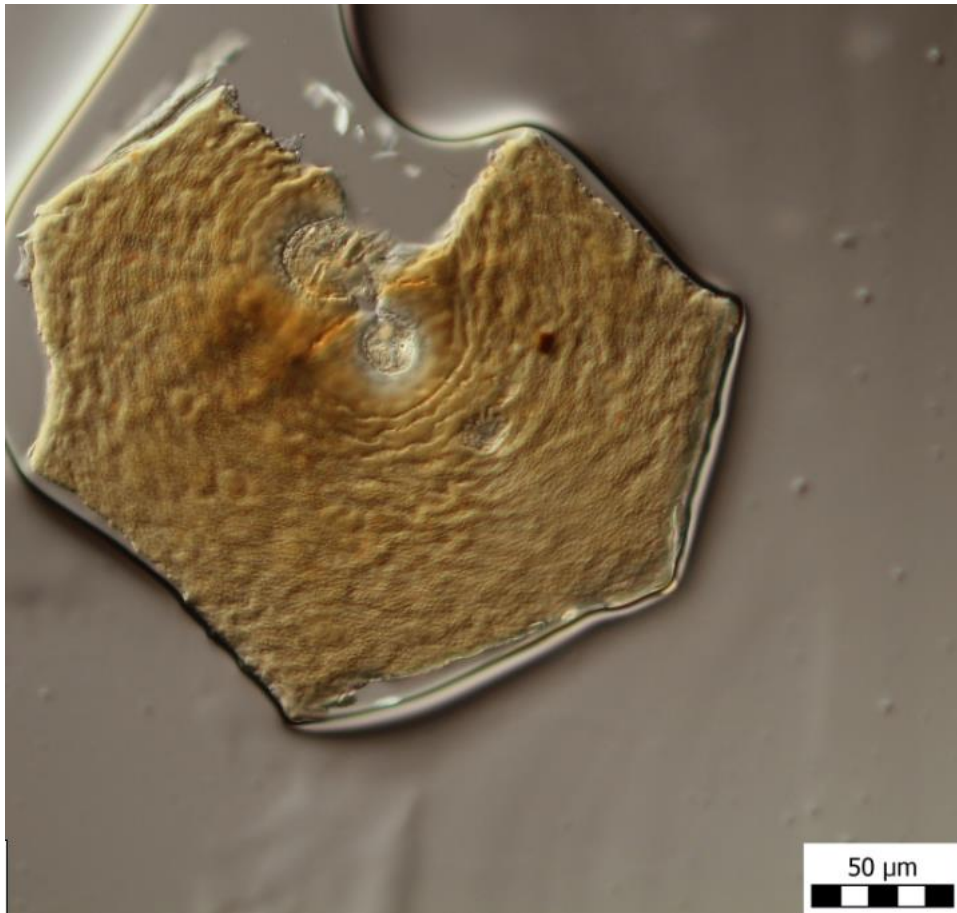


Graf č. 2: bodový graf – korelace mezi počtem cyst a hodnotou alfa (Tamlarová, 2017).

Z grafu není jasná korelace. Proložená regresní přímka je sice minimálně rostoucí, což ukazuje mírnou pozitivní korelaci, ale žádný jasný trend tu není zřejmý.

Korelační analýzy nepotvrdily korelaci u proměnných (“počet cyst na 300 g” s ani jednou z proměnných.

Po proplavení všech vzorků byly vybrány tři cysty zhruba ze třetiny celkového počtu nasbíraných vzorků, celkem 140 kusů cyst. Z nich byly vytvořeny trvalé preparáty. V tomto kroku vzniklo 140 trvalých preparátů.



Obr. č. 2: Fotografie – vulva cysty (vzorek č. 52) (Tamlarová, 2017).



Obr. č. 3: Fotografie embryonů – *Heterodera schachtii*(Tamlerová, 2017).

Následně byly vzorky cyst podrobeny laboratorním molekulárně biologickým metodám uvedeným v předchozí praktické části. Nejprve se získala čistá DNA z biologického materiálu. Pak proběhlo PCR u vybraných správně vyčištěných vzorků. Dalším krokem byla elektroforéza, separace DNA z gelu a odeslání vzorků k sekvenaci. Do této fáze se dostalo 8 vzorků, sekvenování je velmi drahá záležitost, avšak velmi precizní a přesná sloužící k identifikaci druhu. Jednotlivé vzorky byly pomocí sangerovy dideoxyterminační metody osekvenovány na jednotlivé nukleotidové báze. Laboratorní výsledky byly převedené ve Wordu, vyhodnocené na www.blast.ncbi.nlm.nih.gov a jsou uvedeny v následující tabulce.

vzorek		score	Q.cover	Ident	Accession	ID
04JG56	H.Humuli	1766	87%	99%	AY347926.1	CCV8YF0U013
04JG57	H.Humuli	1380	84%	98%	AY347926.1	CCVDVX7G016
04JG59	H.Humuli	1535	99%	98%	JX024217.1	CCUV18P2013
04JG60	H.Humuli	1487	85%	99%	AY347926.1	CCVKY3DC016
04JG62	H.Schachtii	1227	97%	98%	EF611107.1	CCVXSAH7016
04JG63	H.Schachtii	1279	99%	99%	AF156267.1	CCWC6E44013
04JG65	H.Schachtii	793	98%	99%	KT874526.1	CCWJ2RHX016
04JG66	H.Schachtii	832	99%	99%	KT225726.1	CCXK187V016
04JG68	H.Schachtii	789	98%	99%	EF611107.1	CD0YBFP7016
04JG69	H.Schachtii	1242	100%	98%	AF156267.1	CD132CSD016
04JG71	H.Humuli	1770	88%	99%	AY347926.1	CD18W1UB016
04JG72	H.Humuli	1528	85%	99%	AY347926.1	CD1EES6A016
04JG74	H.Humuli	1591	93%	99%	AY347926.1	CD1JSUEG016
04JG75	H.Humuli	1251	82%	99%	AY347926.1	CD1UEMWM016
04JG78	H.Humuli	1085	79%	100%	AY347926.1	CD201HBT016

Tab. č. 10: Výstup z www.blast.ncbi.nlm.nih.gov (Tamlerová, 2017).

vzorek	Label	Sample ID	Name	F/R
1	Seq. ID 04JG57	19.1F	<i>Heterodera humuli</i>	S18
	Seq. ID 04JG56	19.1R	<i>Heterodera humuli</i>	S21
2	Seq. ID 04JG60	54.1F	<i>Heterodera humuli</i>	S18
	Seq. ID 04JG59	54.1R	<i>Heterodera humuli</i>	S21
3	Seq. ID 04JG63	59.1F	<i>Heterodera schachtii</i>	S18
	Seq. ID 04JG62	59.1R	<i>Heterodera schachtii</i>	S21
4	Seq. ID 04JG66	117.1F	<i>Heterodera schachtii</i>	S18
	Seq. ID 04JG65	117.1R	<i>Heterodera schachtii</i>	S21
5	Seq. ID 04JG69	122.1F	<i>Heterodera schachtii</i>	S18
	Seq. ID 04JG68	122.1R	<i>Heterodera schachtii</i>	S21
6	Seq. ID 04JG72	69.1F	<i>Heterodera humuli</i>	S18
	Seq. ID 04JG71	69.1R	<i>Heterodera humuli</i>	S21
7	Seq. ID 04JG75	117.2F	<i>Heterodera humuli</i>	S18
	Seq. ID 04JG74	117.2R	<i>Heterodera humuli</i>	S21
8	Seq. ID 04JG78	137.2F	<i>Heterodera humuli</i>	S18
	Seq. ID 04JG77	137.2R	<i>Heterodera humuli</i>	S21

Tab. č. 11: Výsledky sekvenace DNA, BLAST (Tamlerová, 2017).

Osekvenované vzorky ukázaly přítomnost nejen předpokládaného druhu *Heterodera humuli*, ale také druh *Heterodera schachtii*, poměrně v hojném zastoupení (5:3).

6 Diskuze

Fytoparazitická hád'átka mají svou nezastupitelnou roli v rostlinolékařství a tvoří významnou kapitolu v ochraně rostlin. Některá jsou více či méně škodlivá, některá dokonce karanténní. Získané výsledky této diplomové práce náleží pouze k vybrané oblasti Žatecka, z které byly vzorky pořízeny. Žatecká oblast je velmi rozsáhlá, má svá specifika a tvoří většinový produkční podíl této plodiny v celé ČR. Proto jsem ji vybrala do své diplomové práce jako vhodný příklad pro téma Význam fytoparazitických hád'átek pro produkci chmele v ČR. V diplomové práci jsem zkoumala přítomnost, abundanci hád'átek a jejich význam na výnos a kvalitu chmele zastoupenou procentuálním vyjádřením alfa hořkých kyselin obsažených ve chmelových rostlinách na jednotlivých pozemcích.

Jedna část práce byla zaměřena na výskyt osních hád'átek *Ditylenchus dipsaci* a *D. destructor*. Ve svém průzkumu jsem nezaznamenala pozitivní nález osních hád'átek na chmelových rostlinách.

V červenci 1984 v severovýchodním Portugalsku bylo nalezeno hád'átko *Ditylenchus destructor* na sedmi chmelnicích. Dále bylo hád'átko potvrzeno ve Francii, Rumunsku, Řecku bývalé Jugoslávii a na Kypru (Reis, 1985).

Na Novém Zélandu byl potvrzen první pozitivní nález *D. destructor* v roce 1964. V únoru 1979 byl opět zjištěn výskyt hád'átek *D. destructor* na chmelových rostlinách, které vykazovaly příznaky černé hniloby kořenů a zakrslého růstu na chmelnici v oblasti Motueka. Vzorek kořenů obsahoval 204 jedinců hád'átek na gram rostlinné hmoty. Půda obklopující kořeny byla zamořena 522 jedinci na 100 ml. Zdravé rostliny z okolí, které nevykazovaly tyto příznaky, byly téměř bez výskytu nebo jenom s nízkým napadením. Dále byly nalezeny další dva druhy hád'átek *H. humuli* a *Pratylenchus penetrans* (Foot & Wood, 1982). Na Novém Zélandu byly v asociaci se chmelem dále nalezeny druhy hád'átek *Helicotylenchus labiatus* a *Xiphinema diversicaudatum* (Knight *et al.*, 1997).

S tímto hád'átkem *D. destructor* jsou problémy také na Ukrajině a v Číně, kde likviduje porosty batátů.

U nás bylo toto hád'átko poprvé detekováno na chmelnici ve vsi Hředle na Žatecku v roce 2008. V roce 2012 pak byl nalezen v 15 zkoumaných chmelařských oblastech v Čechách i na Moravě. Způsobuje rostlinám poškození kořenového systému, který později uhnívá, příznakem je pomalý růst a vadnutí chmele (Macháček, 2013).

Má diplomová práce ve druhé části byla zaměřena na cystotvorná hád'átka, sběrem půdních vzorků ve stejné oblasti jsem stanovila počet cyst na určitou hmotnost suchého

půdního vzorku. Množství cyst v jednotlivých vzorcích o hmotnosti 300 g se pohybovalo od 0 do 112 cyst. Korelační analýzy vyvrátily statistický význam přítomnosti cystotvorných háďátek na produkci chmele, jak v korelaci s výnosem, tak i v korelaci s obsahem alfa hořkých kyselin.

Cystotvorná háďátka jsou všeobecně velmi destruktivními škodlivými organismy pro své hostitele. Navíc jsou velmi perzistentní, mohou setrvat v klidovém stádiu po celou dekádu nebo i déle bez hostitelské rostliny. Co se týká významu háďátek na chmelovou produkci, autoři se liší svými názory na jejich škodlivost.

Von Mende a McNama (1995) uvedli, že není známo, že by háďátko *Heterodera humuli* způsobovalo škody, ačkoliv se často vyskytuje ve značné populační hustotě, což je překvapivé ve srovnání s jinými cystotvornými druhy, které jsou velmi škodlivé a způsobují velké ztráty na úrodě. Zde se potvrzuje úvaha o značné toleranci chmele k poškození háďátky oproti jiným plodinám.

Ve studii z Austrálie byl pozorován úbytek váhy o 38 % na štok mezi rostlinami na chmelnici s nejvyšší hustotou populace *H. humuli* oproti pozemku s nejnižším výskytem háďátek. Studie naznačuje nutnost přítomnosti velké populační hustoty pro způsobení závažné škody (Warner *et al.*, 2013).

Nedávná studie zkoumala vertikální distribuci druhů v půdním profilu ve střední Evropě, ta je závislá na mohutném kořenovém systému chmele. Rostliny (*Humulus lupulus*) mají dva druhy kořenů, laterální (2 – 5 m dlouhé, vláscité, větvcí se až do vrchní vrstvy horních 20 – 30 cm půdního horizontu) a vertikální kořeny (2 – 9 m dlouhé, masité, nevětvcí se). Vysoká populační hustota byla zaznamenána na mladých vláscitých kořenech (Sen, 1968).

Vertikální distribuce cystotvorných háďátek byla také zkoumána na 17 chmelnicích v České a Slovenské republice, kde jsou pěstovány odrůdy Žatecký poloraný červeňák, Sládek a Premiant, náchylné k cystotvorným háďátkům. Pokusy tohoto druhu lze obtížně zhodnotit hlavně kvůli jiným faktorům, jako je např. vlhkost půdy, teplota, struktura půdy, půdní typ a druh. Ačkoliv největší význam má přítomnost kořenových exudátů hostitelských rostlin a distribuce kořenového systému. Navíc bylo zjištěno, že určující vliv na vertikální výskyt má obsah jílu v hlubokých vrstvách a také vlhkost, dále se příkládá značný význam antropogenním vlivům jako jsou agrotechnické zásahy. Počet zjištěných cyst, larev a dospělců byl relativně malý. Odhaduje se, že je to zapříčiněno organickým hnojením, které hraje významnou roli v prevenci proti výskytu háďátek. Výsledky poukázaly na správnost hypotézy, že podzimní orba způsobuje transport zralých cyst do hlubších vrstev ornice, což může být zdrojem infekce. Stejně tak byla potvrzena přítomnost juvenilních jedinců

v hlubších vrstvách, což pravděpodobně souvisí s rozmístěním vláscitých kořenů chmele ve svrchní vrstvě 0 – 30 cm (Renčo *et al.*, 2011).

Na Slovensku bylo z půdních vzorků identifikováno na devíti lokalitách chmelnic asi padesát druhů volně žijících a deset druhů fytoparazitických háďátek: *Ditylenchus dipsaci*, *Bitylenchus dubius*, *Merlinius brevidens*, *Rotylenchus robustus*, *Helicotylenchus canadensis*, *H. digonicus*, *Pratylenchus penetrans*, *P. pratensis*, *Heterodera humuli* a *Paratylenchus bukowinensis*. *Bitylenchus dubius* a *Merlinius brevidens* patřily k dominujícím druhům, druh *Heterodera humuli* a *Helicotylenchus digonicus* byly minoritní. Výskyt cyst *H. humuli* byl prokázán na všech devíti studovaných lokalitách a výskyt juvenilních jedinců v půdě na podzim ukázal, že tento druh prochází více-generačními cykly během vegetační doby. Převažující poměr různých trofických kategorií byl ku prospěchu bakteriofágů následovaných fytoparazitismem (Lišková & Renčo, 2007).

V Bulharsku byly zaznamenány dva druhy háďátek na chmelu, *Ditylenchus destructor* byl nalezen v 84 % vzorků a *Heterodera humuli* v 52 % s průměrným počtem 8 cyst na 100 g suché zeminy. Odrůda *Savinski* byla náchylnější k infekci než *Wurtemberg* (Katalan-Gateva & Konstantinova-Milkova, 1975).

Od roku 1957 vzorky ze všech chmelnic zkoumaných v Belgii na přítomnost *H. humuli* potvrdily pozitivní výsledek. V průměru se našlo 100 cyst na 100 gramů suché půdy. Na pozemcích se vyskytovaly pouze rostliny druhu *Humulus lupulus* a *Urtica dioica*. Cysty nalezené na kopřivách byly menší než cysty z chmelu (De Grisse & Gillard, 1963).

První nález *Heterodera humuli* ve Španělsku byl zjištěn v roce 1986, na očividně zdravém porostu chmelnic na několika lokalitách v provincii Leon. Terénní studie neprokázaly vztah mezi výskytem háďátek a poklesem produkce chmele. Populace *H. humuli* z chmelnice se nerozmnožovala na rostlinách *Urtica dioica*, což naznačovalo odlišnost od rasy vyskytující se na kopřivách (Lopez & Romero, 1989).

Von Mende & McNama (1995) zjistili výskyt cyst *H. humuli* v každém odebraném půdním vzorku z chmelnice v Anglii. Nejvíce se jich vyskytovalo ve svrchní vrstvě 15 cm, početnost se dvojnásobně zmenšovala s každými 15 cm zeminy do hloubky. Množství juvenilních stádií J2 kolísalo během vegetace, z toho plyne, že produkční trend je více než jedna generace za rok, možná 2 – 3. Období produkce jedné generace je okolo 1,5 měsíce. V nádobových pokusech pod regulovanými podmínkami (20 °C, 16 hod světla během dne) trval životní cyklus 40 dní. Optimální teplota byla 20 °C pro vývoj háďátka chmelového na kořenech své hostitelské rostliny (*Humulus lupulus*). Většina juvenilních stádií pronikla do hostitele při teplotě 15 °C, ale líhnutí vajíček probíhalo nejintenzivněji za teploty 20 °C. Ve

vlhké půdě juvenilní stádium J2 přežívalo po dobu alespoň 54 dní a poté byly napadeny kořeny a probíhala reprodukce. V nádobových pokusech inhibovalo háďátko chmelové růst rostliny, když jeho populace přesáhla 500 vajíček na gram půdy. Vývoj *H. humuli* byl testován na sedmi kultivarech chmele. Nebyl zde nalezen žádný rozdíl v počtu nově produkovaných cyst na jednotlivých kultivarech, ale velikost cyst se lišila značně. Největší cysty byly nalezeny na divokém chmelu, naopak na jednom z kultivarů byly cysty nejmenší. U kultivarů *Northdown* a *Target* neměl výskyt háďátek nebo výskyt *Verticillium albo-atrum* vliv na délku výhonů. Růst napadených kultivarů náchylných na sucho byl značně snížen, pokud byla přítomna i patogenní houba *Verticillium albo-atrum*. Patogen *Verticillium spp.* neměl značný vliv na rozmnožování *H. humuli* v laboratorních ani polních podmínkách, ačkoliv líhnutí juvenilních stádií bylo opožděno o dva týdny, více těchto stádií bylo nalezeno na chmelnicích během pozdního léta na kořenech napadených tímto patogenem.

Háďátka mohou interagovat s patogenem *Verticillium spp.* a omezit tak růst rostlin a zvyšovat projevy vadnutí. Jiný druh háďátek známý ve spojitosti s chmelem, *Longidorus elongatus*, byl potvrzen v Německu, tento druh může mít velmi destruktivní dopad a též přenášet nepoviry. Hálkotvorná háďátka (*Meloidogyne spp.*) způsobují celosvětově největší ekonomické ztráty napříč celé spektrum zemědělských plodin. Háďátka druhu *M. hapla* je nejvíce frekventovaný doposud objevený druh v mírném pásmu USA, ale nebyl hlášený v asociaci s chmelem. Kultivary chmele se liší svou náchylností na cystotvorná háďátka. V Oregonu byly cysty nalezeny u kultivarů *Backa*, *Brewer's Gold*, *Bullion*, *Fuggle* a *Kent*, ale v Idaho kultivar *Cascade* vykazoval vyšší zamoření než u jiných. Ve většině případů se chmel však jeví jako tolerantní k parazitním háďátkům (Warner *et al.*, 2013).

V Jihoafrické republice se chmel začal pěstovat v roce 1917. Oblast George je jedinou v této zemi, kde se nachází komerčně-produkční plocha této plodiny. V roce 1991 bylo osázeno 90 % (z rozlohy 450 ha) místními kultivary *Southern Brewer* a 10 % australským kultivarem *Pride of Ringwood*.

V ostatních zemích se dříve používala fumigace půd na odstranění háďátek. V Jihoafrické republice se žádná tato fumigační ošetření proti háďátkům nepoužila. Byl uskutečněn pokus s fumigací před výsadbou, při kterém se zjistilo, že snížení výnosu chmele přisouzený háďátkům může být až o 23 % na hektar z nově vysazených rostlin. Průzkum určil, které druhy háďátek se vyskytují na chmelnicích v Jihoafrické republice. Pěstební plocha byla rozdělena do tří částí. Odebíraly se vzorky půdy a byl zaznamenán počet cyst. Rody *Helicotylenchus*, *Rotylenchus* nebo *Scutellonema* byly nalezeny v každé zkoumané oblasti. Následoval počet háďátek rodů *Pratylenchus*, *Paratrichodorus*, *Paratylenchus*, *Meloidogyne*,

Heterodera a *Criconebella*. Identifikovalo se 16 druhů a 12 rodů. Spirálovitá háďátka zahrnovala nejvyšší zastoupení, v oblasti Quteniqua celkem přes 90 % nalezených druhů. Endo a semi-endoparazitě (*Pratylenchus*, *Meloidogyne* a *Heterodera*) byli nalezeni ve všech třech oblastech. V oblasti Waboonskraal bylo nejvyšší zastoupení rodu *Pratylenchus* (18 %), v lokalitě Herold *Meloidogyne* (21 %) a *Heterodera* (3 %). Pokud se množení provádí chmelovou sádí z pozemku již zamořeného, pak jsou i nově založené chmelnice infikovány přítomnými háďátkami. *Heterodera humuli* bylo pravděpodobně zavlečeno do jižní Afriky ještě před tím než vznikly současné striktní karanténní opatření. Nejvíce larev bylo z rodů *Heterodera* 7 800 ks a *Meloidogyne* 15 370 kusů, v 250 ml půdy z pozemku v oblasti Outeniqua. Tato čísla by měla pěstitele donutit provést předběžné opatření. Nové chmelnice by měly být testovány ohledně přítomnosti a úrovně zamoření háďátka před osázením, popřípadě zjistit potřebu a způsob ošetření těchto pozemků. Vhodné je využívat metody k ozdravení množícího materiálu, např. ošetření horkou vodou nebo máčení v nematocidech. Pokud je kořenový systém ve stresu (sucho nebo deficit ve výživě), může se vliv háďátek stát zásadním (Malan *et al.*, 1991).

Heterodera humuli na Novém Zélandu byl poprvé popsán v roce 1963 (Knight, *et al.*, 1997).

Hospodářský význam cystotvorných háďátek v Severní Americe pro komerčně pěstované plodiny mají *Globodera rostochiensis*, *G. pallida*, *G. tabacum*, *Heterodera glycines*, *H. schachtii*, *H. crucifera*, *H. triforii* a *H. avenae*. *H. zae* parazituje na kukuřici v některých oblastech v Marylandu, ale jeho důležitost jako škodlivého organismu se v severní Americe doposud neprokázala. Druhy, které mohou značně škodit v mimořádných situacích, jsou např. *Cactodera cacti* parazitující na kaktusech, *Punctodera punctata* na pšenici, *Heterodera lespedeza* na lespedézii, *H. fici* na fíkovníku, *H. humuli* na chmelu a *H. carotae* na mrkvi, tyto druhy ale zatím obecně nemají hospodářskou škodlivost na plodinách v Severní Americe (Miller, 1986).

Ve Francii nebyla zpozorována zřetelnost patogenity chmele, i když úroveň zamoření byla 500 cyst na 100 cm³ půdy. Ani Šedivý nezjistil patogenní stav v poměrně vysokém zamoření (až 342 cyst na 100 g půdy). Dmitriev však určil *H. humuli* bezvýhradně za patogenní (Decker, 1989).

Význam fytoparazitických háďátek pro chmel jednoznačně existuje, avšak v praxi se neprojevují značné škody na produkci, jelikož pro výnos a kvalitu chmelových hlávek je rozhodující hlavně průběh počasí v období těsně předcházejícím sklizni. Např. rok 2015 byl nepříznivý pro produkci chmele kvůli nadměrnému suchu a horku, které se dotklo téměř celé

Evropy, Německo hlásilo pokles produkce až o 30 %. Hlávky byly podstatně menší a obtížně se česaly.

Populace háďátek je ovlivňována organickým hnojením, které se v Čechách běžně provádí. Dalším zásadním agrotechnickým opatřením je vápnění půdy a s tím související pH půd. Takováto ošetření pozemků podporují nematocidní účinky. Důležitou roli hraje výživa a ochrana rostlin vůči jiným škodlivým organismům. Je-li celkový zdravotní stav rostlin na nejlepší možné úrovni, projeví se to pozitivně i na produkci. Trpí-li rostliny nedostatkem některé z životně důležitých podmínek pro správný růst a vývoj, pak se to projeví opět na produkci, avšak v negativním smyslu.

V roce 2012 došlo k celkovému poklesu produkce spojené s úbytkem chmele a vymíráním chmelových rostlin v rámci České republiky. Příčina vymírání chmele byla ovlivněna komplexem činitelů. Klimatické faktory daný rok nebyly příznivé. Mnoho starších chmelnic bylo podmáčených velmi extrémním způsobem již z minulých let. Porosty byly atakovány nárůstem populace půdních houbových patogenů. Zkoumal se i obsah háďátek při rozboru půdních vzorků. V červnovém odběru byla prokázána přítomnost *Ditylenchus destructor*, ale odběry v srpnu potvrdily pouze sekundární výskyt tohoto druhu s návazností na přítomnost houbových patogenů. Závěrečné ustanovení nepředpokládá významnou škodlivost a háďátko nelze považovat za původce vymírání chmelových rostlin. Pouze za sekundární škodlivý organismus, jehož výskyt je trvale vázán na chmelové babky, aniž by zde způsobovalo ekonomicky významnou škodu (Anonym 7, 2017).

7 Závěr

V rámci diplomové práce byl tento detekční průzkum z roku 2014 zaměřen na chmelařskou produkční oblast Žatecka. Sledoval se význam fytoparazitických háďátek pro produkci chmele na daném území. Půdní i rostlinné vzorky byly získány ze tří lokalit – Žatec, Staňkovice a Běsno.

Celkem bylo odebráno 160 vzorků půdy ze 44 parcelních bloků. K jednotlivým vzorkům je uvedena přesná lokace pomocí souřadnic dle GPS, odrůda, která se na daném pozemku pěstuje, výnos a hodnota α hořkých kyselin obsažených v jednotlivých odrůdách expertně stanovených v dané vegetační období. Dále byla zpracována data ke každému vzorku o počtu nalezených cyst sedentérních háďátek flotační metodou Fenwickovy konve. Množství nalezených cyst jsou v rozpětí mezi 0 – 112 cyst na 300 g půdy. Výnosy chmele se pohybují mezi 5,1 – 21,1 q/ha a hodnota alfa v rozmezí 2,58 – 9,63 %. Dalším krokem byla laboratorní metoda, která byla provedena u 140 vzorků cyst. Zahrnovala fixaci vzorků do trvalých preparátů, extrakci DNA z biologického materiálu, následnou polymerázovou řetězovou reakci a finální sekvenování DNA. Rozbor jednotlivých cyst pomocí molekulárně biologických metod identifikoval 8 vybraných vzorků. Výsledky ukázaly, že z 8 vzorků bylo 5 cyst druhu *Heterodera humuli* a 3 cysty druhu *Heterodera schachtii*.

Data o množství nalezených cyst spolu s kvalitativními a kvantitativními parametry produkce chmele byla statisticky vyhodnocena. Korelační analýza mezi počtem cyst a výnosem neprokázala statistický význam. Stejně tak korelace mezi množstvím cyst v jednotlivých vzorcích a obsahem alfa hořkých kyselin.

V druhé části bylo odebráno 25 rostlinných vzorků z 19 chmelnic ve vybrané produkční oblasti, testovaných na přítomnost osních háďátek (*Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor*). Jejich přítomnost se nepotvrdila u žádného vzorku.

8 Seznam literatury

- Anonym1. *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor* [on-line]. ISPM 27 Diagnostic protocols. Annex 8. 2015. [cit. 2017-1-21]. Dostupné z https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2016/09/DP_08_2015_2004-017_Ditylenchus_dipsaci_and_Ditylenchus_destructor_2015-09-21_REV.pdf.
- Anonym 1a. *Ditylenchus dipsaci* [on-line]. DBpedia. 2017. [cit. 2017-3-20]. Dostupné z http://dbpedia.org/page/Ditylenchus_dipsaci.
- Anonym 1b. Fenwick can [on-line]. MEKU. 2017. [cit. 2017-4-10]. Dostupné z <http://www.meku-pollaehne.de/Home/NEMATODE-instruments/Fenwick-can/fenwick-can.html>.
- Anonym 2. 2008. *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*. OEPP/EPPO Bulletin, Vol. 38. No. 1, p. 363-373.
- Anonym 2a. *Ditylenchus dipsaci* [on-line]. Forestry images. 2017. [cit. 2017-3-20]. Dostupné z <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5476502>.
- Anonym3. Nematoda [on-line]. Zoologie pro veterinární mediky 2015.[cit.2017-1-21]. Dostupné z <http://www.zoologie.frasma.cz/mmp%200209%20hlistice/hl%C3%ADstice.html>.
- Anonym 3a. *Ditylenchus destructor* [on-line]. 2017. [cit. 2017-3-15]. Dostupné z <http://nematode.unl.edu/didestr.htm>.
- Anonym 4. Data Sheets on Quarantine Pests *Ditylenchus destructor* [on-line]. EPPO. 2017. [cit. 2017-1-12]. Dostupné z https://www.eppo.int/QUARANTINE/data_sheets/nematodes/DITYDE_ds.pdf.
- Anonym 5. *Ditylenchus destructor* Thorne - Potato Rot Nematode [on-line]. Canadian Food Inspection Agency. 2013. [cit. 2016-12-1]. Dostupné z <http://www.inspection.gc.ca/plants/plant-pests-invasive-species/nematodes-other/potato-rot-nematode/eng/1326330708349/1326330805394>.
- Anonym 6. Proces pěstování a sklizně chmele [on-line]. Hopservis s.r.o. 2016. [cit. 2017-2-16]. Dostupné z <http://www.hopservis.cz/process.html>.

- Anonym 7. Příčiny vymírání chmelových rostlin v jarním období 2012. Chmelařský institut Žatec. 2017. [cit. 2017-3-1]. Dostupné z <<http://www.chizatec.cz/download/page4640.pdf>>.
- Anonym 8. BLAST [on-line]. National Center for Biotechnology Information. 2017. [cit. 2017-3-20]. Dostupné z: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.
- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T. 2010. Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva. VŠCHT Praha, 1. vyd., s. 904.
- Behre, K. E. 1999. The History of Beer Additives in Europe. *Vegetation History and Archaeobotany*, 8, p. 35-48.
- Block, V. C., Phillips, M. S., McNicol, J. W., Fargette, M., 1997. Genetic variations in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. *Fundamental and Applied Nematology* 20, p. 127-135.
- Burlage, R. S., Atlas, R. M., Stahl, D., Geesey, G., Sayler, G. 1998. *Techniques in microbial ecology*. Oxford University Press, New York, p. 468.
- Čermák, V., Gaar, V. 2013. Listy cukrovarnické a řepařské. *LCAŘ* 129, č. 9–10, s. 275-282.
- De Grisse, A., Gillard, A. 1963. Morphology and Biology of Hop Cyst Eelworm (*Heterodera Humuli* Filipjev 1934). *Nematologica*, Vol. 9, 1, ISSN: 0028-2596, p. 41-48.
- De Lay, P., Blaxter, M. 2003. A new system for Nematoda: Combining morphological characters with molecular trees and translating clades into ranks and taxa. *Nematological Monographs and Perspectives*, p. 20-21.
- De Waele D, Wilken R. 1990. Effect of temperature on the *in vitro* reproduction of *Ditylenchus destructor* isolated from peanut. *Revue de Nématologie*, 13: p. 171–174.
- Decker, H. 1989. *Plant Nematodes and Their Control (Phytonematology)*. Amerind Publishing, p. 540.
- Donn, S., Griffiths, B. S., Nielson, R., Daniell, T. J. 2008. DNA extraction from soil nematodes for multisample community studies. *Applied Soil Ecology* 38, p. 20-26.
- Douda, O. 2008. *Metody monitoringu, diagnostiky a hodnocení škodlivosti karanténních háďátek rodu Ditylenchus*. Vyd. 1. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, ISBN 978-80-7427-003-1, s. 39.

- Dubernet, S. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters* 214, ISSN 0378-1097, p. 271-275.
- Eroshenko, A.S., Subbotin, S.A., Kazachenko, I.P. (2001). *Heterodera vallicola* sp. n. (Tylenchida: Heteroderidae) from elm trees, *Ulmus japonica* (Rehd.) Sarg. in the Primorsky territory, the Russian Far East, with rDNA identification of closely related species. *Russian Journal of Nematology* 9, p. 9-17.
- Erlich H. A., 1989. PCR TECHNOLOGY Principles and Applications for DNA Amplifications. Stockton Press, New York, p. 235.
- Esquibet, M., Caubel, G., Plantard, O., Abbad Andaloussi, F. 2003. DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: development of diagnostic markers for normal and giant races. *Genome* 46, p. 1077-1083.
- Ferris, H., Bongers, T. 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Tree*, Vol. 14, No. 6, p. 224-227.
- Foot, M. A. Wood, F. H. 1982. Potato rot nematode, *Ditylenchus destructor* (Nematoda: Tylenchidae), infecting hops in New Zealand. *New Zealand J. exp. Agric.*, 10: p. 443-446.
- Gaar, V. 2001. *Rostlinolékař*. Praha: SRS.
- Gaar, V. 2004. *Rostlinolékařská terminologie, Charakteristika nematod*. *Plant Protection Science*, Vol. 40 No. 2, s. I-LVI.
- Gaar, V., Čermák, V. 2012. Hlístice v půdním profilu vybraných chmelnic. Vol. 4 *Rostlinolékař*, s.12-18.
- Greco, N., Volvas, N., Inserra, R. N. 1991. The stem and bulb nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Nematology Circular*, No. 187, p. 4.
- Gus'kova, L. A. 2016. Hop Cyst Nematode [on-line]. *Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries*. [cit. 2016-12-1]. Dostupné z <http://www.agroatlas.ru/en/content/pests/Heterodera_humuli/>.
- Hajšl, J. Chmelař Hajšl [on-line]. 2005. [cit. 2017-1-6]. Dostupné z <http://chmelar.hajsl.cz/71_2000.php>.
- Handoo, Z. A. 1998. Plant-parasitic nematodes [on-line]. USDA, ARS, Nematology Laboratory. [cit. 2016-10-3]. Dostupné z <<https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md/beltsville-agricultural-research-center/nematology-laboratory/docs/plant-parasitic-nematodes/>>.

- Hooper, D. J., Cowland, J. A. 1986. Fungal hosts for the chrysanthemum nematode, *Aphelenchoides ritzemabosi*. *Plant Pathology*, Vol. 35, 1, p. 128-129.
- Horejšek, J., Zich, M., 1990. *Chmelařství*. SZN, Praha, s. 285.
- Chitambar, J. *Ditylenchus destructor*, Thorne 1945. Pest Rating Proposals and Final Ratings. 2016. [cit. 2016-12-27]. Dostupné z <http://blogs.cdfa.ca.gov/Section3162/?p=2649>.
- Chrumbach, A., Dunn, M. J., Radola, B. J. 1987. *Advances in Electrophoresis*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, Germany, s. 440.
- Karczmarek, A. 2006. *Dissecting host plant manipulation by cyst and root-knot nematodes*, Wageningen: Ponsen & Looijen BV, ISBN: 90-8504-464-2, p. 120.
- Katalan-Gateva, S., Konstantinova-Milkova, M. 1975. Two species of parasitic nematodes on hop in Bulgaria. *Zoologiya*, Vol. 68, p. 49-56.
- King, R.C., Stansfield, W. D., Mulligan, P.K. 2006. *A dictionary of Genetics*, Seventh Edition, Oxford University Press, p. 98.
- Knight, K. W., Barber, C., Page, G. 1997. Plant-parasitic Nematodes of New Zealand Recorded by Host Association. Supplement to the *Journal of Nematology* 29, p. 640-656.
- Kořen, J. Sušení chmele na komorových sušárnách [on-line]. Chmelařský institut s.r.o. 2008. [cit. 2016-6-23]. Dostupné z https://invenio.nusl.cz/record/170482/files/nusl-170482_1.pdf.
- Králová, T. Plochy českých chmelnic nejnižší od roku 1871 [on-line]. *Zemědělec*. 2005. [cit. 2017-1-12]. Dostupné z <http://zemedelec.cz/plochy-ceskych-chmelnic-nejnizsi-od-roku-1871/>.
- Křemen, J., Pohlreich, P., Stříbrná, J. 1998. *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Karolinum Praha, s. 117.
- Lee, D. L. 2002. *The Biology of Nematodes*. Taylor & Francis; New York, p. 648.
- Lišková, M., Renčo, M. 2007. Communities of free living and plant parasitic nematodes in hop gardens in Slovakia. *Helminthologia* Vol. 44, No. 2, s. 80-86.
- Lopez, D. J., Romero, M. D. 1989. First rekord of *Heterodera humuli* Filipjev in Spain. *Nematologia Mediterranea*, Vol. 17, No. 1, p. 33-34.
- Luc, M., Sikora, R. A., Bridge, J. 2005. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Cabi, p. 871.
- Macháček, T. Hádátka útočí na české chmelnice [on-line]. *Biomach*. 2013. [cit. 2017-1-12]. Dostupné z <http://www.biomach.cz/oznameni/hadatkoutocinaceskechmelnice>.

- Malan, A. P., Pieterse, W., Brits, G. 1991. Plant Parasitic Nematodes associated with hops (*Humulus lupulus*) in South Africa. *Phytophylactica*, Vol. 23, No. 2, p. 173-177.
- Mende, N. V., Mcnamara, D. G. 1995, Biology of the hop cyst nematode *Heterodera Humuli*. *Annals Of Applied Biology*, Vol. 126, p. 505–516.
- Miffin, T. E., Sansieri, C. A., Kapp, D. W., Casciato, J. 1994. Characterisation of a rapid method for isolation of genomic DNA suitable for amplification. *Clinical Chemistry*, Vol. 40, No. 6, p. 1091-1092.
- Miller, L. I. 1986. Economic Importance of Cyst Nematodes in North America. *Cyst Nematodes*, Vol. 121, p. 373-385.
- Moreira, F. M., Oswaldo, J., Brussaard L. 2006. Soil Biodiversity an Amazonia and Other Brazilian Ecosystems. CABI, p. 280.
- Mulvey, R. H., Golden, M. A. 1983. An Illustrated Key to the Cyst-forming Genera and Species of Heteroderidae in the Western Hemisphere with Species Morphometrics and Distribution. *Journal of Nematology*, Vol. 15, No. 1, p. 1-59.
- Murakami, A., Darby, P., Javornik, B., Svoboda, P., Pais, M. S., Seigner, E., Lutz, A. 2006. Molecular phylogeny of wild Hops. *Heridity* Vol. 97, p. 66-74.
- Němec, J. 2001. Bonitace a oceňování zemědělské půdy České republiky. VÚZE, Praha, s. 260.
- Palm, C. E., Dykstra, W. W., Hansberry, R. 1968. Principles of Plant and Animal Pest Control (Vol. 4 Control of Plant-Parasitic Nematodes). National Academy of Sciences, p. 205.
- Perry, R. N., Moens, M. 2006. Plant Nematology. CABI, p. 445.
- Poinar Jr., G. O. 2011. The Evolutionary History of Nematodes: as revealed in stone, amber and mummies. Brill, p. 453.
- Reis, L. G. First Report of *Ditylenchus destructor* in Portugal [on-line]. The American Phytopathological Society. 1985. [cit. 2016-12-10]. Dostupné z <https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1985Abstracts/PD_69_451b.htm>.
- Renčo, M., Čermák, V., Gaar, V. 2011. Vertical Distribution of Hop Cyst Nematode in Hop Gardens in Central Europe. *The Journal of Nematology*, Vol. 43 No. 3-4, s. 220-222.
- Roberts, P.A. 1993. The future of nematology: integration of new and improved management strategies. *Journal of Nematology*, 25, p. 380-394.
- Rosypal, S. 2000. Úvod do molekulární biologie. Brno, s. 996.

- Rybáček, V. 1980. Chmelařství. SZN, Praha, s. 426.
- Sen, A. K. Bionomics of the hop cyst nematode, *Heterodera humuli* Filipjev, 1934 [on-line]. 1968. [cit. 2016-11-20]. Dostupné z <<https://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/46749/SenArunK1968.pdf?sequence=3>>.
- Shibata, D. 1994. Preparation of Nucleic Acids for Archival Material, In the Polymerase Chain Reaction, Birkhauser, Boston, p. 47-54.
- Shurtleff, M. C., Averre, C. W. 2000. Diagnosing Plant Diseases Caused by Nematodes. American Phytopathological Society, ISBN: 0-89054-254-6, p. 187.
- Skantar, A. M., Carta, L. K. 2005. Multiple displacement amplification (MDA) of total genomic DNA from *Meloidogyne* spp. and comparison to crude DNA extracts in PCR of ITS1, 28S D2-D3 rDNA and Hsp90. *Nematology* 7, p. 280-295.
- Slonek, Z. Situační a výhledová zpráva, chmel, pivo [on-line]. Mze eagri.cz. [cit. 2014-12-2]. Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/file/433497/SVZ_Chmel_2014.PDF>.
- Small, E. A. 1978. Numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. *Systematic Botany*. American Society of Plant Taxonomists, Vol. 3, p. 37-76.
- Šmarda, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, ISBN 80-210-3841-1, s. 48-79.
- Šnorbl, J., Pulkrábek, J. a kol. 2011. *Základy rostlinné produkce*, FAPPZ, ČZU v Praze, ISBN 978-80-213-1340-8, s. 174.
- Táborský, M. Národní klenoty. Žatec, zelené zlato [on-line]. Česká televize. [cit. 2017-3-11]. Dostupné z <<http://www.ceskatelevize.cz/porady/10361869257-narodni--klenoty/215562235200002-zatec-zelene-zlato/>>.
- Thorne, G. 1945. *Ditylenchus destructor* n. sp. the potato rot nematode, and *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936, the teasel nematode (Nematoda: Tylenchidae). *Proceedings of the helminthological Society of Washington*, 12(2), p. 27-34.
- Tizard, I.R. 1996. *Veterinary Immunology – an Introduction*. Saunders co., Philadelphia, p. 92-103.
- Tseng, S. – T. 1966. An Ecological Study of *Ditylenchus Dipsaci* (Kuhn) Filipjev, in a Field of Alfafla [on-line]. Utah State University. 1966. [cit. 2017-1-27] Dostupný z <<http://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=3863&context=etd>>
- Vlk, F. 1985. *Ochrana rostlin, Nematologie obecná a speciální*. ČZU, s. 157.

- Warner, F. W., Bird, G. W., Hay, F. S., Serrine, R., Gent, D. H. 2013. Field Guide for Integrated Pest Management in Hops. Washington State University, p. 122.
- Zouhar, M., Mazáková, J., Gaar, V. 2008. Diagnostické metody významných háďátek rodu *Aphelenchoides* v podmínkách ČR. ČZU v Praze, ISBN: 978-80-213-1748-2, s. 30.

9 Seznam použitých zkratek

aj. – a jiné

a kol. – a kolektiv

ČR – Česká republika

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EB – ethidiumbromid

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

ELFO – elektroforéza

EPPO – Evropská a středozevní organizace na ochranu rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organisation)

EPZ – Eppendorf zkumavka

et al. – „et alii“ = a kolektiv

GPS – navigační systém (Global Positioning System)

J2 – druhé larvální stádium háďátka

JZD – jednotné zemědělské družstvo

LB – lysis buffer

LPIS – Land Parcel Information System

NA – nukleová kyselina

např. – například

PCR – polymerázová řetězová reakce

rDNA – ribozomální DNA

RNA – ribonukleová kyselina

tzv. – tak zvaný

USA – Spojené státy americké

UV – ultrafialové záření

10 Seznam v textu uvedených tabulek, obrázků a grafů

10.1 Seznam tabulek

Tab. č.1: Morfometrické údaje *Ditylenchus dipsaci* (v μm)(Douda, 2008).

Tab. č.2: Morfometrické údaje *Ditylenchus destructor* (v μm) (Douda, 2008).

Tab. č. 3: Morfometrické údaje k J2 (v μm) (Eroshenko *et al.*, 2001).

Tab. č. 4: Pohlavní determinace jednotlivých druhů cyst *Heterodera* (Eroshenko *et al.*, 2001).

Tab. č. 5: Semispecifické primery (Tamlarová, 2017).

Tab. č. 6: Charakteristika odebraných půdních vzorků (Tamlarová, 2017).

Tab. č. 7: Statistický výstup 1 (Tamlarová, 2017).

Tab. č. 8: Statistický výstup 2 (Tamlarová, 2017).

Tab. č. 9: Výstup z www.blast.ncbi.nlm.nih.gov (Tamlarová, 2017).

Tab. č. 10: Výsledky sekvenace DNA (Tamlarová, 2017).

Tab. č. 11: Výsledky – osní háďátka (Tamlarová, 2017).

10.2 Seznam obrázků

Obr. č. 1: Fenwickova konev (Anonym 1b, 2017).

Obr. č. 2: Fotografie – vulva cysty (vzorek č. 52) (Tamlarová, 2017).

Obr. č. 3: Fotografie embryonů – *Heterodera schachtii*(Tamlarová, 2017).

Obr. č. 4: Elektroforeogram (Tamlarová, 2017).

10.3 Seznam grafů

Graf č. 1: bodový graf – korelace mezi počtem cyst a výnosem (Tamlarová, 2017).

Graf č. 2: bodový graf – korelace mezi počtem cyst a hodnotou alfa (Tamlarová, 2017).

11 Přílohy

11.1 Seznam příloh

Obr. č. 5: *Ditylenchus dipsaci* – ilustrace (Anonym 1a, 2017).

Obr. č. 6: *Ditylenchus dipsaci* – stylet (Anonym 2a, 2017).

Obr. č. 7: *Ditylenchus destructor* – ilustrace (Anonym 3a, 2017).

Obr. č. 8: *Heterodera humuli* – larva a cysta (Sen, 1968).

Obr. č. 9: Životní cyklus – *Heterodera humuli* (Sen, 1968).

Obr. č. 10: Fotografie –*H. humuli*– cysty (Čermák, 2017)

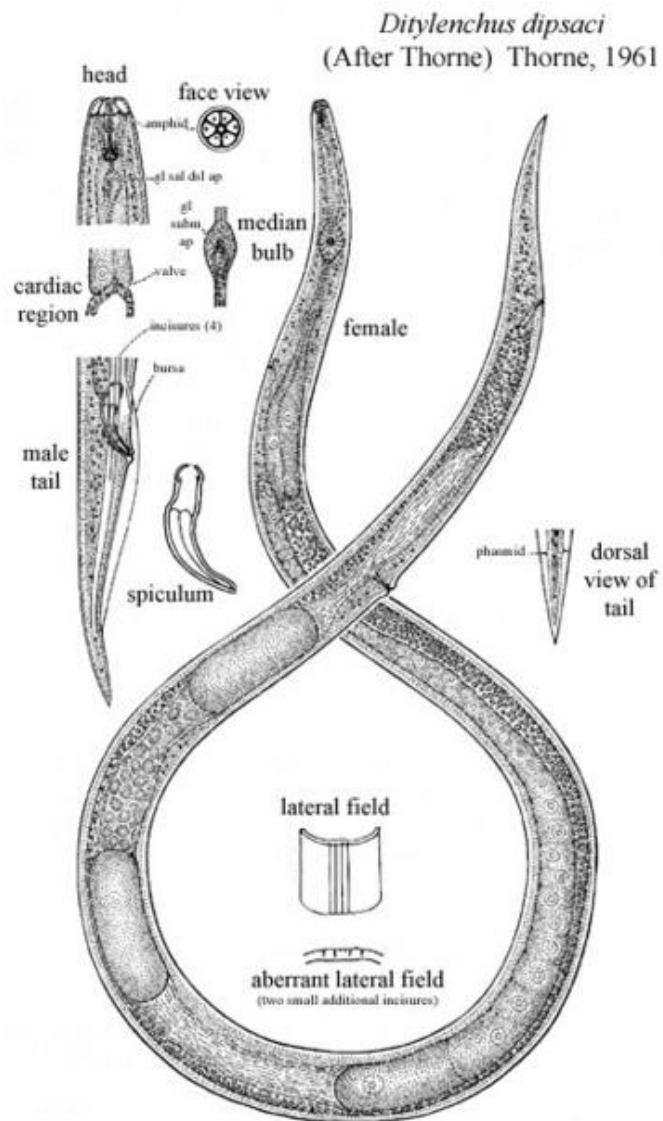
Obr. č. 11: *Heterodera humuli* – vulva (Čermák, 2017).

Obr. č. 12: Mapa č. 1 – Žatec (Tamplerová, 2017).

Obr. č. 13: Mapa č. 2 – Staňkovice (Tamplerová, 2017).

Obr. č. 14: Mapa č. 3 – Běsno 1 (Tamplerová, 2017).

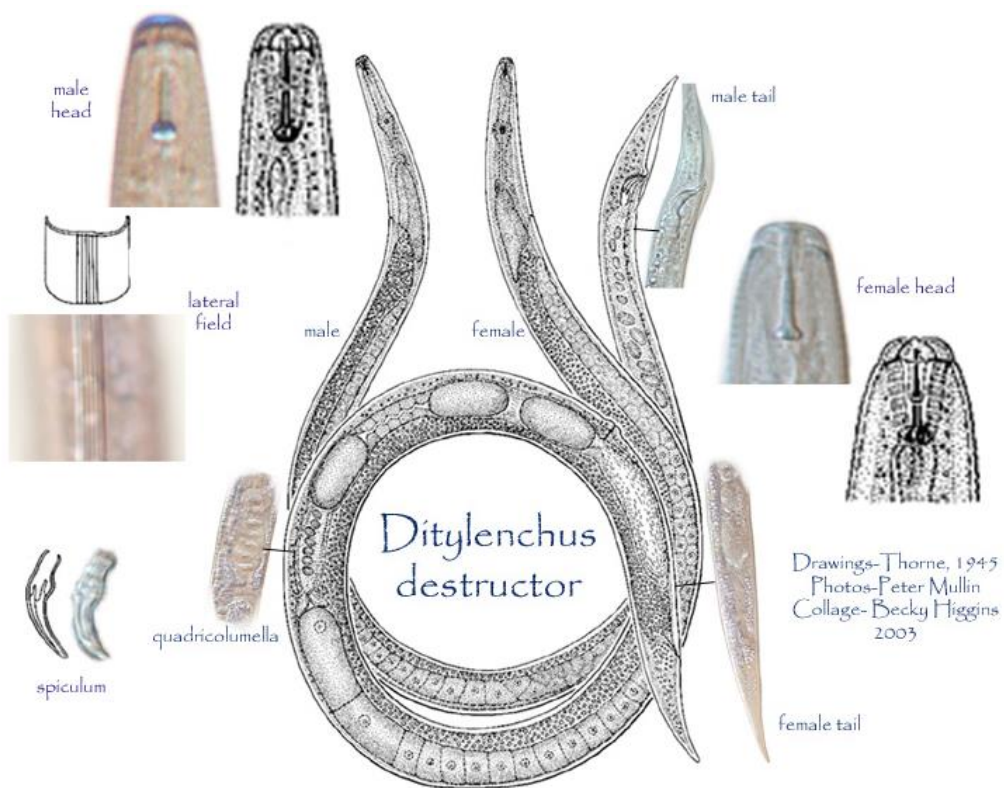
Obr. č. 15: Mapa č. 4 – Běsno 2 (Tamplerová, 2017).



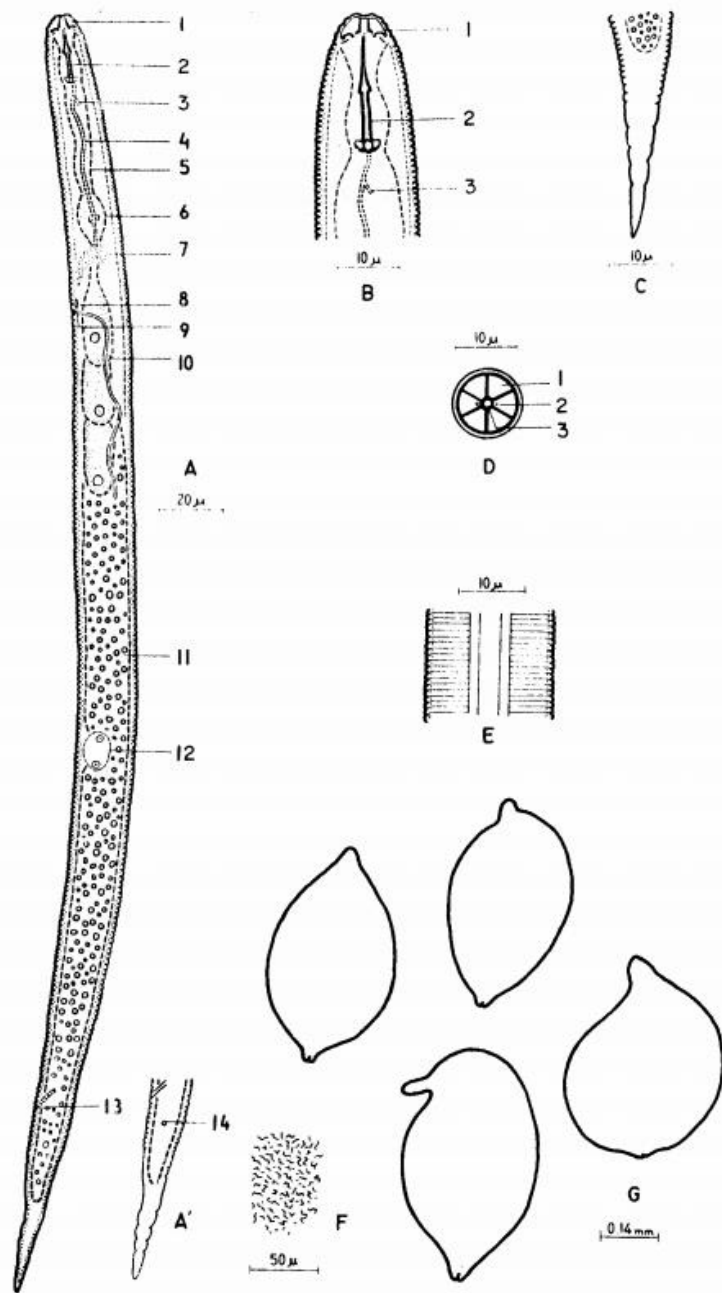
Obr. č. 5: *Ditylenchus dipsaci* – ilustrace (Anonym 1a, 2017).



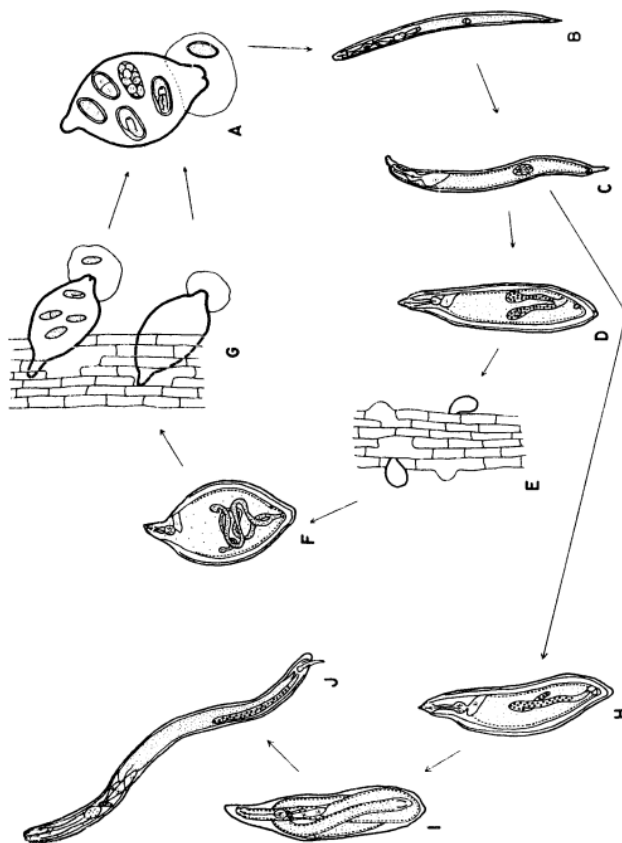
Obr. č. 6: *Ditylenchus dipsaci* – stylet (Anonym 2a, 2017).



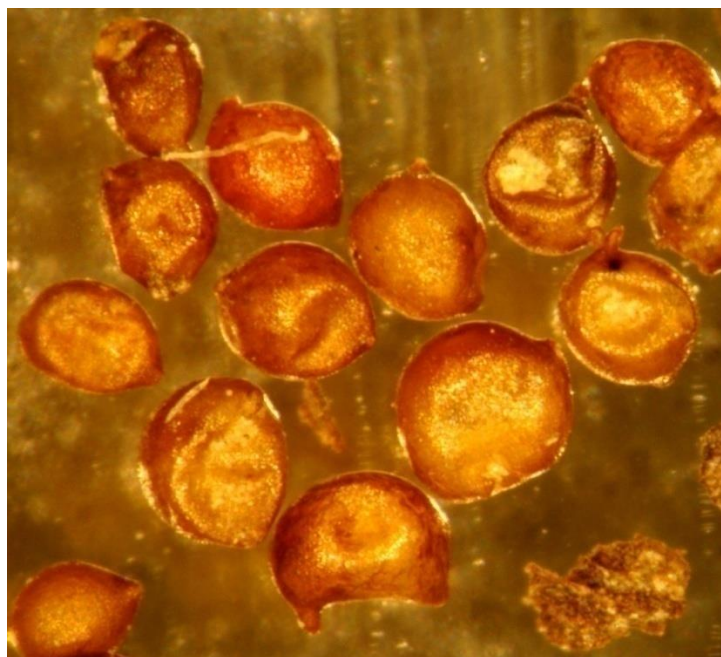
Obr. č. 7: *Ditylenchus destructor* – ilustrace (Anonym 3a, 2017).



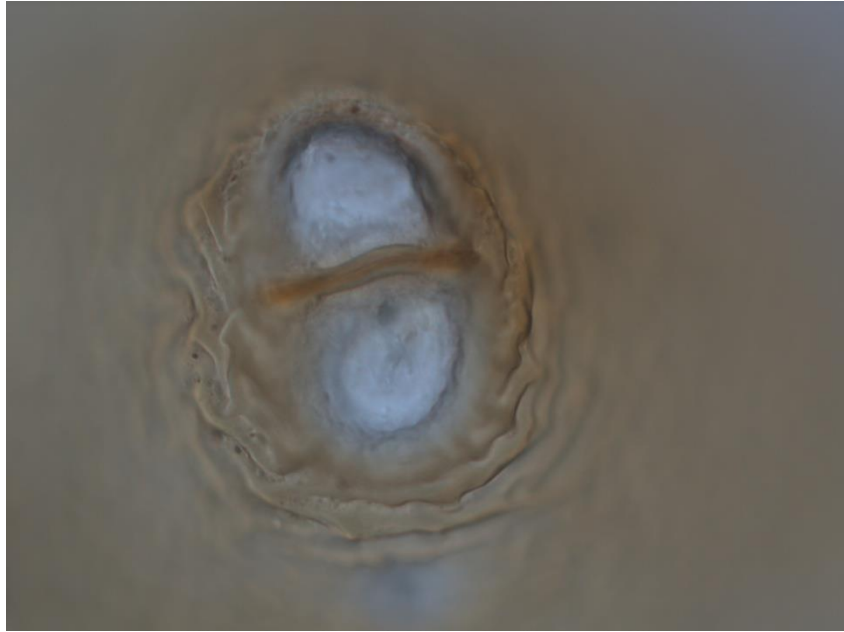
Obr. č. 8: *Heterodera humuli* – larva a cysta (Sen, 1968).



Obr. č. 9: Životní cyklus – *Heterodera humuli* (Sen, 1968).



Obr. č. 10: Fotografie –*H. humuli*– cysty (Čermák, 2017).



Obr. č. 11: *Heterodera humuli* – vulva (Čermák, 2017).

