



BAKTERIÁLNÍ KROUŽKOVITOST BRAMBORU

Clavibacter michiganensis
subsp. *sepedonicus*

Kolektiv autorů
CERTIFIKOVANÁ METODIKA
2017

VÝZKUMNÝ ÚSTAV ROSTLINNÉ VÝROBY, v.v.i.,
VÝZKUMNÝ ÚSTAV BRAMBORÁŘSKÝ HAVLÍČKŮV BROD, s. r. o.

Kolektiv autorů:

Ing. Iveta Pánková, Ph.D.; Ing. Václav Krejzar, Ph.D.

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Ing. Ervín Hausvater, CSc.; Ing. Petr Doležal, Ph.D.

Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.

Oponenti:

Ing. Jana Vichová, Ph.D.

Mendelova universita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, tel.: 545 133 050,

e-mail: vichova@mendelu.cz

Ing. Jan Žižka

Ministerstvo zemědělství České republiky, Sekce zemědělských komodit, zahraničních vztahů a ekologického zemědělství, Odbor rostlinných komodit, Oddělení tržních řádů 17224, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1, tel.: 221 812 794, e-mail: jan.zizka2@mze.cz

Dedikace:

Metodika je výstupem projektu NAZV QJ1310218 „Snížení rizika výskytu původce bakteriální kroužkovitosti bramboru v šlechtitelském a množitelském materiálu“ a s podporou Ministerstva zemědělství ČR je výstupem v rámci řešení institucionálního projektu č. RO0417, Etapy č. 21: „Zvýšení účinnosti regulace fytopatogenních prokaryot“.

Metodika je komplexní informační materiál určený pro šlechtitele a množitele sadbových hlíz bramboru, pěstitele konzumních odrůd bramboru, pro orgány státní správy – Ministerstvo zemědělství ČR a Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský zabývající se dohledem a kontrolou výskytu karanténního činitele, původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a pro Vysoké školy s výukou rostlinolékařské bakteriologie.

Odbor rostlinných komodit MZE ČR vydal OSVĚDČENÍ č. j. 8666/2017-MZE-17 224 o uznání certifikované metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a hodnocení programů účelové podpory, schválené usnesením vlády ČR ze dne 8. února 2017 č. 107

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2017

ISBN 978-80-7427-240-0

© Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o., 2017

ISBN 978-80-86940-75-5

OBSAH

1. Uvedení do problematiky	4
2. Cíl metodiky	5
3. Vlastní popis metodiky	5
3.1. Hostitelský okruh a rozšíření bakteriální kroužkovitosti bramboru ..	6
3.2. Příznaky choroby	7
3.2.1 Příznaky choroby na nadzemních částech rostliny bramboru.....	7
3.2.2 Příznaky choroby na hlízách bramboru.....	9
3.3. Infekční cyklus a přenos infekce	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	11
3.3.1 Vertikální přenos infekce	11
3.3.2 Horizontální přenos infekce	12
3.4. Identifikace	13
3.4.1 Odběr vzorků.....	14
3.4.1.1 Rostliny	14
3.4.1.2 Hlízy.....	14
3.4.2 Vizuální kontrola hlíz	15
3.4.3 Přesné detekční metody.....	15
3.4.4 Biologický test a izolace patogenu.....	16
3.5. Preventivní opatření proti šíření infekce	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	17
3.5.1 Třístupňová kontrola vstupních šlechtitelských	
a množitelských materiálů bramboru.....	18
3.6. Management, regulace choroby	20
4. Srovnání novosti postupů	21
5. Popis uplatnění metodiky	22
6. Ekonomické aspekty	22
7. Seznam použité literatury	23
8. Seznam souvisejících publikovaných článků	25
9. Obrazová část	26

1. UVEDENÍ DO PROBLEMATIKY

Původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (SPIECKERMANN & KOTTHOFF 1914) DAVIS et al. 1984 (*Cms*), je uveden na seznamu škodlivých karanténních organismů, proto je nezbytné dodržovat zvláštní opatření k zabezpečení ochrany proti jeho zavlékání a rozšiřování (zákon č. 245/2011 Sb. a vyhláška 382/2011 Sb.). Tato opatření jsou v České republice uplatňována od roku 1995. Po počátečním radikálním snížení počtu pozitivních výskytů došlo v posledních letech (2012–2015) opět postupně k jejich nárůstu. Od zavedení opatření dochází k systematické kontrole partií sadbových, ale i konzumních odrůd bramboru. Žádný z pozitivních nálezů *Cms* nebyl doposud zjištěn v souvislosti s významnými výnosovými nebo posklizňovými ztrátami na hlízách bramboru. Okamžité ekonomické ztráty u podniků vznikají v důsledku dopadu mimořádných rostlinolékařských opatření (MRO), která jsou automaticky zavedena po pozitivním nálezu. Největší, dlouhodobé ekonomické ztráty vznikají z obav pěstitelů nakupovat sadbu z podniku s MRO minulostí. Všechny pozitivní výskyty *Cms* byly odhaleny až laboratorní detekcí, nejčastěji imunofluorescenční metodou, potvrzenou některou z molekulárně genetických metod a biologickým testem na lilku vejcoplodém (*Solanum melongena* L.). Patogen je v rostlinách a hlízách bramboru v malé koncentraci, nevyvolává žádné nebo jen drobné, obtížně rozpoznatelné, vnější příznaky bez dalších následků. Je tak pro šlechtitele, množitele i pěstitele brambor neviditelný. K nedávnému nárůstu počtu odhalených pozitivních nálezů *Cms* došlo i přesto, že doporučené postupy a opatření bránící horizontálnímu šíření patogenu – dodržování osevních postupů, důsledné odstraňování plevelných hlíz, důsledné čištění a dezinfekce strojů, třídících linek, pracovních nástrojů, skladovacích a přepravních prostor a jejich vybavení, skleníků, apod. – se stala rutinní záležitostí u většiny podniků zabývajících se především šlechtěním a množením brambor. Počet pozitivních výskytů *Cms* dosáhl maxima v teplotně nadprůměrné vegetační sezóně roku 2015. Po důsledné kontrole a postupném vyloučení všech možných cest horizontálního šíření původce bakteriální kroužkovitosti musela být pozornost zaměřena na dosud opomíjenou možnost přenosu patogenu z matečných na dceřiné hlízy, tedy na vertikální šíření. Byly postupně nalezeny možné cesty vstupu infikovaného materiálu do procesu šlechtění a množení sadbových hlíz. Na základě zjištěných skutečností byl navržen postup jak co nejvíce minimalizovat možnosti těchto vstupů a tím i možnosti vertikálního šíření bakteriální kroužkovitosti bramboru.

Z uveřejněných článků, dokumentů a fotografií je patrné, že příznaky bakteriální kroužkovitosti bramboru jsou ve většině případů zaměňovány s projevy různých biotických a abiotických poruch, případně s příznaky jiných bakteriálních nebo dokonce i virových nebo houbových chorob bramboru. Existuje řada mýtů o způsobu šíření a přežívání *Cms*, bohužel i mezi odbornými pracovníky. Proto jsme se, na základě dlouholeté práce s patogenem *Cms*, dlouhodobého pozorování a vyhodnocování polních porostů a sklizně brambor, hodnocení skleníkových porostů a pokusů a znalosti laboratorních determinačních metod, rozhodli vypracovat komplexní metodiku zabývající se příznaky, šířením a kontrolou bakteriální kroužkovitosti bramboru.

2. CÍL METODIKY

Metodika komplexně popisuje příznaky bakteriální kroužkovitosti bramboru, způsob přenosu a jejího šíření, charakterizuje původce choroby, bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a popisuje determinaci a detekci patogenu a možnosti jeho regulace. Vše s konečným cílem redukce pozitivních nálezů původce bakteriální kroužkovitosti při fyto-sanitárních kontrolách v ČR i v zahraničí.

Tyto souhrnné informace a postupy jsou určeny pro odbornou veřejnost – šlechtitele, množitele a pěstitele brambor a měly by přispět:

1. k objasnění možností šíření patogenu v oblastech mírného klimatického pásma střední Evropy, na základě znalosti jeho infekčního cyklu a hostitelského spektra;
2. k stanovení podmínek horizontálního a vertikálního způsobu šíření patogenu;
3. k rozšíření možností včasného zachytu patogenu v šlechtitelském a množitelském materiálu;
4. k rychlejšímu zavedení postupů prověřování vstupních šlechtitelských a množitelských materiálů do praxe;
5. obnovení důvěry v české odrůdy.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Cms je vysoce infekční patogen a může způsobit v některých částech světa významné výnosové ztráty (RICH, 1983; ROWE et al., 1995). Již při 5% infikovaných hlíz může dojít během skladování ke ztrátě celé sklizně (EVANS et al., 1998). Choroba způsobuje významné ekonomické ztráty i pěstitelům sadbo-

vých brambor. Nulová tolerance patogenu byla zavedena v USA, Kanadě a EU (*Bulletin OEPP/EPPO* Bulletin 41, 2011) a znamená, že nález jediné infikované rostliny nebo hlízy může vést k likvidaci celé partie sadbových hlíz (Drenman et al., 1993; Lee et al., 2001).

Bakterie infikuje hlízy přes mechanická poranění, ke kterým docházelo dříve zejména při krájení sadbových hlíz. Dnes dochází k poškození zejména při nešetrném nakládání se sadbovými hlízami před a během sázení a při sklizni a třídění. Od jedné infikované hlízy je možné infikovat dalších 20–100 (ROWE et al., 1995). Bakterie může přežívat ve vitálním stavu řadu týdnů, měsíců až let ve vysušených zbytcích hlíz bramboru na nářadí, pytlech, přepravkách (EVANS et al., 1998). Bakterie primárně přezimuje v infikovaných hlízách ve skladu nebo na poli v takzvaných plevelných hlízách (RICH, 1983). Nemůže přežít volně v půdě bez rostlinných zbytků rostlin nebo hlíz (ROWE et al., 1995). Existuje teorie, že infekci *Cms* z rostliny na rostlinu může přenášet i hmyz *Epitrix cucumeris*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Myzus persicae* (CHRISTIE et al., 1991; DE BOER et al., 1988).

3.1. Hostitelský okruh rozšíření bakteriální kroužkovitosti bramboru

Kromě brambor (*Solanum tuberosum* L.) může patogen přirozeně přežívat a být detekován v kořenech cukrové řepy (*Beta vulgaris* L.), (BUGBEE and GUDMESTAD, 1988). Na rostlinách a bulvách nejsou patrné žádné příznaky infekce, nezpůsobuje žádné ztráty na sklizni. Pouze po umělé infekci se podařilo vyvolat příznaky napadení *Cms* na dalších rostlinných druzích čeledi *Solanaceae*, na kulturních rostlinách lilku a rajčete a plevelných druzích *Solanum citrullifolium* a *S. commersonii* (SLACK, 1987). Ostatní plevelné druhy zůstávají i po umělé inokulaci *Cms* bez příznaků, přestože je patogen detekovatelný. Patogen nijak neovlivňuje okolní prostředí, svou přítomností a pouhým přežíváním v planých rostlinách nevyvolává žádné změny ve složení a kompetici jejich epifytní mikrobioty. Při analýze plevelných rostlin z pole, kde byly pěstovány kontaminované brambory, byla infekce *Cms* detekována pouze v druhu *S. saccharoides* a v dalších běžných rodech jako *Chenopodium* a *Amaranthus* (ZIZZ and HARRISON, 1991). Na základě dosavadních poznatků jsou rostliny a hlízy bramboru jediné prostředí, kde se původce bakteriální kroužkovitosti dokáže přirozeně množit.

Bakterie je rozšířena ve velké části Evropy, v Asii, Severní Africe, Kanadě, USA, Mexiku a Venezuele, celkem v 31 zemích.

3.2. Příznaky choroby

Příznaky bakteriální kroužkovitosti bramboru významně závisí na genotypu bramboru, na vnějších podmínkách a výskytu další potenciálních patogenů a infekčním potenciálu patogenu *Cms*.

Dle vlastní studie na rostlinkách bramboru namnožených z *in vitro* kultur byl projev umělé infekce *Cms* na jednotlivých genotypech výrazně odlišný. Na některých genotypech byly výrazné příznaky zavádání listů patrné už po 3 týdnech, u jiných byly slabé příznaky patrné po 6 a více týdnech, některé kultivary nevykazovaly žádné příznaky a po cca 7 týdnech došlo ke kolapsu významné části pokusných rostlin (dosud nepublikováno).

Obecně teplejší průběh vegetační sezóny napomáhá množení patogenu a tím možnému projevu příznaků.

Příznaky mohou být zaměněny s příznaky:

1. houbových chorob – terčovitou a hnědou skvrnitostí bramboru (*Alternaria solani*, *A. alternata*), plísní bramboru (late blight, *Phytophthora infestans*), verticiliovým vadnutím (*V. albo-atrum*, *V. dahliae*), černou tečkovitostí bramboru (*Colletotrichum coccodes*), případně fusariovým vadnutím;
2. bakteriálních chorob – hnědou hnilobou bramboru (brown rot, *Ralstonia solanacearum*) a bakteriálním černáním stonku a měkkou hnilobou hlíz (*Pectobacterium* spp., *Dickeya chrysanthemi*);
3. virových chorob - virus svinutky bramboru (Potato leaf roll virus, PLRV), (BABADOOST, 1990).

Projev příznaků může záviset i na virulenci daného lokálního kmenu. Bakterie může být přítomna v rostlině i v dostatečné koncentraci, ale v latentní fázi a k projevu příznaků nedojde (LELLIOTT and STEAD, 1997).

3.2.1 Příznaky choroby na nadzemních částech rostliny bramboru

Projevy choroby v polních podmínkách ČR nelze vizuálně odhalit. Příznaky bakteriálního vadnutí na nadzemních částech rostliny jsou obecně v polních podmínkách střední Evropy velmi vzácné, jsou zaměňovány s příznaky abiotických poruch. Rostliny infikované *Cms* se neliší vzrůstem, zabarvením rostliny, dobou kvetení, ani rychlostí senescence v porovnání se zdravou rostlinou. Pokud už se příznaky projeví, tak obvykle až u téměř plně narostlé rostliny, v období kvetení nebo později (DAVIS et al., 1997). Řada publikovaných fotografií bohužel zaměňuje příznaky bakteriální kroužkovitosti na listech rostliny s příznaky abiotického svinování a vadnutí listů například ke konci vegetační sezóny nebo s proje-

vy virových chorob nebo houbových chorob bramboru. Grampozitivní patogen kolonizuje cévní svazky rostlin a jen pomalu se množí. Teplotní optimum pro tuto bakterii je 20–22 °C. V porovnání s jinými zejména gramnegativními bakteriálními patogeny bramboru, např. karanténní bakterii *Ralstonia solanacearum* nebo pektinolytickými bakteriemi z rodu *Dickeya*, *Pectobacterium* nebo *Pseudomonas* se *Cms* množí za optimálních teplotních podmínek 3× až 4× pomaleji. S teplotou klesající pod 15 °C se rychlost množení výrazně zpomaluje. Při teplotách kolem 0 °C se prakticky nemnoží, pouze přežívá. Prvotní příznaky choroby se projevují při silnější infekci na okrajích spíš spodních listů u slabší infekce na horních částech stonků často jen na jedné straně rostliny. Listy se křabátí, rolují od okrajů a jsou jen lehce světlejší než zdravé listy. Vlivem nerovnoměrného zásobování živinami a vodou postupně se ucpávajícími cévami může docházet k pozvolné deformaci listů. Infikované rostliny mohou během horkého dne částečně zavadat, přes noc se rostliny pozvolna vzpamatují. Během této fáze nedochází k výrazným barevným změnám listů. Ty následují až po zneprůchodnění cévních svazků, pak dochází ke žloutnutí tkáně listů mezi žilkami. Při silné infekci v dalším stádiu napadené listy odumírají (GUDMESTAD and SECOR, 1993). Bylo pozorováno uvadání, žloutnutí a odumírání jednoho až dvou celých stonků v trsu (DEFRA, 2002) a hnědnutí silně infikovaných stonků u báze, z kterých po zmáčknutí vytékal bakteriální exudát (BABADOOST, 1990; LELLIOTT and STEAD, 1987). Pokud ponoříme silně infikovaný stoněk na několik minut do vody, začne se z něj uvolňovat mléčně zbarvený sliz. Ve většině případů se však neobjeví žádné příznaky na nadzemních částech rostliny.

Ve snaze vyvolat charakteristické příznaky choroby na rostlinách bramboru byly provedeny kombinované umělé infekce matečných hlíz a rostlin různých genotypů bramboru řadou koncentrací od 10² do 10⁸ buněk/ml virulentního kmenu *Cms*. Klíčky pěti matečných hlíz jednotlivých odrůd byly narušeny a namočeny do suspenze *Cms* o dané koncentraci. Po zaschnutí byly zasazeny. Vzešlé rostliny bramboru byly inokulovány cca za 3 týdny injikací suspenze *Cms* do stonku, cca 5 cm nad bází. Koncentrace inokula byla stejná jako při namáčení naklíčené matečné hlízy, z které rostlina vyrostla. Kontrolní matečné hlízy a z nich vyrostlé rostliny bramboru byly inokulovány vodou. Při ideálních teplotních a vlhkostních podmínkách pro rozvoj choroby v karanténním skleníku se podařilo u náchylnějších odrůd bramboru vyvolat typické příznaky – zasychání a svinování okrajů listů, deformace a postupné vadnutí částí nebo celých listů až po více jak 3 týdnech po inokulaci virulentním kmenem *Cms* o koncentraci

10⁴ buněk/ml a vyšší (viz fotografie na titulní straně). Ani při umělé infekci vysokou koncentrací patogenu (10⁸ buněk/ml) se nepodařilo během vegetace u žádného genotypu bramboru vyvolat totální kolaps rostlin. Zpravidla odumřelo několik listů nebo částí listů v blízkosti místa inokulace rostliny, na ostatních listech docházelo postupně v průběhu celého vegetačního cyklu k zavádání a svinování listů. I v případě citlivých indikátorových rostlin lilku vejcoplodého (*Solanum melongena* L.) využívaných v biologických testech pro detekci patogenu se daří spolehlivě vyvolat příznaky choroby až po více jak 4 týdnech po inokulaci virulentním kmenem o koncentraci 10³ buněk/ml a vyšší. A to pouze za předpokladu, že tyto rostliny infikujeme virulentním kmenem a v jejich raném stádiu růstu, ideálně ve stádiu 2 pravých listů. Čím později rostliny infikujeme, tím obtížnější je vyvolat příznaky choroby. Ze starších rostlin lilku může být patogen izolován, aniž by vyvolal jakékoliv vnější příznaky choroby. Rostliny lilku i bramboru byly během pokusů s umělými infekcemi zasazeny v růstových nádobách v běžném půdním substrátu a nebyly přihnojovány. V polních podmínkách jsou rostliny bramboru intenzivně vyživovány, případně zavlažovány. Rostliny, tedy i cévní svazky jsou mohutnější než u rostlin v nádobách a šance pomalu se množícího patogenu přerušit přívod živin a vody do nadzemních částí vitálních rostlin, a tím vyvolat jejich kolaps, je v našich klimatických podmínkách nulová.

3.2.2 Příznaky choroby na hlízách bramboru

Z infikované matečné hlízy se přes rostlinu vytváří infikované dceřiné hlízy. Obvykle nedochází k významné redukci počtu a velikosti vytvořených dceřiných hlíz v porovnání se zdravou rostlinou. Ani vizuální kontrola cévních svazků hlíz podélně rozkrojených v pupkové části nemusí odhalit infekci *Cms*. Patogen postupně kolonizuje cévní svazky hlíz bramboru a za průměrných teplot v ČR (teplota vzduchu byla 18,3 °C v období od dubna do září roku 2015) se jen pomalu množí. První příznaky se v dceřiných hlízách vytváří až ke konci vegetační sezóny a projevují se jako nepatrné zesklotatění cévních svazků. K další progresi příznaků dochází po desikaci a zejména během skladování. V našich zeměpisných šířkách je hlavním příznakem silnější infekce na hlízách ztmavnutí cévních svazků, dle odrůdy jsou tmavě žluté až hnědé (viz. fotografie na titulní straně). Infikované cévní svazky jsou o několik odstínů tmavší v porovnání s cévními svazky zdravých hlíz dané odrůdy. Ztmavnutí cévních svazků může být způsobeno i původci dalších chorob, například při napadení stolonů bakteriemi *Pectobacterium* spp., *Dickeya chrysanthemi*, původci bakteriálního černání

stonku a měkké hniloby a hlíz nebo bakterie *Ralstonia solanacearum*, původce hnědé hniloby vyvolává hnědnutí cévních svazků hlíz v raných stádiích infekce. Tmavnutí cévních svazků může být i vyvoláno řadou abiotických faktorů nebo poškozením desikanty. Následnými příznaky bakteriální kroužkovitosti u silně infikovaných hlíz bramboru je vodnatá a poloprůhledná dužnina v okolí cévních svazků. Jak infekce *Cms* postupuje, mohou se cévní svazky a okolní dužnina rozkládat a při zmáčknutí z hlízy vytéká krémově zbarvená kašovitá hmota bez zápachu (viz. fotografie na titulní straně) a rozložená dužnina tvoří kruh kolem cévních svazků (ring rot). Z pletiva v těsné blízkosti rozložených cévních svazků lze provést úspěšnou izolaci patogenu. Dle literatury se silné napadení hlíz projevuje na povrchu propadem dužniny, tvorbou prasklin a zrzavě hnědým zbarvením kolem oček (RICH, 1983; ROWE et al., 1995). Tyto hlízy jsou sekundárně napadány dalšími bakteriemi a houbami. Nález takto silně napadených hlíz je v našich zeměpisných šířkách vzácný. Zkušený hodnotitel je schopný takto intenzivně napadené hlízy odhalit na základě vizuálního porovnání s cévními svazky zdravých hlíz. Většina slabě až středně infikovaných cévních svazků hlíz v době sklizně zůstává bez příznaků diskolorace. A to i přesto, že koncentrace patogenu při přechodu z matečné hlízy na rostlinu a následně při přechodu z rostliny do dceřiných hlíz pomalu roste. U bezpříznakových hlíz je koncentrace patogenu v cévních svazcích hlíz nedostatečná na jejich devastaci, která by následně mohla vést k jejich napadení a rozkladu sekundárními patogeny na poli nebo během skladování. Nižší obsah patogenu umožní jeho přežití v hlízách a vertikální přenos do další generace.

Ani ponechání infikované hlízy v půdě nepředstavuje významné riziko. Cévní patogen *Cms* je úzce specializovaný na brambory, potenciálně může přežít v některých druzích plevelů z čeledi *Solanaceae*, ve volné půdě ale nepřežívá. Pokud infikované hlízy přežijí zimu, je snaha, pokud je to možné, je stejně jako plevele likvidovat herbicidy. Namátkové testování plevelných hlíz a některých druhů plevelů prováděné v letech 2004–2008 neprokázalo přítomnost *Cms*. Vzhledem k malému počtu pozitivních nálezů původce bakteriální kroužkovitosti bramboru v těchto letech nebyly tyto kontroly prováděny v návaznosti na jeho potvrzený výskyt. Při odhalování původců ztrát při skladování hlíz často dochází k záměně *Cms* s pektinolytickými bakteriemi. Některé druhy těchto bakterií, které jsou běžně přítomné na povrchu hlíz, pronikají drobnými poraněními do dužniny a zde se intenzivně množí i při nízkých skladovacích teplotách. Zejména bakterie z rodu *Pectobacterium* a *Pseudomonas* dužninu rozloží

během několika dní a hlízy „tečou“. Oproti tomu *Cms* je lokalizován v cévních svazcích, při nízkých teplotách se téměř nemnoží a rozklad hlíz sám o sobě nevyvolává. Pouze u hlíz oslabených silnou infekcí *Cms* se bortí cévní svazky a hlízy jsou sekundárně napadány bakteriálními nebo houbovými patogeny, které je následně mohou zcela rozložit.

3.3. Infekční cyklus a přenos infekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Celý infekční cyklus patogenu je striktně vázán na rostliny a hlízy bramboru. Patogen přechází z infikované matečné hlízy do vytvořené rostliny a následně do dceřiných hlíz. Po celý cyklus se dle vnějších podmínek pomaleji nebo rychleji množí. Patogen může případně přežít, nikoliv se množit, v některých planých druzích čeledi *Solanaceae*. Patogen nepřežívá dlouhodobě volně v půdě, na jiných druzích rostlin, ve vodě ani ve vzduchu. Nejdelší uvedená doba přežití při pokusech byla 35 dní ve sterilní kohoutkové vodě při teplotě 20 °C. V nesterilních povrchových vodách při teplotě 10 °C se doba jeho přežití zkracuje na 7 dní (VAN DER WOLF and BECKHOVEN, 2004). Kontaminace porostů bramboru ze závlahy není možná. Patogen se v povrchových vodách vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích a není schopný se množit v pobřežní vegetaci. Jeho přežití v půdě, vodě, na pozemcích a v prostorách farmářských podniků je vždy vázáno na zbytky rostlinných pletiv a rostlinných štáv. Šíření z rostliny na rostlinu hmyzími vektory není významné.

Infikované sadbové hlízy s příznaky i bez příznaků a rostliny v tkáňových kulturách jsou hlavním potenciálním zdrojem infekce (SLACK, 1987). K rozšiřování infekce pak dochází zejména dceřinými hlízami, tj. vertikální cestou nebo kontaminovanými farmářskými nástroji a stroji (MANSFELD-GEISE, 1997), tj. horizontální cestou.

3.3.1 Vertikální přenos infekce

Vertikální přenos infekce z matečných hlíz na rostliny bramboru a následně na dceřiné hlízy může probíhat několik let zcela skrytě. Navyšování koncentrace patogenu při přechodu z jedné generace na následnou je za stávajících teplotních podmínek střední Evropy velmi pozvolné. Patogen je obvykle zjištěn až po několika přesadbách, když dosáhne koncentrace zachytitelné některou z imunochemických nebo molekulárně genetických metod a vyvolá příznaky cévního vadnutí na rostlinách lilku a je z nich reisolován. Rychlost nárůstu

koncentrace patogenu v cévních svazcích rostlin a hlíz je ovlivněna v průběhu vegetační sezóny pouze teplotami. Teplejší počasí vede k jeho rychlejšímu pomnožení. Například vysoké teploty v létě roku 2015 vedly k zachycení zvýšeného počtu dosud latentně probíhajících infekcí. V následujícím teplotně průměrné vegetační sezóně nebyl hlášen žádný *Cms* pozitivní vzorek. Na základě znalostí chování patogenu a vyhodnocení praktických postupů při šlechtění a množení brambor byla navržena opatření, jak řetěz vertikálního přenosu přerušit a do budoucna ho zcela vyloučit.

3.3.2 Horizontální přenos infekce

Pozornost výzkumu i legislativy se doposud více soustřeďuje na minimalizaci horizontálního šíření *Cms* – technologická opatření, sanitace apod. (Anonymous, 1987). I mimořádná rostlinolékařská opatření (MRO) zaváděná v zemědělském podniku, kde byl prokázán výskyt *Cms*, slouží prioritně k zamezení dalšího horizontálního šíření patogenu. Zahrnují zákaz sázení zamořené partie brambor, její likvidaci způsobem, který nepřestavuje riziko dalšího šíření choroby, očištění a dezinfekci zařízení, strojů, dopravních prostředků, skleníků, skladů, obalů apod., vymezuje území, kde nesmí být po stanovenou dobu pěstovány žádné brambory, vše za zvýšeného dohledu a opakovaných kontrolách pracovníků ÚKZÚZ. MRO neřeší vertikální přenos. Likvidace jedné partie, kde právě koncentrace patogenu přesáhla detekovatelný limit, neřeší latentní šíření z matečné hlízy na dceřinou.

Hlavním zdrojem horizontálního šíření jsou infikované rostlinné zbytky bramboru. Patogen může přežít na suchých rostlinných zbytcích na farmářských nástrojích a materiálech používaných při sklizni a uskladňování brambor. Při současné vysoké mechanizaci zemědělské výroby je možnost šíření infekce obrovská. Základním pravidlem při produkci zejména sadbových brambor je používat co nejšetrnější způsob nakládání s hlízami. To je takový, který nezpůsobí mechanické poškození hlíz v žádné fázi – sázení, pěstování a skladování brambor. Bakterie také může přežít a zůstat infekční po několik let na pytlech, přepravech, zdech skladu a jiných plochách, kde zůstaly zaschlé zbytky hlíz nebo šťávy z hlíz. Ačkoliv tyto rostlinné zbytky nejsou významným zdrojem šíření infekce, mohou zkomplikovat eradikaci patogenu. Bakterie může přezimovat v půdě, ale pouze na rostlinných zbytcích bramboru nebo v plevelných hlízách. Likvidace plevelných hlíz je velmi obtížná. Pouze málo v současnosti povolených herbicidních přípravků je účinných. Plevelné hlízy mohou přežít na daném

stanovišti několik let. Patogen může přežít ve vodě více jak měsíc. Není ale znám žádný plevelný hostitel, který by umožňoval jeho množení. Existují důkazy, že k přenosu může dojít přes vodu, v které byly umyty kontaminované hlízy. Při čištění a mytí hlíz dochází často k tvorbě nepatrných mechanických poranění, kterými může patogen proniknout do hlízy. Nicméně tento způsob přenosu je nevýznamný. Přenos přes vodu nebo kontaminované části mycí a balicí linky hrozí především u konzumních nikoliv sadbových hlíz. Zdrojem patogenu mohou být odpadní vody ze závodů zpracovávajících hlízy. *Cms* může určitou dobu přežívat na rostlinných zbytcích nebo v koloidním roztoku škrobu. Teplota odpadních vod obvykle nedovoluje množení patogenu, pouze jeho přežívání, nicméně tyto odpady by neměly být vyváženy na pozemky, kde se plánuje výsadba brambor nebo rajčete. Odpady lze vypouštět například na trvalé travní porosty. Klesající ceny technologií biologického čištění odpadních vod a rostoucí sankce za případnou kontaminaci půdy pravděpodobně brzo odstraní i toto riziko šíření patogenu. V současnosti jsou nejdostupnějšími dekontaminační technologie využívající dezinfekce UV zářením a pro větší podniky je dostupná i ozonizace odpadních vod. Po vyřešení dlouhodobé stability filtrů budou v dohledné době velmi perspektivní metody membránové filtrace a filtrace přes modifikované nanotextilie. Ve všech případech se pro zvýšení účinnosti musí zařadit mechanické předstupně filtrace.

3.4. Identifikace

Vzhledem k tomu, že se detekce původce bakteriální kroužkovitosti provádí převážně v bezpříznakových rostlinách a hlízách, je potvrzení přítomnosti *Cms* závislé na přesných detekčních metodách. Jejich výsledek musí být ve druhé fázi potvrzen biologickým testem patogenity a izolací patogenu z inokulovaných rostlin. Výsledky všech determinačních metod musí být hodnoceny v porovnání s výsledky pozitivní a negativní kontroly. Ve snaze zvýšit účinnost detekčních metod *Cms* jsou využity detailní znalosti o rychlosti množení, migraci a lokalizaci patogenu v hlízách a uvnitř vaskulárních pletiv celé rostliny v závislosti na růstové fázi rostlin a na vnějších podmínkách. Úspěšnost identifikace ovlivňuje zejména termín odběru vzorků rostlin a hlíz a optimalizace detekčních metod. Podrobný popis způsobu odběru vzorků rostlinných pletiv, jejich zpracování a detekce patogenu optimalizovanými metodami je popsána v metodice (PÁNKOVÁ a KREJZAR, 2015).

3.4.1 Odběr vzorků

Termín odběru vzorků, přesné místo odběru a velikost vzorku se u rostlin a hlíz liší.

3.4.1.1 Rostliny

Při determinaci *Cms* v polních nebo skleníkových podmínkách je ideální odebrat v době květu hlavní stonky a provést analýzu cca 1 g cévních svazků na bázi, ve středu a vrcholu rostliny. Rostlina, z které se vzorky odebírají, se označí. Podle provedených pokusů lze *Cms* prokázat v bazální zelené části rostliny nejdříve 6 týdnů po vyrašení. Infekce migruje cévními svazky rostliny. Infekce je přítomná ve všech stoncích trsu rostliny bramboru. Střední až silná infekce je v období kvetení prokazatelná v téměř 100 % analýz i ve střední části rostliny bramboru a více jak 50 % i ve vrcholu rostliny. Odběr ze tří částí rostliny zvyšuje pravděpodobnost záchytu infekce. Odběr vzorků rostlin v květu poskytuje výhodu včasného stanovení *Cms*, vychází z poznatků o migraci patogenu v cévních svazcích. Jeden vzorek rostliny je více reprezentativní než jeden vzorek hlíz. Je vhodnější než předsklizňový odběr nasazených hlíz. V případě pozitivního nálezu *Cms* v rostlině, lze celý trs bramboru zlikvidovat a zabránit tak dalšímu šíření patogenu. Pozitivní nález v rostlinách by měl vést ke zvýšené kontrole sklizně.

Při determinaci *Cms* v tkáňových kulturách *in vitro* se napěstuje nejméně 40 rostlin/klon odrůdy. Jeden vzorek obsahuje celé stonky bez listů 10 rostlin cca 10 cm vysokých (1 g). Jakýkoliv pozitivní nebo podezřelý nález *Cms* musí vést k likvidaci klonu a důsledné kontrole dalších klonů odrůdy.

3.4.1.2 Hlízy

Zavedený postup analýz dceřiných hlíz v předsklizňové zralosti je z hlediska znalostí o růstu a migraci *Cms* naprosto nevhodný. Řada skrytých latentních infekcí zůstane neodhalena. Latentní infekce se díky nevhodnému termínu přenáší do další generace. Při determinaci *Cms* v dceřiných hlízách před sklizní by se před analýzou měly hlízy alespoň 6–8 týdnů inkubovat při provokační teplotě 20–22°C. Zvýšená teplota podporuje rozvoj infekce v hlízách a zvyšuje pravděpodobnost namnožení patogenu nad detekční práh. Při pozdějším odběru postačuje kratší doba inkubace hlíz, cca 4 týdny. Vzorek obsahuje vyextrahované cévní svazky z pupkové části cca 10 hlíz (1 g cévních svazků). Pozitivní nález *Cms* by měl vést k likvidaci celé partie a dalším kontrolním odběrům dalších partií dané odrůdy.

3.4.2 Vizualní kontrola hlíz

Vzhledem k tomu, že v ČR jsou příznaky choroby na rostlinách a v hlízách vzácné, je vizualní kontrola jen orientační.

Při vizualní kontrole se hodnotí zabarvení cévních svazků na podélném řezu rozkrojené hlízy v pupkové části, tak aby byl viditelný průběh cévních svazků. Vizualní kontrolou lze odhalit pouze silnější infekci hlíz. Vizualní kontrola může být zkreslena přítomností původců dalších chorob, abiotickými faktory nebo desikanty.

U silně infikovaných hlíz po zmáčknutí vytéká z cévních svazků bílý až žlutě zabarvený hustý bakteriální exudát, z kterého lze bakterii přímo izolovat. Na základě několikaletého porovnání vizualního posouzení cévních svazků hlíz a výsledků jejich testování determinacím imunoabsorpčním sendvičovým testem (DAS ELISA), je zaškolený pracovník schopen odhalit s více jak 75% spolehlivostí středně až silně infikované hlízy. Tyto hlízy jsou pak jednoznačně pozitivně vyhodnocené detekčními metodami DAS ELISA a real-time PCR a v biologickém testu.

3.4.3 Přesné detekční metody

V současné době se pro včasné odhalení patogenu *Cms* v nízkých koncentracích využívá detekce citlivými imunochemickými a molekulárně genetickými metodami. Na citlivosti detekčních metod závisí odhalení latentních infekcí *Cms*.

Z imunochemických metod se pro detekci *Cms* využívá především nepřímá imunofluorescence (IFA) a sendvičový ELISA test (DAS ELISA). Detekční limit těchto metod se pohybuje kolem 10^4 buněk na 1 ml rostlinného extraktu. Otestované komerční protilátky pro ELISA byly spolehlivé. Dlouhodobě nebyla v ČR nalezena žádná bakterie z epifytu rostlin a hlíz bramboru, která by vyvolávala falešně pozitivní reakci. Zvýšenou hodnotu absorbance při hodnocení testů nevyvolává ani rostlinná šťáva z brambor vysoce škrobnatých průmyslových odrůd. Někteří autoři uvádí křížové reakce s extrakty jiných rostlinných druhů (SIVAPALAN, 2001), což je při způsobu odběru vzorků ČR nevýznamné. ELISA metoda nevyžaduje finančně náročné vstupní investice, poskytuje výsledek během 48 h a lze ji hodnotit vizualně podle barevné změny. Je proto vhodná pro firemní laboratoře pro systematickou kontrolu výchozích materiálů, mezistupňů šlechtění a jednotlivých stupňů množení bramboru apod.

Druhou skupinu detekčních metod tvoří molekulárně genetické metody založené na amplifikaci pro *Cms* specifického úseku genomové nebo plazmidové

DNA. Všechny varianty PCR, nested PCR, real-time PCR, FISH apod. poskytují výsledek analýzy vyextrahované DNA během 24h bez ohledu na to, zda jde o příznakové nebo bezpříznakové rostliny. Realistické detekční limity u PCR protokolů s vysokou hodnotou reprodukovatelnosti jsou 10^3 buněk na 1 ml. Pravděpodobnost falešně pozitivní reakce je minimální, lze ji zcela eliminovat použitím interní kontroly. Falešně negativní reakce může být vyvolána příliš nízkou koncentrací *Cms* nebo inhibicí amplifikace DNA reakcí s rostlinnými pletivy a kontaminací z prostředí. Inhibici lze částečně zabránit přidáním druhého setu primerů, které amplifikují 16S DNA úsek. Molekulárně genetické metody jsou doposud finančně náročné a vyžadují odborné vyškolení.

Obohacovací předstupu identifičních metod, které se snaží zvýšit koncentraci bakterie *Cms* k pozitivním detekčním limitům před vlastní analýzou se neosvědčily. Vzhledem k pomalému růstu *Cms*, dochází během jeho kultivace k přerůstání ostatními přítomnými mikroorganismy.

3.4.4 Biologický test a izolace patogenu

Provádí se injikací *Cms* pozitivního extraktu do lilku vejcoplodého (*Solanum melongena* L.) cv. Black Beauty v karanténním skleníku v minimálně 6 opakováních ve fázi dvou pravých listů při ideální teplotě kolem 24 °C, vyšší relativní vlhkosti – nad 75 % a denní periodě min. 10,5 h (BISHOP and SLACK, 1987). Vizuální hodnocení rostlin se provádí v týdenních intervalech, 4–8 týdnů v porovnání s pozitivní kontrolou, tj. bakteriální suspenze sbírkového kmene *Cms* NCPPB 3467 o koncentraci 10^6 buněk/ml, (viz fotografie na titulní straně) a negativní kontrolou (sterilní fyziologický roztok nebo extrakt ze zdravých rostlin nebo hlíz). Izolace a determinace patogenu se provádí z okolí místa vpichu po vytvoření příznaků cévního vadnutí u rostlin lilku v několika opakováních nebo z bezpříznakových rostlin lilku po 8 týdnech. Macerát lilku se roztírá na médium C nebo semiselektivní médium NCP-88 (DE LA CRUZ et al., 1992). Patogen po inkubaci při 22–25°C po dobu nejméně 5 dní vytváří drobné krémově bílé, později, po 10 a více dnech, až nažloutlé kolonie. Morfologii izolovaného *Cms* lze orientačně ověřit gramovým barvením. Přítomnost patogenu se potvrdí některou z výše uvedených determinačních metod.

3.5. Preventivní opatření proti šíření infekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Vzhledem k tomu, že neexistují žádné účinné chemické ani nechemické metody regulace patogenu, je nezbytné se zaměřit na prevenci horizontálního a vertikálního šíření. Přestože existují rozdíly v citlivosti odrůd vůči patogenu, v praxi se neuplatňují (Pánková, Krejzar, nepublikováno).

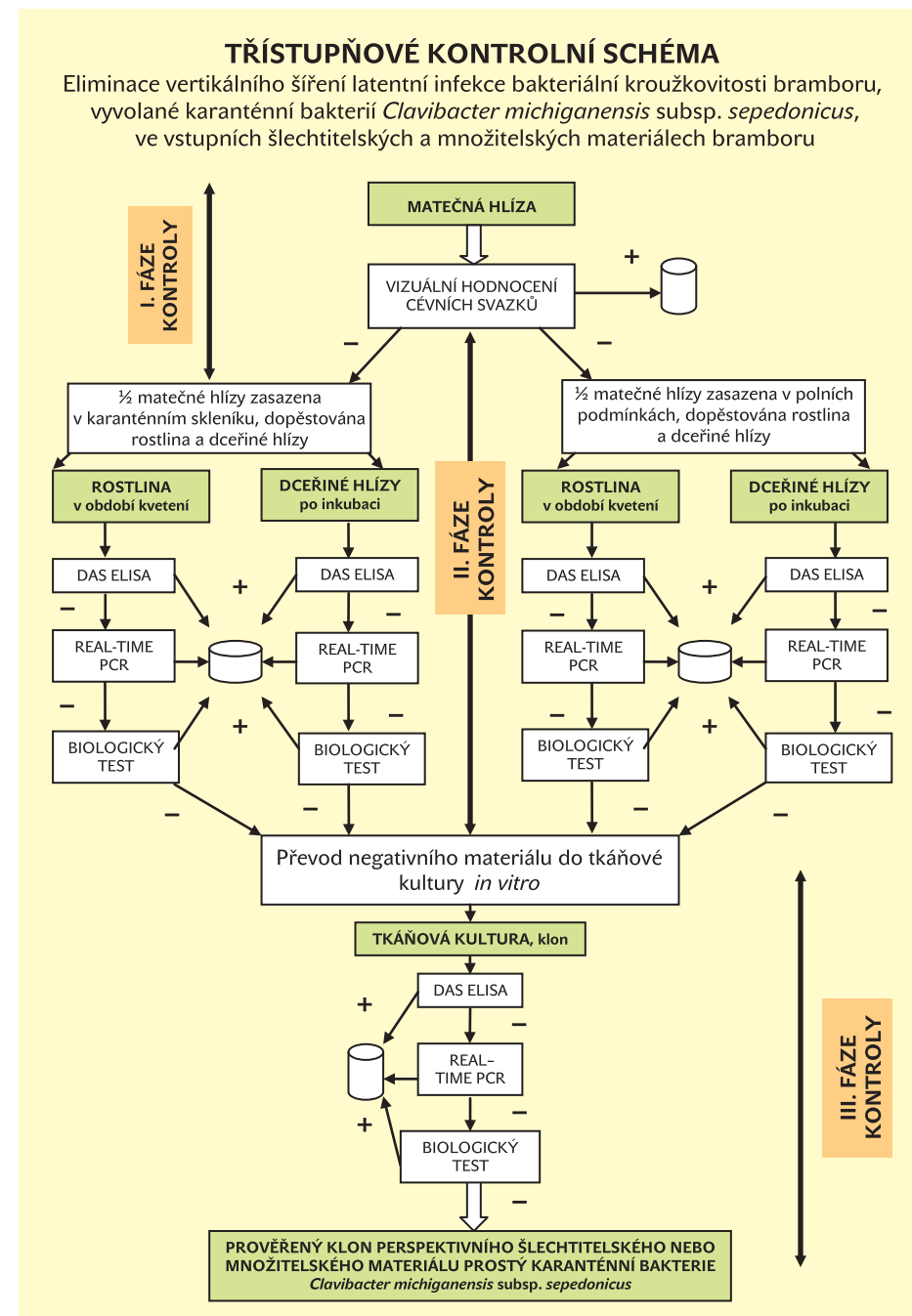
Opatření proti horizontálnímu šíření patogenu, tj. zejména dodržování osevnického postupu a dalších agrotechnických opatření a všech sanitárních opatření bránících horizontálnímu přenosu původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, jsou samozřejmým předpokladem pro přiblížení se k požadavku jeho nulového výskytu v sadbě brambor.

Nejvýznamnějším preventivním opatřením proti vertikálnímu šíření patogenu je systematické testování porostů sadby a sadbových hlíz. Bohužel při současné nulové toleranci *Cms* v sadbě je systematické opakované testování sice velmi nákladnou, ale jedinou cestou jak se tomuto požadavku přiblížit. Opakováním třístupňové kontroly u perspektivních šlechtitelských a množitelských materiálů po dobu několika let by se mělo docílit přerušení vertikálního přenosu patogenu z matečných hlíz na dceřině. Ztráta jedné vegetační sezóny nutné pro otestování výchozích materiálů je menší komplikací, než řešení důsledků vyplývajících z pozdějších pozitivních nálezů.

Význam vertikálního šíření původce bakteriální kroužkovitosti bramboru byl v posledních letech prokázán pozitivními výskytu v komerčních stupních sadby. S každým stupněm přesadby roste pravděpodobnost, že dojde k namnožení patogenu na hranici detekovatelnosti doporučených determinačních metod a biologického testu. Nemnožit sadbový materiál do nižších komerčních stupňů A nebo dokonce B, je vedle systematického testování vstupních materiálů nejvýznamnějším preventivním opatřením proti šíření patogenu.

3.5.1 Třístupňová kontrola vstupních šlechtitelských a množitelských materiálů bramboru

Navržený třístupňový proces zahrnuje důslednou několikanásobnou kontrolu veškerých výchozích šlechtitelských a zdrojových materiálů genotypů bramboru i novošlechtění. Každý materiál je během jedné vegetační sezóny intenzivně testován ve všech vegetačních fázích vývoje. V první fázi jsou vizuálně kontrolovány matečné hlízy. Ve druhé fázi jsou detekčními metodami v průběhu vegetace kontrolovány rostliny bramboru a dceřiné hlízy. Ve třetí fázi jsou detekčními metodami kontrolovány rostliny *in vitro* po převodu materiálů do tkáňových kultur. V jednotlivých stupních kontroly jsou veškeré podezřelé vzorky hlíz nebo rostlin okamžitě vyřazovány. Pouze materiál, který je zcela negativní v celém procesu kontroly od matečné hlízy až po tkáňovou kulturu, může být dále použit pro šlechtění nebo množení. Cílem celého procesu kontroly je vytvořit co nejvhodnější podmínky pro pomnožení patogenu a intenzivním systematickým mnohonásobným testováním materiálu determinačními metodami ve všech vegetačních stádiích maximálně zvýšit pravděpodobnost jeho záchytu. Pro podporu množení *Cms* jsou matečné a dceřiné hlízy před hodnocením 4–6 týdnů inkubovány při teplotě 22 °C. Pro zvýšení počtu testovaných vzorků je po vizuálním hodnocení jedna polovina každé matečné hlízy zasazena do růstové nádoby v ideálních podmínkách karanténního skleníku a druhá polovina je pěstována v polních podmínkách. Pravděpodobnost záchytu patogenu v nízkých koncentracích a snížení výskytu falešně pozitivních reakcí v důsledku křížových reakcí s nadbytečnými rostlinnými pletivy je zvýšena i rozdělením standardního vzorku na několik dílčích cca 1g vzorků rostlin a hlíz a precizní extrakcí cévních svazků zejména hlíz.



3.6. Management, regulace choroby

Trvalá eradikace patogenu je vzhledem k jeho vysokému infekčnímu potenciálu nemožná.

- **Korekce výskytu choroby** je velmi obtížná a nákladná – možná je jen na základě dodržování všech opatření proti vertikálnímu a horizontálnímu šíření patogenu. Trvalým systematickým testováním všech vstupních šlechtitelských materiálů, mezistupňů šlechtění, nových odrůd lze eliminovat možnost vertikálního šíření *Cms*. Zvláštní důraz musí být kladen na prověřování všech materiálů určených na převod do tkáňových kultur! Důslednými sanitárními opatřeními zahrnujícími očištění všech nástrojů, sázecích a sklízecích strojů, všech skladovacích a transportních prostor, bezpečným nakládáním s odpady a dodržováním správných agrotechnických postupů lze zabránit horizontálnímu šíření patogenu.
- **Dopad výskytu patogenu** ve střední Evropě se neprojevuje žádnými významnými sklizňovými nebo posklizňovými ztrátami. Ekonomické ztráty vznikají až v důsledku mimořádných opatření (MRO) uvalených na podnik, na jehož plochách byl patogen prokázán. Dlouhodobě přetrvávající pochybnosti o „čistotě“ sadby vypěstované v podniku, na který byla v minulosti uvalena MRO, mohou vést k velkým ekonomickým ztrátám a ukončení činnosti množení a pěstováním brambor.
- **Potenciál choroby** spočívá v možnosti bezpříznakového šíření po všech produkčních plochách bramboru – šíření choroby v Evropě dlouhodobě docházelo prostřednictvím „čisté“ sadby. Patogen může přežívat v infikovaných hlízách po několik generací bez jakýchkoliv příznaků a v nedetekovatelné koncentraci.
- **Zdrojem infekce** jsou jednak bezpříznakové hlízy použité pro převod genotypu do tkáňových kultur (SCHUD et al., 1992). Prostřednictvím infikovaných výchozích *in vitro* kultur lze postupným množением sadby rozšířit patogen bez projevu jakýchkoliv příznaků na obrovské plochy! Významným zdrojem patogenu jsou suché zbytky infikovaných rostlin, hlíz a šťávy na nástrojích a sklízecích strojích, kde patogen přežívá až 5 let (GUDMESTAD and SECOR, 1993; NELSON 1984) a může být jejich prostřednictvím rozšířen na další produkční plochy a další stroje.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Komplexní metodika reaguje na situaci posledních cca 5 let. Potřebnost a aktuálnost **řešené problematiky** je dána opětovným nárůstem pozitivních nálezů původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, karanténní bakterie *Cms* v komerčních stupních množení odrůdového sadbového materiálu. Tyto pozitivy byly hlášeny navzdory 20 let trvající snaze o eradikaci patogenu, navzdory vysokým nákladům vynaloženým na testování sadbových a konzumních hlíz bramboru na přítomnost patogenu. Při pozitivních nálezech patogenu v sadbě se MRO zaměřují především na přerušení možnosti horizontálního šíření patogenu. Praxe posledních let prokázala nedostatečnost těchto opatření. Vzniklá situace vyvolala paniku mezi množiteli sadby i pěstiteli konzumních brambor, kteří se bojí nakupovat sadbu od tuzemských množitelů, přestože některé české odrůdy patří v Evropě mezi nejlepší. Hrozí, že některé zemědělské podniky omezí množení a pěstování této plodiny, ohroženo je i šlechtění nových odrůd přes naprosto ideální geografické a klimatické podmínky ČR pro tuto komoditu v rámci Evropy.

Metodika je určena především široké odborné veřejnosti, šlechtitelům, pracovníkům podniků, které produkují sadbový materiál i konzumní brambory. Může sloužit i jako informační materiál pro orgány státní správy – Ministerstvo zemědělství ČR a Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Metodika by měla přispět k reálnému komplexnímu náhledu na chorobu a reálné účinné možnosti ochrany proti jejímu šíření horizontálně i vertikálně. Praxe celosvětově prokázala, že žádný jednoduchý, rychlý a bohužel ani levný návod na eradikaci patogenu neexistuje. Metodika dále nově zahrnuje efektivní, systematický standardizovaný postup testování všech materiálů bramboru, které umožní vyloučení infikovaných klonů a partií sadbových hlíz z dalšího procesu účelového šlechtění a množení. Postupně by se tak měla eliminovat i možnost vertikálního šíření latentně přítomné infekce a mělo by dojít k ozdravení stávajících množitelských materiálů bramboru. Komplexní přístup k chorobě by měl přispět k obnovení jistoty podnikání u českých množitelů a šlechtitelů a důvěry českých pěstitelů bramboru. Nově doporučovaný postup týkající přerušení řetězce vertikálního šíření patogenu v šlechtitelských a množitelských materiálech bramboru je v procesu schvalování právní ochrany.

5. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Tato metodika poskytuje komplexní pohled na problematiku bakteriální kroužkovitosti bramboru, zabývá se příznaky, šířením a kontrolou choroby. Shrnuje současné vědecké poznatky a dlouhodobé praktické zkušenosti pracovníků Rostlinolékařské bakteriologie v oblasti epidemiologie choroby a chování patogenu v klimatických a pěstitelských podmínkách střední Evropy. Shrnuje všechna funkční preventivní opatření bránící vertikálnímu i horizontálnímu šíření patogenu s důrazem na ochranu cenných šlechtitelských materiálů a sadbových materiálů jednotlivých genotypů bramboru v procesu množení. Trendem v zahraničí je průběžná kontrola porostů a hlíz bramboru na přítomnost *Cms* nad rámec národní fytoosanitární kontroly ve vlastních firemních nebo komerčních laboratořích, s cílem předejít sankcím následujícím pozitivní nález *Cms*. V českých podnicích se tyto preventivní kontroly provádí zatím jen ojediněle. Metodika je určena všem pěstitelům bramboru.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Bakteriální kroužkovitost bramboru v našich zeměpisných šířkách doposud nepůsobuje žádné ztráty v průběhu vegetace, na výnosu sklizně, ani během skladování. Patogen nepoškozuje lidské zdraví. Primární ekonomické ztráty farmářů jsou v České republice způsobeny nulovou tolerancí patogenu v sadbovém materiálu a z toho vyplývajícími mimořádnými rostlinolékařskými opatřeními (MRO) uvalenými na podniky s pozitivním výskytem. Nákladná sanitační opatření zahrnují nejen dezinfekční prostředky, ochranné pomůcky apod. (cca 250 tis. Kč/rok a odrůdu), ale i osobní náklady spojené s jejich realizací. V dohledné době nelze očekávat, že bude tento pouze legislativně podložený požadavek nulové tolerance v sadbových a konzumních hlízách zrušen nebo zmírněn. Sekundární, dlouhodobé ekonomické ztráty vznikají v důsledku ztráty důvěry podniku u pěstitelů. Tyto ztráty jsou obtížně vyčíslitelné. Farmáři se obávají nakupovat sadbu z podniku s MRO minulostí a se setrvačností pak odebírají sadbu z konkurenčních, téměř v 100 %, zahraničních firem. Pěstitelé a šlechtitelé pak obtížně hledají nové zákazníky. Zisk podniku při množení perspektivní odrůdy se odhaduje na cca 2400 tis. Kč/rok, tj. 12000 tis. Kč za 5 let.

K některým odhalením dochází po celé Evropě i u takzvané „čisté“ certifikované sadby. Například při souhrě nevhodných podmínek při balení, vyskladňování a transportu sadbových hlíz dojde k namnožení patogenu, který byl do té doby přítomný v nezachytitelné, podprahové koncentraci současných analytických

a biologických metod. Firmy v zahraničí si toto riziko uvědomují a certifikované sadbové hlízy si raději sami opakovaně před vývozem a před výsadbou testují. Bohužel bakteriální kroužkovitost bramboru je zneužívána v konkurenčním boji mezi podniky obchodujícími se sadbovými materiály bramboru. I nepodložené zprávy o podezření na výskyt *Cms* v sadbovém materiálu mohou vést k poklesu prodeje a ekonomickým ztrátám firmy. Eliminace *Cms* přispěje k ekonomické stabilizaci a umožní rozvoj zemědělských podniků zabývajících se šlechtěním a množением konzumních a průmyslových genotypů bramboru v ideálních geografických a klimatických podmínkách ČR.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ANONYMOUS 1987: Scheme for detection and diagnosis of the ring rot bacterium *Corynebacterium sepedonicum* in batches of potato tubers. Rep. Eur. 11288. Office Off. Publ. Eur. Communities, Luxembourg.
- BABADOOST, M. 1990. Bacterial Ring Rot of Potato. University of Illinois, Department of Crop Sciences, Extension. http://web.aces.uiuc.edu/vista/pdf_pubs/937.pdf
- BISHOP, A. and SLACK, S. 1987 Effect of inoculum dose and preparation, strain variation, and plant growth conditions on the eggplant assay for bacterial ring rot. *Am Potato J.* 1987; 64:227–234. doi: 10.1007/BF02853560.
- BUGBEE, W.M. and GUDMESTAD, N.C. 1988. The recovery of *Corynebacterium sepedonicum* from sugar beet seed. *Phytopathology* 78: 205–208. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 41, 2011, p: 385–388.
- DAVIS, R.M., NUNEZ, J. and SMART, C. 1997. UC IPM pest management guidelines:potato. The University of California, USA. <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r607100211.html>
- DE BOER, S., WIECZOREK, A. and KUMMER, A. 1988. An ELISA test for bacterial ring rot of potato with a new monoclonal antibody. *Plant Dis.* 1988; 72:874–878. doi: 10.1094/PD-72-0874.
- DE LA CRUZ, A., WIESE, M., and SCHAAD, N.A. 1992. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from potato tissues. *Plant Dis.* 1992; 76:830–834. doi: 10.1094/PD-76-0830.
- DEFRA (Department of Environment, Food and Rural Affairs), United Kingdom, 2002. Potato Ring Rot. <http://www.defra.gov.uk/plant/pestpics/qic41.htm>
- DRENNAN, J.L., WESTRA, A.A.G., SLACK, S.A., DELSERONE, L.M., COLLMER, A., GUDMESTAD, N.C. and OLESON, A.E. 1993. Comparison of a DNA hybridisation probe and ELISA for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown potatoes. *Plant Diseases* 77:1243-1247.
- EVANS, I., YARSH, C., SCHAUMPMEYER, W., WOLFF, G. and DUPLESSIS, P. 1998. Understanding bacterial ring rot in potatoes. Alberta Agriculture, Food and Rural Development, Canada. <http://www.agric.gov.ab.ca/agdex/200/258.635-5.htm>
- GUDMESTAD, N.C. and SECOR, G.A. 1993. Management of soft rot and ring rot. In: *Potato Health management*. R.C. ROWE (ed.). APS Press, St. Paul, USA, pp. 135–139.

- CHRISTIE, R.D., SUMALDE, A.C., SCHULZ, J.T. and GUDMESTAD, N.C. 1991. Insect transmission of the bacterial ring rot pathogen. *Am. Potato J.* 68:363–372.
- LEE, I.M., LUKAESKO, I.A. and MAROON, C.J.M. 2001. Comparison of Dig-Labeled PCR, Nested PCR, and ELISA for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Field-Grown Potatoes. *Plant Dis.* 85:261–266.
- LELLIOTT, R.A. and STEAD, D.E. 1987. *Methods in Plant Pathology Volume 2. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants, Chapter 3 Diagnostic procedures 3.5.7. Bacterial ring rot of potatoes (Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus syn. Corynebacterium sepedonicum)*. Blackwell Scientific Publications, pp. 97–101.
- MANSFELD-GEISE, K. 1997. Plant-to-plant transmission of the bacterial ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Potato Research* 40:229–235.
- NELSON, G.A. 1984. Survival of *Corynebacterium sepedonicum* on potato stems and on surfaces held at freezing and above-freezing temperatures. *Am. Potato J.* 62:23–28.
- PÁNKOVÁ, I. a KREJZAR, V. 2015. Detekce původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, v šlechtitelském a množitelském materiálu. Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství České republiky, odborem Rostlinných komodit. OSVĚDČENÍ č. j.48881/2015-MZE-17221777 o uznání uplatněné certifikované metodiky bylo vydáno v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“. ISBN 978-80-7427-182-3, pp. 20.
- RICH, A.E. 1983. *Potato Diseases, Chapter 2 Bacterial Diseases, Ring Rot*. Academic Press Inc.: 20–25.
- ROWE, R.C., MILLER, S.A. and RIEDEL, R.M. 1995. Bacterial Ring Rot of Potatoes. Extension Fact Sheet. <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3103.html>
- SCHUD, B.A., CRANE, J. and HARRISON, M.D. 1992. Symptomless infection with *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus* during tissue culture propagation of potato. *Canadian J Plant Science* 72:943–953.
- SIVAPALAN, S. 2001. Pest data sheet – bacteria. (unpublished).
- SLACK, S.A. 1987. Biology and Ecology of *Corynebacterium sepedonicum*. *Am. Potato J.* 64:665–670.
- VAN DER WOLF, J.M. and VAN BECKHOVEN, J.R.C.M. 2004. Factors affecting survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in water. *Phytopathology* 152:161–168.
- Zizz, JD and Harrison, MD 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck & Kotth.) (Carlson & Vidaver) in common weed species found in Colorado potato fields. *Phytopathology* 81:1348 (abstract).

8. SEZNAM SOUVISEJÍCÍCH PUBLIKOVANÝCH ČLÁNKŮ

- PÁNKOVÁ, I. and KREJZAR, V. 2017. Příznaky, šíření a kontrola bakteriální kroužkovitosti bramboru. *Agromanuál* (v tisku).
- PÁNKOVÁ, I. and KREJZAR, V. 2016: Detection of the causal agent of potato ring rot, the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, in the breeding and propagation materials of the three-stage control process. *J Phytopathol Pest Management* 3(2):48–63.
- PÁNKOVÁ, I. a KREJZAR, V. 2016. Detekce původce bakteriální kroužkovitosti ve šlechtitelských materiálech. *Rostlinolékař* 02, s. 18–20.
- PÁNKOVÁ, I. a KREJZAR, V. Detekce původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, v šlechtitelském a množitelském materiálu. Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství České republiky, odborem Rostlinných komodit. OSVĚDČENÍ č. j.48881/2015-MZE-17221777 o uznání uplatněné certifikované metodiky bylo vydáno v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“. ISBN 978-80-7427-182-3, pp. 20.
- PÁNKOVÁ, I. a KREJZAR, V. a HORÁČKOVÁ, V. 2015. Detekce původce bakteriální kroužkovitosti v procesu šlechtění. *Úroda* (63)5, s. 92–95.
- PÁNKOVÁ, I. a KREJZAR, V. 2015. Detekce původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, karanténní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, v třístupňovém procesu kontroly sadbového materiálu bramboru. XX. česká a slovenská konference o ochraně rostlin. 1.–3. 9. 2015 ČZU, Praha, Česká republika, poster.
- CHYTRÁČKOVÁ, J., PÁNKOVÁ, I. and KREJZAR, V. 2015. Reakce původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na přítomnost antibiotik v živném médiu. XX. česká a slovenská konference o ochraně rostlin. 1.–3. 9. 2015 ČZU, Praha, Česká republika, poster.
- KREJZAR, V., PÁNKOVÁ, I., KREJZAROVÁ, R. a KŮDELA, V. 2008. Zefektivnění postupu při stanovení přítomnosti karanténního organismu, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ve vzorcích sadbových brambor. Certifikovaná metodika ISBN: 978-80-87011-42-3, 12s.

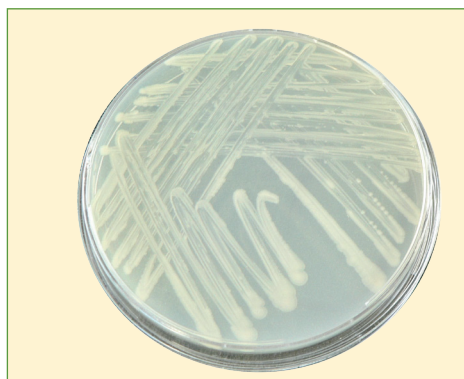
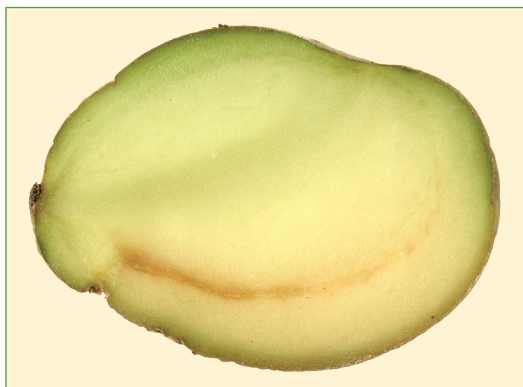
Poradenská a škollčí činnost

- Jednání k problematice zjišťování výskytu a testování na přítomnost původce bakteriální kroužkovitosti bramboru (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) v tuzemské produkci brambor. MZe ČR, 14. 1. 2016 a 26. 10. 2016.
- Školení pracovníků Vesa Velhartice a.s. Detekce původce bakteriální kroužkovitosti, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, v hlízách bramboru metodou DAS ELISA. 20. 1. 2016 VÚRV, v.v.i.
- Jednání k problematice zjišťování výskytu a testování na přítomnost původce bakteriální kroužkovitosti bramboru (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) v tuzemské produkci brambor. MZe ČR, 13. 1. 2015 a 25. 3. 2015.

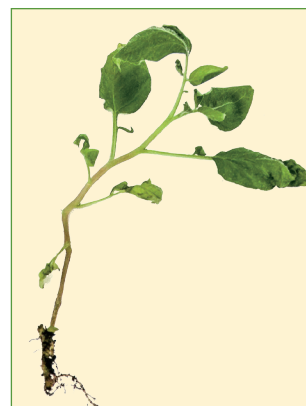
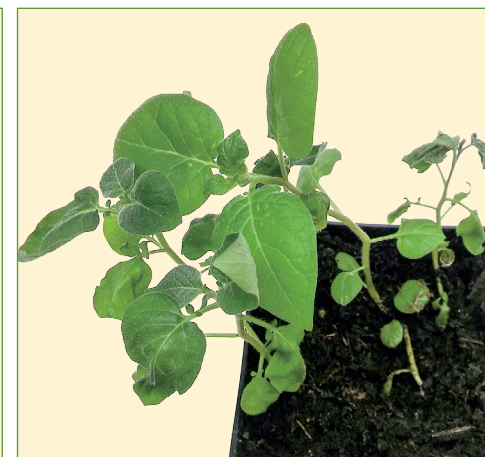
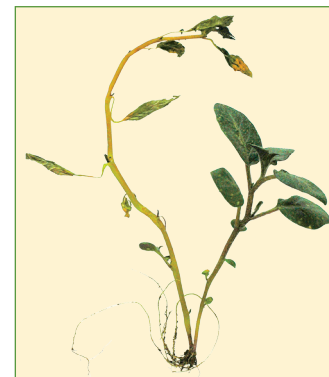
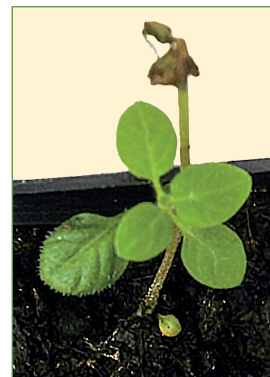
9. OBRAZOVÁ ČÁST



Hlízy s příznaky bakteriální kroužkovitosti bramboru – V našich zeměpisných šířkách je hlavním příznakem silnější infekce na hlízách ztmavnutí cévních svazků, dle odrůdy jsou tmavě žluté až hnědé. Jak infekce *Cms* postupuje, mohou se cévní svazky a okolní dužnina rozkládat a při zmáčknutí z hlízy vytéká krémově zabarvená kašovitá hmota bez zápachu.



Původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na živném médiu



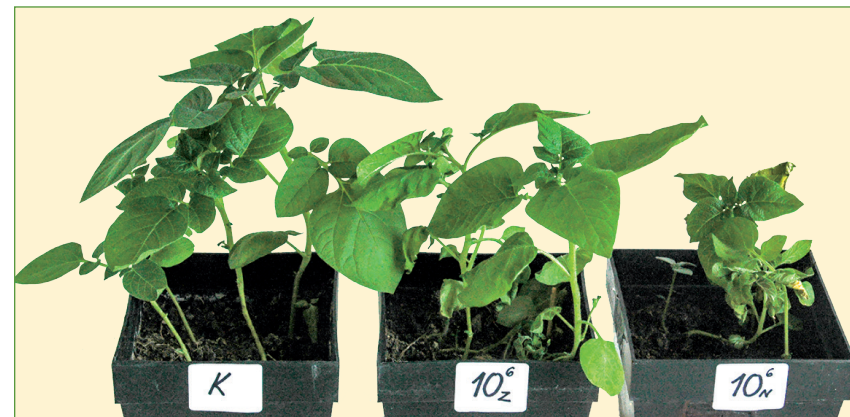
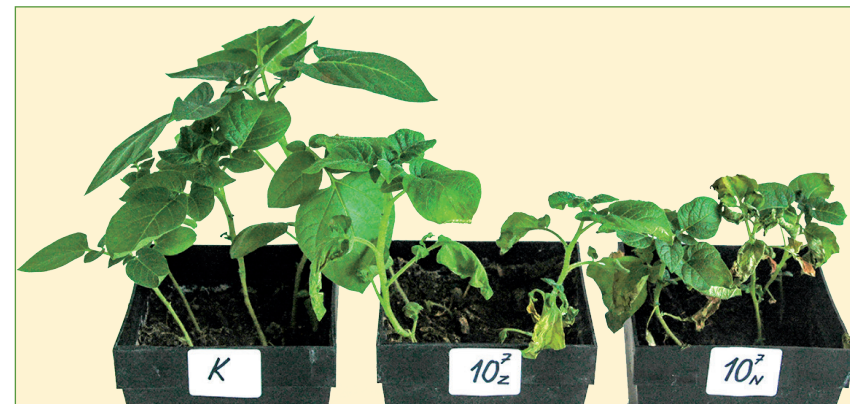
Obr. 1–8: typy příznaků bakteriální kroužkovitosti bramboru po umělé inokulaci kořenů rostlin konzumních a průmyslových odrůd bramboru namáčením v suspenzi *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.



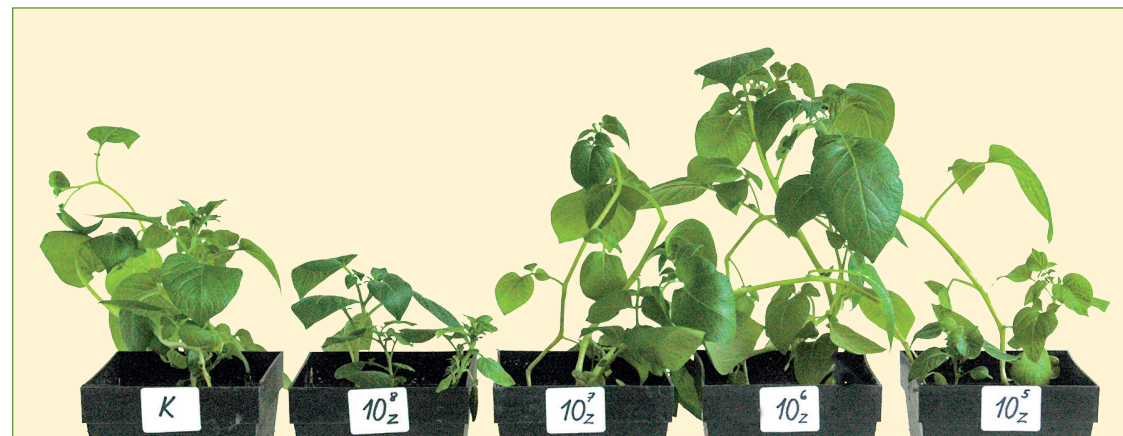
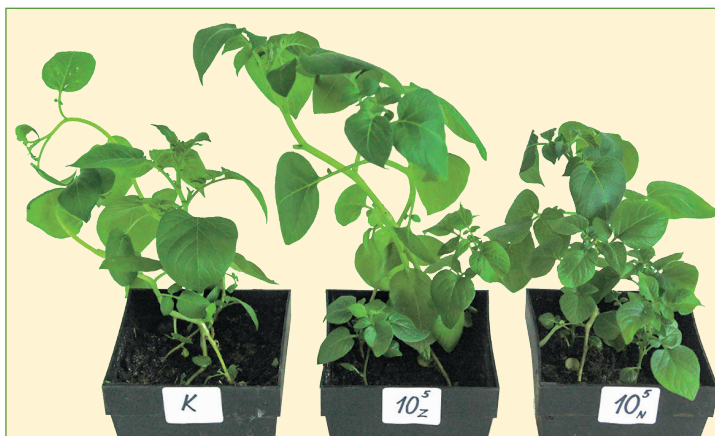
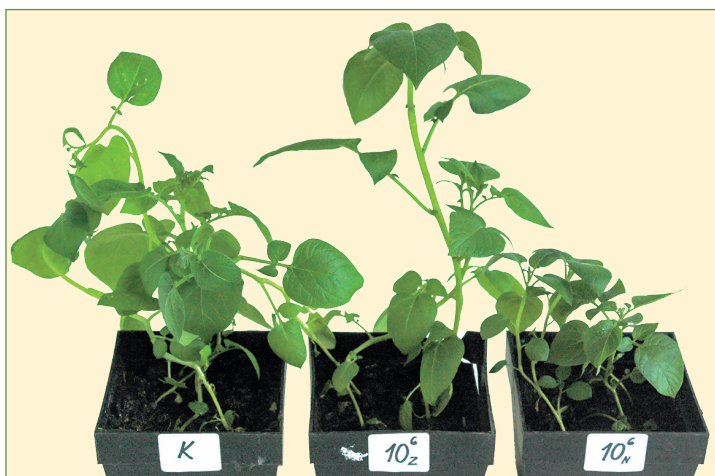
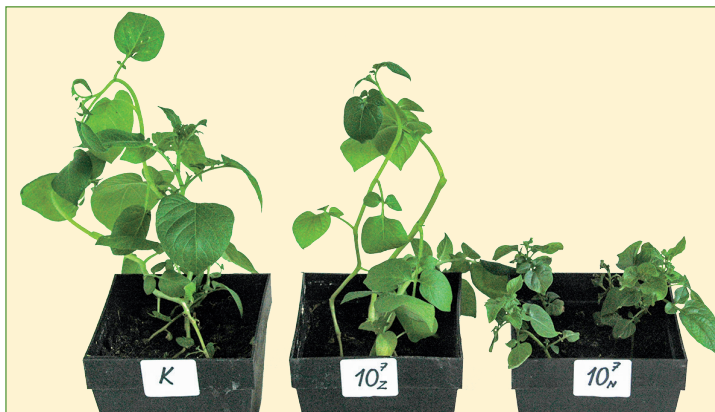
Obr. 9-10 příznaky infekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na rostlinách bramboru v tkáňových kulturách *in vitro*



Obr. 11-12 reakce náchylné (A) a méně náchylné (B) odrůdy bramboru na namáčení kořenů rostlin do bakteriální suspenze *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* o koncentraci 10^5 - 10^8 buněk/ml v porovnání s kontrolními rostlinami bramboru namáčenými do sterilní vody



Obr. 13-15 reakce rostlin citlivějšího genotypu bramboru na umělou inokulaci bakteriální suspenzí *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* o koncentraci 10^7 - 10^8 buněk/ml Z - zaléváním a N - namáčením kořenů v porovnání s kontrolními rostlinami namáčenými do sterilní vody



Obr. 19–20: reakce rostlin bramboru na umělou inokulaci bakteriální suspenzí *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* o koncentraci 10^8 – 10^5 buněk/ml Z – zaléváním a N – namáčením kořenů v porovnání s kontrolními rostlinami namáčenými do sterilní vody

← Obr. 16–18: reakce rostlin odolnějšího genotypu bramboru na umělou inokulaci bakteriální suspenzí *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* o koncentraci 10^7 – 10^5 buněk/ml Z – zaléváním a N – namáčením kořenů v porovnání s kontrolními rostlinami namáčenými do sterilní vody



VÝZKUMNÝ ÚSTAV
BRAMBORÁŘSKÝ
HAVLÍČKŮV BROD



VÝZKUMNÝ ÚSTAV
ROSTLINNÉ VÝROBY



Příznaky vadnutí a svinování na listech bramboru po umělé infekci virulentním kmenem *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Řada PRAKTICKÉ INFORMACE – Číslo 68.

BAKTERIÁLNÍ KROUŽKOVITOST BRAMBORU

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*.

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

(Osvědčení č.j. 8666/2017-MZE-17 224 vydal Odbor rostlinných komodit MZe ČR).

Vydaly: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.,
Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně
a Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.,
Dobrovského 2366, CZ-580 01 Havlíčkův Brod.

Vydání první. Náklad: 100 výtisků.

Grafická úprava: Jiří Trachtulec.

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného svolení VÚRV, v.v.i a VÚB HB, s.r.o.

www.vurv.cz, www.vubhb.cz