

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Karanténní bakteriální choroby bramboru – typy, metody průkazu
Bakalářská práce

2020

Veronika Bugáňová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Bugáňová**
Osobní číslo: **C17243**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Karanténní bakteriální choroby bramboru – typy, metody průkazu**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Z dostupných literárních zdrojů vypracovat literární rešerši o karanténních bakteriálních chorobách bramboru, se zaměřením na bakterie *Clavibacter michiganensis*.
2. Dále popsat projevy karanténních bakteriálních chorob a možnosti stanovení pomocí různých metod (imunofluorescenční test, ELISA, PCR, screeningové testy, FISH test).

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Sciencedirect; odborné knihy.
Další dle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 17. 7. 2020

.....

Veronika Bugáňová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za její odborné vedení, ochotu a cenné rady.

Dále děkuji Ing. Aleně Krpálkové a Ing. Bohumilu Vokálovi, CSc. za jejich užitečné rady a laskavé poskytnutí materiálů.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se věnuje karanténním bakteriálním chorobám bramboru. První část popisuje rostlinu bramboru a choroby, které ji ohrožují. Hlavní část popisuje, které bakterie karanténní choroby bramboru způsobují, zejména pak *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum*. Je popsáno, jak mohou být rozpoznány projevy na rostlině a jak je detegovat pomocí laboratorních metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

Brambor, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum*, karanténní choroby

TITLE

Quarantine bacterial disease of potatoes - types, methods of detection

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on bacterial quarantine diseases of potato. The first part describes the potato plant and the most common diseases that threaten it. The main focus is on bacterial diseases caused mainly by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum*, their manifestations, recognition and the possibility of laboratory identification of their main agents.

KEYWORDS

Potato, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum*, quarantine disease

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	9
SEZNAM ZKRATEK	10
ÚVOD	11
1 Brambor	12
1.1 Biologická charakteristika	12
1.2 Využití hlíz	14
1.2.1 Význam v lidské stravě.....	14
2 Škodliví činitelé	16
2.1 Abiotikózy	16
2.2 Virové choroby	16
2.3 Houbové choroby	17
2.4 Škůdci bramboru	18
2.5 Choroby vyvolané viroidy a fytoplazmami	18
2.6 Bakteriální choroby	18
2.6.1 Bakteriální černání stonku a měkká hniloba hlíz brambor	18
2.6.2 Aktinobakteriální obecná strupovitost bramboru	20
2.6.3 Bakteriální kroužkovitost bramboru a bakteriální hnědá hniloba bramboru – karanténní choroby	20
3 Bakteriální kroužkovitost bramboru	22
3.1 Příznaky choroby.....	22
3.2 Infekce a přenos.....	24
3.3 Výskyt <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> v České republice	25
4 Bakteriální hnědá hniloba bramboru.....	26
4.1 Příznaky choroby.....	27
4.2 Výskyt <i>Ralstonia solanacearum</i> v České republice	28
5 Současná legislativa	30
6 Metody detekce původců karanténních chorob bramboru.....	32
6.1 Odběr vzorku	32
6.2 Zpracování vzorku.....	33
6.3 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi	34
6.4 Imunofluorescence	35
6.5 Polymerázová řetězová reakce	38
6.5.1 Klasická polymerázové řetězové reakce.....	38
6.5.2 Real-Time polymerázová řetězová reakce.....	41

6.6	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	42
6.7	Test patogenity	45
	ZÁVĚR	48
	POUŽITÁ LITERATURA	49

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Popis rostliny brambor (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	12
Obrázek 2: Morfologie hlízy bramboru	13
Obrázek 3: Zmrznutí hlíz bramboru a mechanické poškození hlíz	16
Obrázek 4: Virová svinutka bramboru a Y-viróza bramboru	17
Obrázek 5: Plíseň bramboru na spodní straně listu a na hlíze	17
Obrázek 6: Mandelinka bramborová kladoucí svá vajíčka a mšice řešetláková	18
Obrázek 7: Bakteriální černání stonku a měkká hniloba hlíz bramboru	19
Obrázek 8: Aktinobakteriální obecná strupovitost bramboru	20
Obrázek 9: Nárůst <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> na živném médiu	22
Obrázek 10: Příznaky bakteriální kroužkovitosti bramboru na nadzemní části rostliny	23
Obrázek 11: Napadené hlízy bakteriální kroužkovitostí bramboru	23
Obrázek 12: Hlíza napadená bakteriální kroužkovitostí bramboru s vytékajícím slizem	24
Obrázek 13: <i>Ralstonia solanacearum</i> v elektronovém mikroskopu (kmen UY031)	26
Obrázek 14: Kolonie <i>Ralstonia solanacearum</i> (kmen UY031)	27
Obrázek 15: Příznaky bakteriální hnědé hniloby bramboru na nadzemní části bramboru	27
Obrázek 16: Vytékající bakteriální hnis při nákaze bakteriální hnědé hniloby bramboru	28
Obrázek 17: Schéma mikrotitrační jamky při metodě DAS ELISA	34
Obrázek 18: Přímá a nepřímá imunofluorescence	36
Obrázek 19: Buňky <i>Ralstonia solanacearum</i> při imunofluorescenci	37
Obrázek 20: Cyklus polymerázové řetězové reakce	39
Obrázek 21: Snímek elektroforézy s pozitivním nálezem <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	40
Obrázek 22: Snímek elektroforézy z detekce <i>Ralstonia solanacearum</i>	40
Obrázek 23: Základní kroky metody FISH	44
Obrázek 24: FISH metoda u buněk <i>Ralstonia solanacearum</i> prováděné sondou RSOLB	45
Obrázek 25: Projev bakteriální kroužkovitosti bramboru při inokulaci různými koncentracemi	46
Obrázek 26: Srovnání zdravé a napadené rostliny při umělé infekci <i>Ralstonia solanacearum</i> sazenic bramboru	47

SEZNAM ZKRATEK

bp	počet bází (base pair)
CFU	jednotky tvořící kolonie (Colony Forming Units)
Cms	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EPPO	Evropská a středozevní organizace ochrany rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization)
EU	Evropská unie (European Union)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (Fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FITC	fluorescein isothiokyanát (Fluorescein isothiocyanate)
IF	imunofluorescenční test (Immunofluorescence Test)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real-Time Polymerase Chain Reaction)
Real-Time PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real-Time Polymerase Chain Reaction)
RNA	ribonukleová kyselina (Ribonucleic acid)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina (Ribosomal ribonucleic acid)
Rs	<i>Ralstonia solanacearum</i>
ÚKZÚZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture)
VÚB	Výzkumný ústav bramborářský (Potato Research Institute)

ÚVOD

Brambor je jednoletá rostlina, která se pěstuje na mnoha místech světa pro své jedlé hlízy. Jedná se o jednu z nejdůležitějších plodin, která je ceněna pro svůj obsah sacharidů, bílkovin a vitamínů, přičemž obsahuje málo tuků a nemá vysokou energetickou hodnotu. Hlízy bramboru se využívají i k průmyslovému zpracování.

Rostlinu brambor ohrožuje mnoho abiotikóz, škůdců a chorob. Všechny jmenované škodlivé činitele poškozují rostlinu nebo hlízy, čímž přímo nebo nepřímo tvoří zemědělcům velké škody. Abiotikózy nezpůsobují organismy, jedná se o poškození způsobené například mechanicky, povětrnostními či půdními podmínkami. Škůdci rostlinu oslabují svým požerem nebo sáním. Mezi škůdce bramboru patří mnoho zástupců, například hád'átka, mšice, roztoči, ploštice, motýli a brouci. Choroby vyvolávají plísňe, viry nebo bakterie. Největší škody způsobuje houbová choroba plísňe bramboru. Mezi virové patogeny ohrožující brambor se řadí viry A, Y, S, X, M a vir svinutky bramboru. Choroby bramboru vyvolané bakteriemi jsou bakteriální kroužkovitost bramboru, bakteriální hnědá hniloba bramboru, aktinobakteriální obecná strupovitost bramboru, bakteriální černání stonku a měkká hniloba hlíz bramboru.

Tato práce se podrobněji zabývá bakteriální kroužkovitostí bramboru, která je způsobena bakterií *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, a bakteriální hnědou hnilobou bramboru, kterou vyvolává *Ralstonia solanacearum*. Obě tyto bakterie se řadí mezi karanténní mikroorganismy, proto je nezbytná jejich včasná detekce. Podniky kladou velký důraz na testování především sadbových hlíz, protože karanténní opatření jsou nákladná.

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* a *Ralstonia solanacearum* napadají cévní svazky rostliny bramboru, popřípadě hlízy. Projevy obou chorob, vyvolanými právě těmito bakteriemi, jsou velmi podobné a dají se zaměnit i s jinými chorobami. Proto je důležité provádět laboratorní testy k jejich průkazu.

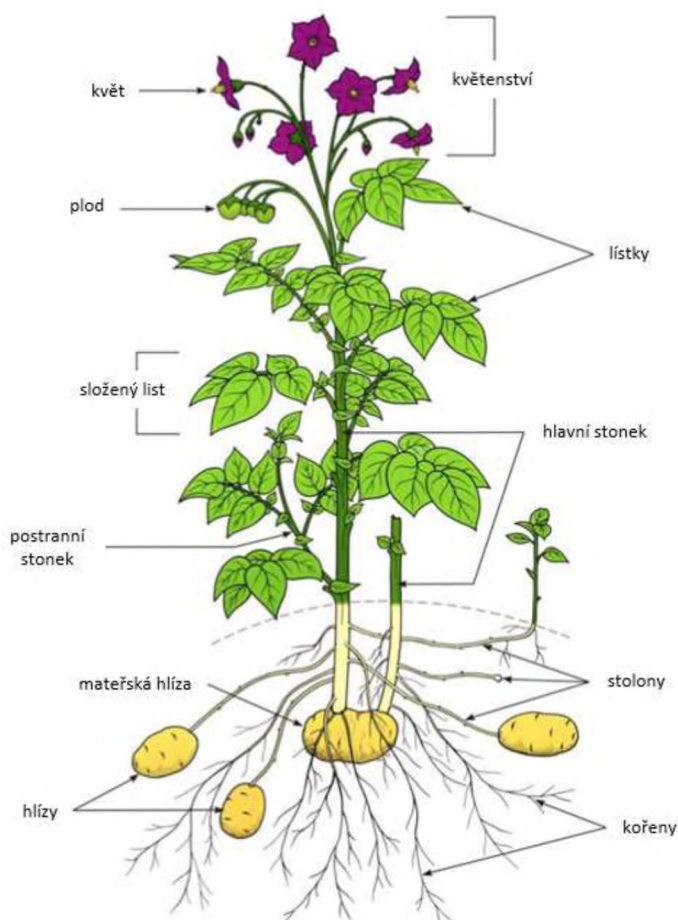
Mezi využívané metody k detekci *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a *Ralstonia solanacearum* se využívají testy enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA), imunofluorescenční test (IF test), polymerázová řetězová reakce (PCR), kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real-Time PCR) a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Pozitivní vzorky se na závěr testují testem patogenity neboli lilkovým testem.

1 Brambor

Brambor, latinským názvem *Solanum tuberosum* L., pochází z peruánsko-bolivijských And, kde je známá více než 7000 let. Do Evropy byl dovezen Španěly v druhé polovině 16. století [1].

1.1 Biologická charakteristika

Tato jednoletá rostlina z čeledi lilkovité (*Solanaceae*) se skládá z nadzemní a podzemní části (Obr. 1). Nadzemní část bramboru je tvořena lodyhou. Ta se rozvětjuje a nese střídavé lichozpeřené listy [1; 2]. List se skládá obvykle z 3 až 5 párů věncitých lístků o různé velikosti. Na konci listu se nachází vrcholový lístek. Na vrcholu lodyhy se rozkládá květenství bramboru typu dvojitý květ. Pětčetný květ bývá bílé až modrofialové barvy. Plod rostliny bramboru je dvoupouzdrá bobule malého kulovitěho tvaru. Uvnitř plodu se vyskytuje mnoho malých semen [2].

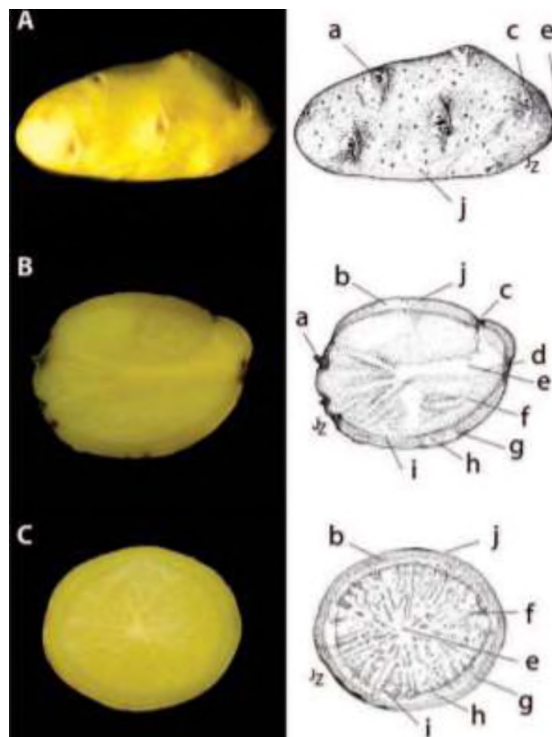


Obrázek 1: Popis rostliny brambor (*Solanum tuberosum* L.). Upraveno z: [3]

Na každé hlíze na jejím povrchu jsou viditelné listové jizvy. Blízko listových jizev jsou úžlabní pupeny. Listová jizva společně s úžlabním pupenem tvoří tzv. oko [1].

V každém očku je 1 až 7 pupenů, ze kterých vyrůstají klíčky. Ty postupně rostou a vytváří stonky. Podzemní část rostliny tvoří adventivní kořeny a stolony [1]. Jednoduše lze říci, že stolony jsou přeměněné stonky bez chlorofylu [4]. Na konci stolonu dochází k tloušťnutí a dužnatění vrcholového internodia, a tak přeměnou stonku vznikají hlízy [2; 4].

Vznik hlíz je podmíněn růstem listové plochy. Je-li velikost listové plochy ve třech čtvrtinách svého maxima, začínají se tvořit hlízy. Hospodářský výnos závisí na rychlosti růstu, velikosti, produktivitě a období, ve kterém se dostatečně vyvine funkční asimilační plocha [1]. Popis hlízy bramboru je uveden na obrázku č. 2.



Obrázek 2: Morfologie hlízy bramboru: A – hlíza, B – podélný řez, C – příčný řez, (a) - pupen, (b) – kůra (cortex), (c) – pupen na bazální části bramboru, (d) – pupek (stonková část), (e) – vnitřní medula (dřeň), (f) – vnější medula (zásobní parenchym), (g) – pericykl, (h) – periderm, (i) – kruh cévních svazků, (j) - epidermis. Převzato z: [1]

Rostlina bramboru se rozmnožuje hlízami (vegetativně), pomocí semen (generativně), popřípadě ve šlechtitelství se využívá rozmnožování pomocí tkáňových kultur. Z každého „očka“ hlízy může teoreticky vzniknout nová rostlina. Většina dnešních odrůd bramboru semena netvoří, avšak tvorba květu a semen je typická pro jihoamerické plané rostliny. Rozmnožování semeny se především využívá v novošlechtění [4; 2; 5]. Semena jsou bílá, vejčitého tvaru o velikosti 1-2 mm. 50-100 semen je uloženo v dužnaté části plodu. Kulaté nebo oválné tvary plodu měří 20-40 mm, vyznačují se zelenou až zelenožlutou barvou [1].

Brambory lze zařadit mezi plodiny se středně velkými nároky na vodu. Nejméně vody vyžadují v době klíčení, nejvíce naopak od počátku tvorby pupat až po fyziologickou zralost porostu, kdy se intenzivně tvoří hlízy. Ideální pro pěstování brambor v České republice jsou oblasti s průměrným ročním úhrnem srážek kolem 650-750 mm a průměrnou roční teplotou mezi 6 až 7 °C. Nejrychlejší růst hlíz je při teplotě kolem 20 °C ve dne a kolem 14 °C v noci [4]. Brambory lze za určitých podmínek pěstovat i ve vysokohorských oblastech až 4500 m n. m, například odrůdu *Solanum acaule* [6].

1.2 Využití hlíz

Pro své hlízy, které jsou jedlé, je právě brambor ceněn nejvíce. Na našem území se tato plodina začala pěstovat počátkem 18. století. Hlízy se využívají především jako příloha, ale pěstují se i pro krmné účely. Využití dnes nachází ve škrobárenském průmyslu a při výrobě lihu [4; 7].

1.2.1 Význam v lidské stravě

Hlízy bramboru jsou častou potravinou v našem jídelníčku. V mnoha vyspělých zemích dospělá osoba denně konzumuje 50-150 g, ve venkovských oblastech Afriky či zemích Latinské Ameriky v blízkosti And jsou hlízy bramboru konzumovány v mnohem větší míře, 300-800 g na dospělého člověka za den [6]. Jsou zdrojem sacharidů, bílkovin, vitamínů, minerálních látek a antioxidantů. Zároveň mají nízký obsah kalorií a tuků [8; 6]. Hlízu bramboru tvoří ze 70-82 % hmotnosti hlízy voda v závislosti na odrůdě, stupni vývoje a zralosti, použité pěstitelské technologii či způsobu skladování [1; 9].

Co se týče výživové hodnoty, 100 g vařených brambor odpovídá 96,33 až 123,17 kcal, což je v porovnání například se 100 g hnědé rýže (363 kcal) nebo 100 g pšenice (361 kcal) méně [10; 6; 11].

Hlízy odrůd brambor, které jsou určeny k přímé konzumaci nebo k výrobě bramborových výrobků, obsahují méně škrobu, a to 12-18 % v původní hmotě. Hlízy odrůd určených k výrobě škrobu obsahují 18-24 % škrobu. Limitní hodnota škrobu pro zpracování brambor na potravinářské výrobky je 18 % v čerstvé hmotě [1]. Škrob je polysacharid skládající se z amylózy a amylopektinu, přičemž amylopektin tvoří 70-80 % dostupného škrobu [12]. Je uložen ve škrobových zrnech [13].

Hlíza dále obsahuje téměř 2 % dusíkatých látek. Bílkoviny zaujímají zhruba 1 % z původní hmoty [1]. Důležitý je i obsah esenciální aminokyseliny lysinu, protože není časté,

aby se vyskytoval v potravinách rostlinného původu [1; 9]. Bramborová hlíza obsahuje pouze 0,1 % tuků. Nejvíce tuků je obsaženo ve slupce [9].

Hlíza bramboru je také důležitým zdrojem vitamínu C, kterého v čerstvé podobě obsahuje 8-54 mg/100 g, a vitamínu B6, jehož množství je 0,13-0,44 mg/100 g [1].

Nejvýznamnějším prvkem, kterého v sušině nalezneme až 2 %, je draslík. Ve 100 g sušiny se může vyskytovat až 2500 mg draslíku. V mnohem menším množství hlíza bramboru obsahuje např. fosfor (78 mg/100 g sušiny), vápník (10-130 mg/100 g sušiny) a hořčík (0,5-8 mg/100 g sušiny). Bramborová hlíza je i zdrojem síry, sodíku, železa, zinku či mědi, i když obsah těchto prvků je nízký [9; 13].

Barviva lutein a zeaxanthin, které se nachází ve žlutých hlízách brambor, a barvivo antokyan, které se vyskytuje v hlízách brambor s modrou nebo červenou slupkou či dužninou, jsou řazeny mezi antioxidanty, tedy látky, které mohou předcházet předčasnému stárnutí organismu [6].

Hlízy brambor obsahují také glykoalkaloidy, které bývají ve vyšších koncentracích pro lidský organismus toxické, avšak v malých dávkách dokáží zabraňovat růstu a množení rakovinných buněk [6].

2 Škodliví činitelé

Rostlina bramboru je ohrožována mnoha škodlivými činiteli. Při poškození nadzemní části rostliny dochází k zmenšení asimilační plochy, poškození podzemní části nepříznivě ovlivňuje růst rostliny. Napadení hlíz vede k výraznému snížení výnosu. Mezi škodlivé činitele můžeme zařadit abiotikózy, choroby a škůdce [4]. Roční celosvětové ztráty bramboru způsobené škůdci a patogeny činí 10-16 % a dalších 6-12 % hlíz brambor je zničeno škodlivými činiteli během skladování [14].

2.1 Abiotikózy

Mezi abiotické vlivy, které ohrožují rostlinu bramboru, patří povětrnostní a půdní podmínky, cizorodé látky v prostředí, poškození vzniklá nesprávným použitím ochranných rostlinných přípravků, chybnými agrotechnickými zásahy či mechanickým poškozením [1]. Tato poškození se nepřenáší z rostliny na rostlinu [15]. Vzhled takových hlíz je zřetelný na obrázku č. 3.



Obrázek 3: Zmrznutí hlíz bramboru (vlevo) a mechanické poškození hlíz (vpravo). Převzato z: [16]

2.2 Virové choroby

Původci virových chorob bramboru jsou rostlinné viry. Negativně ovlivňují výnos, velikost a vzhled hlíz. Při vegetativním rozmnožování se viry snadno dostávají na další generace, přenašečem jsou i hmyz (mšice, mandelinka, ploštice, křísi, třásněnka), háďátka nebo houby. K infekci dochází i při kontaktu nemocné a zdravé rostliny [4; 17].

Virová onemocnění se dělí podle jejich škodlivosti na těžká a lehká. Mezi těžká onemocnění se řadí onemocnění způsobené viry A, Y a virem svinutky bramboru. Lehké virové choroby bramboru způsobují viry S, X a M [1]. Obzvláště nebezpečné jsou tzv. „směsné infekce“ více viry [4]. Příklady dvou virových chorob lze vidět na obrázku č. 4.



Obrázek 4: Virová svinutka bramboru (vlevo) a Y-viróza bramboru (vpravo). Převzato z: [16]

2.3 Houbové choroby

Houbové choroby poškozují všechny části rostliny. Mají specifické příznaky. Do rostliny pronikají přímo nebo sekundárně mechanickým poškozením [18].

Z hospodářského hlediska patří k nejškodlivějším chorobám bramboru plíseň bramboru, jež způsobuje patogen *Phytophthora infestans* [1]. Mírné teploty a vlhké prostředí, které podporují růst brambor, zároveň podporuje růst plísně [19].

Nejčastějšími původci znehodnocení hlíz během skladování je hniloba způsobena plísněmi rodu *Fusarium* (nejčastěji *Fusarium solani* var. *coeruleum*, *Fusarium sulphureum*). K infekci dochází především v místě mechanického poškození hlíz nebo při narušení hlíz jinými chorobami, např. plísní bramboru (viz Obr. 5) [4].



Obrázek 5: Plíseň bramboru na spodní straně listu (vlevo) a na hlíze (vpravo). Převzato z: [16]

Mezi další zástupce chorob vyvolaných plísněmi patří hnědá a terčovitá skvrnitost bramboru, vločkovitost hlíz bramboru, stříbřitost slupky bramboru, vodnatá hniloba bramboru, fomová hniloba bramboru, černá tečkovitost bramboru, prašná strupovitost a rakovina bramboru [1].

2.4 Škůdci bramboru

Škůdci bramboru se rozdělují na škůdce bramborové natě a škůdce kořenů, stolonů a hlíz. Poškození způsobená škůdci jsou pak místem vstupu dalších patogenů. Za škůdce bramboru se považují například háďátka, roztoči, mšice (viz Obr. 6 vpravo), ploštice, křísi, motýli, hlodavci, slimákovití, brouci (mandelinka bramborová (viz Obr. 6 vlevo), chroust obecný, slunéčko vojtěškové aj.) [18].



Obrázek 6: Mandelinka bramborová kladoucí svá vajíčka (vlevo) a mšice řešetláková (vpravo). Převzato z: [16; 20]

2.5 Choroby vyvolané viroidy a fytoplazmami

Viroidy jsou malé kruhové molekuly RNA, které nenesou genetickou informaci pro kódování bílkoviny. Napadají výhradně rostliny [21]. Fytoplazma je triviální označení pro bakterii *Candidatus Phytoplasma*. Tato bakterie má nejmenší genom z rostlinných patogenních bakterií, 680-1600 kb [22].

Tyto choroby jsou typické pro teplejší oblasti. Do této skupiny patří metlovitost bramboru a dvě karanténní choroby, a to viroidní větvenovitost hlíz bramboru a stolbur bramboru. Přenos je způsobený semeny, pylem nebo některými druhy kříšů [18].

2.6 Bakteriální choroby

Bakteriální choroby způsobují prokaryotní organismy. Způsobují vysoké ztráty ve výnosech a ohrožují kvalitu hlíz. Jestliže je rostlina již napadena, nebo je mechanicky poškozena, bakterie urychlují rozklad hlíz. Mezi bakteriální choroby bramboru patří bakteriální kroužkovitost bramboru, bakteriální hnědá hniloba bramboru, bakteriální černání stonku a měkká hniloba hlíz bramboru a aktinobakteriální obecná strupovitost bramboru [1].

2.6.1 Bakteriální černání stonku a měkká hniloba hlíz brambor

Jedná se o běžně se vyskytující chorobu vyvolanou bakteriemi *Pectobacterium atrosepticum*, *Pectobacterium carotovorum* a *Dickeya chrysanthemi*. *Pectobacterium atrosepticum* je

gramnegativní bakterie, která vyvolává chorobu při nízkých teplotách. Naopak gramnegativní bakterii *Pectobacterium carotovorum* vyhovují vyšší teploty, stejně jako *Dickeya chrysanthemi* [1; 23].

Jak je vidět na obrázku č. 7, pokud dojde k nákaze na začátku rašení, klíčky zčernají, shnijí a odumřou. Je to způsobeno enzymy, které dané bakterie produkují a které narušují buněčnou stěnu [24]. Pokud se objeví nákaza u již vzrostlých rostlin, černá stonek, dochází k rozkladu napadeného pletiva a jeho maceraci. Rostlina žloutne a krní, což vede k odumírání celé rostliny. Při silné nákaze dochází k napadení i celého trsu, většinou se však příznaky projevují pouze na jednotlivých stoncích, které lze odstranit. Odumírání se může projevit i na podzemní části [4; 17; 18].

Hlízy mohou být napadeny před sklizní, v době sklizně nebo i při posklizňových úpravách a v době skladování. Dužina hlíz se maceruje, dochází k tvorbě hnědé až černé kašovité hmoty, která silně zapáchá. Rychlost tohoto děje se odvíjí od teploty a vlhkosti. Pokud je půda trvale mokrá, bývá hlíza často napadena plísní bramboru. Pak bakterie způsobující chorobu černání stonku pouze dokončují proces rozkladu. Mechanické porušení hlízy bramboru představuje vstupní bránu pro další patogeny, především pro plísně. Rizikové zároveň je, pokud na povrchu hlíz zůstala voda (nedostatečné osušení po sklizni nebo po omytí, srážení vody při špatném odvětrávání skladu) [1].



Obrázek 7: Bakteriální černání stonku (vlevo) a měkká hniloba hlíz bramboru (vpravo). Převzato z: [16]

Zdrojem rozšíření bakteriální nákazy je obvykle kontaminovaná sadba. Inokulum bakterií se z rostliny na rostlinu přenáší hmyzem, vodou nebo mechanizací [1].

K účinné ochraně před kontaminací je důležité eliminovat zdroje infekce. K sadbě se proto používají pouze certifikované a zdravé hlízy. Dále je důležité zamezit mechanickému poškození hlíz a přítomnosti volné vody na hlízách [18].

2.6.2 Aktinobakteriální obecná strupovitost bramboru

Aktinobakteriální obecnou strupovitost bramboru způsobuje vláknitá grampozitivní bakterie *Streptomyces scabiei*. Je součástí půdní mikroflóry. Daří se jí v lehčích a kamenitých půdách s vysokou teplotou, pH vyšším než 6 a kde není nadbytek vody [1; 25].

Tato choroba poškozuje vzhled hlíz (viz Obr. 8), které jsou tak neprodejné. U sadbových hlíz zhoršuje klíčivost a vzcházení [1; 18].



Obrázek 8: Aktinobakteriální obecná strupovitost bramboru. Převzato z: [16]

Choroba se projevuje tvorbou různě velkých korkovitých strupů na slupce hlízy. Vyznačují se různými formami: plochou, vystouplou nebo naopak propadlou. Ve vlhké půdě jsou strupy pokryty myceliem patogenu. Nejnáchylnější jsou malé hlízy (5-10 mm) na počátku jejich vzniku [1; 18].

Ochrana spočívá ve správném výběru odrůdy. Odolnější odrůdy se sází do lehčí a vysychavé půdy, ve které se původce této choroby často vyskytuje. Během pěstování se doporučuje udržovat vysokou biologickou aktivitu půdy, správné množství živin včetně stopových prvků a používat zelené hnojení [1; 18].

2.6.3 Bakteriální kroužkovitost bramboru a bakteriální hnědá hniloba bramboru – karanténní choroby

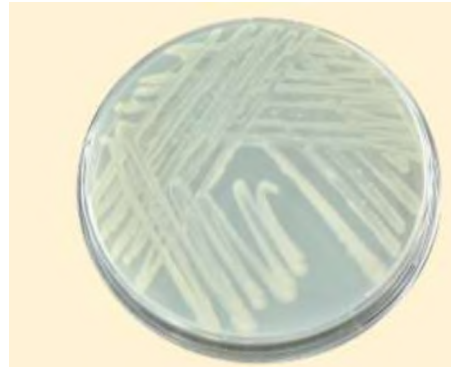
Bakteriální kroužkovitost bramboru je způsobena bakterií *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, bakteriální hnědá hniloba bramboru pak bakterií *Ralstonia solanacearum*. Obě tyto bakterie patří mezi tzv. karanténní bakterie. Karanténní škodlivý činitel je nebezpečný pro hospodářství. Buď v daném státu není doposud přítomen, nebo se vyskytuje, ale nedaří se jej účinně regulovat. K těmto organismům se vztahuje zákon č. 369/2019 Sb., který upravuje zákon č. 326/2004 Sb. [26]. Obě tyto bakterie jsou zapsané v seznamu Evropské a středomořské organizace na ochranu rostlin (EPPO - European and Mediterranean Plant Protection

Organization) ve skupině A2. EPPO doporučuje svým členským státům, mezi kterými je i Česká republika, aby škůdce uvedené v této skupině považovali za karanténní [27].

Podle webových stránek Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) se v červnu 2020 na území České republiky obě bakterie vyskytují a probíhá jejich eradikace [28].

3 Bakteriální kroužkovitost bramboru

Původcem bakteriální kroužkovitosti bramboru je vysoce infekční aerobní grampozitivní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) [1; 29; 5]. Jedná se o malou koryneformní tyčinkovitou bakterii, která při Grammově barvení může dávat slabou nebo dokonce negativní reakci [30]. Pomalu roste, nepigmentuje. Tvoří smetanově bílé, okrouhlé hladké kolonie s rovnými okraji (viz Obr. 9). Kolonie mají v průměru 1-3 mm [31]. Samotná buňka bakterie měří 0,5-1 μm [32].



Obrázek 9: Nárůst *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na živném médiu. Převzato z: [5]

Bakterie nejlépe roste při teplotách 20-22 °C, avšak i při těchto teplotách se, v porovnání s jinými druhy (např. *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, *Dickeya*), množí 3-4× pomaleji. Při teplotě pod 15 °C se rychlost množení výrazně zpomaluje, při teplotách kolem 0 °C se množení zastavuje a bakterie pouze přežívá [29; 5]. Při nevhodných podmínkách může v rostlině či hlíze přežít v inaktivní formě [1].

První informace o této chorobě byly zveřejněny v Německu v roce 1906. Původce této choroby byl popsán později, a to v roce 1914 [32].

U nás se první zmínky o bakteriální kroužkovitosti bramboru objevily v letech 1912-1917. Na území České republiky byla pak prokázána v roce 1995 [33].

V České republice hospodářské ztráty tato choroba nezpůsobuje, avšak náklady na karanténní opatření a testování bakterie jsou vysoké [18]. Pokud by touto chorobou bylo infikováno 5 % skladovaných hlíz, musí být celá sklizeň zlikvidována [5]. Většina zemí Severní Ameriky a Evropy akceptují pouze nulový výskyt této bakterie [34].

3.1 Příznaky choroby

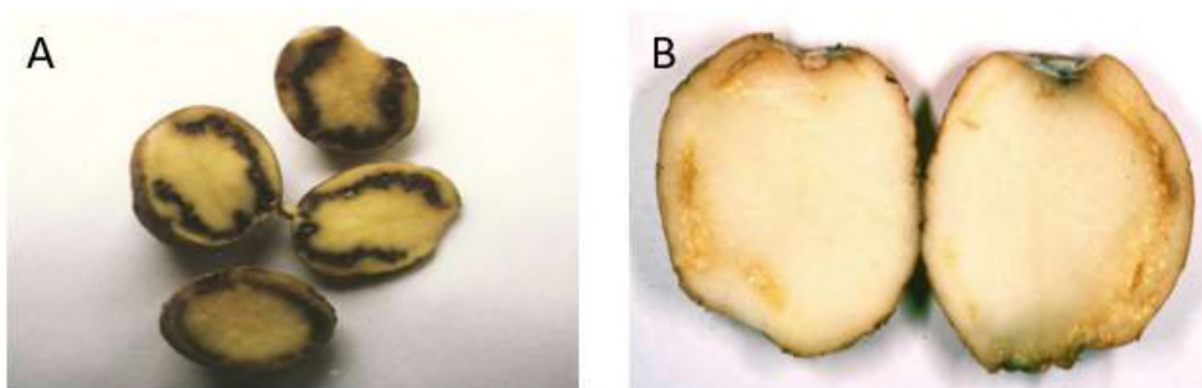
Bakterie osidluje cévní svazky rostliny a hlízy bramboru. Při pohledu na nadzemní část rostliny je v podstatě nemožné tuto chorobu rozpoznat. Projevy abiotikóz a některých virových chorob

jsou podobné příznakům bakteriální kroužkovitosti bramboru. Rostlina má vzrůst, barvu, dobu kvetení i dobu stárnutí stejnou jako zdravá rostlina bramboru. Když se příznaky objeví, rostlina je často plně vzrostlá, je ve fázi kvetení nebo už po ní. V případě silnější infekce se projeví na listech v nižších patrech, u slabších infekcí je rostlina často napadána jednostranně. Listy se vlní, rolují od okrajů a mají odstín barvy jen nepatrně světlejší oproti zdravým listům (viz Obr. 10). Z důvodu ucpávání cév se listy pozvolna deformují, jelikož buňky listů nemají potřebné množství vody a živin. Při úplném ucpání cévních svazků dochází ke zdatelným změnám zbarvení až k odumření listu [29; 5].



Obrázek 10: Příznaky bakteriální kroužkovitosti bramboru na nadzemní části rostliny. Převzato z: [35]

Rostlina s infikovanou matečnou hlízkou tvoří infikované dceřiné hlízy. Jejich počet ani velikost není rozdílný od dceřiných hlíz vytvořených zdravou rostlinou. Příznaky choroby se projevují až koncem vegetačního období ztmavnutím cévních svazků do tmavě žluté až hnědé barvy v závislosti na odrůdě, jak je vidět na obrázku 11 A. Silná infekce se projevuje vodnatěním, v blízkosti cévních svazků je dužina poloprůhledná, rozkládá se (Obr. 11 B) [5].



Obrázek 11: Napadené hlízy bakteriální kroužkovitosti bramboru. Převzato z: [36]

V cévních svazcích se tvoří kašovitá hmota, která je patrná při zmáčknutí hlízy (Obr. 12). Vyznačuje se krémovou barvou a nezapáchá [5].



Obrázek 12: Hlíza napadená bakteriální kroužkovitostí bramboru s vytékajícím slizem. Převzato z: [32]

Bakterie Cms nezpůsobují rozklad hlíz. Napadené hlízy podléhají sekundárním nákazám, jsou snadným cílem dalších bakterií a hub [5].

Může docházet k latentním infekcím, při kterých rostlina nemá žádné příznaky. Bakterii Cms lze spolehlivě prokázat laboratorními metodami [18].

3.2 Infekce a přenos

Cms je výhradně patogenem bramboru. Ve vodě, zemi ani na vzduchu není životaschopný, přežít se mu daří na jiných rostlinách z čeledi lilkovité (*Solanaceae*). Zde se však nemnoží. Pomocí hmyzu přenos z rostliny na rostlinu není častý [5].

Přenos se rozděluje na vertikální a horizontální. Vertikálním přenosem infekce se rozumí přenos mezi generacemi, z matečné hlízy na dceřinou. Infekce může být několik let skrytá. Postupně se patogen kumuluje, jeho zjištění může být až po několika generacích [5].

Horizontální šíření se vyznačuje přenosem mezi jedinci. Rostlinné zbytky a šťávy z hlíz tvoří hlavní původce horizontální nákazy. Bakterie Cms přežívá v suchých zbytcích rostlinných partií například na strojích, zařízení manipulující s hlízami, ve sklenicích či půdě [5].

Dalším zdrojem nákazy mohou být infikované plevelné hlízy, ve kterých patogen přežívá i několik let. Navíc většina schválených herbicidů je neúčinná [5].

Další rizikem je voda, ve které se omývaly infikované hlízy nebo infikované nástroje. Taková voda nesmí být vypouštěna v místech, kde se plánuje pěstování bramboru či rajčete. Nejčastěji se přistupuje k dezinfekci vody ozónem nebo UV zářením [5].

3.3 Výskyt *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* v České republice

Jako reakce na první výskyt Cms na území České republiky v roce 1995 vydalo Ministerstvo zemědělství eradikační program. Do roku 2000 se měla Česká republika stát pro Cms nezamořeným územím, nicméně tomu tak není [26]. Každý rok se od roku 1995 v České republice kontrolují na přítomnost Cms všechny partie především sadbových brambor. Povolena je pouze nulová tolerance. V roce 1995 bylo potvrzeno 12 případů nálezů Cms v sadbových bramborách. O rok později, v roce 1996, byly jen 4 nálezy. V roce 1996 byl výskyt potvrzen u 22 pěstitelů a podniků. Do roku 2000 toto číslo stoupl na 195 podniků. U některých pěstitelů se patogen vyskytoval i několik let po sobě, což poukazuje na nedůsledné dodržování přijatých opatření [26; 37].

Mezi lety 1995-2005 se snížilo množství patogenu z jednotek procent na desetiny procenta. Zatímco v roce 1998 byl potvrzen patogen v 1,14 % otestovaných sadbových hlízách, v roce 2005 se zdálo, že je patogen eradikován, jelikož patogen nebyl prokázán v žádné části základního ani certifikovaného rozmnožovacího materiálu. Rok poté se výskyt opět potvrdil, a to u 0,15 % otestovaných sadbových hlíz. Četnost pozitivních vzorků koncem tisíciletí u nesadbových hlíz činil až 7-8 % [26; 37].

Po roce 2010 opět vzrostl počet výskytů. Často se dnes stává, že v partii označené za zdravou je po sklizni a skladování přítomen patogen. V takovéto partii je podprahové množství, které nelze detekovat. Vlivem optimálních klimatických podmínek, špatných podmínek při převozu a skladovacích podmínek se patogen rozmnoží na detekovatelnou mez [37]. V roce 2019 nebyl detekován žádný nález Cms [38].

I přes velké úsilí nedošlo k úplné eradikaci Cms. Většina států Evropské unie i nadále udává přítomnost tohoto patogenu. Aktuální hlavní snahou je zabránit horizontálnímu přenosu [37].

Ve Výzkumném ústavu bramborářském (VÚB) v Havlíčkově Brodě, kde se zabývají detekcí sadbových brambor od roku 1994, byla bakterie Cms nalezena v 6 vzorcích sadbových brambor v roce 2015. Detekce byla provedena IF testem. Nález potvrdilo nadřízené pracoviště ÚKZÚZ v Olomouci metodou PCR a následný biologický test [39].

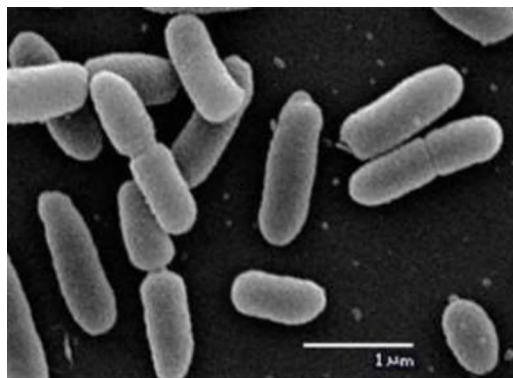
4 Bakteriální hnědá hniloba bramboru

Bakteriální hnědá hniloba bramboru patří také mezi karanténní choroby a je vyvolána bakterií *Ralstonia solanacearum* (Rs). Nejvíce rozšířená je především v tropických a subtropických částech světa, ale její výskyt není neobvyklý ani v našich podmínkách [1].

První zmínky o původci této choroby byly uvedeny v roce 1896, kdy E. F. Smith izoloval bakterii z rajčete, bramboru a lilku, pojmenoval ji *Bacillus solanacearum*. V roce 1914 byla tato bakterie zařazena do rodu *Pseudomonas* [40].

Tradičně se Rs dělí na pět ras podle jejich hostitele a na pět biovarů na základě jejich biochemických vlastností. Za bakteriální hnědou hnilobu bramboru je zodpovědná rasa 3 biovar 2. Rasa 3 označuje primární napadání bramboru. Biovar 2 znamená, že metabolizují disacharidy [41; 42].

Rs je aerobní, gramnegativní bakterie. Buňky mají tvar tyčinky o velikosti 0,5-1,5 μm (Obr. 13). Netvoří spory. Pohybuje se díky svému polárnímu bičíku. Při 28 °C tvoří 2-4 mm kolonie během 2-3 dnů. Je středně rychle rostoucí. Oproti Cms se rozmnožuje 3-4x rychleji [40; 43].



Obrázek 13: *Ralstonia solanacearum* v elektronovém mikroskopu (kmen UY031). Převzato z: [43]

Tvoří hladké, krémovité, perleťově lesklé, opaleskující, ploché a nepravidelné kolonie. Uvnitř kolonie utváří charakteristický růžový prstenec (Obr. 14). Postupným stárnutím kolonie mění barvu na hnědou, jelikož produkuje hnědý difúzní pigment [40; 43].



Obrázek 14: Kolonie *Ralstonia solanacearum* (kmen UY031). Převzato z: [43]

Pro bakterii je přirozeným hostitelem více než 200 druhů rostlin. Kromě bramboru (Obr. 15) infikuje také například rajče (*Solanum lycopersicum*), lilek (*Solanum melongena*), banán (*Musa spp.*), tabák (*Nicotiana tabacum*) a řadu okrasných a plevelných rostlin [42].



Obrázek 15: Příznaky bakteriální hnědé hniloby bramboru na nadzemní části bramboru. Převzato z: [35]

4.1 Příznaky choroby

Rs stejně jako Cms parazituje v cévních svazcích rostliny, příznaky obou chorob je snadné zaměnit. V nejteplejší části dne rostlina bramboru postupně vadne, nejprve lze změny pozorovat u vrcholu, kde jsou listy nejmladší. Okraje listů se krouží a svinují. Listy blednou. Ztrácí zelenou barvu, protože přichází o chlorofyl. Často úplně zhnědnou. Stonky jsou oslabené

a při jeho rozříznutí nebo rozřeznutí hlízy vytéká bělavý až hnědý krémový bakteriální sliz (Obr. 16). Vnitřek hlíz je šedočerný, kolem oček dochází k barevným změnám. Na řezu hlízy je patrné matné, sklovitě žluté až hnědé zbarvení prstence cévních svazků a okolní tkáně. V hostitelské tkáni je až 10^9 CFU/g patogenních buněk. Choroba může mít i latentní podobu [1; 18; 41; 44].



Obrázek 16: Vytékající bakteriální hmota při naze bakteriální hnědé hniloby bramboru. Převzato z: [45]

Bakterie *Rs* dokáže zůstat životaschopná ve vodě, půdě i plevelných rostlinách. Mnohdy k infekci dojde přes závlahovou vodu. Patogen vstupuje do rostliny či hlízy i přes mechanická poranění. Největší riziko představují rostliny a hlízy s latentní nákazou [18].

V půdě dokáže přežít několik měsíců až několik let, v závislosti na druhu půdy. Bakterii se daří v písčitéch, jílovitých a rašelinných půdách. Nikdy se však choroba nešíří v slínovitých půdách [40].

Důležité je dbát na výsadbu zdravých hlíz. Případné použití chemické ochrany není příliš účinné. Užití antibiotik (streptomycin, ampicilin, penicilin a tetracyklin) nejenže je v České republice zakázané, ale ani nevykazují silný účinek. Množství bakterií může snížit hnojení, jelikož pH nižší než 4 a vyšší než 8 je pro bakterii nepřijatelné. Důležitá je i včasná detekce patogenu [44; 40].

4.2 Výskyt *Ralstonia solanacearum* v České republice

V roce 2010 v odebraném vzorku povrchové vody určené k zavlažování v lokalitě povodí řeky Labe byla poprvé laboratorně prokázána přítomnost této bakterie na území České republiky. O rok později, v roce 2011, byl výskyt potvrzen i ve vzdálenější lokalitě. V roce 2012 byl poprvé potvrzen výskyt původce bakteriální hnědé hniloby bramboru v bramboru v České republice [1; 44].

V roce 2019 hlízy bramboru ani odpadní voda z firem zabývajících se úpravou brambor neobsahovaly bakterii Rs. Avšak v daném roce byl její výskyt prokázán ve 14 vzorcích říčních vod Labe, Dyje a Jevišovky a 15 vzorcích odebraných z části rostlin lilku potměchuti (*Solanum dulcamara*) rostoucí na pobřeží řek Labe, Moravy a Dušní Moravy [38].

Ve VÚB nikdy bakterie Rs nebyla detekována. Ta se vyskytuje pouze v odpadních vodách, jak zjistili pracovníci ÚKZÚZ [39].

5 Současná legislativa

Úkolem všech legislativních nařízení a doporučení je ochrana rostlin a rostlinných produktů. Je důležité zamezit šíření, popřípadě eradikovat nebezpečné organismy.

Zákon č. 369/2019 Sb. rozšiřuje a upravuje zákon z roku 2004 č. 326/2004 Sb., Zákon o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů. Ten zpracovává a upravuje práva a povinnosti fyzických a právnických osob s cílem zabránit šíření škodlivých organismů za účelem ochrany rostlin a rostlinných produktů. Dále upravuje podmínky pro ochranné přípravky rostlin, jejich používání, kontrolu a uvádění na trh. Zároveň ustanovuje působnost správních úřadů, jejich práva a povinnosti [46].

Ministerstvo zemědělství, ÚKZÚZ a orgány Celní správy České republiky patří mezi orgány státní správy v záležitostech rostlinolékařské péče. Ve stanoveném rozsahu se zapojují obecní úřady a obecní úřady obcí s rozšířenou působností [46].

Ministerstvo zemědělství vymezuje a kontroluje realizování povinností rostlinolékařské péče. Je odpovědný za ochranu proti zavlečení škodlivých organismů. Mimo jiné také vypracovává národní strategie a jejich soulad s ostatními státy [46].

Ve svých obvodech obecní úřady obcí s rozšířenou působností řeší přestupky spojené s šířením škodlivého organismu na půdách, které nejsou obdělávány nebo udržovány [46].

ÚKZÚZ kontroluje a zkoumá výskyt škodlivých organismů. Představuje veřejnosti, včetně ostatních států EU, současné informace o jejich výskytu a rizicích [46].

Celní úřad spolupracuje s ÚKZÚZ, provádí kontroly dovoзовého materiálu a má pravomoci podezřelé zboží zadržet [46].

Zákon č. 369/2019 Sb. je rozšířen o řadu vyhlášek. Vyhláška č. 5/2020 Sb., o ochranných opatřeních proti škodlivým organismům rostlin, upravuje, za jakých podmínek rostliny a rostlinné produkty převážet, jaké jsou požadavky na jejich dopravu a umístění, aby se předešlo případnému přenosu nákazy. Další důležitou vyhláškou je Vyhláška č. 331/2004 Sb., jež byla novelizována Vyhláškou č. 4/2018 Sb. Zaměřuje se na ochranu proti původcům karanténních bakteriálních chorob. Vymezuje, jaká část bramboru se musí analyzovat, postup analýzy a zároveň jaké kroky jsou potřeba vykonat v případě výskytu bakterií Rs a Cms. Také klade důraz na sanitaci a dezinfekci povrchů, který s infikovaným materiálem přišel do styku, a definuje správnost postupu při likvidaci odpadu [46].

Právnícká osoba nebo podnikající fyzická osoba za zavlékání, šíření, dovoz, přemístění, držení, množení, zamlčení škodlivého organismu, které je v rozporu s nařízením (EU) 2016/2031, se dopouští přestupku, za který lze uložit pokutu ve výši několika milionů Kč. Fyzické osobě za tentýž přestupek může být uložena pokuta v řádech několika desetitisíců Kč [46].

Právních předpisů EU zabývajících se problematikou škodlivých organismů je oproti české legislativě výrazně více. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2016/2031 specifikuje problematiku ochrany rostlin před škodlivými organismy. Určuje pravidla úředních kontrol od pověřených orgánů. Definiuje pojem karanténní škodlivé organismy pro EU. Hlavním cílem je ochrana před těmito organismy. Členské státy, podniky i veřejnost má ohlašovací povinnost a v případě výskytu musí přijmout vhodná opatření definovaná legislativou [47].

Nařízení Komise v přenesené pravomoci (EU) 2018/631 vymezuje práva, povinnosti a pracovní postupy referenčních laboratoří zaměřující se na škodlivé organismy rostlin. O postupech a opatřeních při provádění úředních kontrol pojednává prováděcí Nařízení Komise (EU) 2019/66 [47].

Pokud se některé rostliny, rostlinné produkty nebo předměty dostanou do karantény či izolace, vztahuje se na ně prováděcí Nařízení Komise (EU) 2019/2148. To stanovuje, kdy a za jakých podmínek může materiál opustit karanténu či izolaci [47].

6 Metody detekce původců karanténních chorob bramboru

Průkaz Cms umožňuje odhalit přítomnost patogenu i u latentních chorob. Přítomnost patogenu je prokázána, pokud jsou pozitivní výsledky minimálně dvou screeningových testů, které jsou založené na odlišném principu. Jsou využívány imunochemické metody, kam je řazena enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA) a imunofluorescenční test (IF), molekulárně genetické metody, konkrétně polymerázová řetězová reakce (PCR), kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Real-Time PCR), DNA microarray. Zároveň musí proběhnout izolace a identifikace čisté kultury kultivací [48; 37]. Další alternativou je metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) [49].

Laboratorní kontrole podléhají vzorky veškerého rozmnožovacího materiálu brambor vyrobeného v ČR, tuzemské sadbové brambory i dovozové ze států, kde se tyto karanténní organismy vyskytují, nebo které jsou podezřelé ze zamoření [50].

V ČR se detekcí těchto patogenů zabývají dvě pracoviště. Výzkumný ústav bramborářský (VÚB) se sídlem v Havlíčkově Brodě kontroluje výskyt patogenu v sadbových hlízách bramboru akreditovanou metodou IF. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) v Havlíčkově Brodě má akreditace pro metody PCR, IF a FISH, jejich úkolem je detekce patogenu v konzumních hlízách bramboru [39].

Cena detekce bakterií Cms a Rs stojí ve VÚB v Havlíčkově Brodě 496 Kč. V případě provedení biologického testu s izolací patogenu se cena zvýší u bakterie Cms na 3627 Kč a u bakterie Rs na 3219 Kč [51].

6.1 Odběr vzorku

Odběr nadzemní části rostliny k analýze se provádí v období mezi 3-4 týdnem od vysazení po dobu prvních náznaků uvadání listů, v závislosti na odrůdě. Rané odrůdy lze už po 45 dnech odebírat, pozdní až po 80 dnech [37].

Primárně se k průkazu bakterií využívají cévní svazky z bazální části hlavního stonku trsu. Největší koncentrace bakterie Cms v nadzemní části je v období květu. V tomto období lze odběr provést z kterékoli části stonku. Minimální hmotnost vzorku je 1 g cévních svazků. Vzorky je vhodné odebírat dva s rozestupem minimálně 21 dnů. První odběr se provádí v době, než rostlina vytvoří květ, a druhý po odkvětu [37].

Provádí se odběr segmentů nebo celých stonků. Vodou omyté stonky se stříkají 70% ethanolem pro odstranění povrchového pletiva. Odebrané vzorky se ukládají do chladu (4 °C) a do jednoho dne se zpracovávají [37].

Hlíza může být odebírána v jakémkoli stádiu od minimální velikosti 0,5 cm, kdy se hovoří o tzv. minihlízách. Hlízy není vhodné odebírat za deště nebo pokud je zemina mokrá. Po odebrání je nezbytné hlízy mechanicky očistit, zabrání se tak znehodnocení hlíz z důvodu nákazy, jejímž zdrojem by mohly být zbytky zeminy či části rostlin. Hlízy se sbírají do prodyšných pytlů z juty, v případě minihlízek do papírových sáčků. V těchto materiálech dochází i k inkubaci. Pytle musí být řádně označené návěškem a dovnitř pytle se umísťuje štítek se shodnými údaji jako na návěsku. Teplota při převozu do skladu by se měla pohybovat v rozmezí 10-22 °C. Následuje inkubační doba, při které se má zvýšit pravděpodobnost detekce patogenu. Patogen se v hlízách s podprahovým množstvím za 4-8 týdnů při teplotě 20-22 °C v temném a suchém skladu pomnoží na detekovatelné množství [50; 37].

Po inkubaci se hlízy bramboru opět očistí vodou a 70% ethanolem. Takto vydezinfikované hlízy se nechají osušit. Pupková část se skalpelem odřízne a vyřízne se cévní svazek s minimálním množstvím dužiny. Jeden vzorek by měl vážit 1 g, což je hmotnost cévních svazků získaných z 8-15 hlíz (20-40 minihlízek). Standardně se testuje 220 hlíz. U nových klonů a odrůd se testuje minimálně 100 hlíz (400 minihlízek) [50; 37].

U hlíz s vysokým obsahem škrobu je důležité vykrojit cévní svazek s co nejméně dužiny. U všech determinačních metod škrob komplikuje průkaz patogenu [37].

6.2 Zpracování vzorku

V třetí misce se segmenty rozdrť a provádí se výluh ve fosfátovém puftu po dobu 20-24 hodin při pokojové teplotě na třepačce. Následně se supernatant přelije do tří mikrozkušavek. Jedna mikrozkušavka se zmrazí na teplotu -30 °C a méně, kde zůstane uložená do doby, dokud všechny prováděné testy nevyloučí přítomnost patogenu. Zbylé dvě zkumavky se opět centrifugují a dále upravují podle postupů u jednotlivých metod [37].

200 vykrojených cévnatých svazků se extrahuje nejčastěji do fosfátového pufru. Počítá se s 20 hlízami navíc, jelikož se některé hlízy nemohou využít z důvodu mechanického poškození nebo napadení jiným činitelem. Další fází zpracování je proces inkubace po dobu jednoho dne při pokojové teplotě za stálého třepání. Extrakt se přelije do mikrozkušavek. Jedna se opět zamrazí na -30 °C nebo méně a vzorek se uchovává dokud není ukončen lilkový test. Zbylé mikrozkušavky se po centrifugaci upravují dle potřeb jednotlivých metod [37].

6.3 Enzymová imunoanalýza na pevné fázi

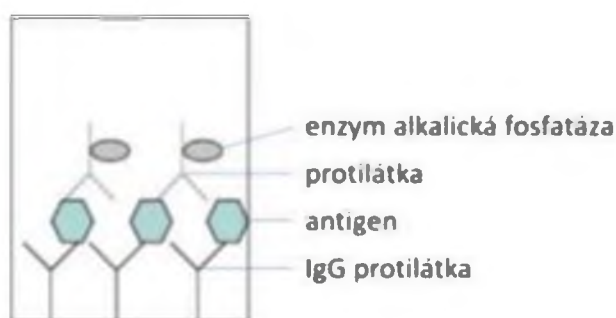
Enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA) je zkratkou z anglického originálu enzyme-linked immunosorbent assay. Patří mezi imunochemické metody, které využívají vysoce specifické interakce protilátka-antigen. Tato imunochemická metoda je nejpoužívanější pro detekci Rs ve vodě, půdě i v částech rostlin. Její citlivost závisí na afinitě protilátky a druhu analýzy. Tato metoda je díky jednoduchosti a možnosti automatizace využívána pro systematický screening [37; 52; 53].

Tuto metodu je možné použít k měření látek ve velmi nízkých koncentracích. Reakce antigenu s protilátkami je vysoce specifická. Známe-li antigen, který je specifický pro určitou protilátku, a máme jej k dispozici, lze protilátku identifikovat a určit její množství. Zároveň to platí i opačně, na základě známé protilátky lze určit její antigen a množství antigenu [52].

Limit detekce se pohybuje v rozmezí 10^5 - 10^6 CFU/ml. Proto je vhodné jej používat spíše k potvrzení nálezu v případě viditelných projevů na rostlině [54].

ELISA se obvykle provádí v mikrotitračních destičkách s 96 jamkami nebo v prouzcích s 8 nebo 12 jamkami. Mezi enzymy používané v ELISA metodě patří β -galaktosidáza, peroxidáza, glukózooxidáza nebo alkalická fosfatáza [52; 55].

Při průkazu Cms se nejčastěji používá sendvičová metoda, tzv. DAS ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA; dvojitý protilátkový sendvič). Specifické protilátky (IgG) proti stanovovanému původci jsou navázány na jamky mikrotitračních destiček (Obr. 17). Na protilátky se váže antigen ze vzorků a vzniká komplex protilátka-antigen. Následně se na tento komplex naváží protilátky značené enzymem, např. alkalickou fosfatázou (AP-koagulát). V posledním kroku alkalická fosfatáza (AP) reaguje se substrátem (4-nitrofenylfosfát). Při této reakci vzniká produkt žluté barvy 4-nitrofenol, který je detegován spektrofotometricky [48].



Obrázek 17: Schéma mikrotitrační jamky při metodě DAS ELISA. Upraveno z: [56]

Przewodowski a Przewodowska (2017) ve svém výzkumu srovnávali mimo jiné použití monoklonálních a polyklonálních látek u metody ELISA. Popsali například použití monoklonální látky 9A1 u imunofluorescenčních sérologických testů, která je namířena proti antigenu z bakteriální buněčné stěny. Došli k závěru, že použití této protilátky není u metody ELISA vhodné, avšak použití monoklonálních protilátek namířené proti polysacharidovým složkám v hleu, který Cms produkuje, jsou u ELISA velmi citlivé. Při použití monoklonálních látek byla citlivost stanovena 10^5 - $5 \cdot 10^6$ bakteriálních buněk v ml suspenze. Polyklonální látky k detekci Cms nejsou vhodné z důvodu nízké citlivosti a specifčnosti. Zároveň většina dostupných monoklonálních i polyklonálních protilátek vykazovalo řadu nespecifických reakcí, což vedlo k falešně nespecifickým reakcím [57].

Nejvyšší citlivost a specifčnost byly získány kombinací primární kuřecí polyklonální protilátky a myši monoklonální protilátky 1H3. Použití této kombinace polyklonálních a monoklonálních protilátek vedla k 90-95% úspěšnosti detekce Cms, citlivost klesala při použití méně mukoidních kmenů [57].

Výzkum Behiryho a kol. (2018) měl za cíl prozkoumat virulentní reakce Rs proti některým hostitelům, produkci polyklonálních látek proti antigenu Rs vytvořený v séru novozélandských bílých králíků a antigenní aktivity Rs ve svém antiséru. Použitou metodou byla nepřímá ELISA. Jako imunoglobulin byl použit kozí anti-kraličí (goat anti-rabbit gamma globulin) označen alkalickou fosfatázou. Následně se měřila absorbance při 405 nm [58].

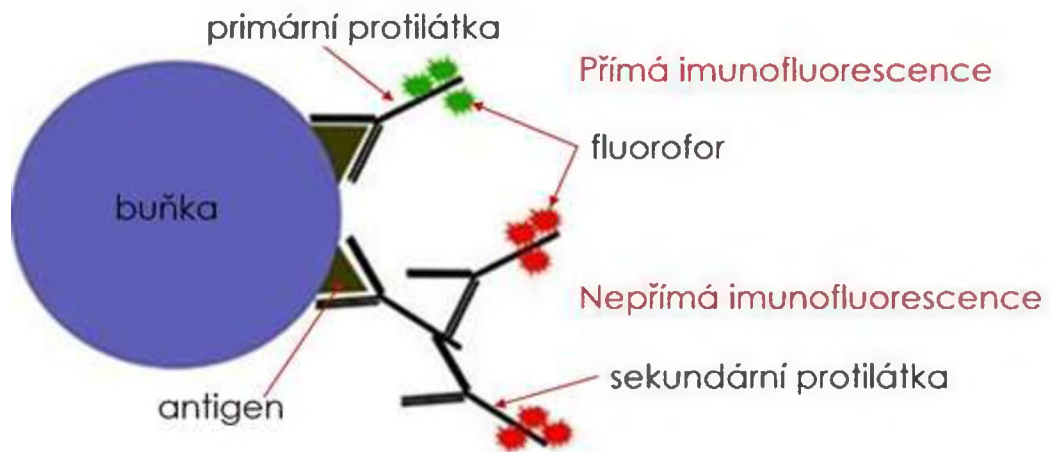
U nepřímé ELISA metody se na antigen váže primární protilátka. Na tu se následně váže značená sekundární protilátka, která se nachází v médiu. Jejím úkolem je zviditelnit komplex antigen-protilátka. Závěrem se přidává substrát enzymu, aby se médium obarvilo a dala se změřit koncentrace [52]. Výsledky výzkumu Behiryho a kol. (2018) ukázaly pozitivní reakce v rozmezí koncentrací od 10^8 do 10^6 CFU/ml, čímž se potvrdily výsledky vědeckých studií provedených Machmudem a kol. v letech 1999, 2004 a 2008, že použití monoklonální a polyklonální protilátky lze při větších koncentracích, ale u latentních infekcí, kdy je koncentrace pod 10^6 CFU/ml, jsou vyžadovány citlivější a spolehlivější metody. Nejnižší detekční úroveň techniky ELISA byla 10^3 CFU/ml [58].

6.4 Imunofluorescence

Jedná se o levnou a přiměřeně specifickou metodu. K úspěšnému provedení této metody jsou třeba vysoce kvalitní antiséra a dobře vyškolený personál pro zkoumání sklíček s obarvenými

bakteriemi. Tento test je vhodné používat jako první screeningový [59]. Vyznačuje se přesností detekce 10^3 CFU/ml. Její citlivost je tedy vyšší než u metody ELISA [54].

Značené protilátky se váží na sledovaný antigen. Následuje detekci pomocí fluorescenčních technik. Váže-li se daná protilátka značená fluoroforem přímo na antigen, hovoří se o přímé imunofluorescenci (Obr. 18). Při nepřímé imunofluorescenci se na primární protilátku navázanou na požadovaný antigen specificky váže sekundární protilátka značená fluoroforem. Výhodou této metody je, že sekundární protilátka může být použita pro různé primární protilátky. Na jednu primární protilátku se může navázat několik sekundárních protilátek. Také se v jednom vzorku může najednou vizualizovat několik bílkovin, kdy se využívá vazby sekundárních protilátek značených různými fluorofory [60; 61].



Obrázek 18: Přímá a nepřímá imunofluorescence. Upraveno z: [61]

Fluorofory jsou látky, které dokáží své elektrony po absorpci energie z fotonu o určité vlnové délce excitovat do vyššího nestabilního energetického stavu. Při návratu do svého základního stavu emitují světlo s delší vlnovou délkou. Mezi nejčastěji používané fluorofory patří fluorescein isothiokyanát (FITC) (zelená fluorescence), tetramethylrhodamin isothiokyanát (TRITC) (červená fluorescence) a fykoerythrin (červená fluorescence). Záření je následně detegováno fluorescenčním mikroskopem [61], případně světelným mikroskopem, který musí být vybaven pro epifluorescenční světlo s vhodným výstupním a bariérovým filtrem pro dané fluorescenční barvivo [62].

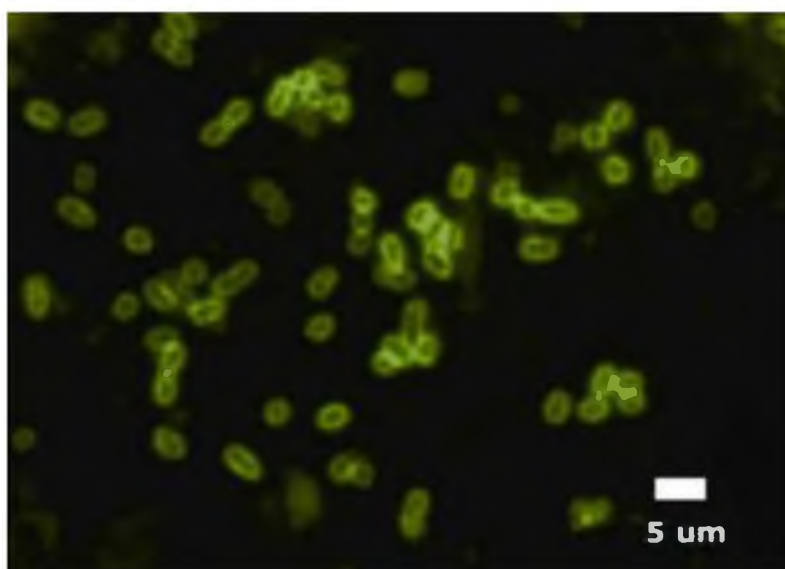
Citlivost metody nepřímé imunofluorescence je 5-10x vyšší přímá metoda [61].

Vreeburg a kol. (2016) prováděli testy Cms a Rs podle směrnic Rady EU 2006/56/EC a 2006/63/EC nepřímou imunofluorescencí, kdy použili primární kozí polyklonální protilátky. Jako sekundární protilátky použili králičí anti-kozí protilátky značené fluorescein

isothiocyanátem ředěné 1:100. Pro porovnání byly všechny vzorky ověřeny podle směrnic Rady EU s použitím izolace patogenu, ověření pomocí PCR a testu patogenity. 100% úspěšnost detekce byla u Cms při koncentraci 10^6 CFU/ml a u Rs při koncentraci 10^5 CFU/ml [59].

Postup popsáný Jansenem a Kokoskovou (2009) je navržen pro Rs, ale zároveň jej lze aplikovat i na detekci Cms. Při nepřímé IF jsou bakterie nejdříve ošetřeny specifickým antisérem proti cílové bakterii. Antisérum je produkováno nejčastěji králíky, kozami nebo v případě monoklonálních protilátek u myši. Po inkubaci a promytí se označí druhým antisérem označeným fluoroforem (fluorescein isothiocyanát) produkováným jiným zvířetem než v případě prvního antiséra. Pouze navázané protilátky fluoreskují, ostatní nenavázané se odstraní promytím. Připravená sklíčka se hodnotí v mikroskopu pod olejovou nebo vodní imerzí při zvětšení 500x až 1000x. Pozorují se okénka ve dvou navzájem kolmých průměrech a při obvodu. Pokud vzorek má málo, nebo dokonce žádné buňky, kontroluje se nejméně 40 polí. Nejprve se hodnotí pozitivní kontroly. Buňky, které nejsou zbarvené celé nebo nedostatečně fluoreskují, se do testu nezapočítávají. Aby se vzorek považoval za pozitivní, musí být jeho intenzita fluorescence srovnatelná nebo intenzivnější v porovnání s pozitivní kontrolou za stejného ředění protilátek [62].

Na obr. 19 je ukázka morfologie buněk Rs infikované tkáně bramboru prokázána nepřímou imunofluorescencí s využitím polyklonálních protilátek značených fluorescein isothiocyanátem v ředění 1:3200 [62].



Obrázek 19: Buňky *Ralstonia solanacearum* při imunofluorescenci (olejová imerze, 100x objektiv). Převzato z: [62]

Vzorek je považován za kontaminovaný, pokud obsahuje $5 \cdot 10^3$ typických buněk v 1 ml neředěné resuspendované pelety. Peleta se vytváří při úpravě vzorku po odstředění a následném odsátí supernatantu [62; 63].

6.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) se při průkazu bakteriálních chorob bramboru používá nejčastěji k potvrzení pozitivních nálezů zjištěných metodami ELISA nebo IF [37]. Jedná se o citlivý test, který umožňuje exponenciálně namnožit (amplifikovat) úsek zdrojové deoxyribonukleové kyseliny (DNA) i v případě, že je k dispozici pouze jedna molekula DNA. Mez detekce je 10^3 - 10^4 CFU/ml. Nevýhodou je náchylnost i ke stopovým kontaminacím nežádoucí DNA [64; 54].

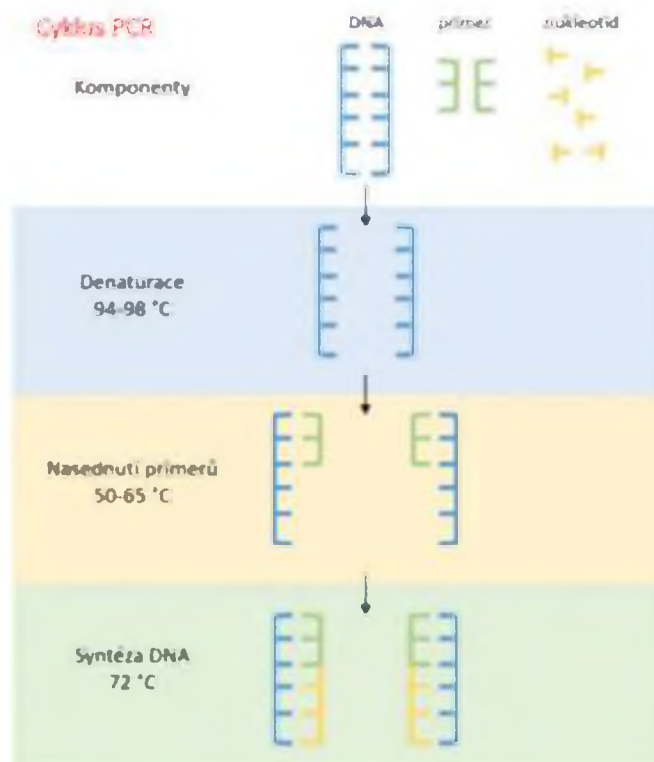
K detekci karanténních bakterií se používají metody klasické PCR a Real-Time PCR [48].

6.5.1 Klasická polymerázové řetězové reakce

Každý test vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů a DNA-polymerázy, které se smíchají a umístí do termocykleru. V prvním kroku dochází k procesu denaturace při 95°C , kdy dojde k rozrušení vodíkových můstků a oddělení vláken DNA od sebe (Obr. 20) [64; 65].

Následně dochází k hybridizaci s primery. Primery, krátké úseky DNA, mají sekvenci nukleotidů odpovídající segmentu DNA, který se má kopírovat. Na základě komplementárního párování bazí se jeden primer připojí k 3' konci jednoho vlákna templátové DNA a druhý primer také k 3' konci druhého vlákna původní DNA. Primer umožňuje navázání DNA-polymerázy. Enzym DNA-polymeráza připojuje jednotlivé nukleotidy komplementárně k templátové DNA ve směru od 5' konce k 3' konci, probíhá poslední proces PCR metody, a to syntéza DNA. Vznikají amplikony, produkty amplifikace. DNA-polymeráza užívaná při PCR nejčastěji pochází z bakterie *Thermus aquaticus*. Tato bakterie odolává vysokým teplotám (teplotám varu vody) [64; 65; 66].

Tento postup se opakuje 20-40 krát. Těmito cykly vznikají miliony kopií původní DNA [66].

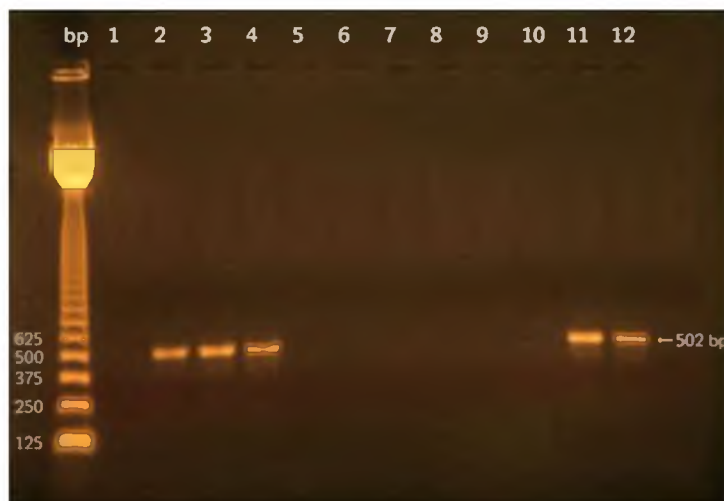


Obrázek 20: Cyklus polymerázové řetězové reakce. Upraveno z: [66]

K vizualizaci produktů PCR se používají především dvě metody. První spočívá v obarvení amplikonů chemickým barvivem, např. ethidium bromidem. Ve druhém způsobu se značí primery nebo nukleotidy pomocí fluorescenčních barviv (fluorofory) již před amplifikací. Analýza produktů je nejčastěji prováděna elektroforézou na agarózovém gelu, která potvrdí přítomnost a velikost produktů PCR [64].

Validovaný protokol, jehož standardizovaný postup se používá dodnes, pro detekci Cms byl zaveden Pastrikem v roce 2000. Ta využívá primery: PSA-1: 5'-CTC CTT GTG GGG TGG GAA AA-3'; PSA-R: 5'-TAC TGA GAT GTT TCA CTT CCC C-3'; NS-7-F: 5'-GAG GCA ATA ACA GGT CTG TGA TGC-3' a NS-8-R: 5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3'. Sada primerů PSA předpokládá produkt o velikosti 502 bp, primery NS, které jsou interní PCR kontrola 18S rRNA, předpokládají velikost 377 bp [48; 63].

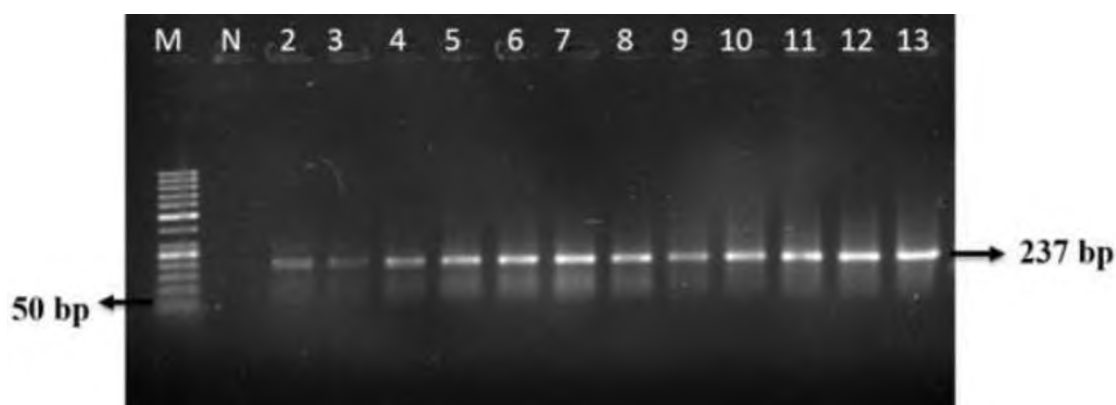
U pozitivních vzorků Cms je pozorován fragment o délce 502 bp. Fragmenty DNA se vizualizují barvivem ethidium bromid. Na snímku elektroforézy na obrázku č. 21 lze vidět pozitivní nálezy ve vzorcích v dráhách 2, 3, 4, 11 a 12 [48; 63].



Obrázek 21: Snímek elektroforézy s pozitivním nálezem *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Převzato z: [48]

Při použití postupu dle Pastrika a Maisse (2000), který se stal taktéž validovanou metodou pro detekci Rs, se používají dva oligonukleotidové primery, přímý primer PS-1: 5'-AGT CGA ACG GCA GCG GGG G-3' a reverzní primer PS-2: 5'-GGG GAT TTC ACA TCG GTC TTG CA-3'. Při použití těchto primerů je specifický fragment pro Rs o velikosti 553 bp [67].

Na obrázku č. 22 jsou viditelné pozitivní vzorky obsahující Rs na polyakrylamidovém gelu při použití primerů RS-Egl-F: 5'-GAC ACC ACG ACC CTG AAG AC-3' a RS-Egl-R: 5'-AAG GTA TGC CAG GTG GCG CA-3'. Dráhy 2 až 7 označují postupné ředění v rozmezí 10^1 až 10^6 CFU/ml. Dráha 2 má koncentraci $1 \cdot 10^1$ CFU/ml, dráha 3 má koncentraci $1 \cdot 10^2$ CFU/ml atd., až k dráze 7 s koncentrací 10^6 CFU/ml. Dráhy 8 až 13 obsahují pozitivní vzorky. Písmenem M je označen standardní molekulový marker o velikosti 50 bp. Dráha N je negativní vzorek [68].



Obrázek 22: Snímek elektroforézy z detekce *Ralstonia solanacearum* (popis obrázku v textu). Převzato z: [68]

6.5.2 Real-Time polymerázová řetězová reakce

Metoda Real-Time PCR (Kvalitativní PCR v reálném čase, qPCR) oproti klasické PCR umožňuje kvantifikaci, tj. kolik specifické DNA nebo genu je přítomno ve vzorku. Jelikož se neanalyzuje produkt po skončení reakce, zkracuje se doba analýzy a je nižší riziko kontaminace. Oproti klasické PCR je nákladnější na činidla a vybavení. qPCR umožňuje detekci i kvantifikaci produktu PCR v reálném čase, zatímco je syntetizován. K detekci produktů dochází po každém cyklu měřením fluorescenčního záření. Buď se užívají fluorescenční barviva (např. SYBR Green I), která nespecificky vmezeří mezi DNA vzniklé dvoušroubovice, nebo sekvenčně specifické DNA sondy (např. Taqman®-Sonden, LightCycler®-Sonden, Molecular Beacons) značené fluorescenčním barvivem, které se váže na přesně definovanou polohu původní DNA nebo do nově vzniklých DNA. Měří se intenzita emitovaného záření. Vzhledem k vysoké specifitě sond je spolehlivost detekce druhého způsobu výrazně vyšší. Sonda se však musí nejdříve spárovat (proces hybridizace) s komplementárním cílem DNA [14; 64; 69].

Přestože konvenční metody PCR jsou vysoce specifické a citlivé, je nezbytné laboratorní zázemí, a proto je v poslední době snaha vyvinout metodu pro molekulární diagnostiku v terénu. Nadějně mohou být miniaturizované stacionární mikročipové systémy, které umožňují provedení PCR v mikroreaktorech s objemem několika pikolitrů. Snižuje se množství použitých činidel, doba analýzy, lépe se reguluje teplota a není třeba kvalifikovaný personál pro hodnocení výsledků [14].

Takovým příkladem může být stacionární mikročip AriaDNA®. Jedná se o jednorázový mikročip umožňující simultánní multiplexní analýzu PCR v reálném čase. Pro každý druh patogenu, včetně Cms a Rs, byly navrženy primery a fluorescenční sondy pomocí software Oligo Primer Analysis v. 6.0. Detekční limit je uváděn 1 ng/ml. Ve srovnání s klasickou PCR se spotřeba činidel snížila 20x, doba ampifikace trvala pouze 33 minut pro 45 cyklů [14].

Uwamahoro a kol. (2020) se zaměřili na detekci Rs ve Rwandě. PCR prováděli pomocí reverzního primeru a čtyř primerů specifických pro každý fylotyp Rs. Počáteční denaturace probíhala při 95 °C po dobu 5 minut, následovalo 30 cyklů při 94 °C po dobu 15 sekund, nasednutí primerů po dobu 30 sekund při 59 °C a proces prodlužování při 72 °C 13 sekund. Konečné prodlužování trvalo 10 minut při 72 °C. Následně byly produkty separovány horizontální gelovou elektroforézou. Touto studií zjistili, že ve Rwandě se nejvíce vyskytuje fylotyp II, což odpovídá označení biovar 2 rasa 3. V této studii došlo k infekci všech rostlin

z rodu *Solanaceae* (rajče, lilek, pepř, paprika) vyjma tabáku, které byly pěstovány v blízkosti bramboru. Prokázali, že ostatní rostliny, např. okurku, fazoli, podzemnici olejnou, kukuřici, pšenici, lze pěstovat v blízkosti bramboru, jelikož tyto rostliny nejsou napadány bakterií Rs [42].

Sadunishvili a kol. (2020) se zaměřili na výskyt Cms na gruzínských polích, skladech, trzích a dovozových hlíz bramboru. Oficiální data o výskytu této bakterie k roku 2020 se v Gruzii nedají dohledat, jelikož nebyly v Gruzii ani okolních státech provedeny žádné pravidelné výzkumy o jejím výskytu, což bylo podnětem tohoto výzkumu. Detekce byla provedena na 124 vzorcích pomocí metody PCR. Použité primery byly PSA-1 a PSA-R s předpokládaným produktem 502 bp. Pozitivní kontroly obsahovaly referenční kmen, negativní kontroly ultračistou vodu. Pro amplifikaci vnitřních kontrol byly použity specifické primery NS-7-F: 5'-GAG GCA ATA ACA GGT ATG TGA TGC -3' a NS-8-R: 5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3'. Ty amplifikují fragment 377 bp. Analýza získaných fragmentů byla provedena horizontální elektroforézou s barvením ethidium bromidem. Dále se výzkum zabýval genotypizací. Pozitivních nálezů bylo 10 u vzorků, které měly projevy choroby bakteriální kroužkovitosti bramboru, a jeden vzorek z asymptomatické rostliny. Žádný z testů neprokázal amplifikaci fragmentu 377 bp u vnitřních kontrol. Stupeň detekce byl 10^3 CFU/ml [70].

6.6 Fluorescenční *in situ* hybridizace

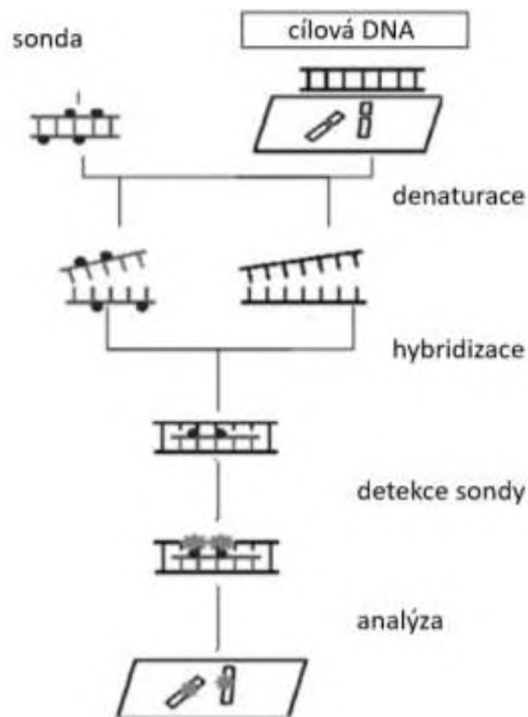
Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je další technika používající se k detekci bakterií Rs a Cms. Využívá mikroskopie v kombinaci s hybridizací DNA sond a cílového genu ze vzorků. *In situ* v názvu metody znamená, že identifikace polohy sekvence probíhá v přirozených polohách v chromozomu. DNA sonda se hybridizuje do specifických oblastí bakteriálních ribozomů. Metoda FISH rozpoznává jedinečnou sekvenci ribozomální RNA cílových organismů. Vysoká afinita a specificita DNA sond poskytuje vysokou citlivost na úrovni jednotlivých buněk u FISH, protože sonda se váže na každý z ribozomů ve vzorku. Avšak citlivost této metody je nižší než u technik PCR. Praktická mez detekce je 10^3 CFU/ml. Přesnost a spolehlivost je závislá na specifitě nukleotidových sond. Úskalím této metody je, že materiály vykazující autofluorescenci poskytují falešně pozitivní výsledky. Falešně negativní výsledky se mohou objevit, dojde-li k nedostatečné penetraci, změny vyššího řádu struktury cíle nebo sondy, např. vznik komplexu ribosomální ribonukleová kyselina-bílkovina (rRNA-bílkovina), tvorba smyčky, či nízkému obsahu rRNA [71; 54; 72; 73]. Mrtvé nebo neaktivní buňky negativně ovlivňují detekční limit, protože takové buňky dávají malý nebo žádný vizuální fluorescenční signál [49].

Fluorescenčně značená nukleotidová sonda a k ní komplementární sekvence DNA/RNA v cílové buňce jsou hlavní prvky FISH metody. Nukleotidovou sondou může být DNA, RNA nebo jejich napodobeniny – např. PNA (peptidová nukleová kyselina). Sondy se vyrábí komerčně nebo laboratorně, uchovávají se při -20 °C až několik měsíců. Při výběru sondy je důležité se zaměřit na specifickou, citlivost a snadný průnik do cíle. Sondy se značí přímo nebo nepřímo. Při přímém značení se enzymaticky nebo chemicky naváže fluorofor. U nepřímé metody jsou sondy značené modifikovanými nukleotidy obsahující haptenu. Nejvíce používanými cílovými nukleotidy pro hybridizaci *in situ* jsou 16S nebo 23S rRNA, protože jsou přítomny v ribosomech všech živých buněk v poměrně velkém množství (více než 1000 kopií), čímž umožňují vazbu velkého počtu značených molekul sondy [73; 74; 75].

Princip metody zahrnuje 4 základní kroky – fixace a permeabilizace vzorků, hybridizace sondy s cílovým nukleotidem, promytí, vizualizace a stanovení výsledku (Obr. 23). Zkoumané buňky jsou fixovány na čisté sklíčko potažené želatinou, polylysinem nebo glutaraldehydem. Tyto látky zamezují ztrátám tkáně a maximalizují regeneraci oligonukleotidů. Pro gramnegativní bakterie se doporučuje k fixaci použít formaldehyd nebo paraformaldehyd. Fixace gram pozitivních bakterií se provádí teplem, ethanolem nebo formalinem. Při použití čerstvých vzorků lze vzorek nefixovat. Detekce nezafixovaného preparátu může být i o něco přesnější, jelikož nedochází k lýze buněk a nevzniká zesílení mezi fixačními činidly a nukleotidy [73].

Cílové oligonukleotidy jsou obklopeny bílkoviny, tuky a jinými látkami, které znesnadňují přístup sond značených fluorofory. K porušení lipidové vrstvy se používají detergenty a bílkoviny částečně hydrolyzují po ošetření kyselinou chlorovodíkovou [73].

Nejprve dochází k denaturaci sondy i cílové sekvence. Aby se snížil bod tání, přidává se formamid. Při hybridizaci se značené sondy vážou k cílové nukleotidové sekvenci a vzniká hybrid sonda-cíl. Následuje vizualizace fluorescenčním mikroskopem nebo průtokovou cytometrií [73].



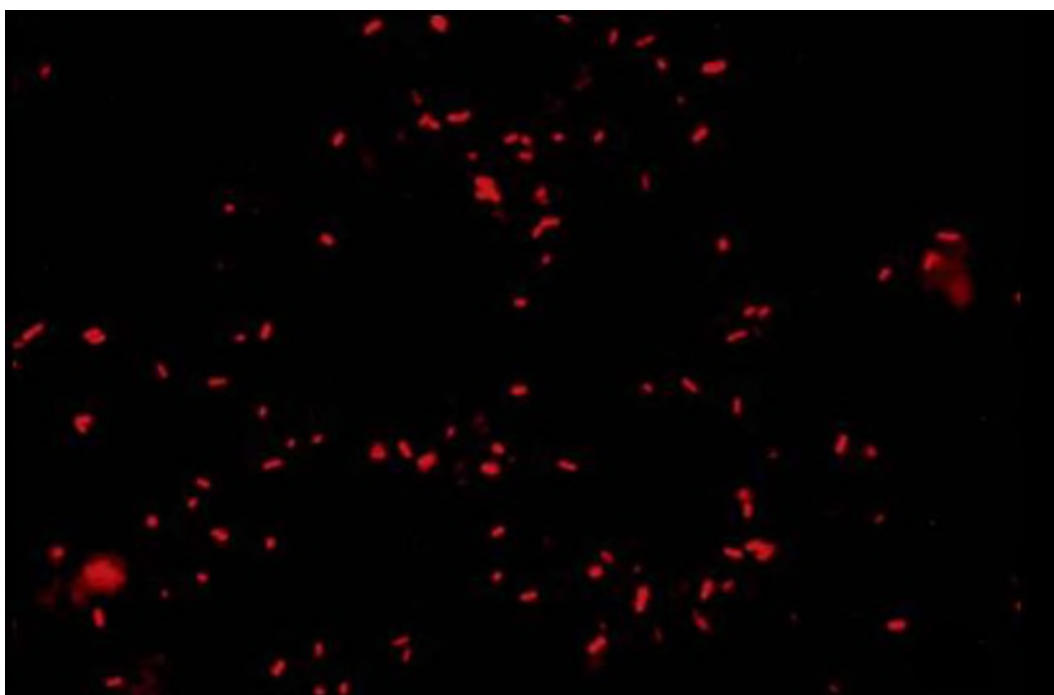
Obrázek 23: Základní kroky metody FISH. Upraveno z: [74]

Postupy imunofluorescence a *in situ* hybridizace jsou dvě odlišné citlivé metody. V předchozích studiích byl gen 16S rRNA sekvenován u pěti poddruhů *Clavibacter michiganensis* a byl porovnáván s příbuznými bakteriemi. Ve studii vypracované Li a kol. (1997) vybrali oligonukleotidovou sondu z 16S rRNA, která byla fluorescenčně značená. Po ní následovalo imunofluorescenční barvení monoklonální protilátkou. V této studii se jedná o první spojení imunofluorescence s *in situ* hybridizací. Specifická sonda pro detekci *Cms* dostala název P1015: 5'-ACC TTG GGG GGC GCA CAT C-3'. Pro kontrolu byla použita univerzální sonda EUB338: 5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'. Oligonukleotidové sondy byly označeny tetramethylrhodamin isothiokyanátem. Po hybridizaci *in situ* následovalo přidání monoklonální protilátky 9A1 a koží anti-myši fluoresceinového konjugátu. Připravené vzorky se pozorovaly s 1000x zvětšením při excitaci zeleného a modrého světla. Použitím obou technik zároveň se zvyšuje jistota diagnózy [75].

Mnoho článků se odkazuje na zdroj napsaný Wullingsem a kol. (1998). V tomto roce byly již geny kódující 23S rRNA amplifikovány, sekvenovány a analyzovány. Proto se pozornost přesunula na sekvenční seřazení 16S rRNA, avšak PCR detekce *Rs* se sadou primerů zaměřující se na 16S rRNA vykazovala zkřížené reakce a po dalších výzkumech se od této možnosti upustilo. V této studii byly poprvé navrženy dvě specifické sondy pro *Rs* a blízké příbuzné kmeny. Sondy dostaly označení RSOLA a RSOLB. Každý vzorek byl hybridizován sondou RSOLA nebo RSOLB a zároveň sondou EUB338. Byl použit prasečí anti-králičí FITC konjugát

zředěný 1:100. Sonda RSOLB byla úspěšně použita pro detekci FISH s čistými kulturami i vzorky bramborové tkáně. Sonda RSOLA vytvářela více chyb, jelikož dávala menší signál s cílovými buňkami. Při použití obou sond zároveň se hybridizační signál nezlepšil. V experimentu, kde byla detekce FISH kombinována s následnou detekcí nepřímou imunofluorescencí, bylo přibližně 60 % buněk reagujících s protilátkou detekováno metodou FISH se sondou RSOLB. Pouze na 12 pozicích genové sekvence byla 23S rDNA sekvence identická pro všechny kmeny Rs a odlišná od 23S rDNA sekvence *Ralstonia pickettii*, což dalo možnost vzniku specifických sond RSOLA a RSOLB pro detekci Rs [49].

Na obrázku č. 24 jsou vidět bakterie Rs v preparátu pod epifluorescenčním mikroskopem obarvené excitační barvou Cy3.



Obrázek 24: FISH metoda u buněk *Ralstonia solanacearum* prováděné sondou RSOLB. Převzato z: [49]

6.7 Test patogenity

Test patogenity neboli lilkový test je biologický test na rostlině lilku vejcoplodého (*Solanum melongena* L.). Jestliže některá z metod odhalí pozitivní nález, je nutné jej potvrdit tímto testem a následně izolovat patogen [76]. Lilek vejcoplodý je citlivá rostlina využívající se k biologickým testům k průkazu patogenu. Rostlina se inokuluje virulentním kmenem s obsahem buněk minimálně 10^3 buněk/ml. Rostliny se inokulují v raném stádiu, nejčastěji ve fázi druhého pravého listu. Jestliže by infekce byla v pozdějším stádiu růstu rostliny, vnější příznaky choroby by se nemusely projevit. Zasázené rostliny se nepřihnojují, aby stonky rostlin nemohutněly a projevy patogenů v cévních svazcích se projeví rychleji [5].

Obrázek č. 25 ukazuje reakci rostlin bramboru na namočení kořenů rostliny do bakteriální suspenze *Cms* o koncentracích 10^5 - 10^8 buněk/ml. Písmenem K je označena kontrolní rostlina, u které byly její kořeny namočeny pouze do sterilní vody.



Obrázek 25: Projev bakteriální kroužkovitosti bramboru při inokulaci různými koncentracemi. Převzato z: [5]

Tento test lze provádět i na jiných rostlinách, například na rostlině pačuli, jak tomu bylo ve výzkumu Wang a kol. (2019), kteří zkoumali náhodné mutagenese kmenů *Rs*. Rostliny inokulovali bakteriální suspenzí o koncentraci 10^8 CFU/ml metodou kořenového máčení. Oříznuté kořeny namočili do suspenze a nechali inkubovat při 28 °C, 85% vlhkostí a se 12 hodinovou fotoperiodou [77].

Guttara a kol. (2017) ve svém článku popisují současný výskyt bakterie *Rs* na zemědělských polích ve střední a severní Peru. Vzorky odebírali na počátku kvetení bramboru ze stonku. Vzorky byly laboratorně upraveny a následně naočkovány rostliny bramboru. Kořeny se poškodily skalpelem a ihned se do půdy nalilo 40 ml bakteriální suspenze, aby konečná koncentrace izolátu byla $5 \cdot 10^7$ buněk/g půdy. Následně se pozorovaly projevy vadnutí a u nepříznakových rostlin se rostliny podrobily detekci na latentní výskyt patogenu. Taxonomická identifikace se ověřila metodou PCR pomocí primerů 759/760. Pozitivní identifikace je založena na přítomnosti amplikonu 282 bp [78].

K výzkumu byla vybrána pole, na kterých rostliny vykazovaly vadnutí, což je projev nemoci bakteriální hnědé hniloby bramboru způsobené *Rs*. Patogen byl nalezen u méně jak 50 % těchto polí [78].

Součástí výzkumu Behiryho a kol. (2018) zmíněného v kapitole o ELISA metodě byl také test patogenity. Rostliny bramboru (odrůda Lady Rosetta), rajčete, pepře a lilku byly naočkovány suspenzí izolovaných bakterií *Rs* o koncentraci 10^8 CFU/ml k třetímu páru pravých listů. Virulence izolátů byla hodnocena za 28 dní po inokulaci. Výsledky byly následně analyzovány softwarem SAS 9.3.1. Obrázek č. 27 ukazuje srovnání zdravé kontrolní rostliny (H) a rostliny inokulované (I) [58].



Obrázek 26: Srovnání zdravé a napadené rostliny při umělé infekci *Ralstonia solanacearum* sazenic bramboru.
Převzato z: [58]

ZÁVĚR

Rostlinu brambor (*Solanum tuberosum* L.) ohrožují dvě bakteriální karanténní choroby. Chorobu bakteriální kroužkovitost bramboru způsobuje bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Bakteriální hnědou hnilobu bramboru vyvolává bakterie *Ralstonia solanacearum*. Obě bakterie napadají cévní svazky rostliny, projevy chorob se vizuálně dají lehce zaměnit. Je důležité zabránit jejich množení a šíření. Snahou je úplná eradikace těchto bakterií, úskalím bývají latentní podoby chorob a podprahové limity, které není možné detekovat.

Existuje několik metod, kterými se dá přítomnost bakterií zjistit. V praxi nejpoužívanější metodou je imunofluorescenční test, jelikož je to metoda rychlá a lze ji použít pro velké série vzorků. Používá se jako první screeningový test, jehož detekční mez je 10^3 CFU/ml a v případě pozitivního nálezu se ověřuje přítomnost pomocí druhého testu založeného na jiném principu. Tím je např. PCR metoda, kterou lze podle matrice vyhodnotit, zda se daná bakterie ve vzorku nachází či nikoli. Mez detekce této metody je 10^3 - 10^4 CFU/ml. Dalšími možnostmi průkazu jsou metody ELISA a FISH. ELISA je nenáročná a relativně levná metoda, umožňující také analýzu velkých sérií vzorků, avšak její citlivost je v těchto případech v porovnání s PCR metodou nižší (10^5 - 10^6 CFU/ml). Při testování metodou FISH lze detekovat 10^3 CFU/ml. Vyšší citlivosti dosahuje díky využití specifických hybridizačních sond. V případě pozitivního nálezu na závěr průkazu musí být proveden lilkový test, bakterie se musí izolovat a kultivovat v Petriho miskách. Následně se zhodnotí, zda se jedná o typické kolonie pro jednotlivé bakterie.

Detekcí obou patogenů se v České republice zabývají pracoviště VÚB a ÚKZÚZ. Detekce těchto patogenů v sadbových hlízách bramboru ve VÚB v Havlíčkově Brodě probíhá akreditovanou metodou IF. Havlíčkobrodské pracoviště ÚKZÚZ používá k detekci patogenů v konzumních hlízách bramboru metody PCR, FISH a IF. V roce 2020 se na území ČR obě bakterie vyskytují a cílem je jejich eradikace.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] VOKÁL B., *Brambory: šlechtění, pěstování, užití, ekonomika*. 1. vydání. Praha: Profi Press, 2013. ISBN 978-80-86726-54-0.
- [2] HOBHOUSE H., *Šest rostlin, které změnilý svět*. První vydání. Praha: Academia, 2004. ISBN 80-200-1179-X.
- [3] The potato plant. Dostupné z: <https://cipotato.org/potato/how-potato-grows/> [cit. 2020-04-01].
- [4] VOKÁL B., ČEPL J., HAUSVATER E., RASOCHA V., *Pěstujeme brambory*. První vydání. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0567-2.
- [5] *Bakteriální kroužkovitost bramboru: Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2017. ISBN 978-80-7427-240-0.
- [6] CAMPOS H., ORTIZ O. (ed.), *The potato crop*. Springer, 2020. ISBN 978-3-030-28683-5. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5>
- [7] MICHALEC Z., *Člověk a rostliny*. První vydání. Praha: Práce, 1977. ISBN 24-110-77.
- [8] Potato. Dostupné z: <https://www.newworldencyclopedia.org/entry/potato> [cit. 2020-03-04].
- [9] ČEPL J., *Máme rádi brambory: Proč jsou brambory zdravé, jak je správně nakupovat i pěstovat, úspěšné projekty PRV a několik osvědčených receptů*. Praha: Ministerstvo zemědělství České republiky, 2012. ISBN 978-80-7434-060-4.
- [10] DE HAAN S. et al., The Nutritional Contribution of Potato Varietal Diversity in Andean Food Systems: a Case Study. *American Journal of Potato Research*. **96**, 2019, 151-163. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12230-018-09707-2>.
- [11] ROBIN F., PALZER S., Texture of breakfast cereals and extruded products. *Modifying Food Texture*. 1st Edition, Elsevier, 2015, 203-235. ISBN 9781782423515. Dostupné z: <https://www.elsevier.com/books/modifying-food-texture/chen/978-1-78242-333-1>.
- [12] ZEEMAN S. et al., Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. **61**(1), 2010, 209-234. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112301.
- [13] SINGH J., *Advances in Potato Chemistry and Technology*. 2nd Edition, Elsevier, 2016. ISBN 978-0-12-800576-7. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpAPCTE001/advances-in-potato-chemistry/advances-in-potato-chemistry>.
- [14] NIKITIN M. M. et al., Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*. **124**(3), 2018, 797-809. DOI: 10.1111/jam.13686.

- [15] HAUSVATER E., DOLEŽAL P., *Abiotikózy bramboru: fyziologické vady a poruchy*. Vydání první. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2015. ISBN 978-80-86940-64-9.
- [16] HAUSVATER E., DOLEŽAL P., *Nejdůležitější škodliví činitelé bramboru*. Vydání druhé. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský, 2019. ISBN 978-80-86940-82-3.
- [17] ČAČA Z., *Ochrana polních a zahradních plodin*. Vydání první. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1984. ISBN 07-086-84.
- [18] RASOCHA V., HAUSVATER E., DOLEŽAL P., *Škodliví činitelé bramboru: abionózy, choroby, škůdci*. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2008. ISBN 978-80-86940-12-0.
- [19] FRY W. E., Phytophthora infestans: the itinerant invader; “late blight”: the persistent disease. *Phytoparasitica*. **48**(1), 2020, 87-94. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12600-019-00778-3>
- [20] Mšice řešetlaková. Dostupné z: http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%22c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c6baaa0%22#r1p|so|skudci|detail:c18ccd9cbe2ba381e37b810d0c6baaa0|popis [cit. 2020-04-03].
- [21] YANG Y. et al., Dendrobium viroid, a new monocot-infecting apscaviroid. *Virus Research*. **282**, 2020. DOI: 10.1016/j.virusres.2020.197958.
- [22] BERTACCINI A. et al., Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences*. **05**(12), 2014, 1763-1788. DOI: 10.4236/ajps.2014.512191.
- [23] ADAMS M., MOSS M., MCCLURE P., *Food microbiology*. 4th edition, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016. ISBN 978-1-84973-960-3. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpFME00042/food-microbiology-4th/food-microbiology-4th>
- [24] AFONSO M. et al., Blackleg Detection in Potato Plants using Convolutional Neural Networks. *IFAC-PapersOnLine*. **52**(30), 2019, 6-11. DOI: 10.1016/j.ifacol.2019.12.481.
- [25] LIU Q., SHEN Y., YIN K., The antimicrobial activity of protein elicitor AMEP412 against *Streptomyces scabiei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **36**(18), 2020. DOI: 10.1007/s11274-019-2794-7.
- [26] KREJZAR V., *Zefektivnění postupu při stanovení přítomnosti karanténního organismu, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, ve vzorcích sadbových brambor*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2007. ISBN 978-80-87011-42-3.
- [27] EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests: version 2019-09. Dostupné z: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list [cit. 2020-03-22].

- [28] Status výskytu regulovaných škodlivých organismů na území ČR. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/skodlive-organismy/status-vyskytu-regulovanych-skodlivych.html> [cit. 2020-03-28].
- [29] PÁNKOVÁ I., KREJZAR V., Příznaky, šíření a kontrola bakteriální kroužkovitosti bramboru. *Agromanuál*. **12**(3), 2017, 26-28.
- [30] *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *EPPO Bulletin*. **36**(1), 2006, 99-109. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2006.00919.x.
- [31] MATOUŠKOVÁ H., TÁBORSKÁ M., Bakteriální kroužkovitost bramboru: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann & Kotthoff) Davis et al. 2007. Praha: Ministerstvo zemědělství. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/58328/Krouzkovitost_bramboru_web.pdf [cit. 2020-03-18].
- [32] VAN DER WOLF J.M., *Epidemiology of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus in relation to control of bacterial ring rot*. Wageningen: Plant Research International B.V., 2005. Dostupné z: <https://edepot.wur.nl/39352>
- [33] KÚDELA V., Bakteriální kroužkovitost bramboru. *Agro*. **11**(11-12), 2006, 5-7.
- [34] PÁNKOVÁ I., KREJZAR V., HORÁČKOVÁ V., Detekce původce bakteriální kroužkovitosti v procesu šlechtění. *Úroda*. **63**(5), 2015, 92-95.
- [35] List of diseases and pests. Dostupné z: <https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trade/agr/standard/potatoes/ListOfDiseasesAndPests.htm> [cit. 2020-04-03].
- [36] Bakteriální kroužkovitost bramboru. Dostupné z: http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/?key=%22076ce40c437581befd8e2e2c82e6bd2e%22#rlp|so|choroby|detail:076ce40c437581befd8e2e2c82e6bd2e|popis [cit. 2020-04-03].
- [37] PÁNKOVÁ I., KREJZAR V., *Detekce původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus v šlechtitelském a množitelském materiálu*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2015. ISBN 978-80-7427-182-3.
- [38] Integrovaná ochrana při pěstování brambor. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/ukzuz/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/ukzuz-2012-2014/x2020_ior-brambory.html [cit. 2020-05-13].
- [39] Ing. KRPÁLKOVÁ A. – Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, odborná osobní konzultace dne 30. 6. 2020.
- [40] HUMPOLÍČKOVÁ V., TÁBORSKÁ M., *Hnědá hniloba bramboru - původce Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi et al.* Praha: Ministerstvo zemědělství, 2007. Dostupné z: <https://adoc.tips/hnda-hniloba-bramboru-pvodce-ralstonia-solanacearum-smithyab.html>

- [41] MENG F., *Ralstonia Solanacearum* Species Complex and Bacterial Wilt Disease. *Journal of Bacteriology and Parasitology*. **04**(02), 2013. DOI: 10.4172/2155-9597.1000e119.
- [42] UWAMAHORO F. et al., *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt: host range and cultivars' susceptibility in Rwanda. *Plant Pathology*. **69**(3), 2020, 559-568. DOI: 10.1111/ppa.13140.
- [43] GUARISCHI-SOUSA R. et al., Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031. *Standards in Genomic Sciences*. **11**, 2016. DOI: 10.1186/s40793-016-0131-4
- [44] TÁBORSKÁ M., Riziko výskytu původce hnědé hniloby bramboru v tuzemské produkci brambor. *Agromanuál*. **9**(7), 2014, 37-38.
- [45] Šíření hnědé hniloby bramboru se musí zamezit. Dostupné z: <https://www.zemedelec.cz/sireni-hnede-hniloby-bramboru-se-musi-zamezit/> [cit. 2020-04-03].
- [46] Legislativa ČR. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/legislativa/legislativa-cr/skodlive-organismy/> [cit. 2020-07-03].
- [47] Právní předpisy EU pro oblast ochrany proti škodlivým organismům. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/legislativa/legislativa-eu/skodlive-organismy/> [cit. 2020-07-03].
- [48] DĚDIČ P., KMOCH M., KRPÁLKOVÁ A., *Alternativní metody a postupy laboratorní diagnózy Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 2016. ISBN 978-80-86940-68-7.
- [49] WULLINGS B. et al., Detection of *Ralstonia solanacearum*, Which Causes Brown Rot of Potato, by Fluorescent *In Situ* Hybridization with 23S rRNA-Targeted Probes. *Applied and environmental microbiology*. **64**(11), 1998, 4546–4554. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106683/>
- [50] HUMPOLÍČKOVÁ V., Odběr a determinace vzorků brambor na karanténní bakteriózy. *Úroda*. **50**(2), 2002, 16-17.
- [51] Diagnostika karanténních bakteriálních chorob bramboru. Dostupné z: <https://www.vubhb.cz/cs/diagnostika-karantennich-bakterialnich-chorob-bramboru-cms-rs> [cit. 2020-07-07].
- [52] AYDIN S., A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. **72**, 2015, 4-15. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- [53] PANFEROV V. et al., Development of the sensitive lateral flow immunoassay with silver enhancement for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers. *Talanta*. **152**, 2016, 521-530. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.02.050.

- [54] FANG Y., RAMASAMY R., Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. *Biosensors*. **5**(3), 2015, 537-56. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-6374/5/3/537>
- [55] HE J., Practical Guide to ELISA Development. *The Immunoassay Handbook*. Fourth Edition, Elsevier, 2013, 381-393. ISBN 978-0-08-097037-0. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080970370000257>
- [56] *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Seventh edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. ISBN 978-0-521-51635-8.
- [57] PRZEWODOWSKI W., PRZEWODOWSKA A., Development of a Sensitive and Specific Polyclonal Antibody for Serological Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *PLOS ONE*. **12**(1), 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0169785.
- [58] BEHIRY S. et al., Antigenic and pathogenicity activities of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 molecularly identified and detected by indirect ELISA using polyclonal antibodies generated in rabbits. *Microbial Pathogenesis*. **115**, 2018, 216-221. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.12.060.
- [59] VREEBURG R. et al., Performance of real-time PCR and immunofluorescence for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Ralstonia solanacearum* in potato tubers in routine testing. *EPPO Bulletin*. **46**(1), 2016, 112-121. DOI: 10.1111/epp.12278.
- [60] The Principle of Immunofluorescence Assays. Dostupné z: <https://ibidi.com/content/364-the-principle-of-immunofluorescence-assays> [cit. 2020-04-30].
- [61] SAWANT P. et al., Immunofluorescence in Oral Mucosal Diseases – A Review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Radiology*. **2**(1), 2014, 6-10. Dostupné z: <http://pubs.sciepub.com/oral/2/1/2>
- [62] JANSE J., KOKOSKOVA B., *Indirect Immunofluorescence Microscopy for the Detection and Identification of Plant Pathogenic Bacteria (In Particular for Ralstonia solanacearum)*. Plant Pathology. Totowa: Humana Press, 2009, 89-99. ISBN 978-1-58829-799-0. DOI: 10.1007/978-1-59745-062-1_8.
- [63] PASTRIK K.-H., Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Potato Tubers by Multiplex PCR with Coamplification of Host DNA. *European Journal of Plant Pathology*. **106**, 2000, 155-165. DOI: 10.1023/A:1008736017029.
- [64] GARIBYAN L., AVASHIA N., Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. **133**(3), 2013, 1-4. DOI: 10.1038/jid.2013.1.
- [65] PCR. Dostupné z: <https://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/> [cit. 2020-04-22].
- [66] Conventional PCR. Dostupné z: <https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-conventional-pcr-3473.html> [cit. 2020-04-23].

- [67] PASTRIK K.-H., MAISS E., Detection of *Ralstonia solanacearum* in Potato Tubers by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Phytopathology*. **148**(11-12), 2000, 619-626. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0434.2000.00567.x>
- [68] AVINASH P. et al., Discrimination of *Ralstonia solanacearum* isolates by genetic signatures produced by single-strand conformation polymorphism and low-stringency single specific primer PCR analysis. *African Journal of Microbiology Research*. **10**(30), 2016, 1128-1139. DOI: 10.5897/AJMR2016.8140.
- [69] SEIGNER L., KAEMMERER D., KAPPEN M., Realtime-PCR zum Nachweis von *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* und *Ralstonia solanacearum* – Grundlagen, Methode und praktische Hinweise. *Gesunde Pflanzen*. **59**, 2007, 101-106. DOI: 10.1007/s10343-007-0159-x.
- [70] SADUNISHVILI T. et al., Molecular, morphological and pathogenic characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* strains of different geographic origins in Georgia. *European Journal of Plant Pathology*. 2020. DOI: 10.1007/s10658-020-02066-x.
- [71] GAUTAM A., KUMAR S., Techniques for the Detection, Identification, and Diagnosis of Agricultural Pathogens and Diseases. *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*. Elsevier, 2020, 135-142. ISBN 9780128193044. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128193044000129>
- [72] O'CONNOR C., Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH). *Nature Education*. **1**(1), 2008, 171. Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/fluorescence-in-situ-hybridization-fish-327/#>
- [73] PGI D., RMUSK R., Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in food pathogen detection. *International journal of molecular biology*. **3**(3), 2018, 143-149. DOI: 10.15406/ijmboa.2018.03.00066.
- [74] RATAN Z. et al., Application of Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus*. **9**(6), 2017. DOI: 10.7759/cureus.1325.
- [75] LI X. et al., Improved microscopic identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* cells by combining *in situ* hybridization with immunofluorescence. *Letters in Applied Microbiology*. **24**(6), 2003, 431-434. DOI: 10.1046/j.1472-765X.1997.00283.x.
- [76] KMOCH M., DĚDIČ P., Detekce *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* v rostlinách bramboru pomocí duplex Real-Time PCR s TaqMan-MGB sondami. *Úroda*. **64**(12), 2016, 229-232.
- [77] WANG Y. et al., A practical random mutagenesis system for *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of *Pogostemon cablin* using Tn5 transposon. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **35**(1), 2019. DOI: 10.1007/s11274-018-2581-x.

[78] GUTARRA L. et al., Diversity, Pathogenicity, and Current Occurrence of Bacterial Wilt Bacterium *Ralstonia solanacearum* in Peru. *Frontiers in Plant Science*. **8**, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.01221.