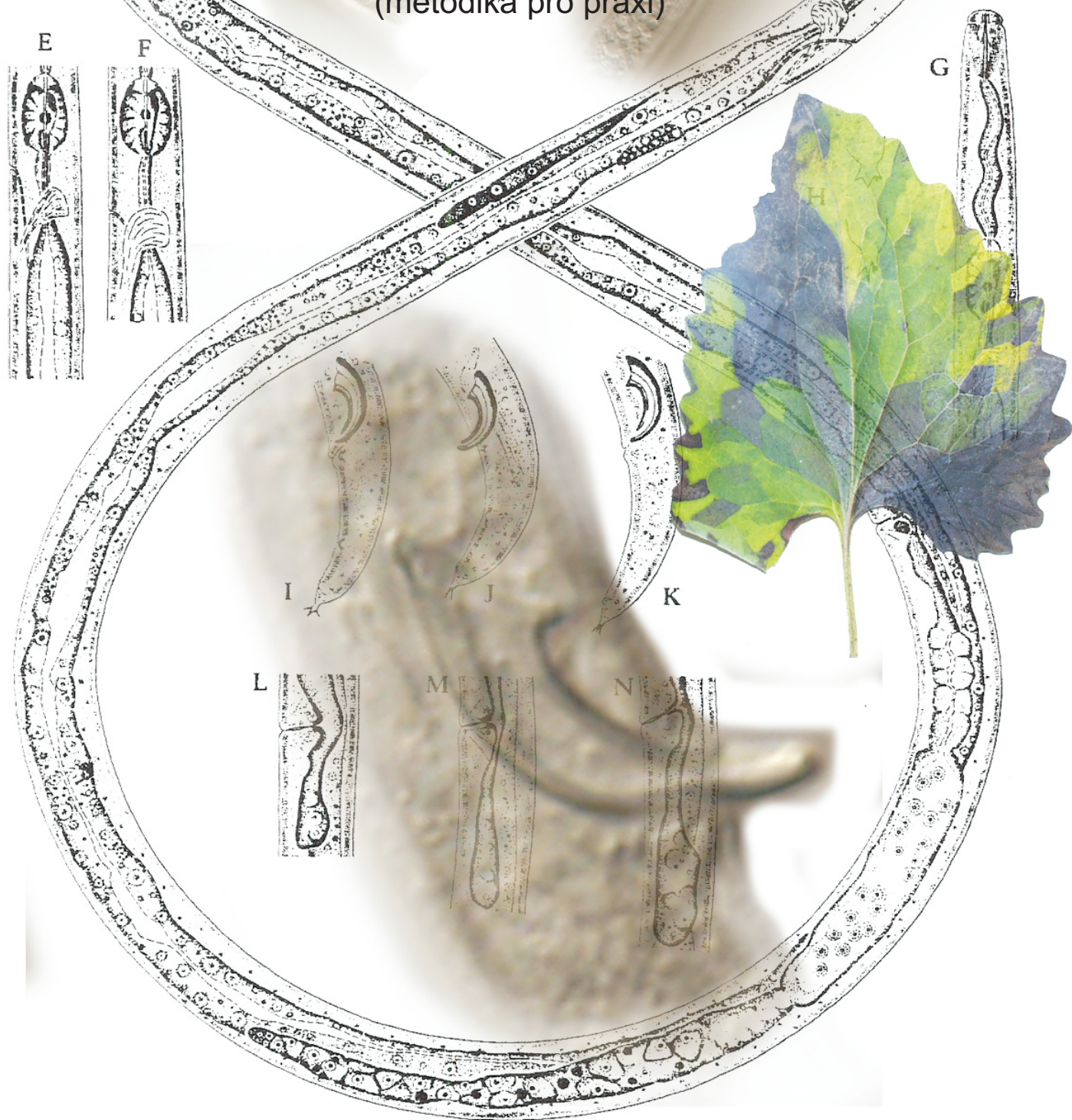


ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH
A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

Diagnostické metody významných háďátek rodu
Aphelenchoides v podmínkách ČR
(metodika pro praxi)



ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH
A PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ

Diagnostické metody významných hád'átek rodu
Aphelenchoides v podmínkách ČR.
(metodika pro praxi)

Zouhar Miloslav, Mazáková Jana, Gaar Vladimír

© Miloslav Zouhar

ISBN: 978-80-213-1748-2

Diagnostické metody významných hádčátek rodu *Aphelenchoides* v podmínkách ČR.
(metodika pro praxi)

Obsah

1.CÍL METODIKY A DEDIKACE	- 2 -
2.VLASTNÍ POPIS METODIKY	- 2 -
2.1.Úvod	- 2 -
2.2.Charakteristika hádčátek rodu <i>Aphelenchoides</i>	- 3 -
2.2.1.Taxonomické zařazení	- 3 -
2.2.2.Morfologie a anatomie	- 4 -
2.2.3.Biologie, bionomie, rozšíření a hostitelský okruh	- 5 -
2.3.Ochranná opatření	- 8 -
2.3.1.Preventivní opatření	- 8 -
2.3.2.Kurativní opatření	- 9 -
2.4.Diagnostické metody	- 10 -
2.4.1.Odběr vzorků	- 10 -
2.4.1.1.Metoda	- 10 -
2.4.2.Extrakce hádčátek z živého či skladovaného rostlinného materiálu	- 11 -
2.4.2.1.Metoda	- 11 -
2.4.3.Diagnostika na úrovni komparativní mikroskopie	- 12 -
2.4.3.1.Přehled	- 12 -
2.4.3.2.Příprava nativních a trvalých preparátů	- 13 -
2.4.4.Diagnostika na úrovni nukleových kyselin	- 15 -
2.4.4.1.Izolace nukleových kyselin	- 15 -
2.4.4.1.1.Přehled	- 15 -
2.4.4.1.2.Metoda	- 16 -
2.4.4.1.2.1.Izolace DNA z listů obsahujících hádčátka	- 16 -
2.4.4.1.2.2.Izolace DNA ze suspenze hádčátek či jednotlivých hádčátek	- 17 -
2.4.4.2.Polymerázová řetězová reakce a její využití pro detekci a determinaci fytoparazitických hádčátek	- 19 -
2.4.4.2.1.Přehled	- 19 -
2.4.4.2.2.Metoda	- 22 -
2.4.4.3.Agarózová elektroforéza – frakcionace fragmentů DNA ve stejnosměrném elektrickém poli	- 23 -
2.4.4.3.1.Přehled	- 23 -
2.4.4.3.2.Metoda	- 24 -
2.4.4.4.Restrikční štěpení jako klíč pro determinaci rostlinně parazitických hádčátek	- 24 -
2.4.4.4.1.Přehled	- 24 -
2.4.4.4.2.Metoda	- 25 -
2.2.Seznam literatury	- 27 -
3.SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	- 30 -
4.ZÁVĚR	- 30 -

1.Cíl metodiky a dedikace

Cílem této metodiky je poskytnout pracovníkům řešícím v České republice problematiku týkající se výzkumu fytoparazitických háďátek základní informace o technikách diagnostiky těchto škodlivých organismů na úrovni morfologie i molekulární biologie a poskytnout tak snadno dostupný metodický materiál pro zavádění těchto metod do rutinní praxe. Metodika vznikla za finanční podpory MZe a je výstupem řešení projektu NAZV QF4156 „Vývoj diagnostických metod pro determinaci karanténních háďátek z rodů *Aphelenchoides*, *Bursaphelenchus*, *Xiphinema* a *Radopholus*“.

2.Vlastní popis metodiky

2.1.Úvod

Fytoparazitická háďátka jsou živočichové jejichž význam je velmi často opomíjen. Celá řada příznaků onemocnění rostlin je pak přisuzována jinému agens. Tyto organismy však vynikají nadprůměrnou rezistencí vůči nepříznivým podmínkám, snadno se přizpůsobují novým agroekosystémům, do kterých jsou introdukováni. Vzhledem k rozměrům od 0,1 mm do několika milimetrů, biologii a bionomii není boj s těmito fytoparazity jednoduchý. Všechny druhy mají typický, protáhlý, hadovitý tvar těla a to alespoň v některých fázích vývoje. Při získávání potravy poškozují buňky různých rostlinných pletiv. Některé druhy háďátek pronikají z půdy do rostlin, kde žijí v mezibuněčných prostorech. Na napadených částech se objevují výrazné deformace nebo části pletiv zcela odumírají. Háďátka jsou schopna přežít řadu let bez potravy, a to i ve zcela suchém prostředí. Řada druhů vyniká schopností anhydrobiózy, která jim umožňuje přecházet do stavu hybernace a přežít tak nepříznivé období. Jako příklad lze uvést háďátka rodu *Anquina*, která byla objevena v botanických sbírkách, ve kterých setrvala v životaschopném stavu po dobu několika desítek let (Siddiqui, 2000). Tuto schopnost lze sledovat i u dalších rodů, jakými jsou *Aphelenchoides*, *Ditylenchus*. Anhydrobióza je jednou nikoli jedinou schopností háďátek jak překonat nepříznivé podmínky pro jejich zdárný vývoj. Ve vývojových cyklech mnoha rodů lze nalézt klidová stádia, která mohou přežít bez hostitele řadu let. Rody *Globodera*, *Heterodera* a *Punctodera*, jsou řazeny do skupiny sedenterních háďátek a jejich klidové stádium zvané cysta (obal samičky naplněný vajíčky) je schopno přežít v půdě bez hostitele několik let, přičemž výjimkou nejsou ani klimaticky velmi nepříznivé pouštní oblasti. Další vlastností, která staví

hádátka do pozice významných parazitů rostlin, je rychlost vývoje. Dokončení vývojového cyklu za méně než tři týdny není nic neobvyklého (Marks & Brodie, 1998). Hádátka rodu *Aphelenchoides* patří do skupiny háďátek napadajících listové části rostlin. Tato skupina se vyznačuje malými rozměry dospělců v porovnání s ostatními druhy fytoparazitických háďátek, to souvisí s biologií tohoto rodu, respektive se způsobem napadání rostlin. Hádátka využívají jako vstupní bránu do rostliny otevřené průduchy zpravidla na listech. Charakteristickým syndromem napadení rostlin háďátky rodu *Aphelenchoides* je změna barvy listů, výrazné žloutnutí oblastí listů mezi žilnatinou a pozdější nekrotizace těchto oblastí. Příznaky postupují obvykle od bazální části rostliny k apikální. Symptomatické diagnostické metody používané ve fytopatologii a speciální rostlinné parazitologii mohou v tomto případě selhat, neboť napadení rostlin háďátky bývá zaměňováno s celou řadou bakteriálních či houbových onemocnění (Hunt, 1993). Jak již bylo řečeno, boj s fytoparazitickými háďátky je nelehkou úlohou, proto je nezbytné využít přesné, rychlé a citlivé diagnostické metody pro včasné zjištění zdroje napadení (osivo, sadba, porost) a umožnit tak eradikaci těchto parazitů rostlin.

2.2.Charakteristika háďátek rodu *Aphelenchoides*

2.2.1.Taxonomické zařazení

Stejně tak jako i u jiných organismů i mezi háďátky nalezneme taxonomické skupiny jejichž uspořádání v systému se čas od času mění. V případě rodu *Aphelenchoides* tomu není jinak. Rod *Aphelenchoides* byl popsán již Fischerem v roce 1894, který použil *A. kuehnii* jako jediného charakteristického zástupce této skupiny. Od této první studie byl název několikrát změněn a zařazení upraveno. V současné době se řada autorů přiklání k systému podle Hunt (1993).

Kmen: Nematoda

Třída: Secernentea

Řád: Aphelenchida

Podřád: Aphelenchina

Nadčeleď: Aphelenchoidoidea

Čeleď: Aphelenchoididae

Podčeleď: Aphelenchoidinae

Rod: *Aphelenchoides*

Dle dostupných zdrojů je zařazeno do rodu *Aphelenchoides* více než 50 druhů. Z této rozsáhlé skupiny je většina druhů primárně mykofágních a sekundárně fytofágních. Hospodářský význam lze tedy sledovat pouze u několika druhů, jmenovitě *A. fragariae* , *A. ritzemabosi*, *A. besseiy*, *A. subtenuis*,

případně *A. myceliophagus*. Zařazení do systému je podmíněno komparací morfologických znaků (Anonym 1, 2004).

2.2.2.Morfologie a anatomie

Háďátka rodu *Aphelenchoides* mají protáhle, nitkovité tělo, jehož délka nepřesahuje většinou 1,2 mm. Larvy i dospělci mají hadovitý tvar těla. Tělo je značně subtilní a tudíž dobře přizpůsobeno pohybu v malých prostorech pletiva listů rostlin. U rodu *Aphelenchoides* je zaznamenán výrazný pohlavní dimorfismus, ovšem *Aphelenchoides besseyi* se může reprodukovat i partenogeneticky.

Samičky rodu *Aphelenchoides* jsou 0,5 – 1,0 mm dlouhé. Jsou velmi štíhlé ($a = 32 - 65$). Pakliže trpí nedostatkem kyslíku, nebo jsou-li mrtvé, zaujímají strnulou polohu a to ventrálně stočenou. Na hlavové části je dobře patrný první hlavový prstenec a dále jsou patrné čtyři laterální rýhy a to cca na $\frac{1}{4}$ průměru těla. Stylet je na anteriárním konci dobře zašpičatělý a to na 45 % délky styletu. Posterární část styletu s nevýrazným knoflíkovitým zakončením je cca 1,75 μm dlouhá. Střední bulbus je oválný, s výrazným sacím ústrojím posunutým jako by za střed bulbu. Jícnové žlázy jsou protáhlé a přesahují o 4-8 šířek těla počátek střeva. Nervový provazec je patrný ve vzdálenosti jedné šířky těla za středním bulbem. Exkreční póry jsou lokalizovány obvykle na anteriárním konci nervového provazce. Hemizonid se pak nachází v oblasti 11-15 μm za exkrečními póry. Vulva je uložena příčně s mírně vystouplými okraji. Spermatéka je oválná, pakliže je úplně relaxovaná, je 8x delší než je její šířka. Vaječníky jsou relativně krátké, nedosahují k jícnovým žlázám. Oocyty jsou uspořádány ve dvou až čtyřech řadách. Post-vulvální váček je rudimentární neobsahující spermie. Ocas je kuželovitý na konci opatřen mukrem. (Malcolm & Averre, 2000).

rod a druh	zakončení mukra	délka postvulválního váčku	konec ocasu	a	b	L (mm)	S	c
<i>Aphelenchoides Besseyi</i>	hvězdičkovité	méně než 33% vzdálenosti vulva anus	kuželovitý	26,6-58	6,0-13,1	0,57-0,88	10-12,5	13,8-21
<i>Aphelenchoides ritzemabosi</i>	tupý konec se 2-4 špičkami	více než 50% vzdálenosti vulva anus	prodloužený a kuželovitý	40-45	10-13	0,77-1,2	12	18-24
<i>Aphelenchoides fragarie</i>	téměř bez mukra	více než 50% vzdálenosti vulva anus	prodloužený a kuželovitý	45-63	8-15	0,45-0,8	10-11	12-20

legenda

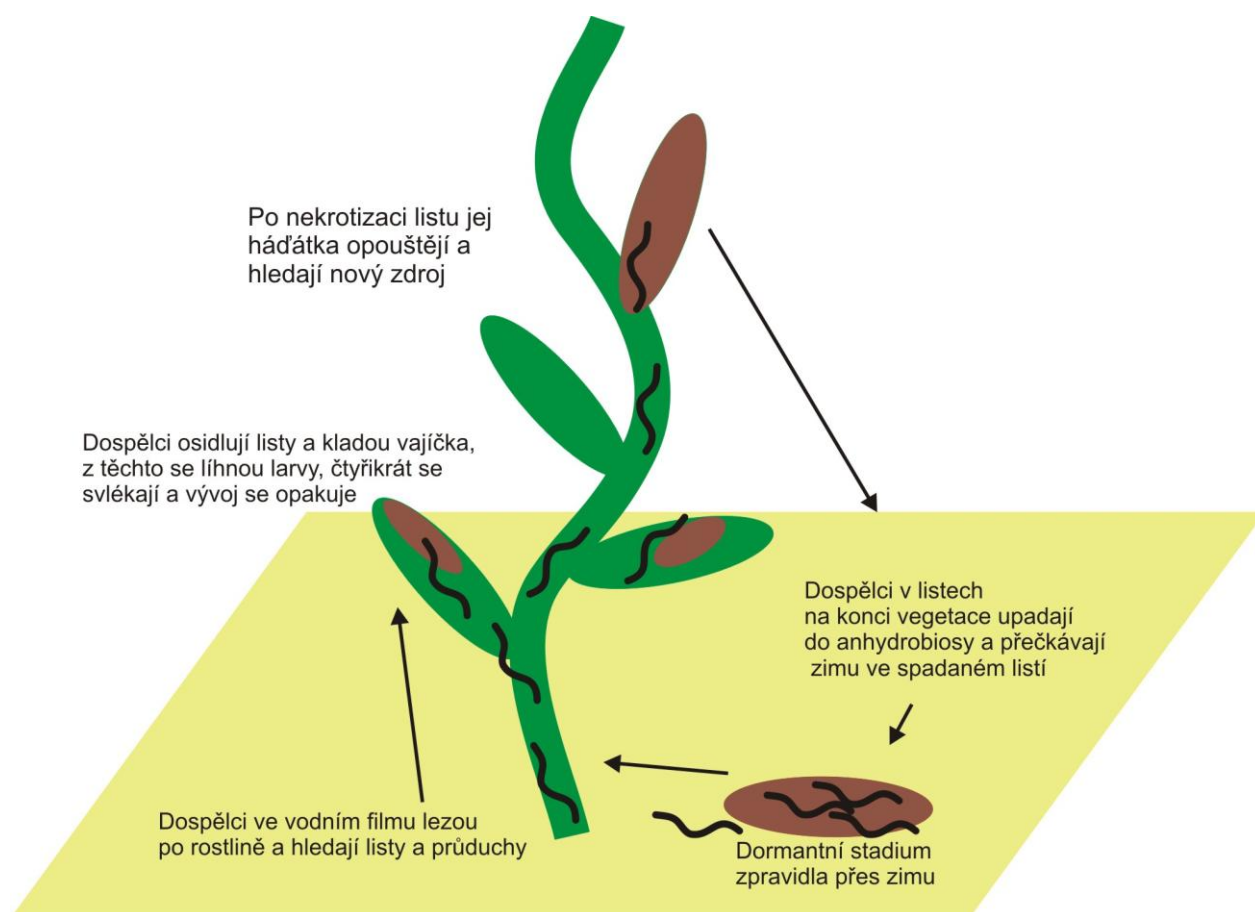
a - poměr délky těla k největší šířce těla
b - poměr délky těla k délce od hlavy ke konci jícnu
L - délka těla
S - délka styletu
c - poměr délky těla k délce ocasu

Samečci rodu *Aphelenchoides* jsou obvykle velmi podobní samičkám velikostí a tvarem, s výjimkou sekundárních reprodukčních charakteristických rysů. V relaxované fázi je posterární část těla samečka

ventrálně stočena. Spikula je typická ventrálně zahnutá, dvojitá bez kukulu, je přítomno pouze jedno varle. Gubernakulum ani bursa copulatrix nejsou přítomny (Todd & Atkins, 1958, 1959a, 1959b). Hádátka, jejichž diagnostice je věnována i tato metodika, jsou charakterizována morfometrickými znaky uvedenými v tabulce.

2.2.3. Biologie, bionomie, rozšíření a hostitelský okruh

Vývoj háďátek prochází stádií vajíčka, dospělého vajíčka (embryon), čtyř larválních stádií a dospělého. Většina druhů rodu *Aphelenchoides* se rozmnožuje pohlavním způsobem, ačkoli nemalý počet se rozmnožuje partenogeneticky. Mezi jednotlivými stádii dochází ke svlékání kutikuly. Jedinec opustí starou kutikulu poté, co je vytvořena kutikula nová. Jedná se o proces ekdyze. K prvnímu svlékání dochází obvykle uvnitř vajíčka a líhne se až jedinec druhého juvenilního stádia (invazní larva). Pakliže jsou okolní podmínky vhodné, životní cyklus některých mykofágických druhů může být velmi rychlý a trvat pouze několik dní (Evans et al., 1993).



Listová háďátka přetrvávají období dormance v napadených částech rostlin. Kvantifikujeme-li populaci listových háďátek v průběhu roku, lze sledovat následující vývoj. Během zimy nedochází

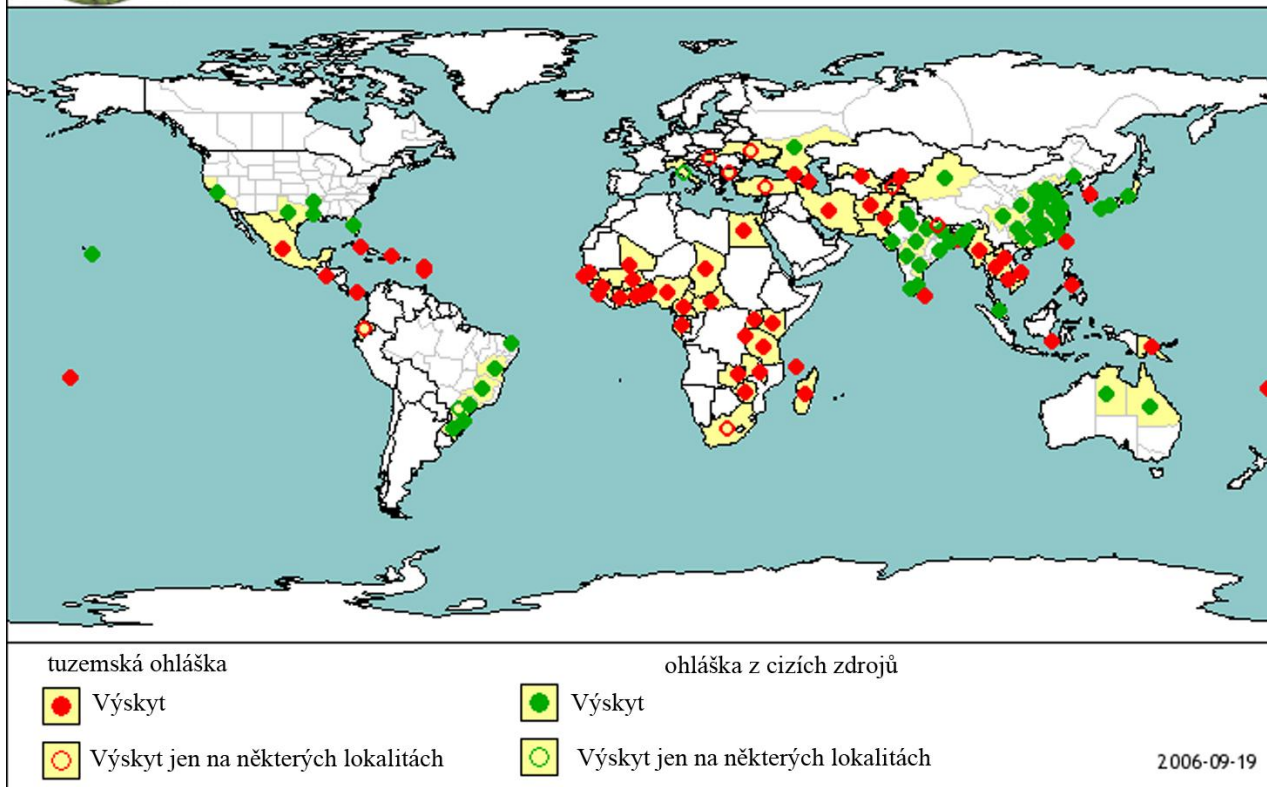
k reprodukci a počet jedinců je nejnižší vzhledem k celému roku, na jaře postupně vzrůstá počet aktivních jedinců v populaci, v období aktivní vegetační periody je pak počet nejvyšší. Po ukončení dormance migrují dospělci v tenké vrstvičce vody po stonku k listům svého hostitele a proniknou do listů přes přirozené otvory, průduchy. V listech háďátka migrují, parazitují na houbovém parenchymu, páří se a kladou vajíčka. Poněvadž se listová háďátka nepříliš dobře pohybují mezi přiléhajícími buňkami a přes listovou žilnatinu, je napadené pletivo obvykle ohraničeno touto listovou žilnatinou. Pro napadení další části listu jsou tedy nuceni jej opustit a překonat překážku po povrchu listu. Z nakladených vajíček se líhnou larvy, které se čtyřikrát svlékají. Při dostatečné vlhkosti listů se háďátka mohou přemisťovat na jiné listy a tak způsobit celkové poškození rostliny. Zimu přečkávají v odumřelých listech až do příznivějších podmínek na jaře. Odumřelé listy jsou rozneseny větrem k dalším hostitelům, které budou na jaře napadeny. Jeden životní cyklus trvá přibližně dva až tři týdny v závislosti na podmínkách prostředí. Přezimování larev a dospělců probíhá ve formě anhydrobiózy. Háďátka rodu *Aphelenchoides* jsou schopna anhydrobiózy. Tento stav přerušení životních projevů je vyvolán vysycháním a je ukončen hydratací. *A. besseyi* je schopno přežít v anhydrobióze několik let na zrnech rýže a *A. ritzemabosi* může být oživeno ze suchého rostlinného materiálu po více než třech letech. *A. besseyi* přežívá ve stavu anhydrobiózy nejlépe v preadultním juvenilním stádiu a *A. ritzemabosi* jak v preadultním juvenilním stádiu, tak ve stádiu dospělé (Hunt, 1993).

Rod *Aphelenchoides* je rozšířen celosvětově, jednotlivé druhy osidlují velmi rozdílná klimatická pásma od horkých afrických pouští až po Antarktidu. Některé druhy tohoto rodu můžeme naléznout i na mořském dně, jako například *A. gynytylus*. Háďátka z rodu *Aphelenchoides* patří spolu s rodem *Aphelenchus* mezi nejbohatší a nejrozšířenější *Aphelenchina*. I když rod *Aphelenchoides* má převážně jednoznačně mykofágní zástupce, přesto některé druhy parazitují na vyšších rostlinách a jsou známy pod názvem „pupenová a listová háďátka“. Některé z těchto druhů jako *A. arachidis*, *A. besseyi* a *A. fragariae* jsou schopny se okamžitě rozmnožovat na houbách a jsou očividně fakultativní parazité rostlin. Na druhé straně druh *A. ritzemabosi* je považován za obligátního fytoparazita, i když bylo prokázáno, že jeho reprodukce na houbách je možná (Luc et al. 1990).

A. besseyi je široce rozšířeno v oblastech zaměřených na pěstování rýže, kde způsobuje příznaky zvané „symptom bílých konečků“ rýže. *A. besseyi* je velmi odolné k vysoušení. Je schopno přežívat na suchých rýžových zrnech, čímž zvyšuje riziko rozšíření. To je také jeden z důvodů proč bylo zařazeno mezi karanténní organismy. Rozšířeno je celosvětově a to zejména v oblastech hlavních pěstitelů rýže (Afrika, Asie, východní Evropa, Severní, Střední a Jižní Amerika, oblast Pacifiku) (Anonym 2, 1992, Javor, 1970).



Mapa rozšíření *Aphelenchoides besseyi*



A. fragariae se obvykle vykytuje na jahodníku, u kterého způsobuje příznaky zvané „kadeřavost“ jahodníku. Jeho hospodářský význam se vztahuje také na okrasné kapradiny, z nichž napadá přes 100 druhů (*Asplenium*, *Adiantum*). Hostitelský okruh je široký, zahrnující více než 250 rostlinných druhů. Jsou to především rostliny patřící do čeledi *Liliaceae*, *Primulaceae* a *Ranunculaceae*. *A. fragariae* je ekto- i endoparazitem nadzemních částí rostlin. Příznaky: deformace, pokroucení, kadeřavost listů, listová skvrnitost, diskolorace a hnědnutí listových pletiv. Rozmnožuje se pohlavním způsobem. Životní cyklus trvá při 18 °C 10-11 dní. *A. fragariae* je široce rozšířeno ve státech bývalého USSR, v Evropě, Japonsku a Severní Americe (Qui et al., 1993).

A. ritzemabosi je obecně známé pod názvem „listové háďátko chrysantém“, je považováno za hlavního škůdce chrysantém, je to polyfágní ekto a endoparazit více než 200 rostlinných druhů, především z čeledi *Asteraceae*. Spolu s *A. fragariae* napadá také jahodník a může způsobit rozsáhlé škody (Hunt, 1993). Příznaky napadení mohou vykazovat retardaci růstu, deformace, listové skvrnitosti přecházející v hnědé, později černé skvrny, *A. ritzemabosi* se rozmnožuje pohlavně, životní cyklus trvá mezi 10-14 dny v závislosti na teplotě. Rozšířeno je celosvětově a to zejména v chladnějších oblastech (bývalá oblast USSR, Evropa, Severní Amerika, Jižní Afrika) (Ibrahim et al., 1994).



Příznaky napadení listů chryzantémy a kamzičniku hádátky *A. ritzemabosi*.

2.3.Ochranná opatření

Cílem ochrany před fytoparazitickými hádátky je aplikování takových ochranných postupů a opatření, které preventivně brání jejich přemnožení a plošnému rozšíření. Nejlepší ochrana plodin nespočívá v použití pouze jedné metody, ale v jejich vzájemné kombinaci využití v rámci principů integrované ochrany rostlin. Preventivní sanitární opatření jsou v ochraně proti listovým hádátkům velmi důležitá, protože chemická ochrana proti hádátkům je často finančně nákladná a obtížně aplikovatelná (Feakin, 1971).

Hádátka jsou organismy, které jsou schopny se sami pohybovat, ale většina z nich urazí v půdě vzdálenost ne více než jeden metr dlouhou a to za celý svůj život. Díky nedodržení ochranných opatření se však mohou rozšířit mnohem dále než by byla sama schopna. Kromě klimatických faktorů, jako je vítr nebo déšť, přispívají k rychlému šíření i závlahy, neasanované polní stroje či nářadí. Transport infikovaných rostlin, semen či hlíz poskytuje hádátkům možnost osídlení nových lokalit. Na přenos hádátek mohou mít vliv i různé typy zoochorie. Faktory ovlivňující pohyb kontaminované půdy či infikovaného rostlinného materiálu umožňují snadné rozšíření fytofágních hádátek. Ochranná opatření aplikovaná proti fytoparazitickým hádátkům lze v jedné rovině rozdělit na preventivní a kurativní (Decker, 1969).

2.3.1.Preventivní opatření

Základem preventivních opatření je zabránění přenosu a šíření hádátek do oblastí, kde se zatím nevyskytovala. V případě karanténních organismů je toto opatření považováno za primární. Vysazovat či vysévat je možné jen certifikovaný, zdravý materiál, pro předpěstování sadby pak neopomenout

zdravotní stav substrátu. Z agrotechnických opatření je to správný osevní postup, termín výsadby, optimální výživa rostlin, ničení plevelů jako možných rezervoárových rostlin pro hádátka. Plevelné rostliny v případě listových hádátek hrají rovněž roli při úpravě mikroklimatu porostu. V zaplevelených porostech je vyšší vlhkost, po závlaze či srážkách dochází k pomalému vysychání a hádátka mají k dispozici delší časovou periodu pro osidlování rostlin. Do osevního postupu by měly být řazeny rostliny tzv. nepřátelské, které sice umožní hádátkům penetraci pletiv a osídlení rostliny, ale na druhou stranu nebudou pro hádátka vhodným hostitelem a jejich reprodukce bude omezena (Ganpati et al., 2004).

2.3.2. Kurativní opatření

Pro ochranu rostlin proti fytoparazitickým hádátkům jsou doporučovány tři kurativní strategie (aplikace nematocidů, použití fyzikálních metod, aplikace bioagens). První z nich je aplikace fumigujících či nefumigujících nematocidů (Webster 1972). Tato varianta v ČR není použitelná, neboť většina účinných přípravků není v registru pesticidů ČR zařazena. V registru přípravků jsou registrovány pouze pro okrasné rostliny proti půdním hádátkům: BASAMID GRANULÁT (dazomet), DURSBAN 10G (chlorpyrifos) a DURSBAN 480EC (chlorpyrifos). Většinou se aplikují do půdy před setím a výsadbou, DURSBAN 480 EC se používá ve formě zálivky k rostlinám. Jejich účinnost proti fytoparazitickým hádátkům byla autory sledována v letech 2005-2007, v povolených dávkách byla sledovaná účinnost minimální. Fyzikální metody jsou využitelné pro asanaci semen a sadby, použít lze moření horkou vodou. U napadeného osiva, hlíz, či rostlin sadby je časté ošetření vodou při teplotě 43,5 °C, po dobu 30 minut. Pro ošetření výsevního substrátu lze doporučit propařování půdy při teplotě 90-95 °C po dobu 15-20 minut. Pro volné výsadby je možné v teplejších klimatických pásmech využívat solarizace, kdy půda je zakryta polyetylenovou folií a vystavena v průběhu léta po dobu až 3 týdnů slunečnímu záření. Dochází k prohřátí půdního profilu do hloubky 20-25 cm a k eradikaci majoritního podílu půdní mikrofauny. V ČR je aplikace této metody omezena klimatickými podmínkami. Aplikace bioagens je v posledních deseti letech takřikajíc číslem jedna pro rozsáhlou nematologickou komunitu (Duan et al. 2003).

Jako bioagens je možné použít grampozitivní bakterie *Pausteria penetrans*, které omezují množení hádátek a možnost invazních larev penetrovat do kořenů (Jaffee et al. 1998). Nematofágní houby patří k nejvýznamnějším nepřátelským organismům hádátek. Vyskytují se téměř ve všech půdách, především v půdách s dostatečným obsahem organických látek. Nejvýznamnější a také nejčastější nematofágní houby patří do řádu Moniliales (Hyphomycetes) ze skupiny hub nedokonalých fungi imperfecti. Nematofágní houby z řádu Moniliaes jsou jak endo, tak ektoparazity. Smrt hádátka není

způsobena pravděpodobně jen mechanickým poškozením, ale i působením toxických látek („Nematoxin“) produkovaných nematofágními houbami. V kompostech a mulčích byla zjištěna zvýšená aktivita výše uvedených nematofágních hub. Z tohoto hlediska lze doporučit zapravování organické hmoty ve formě například kompostů jako jednu strategii napomáhající k selektivnímu snížení infestace půdy háďátky (Gené et al. 2005, Jensen et al. 1997, Morton et al. 2004, Perssonová & Jansson, 1999).

2.4.Diagnostické metody

Aplikace vhodných metod diagnostiky pro určení diagnózy onemocnění rostlin je pro pěstitele prvním a bezpochyby nejpodstatnějším krokem při integrované produkci zemědělských komodit. Metody diagnostiky fytoparazitických háďátek vycházejí z jejich morfometrických znaků. Dichotomické klíče jsou základním prvkem při diagnostice háďátek. S vývojem diagnostických metod vstupují i na pole nematologie nové metody, využívající různých biochemických charakteristik jako markerů taxonů. V této metodice jsou uvedeny metody detekce a determinace na úrovni morfologických komparativních technika, dále pak na úrovni molekulárních markerů.

2.4.1.Odběr vzorků

2.4.1.1.Metoda

Odběr vzorků listových háďátek je vhodné zaměřit na odběr rostlinné hmoty, nikoliv na půdní vzorky. Pravděpodobnost úspěšné detekce háďátek rodu *Aphelenchoides* v suspenzi háďátek získaných z půdních vzorků je relativně malá. Pro snadný, rychlý a přesný monitoring výskytu je tedy vhodné odebírat části rostlin. Pracovník, který provádí monitoring, by se měl zaměřit na rostliny vykazující příznaky a dále pak na rostliny v jejich okolí. Účelem je odebírat části rostlin s příznaky a části v horizontální úrovni nad těmito částmi. Pakliže jsou rostliny napadeny, je pravděpodobné, že v nekrotických listech bude menší podíl háďátek než v listech do této chvíle bez příznaků. Pro monitoring semen rostlin nelze doporučit nic než sérii náhodných výběrů a to takovou, která odpovídá velikosti testovaného souboru. Odebrané listy umístíme do papírových pytlíků a označíme. V procesu monitoringu nepoužíváme polyetylenové či jiné neprodyšné pytlíky, dochází pak ke zvýšení teploty a háďátka opouštějí pletivo listu, což může nežádoucím způsobem ovlivnit monitoring. Pro rychlý screening nebo ověření výskytu v nedostupné oblasti lze doporučit přípravu vzorků (pomalé sušení) a

jejich transport například za využití poštovní zásilky. V těchto případech je nutné listy pozvolna usušit v teplotách cca 22-25°C. K proschnutí listů by nemělo dojít rychle, sušíme cca jeden týden bez aktivní ventilace. Takto připravený materiál lze zaslat poštou na pracoviště zabývající se diagnostikou hádátek rodu *Aphelenchoides*.

2.4.2.Extrakce hádátek z živého či skladovaného rostlinného materiálu

2.4.2.1.Metoda

Odebrané vzorky listů uložené v papírových sáčkích je nutné rozdělit na tři části, první část bude podrobena izolaci hádátek ihned a další dvě je vhodné umístit do chladicího boxu při 4-10 °C, jako zálohový referenční materiál. Dělením vzorků se rozumí rozstřížení každého listu na tři zhruba stejné části. Pro extrakci těchto poměrně malých hádátek lze využít dva druhy metod a to sedimentační síťovou a centrifugační.

Sedimentační síťová metoda je založena na stejném principu jako Baermannova nálevka, jejíž



využití pro tento rod není optimální vzhledem k rozměrům hádátek. Materiál je před extrakcí homogenizován a to stříhem či řezem a to na proužky o šířce cca 2-3 mm. Není nutné se obávat poškození hádátek. Zařízení se skládá ze dvou do sebe zapadajících misek (10 x 35 x 20 cm), jedna z misek má perforované dno. Do perforované misky se umístí jedna vrstva buničiny

(buničinou se rozumí materiál neuvolňující drobné chloupky, ideálně pak ubrousky ROTH (P-lab R008721) a na ní pak nastříhané listy, které se přikryjí druhou vrstvou buničiny. Do spodní misky s pevným dnem se nalije voda (běžná voda z vodovodního řádu) a do ní se pak umístí miska s materiálem určeným pro izolaci. Hladina vody by neměla listy zaplavit. Hádátka budou přirozeně migrovat z listů a shromažďovat se ve spodní misce. Doporučená doba plavení je cca 9-12 hodin a to i pro sušený rostlinný materiál. Suspenze hádátek ze spodní misky se přefiltruje pomocí síta s velikostí otvorů 0,02 mm. Suspenzi hádátek lze skladovat bez poškození i několik dní při 4°C.



Centrifugační metoda je poněkud progresivnější, ovšem je vázána na laboratorní podmínky a adekvátní přístrojové vybavení. Tato metoda je rutinně zvládnutelná, její aplikace vyžaduje centrifugaci poměrně velkých objemů (50-100 ml). Při aplikaci této metody pro suchý rostlinný materiál je nutné zařadit před první krok ještě inkubaci ve vodě, která zajistí hydrataci anhydrobiotizovaných jedinců. V případě háďátek rodu *Aphelenchoides* postačí inkubace 1 h při laboratorní teplotě.

1. 5 g listů umístit do mixéru (běžný kuchyňský) a zalít 100 ml vody (voda z vodovodního řadu).
 2. Mixovat na maximální výkon 5 minut.
 3. Suspenzi převést do kádinky.
 4. Do 50 ml uzavíratelných kyvet (falkonky - Orange Scientific) odměřit cca 5 ml kaolínu (Fluka-18672) a kyvetu doplnit připravenou suspenzí.
 5. Intenzivně promíchat, tak aby došlo ke smísení kaolínu se suspenzí.
 6. Centrifugovat 2 minuty při 2500 g
 7. Supernatant odstranit a do kyvety přidat 40 ml 1 M sacharózy (postačí i obyčejný potravinářský cukr, MW-342,30 g/mol).
 8. Peletu resuspendovat lžičkou a intenzivním třepáním.
 9. Centrifugovat 2 minuty při 2500g.
 10. Supernatant obsahuje háďátka, ty je nutné přefiltrovat přes síto o velikosti otvorů 0,02 mm
- Háďátka jsou připravena pro detekci a determinaci.

2.4.3.Diagnostika na úrovni komparativní mikroskopie

2.4.3.1.Přehled

Dichotomické klíče pro determinaci taxonů háďátek jsou určeny k porovnávání morfologických znaků a naměřených hodnot s hodnotami popsány a umožňují tak determinaci háďátka ve vzorku. V tomto ohledu lze pracovat s nativními či trvalými preparáty. Obě skupiny skýtají řadu výhod i nevýhod. Nativní preparáty se snadno připravují a háďátka z preparátů je možné posléze využít pro další techniky, s háďátkem lze rovněž manipulovat. Pro sledování nativních preparátů je velmi obtížné použít „mokrý“ imerní objektiv, což je v celé řadě případů zcela nezbytné. Nativní preparáty nelze skladovat déle než několik hodin. Trvalé preparáty lze skladovat po dobu několika desítek let a slouží i jako referenční materiál. Při jejich pozorování lze používat mokré imerní objektivy. Háďátka z trvalých preparátů lze jen velmi obtížně použít pro aplikaci dalších technik, není možné s nimi manipulovat bez poškození trvalého preparátu. Pro sledování infrastruktury háďátek doporučujeme využít Nomarskiho kontrast, provedení

mikroskopické komparativní diagnostiky se tím usnadní. Měření jednotlivých morfologických charakteristik je také podmíněno technickým vybavením laboratoře. Optimálním řešením je digitální kamera na trinokuláru mikroskopu a vhodný software pro měření a ukládání hodnot. V krajním případě lze využít měřicího okuláru a kalibrovat objektivy pomocí měřítka na podložním sklíčku. Konec konců v dobách, kdy dichotomické klíče vznikaly, tomu nebylo jinak. Pro determinaci háďátek rodu *Aphelenchoides* doporučujeme využít klíč dle Hunt (1993). Tato metodika je zaměřena na tři druhy, jejichž základní morfologické charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 1., kapitola 2.2.2..

2.4.3.2. Příprava nativních a trvalých preparátů

Pro detekci a determinaci háďátek rodu *Aphelenchoides* na úrovni morfologických a anatomických znaků je vhodné použít jak nativních preparátů, tak preparátů fixovaných.

Příprava nativních preparátů háďátek je obdobná jako v případě přípravy jiných nativních preparátů pro světelnou mikroskopii. Tedy do kapky vody na podložním sklíčku přemístíme pomocí nematologické jehly několik jedinců háďátek a zakryjeme krycím sklíčkem. Není třeba se obávat rozdrcení háďátek, jejich rozměry jsou v případě rodu *Aphelenchoides* příliš malé. Rozdílem od přípravy nativních preparátů například hub, či rostlinného pletiva je fakt, že háďátka se pohybují. Pro tento případ lze použít anesteziologické techniky umožňující pozorování morfologických charakteristik použitelných pro determinaci háďátek. Anestézie může být provedena fyzikálně či chemicky, a vyžaduje určitou zkušenost, tak aby háďátka nebyla usmrcena, neboť v takovém případě bývají jak vnitřní tak řada vnějších struktur neidentifikovatelné. Nejjednodušší metodou je zahřátí preparátu nad lihovým kahanem a to na dobu nezbytně nutnou (tuto dobu je nutné odzkoušet). Jako detekční kritérium pro úspěšnou anestézii lze považovat fakt, že se háďátka přestanou hýbat a jejich struktury nejsou poškozeny. Pro anestézii lze rovněž využít CO₂ a to ve formě malých kousků suchého ledu přiložených do blízkosti háďátek, je ale nutné brát zřetel na velmi nízkou teplotu: „Preparát nesmí zmrznout!“ Dále doporučujeme aplikaci dichlor-ethyl-eteru (Fluka 35650). Je vhodné připravit zásobní roztok v koncentraci 0,1 % a ten použít přímo pro anestézii. Po úspěšné anestézii jsou háďátka připravena pro světelnou mikroskopii.



Sada nástrojů pro manipulaci s háďátky.

Po několikaletých zkušenostech s fixací lze doporučit metodu fixace pomocí roztoku TAF (Courtney et al., 1955): 7 ml 40 % formalínu, 2 ml trietanolaminu, 91 ml destilované vody. TAF vykazuje velmi dobré výsledky co do zřetelnosti detailu a vysoké stability sloučeniny (Southey, 1985). Pro práci s háďátky lze s úspěchem využít skleněnou misku s konkávním dnem (ED – embryonal dishes). Háďátka pomocí nematologické jehly přemístíme do 20 μ l vody (cca 20 ks), 2 ml fixativu zahřejeme na 80 °C a pak pomocí Pausterovy pipety rychle přepipetujeme do mikrozkušavky s háďátky. Takto připravená háďátka uložíme v laboratorní teplotě minimálně na 10 dnů. Tímto způsobem lze fixovaná háďátka skladovat i po několik let. Takto fixovaná háďátka lze použít pro přípravu permanentních glycerolových preparátů. Na podložní sklíčko s jamkou napipetujeme 10 % glycerol a do něj přemístíme háďátka, klademe důraz na to, aby všechna háďátka byla pod hladinou glycerolu. Podložní sklíčka inkubujeme při 60 °C až do doby odpaření maximálního množství vody, tento fakt ověříme vizuálně (glycerol zhoustne na koncentraci 99 % glycerolu). Inkubaci několikrát (1x za 5 minut) přerušíme a preparát necháme vystydnout (30 sekund). V průběhu odpařování je nezbytné ověřovat množství glycerolu v jamce a případně jej doplnit tak, aby nedošlo ke zničení háďátek. Připravíme si podložní sklíčka pro permanentní preparáty, napipetujeme na ně cca 5 μ l 99 % glycerolu a inkubujeme při 80 °C 15 minut, tak aby se odpařily zbytky vody v glycerolu. Do těchto kapek přemístíme 2 ks háďátek z glycerolu, po stranách umístíme přiměřené množství směsi parafínu a včelího vosku (1:4), přiložíme krycí sklíčko (nejlépe kruhové průměr 12 mm) a přeneseme do 80 °C. Počkáme až se směs parafínu a včelího vosku dokonale rozpustí a krycí sklíčko zcela zakryje

hádátka. Preparát je připraven pro mikroskopii a uložení do sbírky. Glycerolové preparáty skladujeme vždy vodorovně a bez přístupu světla. Diagnostické znaky a fotodokumentace je uvedena v přílohách.

2.4.4.Diagnostika na úrovni nukleových kyselin

Nukleové kyseliny jako hmotná podstata genetické informace dávají základ pro expresi proteinů a tudíž jsou i podstatou všech buněčných procesů. Jejich snadná replikovatelnost a stabilita dávají dobré předpoklady pro využití těchto redenaturovatelných molekul pro diagnostické účely (Krčmář & Břicháček, 1993).

2.4.4.1.Izolace nukleových kyselin

2.4.4.1.1.Přehled

Prvním krokem při práci s nukleovými kyselinami (NA) je jejich izolace v nativním stavu z biologického materiálu, v dostatečném množství a čistotě. Izolované nukleové kyseliny je třeba zbavit všech látek, které se po lyzi buněk stávají součástí hrubých lyzátů a jejichž přítomnost by bránila účinnému a specifickému působení enzymů používaných k jejich analýze a úpravám (Rosypal, 2000). Základní principy izolace nukleových kyselin spočívají v uvolnění nukleových kyselin z vazby na proteiny. Po rozrušení buněk, popřípadě ostatních buněčných kompartmentů, je izolace NA zaměřena na odstranění kontaminujících buněčných komponent a dále pak na vlastní disociaci nukleových kyselin. Materiál je homogenizován nejčastěji v pufru, který obsahuje chelatační činidlo (např. EDTA - ethylendiamintetraoctová kyselina či její dvojsodná sůl) bránící degradaci nukleových kyselin přítomnými nukleázami. Pro rozrušení buněčných stěn je vhodné použít inkubaci v dusíku a posléze tření v třecí misce či skleněném hmoždířku. Lze také použít některé z komerčně dodávaných homogenizátorů. Pro rozdělení komplexu NA - protein se do reakční směsi přidává nějaký druh tenzidu, např. sodium dodecyl sulfát (SDS) (Křemen et al., 1998). Denaturace proteinů je dosaženo inkubací ve vodní lázni 60 - 80 °C. K oddělení denaturovaných proteinů, lipidů a jiných složek hrubého homogenátu se nejčastěji používá fenolová nebo fenol-chloroformová extrakce. Fenol denaturuje proteiny, rozpouští tuky a napomáhá oddělení jednotlivých fází získaných centrifugací. Spodní, organická fáze, je tvořena fenolem nebo fenol-chloroformem, mezifázi tvoří denaturované proteiny a zbytky buněk. Horní fáze obsahuje nukleové kyseliny (Rosypal, 2000). Jednotlivé typy nukleových kyselin se extrahují do vodné fáze v závislosti na hodnotě pH použitého pufru. Alkalický pufr (pH 8,0) extrahuje DNA, kdežto při kyselém pH (4,5 - 6,0) se

extrahuje RNA (Sambrook et al., 1989). Nežádoucí typ nukleové kyseliny lze odstranit působením příslušné nukleázy. Nukleové kyseliny se z vodné fáze vysráží etanolem, případně isopropanolem. Účinné precipitaci nukleových kyselin přítomných v nízkých koncentracích napomáhá snížení teploty a přidavek solí (Rosypal, 2000). Nejčastěji se používá octan sodný, dále octan amonný, octan draselný, chlorid litný, chlorid sodný, chlorid hořečnatý a další (Krčmář & Břicháček, 1993). Posledním krokem izolace je shromáždění precipitátu nukleových kyselin centrifugací a rozpuštění získaného sedimentu ve vhodném rozpouštědle (TE, ddH₂O, ddH₂O - DEPC) (Rosypal, 2000).

2.4.4.1.2. Metoda

Pro úspěšnou diagnostiku za využití polymorfismů DNA je primárním faktorem úspěchu vhodná metoda extrakce DNA. Cílem je izolovat DNA v dostatečné čistotě, kvalitě a množství pro následné analýzy. Lze použít následující metody extrakce DNA pro různé použití a s různým výchozím materiálem pro extrakci. Uvedeny jsou optimalizované protokoly testované na hádátkách rodu *Aphelenchoides*.

2.4.4.1.2.1. Izolace DNA z listů obsahujících hádátka

Pro izolaci totální DNA z listových pletiv obsahujících hádátka je stěžejním krokem dokonalá homogenizace biologického materiálu a jeho převedení do suspenze. V tomto ohledu lze doporučit poněkud jednoduchou, nicméně osvědčenou homogenizaci rostlinných pletiv v tekutém dusíku s použitím porcelánové třecí misky. V následujícím postupu je používáno fenolu jako denaturačního činidla. V tomto ohledu je nutné dodržovat pravidla bezpečnosti práce s touto chemikálií.

1. Listy rozdrtit v tekutém dusíku ve třecí misce nejprve na sucho a po-té homogenizovat s extrakčním pufrem CTAB (na terčík průměru 1 cm 600 µl pufru). Odebrat pipetou 500 µl do 2 ml mikrozkušavky.
2. Homogenát inkubovat 2 hodiny při teplotě 60 °C ve vodní lázni.
3. Přidat stejný objem směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol (25:24:1), 10 minut vortexovat na maximální otáčky, 10 minut centrifugovat při 3500 g.
4. Po centrifugaci odebrat horní fázi a přidat stejný objem směsi chloroform isoamylalkohol (24:1), 10 minut vortexovat na maximální otáčky, 10 minut centrifugovat při 3500 g.
5. Po centrifugaci odebrat horní fázi a přidat stejný objem isopropanolu

6. Precipitovat DNA 9 - 12 hodin při teplotě - 25 °C nebo 20 minut v tekutém dusíku.
6. Centrifugovat při 4500 g 10 minut, slít supernatant a peletu 15 minut promýt v 150 µl 80 % EtOH - 10 mM LiCl - 1 mM Tris.
7. Centrifugovat při 4500 g 10 minut, slít supernatant a peletu usušit při laboratorní teplotě „mikrozkumavku stačí postavit dnem vzhůru na papírový ubrousek“
8. Rozpustit peletu v 30 µl ddH₂O nebo ddH₂O-DEPC
9. Takto připravená nukleová kyselina je připravena pro další analýzy nebo pro skladování v mrazícím boxu při -30°C nebo při -80°C.

Použitý extrakční pufr:

CTAB

50 mM Tris - HCl pH 8,0

0,7 M NaCl

10 mM EDTA

1 % CTAB

20 mM merkaptoetanol

2.4.4.1.2.2. Izolace DNA ze suspenze hádátek či jednotlivých hádátek

Izolace DNA ze suspenze hádátek je provázeno celou řadou restrikcí a doporučení. Malé množství biologického materiálu není vždy zárukou pozitivního výsledku následných analýz DNA, proto je nezbytně nutné minimalizovat ztráty biologického materiálu a izolované DNA v procesu izolace na minimum. Za tímto účelem byl optimalizován postup izolace za použití hydroxy-apatitových kolonek, které jsou součástí komerčně dodávaného kitu pro izolaci savčí DNA (GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit SigmaAldrich-GN10)

1. Suspenzi hádátek či jednotlivá hádátka umístit do 1,5 ml polypropylénové mikrozkumavky s konkávním dnem a to do 20 µl ddH₂O.
2. Připipetovat 180 µl roztoku T a 20 µl roztoku Proteinázy K (20 mg/1 ml) inkubovat 1 h při 55°C.
3. Přidat odměřené množství (jedno plné víčko 0,2 ml mikrozkumavky) Glass Beads (G9143 Sigma Glass beads, unwashed, připravených pro izolaci DNA podle přiloženého protokolu) a vortexovat 20 minut na nejvyšší otáčky.
4. Spinovat (několik sekund centrifugovat tak, aby se vše co bylo na stěnách mikrozkumavky dostalo na dno) a inkubovat při 55°C 2 hodiny, v průběhu inkubace 3-4 x vortexovat po 1 minutě a spinovat.

5. Přidat 200 µl roztoku C a 10 minut vortexovat na maximální otáčky, spinovat a inkubovat 3 minuty při 70 °C.
6. Připravit kolonky napipetováním 500 µl roztoku pro přípravu kolonek a centrifugací při 12000 g 1 minutu.
7. Do homogenátu přidat 200 µl etanolu (etanol pro molekulární biologii Merck 1085430250), vortexovat 30 sekund, spinovat.
8. Nanést homogenát na kolonku a to společně s Glass Beads (za tímto účelem je vhodné použít špičky s širokým otvorem a nebo jen ustříhnout špičky běžné), centrifugovat při 6500 g 1 minutu. DNA je nyní zachycena na hydroxyapatitovém jádru kolonky.
9. Přenést klonku do nové mikrozkušavky a přidat 500 µl promývacího roztoku.
10. Centrifugovat při 6500 g 1 minutu, přenést klonku do nové mikrozkušavky.
11. Přidat do kolonky 500 µl promývacího roztoku a centrifugovat 6500 g 1 minutu.
12. Přenést klonku do nové mikrozkušavky a centrifugovat při 18000 g 3 minuty. Je nutné vysušit jádro kolonky touto centrifugací.
13. Přenést klonku do nové sterilní mikrozkušavky a připipetovat na střed kolonky 100 µl elučního roztoku, nechat inkubovat v laboratorní teplotě 10 minut a centrifugovat při 6500 g 2 minuty.
14. Do kolonky připipetovat dalších 100 µl elučního roztoku a nechat inkubovat v laboratorní teplotě 10 minut.
15. Centrifugovat při 18000 g 3 minuty.
16. DNA v mikrozkušavce je vhodné zkoncentrovat podle množství háďátek použitých pro izolaci DNA. K roztoku DNA připipetovat 2,5 x objem isopropanolu (p-lab I 05701) a 10 % objemu DNA 3 M octanu sodného.
17. Inkubovat při -30°C 9 - 12 hodin.
18. Centrifugovat při 12000 g 15 minut
19. Supernatant odstříknout a přidat 100 µl 70 % etanolu mírně promíchat pohyby ruky, nevortexovat.
20. Centrifugovat při 12000 g 10 minut , supernatant odstříknout a peletku sušit na stole dnem vzhůru.
21. Po vyschnutí resuspendovat peletku (někdy ani není vidět) v adekvátním množství elučního roztoku. Pro jednotlivé kusy háďátek doporučujeme resuspendovat v 5-20 µl, pro množství 10-50 háďátek v 20-50 µl a pro množství nad 50 háďátek v 50-100 µl.

Takto připravená DNA je použitelná pro další analýzy.

2.4.4.2. Polymerázová řetězová reakce a její využití pro detekci a determinaci fytoparazitických hádátek

2.4.4.2.1. Přehled

V letech 1983 - 1985 vyvinuli Mullis, Faloon a Saiki enzymovou vysoce účinnou metodu, kterou se in vitro exponenciálně množí vybrané sekvence nukleových kyselin. Metoda se nazývá polymerázová řetězová reakce - PCR (Polymerase Chain Reaction). Podstatou PCR je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA, ke které dochází po připojení dvou primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'OH-konce směřují proti sobě. Jako primery se obvykle používají dva uměle připravené krátké oligonukleotidy o délce 18 - 30 bází, odvozené z koncových sekvencí DNA určené k amplifikaci. Délka, komplementarita a poměr purinových a pyrimidinových nukleotidů v primeru určují specifitu i reakční podmínky PCR. Reakční směs pro amplifikaci specifického fragmentu DNA je složena z pufru (pro danou polymerázu), DNA - polymerázy, směsi deoxyribonukleotidů, dvou či více primerů, templátové DNA a $MgCl_2$. Při syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy, které se izolují z termofilních organismů. Nejčastěji používaná Taq DNA polymeráza je izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus* a odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. Termofilní bakterie *Thermus aquaticus* byla objevena v termálních pramenech (70 - 75 °C) Yellowstonského národního parku v roce 1969. Velikost tohoto enzymu je 60-68 kDa a specifická aktivita je 2000-8000 u.mg⁻¹ bakterií. Enzymatická aktivita Taq DNA polymerázy byla popsána v roce 1976 (Innis et al., 1990). Kromě DNA polymerázové aktivity má také 5' - 3' exonukleázovou aktivitu, postrádá však endonukleázovou a 3' - 5' exonukleázovou aktivitu. V současné době se také používají rekombinantní enzymy, např. Ampli Taq DNA polymeráza získaná expresí genu Taq DNA polymerázy *T. aquaticus* v *E. coli*. Kromě toho byl připraven modifikovaný rekombinantní enzym, tzv. Stoffelův fragment, který se liší od původního enzymu delecí 289 N-koncových aminokyselin. Touto úpravou se odstraňuje 5' - 3' exonukleázová aktivita a zvyšuje termostabilita a životnost enzymu. Kromě těchto polymeráz je v současné době na trhu celá řada dalších polymeráz izolovaných z různých bakterií (Tfl, Pfu, Dynazyme, Taq gold apod.). Výběr polymerázy závisí na konkrétním případě. Z praktického hlediska je rozhodujícím faktorem cena (Křemen et al., 1998). Standardní PCR se nejčastěji provádí v reakční směsi o objemu 25 - 50 µl. Amplifikace DNA probíhá v tepelně a chemicky inertních (polypropylénových) mikrozkuřkách nebo v jamkách speciálních destiček pro PCR (Innis et al., 1990). Syntéza DNA probíhá opakovaně formou 30 a více cyklů, při nichž se v závislosti na teplotě reakční směsi střídají pravidelně tři následující kroky:

- denaturace templátové DNA při teplotě 94-96 °C po dobu 15 sekund až 2 minut, přičemž se rozdělí komplementární řetězce DNA,
- připojení primerů (annealing) k jednovláknovým DNA řetězcům snížením teploty na 30 - 65 °C po dobu 30 - 60 sekund. Asociací primerů se ohraničuje amplifikovaná oblast ve směru od 3' - OH konců na obou templátových řetězcích. Teplota annealingu je závislá na množství CG a AT bazí v primeru a rovněž na délce primeru, což vyplývá i ze vzorce (jeden z mnoha) pro stanovení $T_a = 2(A+T) + 4(G+C) - 5$,
- polymerizační reakce (extenze, elongace) primerů ve směru 5' - 3' na obou řetězcích obvykle při optimální teplotě pro Taq DNA polymerázu (65 - 75 °C) po dobu 30 - 60 sekund. Na aktivitu Taq DNA polymerázy má základní vliv množství hořčnatých iontů v reakci, i tento faktor patří mezi základní při optimalizaci PCR. Krok polymerizace tedy uzavírá jeden amplifikační cyklus. Výslednými produkty jsou fragmenty DNA, jejichž konce jsou vymezeny 5'-konci primerů a jejichž délky jsou dány vzájemnou vzdáleností primerů. Automatické opakování jednotlivých cyklů umožňují speciální programovatelné termostaty, tzv. PCR termocykléry, ve kterých lze dosáhnout přesně definovatelných změn inkubačních teplot během krátkých intervalů. Každý z termocyklérů má svoje specifické vlastnosti (rychlost změny teploty), takže pokud je metoda PCR optimalizována pro určitý typ, je nutné při využití metody na jiném typu termocykléru program optimalizovat. Využitelnost PCR pro detekci a determinaci fytofágických hádátek je nediskutovatelným faktem, který podtrhuje i skutečnost publikační činnosti nematologů na celém světě. V průběhu let docházelo k vývoji a modifikacím základního principu PCR a dnes tedy můžeme nalézt nové původní metody založené na principu PCR (RAPD, SCAR, RT-PCR, Real Time – PCR, Multiplex - PCR, RD – PCR a další). Mnoho prací zabývajících se diagnostikou organismů na úrovni nukleových kyselin směřuje k populačně konzervativním úsekům, ITS (Internal Transcribed Spacer) regionům v oblasti cistronu rDNA (Powers et al. 1997, Iwahori et al. 1998, Hoyer et al. 1998, Al-Banna et al. 1997). Tato část genomu je osekvenována již u mnoha druhů organismů. Cistron rDNA je složen ze tří genů pro ribozomální RNA a ze dvou mezerníků, tedy ITS1 a ITS2. Tato struktura se opakuje a to řádově tisícekrát (Ondřej, 1992, Vachtenheim & Duchoň, 1992). V diagnostice jsou tyto úseky využívány zejména pro jejich vlastnost populační stálosti v rámci rodu či čeledi.

Hlavní složky polymerázové řetězové reakce

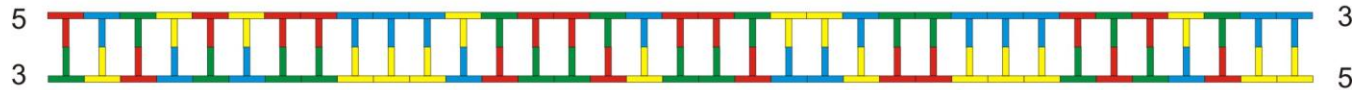
Taq polymeráza

dNTP C G T A

Primery 3' [sequence] 5' 5' [sequence] 3'

Templátová původní DNA

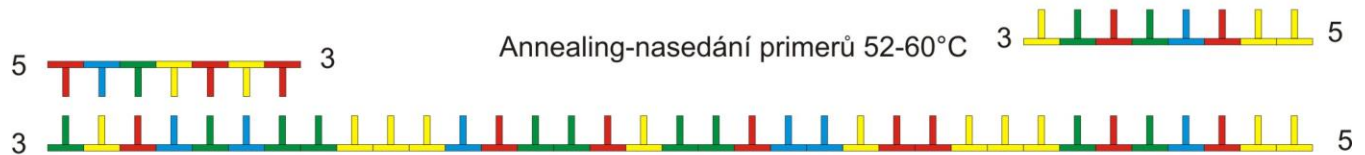
Původní řetězec DNA



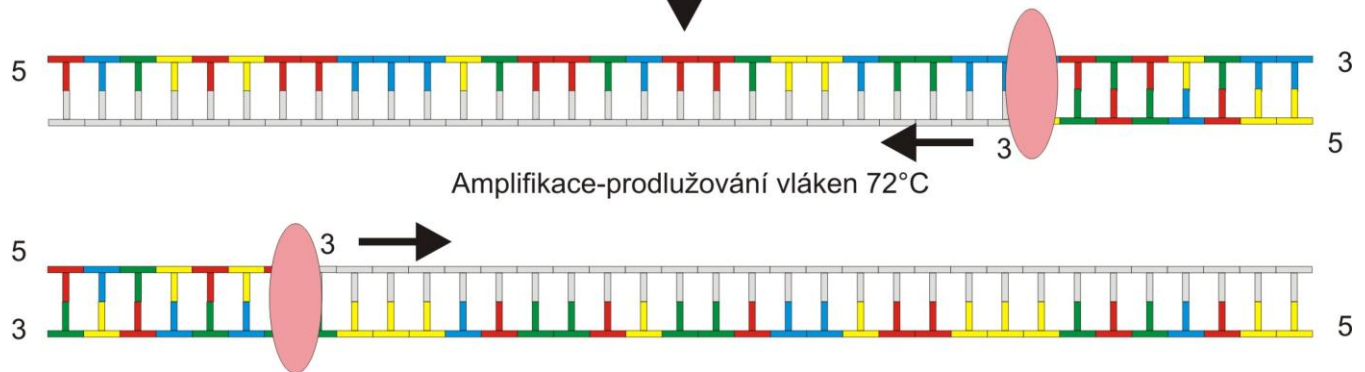
Denaturace 94°C



Annealing-nasedání primerů 52-60°C



Amplifikace-prodlužování vláken 72°C



Tyto tři základní kroky se opakují 35-50 krát

Schéma polymerázové řetězové reakce.

2.4.4.2.2. Metoda

Snahy autorů vytvořit specifické primery pro každý z vybraných druhů nebyly úspěšné. Proto byla zvolena strategie post restrikčního štěpení (viz. níže) pro rozlišení vybraných druhů. Pro detekci a determinaci vybraných druhů háďátek rodu *Aphelenchoides* na úrovni rDNA byly vybrány primery pro PCR z oblastí genů 5,8 S a 28S pro subjednotky ribozómu. Selektce probíhala se zaměřením na specifickou amplifikaci pouze pro taxon *Aphelenchoides*. Prvním krokem je tedy příprava DNA fragmentů pro restrikční štěpení. Pro amplifikace rDNA fragmentu pro *A. basseyi*, *A. fragariae* a pro *A. ritzemabosi* lze použít tyto primery (Aphe sp 5'-GTGGATCGATGAAGAACGCAG- 3F2, Aphe SPR 5'-GCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCAC - 3'). Primery naředíte na zásobní koncentraci 100 pmol/μl, do reakce po-té pipetujte koncentraci 10 pmol/μl. Pro tyto primery byla optimalizována následující reakční směs (mastermix) a teplotní standardy pro PCR. Reakce je optimalizována pro termocyklér PTC-200 (BioRad).

Reakční podmínky:

Mastermix pro 25μl reakci

1. pufr pro Taq polymerázu (Fermentas) -	2,5 μl
2. MgCl ₂ -	3,5μl
3. Taq polymeráza (1,5 U)(Fermentas) -	0,5 μl
4. dNTP (každého nukleotidu 25 mM) -	0,30 μl
5. primer 1	1,0 μl
6. primer 2	1,0 μl
7. izolovaná DNA (dle otestované, vhodné koncentrace)	1,0 – 5,0 μl
8. ddH ₂ O -	do 25 μl doplnit

Mastermix připravujeme vždy ve sterilních podmínkách nejlépe ve flow boxu. Používáme sterilní špičky s filtrem, předejdeme tak problémům souvisejícím s kontaminacemi. Pakliže připravujete mastermix pro několik vzorků je vhodné jej míchat v mikrozkuhavce 2,0 ml po-té dobře promíchat a rozpipetovat do 0,2 ml mikrozkuhavek pro PCR. DNA je vhodné přidat do víčka před uzavřením mikrozkuhavek a po-té spinováním smíchat s mastermixem. Ujednotí se tak okamžik kontaktu DNA s mastermixem. Po spinování umístíme mikrozkuhavky do termocykléru a spustíme program: „1 krok 95°C 2 minuty, 35 kroků 94 °C 1 minuta – 52 °C 45 sekund – 72 °C 1 minuta, 1 krok 72 °C 4 minuty, závěrečné chlazení na 4 °C „. Po PCR je vhodné otestovat přítomnost amplifikovaných fragmentů pomocí agarózové horizontální elektroforézy (viz. níže). Koncentrace DNA je jednou z limitních hodnot pro úspěšný průběh PCR. Je tedy

nutné ji věnovat náležitou pozornost. Po izolaci DNA z malého množství biologického materiálu ještě není zajištěno, že koncentrace cílových úseků DNA ve vzorku bude dostatečná pro její PCR amplifikaci. S ohledem na tuto skutečnost doporučujeme v první fázi připravit testovací PCR s různým množstvím DNA pipetovaným do reakce. Po ověření vhodného množství je další postup již jasný a případný falešně negativní výsledek neovlivní celkový proces diagnózy.

2.4.4.3. Agarózová elektroforéza – frakcionace fragmentů DNA ve stejnosměrném elektrickém poli

2.4.4.3.1. Přehled

Vizualizace replikovaných řetězců NA je nutnou součástí metod studujících NA. Nukleové kyseliny jsou separovány ve stejnosměrném elektrickém poli. Jako medium, ve kterém se NA pohybují, může sloužit agaróza, která je vhodná pro separaci fragmentů cca stovky párů bazí a více. Agaróza je lineární polysacharid, který se skládá z D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktosy. Pro elektroforetické účely se připravuje z agaru o vysokém stupni čistoty. Nukleové kyseliny se dělí nízkonapěťovou elektroforézou při potenciálovém spádu 5-10 V/cm délky gelu. Díky zbytkům kyseliny fosforečné jsou NA záporně nabitý a proto se ve stejnosměrném elektrickém poli pohybují ke kladnému pólu. Jejich pohyb je omezen jejich délkou a současně hustotou gelu. Kratší fragmenty se pohybují rychleji a delší pomaleji. Průběh elektroforézy se sleduje podle pohyblivosti přidáných barviv. Jako barvivo pro vizualizaci fragmentů NA lze použít ethidium bromid (EB), který se váže mezi báze NA. Pokud je NA označená EB vystavena záření o vlnové délce 260 nm, emituje EB oranžovočervené záření v oblasti viditelného světla 560 nm. Tímto způsobem jsou barveny zejména agarózové gely. Lze rovněž použít alternativní způsoby barvení jako například Syber green. Většina reagensů používaná pro elektroforézu jsou látky zdraví škodlivé, jedovaté atd. proto doporučujeme oddělit na pracovišti místnost pro práci s elektroforézou tak, aby celý proces práce s elektroforézami probíhal v uzavřeném cyklu se zvýšenou ochranou zdraví a prostředí, zahrnující používání ochranných pomůcek a likvidaci odpadů. Ethidium bromid je řazen mezi silné mutageny a proto jsou při práci s ním spojena i opatření ochraňující zdraví laborantů i prostředí. Zbytky použitého EB je nutné likvidovat podle směrnic týkajících se likvidace chemických odpadů. Jednou z firem zajišťující servis na území ČR je firma HORNET.

Vzorky nukleových kyselin s přidáním barviva a glycerolem (Ficoll) se podvrstvějí pod elektroforetický pufr do jamek v gelu. Po skončení elektroforézy, které indikuje doputování zóny barviva ke spodnímu okraji gelu, se nukleové kyseliny vizualizují pomocí transiluminátoru (Chrambach et al. 1987).

2.4.4.3.2. Metoda

Do mikrozkušavek odpipetujeme 5 µl produktu a přidáme 1 µl barviva pro elektroforetickou separaci (nanášecí barvivo – Loading dye). Barvivo kromě barev obsahuje i glycerol, který umožní nanášení produktu do jamek elektroforetického gelu.

Příprava 1 % agarózového gelu:

1. Navážit požadované množství agarózy do Erlenmayerovy baňky.
2. Agarózu promíchat s TBE pufrem.
3. Mírně povařit v mikrovlnné troubě za průběžného promíchávání.
4. Zchladit pod proudem vody na 50-60 °C.
5. Připipetovat 5 % (objemu gelu) ethidium bromidu (0,5 µg/ml), opatrně zamíchat a nalít do předem připravené vaničky s hřebenem.
6. Po ztuhnutí gelu hřeben vyjmout a vaničku uložit do horizontálního elektroforetického aparátu.
7. Zalít připraveným elektroforetickým pufrem (TBE).

Příprava TBE

Připravujeme zásobní roztok 5x koncentrovaný (uchovat ve 4°C).

Na 1 l TBE 5x pH (8,0)

TRIS - 54,5 g

Kyselina boritá - 27,5 g

EDTA - 3,65 g

2.4.4.4. Restrikční štěpení jako klíč pro determinaci rostlinně parazitických hádátek

2.4.4.4.1. Přehled

Za rutinní metodou pro diagnostiku fytoparazitických hádátek se dá označit kombinace PCR a restrikčního štěpení. Pro aplikaci této metody není nutné speciální vybavení, postačí jen základně vybavená molekulárně biologická laboratoř na rozdíl od například sekvenačních technik či technik rekombinantní DNA. Restrikční endonukleázy jsou původní bakteriální enzymy. Nukleázy katalyzují hydrolýzu fosfodiesterové vazby v nukleových kyselinách. Restrikční endonukleázy mají jednu zajímavou

vlastnost, která je odlišuje od ostatních nukleáz – štěpí DNA pouze v místech se specifickou nukleotidovou sekvencí. Proto jich lze využívat ke štěpení genomové DNA na sadu specifických fragmentů. Restrikční endonukleázy zabraňují přenosu DNA mezi různými druhy bakterií, protože různé druhy bakterií syntetizují restrikční endonukleázy štěpící různé nukleotidové sekvence. Restrikční endonukleázy používané v molekulární biologii pocházejí převážně z bakterií a protože jsou jimi rozpoznávána místa na DNA krátká (obvykle 4-8 nukleotidových párů), je vysoká pravděpodobnost, že se tato místa náhodně vyskytnou v každé delší molekule DNA. Proto mohou být tyto enzymy použity pro analýzu DNA z jakéhokoli zdroje. Restrikční endonukleázy se staly běžným předmětem obchodu a v dnešní době jsou rozesílány poštou, typický katalog firem zabývajících se dodáváním těchto enzymů, obsahuje více než stovku restrikčních endonukleáz, přičemž každá rozpoznává jinou sekvenci DNA. Průměrná velikost fragmentů produkovaných různými restrikčními endonukleázami se tedy značně liší, což umožňuje naštěpit dlouhou molekulu DNA na fragmenty o délce, která nejlépe vyhovuje jejich dalšímu využití (Alberts et al. 1998).

Restrikční enzymy (RE) mohou být použity pro štěpení DNA v místě specifických známých sekvencí. Princip spočívá v rozložení palindromatických sekvencí v genomu a jejich nalezení pomocí restrikční endonukleázy. Sekvence nukleotidů, kterou RE rozpoznává, se nazývá rozpoznávací sekvence, nejčastěji se jedná o palindromatickou strukturu. Místo, v němž je štěpena, se nazývá restrikční (Perry & Wright, 1998). Zde jsou uvedeny některé příklady využití rDNA pro detekci a determinaci fytoparazitických hádátek. Úsek od 3' konce genu 18S až po 5' konec genu 28S byl použit pro srovnání PCN (Potato Cyst Nematodes) ze dvou kontinentů (Ferris et al. 1995). Stejně tak i v následující práci se jednalo o populační studii zaměřenou na *G. pallida*, *G. rostochiensis*, *G. virginiae* (Marks & Brodie, 1998). Pro studium fylogeneze izolátů *B. xylophilus* a *B. mucronatus* bylo použito sekvenční analýzy ITS rDNA a byly zde nalezeny mutace, které je možné využít pro konstrukci fylogenetických stromů (Iwahori, 1998). Na základě studia rDNA byly nalezeny restrikční endonukleázy, které je možné použít pro diferenciaci pěti druhů z rodu *Bursaphelenchus* tato metoda restrikčního mapování byla optimalizována pro několik desítek druhů (Hoyer et al. 1998).

Pro diferenciaci *A. besseyi*, *A. nechaleos* a *A. paranechaleos* napadajících rýži byla použita metoda ITS-RFLP PCR a to na základě amplifikace celého cistronu mezi geny S18 a S28 (Ibrahim et al. 1994).

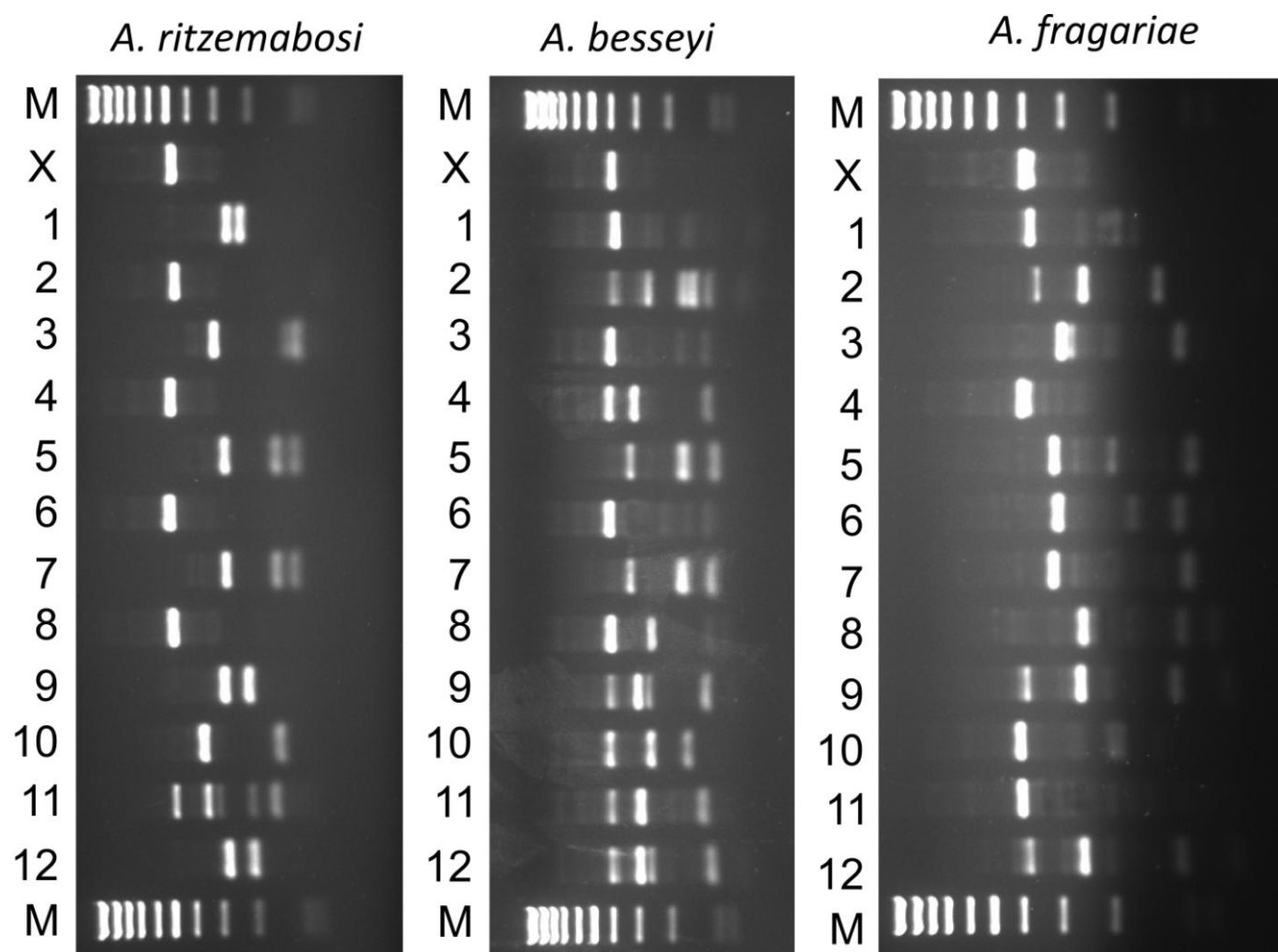
2.4.4.4.2. Metoda

Byly vybrány restrikční endonukleázy, které charakterizují motivem vzniklých fragmentů každý z rozlišovaných druhů rodu *Aphelenchoides*. Takovéto restrikční mapování je používáno v řadě jiných

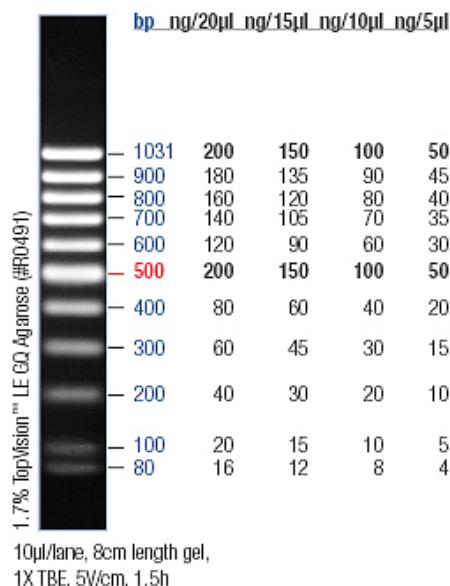
případů jako relevantní sekvenční charakteristika daného fragmentu dsDNA. V případě molekulární diagnostiky háďátek rodu *Bursaphelenchus* se používá sada pěti enzymů. Pro účely rozlišení tří významných druhů rodu *Aphelenchoides* bylo vytypováno 12 restričních endonukleáz.

1. 10 μ l PCR produktu napipetovat do 12 mikrozkušavek 0,2 ml
2. připipetovat 5 μ l ddH₂O a 2 μ l pufru pro daný enzym (lze také použít univerzální pufr dodávaný výrobcem enzymu)
3. Připipetovat 1 μ l enzymu

Inkubujeme v předepsané teplotě (37°C nebo 60°C) po dobu dvou hodin. V případě 60 °C doporučujeme použít termocyklér s vyhřívaným víčkem tak aby nedocházelo k odpařování směsi, je rovněž možné přidat 20 μ l minerálního oleje pro PCR (Sigma – M5904). Produkty restričního štěpení separujeme na 1,5 - 1,8 % agarózové horizontální elektroforéze. Získané fragmenty (motivy bandů) porovnáme z následujícími markery.



Pro štěpení fragmentu „X“ byly použity pro jednotlivé druhy následující restriční endonukleázy: 1-Fnu4HI, 2-NmuCI, 3-HpaII, 4-Pdml, 5-HinP1I, 6-AluI, 7-Hin6I, 8-BseGI, 9-BcH1285I, 10-Bsp143II, 11-Tail, 12-BsiEI. Jako molekulární marker „M“ byl použit MassRuler DNA Ladder (Fermentas SM0383).



2.2.Seznam literatury

- Al-Banna, L., Williamson, V., Gardner, S., L. (1997). Phylogenetic analysis of nematodes of genus *Pratylenchus* using nuclear 26 S rDNA. *Molecular Phylogenetic Evolution* 7(1): 94-102.
- Alberts, B., Bray, D. Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1998). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, 630 p.
- Anonym 1 (2004) *Bulletin OEPP/EPPO* 34, 155-157.
- Anonym 2, (1992). *OEPP/EPPO Quarantine procedures No. 38. Aphelenchoides besseyi* in seeds of *Oryza sativa*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 22: 217-218.
- Decker, H. (1969). *Phytonematologie*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag Berlin, 526 s.
- Duan, Y.P., Castro, H.F., Hewlett, T.E., White, J.H., Ogram, A.V. (2003). Detection and characterization of *Pasteuria* 16S rRNA gene sequences from nematodes and soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 105-112.
- Evans, K., Trutgill, D. L., Webster, J. M. (1993). *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture*. Wallingford: CAB International, 648 p.
- Feakin, S.D. (1971). Pest control in rice. *PANS Manual* 3: 99-100.
- Ferris, V. R., Miller, L. I., Faghihi, J., Ferris, M. (1995). Ribosomal DNA comparisons of *Globodera* from two continents. *Journal of Nematology* 27: 273-283.
- Ganpati B. J., Parwinder S. G., (2004). Effectiveness of a Hot Water Drench for the Control of Foliar Nematodes *Aphelenchoides fragariae* in Floriculture. *Journal of Nematology* 6(1):49–53.

- Gené, J., Verdejo-Lucas, S., Stchigel, A.M., Sorribas, F.J., Guaro, J. (2005). Microbial parasites associated with *Tylenchulus semipenetrans* in citrus orchards of Catalonia, Spain. *Biocontrol Science and Technology* 15(7): 721 - 731.
- Hoyer, U., Burgermaister, W., Faghihi, H. (1998). Identification of *Bursaphelenchus* species (Nematoda, Aphelenchoididae) on the basis of amplified ribosomal DNA (ITS-RFLP). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 50: 273-277.
- Hunt, D. J. (1993). *Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematics and bionomics*. CABI Cambridge, 352 p.
- Chrambach, A., Dunn, M. J., Radola, B. J. (1987) *Advances in Electrophoresis*. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, Germany 440 p.
- Ibrahim, S. K., Perry, R. N., Burrows, P. R., Hooper, D. J. (1994). Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of Nematology* 26 (4): 412-421.
- Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T. (1990). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press Inc., 416 p.
- Iwahori, H., Kanzaki, N., Futai, K. (1998). Phylogenetic relationship among several isolates of *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* based on their ribosomal DNA sequences. *Proceedings of International Symposium, Tokyo, Japan, 27-28 October*.
- Jaffee, B. A., Ferris, H., Scow, K. M. (1998). Nematode-Trapping Fungi in Organic and Conventional Cropping Systems. *Phytopatology*, 88(4): 344-350.
- Javor, I. (1970). [Occurrence of rice nematode (*Aphelenchoides besseyi* Christie) in Hungary]. *Novényvédelem* 6: 259-263.
- Jensen, C.H., Neumeister, H.G., Lysek, G. (1997). Nematophagous Fungi – Study by Fluorescence Microscopy and EDX – Technique of the Periodicity of Trap Formation in Soil. *Biological Rhythm Research* 28(3): 365 – 373.
- Krčmář, M., Břicháček, B. (1993). *Molekulárně biologické metody ve virologické diagnostice*. Institut pro další vzdělávání pracovníků ze zdravotnictví Brno, 87 s.
- Křemen, J., Pohlreich, P., Stříbrná, J. (1998). *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Karolinum Praha, 117 s.
- Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (1990), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International, Wallingford, UK.
- Malcolm, C. S., Averre, Ch. W. (2000). *Diagnosing plant disease caused by nematodes*. St. Paul Minnesota: The American Phytopathological Society, 187 p.

- Marks, R. J., Brodie, B. B. (1998). Potato cyst nematodes biology , distribution and control. CABI Wallingford, 395 p.
- Morton C.O., Hirsch P.R., Kerry B.R. (2004): Infection of plant parasitic nematodes by nematophagous fungi – a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology* 6(2): 161 – 170.
- Ondřej, M. (1992). Genové inženýrství kulturních rostlin. Academia, Praha, 123 s.
- Perry, R. N., Wright, D. J. (1998). Free-living plant-parasitic nematodes. CABI, 438 p.
- Perssonová, C., Jansson, H.B. (1999). Rhizosphere Colonization and Control of *Meloidogyne* spp. by Nematode-trapping Fungi. *Journal of Nematology* 31(2): 164-171.
- Powers, T. O., Todd, T. C., Burnell, A. M., Murray, P. C. B., Fleming, C. C., Szalanski, A. L., Adams, B. A., Harris, T. S. (1997). The rDNA transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology* 29(4): 441-450.
- Qiu, J., Westerdahl, B. B., Buchner, R. P., Anderson, C. A. (1993). Refinement of Hot Water Treatment for Management of *Aphelenchoides fragariae* in Strawberry. Supplement to *Journal of Nematology* 25(4S): 795-799.
- Rosypal, S. (2000). Úvod do molekulární biologie. Brno, 996 s.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1590 p.
- Siddiqi, M.R. (2000). Tylenchida Parasites of Plants and Insects. 2nd Edition. CABI Publishing, 805 p.
- Southey, J. F. (1985). Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Her Majesty's Stationery Office London, 202 p.
- Todd, E.H., Atkins, J.G. (1958). White tip disease of rice. I. Symptoms, laboratory culture of nematode and pathogenicity tests. *Phytopathology* 48: 632-637.
- Todd, E.H., Atkins, J.G. (1959a). White tip disease of rice. II. Seed treatment studies. *Phytopathology* 49: 184-188.
- Todd, E.H., Atkins, J.G. (1959b). White tip disease of rice. III. Yield tests and varietal resistance. *Phytopathology* 49: 189-191.
- Vachtenheim, J., Duchoň, J. (1992). Molekulární biologie pro mediky a lékaře. Od klonování DNA po lékařské aplikace. UK Praha, 175 s.
- Webster, J.M. (1972): Economic nematology. London Academic Press Inc., 563 p.

Poděkování:

Autorský tým děkuje touto cestou Ing. Markétě Hájkové za spolupráci při výzkumu v této oblasti.

3.Srovnání „novosti postupů“

V předložené metodice jsou uvedeny uplatnitelné postupy pro detekci a determinaci významných hádátek rodu *Aphelenchoides*. Současná metodické postupy diagnostiky těchto hádátek jsou zaměřeny pouze na morfometrickou komparativní diagnostiku. V tomto ohledu je existence nových funkčních a aplikovatelných metod diagnostiky na úrovni nukleových kyselin jedinou možností, jak potvrdit, nebo vyvrátit výsledky diagnostických metod doposud používaných. Jako novum lze tedy označit nové optimalizované metody diagnostiky hádátek rodu *Aphelenchoides* na úrovni molekulárních markerů. V metodice jsou rovněž uvedeny optimalizované postupy extrakce hádátek z rostlinného materiálu, příprava trvalých i nativních preparátů a ve srovnání s publikovanými pracemi se jedná o postupy „de novo“. V neposlední řadě lze uvést, že v ČR se jedná o první práci tohoto druhu a rozsahu. Možnost přímé konzultace či získání praktických zkušeností na pracovišti poskytovatele je nejen možná, ale i žádoucí. Tato skutečnost dává dobré předpoklady pro využití metodiky v praxi.

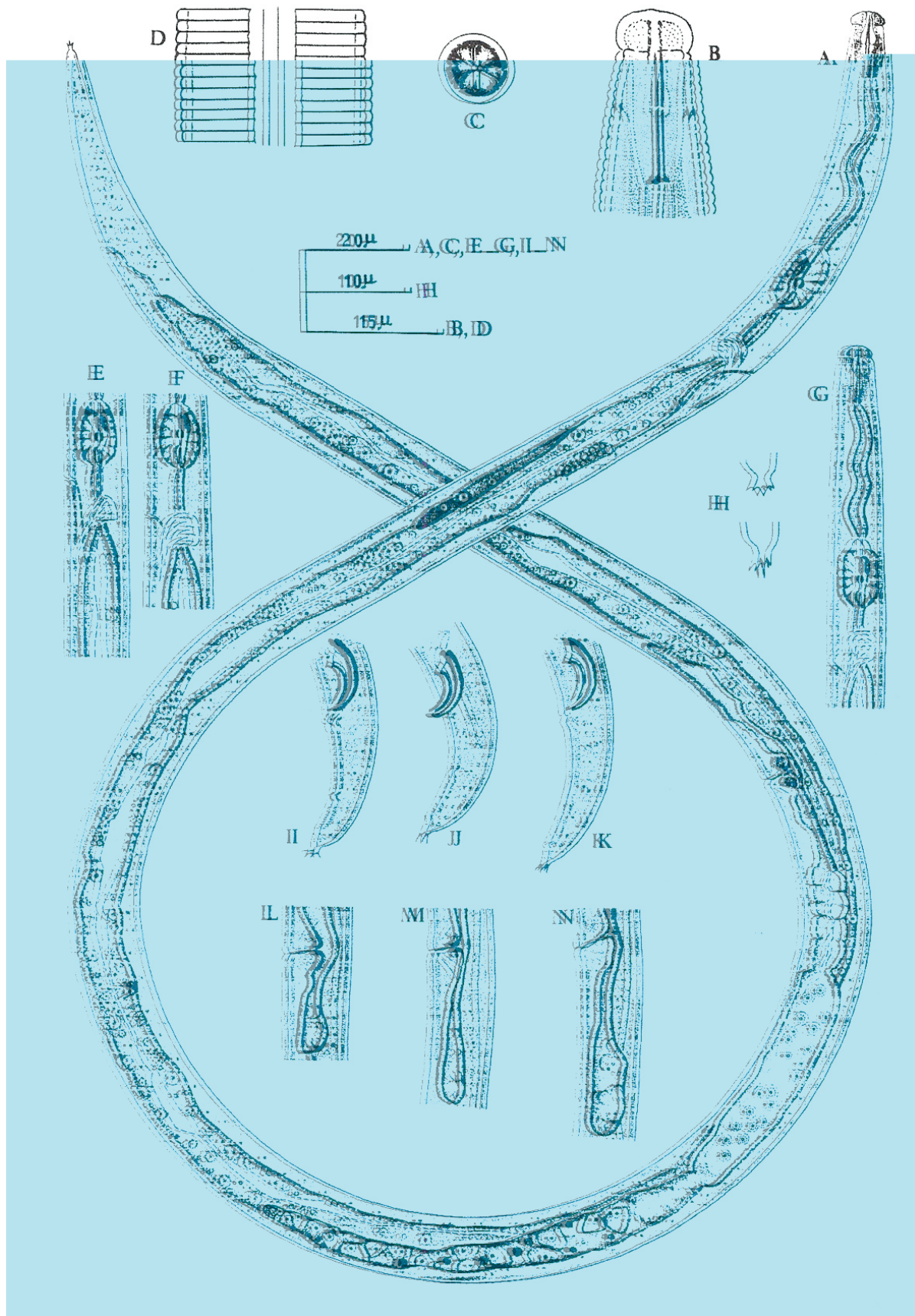
4.Závěr

Tato metodika je určena pro organizace na území ČR zabývající se výzkumem či aplikací výsledků výzkumu do praxe a to na úrovni ochrany rostlin. Jedná se na prvním místě o Státní rostlinolékařskou správu, dále pak o Výzkumný ústav Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví Průhonice. Metodika bude využita jako součást zavedených laboratorních postupů. V případě zájmu dalších organizací budou uzavřeny i další smlouvy o využití metodiky.

Přílohy



Příznaky napadení kapradin háďátky rodu *Aphelenchoides*.

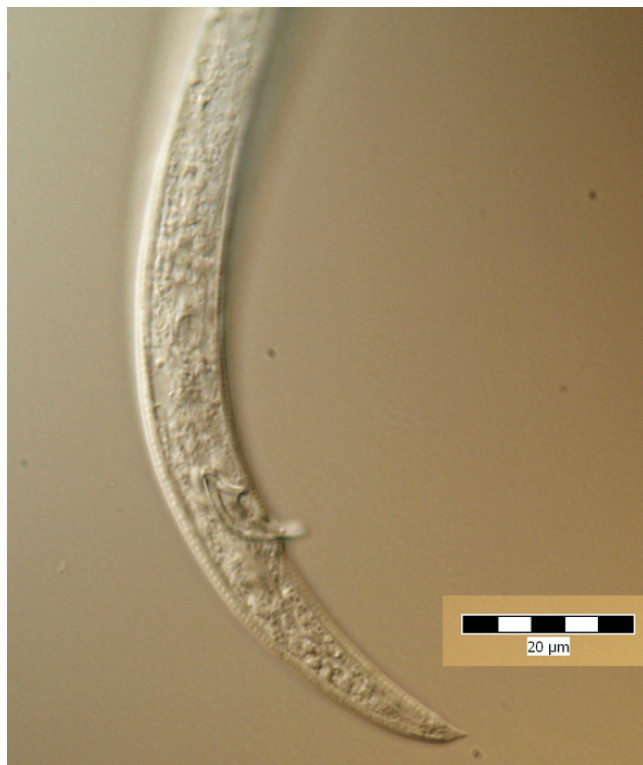


Perokresba *A. besseyi*, převzato z Hunt, 1993.

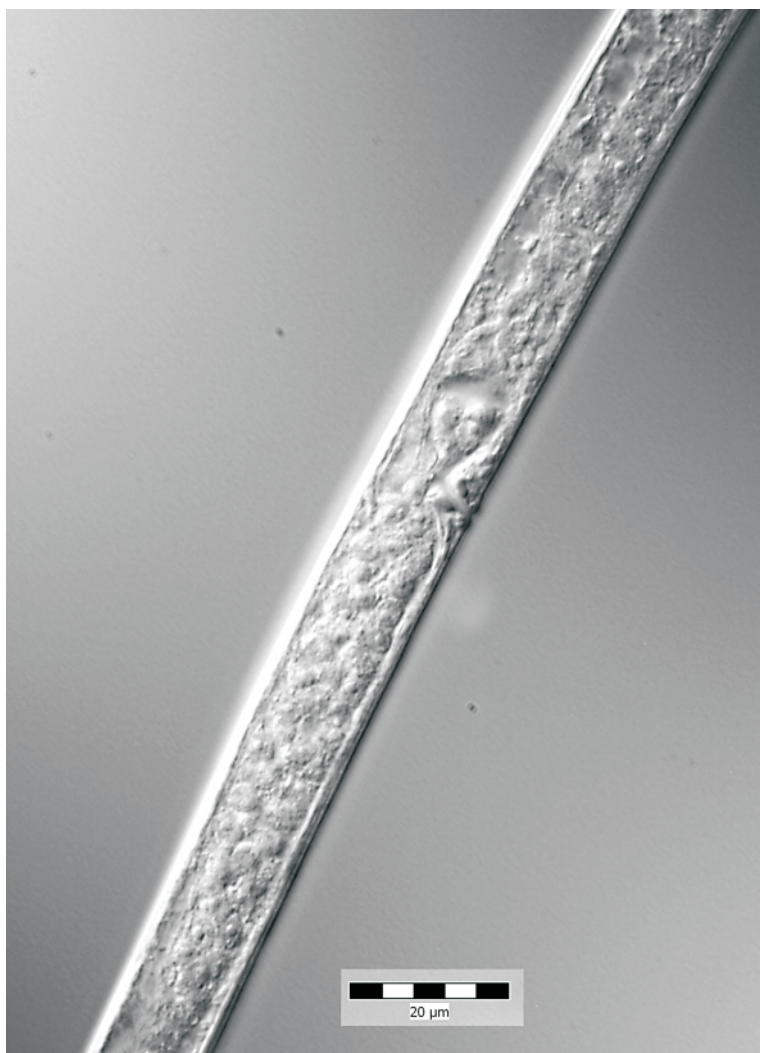
Legenda: A-samička, B-hlava samičky, C-hlava samičky anteriárně, D-laterální linie, E,F-střední bulbus samičky, umístění exkrementních pórů a rozdíly v nervovém provazci, G-hlava samečka, H-konec ocasu samičky, různé tvary mukra, I-K-ocas samečka, L-N-různé tvary post vulválního váčku.



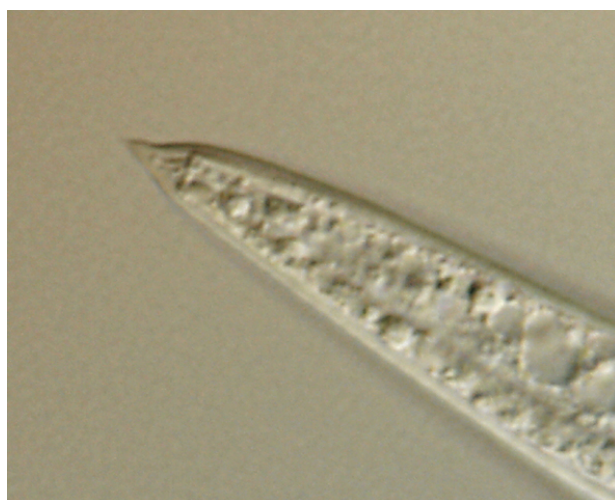
Aphelenchoides besseyi hlava samečka.



Aphelenchoides besseyi ocas samečka.



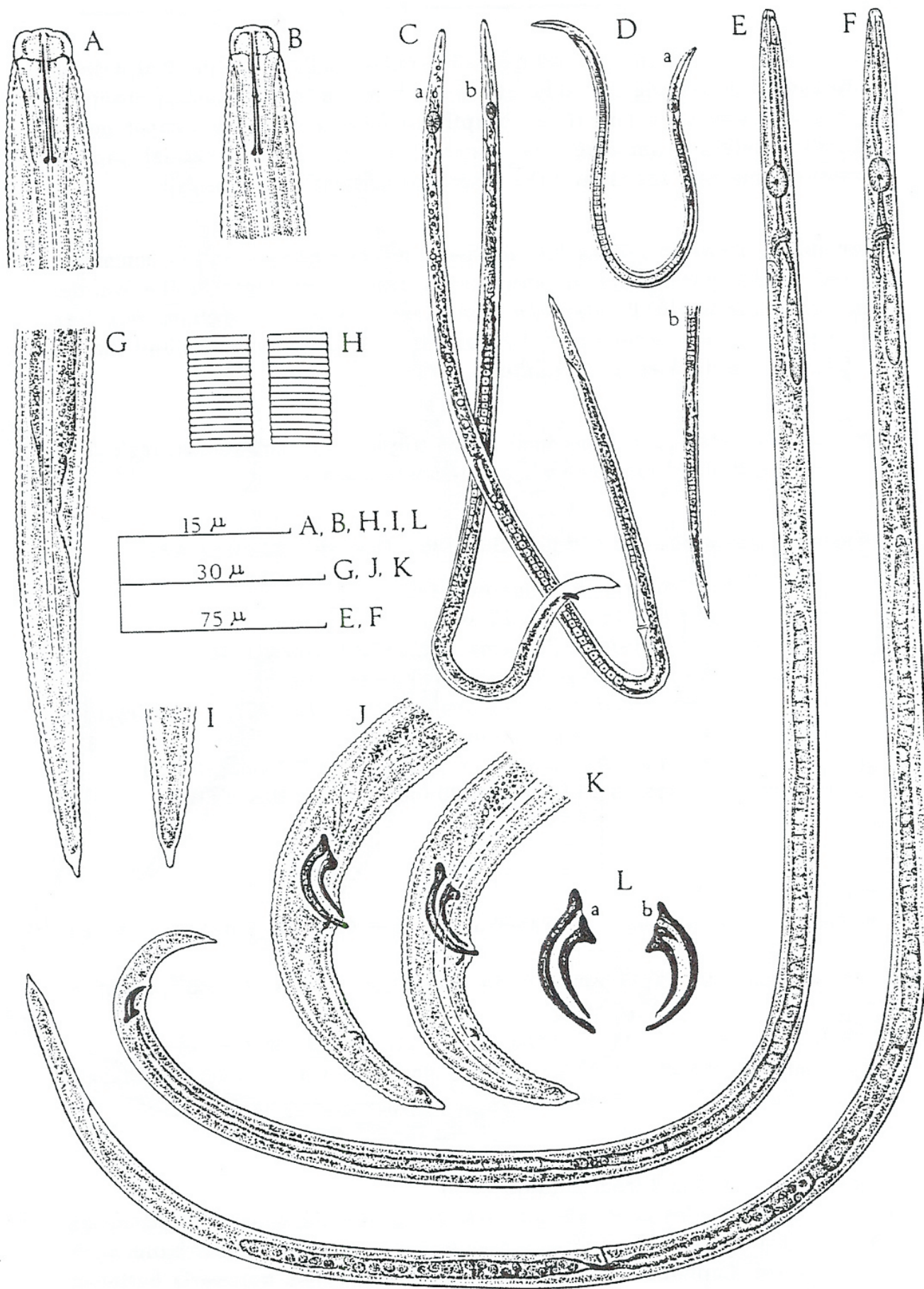
Aphelenchoides besseyi vulva.



Aphelenchoides besseyi ocas samička.

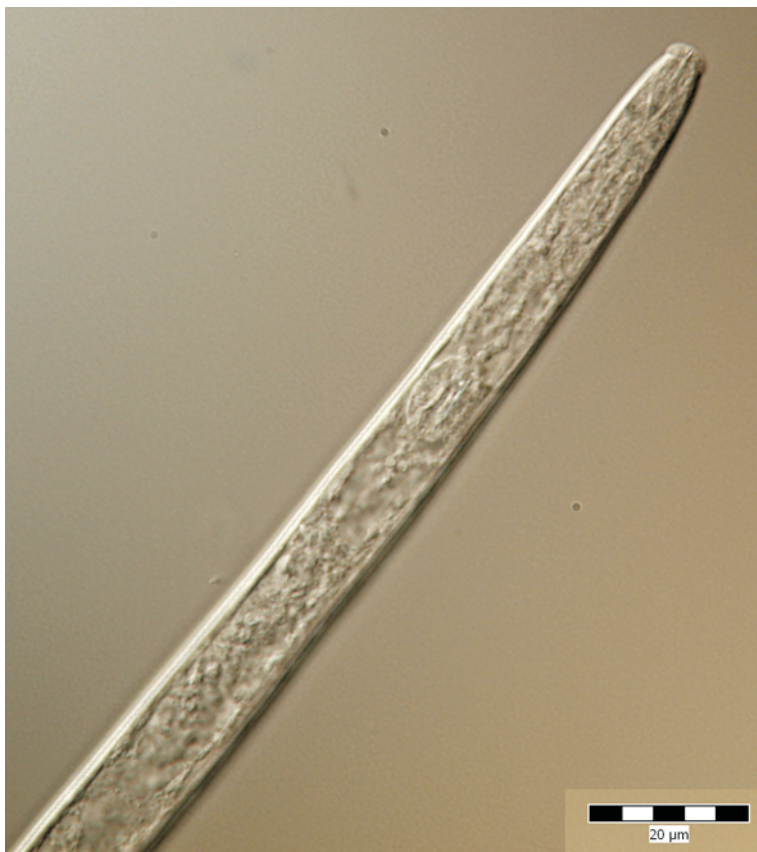


Aphelenchoides besseyi spikula.

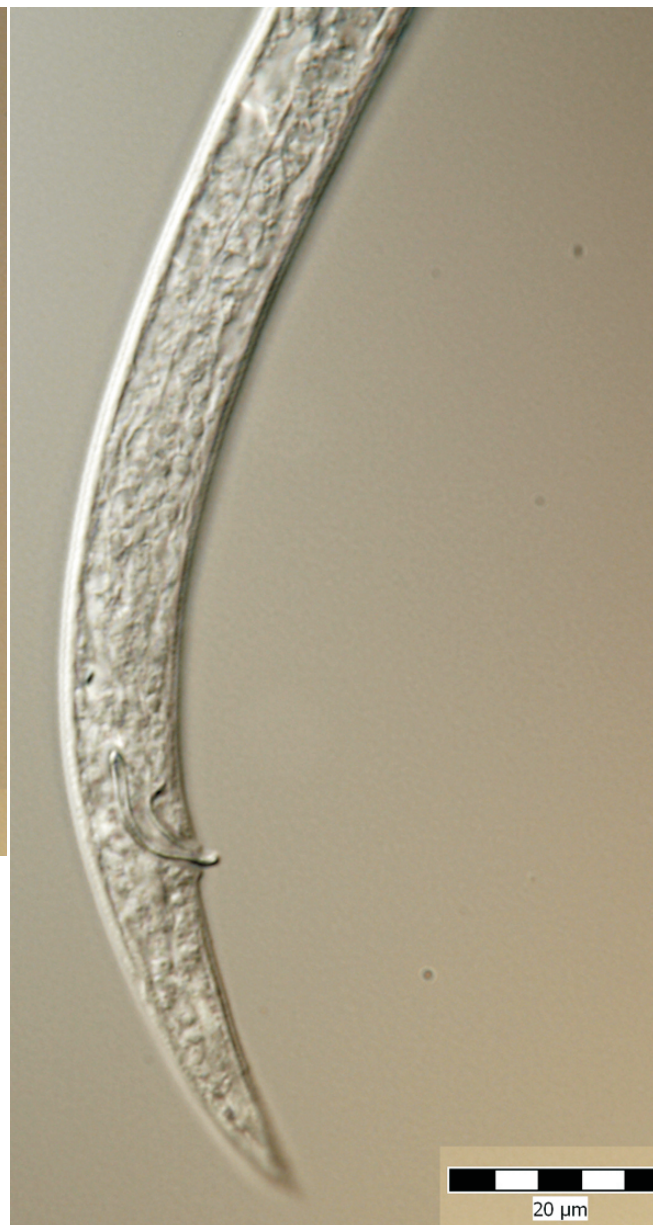


Perokresba *A. fragariae*, převzato z Hunt, 1993.

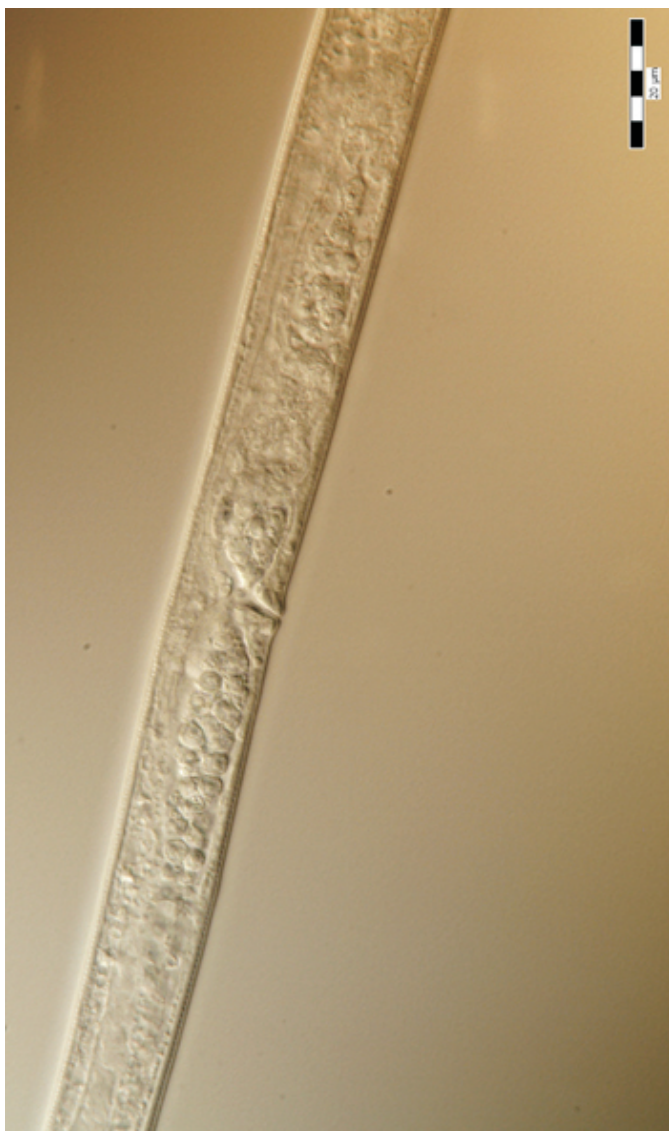
Legenda: A-hlava samičky, B-hlava sameček, C-a) samička, b) sameček, D- a) male, b) samička posteriární část, E-sameček, F- samička, G- ocas samička, H-laterální linie, I-samička uzakončení ocasu, J,K-sameček ocas, L-spikuly.



Aphelenchoides fragariae hlava samečka.



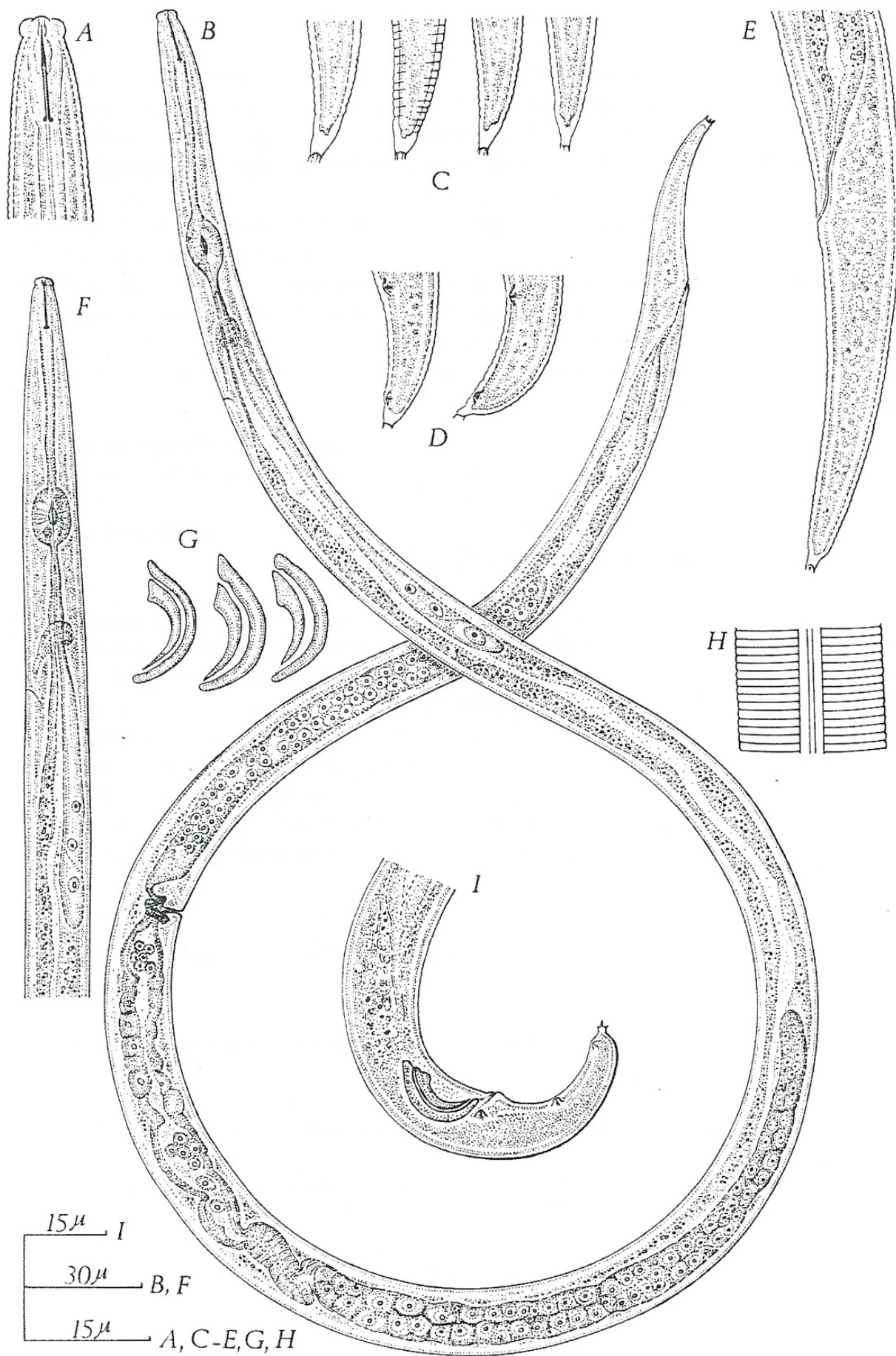
Aphelenchoides fragariae ocas samečka.



Aphelenchoides fragariae vulva.



Aphelenchoides fragariae ocas samička.

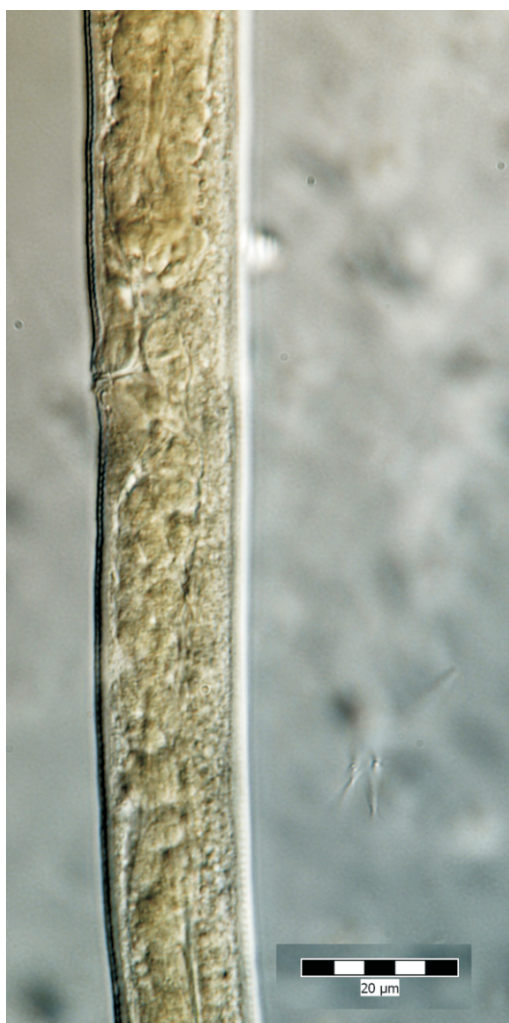


Perokresba *A. ritzemabosi*, převzato z Hunt, 1993.

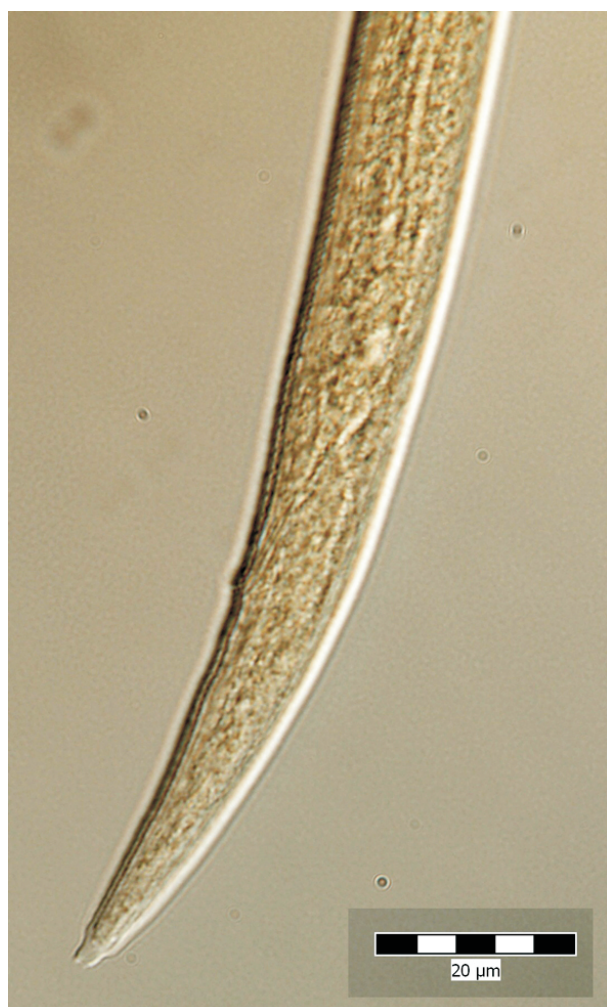
Legenda: A-hlava samičky, B-samička, C-ocas samičky, D-ocas samec, E-ocas samička, F-samička jícen, G-spikuly, H-laterální linie, I-ocas samečka.



Aphelenchoides ritzemabosi hlava sameček.



Aphelenchoides ritzemabosi vulva.



Aphelenchoides ritzemabosi ocas samička.

Poznámky

**Název: Diagnostické metody významných háďátek rodu Aphelenchoides
v podmínkách ČR. (metodika pro praxi)**

Autoři: Zouhar M., Mazáková J., Gaar V.

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Povoleno: Děkanátem AF

Tisk: PowerPrint, ČZU-Kamýcká ul., Praha 6 Suchdol

Náklad: 30

Počet stran:38

Doporučená cena: 150,- Kč

Vydání: první

Rok vydání: 2008

ISBN:978-80-213-1748-2