

**BIOLOGICKÁ OCHRANA BRAMBOR
PROTI VYBRANÝM
PATOGENNÍM BAKTERIÍM**
Možnosti využití fágů
v ochraně proti pektinolytickým bakteriím

Kolektiv autorů

CERTIFIKOVANÁ METODIKA
2022

VÝZKUMNÝ ÚSTAV BRAMBORÁŘSKÝ HAVLÍČKŮV BROD, s. r. o.

KOLEKTIV AUTORŮ

Ing. Josef Vacek, Ph.D. (30 %); **Ing. Martin Kmoch, Ph.D.** (20 %)

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

Prof. RNDr. Karel Petrzik, CSc. (15 %)

Biologické centrum AV ČR, v. v. i.

Doc. Ing. Rudolf Ševčík, Ph.D. (20 %); **Ing. Filip Beňo** (5 %)

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Ing. Vladislav Klička (10 %)

Vesa Velhartice, a.s.

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení č. **UKZUZ 242248/2022** o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

OPONENTI

Ing. Pavel Beran, Ph.D., *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*

Ing. Mgr. Miloslava Navrátilová, Ph.D., *ÚKZÚZ Brno*

DEDIKACE



Tato metodika Biologická ochrana brambor proti vybraným patogenním bakteriím byla vytvořena se státní podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci stejnojmenného projektu QK1910028 Programu aplikovaného výzkumu ZEMĚ 2017-2025.

OBSAH

1. CÍL METODIKY (Vacek).....	2
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	2
2.1. Úvod (Vacek).....	2
2.2. Bakteriální černání stonku a měkká hniloba hlíz bramboru (Vacek, Kmoch).....	2
2.3. Biologická ochrana včetně využití bakteriofágů (Petrzik, Vacek).....	7
2.4. Výsledky pokusů.....	14
2.4.1. Stanovení citlivosti odrůd k měkké hnilobě hlíz a bakteriálnímu černání stonku (Kmoch, Klička).....	14
2.4.2. Laboratorní testy účinnosti vybraných fágů na bakterii <i>Dickeya solani</i> a <i>Pectobacterium carotovorum</i> (Kmoch, Beňo).....	16
2.4.3. Skleníkové testy účinnosti vybraných fágů na bakterii <i>Dickeya solani</i> (Kmoch).....	20
2.4.4. Poloprovozní pokusy účinnosti vybraných lytických fágů na bakterii <i>Dickeya solani</i> (Vacek, Ševčík, Klička).....	22
2.5. Technologie aplikace (Vacek, Ševčík).....	28
3. SROVNÁVÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ (Vacek, Ševčík).....	30
4. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY (Vacek).....	30
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY (Vacek, Ševčík, Klička).....	30
6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY (Vacek).....	31
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	32

1. CÍL METODIKY

Cílem byl vývoj a ověření prostředků biologické ochrany brambor proti vybraným patogenním bakteriím na bázi bakteriofágů, zlepšení kvality zemědělské produkce a potravin.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. Úvod

Brambory (*Solanum tuberosum*) jsou celosvětově pěstovaná hlíznatá okopanina, která je čtvrtou nejvýznamnější potravinářskou plodinou na světě po kukuřici (*Zea mays*), rýži (*Oryza sativa*) a pšenici (*Triticum aestivum*), a to jak z hlediska pěstovaných ploch, tak i celkové produkce. Hlízy obsahují 75–80% vody, zásobní látkou je polysacharid škrob, jehož obsah se běžně pohybuje od 12 do 23% v původní hmotě. Jsou excelentním zdrojem vitamínu C, dobrým zdrojem draslíku, vitamínu B6, při konzumaci se slupkou vlákniny a i dalších dieteticky významných látek. Brambory nevyžadují zvláštní podmínky růstu; byly dlouhou dobu důležitou polní plodinou v oblastech mírného pásma a nyní se stále více rozšiřují i v teplejších oblastech. Jsou pěstovány cca ve sto třiceti zemích, z nichž 95 jsou země rozvojové. Komerční odrůdy jsou odvozeny z omezeného počtu klonů brambor dovezených do Evropy v 16. století po průzkumu Jižní Ameriky. To vedlo k úzké genetické základně s omezeným rozsahem rezistence vůči mnoha chorobám, které snižují výnosy a kvalitu hlíz. Světová produkce neustále roste, a to především v rozvojových zemích, nicméně se také odhaduje, že přibližně 22% brambor je každoročně ztraceno kvůli virovým, bakteriálním a houbovým chorobám a škůdcům (UNECE, 2017). Mezi nejvýznamnější bakteriální choroby brambor patří karanténní bakteriální kroužkovitost bramboru vyvolávaná bakteriemi *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, karanténní bakteriální hnědá hniloba bramboru způsobovaná bakteriemi *Ralstonia solanacearum*, bakteriální černání stonku a měkká hniloba hlíz bramboru, jejichž původci jsou bakterie rodů *Pectobacterium* a *Dickeya* a aktinobakteriální obecná strupovitost bramboru vyvolávaná bakteriemi *Streptomyces scabies* (Rasocho *et al.*, 2008).

2.2. Bakteriální černání stonku a měkká hniloba hlíz bramboru

Hlavní bakterie způsobující bakteriální černání stonku, které postihuje rostoucí rostlinu, a měkkou hnilobu hlíz brambor jsou pektinolytické bakterie *Pectobacterium atrosepticum* (*Pa*), *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) a *Dickeya* spp., všechny dříve patří do rodu *Erwinia* (*E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica* a *E. chrysanthemi*).

Podle Sadlera (2016) vyvolávají v Evropě bakteriální černání stonku a měkkou hnilobu hlíz bramboru *Pa*, *Pcc* a barevně vyznačené druhy bakterie *Dickeya* v Tab. 1.

Tab. 1: Příčiny bakteriálního černání stonku a měkké hniloby hlíz bramboru

Hostitelé (příznaky)	Staré jméno	Nové jméno
Brambor (bakteriální černání stonku, měkká hniloba hlíz)	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (<i>Pa</i>)
Brambor a celá řada dalších plodin (bakteriální černání stonku, měkká hniloba hlíz)	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (<i>Pcc</i>)
Brambor	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>
Brambor a japonský křen	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>wasabiae</i>	<i>Pectobacterium wasabiae</i> (nyní <i>P. parmentieri</i>)
Brambor, hvozdík, rajče, kukuřice, chryzantéma, atd.	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Dickeya chrysanthemi</i> <i>Dickeya dadantii</i> <i>Dickeya dianthicola</i> <i>Dickeya dieffenbachiae</i> <i>Dickeya paradisiaca</i> <i>Dickeya solani</i> <i>Dickeya zeae</i>

V té době byly ve světě popsány dva další nové poddruhy *P. carotovorum* jako organismy způsobující bakteriální černání stonku. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis*, vysoce agresivní bakterie zodpovědná za většinu výskytu bakteriálního černání stonku v Brazílii a Jižní Africe. *Pectobacterium wasabiae* (nyní *P. parmentieri*) byl popsán jako nový patogen brambor odpovědný za vysoký výskyt bakteriálního černání stonku na Novém Zélandu. V současné době (2022) s rozvojem sekvenování nové generace (NGS) je již ve světě klasifikováno 20 druhů bakterií *Pectobacterium* a 12 druhů *Dickeya* vyvolávajících na různých rostlinách měkkou hnilobu (soft rot).

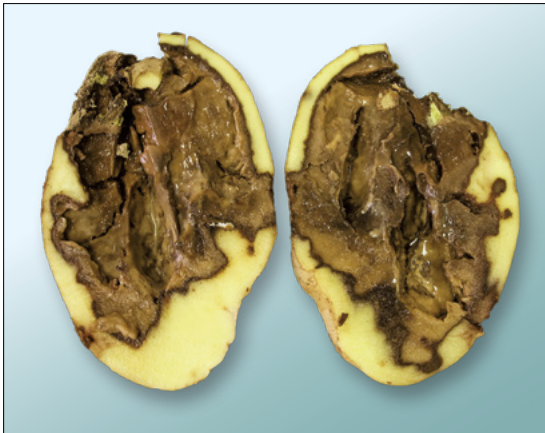
K zavlečení patogenu *Dickeya* do mnoha zemí došlo v nedávné minulosti prostřednictvím mezinárodního obchodu se sadbovými bramborami, spekuluje se i o zavlečení kontaminovanou závlahovou vodou.

Nejcharakterističtějším příznakem bakteriálního černání stonku způsobeným jak druhy *Pectobacterium*, tak *Dickeya* je slizká, mokrá léze černé hniloby šířící se z hníjící matečné hlízy nahoru po stoncích, zejména ve vlhkých podmínkách. Pokud jsou však podmínky suché, symptomy bývají zakrnutí, žloutnutí, vadnutí a vysychání stonků a listů (Obr. 1). Koncem léta, za trvalých dešťových srážek, se může rozvinout rozsáhlá hniloba stonků, začínající shora a postupující dolů k základně, s příznaky zaměnitelnými s bakteriálním černáním stonku, ale obvykle je způsobena pouze *Pcc*.



Obr. 1: Příznaky bakteriálního černání stonku na nati

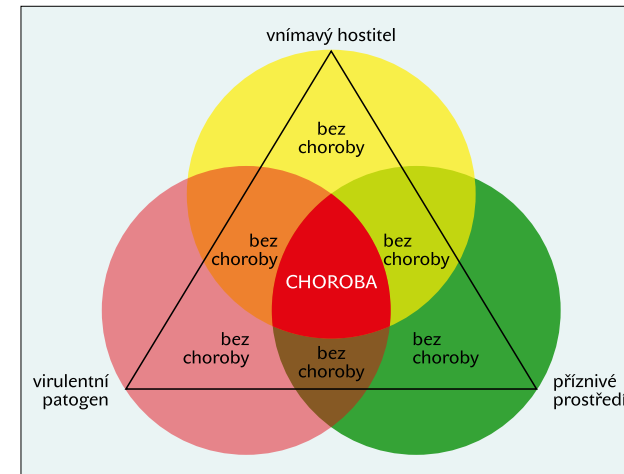
Měkká hniloba hlíz je iniciována za mokra v lenticelách, pupku, v komerční praxi nejčastěji v ranách. Léze se může rozšířit na celou hlízu a odtud na sousední skladované hlízy. Tkáň hlíz je macerována do krémové konzistence, která v přítomnosti vzduchu



Obr. 2: Příznaky měkké hniloby na hlíze bramboru

zčerná a při napadení sekundárními organismy vyvine nepříjemný zápach (Obr. 2). V nedostatečně větraných skladech se hniloba může rozšířit na přilehlé hlízy, protože kapalina z hniјících hlíz prosakuje na ostatní, což někdy vede k masivním hnilobným kapsám ve skladované partii. Když sadbové hlízy začnou na poli před vzejitím hnit, dojde k mezerovitosti.

Obecně se choroby mohou vyvíjet za předpokladu současné existence vnímavého hostitele, přítomnosti virulentního patogenu v příznivém prostředí, viz Obr. 3.



Obr. 3: Trojúhelník choroby

Bakterie měkké hniloby nepřežívají v půdě. Přežití v půdě je omezeno na 1 týden až 6 měsíců v závislosti na podmínkách prostředí, jako je teplota půdy, vlhkost a pH. Přežití může být delší ve spojení s rostlinným materiálem. V žádném případě nemohou bakterie přežít v půdě v systému střídání plodin 3–8 let.

Nyní se obecně uznává, že hlavním zdrojem infekce bakteriálního černání stonku jsou latentně infikované sadbové (matečné) hlízy. Když matečná hlíza hnije, bakterie se uvolňují do půdy, jsou přenášeny půdní vodou a kontaminují sousední dceřiné hlízy. Czajkowski *et al.* (2010) ukázali, že bakterie v půdě mohou také kolonizovat kořeny brambor a následně se přes vaskulární systém přesunout do dceřiných hlíz. Jakmile se bakterie dostanou do stonků, nemusí nutně způsobit hnilobu stonků (bakteriální černání stonku), ale mohou zde přežívat v latentní formě.

V současné komerční praxi nejčastěji ke kontaminaci hlíz dochází během mechanizované sklizně a při vyskladňování ze skladu (třídění) prostřednictvím rozpadu hniјících hlíz a šíření hniјící tkáňe na strojích do ran způsobených během manipulace s nimi.

Ke kontaminaci porostu dochází také při mechanickém drcení natě před sklizní. Může k němu dojít i ze zdrojů přenášejících vzduchem, přenos na velkou vzdálenost z nemocných rostlin hmyzem nebo na kratší odfouknutím aerosolu vytvořeného dopadem dešťových kapek na nemocné rostliny nebo při drcení jejich natě.

Bylo zjištěno, že povrchové vody v USA a Skotsku jsou kontaminovány *Pcc* a v menší míře *Pa*. Povrchová voda používaná pro účely zavlažování bude tedy pravděpodobně také zdrojem patogenu a může být i zdrojem nových variant patogenu.

Bakteriální černání stonku se vyvíjí po hnilobě (matečných) sadbových hlíz, ale není nutným pokračováním hniloby matečných hlíz. Podmínky, které podporují hnilobu, také

podporují vývoj bakteriálního černání stonku. Důležitým environmentálním faktorem pro rozvoj bakteriálního černání stonku je stav půdní vody. Přítomnost vodního filmu na povrchu hlíz vyvolává vývoj anaerobních podmínek v matečných hlízách, čímž podporuje množení bakterií a iniciaci hniloby. Anaerobióza ovlivňuje rezistenci hostitele závislou na kyslíku, což umožňuje neomezené množení bakterií a produkci enzymů degradujících buněčnou stěnu, což pak vede k hnilobné lézi.

Další kritickou podmínkou ve vývoji onemocnění je úroveň kontaminace sadby, jak je ukázáno v případě *Pa*. Čím vyšší je bakteriální hustota, tím pravděpodobněji bude patogen převládat v počínající lézi a tím dříve začne hniloba. Ačkoliv jsou k dispozici pouze omezené údaje týkající se *Dickeya* spp., zdá se, že úroveň kontaminace sadby je méně důležitá pro vývoj bakteriálního černání stonku, možná proto, že jsou agresivnější než *Pectobacterium* spp.

Konkurence uvnitř hničících matečných hlíz, modulovaná podmínkami prostředí, zejména teplotou, určuje, který patogen bude převládat, pokud je přítomen více než jeden. Bakterie měkké hniloby mohou také interagovat s jinými patogeny, zejména vaskulárními, jako jsou *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium* spp., *Verticillium* spp. a *Rhizoctonia solani*. Oslabení rezistence hostitele jedním patogenem může podpořit vývoj jiného.

Strategie ochrany

Byly studovány různé metody kontroly bakteriálního černání stonku a měkké hniloby hlíz (Czajkowski *et al.*, 2011), ale úspěšnost byla proměnlivá. Současné metody založené na zabránění kontaminaci a spoléhání se na systémy certifikace sadby široce rozšířené v rámci Evropské unie (v Česku garantuje certifikaci ÚKZÚZ) jsou jen částečně úspěšné.

Zlepšená správa skladu může snížit bakteriální zátěž hlíz a jejich hnití. Vyvážené hnojení rostlin a zvýšený obsah vápníku v půdě může být součástí integrované strategie jejich ochrany, ale samo o sobě dostatečnou kontrolu patogenů nezajistí. Byly zkoumány jak různé fyzikální (zejména ošetření horkou vodou), tak různé chemické metody (např. sloučeniny na bázi chloru), ale s omezeným úspěchem v praxi.

Šlechtění na odolnost se zatím ne zcela zdařilo ať už z důvodu úzkého rozsahu genetické diverzity v použitém rodičovském šlechtitelském materiálu, nebo nízké priority ve šlechtitelských programech. Relativně nízkou odolnost vůči bakteriálnímu černání stonku a měkké hnilobě hlíz u kultivarů lze posílit využitím vysokých úrovní odolnosti pozorovaných u planých druhů brambor (Dobiáš, 1977). Genetické inženýrství je slibnou alternativou k tradičnímu šlechtění rostlin, které je časově náročné. Již zavedený kultivar by mohl být upraven pro zvýšení odolnosti, aniž by bylo nutné podstupovat časově náročné polní pokusy na jiné znaky. V Evropě však zavádění genů do plodin

z nekřížitelných druhů za účelem zlepšení jejich kvality není společností přijímáno. Námitku proti těmto GM rostlinám by bylo možné zvrátit produkcí cisgenních rostlin brambor místo transgenních. V cisgenním přístupu jsou recipientní rostliny modifikovány geny rezistence z kultivarů nebo linií stejného nebo sexuálně kompatibilního (křížitelného) druhu. Výhodou cisgenních rostlin oproti transgenním rostlinám je to, že použití požadovaného genu, který je již v daném druhu přítomen po staletí, nemění genofond ani nevnaší další vlastnosti.

2.3. Biologická ochrana včetně využití bakteriofágů

Biologická kontrola rostlinných patogenních bakterií by mohla být účinnou alternativou k chemické a fyzikální kontrole a šlechtění na odolnost. Strategie biologické kontroly zahrnují použití bakterií ovlivňujících populace patogenů přímo jejich lovem a následným vysátím (Epton *et al.*, 1990) nebo prostřednictvím antibioly tj. produkcí sekundárních antibakteriálních metabolitů jako např. antibiotika apod. (Cronin *et al.*, 1997; Cladera-Olivera *et al.*, 2006; Trias *et al.*, 2008), soutěže o živiny nebo indukce systémové rezistence rostlin. Jafra *et al.* (2006) se zaměřili na bakterie schopné degradovat signální molekuly mechanismu quorum-sensing produkované *Pectobacterium* spp. a *Dickeya* spp., což je účinná strategie ochrany proti bakteriím bránící větší sekreci pektinolytických enzymů k maceraci pletiv hlíz.

Ačkoli bylo učiněno několik pokusů o kontrolu *Pectobacterium* spp. a *Dickeya* spp. na bramborách s použitím látek biologické ochrany, byla většina omezena na přípravné studie *in vitro*, testy na plátcích brambor nebo rostliny brambor pěstované *in vitro*; pouze několik málo zahrnovalo polní experimenty pro kontrolu konzistence výsledků. Problémem je, že aby antagonist byl aktivní, potřebuje přežít a množit se, nejlépe se usadit na hlíze a v mikroflóře rhizosféry. Dalším požadavkem je příprava stabilní formulace. Agens musí dosáhnout svého cíle, který by se v případě brambor nacházel v lenticelách, suberizovaných ranách a cévním systému, tedy místech, která nejsou vždy snadno dostupná.

Jinou možností biologické kontroly bakteriálních chorob rostlin je použití bakteriofágů, zkráceně fágů. Bakteriofágy jsou viry, které infikují a lyzují bakteriální buňky, jsou z 20–50 % příčinou jejich mortality. Jsou nejpočetnějším biologickým objektem v biosféře, jejich počet se odhaduje na 10^{31} částic. Evoluce fágů probíhá současně s evolucí bakterií, jsou kontinuálně se vyvíjejícím rezervoárem genů. Protože jsou fágy úzce specifické pro své hostitele, neinfikují jiné mikroorganismy. Jsou samoreplikovatelné, perzistentní v životním prostředí a bezpečné k použití, nemohou infikovat ani lidi ani zvířata. Bylo prokázáno, že bakteriofágy mají potenciál kontrolovat řadu rostlinných

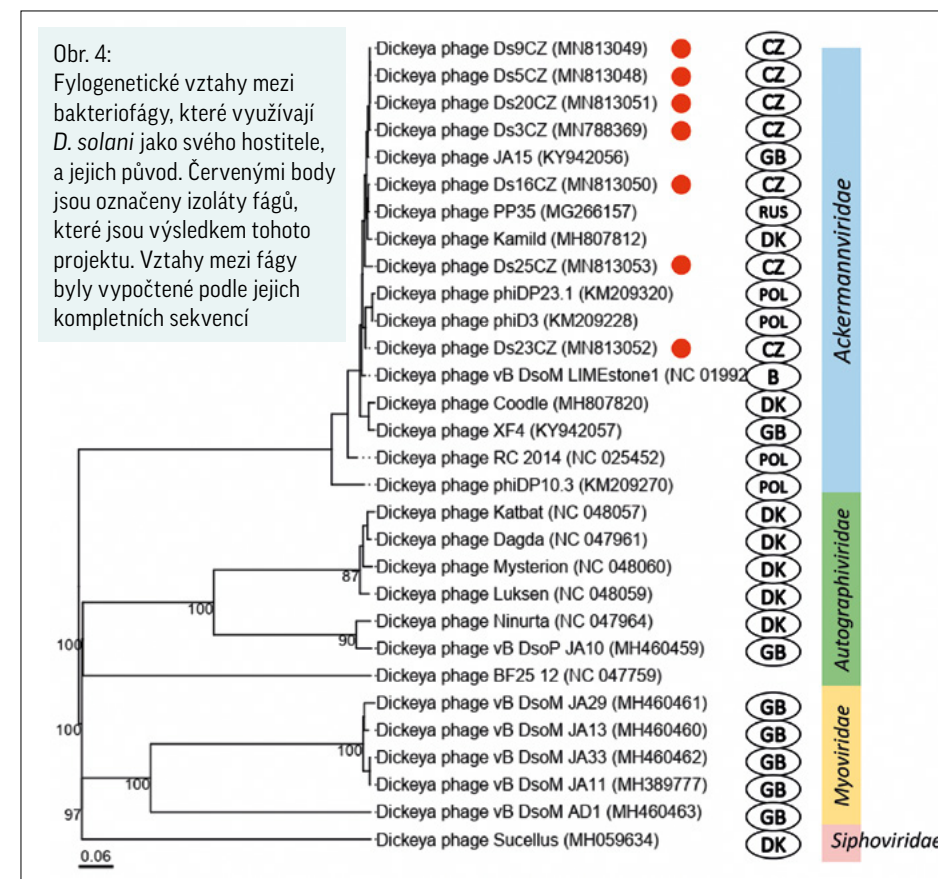
patogenních bakterií (např. *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*) (Jones et al., 2007; Buttner et al., 2017; Jagannathan et al., 2022). Využití bakteriofágů k potlačení bakterií měkké hniloby a bakteriálního černání stonku u brambor se dostalo do popředí po publikaci Ravensdale et al. (2007), kteří prokázali ve skleníkových pokusech snížení výskytu měkké hniloby na hlízách kaly inokulovaných *Pcc* až o 50%. V posledních deseti letech to byly na bramborách především práce Adriaenssens et al. (2012), Lim et al. (2013), Czajkowski et al. (2014), Czajkowski et al. (2015), Czajkowski et al. (2017), Buttner et al. (2018), Carstens et al. (2018), Carstens et al. (2019).

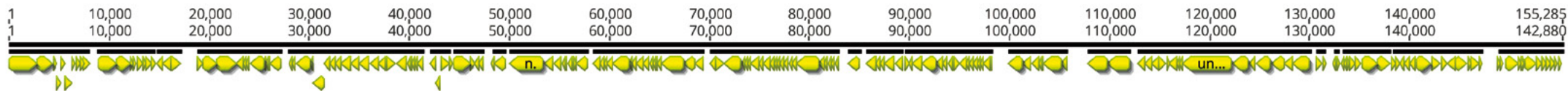
Fágy mohou působit proti nejrůznějším bakteriím, a to i proti takovým, které jsou rezistentní vůči působení antibiotik. Snadno se aplikují, jsou levné a samy se udržují. Není ovšem pravda, že by libovolný nalezený fág mohl být takto použitý. Existuje řada fágů, které se mohou začleňovat do genomu hostitelské bakterie. Při svém vyčleňování a balení do virových částic pak mohou s relativně vysokou pravděpodobností spolu se svým genomem chybně vyčlenit i část genomu hostitele, a tak přenášet do dalších bakterií libovolné geny, včetně genů, které zvyšují virulenci nebo rezistenci bakterií. Prvním předpokladem pro biotechnologické využití fága je proto ujištění, že se jedná striktně o lytického fága, který hostitelské buňky účinně lyzuje a v žádném případě se do nich nezačleňuje. Dalším předpokladem je, že fág nekóduje žádný protein, který by mohl v eukaryotických organismech působit jako toxin nebo alergen. Tady je zapotřebí znát genom bakteriofága a porovnat vlastnosti jím kódovaných proteinů s databázemi známých toxinů a alergenů.

Protože bakteriofágy jsou striktně vázány na své bakteriální hostitele, předpokládá se, že jejich rozšíření bude víceméně kopírovat rozšíření jejich hostitelů. *Dickeya solani* van der Wolf 2014 je relativně nedávno objevený patogen, který se začal šířit v Evropě po roce 2004. S výjimkou trávy šáchoru hlíznatého (*Cyperus rotundus* L.), která je pravděpodobným původním hostitelem bakterie, je jediným dalším hostitelem lilek brambor (*Solanum tuberosum*). V Česku byl výskyt *D. solani* zaznamenán v roce 2012, od té doby se bakterie na našem území sporadicky vyskytuje. Dosavadní genetické studie ukazují na to, že *D. solani* je geneticky velmi málo variabilní patogen. Protože zdrojem bakterie jsou s velkou pravděpodobností infikované hlízy, dochází v praxi k rotaci a přenosu jen několika málo bakteriálních populací. To by mohlo být považováno za výhodu pro eventuální biologickou ochranu, protože v tomto případě by fágy mohly rozeznávat a lyzovat prakticky všechny málo rozrůzněné populace této bakterie. Vzhledem k relativní novosti bakterie, obtížné rozlišitelnosti symptomů infekce způsobené *D. solani* od infekcí způsobených jinými bakteriemi jako *Pectobacterium atrosepticum*, *P. caro-*

torum, *D. dianthicola* apod., chybami v klasifikaci sbírkových položek, je nutné řadu zjištěných uváděných v literatuře a týkajících se účinku jednotlivých bakteriofágů na konkrétní bakteriální kmeny vyhodnocovat s obezřetností.

Komerční dostupnost bakteriofágů je velmi omezená. Ve DSMZ sbírce mikroorganismů (Braunschweig, Německo) ani v ATCC sbírce (USA) není deponován ani jeden bakteriofág proti *Dickeya solani* nebo *Pectobacterium* sp., který by bylo možné získat. Přitom bylo k 28. 6. 2022 v databázi sekvencí GenBank evidováno 10 referenčních sekvencí fágů proti *D. solani*, a 39 sekvencí proti *Pectobacterium* sp. Existující bakteriofágy proti *D. solani* jsou klasifikovány mezi fágy s kontraktilním bičíkem (*Myoviridae*), fágy s nekontraktilním bičíkem (*Ackermannviridae*, *Siphoviridae*), i mezi bezbičíkatými fágy (*Autographiviridae*) (Viz Obr. 4). S výše uvedenými bakteriofágy však prakticky disponují zatím pouze výzkumné skupiny.





Obr. 5: Genom limestone viru *Dickeya virus Ds3CZ*. Šipky znázorňují pozici a orientaci jednotlivých genů

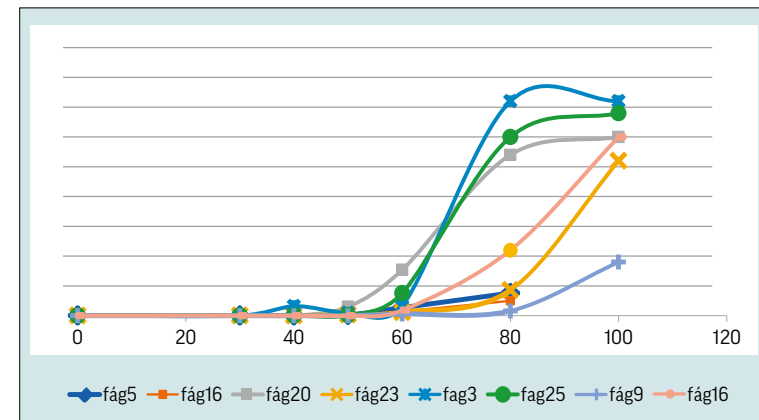
V letech 2019–2021 jsme prováděli v různých lokalitách ČR sběr vzorků půdy, symptomatických pletiv a pracích vod s cílem nalézt specifické fágy k *D. solani* a *Pectobacterium* sp. způsobujícím onemocnění známé jako bakteriální černání stonku a měkká hniloba hlíz bramboru. Vzorky byly testovány proti bakteriálnímu kmenu *D. solani* 050 ze sbírky CPPB (VÚRV Praha, Ruzyně), který byl odebrán z lenticel odrůdy brambor Laura ve Valečově. Z více než 1000 vzorků jen 9 obsahovalo lytické fágy. Po jejich sekvenování jsme rozlišili 7 unikátních sekvencí, které všechny patřily fágům rodu Limestonevirus (viz foto na obálce). Podobné fágy byly předtím už nalezeny ve Velké Británii, Polsku, Rusku, Dánsku a Belgii, jedná se tedy o relativně rozšířené fágy, pravděpodobně více odolné vůči vlivu prostředí, které produkují větší množství virionů z jedné infikované buňky (90–150 pfu/b). Bakteriofágy z jiných čeledí se nám nepodařilo nalézt, je možné, že jejich výskyt je omezen jen na konkrétní lokality nebo na specifické bakteriální kmeny, které se u nás nevyskytují.

Při detailní analýze genomů všech nalezených limestonevirů jsme zjistili, že jednotlivé fágy se liší jen velmi málo. Jejich genom je dlouhý 149 364–155 285 pb a je na něm 194–206 genů (Obr. 5). Za rozdíly v délce sekvencí stojí v první řadě přítomnost nebo nepřítomnost parazitických genů (homing endonucleases). Těch bylo nalezeno od 15 do 23 v jednom genomu. Tyto geny jsou v genomu nestabilní a mohou se během infekce přenášet na jiná místa a do jiných bakterií. Tím způsobují zmíněnou variabilitu a rovněž mutace v dalších genech. Biologie limestonevirů a funkce jejich jednotlivých genů nejsou dosud příliš detailně známé. Virové částice jsou utvořeny z přibližně 16 různých proteinů. Hlavní kapsidový protein (major capsid protein), který tvoří hlavu fága, má velikost kolem 48 kDa, hlavní protein tvořící bičík má velikost kolem 69 kDa. Na genomu jsou na základě podobnosti s jinými fágy identifikovány klíčové enzymy nutné pro replikaci fágového genomu, jako jsou DNA helikáza a DNA polymerázy, stejně jako opravné enzymy a endolyzin, který zodpovídá za lyzi hostitelských buněk. Pro přibližně 160 genů však jejich funkce a význam neznáme.

Pro praktické použití fágů je důležitá informace, že k nasednutí fágů na povrch hostitelských bakterií dochází během 10–20 minut a za dalších 30–40 minut začínají buňky lyzovat. Tyto parametry se u jednotlivých našich izolátů mírně liší, nejrychleji dochází k lyzi buněk u fága Ds20CZ, nejpomaleji u fága Ds9CZ. Při lyzi se z každé buňky uvolní

přibližně 100 fágových částic, nejvíce u fága Ds3CZ, nejméně u fága Ds5CZ (Obr. 6). Proto jsme pro polní pokusy a testování účinnosti fágů na hlízách připravili přípravek, který obsahuje směs fágů Ds3 a Ds20 v poměru 50–70% fága Ds3 a 30–50% fága Ds20.

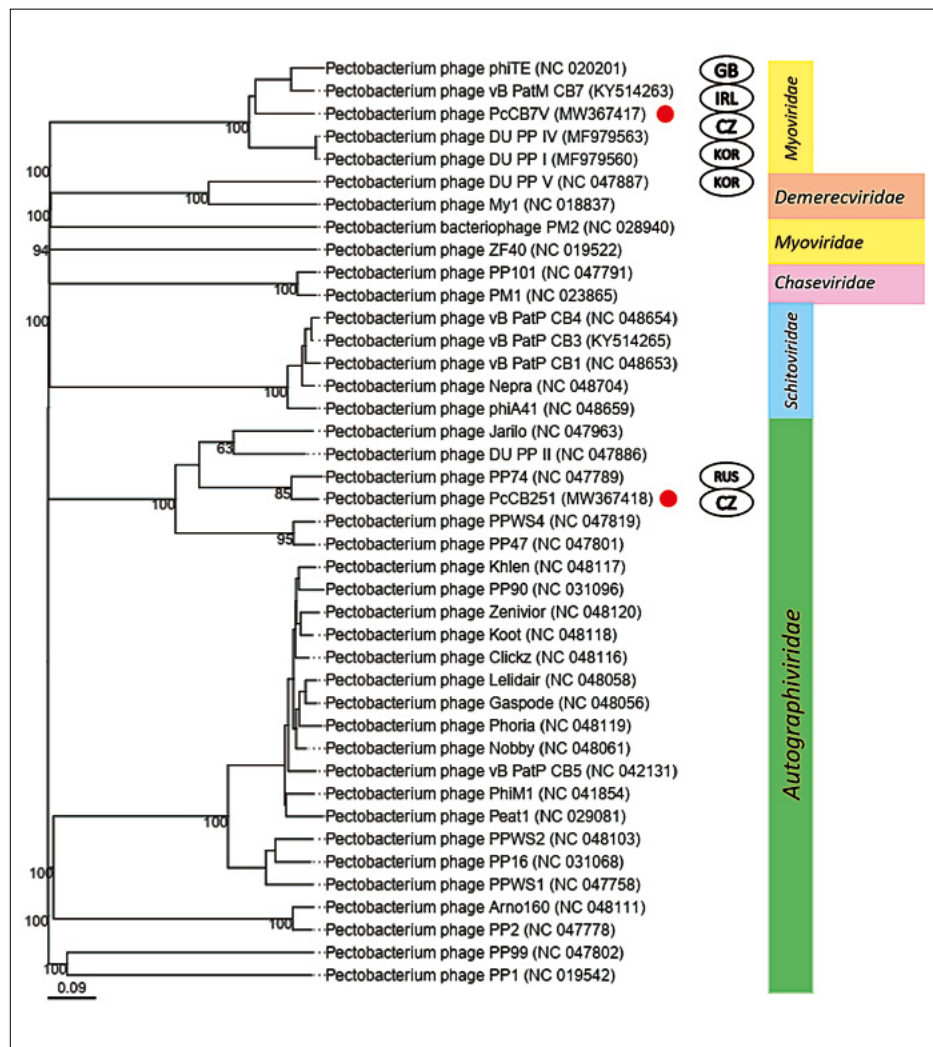
Obr. 6: Růstové křivky bakteriofágů Ds3, Ds5, Ds9, Ds16, Ds20, DS23, Ds25 na hostiteli *D. solani* 050. Na vodorovné ose je čas od okamžiku inokulace v minutách



Jak bylo uvedeno výše, bakteriofágů, které využívají bakterie *Pectobacterium* sp. jako své hostitele, je známo mnohem více. Bakterie *P. parmentieri*, v současnosti identifikovaná jako jeden z nově se šířících původců bakteriálního černání stonku, je velmi variabilní bakterie, u které se rozlišuje minimálně 5 variant genomu. Vzhledem k častým reorganizacím, taxonomickým změnám u druhu *Pectobacterium* a nepřesné diagnostice není vždy zcela jasné, jaká je specifita popsaných fágů podle současné bakteriální taxonomie. Naše vzorky byly proto testovány proti kmenům *Pectobacterium* 084, 087, 145 a 224 z CPPB sbírky (VÚRV, Praha), které byly všechny izolovány ze symptomatických hlíz bramboru z území ČR, a proti kmenu *P. parmentieri* 8475 (sbírka CFBP, Beaucouzé, Francie).

Přestože rozšíření patogenních pectobakterií je mnohem širší než u *D. solani*, v téměř 500 vzorcích jsme zachytili a izolovali pouze dva různé fágy, jeden s kontraktálním bičíkem PcCB7V, druhý s velmi krátkým bičíkem PcCB251. Po analýze jejich sekvencí byly tyto fágy klasifikovány do rodu Certrevirus (*Myoviridae*) a do rodu Berlinvirus (*Autographiviridae*) (Obr. 7). V obou případech se jednalo o fágy se statusem nových druhů pro dané rody.

Obr. 7: Phylogenetické vztahy mezi bakteriofágy, které využívají *Pectobacterium* sp. jako svého hostitele. Červenými body jsou označeny nově nalezené fágy



Růstové charakteristiky obou pektofágů jsou podobné. Doba od infekce do začátku lyze je u obou fágů kolem 45 minut a v jedné infikované buňce se vytvoří kolem 100 virových částic. Fág PcCB7V je schopen infikovat a lyzovat několik bakteriálních kmenů – v našem případě lyzoval kmeny CPPB 084, 145 a 224. Fág PcCB251 měl užší rozmezí hostitelů a lyzoval jen kmen CPPB 084 a kmen CFPB 8475. Přestože jsou

nalezené fágy specifické jen k několika málo bakteriálním kmenům, v předpokládaném použití ve směsi s dalšími fágy budou představovat významné obohacení spektra použitelných bakteriofágů.

Využití bakteriofágů pro kontrolu přítomnosti a omezení výskytu fytopatogenních bakterií je velmi perspektivní, protože v současnosti neexistují jiné efektivní způsoby, jak bakterie regulovat. Použití antibiotik, ke kterým jsou bakterie citlivé, není vzhledem k celosvětovému problému vzniku bakteriálních kmenů rezistentních k antibiotikům možné. Jediným přirozeným antagonistou bakterií jsou tak bakteriofágy. Je však třeba si uvědomit, že vzájemné působení fágů a bakterií je možné jen za určitých podmínek. Musí především probíhat ve vodném prostředí, protože bakteriofágy nejsou schopné se aktivně pohybovat, a oba organismy se musí vyskytovat v takových koncentracích, aby existovala pravděpodobnost, že se mohou v prostředí setkat. Doporučovanou pracovní koncentrací fágů je proto minimálně 10^6 pfu/ml. Poklesne-li koncentrace bakterií v prostředí pod určitou mez, bakteriofágy nenaleznou své hostitele, nebudou se množit a z prostředí časem vymizí působením fyzikálních, chemických a biologických vlivů. V prostředí však zůstane nenulová koncentrace bakterií.

Stejně jako v případě vzniku rezistence k antibiotikům, mohou vzniknout i bakterie rezistentní k bakteriofágům. Nejjednodušším mechanismem vzniku rezistence je změna v receptoru na povrchu bakterií, na který se bakteriofág váže. Na druhou stranu, i bakteriofág může mutacemi měnit svou schopnost vázat se na konkrétní receptor a může tak překonat bakteriální rezistenci. Těmto procesům nedokážeme zabránit, je to přirozená schopnost všeho živého. Cestou, jak se vyhnout vzniku rezistentních bakterií, je ale aplikace směsí fágů, které využívají různé receptory na povrchu bakterií. Předpokládá se, že v takovém případě nebude bakterie schopná vytvořit několikanásobného mutantu v několika receptorech současně a podlehne infekci. V různých aplikacích byly laboratorně zkoušeny směsi až desítek různých fágů (Carstens *et al.*, 2018), které vykazovaly prokazatelný kurativní účinek. Je přitom výhodou, když jsou ve směsi fágy z různých taxonomických skupin a s různým rozmezím hostitelských bakterií. V našem případě jsme použili dva geneticky odlišné izoláty fágů využívající bakterii *Dickeya* a máme k dispozici dva různé fágy se specificitou k bakterii *Pectobacterium*. Jejich funkčnost na uměle inokulovaných hlízách i v polním pokusu je uvedena dále.

2.4. Výsledky pokusů

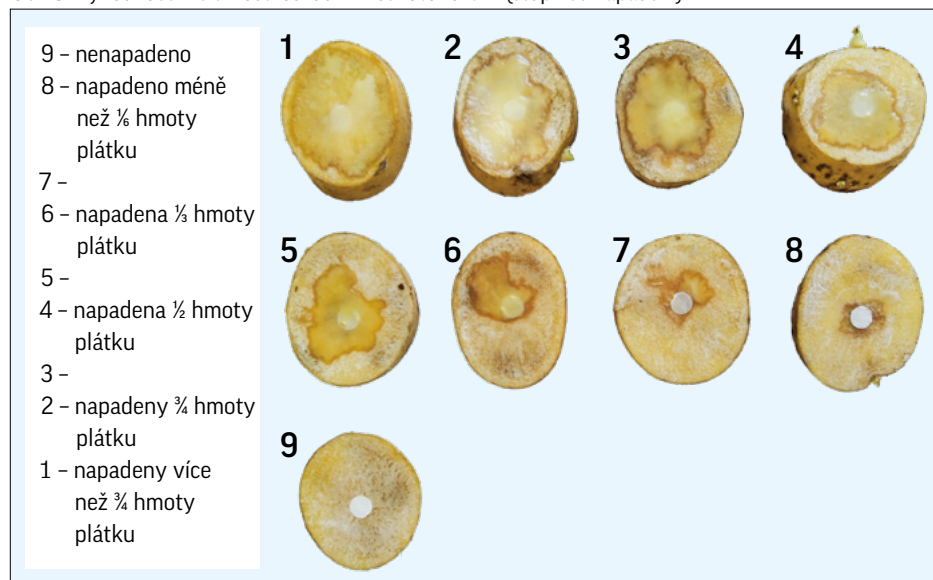
2.4.1. Stanovení citlivosti odrůd k měkké hnilobě hlíz a bakteriálnímu černání stonku

Cílem experimentů bylo zjištění citlivosti vybraného sortimentu odrůd bramboru firmy Vesa Velhartice, a. s., k bakterii *Pectobacterium carotovorum*, *P. atrosepticum* a *D. solani* pomocí umělé inokulace hlíz a stonků. Do pokusů byly v roce 2019 zařazeny odrůdy: Alice, Bella, Bohemia, David, Dominika, Jasmina, Jindra, Katy, Magda, Mariannka, Monika, Primarosa, Red Anna, Suzan, Verne, Vysočina, Westamyl. Pokusy byly provedeny v roce 2019, 2020 a 2021 na dvou pracovištích, tj. VÚB Havlíčkův Brod, s. r. o., a Vesa Velhartice, a.s.

Zjištění citlivosti odrůd k *P. carotovorum* a *D. solani*

Pro zjištění citlivosti odrůd k *P. carotovorum* a *D. solani* byla použita metoda infekce plátků hlíz kotoučky filtračního papíru nasycenými bakteriální suspenzí (Dobiáš, 1976). K infekci byla použita suspenze bakterie *P. carotovorum* a *D. solani* vysoce patogenních kmenů CPPB-201 a CPPB-050 o hustotě 500 tisíc jednotek na 1 ml pocházející ze Sbirky patogenních bakterií VÚRV Praha. Citlivost byla hodnocena třetí den po infekci podle bonitační stupnice 9-1 (Obr. 8):

Obr. 8: Vyhodnocení citlivosti odrůd k *P. carotovorum* (stupnice napadení)



Zjištění citlivosti odrůd k *P. atrosepticum*

Pro zjištění citlivosti odrůd k *P. atrosepticum* byla použita metoda infekce mladých rostlin ve skleníku (Dobiáš, 1976). K inokulaci byl ponechán pouze jeden stoněk. Inokulace byla provedena při velikosti rostlin 8 cm injekční stříkačkou s bakteriální suspenzí o hustotě 500 tisíc jednotek na 1 ml (kmen CPPB-081), a to vpichem do stonku ve výšce cca 0,5-1 cm nad substrátem. Napadení rostlin bylo hodnoceno osmý den po infekci bonitační stupnicí odolnosti 9-1:

- 9 – nenapadeno
- 8 – v místě vpichu patrná hnědá nekróza, která zasychá
- 7 –
- 6 – macerované pletivo v rozsahu cca 2 cm kolem vpichu začíná černat, listy začínají žloutnout
- 5 –
- 4 – černání stonku v rozsahu cca 5 cm, listy žloutnou
- 3 –
- 2 – černání stonku v rozsahu cca 10 cm, lámou se, listy žluté
- 1 – celá rostlina zasažena černáním stonku a odumírá

Hodnocení citlivosti odrůd k pektinolytickým bakteriím

Celkové hodnocení bylo provedeno podle následující Tab. 2.

Tab. 2: Stupnice odolnosti odrůd bramboru k pektinolytickým bakteriím

Odolnost odrůd	Průměrné napadení
I. Odrůdy odolné	8,99 až 7,50
II. Odrůdy částečně odolné	7,49 až 6,00
III. Odrůdy náchylné	5,99 až 4,50
IV. Odrůdy silně náchylné	4,49 až 3,00
V. Odrůdy velmi silně náchylné	2,99 až 1,00

Ve sledovaném sortimentu genotypů bramboru nebyly nalezeny žádné odolné (tolerantní) odrůdy k *P. carotovorum* a *D. solani* (Tab. 3). Odrůdy Vysočina, Katy a Suzan byly odolné (tolerantní) k *P. atrosepticum*. Mezi odrůdy částečně odolné (tolerantní) k *P. carotovorum* patřily Bella a Vysočina. Mezi odrůdy částečně odolné (tolerantní) k *P. atrosepticum* patřily Magda, Monika, Dominika, Jindra, Primarosa, Verne, David, Bella a Alice. Mezi odrůdy částečně odolné (tolerantní) k *D. solani* patřily Bella, Vysočina a Katy. Žádné odrůdy nebyly velmi silně náchylné ke sledovaným bakteriím. Na základě těchto výsledků byla k dalším experimentům vybrána silně náchylná odrůda Red Anna.

Tab. 3: Citlivost genotypů bramboru k *P. carotovorum*, *P. atrosepticum* a *D. solani*

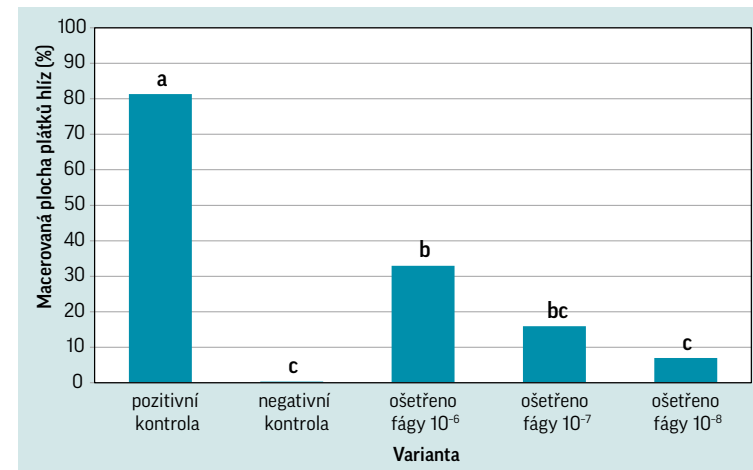
Citlivost odrůd	Druh bakterie		
	<i>P. carotovorum</i>	<i>P. atrosepticum</i>	<i>D. solani</i>
Odolné	–	Vysočina, Katy, Suzan	–
Částečně odolné	Bella, Vysočina	Magda, Monika, Dominika, Jindra, Primarosa, Verne, David, Bella, Alice	Bella, Vysočina, Katy
Náchylné	Monika, Suzan, Primarosa, Mariannka, David, Magda, Katy	Jasmína, Mariannka, Bohemia, Westamyl	Verne, Monika, Suzan, Dominika, Mariannka, David, Primarosa, Magda
Silně náchylné	Jindra, Red Anna, Westamyl, Jasmína, Bohemia, Alice, Verne, Dominika	Red Anna	Jindra, Jasmína, Red Anna, Bohemia, Westamyl, Alice
Velmi silně náchylné	–	–	–

2.4.2. Laboratorní testy účinnosti vybraných fágů na bakterii *Dickeya solani* a *Pectobacterium carotovorum*

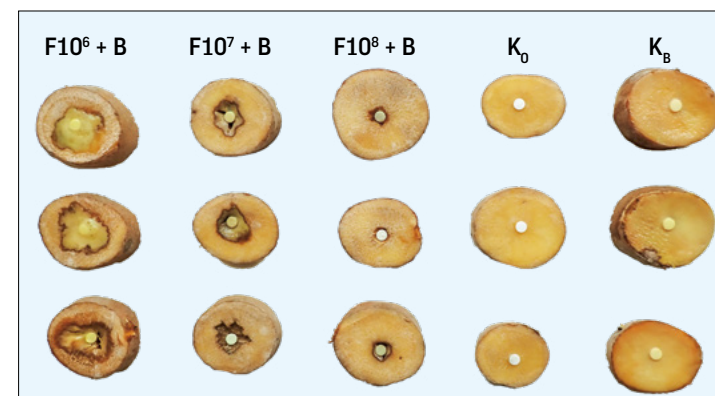
Cílem experimentů bylo zjistit účinnost vybraných lytických fágů na bakterii *D. solani* a *P. carotovorum*. K testům byly použity hlízy odrůdy Red Anna, suspenze bakterií *D. solani* CPPB-050 a *P. carotovorum* CPPB-087 a dále směsi fágů Ds3CZ + Ds20CZ a PcCB7V + PcCB251.

V prvním experimentu s *D. solani* prováděném ve VÚB byla použita modifikovaná metoda infekce nakrájených plátků hlíz kotoučky filtračního papíru (Kmoch *et al.*, 2020). Ty byly nasycené bakteriální suspenzí (5×10^5 bakterií/ml) s tím, že 10 min před položením nasycených kotoučků filtračního papíru bylo na plátky pipetou naneseno 200 μ l fágového roztoku o koncentraci 10^6 , 10^7 a 10^8 pfu/ml. Po třech a pěti dnech inkubace bylo provedeno vyhodnocení pokusu počítačovou analýzou obrazu a byl zjištěn rozsah infekce plátků hlíz (% macerované plochy) jednotlivých variant. Výsledky hodnocené analýzou rozptylu (ANOVA a Tukey HSD) jsou uvedeny na Obr. 9 a 10.

Obr. 9: Macerovaná plocha plátků jednotlivých variant po 3 dnech od inokulace



Obr. 10: Infekce plátků hlíz ošetřených různými koncentracemi fágového roztoku po 5 dnech od inokulace

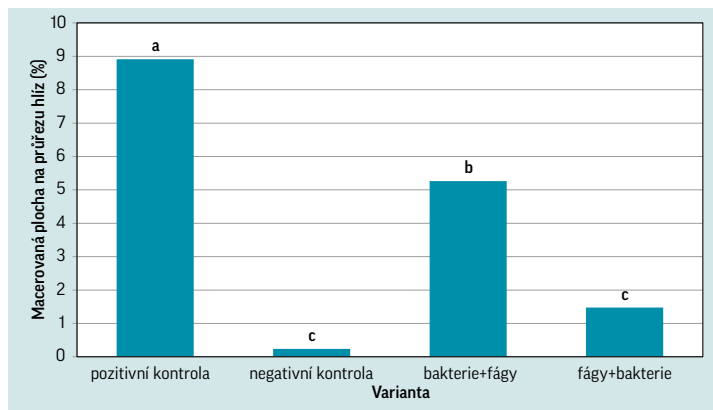


Mezi pozitivní kontrolou inokulovanou pouze bakteriálním kmenem CPPB050 a variantami nejdříve ošetřenými směsí fágů byl zjištěn statisticky vysoce průkazný rozdíl v rozsahu infekce. Zatímco pozitivní kontrola měla macerovanou plochu plátků z 81%, varianta ošetřená fágy o koncentraci 10^6 pfu/ml ji měla 33%, varianta ošetřená koncentrací 10^7 pfu/ml ji měla 16% a varianta ošetřená koncentrací 10^8 pfu/ml ji měla pouze 7%. Mezi touto variantou a pozitivní kontrolou tedy došlo k relativnímu snížení macerované plochy o 91%.

V druhém experimentu opět s *D. solani* prováděném ve VÚB byly celé hlízy uměle poraněny vpichem ocelové tyčky o průměru 3mm v pupkové a korunkové části do hloubky 10 mm. Do vpichů poraněných hlíz byl pipetou buď nejprve nanesen fágový roztok o koncentraci 10^8 pfu/ml následovaný po deseti minutách nanesením 10 μ l bakteriální suspenze anebo nejprve nanesena bakteriální suspenze (5×10^5 bakterií/

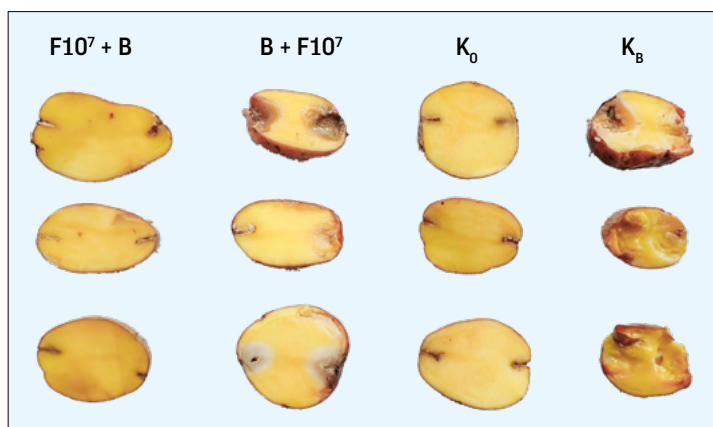
ml) následovaná obdobně 10 µl fágového roztoku. Po třech dnech inkubace byly hlízy rozříznuty přes očkovací body a zjištěn rozsah infekce. Výsledky hodnocené analýzou rozptylu jsou uvedeny na Obr. 11. Ilustrativní foto s fágovým roztokem o koncentraci 10^7 pfu/ml je na Obr. 12.

Obr. 11:
Macerovaná plocha na průřezu hlíz po 3 dnech inkubace



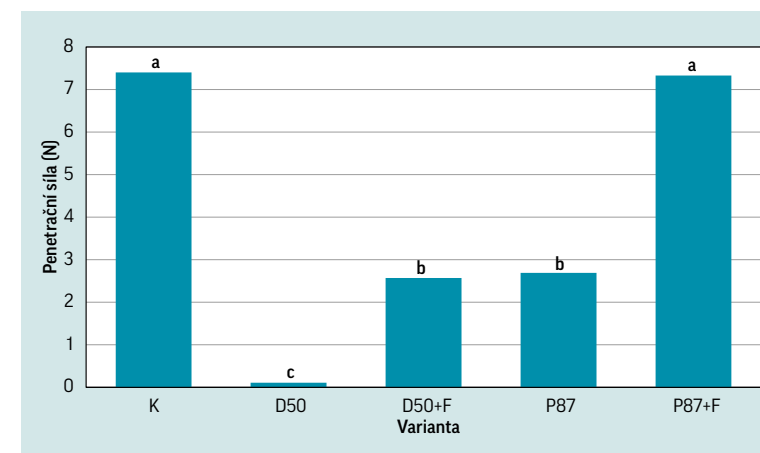
Mezi pozitivní kontrolou inokulovanou pouze bakteriálním kmenem CPPB050 a variantami následně ošetřenou směsí fágů a nejdříve ošetřenou směsí fágů byl zjištěn statisticky vysoce průkazný rozdíl v rozsahu infekce. Zatímco pozitivní kontrola měla po přeříznutí hlíz v místě vpichu macerovanou plochu z 9%, varianta následně ošetřená fágy o koncentraci 10^8 pfu/ml ji měla z 5% a varianta ošetřená nejdříve fágy ji měla pouze 1%. Mezi touto variantou a pozitivní kontrolou tedy došlo k relativnímu snížení macerované plochy o 89%.

Obr. 12:
Infekce vpichu jednotlivých variant neošetřených a v opačném pořadí ošetřených fágy po přeříznutí hlíz v místě vpichu



Ve třetím experimentu prováděném na VŠCHT se posuzovala účinnost vybraných lytických fágů na bakterie ve statickém prostředí, při namáčení oloupaných bramborových hlíz. K testům byly použity bakterie *D. solani* CPPB-050 a směs fágů Ds3CZ a Ds20CZ v poměru 50–70% fága Ds3 a 30–50% fága Ds20 a bakterie *P. carotovorum* CPPB-087 a roztok fágů PccB7V a PccB251 v poměru 50% PccB7V a 50% PccB251. Roztoky fágů byly použity v koncentraci 10^7 pfu/ml. Inhibiční účinky fágů na růst bakterií byly proměřeny pomocí kultivace na válečcích brambor uzavřených v sáčcích. Účinek bakteriofágů na inhibici růstu byl testován u těchto válečků pomocí stanovení penetrační síly F (N) brambor, resp. tvrdosti brambor, protože fytopatogenní bakterie způsobují během rozvoje hniloby maceraci pletiv, tedy i snížení tvrdosti brambor. Výsledky hodnocené analýzou rozptylu (ANOVA a Tukey HSD) jsou uvedeny na Obr. 13.

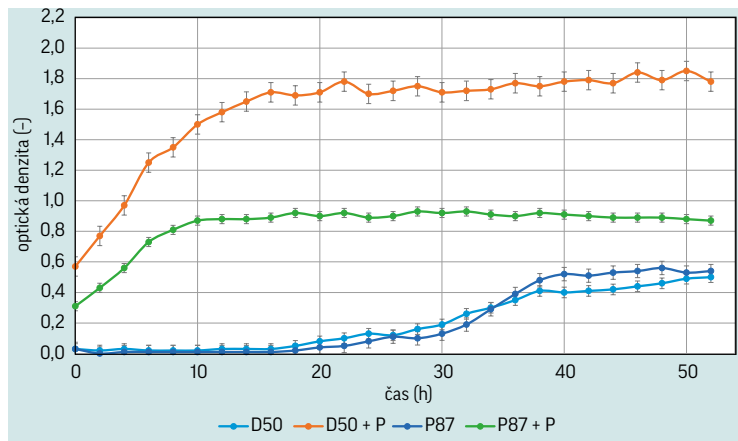
Obr. 13:
Tvrdost bramborových válečků na začátku (kontrola) a na konci skladovacího pokusu po 72 hod



Je vidět, že ošetření brambor pomocí bakteriofágů mělo pozitivní vliv na tvrdost brambor (zpomalení bakteriálního rozkladu). U varianty P87 + F došlo prakticky k jeho zastavení, i když k úplnému zastavení mikrobiologického rozkladu nedošlo.

Ve čtvrtém experimentu prováděném na VŠCHT se posuzovala účinnost vybraných lytických fágů na bakterie v dynamickém prostředí, kdy docházelo k promíchávání media s rotací 1 000 otáček/min. K testům byly použity opět bakterie *D. solani* CPPB-50 a směs fágů Ds3CZ a Ds20CZ v poměru 50–70% fága Ds3 a 30–50% fága Ds20 a bakterie *P. carotovorum* CPPB-87 a roztok fágů PccB7V a PccB251 v poměru 50% PccB7V a 50% PccB251. Roztoky fágů byly použity v koncentraci 10^7 pfu/ml. Experiment *in vitro* v tekutém médiu (v tomto případě TSB bujónu) byl proveden v laboratorním bioreaktoru RTS-8 vyhodnocujícím optickou denzitu roztoku (bujónu). Výsledky jsou uvedeny na Obr. 14.

Obr. 14:
Vliv bakteriofágů
na růstové křivky
fytopatogenních
bakterií
(CPPB-050
a CPPB-087)



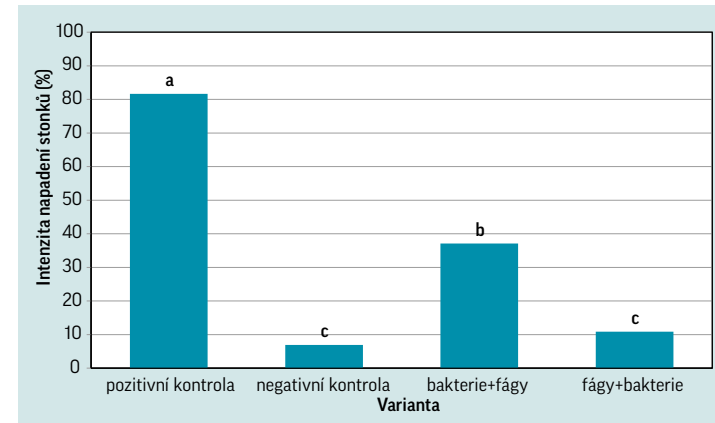
Tento pokus nepotvrdil inhibiční účinky bakteriofágů na růst vybraných fytopatogenních bakterií. V případě samotných bakterií došlo po 50 hodinách kultivace (při 15 °C) k pomnožení bakterií až na hodnotu optické denzity 0,5 až 0,6, přičemž exponenciální fáze růstu začala až po přibližně 20 hodinách kultivace. Naopak v bujónech, do kterých byla inokulována společně s bakteriemi i suspenze bakteriofágů, došlo k výrazně vyššímu nárůstu optické denzity. V případě P87+F byla optická denzita po 50 hodinách přibližně 2× vyšší ve srovnání s P87 a u vzorku D50+F byla naměřena optická denzita dokonce 3× vyšší. Kultivační bujóny naočkované bakteriemi a obsahující bakteriofágy přešly do exponenciální fáze růstu mnohem dříve.

Protože bakteriofágy nejsou dostatečně účinné v dynamickém prostředí, je nutné pro aplikaci při praní hlíz uvažovat operace, kdy prostředí umožní fágům navázání na bakterie. Takovými operacemi může být namáčení do roztoků fágů nebo postřik hlíz roztoky fágů.

2.4.3. Skleníkové testy účinnosti vybraných fágů na bakterii *Dickeya solani*

Cílem experimentu bylo ověřit v nádobových pokusech na celých poraněných hlízách výsledky laboratorních experimentů. K testům byly opět použity hlízy odrůdy Red Anna, suspenze bakterií *D. solani* CPPB-50 a směs fágů Ds3CZ a Ds20CZ. Hlízy byly obdobně poraněny vpichy jako v druhém laboratorním pokusu a směs fágů byla aplikována pipetou ve formě roztoku na poraněné hlízy bramboru třicet minut před a po inokulaci bakterií *D. solani*. Po inokulaci byly hlízy vysazeny do kontejnerů (10 × 10 cm). V průběhu vegetace (5–6 týdnů po inokulaci) byla hodnocena závažnost onemocnění rostlin (intenzita napadení) bakteriálním černáním stonku bramboru jednotlivých variant pokusu a výsledky byly statisticky vyhodnoceny (ANOVA a Tukey HSD), viz Obr. 15 a 16.

Obr. 15:
Vyhodnocení
účinnosti roztoku
fágů Ds3CZ
a Ds20CZ
(koncentrace
10⁷ pfu/ml)
v nádobovém pokusu
ve skleníku pomocí
umělé
inokulace hlíz
(metoda
napíchnutí hlíz)



Obr. 16:
Intenzita napadení
rostlin bramboru
po aplikaci roztoku
fágů (metoda
napíchnutí hlíz)



Mezi napadením stonků u pozitivní kontroly a napadením stonků variant následně a nejdříve ošetřených směsí fágů byl zjištěn statisticky vysoce průkazný rozdíl. Zatímco pozitivní kontrola měla napadeno 82% stonků, varianta s následným ošetřením fágy měla napadeno 37% stonků a varianta s ošetřením předcházejícím inokulací měla napadeno pouze 11% stonků. Mezi touto variantou a pozitivní kontrolou tedy došlo k relativnímu snížení počtu napadených stonků o 87%.

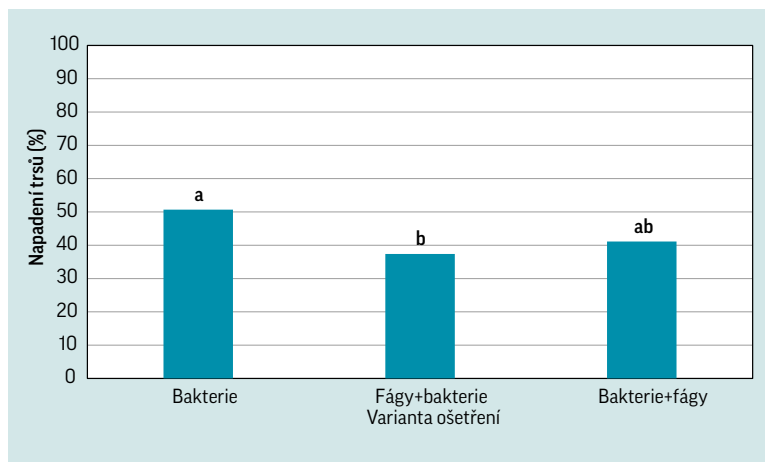
2.4.4. Poloprovozní pokusy účinnosti vybraných lytických fágů na bakterii *Dickeya solani*

Cílem poloprovozních pokusů bylo ověřit výsledky laboratorních a skleníkových experimentů v reálných poloprovozních podmínkách na poli a na posklizňových linkách.

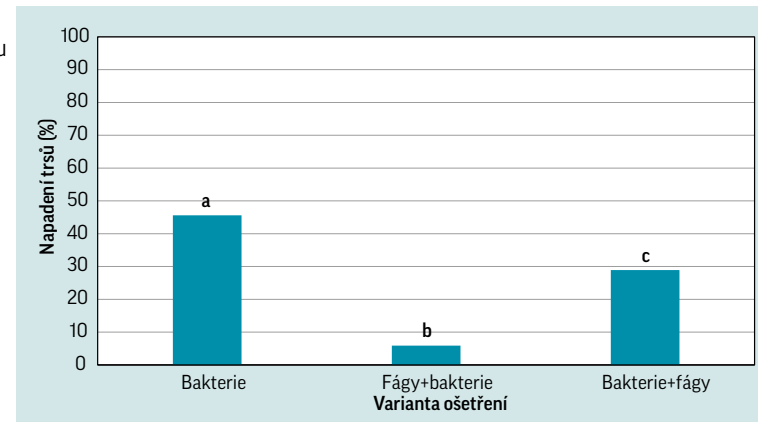
Polní maloparcelkové pokusy byly založeny poslední 2 roky řešení na dvou stano-
vištích (Výzkumná stanice VÚB Havlíčkův Brod ve Valečově, Vesa Velhartice, a. s.)
s odrůdou Red Anna. Její hlízy byly inokulovány bakteriálním kmenem *D. solani* CPPB-
050 o hustotě 5×10^5 bakterií na 1ml a ošetřeny směsí fágů Ds3CZ a Ds20CZ o kon-
centraci 10^7 pfu/ml. V roce 2021 byly před výsadbou odklíčené sadbové hlízy nebo
hlízy s otevřenými lenticelami (Gill et al., 2014) namočené do bakteriální suspenze a při
výsadbě mořené postřikem fágovým roztokem. U bakterií inokulovaných kontrol bez
ošetření fágy nedošlo k významně vyššímu výskytu bakteriálního černání stonku,
takže nešlo rozhodnout, zda bylo moření fágy účinné. Proto v roce 2022 byly sadbové
hlízy bezprostředně před výsadbou těžce mechanicky poraněny překrojením nebo
vpichem do pupku ocelovou tyčkou o průměru 3mm do hloubky 10mm. Bakteriální
suspenze i roztok fágů byly aplikovány v den výsadbý namočením. V průběhu vege-
tace byl po jednotlivých trsech hodnocen výskyt bakteriálního černání stonku v šesti
termínech od vzejití do zapojení porostu a při sklizni výnos jednotlivých parcelék dále
přepočtený na ha.

Diskutovány jsou proto výsledky z posledního roku 2022. Výsledky výskytu bak-
teriálního černání stonku ve Valečově v termínu 5 (24. 6. 2022) hodnocené analýzou
rozptylu jsou uvedeny na Obr. 17 a 18.

Obr. 17:
Procento
výskytu
bakteriálního
černání stonku
po trsech
u variant s krá-
jenou sadbou

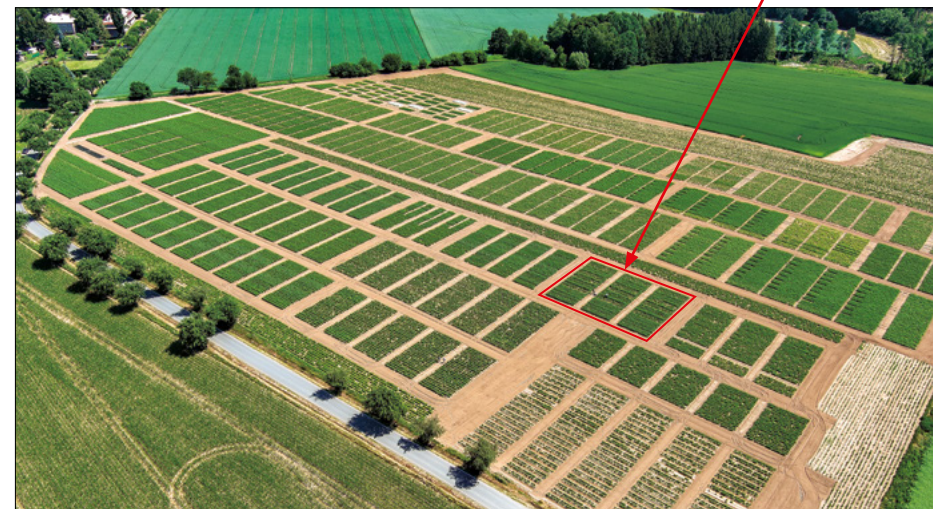


Obr. 18:
Procento výskytu
bakteriálního
černání stonku
po trsech
u variant
s napichnutými
hlízami



U krájené sadby měla varianta namočení nejdříve v roztoku fágů následovaná po 30
minutách namočením v bakteriální suspenzi (FB) proti variantě namočení pouze v bak-
teriální suspenzi (B) vysoce průkazně nižší napadení trsů 37%, resp. 51%. Došlo k rela-
tivnímu snížení napadení o 27%. U sadby poškozené vpichem do pupku byly vysoce
průkazně rozdíly mezi všemi variantami. U varianty B mělo 46% trsů výskyt bakteriál-
ního černání stonku, u varianty FB 6% trsů a u varianty BF, kde předcházelo namočení
v bakteriální suspenzi namočení v roztoku fágů, to bylo 29% trsů. Mezi variantami B
a FB došlo k relativnímu snížení napadení o 87%.

V termínu 3 (15. 6. 2022) byla pomocí fotografických snímků pořízených RGB kame-
rou na UAV zjišťována plocha vegetačního krytu jednotlivých variant:



Trojřádkové parcelky variant krájené sadby jsou na Obr. 19. a na Obr. 20 jsou parcelky variant s napíchnutými hlízkami.

Obr. 19:
Foto jednoho opakování parcelky variant s krájenou sadbou



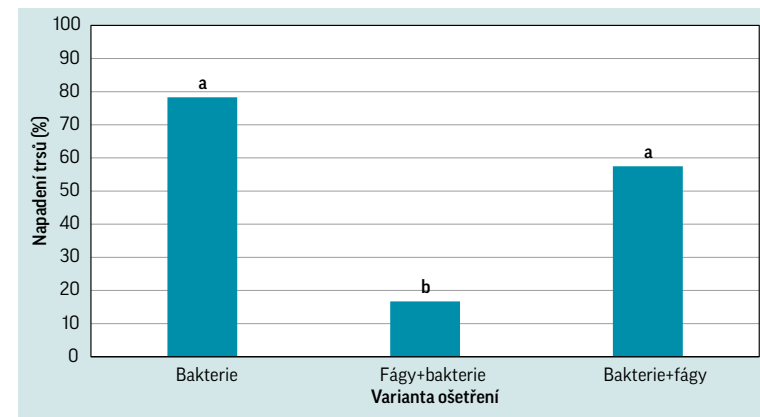
Obr. 20:
Foto jednoho opakování parcelky se sadbovými hlízkami poškozenými vpichem do pupku



Z obrázků je vidět, že nejlepší porosty měly varianty FB, následované BF a nejhorší měly varianty B, což pořadím odpovídá i výskytu bakteriálního černání stonků na Obr. 17 a 18. Konkrétně v tomto termínu, u sadby s vpichem do pupku (Obr. 20) měla varianta FB plochu vegetačního krytu 6,79 m², varianta BF 4,86 m², varianta B 4,74 m² a tedy proti FB relativně menší o 30 %.

Ve Velharticích byl pokus založen pouze s krájenou sadbou. Výsledky výskytu bakteriálního černání stonku hodnocené analýzou rozptylu jsou uvedeny na následujícím obrázku.

Obr. 21:
Procento výskytu bakteriálního černání stonku po trsech ve Velharticích.

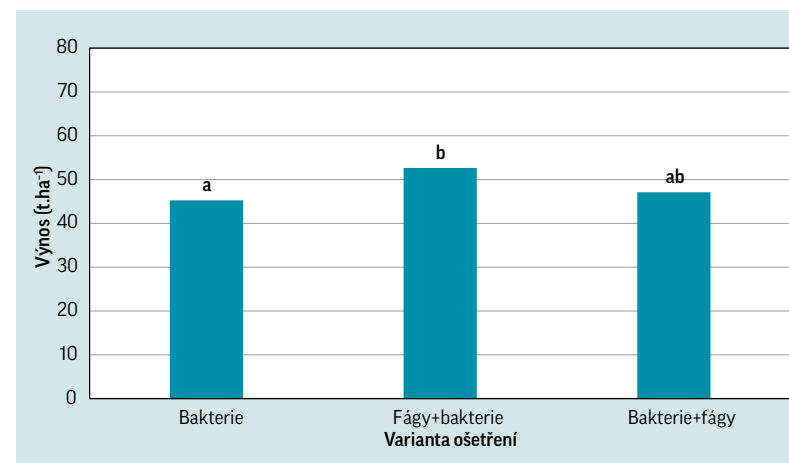


Statisticky vysoce průkazné rozdíly byly mezi variantou FB a variantami B a BF. U varianty FB bylo napadeno 17% trsů, kdežto u varianty B 78%, došlo tedy k relativnímu snížení napadení taktéž o 78%.

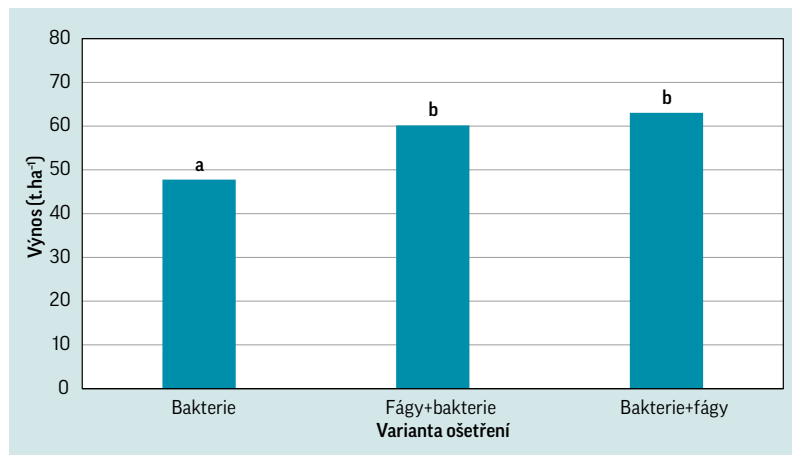
Přepočtené hektarové výnosy z Valečova hodnocené analýzou rozptylu jsou uvedeny na Obr. 22 a 23.

U krájené sadby měla varianta FB vysoce průkazně vyšší přepočtený výnos proti variantě B, tj. 52,6 t/ha proti 45,3 t/ha. Došlo tedy k relativnímu navýšení výnosu o 16%.

Obr. 22:
Přepočtený výnos v t.ha⁻¹ u variant s krájenou sadbou



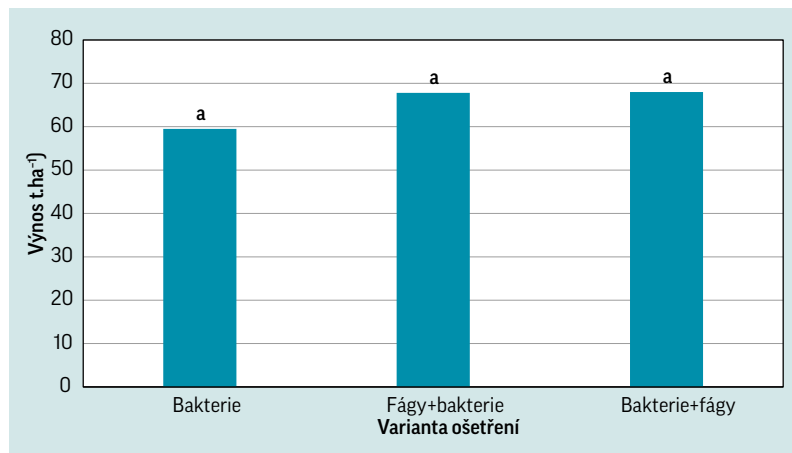
Obr. 23:
Přepočtený
výnos v t.ha⁻¹
u variant se
sadbovými
hlízi
s vpichem
do pupku



U sadby poškozené vpichem do pupku měla varianta B vysoce průkazně nižší výnos než varianty BF a FB. U varianty B byl přepočtený výnos 47,8 t/ha, kdežto u varianty BF 63,1 t/ha, došlo tedy k relativnímu navýšení výnosu o 32%.

Ve Velharticích u pokusu s krájenou sadbou jsou výnosy hodnocené analýzou rozptýlu uvedeny v následujícím obrázku.

Obr. 24:
Přepočtený
výnos
v t.ha⁻¹
u variant
s krájenou
sadbou ve
Velharticích

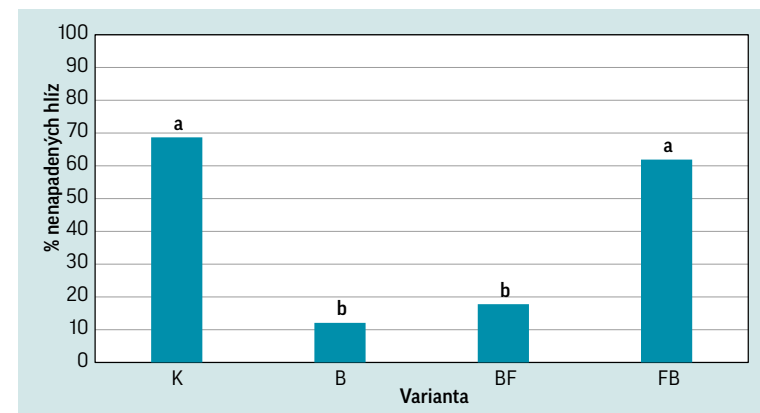


Mezi variantami nebyly v přepočteném výnosu statisticky průkazné rozdíly, pouze tendence vyššího výnosu u variant ošetřených fágem. Varianta B měla výnos 59,5 t/ha, varianta FB 67,8 t/ha a varianta BF 68,0 t/ha.

V dalším experimentu opět s *D. solani* prováděném ve VŠCHT byly celé hlízy ošetřeny pracími roztoky: kontrola K vodou, varianta B roztokem se suspenzí bakterie D050

(10⁸ cfu/ml), varianta BF nejdříve tímž pracím roztokem následovaným bakteriofágovou suspenzí o koncentraci 10⁷ pfu/ml (směs fágů Ds3CZ a Ds20CZ v poměru 50-70% fága Ds3 a 30-50% fága Ds20). Varianta FB byla ošetřena stejně v opačném pořadí pracích roztoků. Brambory byly po ošetření zabaleny do perforované LDPE folie a skladovány v termostatu při 25 °C, v týdenních intervalech byl vizuálně hodnocen počet poškozených (mikrobiálně napadených kusů). Výsledky čtvrtý týden hodnocené analýzou rozptýlu jsou uvedeny na následujícím obrázku.

Obr. 25:
Výsledky
vizuálního
hodnocení praní
konzumních
bramborových
hlíz



Z vizuálního hodnocení vychází jako neúčinnější způsob praní brambor využití suspenze fágů (fág + D50), kdy i po 4 týdnech skladování v 25 °C bylo 62% hlíz bez mikrobiálního kažení. Tyto výsledky byly oproti dvěma zbylým způsobům (ošetření bakterií a ošetření bakterií + fágem) statisticky vysoce průkazné. Varianta BF měla bez mikrobiálního kažení 18% hlíz a varianta B pouze 12%. Výsledky praní konzumních bramborových hlíz potvrzují možnost využití suspenze fágů jako preventivního způsobu ošetření konzumních hlíz, kdy v případě preventivní přítomnosti fágů nedochází k šíření hniloby na opané hlízy.

Shrnutí experimentálních výsledků

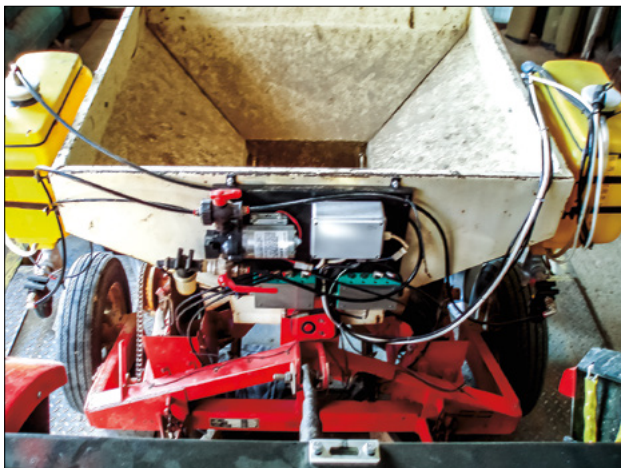
Z výše uvedených experimentů je vidět, že směsi fágů mohou být v ochraně brambor s úspěchem využitelné jak na poli (snížení výskytu bakteriálního černání stonku promítající se až do výnosu), tak v rámci maloobchodního skladování praných hlíz (snížení výskytu hlíz s měkkou hnilobou maloobchodních balení). Účinnost byla samozřejmě proměnlivá v závislosti na bakteriálním kmenu, koncentraci fágů, pořadí aplikace, stupni mechanického poškození, podmínkách pro nasednutí fágů a v neposlední řadě na stanovišti (vlhkosti půdy a tedy srážkách).

2.5. Technologie aplikace

Moření postřikem při sázení

V roce 2021 byly ve Výzkumné stanici VÚB ve Valečově provedeny praktické zkoušky aplikace fágového roztoku mořením postřikem sadbových hlíz při výsadbě. Ke zkouškám byl použit sazeč SA2 074 s mořením při výsadbě (Obr. 26). Odklíčené hlízy byly nejdříve namočeny do bakteriální suspenze (D050) a potom při výsadbě před zahrnutím mořeny (směs fágů Ds3CZ + Ds20CZ) propadem mezi dvěma stříkajícími tryskami, přičemž třetí tryska stříkala do půdy na sadbové lůžko (Obr. 27). Tato technologie aplikace odpovídala variantě BF poloprovodních maloparcelkových pokusů.

Obr. 26: Dvouřádkový sazeč Agrostroj SA2 074 s mořičkou



Obr. 27: Aplikační trysky fágového roztoku



Aplikace studenou mlhou do nuceně provětrávaných hlíz před vyskladňováním

Další možností aplikace fágového roztoku, která ovšem nebyla prakticky zkoušena, je aplikace studenou mlhou do vrstvy volně ložených hlíz nebo nuceně provětrávaných palet před začátkem vyskladňování odpovídající variantě FB poloprovodních maloparcelkových pokusů (Obr. 28). V podstatě to odpovídá aplikaci inhibitorů klíčení, která se ovšem provádí termickým zmlžením (Synofog SF1H).

Obr. 28: Pneumatický zmlžovač na výrobu studené mlhy pulsFOG Turbo UL

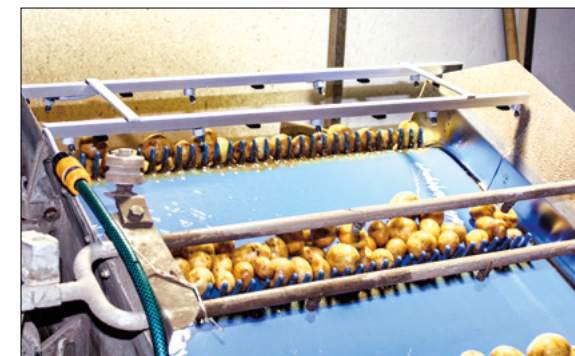


Aplikace postřikem na rostliny je vesměs neúčinná, vzhledem k rychlé degradaci fágů působením slunečního záření. Naproti tomu, v půdě byly bakteriofágy nalezeny ve Valečově v roce 2021 i po třech měsících od aplikace, předpokladem je ovšem její stálá vlhkost.

Aplikace sprchováním před balením

Další možností je sprchování brambor suspenzí fágů před balením (Obr. 29). Tato suspenze by se nanášela na vyprané hlízy před jejich osušením pomocí vzduchových nožů a následným balením do perforované folie.

Obr. 29: Příklad sprchování brambor před osušením a balením



3. SROVNÁVÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V ČR tato problematika v ochraně rostlin dosud není prakticky řešena ani využívána. Prakticky se u nás využívají fágy v oborech humánní a veterinární medicíny proti bakteriím rezistentním k antibiotikům jako *Staphylococcus aureus*. Co se týká potravinářství, tak od roku 2019 je v EU povolen komerční přípravek Listex™ P100 (Microos BV) obsahující fága P100 proti bakterii *Listeria monocytogenes*. Má GRASS status a nachází uplatnění v konzervaci potravin s krátkou dobou trvanlivosti, jako jsou například sýry zrající od povrchu nebo se využívá při ošetření povrchu, kde hrozí nárůst biofilmu bakterií *L. monocytogenes*.

4. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Předpokládá se možnost uplatnění u šlechtitelů a množitelů sadby, ale i při praní konzumních hlíz ve slupce. Metodika bude využívána v poradenství, šířena v tištěné formě vydavatelem a Českým bramborářským svazem, využití najde i v zemědělském a potravinářském školství, případně státní správě. V elektronické podobě bude zveřejněna na internetu, na stránkách portálu Agronavigátor a stránkách vydavatele Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod, s. r. o.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

V návaznosti na dříve uvedené výsledky ve stati „Poloprovozní pokusy účinnosti lytic- kých fágů na bakterii *Dickeya solani*“ a shrnutí experimentálních výsledků lze spekulovat, že využití fágů proti pektinolytickým bakteriím u brambor by mohlo cca u 2% porostů konzumních brambor zvýšit jejich výnos o 15%. Při jejich ploše asi 14 000 ha, průměrném výnosu 26 t/ha a realizační ceně 6 Kč/kg by to ročně představovalo asi 6,5 milionu Kč. Obdobně v maloobchodním řetězci patří ztráty způsobené hnilobou mezi čtyři nejčastější jakostní nedostatky spolu s vadami dužniny, zelenáním a naklíčením bramborových hlíz. Tyto vady mohou způsobit až 2% ztrát, neboť se v případě hnilobou napadené hlízy likviduje celé maloobchodní balení, popřípadě se z maloobchodního řetězce vrací celé palety balených bramborových hlíz. Ty už se většinou nedají znovu nabízet koncovým zákazníkům a jsou likvidovány nejčastěji v bioplynové stanici nebo jinak. Při preventivním zásahu by se takto vzniklé ztráty daly snížit minimálně na polovinu. Pro cca 250 000 t balených praných brambor ve slupce vypěstovaných v Česku a jejich ceně 9 Kč/kg by to ročně představovalo asi 22,5 milionu Kč a tedy celkem za hospodářský rok přínos 29 milionů Kč.

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- ADRAENSSENS E. M., VAN VAERENBERGH J., VANDENVEUHEL D., DURON V., CEYSSENS P.J., DE PROFIT M., KROPINSKI A.M., NOBEN J.P., MAENS M., LAVIGNE R. (2012): T-4 related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by 'Dickeya solani'. *PLoS One* 7, e33227.
- BUTTNER C., McAULIFFE O., ROSS R. P., HILL C., O'MAHONY J., COFFEY A. (2017): Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontier in Microbiology* 8, 1-15.
- BUTTNER C., HENDRIX H., LUCID A., NEVE H., NOBEN J. P., FRANZ CH., O'MAHONY J., LAVIGNE R., COFFEY A. (2018): Novel N4-like bacteriophages of *Pectobacterium atrosepticum*. *Pharmaceuticals* 11, 45.
- CARSTENS A.B., DJURHUUS A.M., KOT W., JACOBS-SERA D., HATFULL G.F., HANSEN L.H. (2018): Unlocking the potential of 46 new bacteriophages for biocontrol of *Dickeya solani*. *Viruses* 10, 621.
- CARSTENS A.B., DJURHUUS A.M., KOT W., HANSEN L.H. (2019): A novel six-phage cocktail reduces *Pectobacterium atrosepticum* soft rot infection in potato tubers under simulated storage conditions. *FEMS Microbiology Letters* 366, fnz101.
- CLADERA-OLIVERA F., CARON G.R., MOTTA A.S., SOUTO A.A., BRANDELLI A. (2006): Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 533-539.
- CRONIN D., MOENNE-LOCCOZ Y., FENTON A., DUNNE C., DOWLING D.N., OGARA F. (1997): Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiology Ecology* 23, 95-106.
- CZAJKOWSKI R., DE BOER W. J., VELVIS H., VAN DER WOLF J. A. (2010): Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology* 100, 134-142.
- CZAJKOWSKI R., PÉROMBELON M.C.M., VAN VEEN J.A., VAN DER WOLF J.A. (2011): Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology* 60, 999-1013.
- CZAJKOWSKI R., OZYMKO Z., LOJKOWSKA E. (2014): Isolation and characterisation of novel soilborne lytic bacteriophages infecting *Dickeya* spp. biovar 3 ('D. solani'). *Plant Pathology* 63, 758-772.
- CZAJKOWSKI R., OZYMKO Z., DE JAGER V., SIWINSKA J., SMOLARSKA A., OSSOWICKI A., NARAJCZYK M., LOJKOWSKA E. (2015): Genomic, proteomic and morphological characterization of two novel broad host lytic bacteriophages ΦPD10.3 and ΦPD23.1 infecting pectinolytic *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. *PLoS One* 10, e0119812.
- CZAJKOWSKI R., SMOLARSKA A., OZYMKO Z. (2017): The viability of lytic bacteriophage ΦD5 in potato-associated environments and its effect on *Dickeya solani* in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. *PLoS One* 12, e0183200.
- DOBIÁŠ K. (1976): Stanovení odolnosti proti bakteriálním chorobám. In: Zadina J., Jermoljev E.: Šlechtění bramboru. Praha: Academia, 176-186.
- DOBIÁŠ K. (1977): Možnosti šlechtění na rezistenci proti černání stonku brambor (*Erwinia carotovora*, Jones, Holland). *Rostlinná Výroba* 23(3), 255-260.
- EPTON H.A.S., WALKER N.M., SIGEE D.C. (1990): *Bdellovibrio*: a potential control agent for soft rot and blackleg of potato. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Budapest, Hungary*, 207-212.
- GILL E.D., HELIAS V., SCHAEERER S., DUPUIS B. (2014): Efficient inoculation method of potato tubers with *Dickeya* spp. In: *Proceedings of the 19th Triennial Conference EAPR, Brussels, Belgium*, abstract 237.

- JAFRA S., PRZYSOWA J., CZAJKOWSKI R., MICHTA A., GARBEVA P., VAN DER WOLF J.M. (2006): Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 1006-1015.
- JAGANNATHAN B.V., DAKOSKE M., VIJAYAKUMAR P.P. (2022): Bacteriophage-mediated control of pre- and post-harvest produce quality and safety. *LWT* 169, 113912.
- JONES J.B., JACKSON L.E., BALOGH B., OBRADOVIC A., IRIARTE F.B., MOMOL M.T. (2007): bacteriophages for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology* 45, 245-262.
- KMOCH M., PETRZIK K., BRÁZDOVÁ S., KOPAČKA V., VACEK, J., ŠEVČÍK R. (2020): Využití bakteriofágů při ochraně bramboru proti bakteriím rodu *Dickeya*. *Úroda* 68(12), vědecká příloha na CD, 187-192.
- LIM J.A., JEE S., LEE D.H., ROH E., JUNG K., OH C., HEU S. (2013): Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using bacteriophage PP1. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1147-1153.
- RASOCHA V., HAUSVATER E., DOLEŽAL P. (2008): Škodliví činitelé bramboru. Abionózy, choroby, škůdci. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský. 161 s.
- RAVENSDALE M., BLOOM T.J., GRACIA-GARZA J.A., SVIRCEV A.M., SMITH R.J. (2007): Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 29, 121-130.
- SADDLER G. (May 2016): *Dickeya*: A Scottish, UK, and European Perspective. Dostupné z: <https://doi.org/10.1094/GROW-POT-05-16-064>
- TRIAS R., BANERAS L., MONTESINOS E., BADOSA F. (2008): Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology* 11, 231-236.
- UNECE (2017): Food loss and waste - the case of seed potato certification. Dostupné z: https://unece.org/fileadmin/DAM/trade/agr/meetings/ge.06/2017/RapporteursMtg_TheNetherlands/Food_Loss_Waste.pdf

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZEJÍ METODICE

- KMOCH M., BINDEROVÁ D., VACEK J., KOPAČKA V. (2019): Citlivost vybraných odrůd bramboru k patogenu *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Úroda* 67(12), vědecká příloha na CD, 207-210. ISSN 0139-6013
- HORSÁKOVÁ I., POHŮNEK V., RAJCHL A., ŠEVČÍK R. (2019): Bakteriofágy a jejich aplikace při výrobě potravin. *Výživa a potraviny* 74(6), 145-147. ISSN 1211-846X
- PETRZIK K., VACEK J., BRÁZDOVÁ S., ŠEVČÍK R., KOLONIUK I. (2021): Diversity of limestone bacteriophages infecting *Dickeya solani* isolated in the Czech Republic. *Archives of Virology* 166, 1171-1175. DOI:10.1007/s00705-020-04926-7. ISSN 0304-8608
- KMOCH M., PETRZIK K., BRÁZDOVÁ S., KOPAČKA V., VACEK, J., ŠEVČÍK R. (2020): Využití bakteriofágů při ochraně bramboru proti bakteriím rodu *Dickeya*. *Úroda* 68(12), vědecká příloha na CD, 187-192. ISSN 0139-6013
- PETRZIK K., KMOCH M., BRÁZDOVÁ S., ŠEVČÍK R. (2021): Complete genome sequences of novel Berlinvirus and novel Certrevirus lytic for *Pectobacterium* sp. causing soft rot and black leg disease of potato. *Virus Genes* 57, 302-305. DOI:10.1007/s00705-020-04926-7. ISSN 0920-8569
- BEŇO F., HORSÁKOVÁ I., KMOCH M., PETRZIK K., KRÁTKÁ G., ŠEVČÍK R. (2022): Bacteriophages as a strategy to protect potato tubers against *Dickeya dianthicola* and *Pectobacterium carotovorum* soft rot. *Microorganisms* 10(12), 2369. ISSN 2076-2607

Vesa Velhartice, a.s.

- **Prodej sadbových brambor**
odrůdy z našeho šlechtění:
Velmi rané: Monika, Magda, Suzan, Primarosa, Katy, Mariannka
Rané: Bohemia, Vysočina, Alice, Terka, Jasmína
Polorané: Dominika, Red Anna, Bella, Gabreta
Polopozdní: Jindra, Lydia
Na zpracování: David, Verne, Dominátor, Borek, Velur
- **Prodej konzumních brambor a poradenství**

Jsme tu pro brambory a naše brambory jsou tu pro Vás..

Kontakty

Velhartice 220, 341 42 Kolínek	Záhoří 4, 396 01 Humpolec
Tel.: +420 602 247 454	Tel.: +420 725 785 088
Email: objednavky@vesa-velhartice.cz	Email: rajdlík@vesa-velhartice.cz



**VÝZKUMNÝ ÚSTAV
BRAMBORÁŘSKÝ
HAVLÍČKŮV BROD**



PROGRAM APLIKOVANÉHO
VÝZKUMU MINISTERSTVA
ZEMĚDĚLSTVÍ 2017–2025

Řada **PRAKTICKÉ INFORMACE** – číslo 87

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

BIOLOGICKÁ OCHRANA BRAMBOR

**PROTI VYBRANÝM PATOGENNÍM BAKTERIÍM – MOŽNOSTI VYUŽITÍ FÁGŮ
V OCHRANĚ PROTI PEKTINOLYTICKÝM BAKTERIÍM**

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

Dobrovského 2366, CZ-580 01 Havlíčkův Brod.

Vydání první. Náklad: 500 výtisků.

Fotografie: foto na obálce Prof. RNDr. Karel Petrzik, CSc.; ostatní archiv VÚB.

Grafická úprava: Jiří Trachtulec.

ISBN 978-80-86940-98-4

© Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o., 2022.

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného svolení Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod.

www.vubhb.cz