



národní  
úložiště  
šedé  
literatury

**Detekce původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, v šlechtitelském a množitelenském materiálu**

Pánková, Iveta; Krejzar, Václav  
2015

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-316561>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 23.05.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://www.nusl.cz) .



**Detekce původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, v šlechtitelském a množitelenském materiálu.**

KOLEKTIV AUTORŮ

*METODIKA PRO PRAXI*

*UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA*



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.  
2015

**Kolektiv autorů:**

Ing. Iveta Pánková, Ph.D., Ing. Václav Krejzar, Ph.D. - Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

**Dedikace**

Metodika je plánovaným výstupem projektu NAZV QJ1310218 „Snížení rizika výskytu původce bakteriální kroužkovitosti bramboru v šlechtitelském a množitelenském materiálu“ a s podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci řešení institucionálního projektu č. RO0415, Etapy č. 21: „Zvýšení účinnosti regulace fytopatogenních prokaryot“.

Metodika je určena pro šlechtitele a množitele sadbových hlíz bramboru, pro orgány státní správy – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Ministerstvo zemědělství ČR zabývající se dohledem a kontrolou výskytu karanténního činitele, původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a diagnostické laboratoře zabývající se detekcí patogenu.

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“.

**Oponenti**

Ing. Jana Víchová Ph.D.

Ing. Michal Hnízdil

**Jména oponentů a názvy jejich organizací**

Ing. Jana Víchová, Ph.D.

Mendelova universita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství

Zemědělská 1/1665

613 00 Brno

tel.: 545133050, e-mail: [vichova@mendelu.cz](mailto:vichova@mendelu.cz)

Ing. Michal Hnízdil

Ministerstvo zemědělství České republiky

Odbor rostlinných komodit

Oddělení polních plodin

Těšnov 65/17

110 00 Praha 1

tel.: 221812231, e-mail: [Michal.Hnizdil@mze.cz](mailto:Michal.Hnizdil@mze.cz)

**Vydal:** Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Drnovská 507, 161 06 Praha 6 - Ruzyně

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2015

ISBN 978-80-7427-182-3

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného svolení VÚRV, v.v.i.

## **Obsah:**

- c1. Uvedení do problematiky
2. Cíl metodiky
3. Vlastní popis metodiky
  - 3.1. Metoda umělých infekcí rostlin a hlíz bramboru jako předpoklad pro studium migrace a lokalizace patogenu v hlízách a uvnitř vaskulárních pletiv v celé rostlině
    - 3.1.1. Inokulace rostlin *in vitro* přes narušený kořenový systém
    - 3.1.2. Inokulace hlíz dopěstovaných z *in vitro* rostlin přes narušené klíčky
  - 3.2. Časový harmonogram, doporučená velikost odebíraných vzorků jednotlivých částí rostlin a hlíz bramboru v průběhu vegetačního období v závislosti na vnějších podmínkách a genotypu bramboru a způsob nakládání se vzorky před zpracováním
    - 3.2.1. Nadzemní části rostlin bramboru
      - 3.2.1.1. Rostliny bramboru ze sadbových hlíz
      - 3.2.1.2. Rostliny z *in vitro* kultur
      - 3.2.1.3. Rostliny bramboru v tkáňových kulturách
    - 3.2.2. Hlízy bramboru
  - 3.3. Způsob zpracování vzorků jednotlivých částí rostlin a hlíz bramboru v závislosti na typu detekční metody
    - 3.3.1. Nadzemní části rostlin
    - 3.3.2. Hlízy
  - 3.4. Determinační metody
    - 3.4.1. ELISA test
    - 3.4.2. IF test
    - 3.4.3. PCR
      - 3.4.3.1. Klasická PCR
      - 3.4.3.2. Real-time PCR
    - 3.4.4. Lilkový test
    - 3.4.5. Reizolace patogenu – naplnění Kochových postulátů
  - 3.5. Použité roztoky, média a jejich příprava
    - 3.5.1. Zpracování vzorků rostlin a hlíz bramboru
    - 3.5.2. Obohacovací krok
    - 3.5.3. ELISA test
    - 3.5.4. IF test
    - 3.5.5. Klasická PCR
    - 3.5.6. Real-time PCR
    - 3.5.7. Elektroforéza
    - 3.5.8. Reizolace patogenu
4. Srovnání novosti postupů
5. Popis uplatnění certifikované metodiky
6. Ekonomické aspekty
7. Seznam použité literatury
8. Seznam souvisejících publikovaných článků
9. Obrazová část

## 1. Uvedení do problematiky

Původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann & Kotthoff 1914) Davis et al. 1984 (*Cms*), je zařazen do seznamu škodlivých karanténních organismů, na které se vztahují zvláštní opatření k zabezpečení ochrany proti zavlékání a rozšiřování škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů (zákon č. 245/2011 Sb. a vyhláška 382/2011 Sb.) Od roku 1995 se v České republice provádí každoroční důsledná kontrola všech partií zejména sadbových brambor s nulovou tolerancí přítomnosti tohoto patogenu. Během prvních deseti let programu eradikace (1995-2005) došlo k výraznému snížení výskytu původce bakteriální kroužkovitosti v sadbových i nesadbových partiích brambor z jednotek procent na desetiny procenta. V roce 2005 dokonce nebyla prokázána přítomnost patogenu v žádné partii základního a certifikovaného rozmnožovacího materiálu. Otázka „nulové“ tolerance patogenu nabyla opět významu s nárůstem počtu pozitivních nálezů po roce 2010. K těmto pozitivním nálezům dochází na pozemcích, u kterých je deklarováno dodržování všech opatření k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření původce choroby. K horizontálnímu šíření infekce by tak nemělo docházet. Opakovaně však dnes dochází k tomu, že partie, která byla před sklizní označena jako zdravá, byla za několik měsíců po převozu k odběrateli označena jako pozitivní. Pravděpodobně při souhře nevhodných podmínek při skladování a transportu sadbových hlíz došlo k namnožení podprahové přítomného patogenu nad v současnosti detekovatelnou hranici. Nárůst těchto pozdních pozitivních nálezů umožnily zejména molekulárně genetické metody detekce *Cms*. K obdobným případům dochází i v zahraničí. Výskyt *Cms* tak ve skutečnosti bude zřejmě čtenější, než jsme se dosud domnívali. K odhalení výskytu dochází, jen pokud má patogen dost času se namnožit nad v současnosti detekovatelnou koncentraci, například za vhodných klimatických podmínek během vegetační sezóny, při skladování nebo transportu nebo při souhře uvedených faktorů. Velké firmy si toto riziko uvědomují a sadbové hlízy sami důsledně a opakovaně testují. Rostoucí konkurence mezi šlechtiteli a množiteli certifikovaných a sadbových partií brambor a klesající výměry osázených ploch způsobují, že jakékoliv, byť jen podezření na výskyt *Cms* v sadbovém materiálu vede k poklesu prodeje a ekonomickým ztrátám firmy.

Ze současné situace v České republice a EU vyplývá, že: 1) víceleté uplatňování nulové tolerance *Cms* podle závazné směrnice EU nedocílilo ani při vynaložení vysokých nákladů na testování sadbových hlíz eradikace patogenu v zamořených oblastech; "podezřelé" výskyty *Cms* jsou stále hlášeny ve většině zemí EU;

2) v dohledné době nelze očekávat, že bude legislativně podložený požadavek nulové tolerance v sadbových a konzumních hlízách zrušen nebo zmírněn;

3) neúspěchy v eradikaci patogenu *Cms* zejména v partiích sadbových brambor uplatněním nulové tolerance zatím nevedly k přehodnocení pohledu na celou problematiku bakteriální kroužkovitosti bramboru, pozornost výzkumu i legislativy se doposud soustřeďuje jen na minimalizaci možného horizontálního šíření *Cms* - technologická opatření, sanitace apod. (Anonymous, 1987).

Pracovníci týmu Rostlinolékařské bakteriologie VÚRV, v.v.i. Praha Ruzyně dlouhodobě řeší problematiku *Cms*. Poukazovali na možné příčiny zejména tzv. "opožděných" pozitivních nálezů a navrhli určitá řešení, jak se přiblížit naplnění požadavku „nulové“ tolerance při možnostech tehdejších diagnostických metod a za předpokladu dodržení všech opatření, bránících horizontálnímu přenosu (vhodnou sanitací, posklizňovými opatřeními apod.) (Krejzar et al., 2007).

Navrhovaná opatření se týkala: 1) Doby odběru. V praxi se vzorky hlíz na testování přítomnosti *Cms* odebírají před sklizní a ihned se analyzují tak, aby v období sklizně byl znám výsledek. Výzkum však prokázal, že se patogen v tomto období (pokud se nejedná o silnou infekci) vyskytuje v hlízách v podprahové koncentraci pro detekci imunofluorescenční, FISH i PCR metodou (Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2011). Pravděpodobnost detekce patogenu lze zvýšit, pokud se odebrané vzorky hlíz před vlastním zpracováním vystaví zvýšené provokační teplotě, tj. teplotě nad 20°C po dobu alespoň 4 týdnů (Krejzar et al., 2007).

2) Zpracování vzorků hlíz bramboru. Standardní vzorek o 200 hlízách se rozdělí na 10-20 dílčích vzorků o 10-20 hlízách. Každá hlíza se podélně rozkrojí v místě pupku a z obou částí se precizně

vyřiznou cévní svazky. Individuální precizní zpracování dílčích vzorků je sice pracné, ale zvyšuje možnost odhalení patogenu v nízkých koncentracích a snižuje výskyt falešně pozitivních reakcí, v důsledku křížových reakcí s nadbytečnými rostlinnými pletivy.

V současné době se za hlavní nástroj k včasnému odhalení patogenu, v nízkých koncentracích považuje detekce citlivými imunochemickými a molekulárně genetickými metodami (Slack et al., 1996). Z imunochemických metod se pro detekci *Cms* využívá především nepřímá IF (immunofluorescence; De Boer and Copeman, 1980), IFC (immunofluorescence colony-staining; Roozen and Van Vurde, 1991) a DAS ELISA (double sandwich enzym linked immunosorbent assay; De Boer et al., 1988), s využitím polyklonálních i monoklonálních protilátek. Detekční limit těchto metod je 10000 buněk na 1ml, problémem jsou falešně pozitivní reakce způsobené křížovými reakcemi protilátek se složkami rostlinné šťávy nebo se složkami dužniny hlízy (např. škrobem u průmyslových odrůd bramboru). Pro zvýšení citlivosti těchto metod se využívají extrakční pufrы (s EDTA, BEB, s obsahem lysozimu), které uvolňují požadovaný antigen a zesilují vazbu antigen-protilátka bez zvýšení signálu pozadí. Citlivost metod lze zvýšit 24-48 hodinovou inkubací homogenátů v semiselektivních živných médiích, vychytáním antigenů *Cms* protilátkami fixovanými na magnetické kuličky (IMS, Poussier et al., 2002), kombinací obou metod, apod. Těmito metodami lze teoreticky dosáhnout detekčního limitu až 1 000 buněk na 1 ml. Problémem je hlavně pomalý růst *Cms* a jeho přerůstání nebo „předběhnutí“ ostatními přítomnými mikroorganismy.

Nejrozšířenější postupy pro detekci *Cms* metodou PCR využívají primery a protokoly Pastrik (2000) a Mills et al. (1997). Amplifikovanou DNA využívají i metody FISH (Fluorescent in situ hybridization, Li et al., 1997), TaqMan PCR (Shaad et al., 1999, Bach et al., 2003) a BIO-PCR (Schaad et al., 1999, Cho et al., 2015). Ribonukleovou kyselinu využívá metoda AmpliDet RNA (Van Beckhoven et al., 2002). Úspěšnost těchto metod při detekci nízkých koncentrací *Cms* ve stolonech a hlízách ovlivňuje zejména efektivita extrakčních metod nukleových kyselin, přístroj, volba primerů a nastavení podmínek amplifikace DNA. Realistické detekční limity u PCR protokolů s vysokou hodnotou reprodukovatelnosti jsou 100-1000 buněk na 1 ml. Průběh amplifikace požadované nukleové kyseliny přímo v rostlinných macerátech nebo extraktech je často inhibován reakcemi s rostlinnými pletivy a kontaminací z prostředí. Stejně jako u imunochemických metod se doporučuje zvýšit koncentraci *Cms* kultivačních extraktů z rostlin nebo hlíz v semiselektivních živných médiích ideálně s následnou imunomagnetickou separací patogenu z extraktu. K uvolnění požadované DNA nebo RNA se využívají speciální protokoly nebo kombinace několika protokolů extrakce garantujících vysokou výtěžnost (Norgen Biotek, RBC Bioscience, Quiagen, GeneAll a další). Těmito postupy se zvýší pravděpodobnost detekce patogenu přítomného v nízké koncentraci a současně se odstraní příčiny většiny inhibičních reakcí. Všechny metody zvyšující pravděpodobnosti zachytu *Cms* jsou časově a finančně velmi náročné. Biochemické metody -Biolog GEN III (USA, Hayward, CA), API systém (Francie, bioMérieux, Inc.) a chemické metody – FAME (analýza mastných kyselin plynovou chromatografií, Agilent Technologies, USA, CA) s využitím databází MIDI (USA, Newark, DE) nejsou pro detekci *Cms* v homogenátech vhodné. Jako perspektivní se jeví proteomické a nanotechnologické metody (např. Ramanovská laserová spektrometrie). Každý pozitivní výsledek získaný jakoukoli metodou musí být vždy potvrzen pozitivním biologickým testem na lilku a reizolací patogenu (Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2011).

Z uvedeného přehledu je patrné, že současný výzkum je zaměřený zejména na zvýšení účinnosti detekčních metod *Cms* a to především v hlízách bramboru. Opomíjí se například potřeba detailních znalostí 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.

Navrhovaná metodika vychází ze dvou předpokladů:

- 1) dosud nebyly využity možnosti redukce vertikálního přenosu, malá pozornost byla věnována eliminaci patogenu v šlechtitelském a v základním rozmnožovacím materiálu;
- 2) veškeré úsilí na odhalení patogenu se zaměřovalo hlavně na jeho detekci v hlízách v předsklizňové zralosti.

Metodika je proto zaměřena na zvýšení účinnosti stávajících detekčních metod patogenu *Cms* ve všech fázích procesu šlechtění a množení, ve všech rostlinných pletivech bramboru: 1) v rostlinách *in*

*in vitro*, uchovávaných jako genetický zdroj jak pro množení jednotlivých komerčně pěstovaných odrůd, tak pro šlechtění nových odrůd s cílem udržet výchozí materiály prosté patogenu;

2) v rostlinách bramboru, s cílem umožnit systematickou kontrolu vysazovaných namnožených *in vitro* rostlin do síťovníků a skleníků, průběžnou kontrolu rostlin bramboru v následných maloparcelkových výsadbách a namátkovou kontrolu SE a nižších stupňů množení v průběhu vegetační sezóny;

3) v minihlízách a sadbových hlízách bramboru s cílem podchytit maximum infikovaného sadbového materiálu před komerčními stupni množení a před převodem perspektivního genetického materiálu do zdrojových *in vitro* kultur.

## 2. Cíl metodiky

Cílem navrhované metodiky bylo vypracovat:

1) metodu umělých infekcí rostlin a hlíz bramboru jako předpoklad pro studium migrace a lokalizace patogenu v hlízách a uvnitř vaskulárních pletiv v celé rostlině;

2) časový harmonogram a doporučenou velikost odebíraných vzorků jednotlivých částí rostlin a hlíz bramboru v průběhu vegetačního období v závislosti na vnějších podmínkách a genotypu bramboru;

3) způsob nakládání se vzorky rostlin a hlíz bramboru před zpracováním;

4) způsob zpracování vzorků jednotlivých částí rostlin a hlíz bramboru v závislosti na typu detekční metody;

5) optimalizaci metod detekce patogenu *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Při dodržení navrhovaného metodického postupu by mělo dojít:

1) k přerušení vertikálního přenosu patogenu v procesu šlechtění;

2) k zvýšení možnosti záchytu patogenu v šlechtitelském a množitelkém materiálu;

3) k redukci podezřelých pozdních nálezů původce bakteriální kroužkovitosti při oficiálních fyto-sanitárních a firemních kontrolách v zahraničí.

## 3. Vlastní popis metodiky

### 3.1. Metoda umělých infekcí rostlin a hlíz bramboru jako předpoklad pro studium migrace a lokalizace patogenu v hlízách a uvnitř vaskulárních pletiv v celé rostlině

Pro přípravu infikovaného materiálu se osvědčily dvě metody inokulace - inokulace rostlin *in vitro* přes narušený kořenový systém (výběr vhodné metody a koncentrace viz. obrazová příloha) a inokulace hlíz dopěstovaných z *in vitro* rostlin přes narušené klíčky. Při inokulačních pokusech pro optimalizaci metodiky odběrů a zpracování vzorků rostlin a hlíz bramboru byly pro přípravu infikovaného materiálu *in vitro* vybrány odrůdy s rozdílnou raností (rané, polorané a pozdní) a s rozdílným obsahem škrobu (konzumní odrůdy, průmyslové škrobnaté odrůdy) - Adéla, Impala, Krumlov, Laura, Marabel, Ornella, Rosara a Tomensa. Rostliny *in vitro* a z nich dopěstované hlízy byly napěstovány ve Výzkumném ústavu bramborařském, s.r.o. (VÚB). Inokulační pokusy probíhaly v karanténním skleníku ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. (VÚRV) při denní teplotě 20-22°C, noční teplotě 15-18°C pod dostatečnou zálivkou.

#### 3.1.1. Inokulace rostlin *in vitro* přes narušený kořenový systém

Od každé odrůdy se ve speciálním živném médiu (3.5.1.) dopěstují nákazy prosté rostliny *in vitro*. Rostliny cca 10 cm vysoké se vyjmou z agaru. K narušení tenkých kořínků dochází samovolně při uvolňování rostlin z tuhého růstového média. Kořeny rostlin jsou jednorázově namočeny do suspenze sbírkového kmene *Cms* NCPPB 3467 o koncentraci optimálně  $10^6$  buněk/ml (obrazová příloha). Suspenze *Cms* může být připravena stěrem narostlé kultury na živném médiu C bez antibiotik (3.5.2.) a naředěním ve sterilní vodě nebo fyziologickém roztoku. Lepší výsledek lze dosáhnout vyříznutím a rozmixováním celého segmentu agarové plotny porostlé bakteriální kulturou *Cms* se sterilní vodou nebo sterilním fyziologickým roztokem. Suspenze s agarem lépe ulpívá na kořenech rostlin, umožňuje lepší přežívání a následnou kolonizaci cévních svazků patogenem. Po okapání suspenze, cca po 5 minutách, jsou rostliny *in vitro* zasazeny do nádob s universálním substrátem (Rašelina a.s., Soběslav). Jako kontrola u každé odrůdy jsou zařazeny rostliny *in vitro*, jejichž narušené kořeny jsou

namočeny do sterilní vody nebo fyziologického roztoku. Pokud se při přípravě inokula využívají segmenty agaru porostlé *Cms*, pak se v kontrolní variantě namáčí kořeny rostlin *in vitro* do suspenze sterilního agaru rozmixovaného ve sterilní vodě nebo fyziologickém roztoku.

### **3.1.2. Inokulace hlíz dopěstovaných z *in vitro* rostlin přes narušené klíčky**

Pro inokulaci přes narušené klíčky hlíz se od vybraných odrůd (uvedených v kapitole 3.1.) dopěstují z *in vitro* rostlin nákazy prosté hlízy. K urychlení klíčení se hlízy ponechají dle odrůdy 1-3 týdny v temnu a teplotě 20°C. Po dosažení cca 3 cm délky se špičky klíčků zastříhnou sterilními nůžkami a narušené klíčky se namočí do suspenze sbírkového kmene *Cms* NCPPB 3467 o koncentraci  $10^8$  buněk/ml, ( $A_{560nm}=0,1$ ). Suspenze se připraví rozmixováním segmentů agarových ploten porostlých bakteriální kulturou *Cms* se sterilní vodou nebo fyziologickým roztokem. Suspenze s agarem lépe ulpívá na klíčcích hlíz, umožňuje lepší přežívání a kolonizaci cévních svazků patogenem. Po zaschnutí suspenze cca po 30 minutách se hlízy zasadí do nádob s universálním substrátem (Rašelina a.s., Soběslav). Jako kontrola u každé odrůdy se zařadí hlízy, jejichž narušené klíčky se namočí do suspenze sterilního agaru rozmixovaného ve sterilní vodě nebo fyziologickém roztoku.

Část infikovaných rostlin *in vitro* se přímo využila pro optimalizaci detekce patogenu *in vitro* kulturách, u části se dopěstovaly infikované hlízy. Dopěstované infikované hlízy z *in vitro* rostlin i dceřiné hlízy z infikovaných matečných hlíz se využily pro optimalizaci detekce patogenu v hlízách a po vysazení pro studium migrace a lokalizace patogenu v průběhu celého vegetačního období bramboru.

## **3.2. Časový harmonogram, doporučená velikost odebíraných vzorků jednotlivých částí rostlin a hlíz bramboru v průběhu vegetačního období v závislosti na vnějších podmínkách a genotypu bramboru a způsob nakládání se vzorky před zpracováním**

### **3.2.1. Nadzemní části rostlin bramboru**

Pro detekci patogenu *Cms* lze provádět odběry nadzemních částí rostlin bramboru v období od 3-4 týdnů po vysazení až do prvních příznaků zasychání natě. Optimální období pro jednorázové odběry vzorků nadzemních částí rostlin bramboru výchozích množitelských materiálů pěstovaných přímo z *in vitro* kultur i z rostlin ze sadbových hlíz pěstovaných ve skleníku, v síťovníku i v polních podmínkách je závislé na ranosti odrůdy. Pro jednorázový odběr nadzemních částí rostlin je nejvhodnější období kvetení, tj. cca 45 dnů ode dne vysazení u velmi rané odrůdy až po 80 dnů ode dne vysazení u pozdní odrůdy. Speciální postup se uplatňuje při kontrole tkáňových *in vitro* kultur. Způsob odběru vzorku se liší podle typu rostlin.

#### **3.2.1.1. Rostliny bramboru ze sadbových hlíz**

U rostlin bramboru ze sadbových hlíz se vzhledem k dostatku rostlinného materiálu odebírá bazální část hlavního stonku trsu. Pokud to není možné, lze v období kolem kvetení rostlin, kdy je koncentrace patogenu v cévních svazcích nadzemních částí rostlin nejvyšší, odebrat pro detekci patogenu cévní svazky kteréhokoliv stonku z trsu a z kterékoli jeho části. K dalšímu zpracování se odebírají cca 3 g stonku, tj. v bazální části stonku v závislosti na odrůdě zhruba do 5 cm rostliny. Pro detekci patogenu je minimální množství 1g cévních svazků, tj. 0,5-2 cm stonku. Při namátkové kontrole stupňů SE a nižších stačí provést jeden odběr v období nasazování květu. Při systematické kontrole šlechtitelského materiálu je vhodné provést alespoň dva odběry nadzemních částí rostlin bramboru – první odběr před nebo při nasazování květu a druhý po odkvětu. Odstup mezi oběma odběry by měl být 21 dnů. Při vlastním odběru se nůžky po každém odebraném vzorku namáčí do 70 % roztoku technického lihu nebo do 3 % roztoku chlornanu sodného (např. Savo). Jednotlivé segmenty nebo celé stonky rostlin se vkládají do igelitových nebo speciálních odběrových sáčků označených odrůdou, číslem řádku a trsu v řádku, aby bylo možné se kdykoliv k dané rostlině vrátit a detekci zopakovat. Vzorky je nutné zpracovat do 24 h po odběru. Převáží se v chladicím boxu. Před zpracováním jsou uloženy v lednici při 4°C. V případě pozitivního nálezu se odběr a detekce zopakují.

#### **3.2.1.2. Rostliny z *in vitro* kultur**

U rostlin dopěstovaných z namnožených *in vitro* kultur ve skleníku nebo síťovníku, sloužících jako výchozí materiál pro množení dané odrůdy se provádí obvykle pouze jeden odběr části stonku, aby nedošlo k likvidaci rostliny a omezení tvorby hlíz. Vrchol až střed stonku o velikosti 2-4 cm se odebírá



v období květu. Nůžky se mezi jednotlivými odběry namáčí do 70 % roztoku technického lihu nebo do 3 % roztoku chlornanu sodného (např. Savo). Rostliny nebo jejich segmenty se vkládají do igelitových sáčků označených odrůdou, číslem řádku a trsu v řádku, aby bylo možné se kdykoliv k dané rostlině vrátit a detekci zopakovat. V chladičím boxu se vzorky ihned převáží na místo zpracování. Vzorky je nutné zpracovat do 24 h po odběru. Před zpracováním jsou uloženy v lednici při 4°C. V případě pozitivního nálezu se konkrétní rostliny včetně vytvořených hlíz zlikvidují.

### **3.2.1.3. Rostliny bramboru v tkáňových kulturách**

Speciální přístup se volí v případě testování genotypů bramboru dlouhodobě uchovávaných v kultuře *in vitro*. Rostliny namnožené v tkáňové kultuře jsou výchozím materiálem pro kontrolu udržovaných zdrojových klonů bramboru. Z chladových podmínek dlouhodobé kultivace jsou *in vitro* rostlinky jednotlivě rozpasážovány do zkumavek, po té sterilně nařízkovány a kultivovány na agarovém živném médiu do velikosti cca 6 cm (viz. 3.5.1.). Množení *in vitro* rostlin se provádí opakovaným pasážováním pomocí stonkových řízků velikosti 15–20 mm, vrcholových nebo s jedním nódem, které se po deseti vkládají do kultivačních nádob. Z jedné rostliny jsou obvykle 3 až 4 řízky. Dózy se umísťují v klimatizované kultivační místnosti s fotoperiodou 16 hod. světlo / 8 hod. tma, s teplotou 20° C a intenzitou osvětlení 60  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Interval mezi jednotlivými pasážemi se pohybuje, v závislosti na genotypu, mezi dvěma až třemi týdny. Přibližně 10 cm vysoké rostliny se vysazují po 4 rostlinách do květináčů (průměr 10 cm) do univerzálního substrátu (Rašelina a.s., Soběslav) a dopěstují se 4 týdny v kultivační komoře s řízenou kontrolou světla, vlhkosti a teploty. K determinačním testům se odebírají celé stonky. Rostliny se omyjí pod tekoucí vodou, odstraní se listy, stonky se povrchově dezinfikují 70 % roztokem etanolu a zváží. Jeden vzorek o hmotnosti 1g obsahuje v průměru čtyři stonky rostlin (jeden květináč). Pro uspokojivou kontrolu uchovávaného klonu je nutné otestovat minimálně 10 vzorků, tj. cca 40 rostlin. Rostliny *in vitro* lze testovat i přímo ze sterilních agarových ploten bez dopěstování v půdním substrátu. Z cca 10 cm vysokých rostlin bramboru se zpracovávají celé stonky. Jeden jednogramový vzorek obsahuje dle odrůdy 5-10 stonků, testuje se 20 vzorků. Rostliny se uvolňují z agarových ploten těsně před zpracováním vzorků. Vytažené rostliny se omyjí pod tekoucí vodou, odstraní se listy, stonky se povrchově dezinfikují 70 % roztokem etanolu, zváží se a ihned zpracují. V případě pozitivního nálezu se napěstují nové rostliny daného klonu a detekce se zopakují. Pozitivní klony se zlikvidují.

### **3.2.2. Hlízy bramboru**

Hlízy mohou být odebírány v jakémkoliv stadiu vývoje zhruba od velikosti 0,5 cm (minihlízky). Vzhledem k následující inkubaci je vhodné provádět odběr vzorků v suchém období nebo alespoň vzorky po odběru mechanicky očistit. Rostlinné nebo půdní zbytky mohou být zdrojem infekce, která by odebrané hlízy během následující inkubace mohla znehodnotit. Hlízy se sbírají a inkubují v prodyšných jutových pytlích nebo v papírových sáčcích (minihlízky). Teplota by se během transportu měla pohybovat mezi 10-22°C. Pro zvýšení pravděpodobnosti detekce patogenu přítomného v podprahové koncentraci se odebrané hlízy umístí do temné a suché komory a vystaví se po dobu 4-8 týdnů provokační teplotě 20-22°C. Před zpracováním se hlízy omyjí pod tekoucí vodou, povrchově dezinfikují 70 % roztokem etanolu a nechají oschnout. Hlíza se v pupkové části rozřízne na poloviny a skalpelem se precizně (s minimem okolní dužniny) vyříznou cévní svazky z obou pupkových částí. Nůž i skalpel se dezinfikují před každým řezem 70 % roztokem etanolu. Stejně jako u cévních svazků rostlin by se velikost jednoho vzorku měla pohybovat kolem 1 g, to odpovídá cévním svazkům vykrájeným z 8-15 hlíz (20-40 minihlízek). Pro první posouzení daného klonu nebo odrůdy je potřeba minimálně 100 hlíz (400 minihlízek) rozdělených cca do 10 vzorků. Pro bezpečnou kontrolu vysokých stupňů množení a před uvolněním odrůd do zákaznických stupňů množení by se mělo otestovat nejméně 40 vzorků po cca 1 g cévních svazků (v průměru v 10 hlízách), tj. nejméně 400 hlíz. V případě pozitivního nálezu se detekce opakuje. Pokud se pozitivní nález potvrdí a jde o minihlízky nebo hlízy z *in vitro* rostlin, likvidují se nejen hlízy, ale i výchozí klon, z kterého byly *in vitro* rostliny namnoženy. U navazujících stupňů se likviduje celá partie dceřiných hlíz.

## **3.3. Způsob zpracování vzorků jednotlivých částí rostlin a hlíz bramboru v závislosti na typu detekční metody**

### 3.3.1. Nadzemní části rostlin

Jedná se o segmenty nebo celé stonky z rostlin bramboru odebraných z *in vitro* kultur, ze skleníku, síťovníku, maloparcelkových i polních výsadeb. Ve všech případech jsou odebrané vzorky rostlinných pletiv zpracovány dle postupu Baer et al. (2011). Stonky se omyjí pod tekoucí vodou a povrchově dezinfikují 70 % etanolem. U vzorků ze silných bazálních částí rostlin odebraných z venkovních výsadeb se po dezinfekci odstraňují povrchová pletiva, aby se zvýšil podíl cévních svazků ve vzorku. K  $1\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$  vzorku se přidá 1,5 ml PBS pufru nebo vzorkového pufru (viz. kapitola 3.5.). Rostlinná pletiva se rozmacerují v třecí misce. Macerát se přelije do 15 ml centrifugační zkumavky. Zkumavky se umístí na výkyvnou třepačku a inkubují se 20-24 h při pokojové teplotě za stálého promíchávání. Po inkubaci se extrakt slije a rozdělí se na tři dílčí vzorky po cca 0,5 ml do mikrozkuvek. Jeden dílčí vzorek slouží jako záložní a uchovává se v mrazáku při teplotě  $-30^{\circ}\text{C}$  a nižší minimálně do jednoznačného ukončení determinace zakončené lilkovým testem a reizolací patogenu. Extrakty se centrifugují při 10 000 ot./min. po dobu 5 min. při pokojové teplotě. Supernatanty se slíjí a pelet se v ependorfce ředí dle metody 0,1 - 0,5 ml specifického pufru nebo vody pro molekulární biologii. Extrakt se dále zpracovává dle zvolené determinační metody.

Při vlastní determinaci patogenu se zejména u vzorků z *in vitro* kultur využívá některá z obohacujících kultivačních metod, která by měla zvýšit koncentraci patogenu a zvýšit pravděpodobnost jeho záchytu determinačními metodami (viz. 3.4.).

### 3.3.2. Hlízy

Všechny hlízy se zpracovávají stejně bez ohledu na velikost a způsob napěstování. Ve všech případech se odebrané hlízy pouze mechanicky očistí. Po 4 týdenní inkubaci při provokační teplotě  $20-22^{\circ}\text{C}$  v suché a temné místnosti se hlízy omyjí pod tekoucí vodou a nechají oschnout. Každá hlíza se rozkrojí podél pupku a z obou částí pupku se skalpelem vyextrahují cévní svazky. Celková hmotnost vzorku je  $1\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ . U standardních sadbových hlíz jeden vzorek tvoří v průměru cévní svazky z 10 hlíz. Cévní svazky se vykrajují s co nejmenším podílem okolní dužniny hlízy. Výsledek testování je závislý na preciznosti a pečlivosti při zpracování vzorků. Precizní vykrájení cévních svazků je nezbytné u hlíz průmyslových škrobnatých odrůd. Vysoký obsah škrobu ztěžuje detekci původce bakteriální kroužkovitosti všemi determinačními metodami. K vyextrahovaným cévním svazkům se v centrifugační zkumavce přidá 5 ml PBS nebo vzorkového pufru (viz. 3.5.). Vzorky se nemacerují a inkubují na rotační třepačce při pokojové teplotě po dobu 24 h. Pokud se cévní svazky precizně vykrájí, nezvyšuje následná macerace pravděpodobnost detekce patogenu. Macerací dochází k dalšímu uvolňování škrobových zrn, která zhoršují přesné a úplné oddělení extraktu od rozmacerovaného rostlinného pletiva, tím dochází k ztrátám extraktu. Po inkubaci se extrakt slije a rozdělí se na dílčí vzorky do mikrozkuvek. Jeden dílčí vzorek slouží jako záložní a uchovává se v mrazáku při teplotě  $-30^{\circ}\text{C}$  a nižší do ukončení determinace zakončené lilkovým testem. Ostatní dílčí vzorky extraktu z cévních svazků se zahustí centrifugací při 10 000 ot./min. po dobu 5 min. při pokojové teplotě. Supernatanty se slíjí a pelet se v mikrozkuvce ředí dle metody 0,1 - 0,5 ml pufru. Extrakt se dále zpracovává dle zvolené determinační metody. Při vlastní determinaci patogenu se může využít některá z obohacujících kultivačních metod (kapitola 3.4.), která by měla zvýšit koncentraci patogenu a zvýšit pravděpodobnost jeho záchytu determinačními metodami.

### 3.4. Determinační metody

Detekce původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* se provádí alespoň dvěma principiálně rozdílnými metodami, např. imunochemickou (ELISA, IFA) a molekulárně genetickou metodou (PCR, real-time PCR, DNA microarray). Výsledky determinačních metod musí být ukončeny biologickým testem s úspěšnou reizolací patogenu. Pro rutinní screening šlechtitelských a množitelských porostů postačuje použít pouze jednu determinační metodu. Před vlastní detekcí se může zařadit obohacovací krok. Do tekutého média nebo na pevné agarové plotny média C s antibiotiky (viz. 3.5.1.) se kape nebo nanáší a roztírá sterilní kličkou 100  $\mu\text{l}$  koncentrovaného a ředěného (1:10) macerátu nebo extraktu z čerstvě rozmacerovaného pletiva. Pevné médium s extraktem se inkubuje při teplotě  $22^{\circ}\text{C}$  po dobu 4-5 dnů. Po inkubaci se pod mikroskopem vybírají a přeočkují na nové misky s živným médiem drobné lesklé bílé až krémové

mikrokolonie. Tekuté médium s extraktem nebo macerátem se inkubuje na třepačce pouze po dobu 24-48 h, aby nedošlo k případnému přemnožení doprovodných bakterií. Tekuté médium se centrifuguje při 10 000 ot./min. po dobu 10 min. Pelet se rozpustí v pufru vhodném pro danou determinační metodu.

#### **3.4.1. ELISA test**

ELISA test je pro firmy zabývající se šlechtěním a množením bramboru z hlediska finanční náročnosti a objektivnosti metody nejvhodnější metodou pro systematický screening všech stupňů šlechtění i vysokých stupňů množení. Pro detekci *Cms* se používá nejčastěji přímá sendvičová metoda - DAS ELISA. Po zahuštění extraktu centrifugací se k peletu přidá 0,6 ml vzorkového pufru (5.3.1.). Detekce patogenu se provádí minimálně pro dvě koncentrace extraktu (základní a 1:1). Jednotlivé koncentrace se kapou alespoň v trojnásobném opakování. Postup ELISA testu, doba trvání jednotlivých kroků, typ protilátek a jejich ředění se řídí doporučeními dodavatele protilátek (Neogen, Adgen, Loewe). Složení pufru je uvedeno v kapitole 3.5.3. Jako pozitivní kontrola se používá bakteriální suspenze sbírkového kmene *Cms* NCPPB 3467 o koncentraci  $10^6$  buněk/ml ( $A_{620}=0,01$ ) ve vzorkovém pufru a rostlinném extraktu z hlízy nebo z rostliny dřívě označené jako negativní. Jako negativní kontrola se používá podle typu vzorku, který se hodnotí - extrakt z hlízy nebo z rostlinného pletiva nadzemní části bramboru dřívě označené jako negativní. Výsledek ELISA testu se vyhodnocuje automaticky ELISA readerem nebo spektrofotometrem s možností vyhodnocovat 96 jamkové destičky. Vzorek se hodnotí jako pozitivní, pokud hodnota absorbance při 405 nm dosáhne hodnoty vyšší než je dvojnásobek hodnoty negativní kontroly  $A_{405X} > 2A_{405NK}$ .

Vzorek obvykle hodnotíme jako negativní, pokud je hodnota absorbance vzorku rovna nebo menší než dvojnásobek hodnoty absorbance NK ( $A_{405X} \leq 2A_{405NK}$ ). U pozitivních vzorků a vzorků s hodnotami absorbance kolem hranice positivity se analýza opakuje.

#### **3.4.2. IF test**

IF test je oficiální robusní metoda dostatečně popsána ve směrnici EPPO (Bulletin 41, 2011). Není vhodná pro firemní screening. Pořizovací náklady na provádění testování pomocí IF testu jsou vyšší než u klasické PCR. Vysoké náklady jsou spojené s pořízením fluorescenčního mikroskopu. Konečné hodnocení závisí na hodnotiteli, výsledek je závislý na jeho erudici. Po centrifugaci vzorku rostliny nebo hlízy bramboru se připraví základní ředění přidáním 0,6 ml 10mM PBS pufru. Postup IF testu - koncentrace protilátek a doby inkubace závisí na typu protilátky a řídí se doporučeními dodavatele protilátek (Neogen, Adgen, Loewe), složení pufrů je uvedeno v příloze 3.5.4. Jako pozitivní kontrola se používá bakteriální suspenze sbírkového kmene *Cms* NCPPB 3467 o koncentraci  $10^6$  buněk/ml ( $A_{620}=0,01$ ) ve vzorkovém pufru a rostlinném extraktu z hlízy nebo z rostliny dřívě označené jako negativní. Jako negativní kontrola se používá extrakt z hlízy nebo z rostlinného pletiva nadzemní části bramboru dřívě označené jako negativní. Vzorky se hodnotí ve čtyřech ředěních v PBS pufru (základní, 1:10, 1:100 a 1:1000) pomocí imunofluorescenčního mikroskopu při celkovém zvětšení 500-1000x s použitím olejové imerze. Každé ředění se kape alespoň ve dvou opakováních. Hodnotí se charakteristický tvar – u *Cms* kyjovité tyčinky a počet jasně plně fluoreskujících kolonií v porovnání s pozitivní kontrolou. První se hodnotí pozitivní kontrola. Jamka se vzorkem se hodnotí šikmým posunem od pravého horního rohu přes průměr jamky na levou stranu. Tímto posunem se hodnotí nejméně 10 zorných polí. V případě negativních vzorků se hodnotí 40 zorných polí. Výpočet průměrného počtu buněk ve vzorku (jamce) se provádí dle závazné metodiky (bulletinu OEPP/EPPO 36, 2006). U pozitivních vzorků a vzorků s hodnotami absorbance kolem hranice positivity se analýza opakuje.

#### **3.4.3. PCR**

Ideální druhá, konfirmační metoda k imunochemickým testům ELISA a IF. Touto druhou molekulárně genetickou metodou stačí pouze potvrzovat pozitivní výsledek ELISA a IF testu a prověřovat podezřelé, nejednoznačné výsledky z těchto testů. Po centrifugaci se připraví základní ředění vzorku přidáním 100  $\mu$ l vody pro molekulární biologii (sdH<sub>2</sub>O). DNA ze vzorku lze uvolnit rychlometodou, 5 min. povařením nebo pomocí speciálních kitů (Quiagen DNeasy Plant Mini kit, GeneAll Plant SV Mini kit). Vyizolovaná DNA se hodnotí minimálně ve dvou koncentracích.

##### **3.4.3.1. Klasická PCR**

Náklady na klasickou PCR metodu jsou dnes srovnatelné nebo dokonce nižší než na IF test a to především z důvodu neustále klesajících cen PCR termobloků a elektroforetických metod, které nevyžadují další nákladnou hodnotící a dokumentační techniku a software. Amplifikace uvolněné nebo vyizolované DNA probíhá za podmínek a s primery dle osvědčených protokolů pro klasickou PCR (Mills et al., 1997; Pastrik, 2000). Optimalizovaný protokol je v kapitole 3.5.5. Jako pozitivní kontrola se používá bakteriální suspenze sbírkového kmene *Cms* NCPPB 3467 o koncentraci  $10^6$  buněk/ml ( $A_{620}=0,01$ ). DNA je uvolněná nebo izolovaná dle stejných protokolů jako u vzorků. Jako negativní kontrola se do reakce přidává voda pro molekulární biologii a extrakt z cévních svazků hlíz nebo rostlin prostých patogenu. Negativní kontrola se zpracovává a ředí stejně jako vzorky. U klasické PCR se přítomnost naamplifikované DNA prokazuje elektroforézou. Elektroforézu vyhodnocujeme po ukončení pomocí skenování a vyhodnocovacích programů. Při použití elektroforézy runVIEW (Cleaver Scientific Ltd.) se zabudovaným UV zdrojem lze hodnotit průběh elektroforézy v reálném čase.

#### **3.4.3.2. Real-time PCR**

Amplifikace uvolněné nebo vyizolované DNA probíhá za podmínek a s primery dle osvědčených protokolů pro real-time PCR (Gudmestad et al., 2009; Cho et al., 2015). U real-time PCR se hodnotí přítomnost amplifikované DNA podle hodnoty  $c_t$  - počet cyklů v reálném čase, při využití nespecifické barvy Sybr Green i podle  $t_m$  - melting point - teploty denaturace produktů po ukončení amplifikačního protokolu. Protokol Gudmestad et al., 2009 je optimalizovaný pro Rotor-Gene Q 5plex HRM (Quiagen, Germany, kapitola). Elektroforéza produktů i hodnoty  $c_t$  a  $t_m$  se hodnotí v porovnání s pozitivní a negativní kontrolou. Jako pozitivní kontrola se používá bakteriální suspenze sbírkového kmene *Cms* NCPPB 3467 o koncentraci  $10^6$  buněk/ml ( $A_{620}=0,01$ ). DNA je uvolněná nebo izolovaná dle stejných protokolů jako u vzorků. Jako negativní kontrola se do reakce přidává voda pro molekulární biologii a extrakt z cévních svazků hlíz nebo rostlin prostých patogenu. Negativní kontrola se zpracovává a ředí stejně jako vzorky. Přítomnost produktů amplifikace lze navíc stejně jako u klasické PCR, kontrolovat elektroforézou. Real-time PCR metoda se používá jako rozhodčí u sporných výsledků. Do značné míry nahrazuje zdlouhavý a pracný lilkový test.

#### **3.4.4. Lilkový test**

Pelet jednoho z dílčích vzorků se naředí po centrifugaci 0,5 ml sterilního fyziologického roztoku ( $pH=7-7,2$ ). Rozpuštěný pelet se ihned injikuje do stonku lilku vejcoplodého (*Solanum melongena* L.) cv. Black Beauty. ve fázi dvou pravých listů v místě děložních lístků. Rostliny se před inokulací 24 h nezalévají. Suspenze každého vzorku se injikuje do 10-15 rostlin. Hodnocení rostlin se provádí v týdenních intervalech, 4-8 týdnů. Jako pozitivní kontrola slouží lilky injikované bakteriální suspenzí sbírkového kmene *Cms* NCPPB 3467 o koncentraci  $10^6$  buněk/ml ( $A_{620}=0,01$ ). Jako negativní kontrola se injikuje sterilní fyziologický roztok nebo extrakt z cévních svazků hlíz nebo z nadzemních částí rostlin bramboru, které byly dříve označené jako negativní.

#### **3.4.5. Reizolace patogenu – naplnění Kochových postulátů**

Po 4-8 týdnech se provádí reizolace bakterií s cílem prokázat přítomnost původce bakteriální kroužkovitosti bramboru. Symptomatické rostliny s vadnoucími a deformovanými listy se po vyjmutí ze substrátu povrchově dezinfikují 70 % roztokem ethanolu. Části stonků, případně řapíků v blízkosti symptomů bakteriálního vadnutí se rozmacerují v cca 1-1,5 ml sterilního fyziologického roztoku nebo sterilní vody pro molekulární biologii v případě současně prováděné PCR. Na živném médiu C (viz. 3.5.6.) se nanáší inokulační kličkou nebo hokejkou koncentrovaný a ředěný macerát (alespoň 1:10). Petriho misky se inkubují při teplotě 22°C. Misky se na přítomnost kolonií původce bakteriální kroužkovitosti bramboru kontrolují po 4-5 dnech. *Cms* tvoří pomalu rostoucí drobné bílé až krémové lesklé kolonie. Odebrané kolonie se přeočkují na nové živné médium. Po 4 dnech se čisté kolonie identifikují dle protokolu výše uvedenými metodami – ELISA, IF, PCR, real-time PCR. Nejrychlejší a u čistých kultur nejlevnější metodou je biochemická metoda Biolog GEN III (Biolog, Inc., Hayward CA). Z několika bakteriálních mikrokolonií se okamžitě připraví suspenze ve speciálním inokulačním roztoku typ A (inoculation fluid IF-A, Biolog, USA) a po důkladném promíchání se ihned kape do speciálních 96 jamkových destiček se sušenými substráty. Jako pozitivní se berou vzorky identifikované speciálním readerem po 24-48 h inkubaci při 28°C jako *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na index podobnosti SimIndex  $\geq 0,5$ . Jako alternativu k metodě Biolog GEN III lze

použit chemickou metodu analýzy mastných kyselin (FAME). Z odebraných bakteriálních kolonií se vyzoluje směs mastných kyselin, obsažených v buněčné stěně bakterií, které se procesem zmýdelnění převedou na těkavé methylestery, které se separují podle teploty varu na speciální koloně plynového chromatografu (Agilent Technologie, USA, CA). Jako pozitivní se berou vzorky identifikované databází Sherlock TBSA 6 (MIDI, Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA) jako *Clavibacter michiganensis* na index podobnosti SimIndex  $\geq 0,5$ .

### **3.5. Použité roztoky, média a jejich příprava**

#### **3.5.1. Zpracování vzorků rostlin a hlíz bramboru**

##### **PBS pufr zásobní roztok, 10x koncentrovaný**

pH = 7,2-7,4

80,0 g NaCl

11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O

2,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2,0 g KCl

1 l destilované vody

uchování při 4°C v lednici po dobu nejméně 3 měsíce

##### **PBS pufr 10mM**

pH = 7,2-7,4

8,0 g NaCl

2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,2 g KCl

1 l destilované vody

uchování při 4°C v lednici po dobu 14 dnů

##### **Vzorkový pufr**

pH = 7,4

20 g polyvinyl pyrrolidonu (viskozita K10-K40)

2 g BSA (bovinní sérový albumin)

1 l destilované vody

připravit před použitím, ihned spotřebovat

uchování při 4°C v lednici po druhého dne

##### **Základní množící živné médium pro kultivaci bramboru *in vitro* (Murashige & Skoog, 1962)**

MS 62 médium – směs vitamínů, bez regulátorů růstu a ATB

30 g sacharózy

8 g agaru

1 l destilované vody

pH na 5,6 – 5,8

promíchat a autoklávovat při teplotě 121° C, 20 min

chladnoucí médium rozlít po 70 ml do sterilních jednorázových plastových kultivačních nádob

#### **3.5.2. Obohacovací krok**

##### **Médium C**

5 g bakteriologický pepton

3 g hydrolyzát kaseinu

3 g kvasničný extrakt

2 g maltóza

1 g laktóza

1 l destilované vody

pH = 7,2

při přípravě pevného média v Petriho miskách přidat 18 g agar

po důkladném promíchání autoklávovat 20 min. při 121°C

zchladit na cca 50°C

přidat antibiotika filtrovaná přes bakteriální filtr a důkladně promíchat

zásobní roztoky antibiotik A

0,06 g trimethoprim (Sigma) v 96 % metanolu

0,002 g nalidixová kyselina (Sigma) v 96 % metanolu

0,01 g amphoterecin B (Sigma) v dimethyl sulfoxidu

zásobní roztoky antibiotik B

0,003 g polymyxin B sulfát (Sigma) v destilované vodě

0,008 g nalidixová kyselina (Sigma) v 0,01 M NaOH

0,2 g cyklohexymid (Sigma) v 50 % etanolu

### **3.5.3. ELISA test**

#### **Potahovací pufr**

1,6 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

2,9 g NaHCO<sub>3</sub>

1 l destilované vody

pH = 9,6

uchování při 4°C v lednici po dobu nejméně 1 měsíce

#### **Konjugační/Vzorkový pufr**

viz. 3.5.1.

#### **Substrátový pufr**

97 ml diethanoaline

0,2 g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O

doplnit destilovanou vodu do 1 l

pH = 9,8 (1 N HCl)

připravit před užitím

1ml pufru/ 1 mg 4-nitrophenyl phosphate di-Na-salt

nelze uchovávat

#### **Promývací pufr**

8,0 g NaCl

2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O

0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,2 g KCl

0,5 ml Tween 20

1 l destilované vody

pH = 7,2-7,4

uchování při 4°C v lednici po dobu 14 dnů

### **3.5.4. IF test**

#### **PBS pufr**

viz. 3.5.1.

#### **Promývací pufr**

viz. ELISA test

#### **Glycerolový pufr**

3,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O

0,2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

50 ml glycerol

100 ml destilovaná voda

pH = 7,6

uchování při 4°C v lednici po dobu nejméně 1 měsíce

### 3.5.5. Klasická PCR

#### Složení mixu

reagencie	1 reakce (μl)
Taq DNA polymeráza (0,4 U)	0,2
směs dNTPs (0,1 mM)	0,2
PSA-1 (1μM) CMS85F	0,25
PSA-R (1μM) CMS85R	0,25
template DNA (vzorek)	2
MgCl <sub>2</sub>	1,5
10x PCR pufr	2,5
sdH <sub>2</sub> O	18,1
celkem	25

#### Cyklus

operace	teplota (°C)	doba	počet cyklů
počáteční denaturace*	95	5 min.	1
denaturace	95	1 min.	
annealing	60	30s	30
elongace	72	1 min.	
konečná elongace	72	10 min.	1
ochlazení	4-8	nejméně 15 min.	

### 3.5.6. Real-time PCR

#### Složení mixu

reagencie	1 reakce (μl)
kit pro Rotor Gene Sybr Green	12,5
CelA-F (1μM) PSA-1 CMS85F	0,25
CelA-R (1μM) PSA-R CMS85R	0,25
template DNA (vzorek)	2
sdH <sub>2</sub> O	10
celkem	25

#### Cyklus

operace	teplota (°C)	doba	počet cyklů
počáteční denaturace*	95	5 min.	1
denaturace	92	30s	
annealing	60	45s	40
elongace	72	30s	

### 3.5.7. Elektroforéza

#### Elektroforetický pufr TAE 10x – zásobní roztok

48,5 g Tris

12,0 g kyselina octová

3,7 g Na<sub>2</sub>EDTA

1 l vody

uchování při 4°C v lednici po dobu nejméně 3 měsíce

#### Elektroforetický agar

0,7 % agarosový gel (0,7 g agarósy na 100 ml pufru TAE)

roztok agarózy se uvede na 2. min. do varu

po ochlazení na 50-55°C se přidá netoxické fluorescenční barvivo (např. Midori Green DNA Stain; SafeView™ Classic 2µl na 100 agarózového gelu a důkladně se rozmíchá

elektroforetický gel se opatrně nalije do elektroforetické vany s hřebenem

uchování při 4°C v lednici v TAE pufru 2-3 dny

### 3.5.8. Reizolace patogenu

Při reizolaci nanášíme macerát na médium C s nebo i bez přidaných antibiotik (viz. 3.5.2.).

## 4. Srovnání novosti postupů

Předkládaná metodika detekce původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, v šlechtitelském a množitelském materiálu bramboru vychází z nových poznatků o migraci a lokalizaci patogenu získaných v průběhu dvou a půl roku trvání projektu NAZV QJ1310218 „Snížení rizika výskytu původce bakteriální kroužkovitosti bramboru v šlechtitelském a množitelském materiálu.“ zabývajícího se touto problematikou. V kombinaci s využitím nejnovějších inovací detekčních metod by měla přispět k omezení vertikálního přenosu patogenu. Předpokládaný metodický postup při testování a ověřování jednotlivých kroků odběrů a determinace vycházel z *in vitro* zdrojů 10 odrůd bramboru uměle infikovaných *Cms*. Hledání optimální metody inokulace hlíz a rostlin bramboru a tkáňových *in vitro* kultur mimo jiné potvrdilo i neschopnost dlouhodobějšího volného přežívání patogenu v půdě. Přes vytvořené optimální podmínky pro rozvoj infekce v karanténním skleníku, optimální na živiny bohatý substrát a vysokou koncentraci virulentního kmene *Cms*, byla inokulace přes půdní substrát neúspěšná u rostlin i hlíz s výjimkou koncentrace  $10^8$  buněk/ml (viz. obrazová příloha) a proto nevhodná pro přípravu infikovaného materiálu. Koncentrace  $10^8$  buněk/ml nelze v přírodních podmínkách u tohoto patogenu nikdy docílit.

Výsledkem tohoto metodického postupu je optimalizovaný postup pro zvýšení pravděpodobnosti záchytu *Cms* především v šlechtitelském materiálu, kdy jsou testovány často jednotlivé rostliny nebo malé počty hlíz. Zcela nový je postup detekce patogenu v tkáňových kulturách. Všechny uvedené postupy by měly zabránit přenosu infekce na nové genotypy a přispět k ozdravení stávajících. Podle navrhované metodiky mohou specializovaná pracoviště a firmy prověřovat šlechtitelské a množitelské porosty na přítomnost *Cms* v průběhu téměř celé vegetační sezóny. Záchyt v nati povede ke zvýšení dohledu nad daným porostem a včasnému přehodnocení přístupu k vypěstovaným sadbovým hlízám. Tato vnitřní kontrola je u velkých zahraničních firem naprostou samozřejmostí. České firmy se musí přizpůsobit, jinak v konkurenci neobstojí.

## 5. Popis uplatnění certifikované metodiky

Potřebnost a aktuálnost řešené problematiky je dána opětovným nárůstem nahlášených pozitivních nálezů původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, karanténní bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* v komerčních stupních množení odrůdového sadbového materiálu. Tyto pozitivy jsou hlášeny navzdory více jak 10 let trvající snaze o eradikaci patogenu, navzdory vysokým nákladům vynaloženým na testování sadbových a konzumních hlíz bramboru na přítomnost patogenu a navzdory dodržování pravidel bránících jeho horizontálnímu přenosu. Každoročně se čestí šlechtitelé a množitelé potýkají s případy reklamací a navrácení různých stupňů množitelského materiálu ze zahraničí s odůvodněním na podezření na výskyt tohoto karanténního patogenu *Cms*. Na vyřešení této situace je vyvíjen tlak zejména ze strany pěstitelských podniků, které se bojí nakupovat sadbu u tuzemských šlechtitelů a množitelů, přestože některé české zejména průmyslové odrůdy patří v Evropě mezi nejlepší. Některé zemědělské podniky dokonce výrazně omezují 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 pro šlechtitele a množitele sadbových hlíz bramboru, pro orgány státní správy – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Ministerstvo zemědělství ČR zabývající se dohledem



a kontrolou výskytu karanténního činitele, původce bakteriální kroužkovitosti bramboru, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a diagnostické laboratoře zabývající se detekcí patogenu. Metodika zohledňuje reálnou potřebu zemědělské praxe včasného záchytu karanténního činitele zejména v množitelských partiích konzumních a průmyslových odrůd bramboru. Aplikace uvedených metodických postupů by měla přispět k zvýšení možnosti záchytu patogenu ve vzorcích obsahujících malé množství rostlinného materiálu, kdy se koncentrace patogenu pohybují pod nebo kolem detekčního prahu současných diagnostických metod. Metodika nepředkládá žádný jednoduchý a rychlý návod eradikace patogenu, ale efektivní, systematické standardizované metodické postupy 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 snižovat možnost šíření latentně přítomné infekce a mělo by dojít k ozdravení šlechtitelského a sadbového materiálu bramboru. Včasné uplatnění tohoto přístupu cílené detekce patogenu ve výchozích materiálech může významně přispět ke snížení budoucích ekonomických ztrát českých množitelů a šlechtitelů.

## 6. Ekonomické aspekty

Jedinou možností českých šlechtitelů a množitelů bramboru jak si udržet konkurenceschopnost mezi zahraničními dodavateli sadby je perfektní vzhled a perfektní zdravotní stav hlíz odrůd, které množí a šlechtí. K dosažení „nulové“ přítomnosti původce bakteriální kroužkovitosti bramboru v komerčních stupních množení je naprosto nezbytná trvalá a důsledná kontrola a testování veškerého výchozího materiálu – rostlin i hlíz v každém kroku šlechtění a v prvních fázích množení a pravidelné nahodilé testování alespoň množitelských stupňů SE a E. Uplatnění uvedeného metodického postupu by mělo vést k snížení rizika pozitivního nálezu v oficiálně testovaných partiích sadbových brambor. Vlastní laboratoře, které hlídají přítomnost alespoň těch nejdůležitějších zejména karanténních činitelů v sadbovém materiálu, jsou nejlevnější možnou cestou. Odhadované náklady na vybavení jednoduché laboratoře pro zajištění základního systematického testování rostlin a hlíz bramboru na přítomnost *Cms* se pohybují kolem 150-300 tis. Kč na vstupních nákladech, 10-15 tis. Kč/1000 vzorků za materiálové náklady plus mzda vyškoleného pracovníka. Provádění rutinního testování servisními laboratořemi je dlouhodobě nerentabilní. Nejdražší variantou je toto testování neprovádět. Pozitivní nález vede k ekonomickým ztrátám způsobeným neprodejností infikované sadby a vícenáklady na likvidaci sadby a sanitaci zamořeného pozemku, skladů, strojů atd. Opakované pozitivní nálezy vedou ke ztrátě důvěry a konkurenceschopnosti podniku. Výsledky výskytu karanténních činitelů v jednotlivých členských státech EU jsou každý rok zveřejňovány stálým fytosanitárním výborem Evropské Komise. Redukce podezřelých výskytů přispěje k ekonomické stabilizaci a rozvoji zemědělských podniků a umožní plně využít ideální geografické a klimatické podmínky ČR pro šlechtění a množení této komodity v rámci Evropy.

## 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 Publ. Eur. Communities, Luxembourg.

Baer, D., Mitzel, E., Pasche, J. and Gudmestad, N.C., 2011. PCR detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* - infected tuber samples in a plate capture assay. Canadian Journal of Microbiol. 40, p: 1007-1018.

Bach, H.J., Jessen, I., Schloter, M., Munch, J.C., 2003. A TaqMan-PCR Protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. J. Microbiol. Methods 52, p: 85–91.

Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 41, 2011, p: 385–388.

Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 2006, p: 99-109.

De Boer, S.H. and Copeman, R.J., 1980. Bacterial ring rot testing with the indirect fluorescent antibody staining procedure. *Am. Potato J.* 63, p: 457-468.

De Boer, S.H., Wieczorek, A. and Kummer, A., 1988. An ELISA test for bacterial ring rot of potato with a new monoclonal antibody. *Plant Disease* 72, p: 874-878.

Gudmestad, N.C., Mallik, I., Pasche, J.S., Anderson, N.R. and Kinzer, K., 2009. A Real-Time PCR Assay for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* Based on the Cellulase A Gene Sequence. *Plant Dis.* 93, p: 649-659.

Cho, M.S., Park, D.H., Namgung, M., Ahn, T.Y. and Dong Suk Park, D.S., 2015. Validation and Application of a Real-time PCR Protocol for the Specific Detection and Quantification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Potato. *Plant Pathol J.* 2015 Jun; 31(2): 123–131. Doi: 10.5423/PPJ.OA.02.2015.0019.

Li, X., De Boer, S.H. and Ward, L.J., 1997. Improved microscopic identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* cells by combining in situ hybridization with immunofluorescence. *Letters in Appl. Microbiol.* 24, p: 431-434.

Krejzar, V., Pánková, I., Krejzarová, R. a Kúdela, V., 2007. 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.

Mills, D., Russell, B.W. and Hanus, J.W., 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. *Phytopathology* 87, p: 853–861.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with Tobago tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3), p: 473-497.

Pastrik, K.H., 2000. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by multiplex PCR with coamplification of host DNA. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, p: 155-165.

Poussier, S., Cheron, J.J., Couteau, A., Luisetti, J., 2002. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *J. Microbiol. Methods* 51, p: 349-359.

Roozen, N.J.M. and Van Vuurde, J.W.L., 1991. Development of a semi-selective medium and an immunofluorescence colony-staining procedure for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in cattle manure slurry. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97, p: 321–334.

Schaad, N.W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. and Knorr, D., 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Disease* 83, p: 1095–1100.

Slack, S.A., Drenan, J.L., Westra, A.A.G., Gudmestad, N.C. and Oleson, A.E., 1996. Comparison of PCR, ELISA, and DNA hybridization for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown potatoes. *Plant Dis.* 80, p: 519-524.

Van Beckhoven, J.R.C.M., Stead, D.E. and Van der Wolf, J.M., 2002. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon. *J. Appl. Microbiol.* 93, p: 840–49.

Použitá literatura je uložena u autorů metodiky.

## **8. Seznam souvisejících publikovaných článků**

Pánková, I., Krejzar, V. a Horáčková, V., 2015: Detekce původce bakteriální kroužkovitosti v procesu šlechtění. *Úroda* 63(5): 92-95.

Pánková, I., Krejzar, V., Čepl, J., Kúdela, V., 2007: The incidence of detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in daughter tubers of volunteer plants in the Czech Republic, Plant Protection Science 4, p: 127-134.

Pánková, I. and Krejzar, V., 2007: Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in arable crops and weed species in the Czech Republic. ISSN 1802-940X, ISBN 978-80-86940-11-3. Vědecké práce 15, Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s: 149 - 156.

Krejzar, V., Pánková, I., Krejzarová, R., Kúdela V., 2007, uplatněná metodika: Zefektivnění postupu při stanovení přítomnosti karanténního organismu, bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, ve vzorcích sadbových brambor. ISBN 978-80-87011-42-3. Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR - odborem rostlinných komodit pod č.j. 696/2008-15010.

Seznam souvisejících publikovaných článků je k dispozici u autorů.

## 9. Obrazová část

Titulní strana – lilkový test

Obrázek 1: Umělé inokulace rostlin *in vitro* metodou zalévání při koncentraci  $10^8 - 10^5$  cfu/ml



Obrázek 2: Umělé inokulace rostlin *in vitro* metodou namáčení při koncentraci  $10^8 - 10^5$  cfu/ml



Obrázek 3: Porovnání metod umělé inokulace rostlin *in vitro* metodou namáčení a zalévání při koncentraci  $10^6$  cfu/ml

