

# STUDY OF POPULATION OF *DITYLENCHUS DIPSACI* FROM IDENTIFY THE CZECH REPUBLIC BY MOLECULAR METHODS

Studium populací *Ditylenchus dipsaci* na území České republiky pomocí metod molekulární biologie

Miloslav ZOUHAR, Martin MAREK, Joao SARAIVA, Pavel RYŠÁNEK  
KOR AF ČZU

## Souhrn, klíčová slova

*Ditylenchus dipsaci* je významným fytoparazitickým hádčátkem střední Evropy. Cílem této práce bylo získat vzorky populací tohoto hádčátka z území ČR a použít metody molekulární biologie k jejich diferenciaci. Byly použity metody PCR, RFLP a SSCP. Byly rovněž optimalizovány metody extrakce DNA z rostlinného materiálu a kontaminované půdy. *Ditylenchus dipsaci*, diagnostika, biorasa, rDNA, PCR, RFLP, SSCP.

## Summary, keywords

*Ditylenchus dipsaci* is one of the most harmful parasitic nematodes in Central Europe. The aim of the study was to collect samples of *D. dipsaci* from the Czech Republic and to identify them by molecular methods. Were used methods PCR, RFLP and SSCP. At the same time methods for DNA extraction from plant material and contaminated soil were optimized.

*Ditylenchus dipsaci*, diagnostics, biorace, rDNA, PCR, RFLP, SSCP.

## Introduction - Úvod

*Ditylenchus dipsaci* je volně žijící osní fytoparazitické hádčátko. V ČR je řazeno mezi karanténní škodlivé organizmy. Jeho výskyt byl potvrzen na pěstovaných plodinách, především na cibuli, česneku, vojtěšce, na bobovitých rostlinách, bramborách a dalších plodinách i plevelech. *Ditylenchus dipsaci* je jedním z nejničivějších rostlinných parazitických hádčátek zvláště v oblastech mírného pásma. Při absenci ochrany může způsobit úplné zničení hostitelských rostlin. Klíčovým prvkem v ochraně rostlin proti *D. dipsaci* je jeho včasná a přesná diagnostika (BRZESKI, 1998). Pro diagnostiku lze použít morfologické znaky, ovšem tyto neřeší rozlišení bioras. Použití DNA pro diagnostiku druhů rodu *Ditylenchus* bylo publikováno (WENDT et al., 1993).

## Methods - Metody

Pro izolaci DNA bylo optimalizováno několik metod. Jako základní bylo nutné optimalizovat metodu extrakce z jednoho hádčátka, tak aby bylo možné posuzovat případné diference i v rámci jedné populace. Vyšli jsme z metody izolace DNA publikované LI et al. (1988) původně určené pro izolaci DNA ze spermií. Rovněž byla optimalizována metoda extrakce DNA z rostlinného materiálu a půdy.

Pro diagnostiku bylo použito cistronu rDNA. Bylo nutné amplifikovat část cistronu rDNA mezi geny 18S a 26S. Byly použity specifické primery publikované (FALLAS 1996) pro amplifikaci rDNA *Caenorhabditis elegans* a použité pro rozlišení *D. dipsaci*, *D. destructor* a *D. myceliophagus* v práci (WENDT 1993). Pomocí těchto primerů, 18S 5'-TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT-3' a 26S 3'-GGA ATC ATT GCC GCT CAC TTT-5,' lze amplifikovat 900 bp dlouhý úsek charakteristický pro *D. dipsaci*.

Pro restriční štěpení bylo použito 16 RE (Eco RI, Hinc II, Alu I, Taq I, Bam HI, Eco 321, Bsu RI, Hinf I, Eco 881, Hind III, Dra I, Msp I, Rsa I, Hin GI, Xho I, Bse GI).

Metoda analýzy SSCP je jednoduchou, velice senzitivní a efektivní technikou k detekci mutací typu záměny jedné báze, tedy mutace nemění délku řetězce NA. (ORITA et al., 1989).

## Results - discussion - Výsledky - diskuse

Podářilo se optimalizovat metodu extrakce NA z jednoho jedince. Rovněž lze použít metodu pro izolaci DNA z půdy pomocí kitu firmy Q-biogene. Citlivost metody se pohybuje mezi 100 - 200 hádčátek na 500 mg zeminy.

Získané populace zastupovaly biorasy z česneku (7), vojtěšky (2), cibule (1) a čekanky (1). Populace biorasy z česneku získané z různých lokalit vykazují homogenní zastoupení restričních míst a ani pomocí SSCP nebyly nalezeny žádné diference. Populace získaná z čekanky vykazuje obdobnou strukturu rDNA jako populace z česneku a nelze ji tedy tímto způsobem odlišit. Naproti tomu populace získané z vojtěšky vykazovaly oproti výše uváděným populacím značné diference. Jak použitím RE (Eco RI, Hinc II, Alu I, Taq I, Eco 321, Bsu RI, Hinf I, Eco 881, Msp I, Rsa I, Hin GI, Xho I), tak při testování pomocí SSCP, či RE SSCP. Stejně diference se vyskytly i u vzorku populace získaného z cibule.

## References - Použitá literatura

- Brzeski, M. W. (1998). Nematodes of Tylenchina in Poland and temperate Europe. Muzeum i Instytut Zoologii Polska Akademia Nauk Warszawa, 395 p.
- Fallas, G. A., Hahn, M. L., Fargette, M., Burrows, P. R., Sarah, J. L. (1996). Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus* spp. from different areas of the world. (1996). Journal of Nematology 28(4): 422-430.
- Li, H., Gyllensten, U. B., Cui, X., Saiki, R. K., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1988). Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature 335: 414-417.
- Wendt, K. R., Vrain, T. C., Webster, J. M. (1993). Separation of three species of *Ditylenchus* and some host races of *D. dipsaci* by restriction fragment length polymorphism. Journal of Nematology 25: 555-563.

Řešeno v rámci grantu QE 1108 priorita III-C-01