



**METODIKA STANOVENÍ
REZISTENCE ODRŮD
BRAMBORU K PŮVODCŮM
AKTINOMYCETOVÉ OBECNÉ
STRUPOVITOSTI A AGRESIVITY
IZOLÁTŮ FYTOPATOGENNÍCH
STREPTOMYCET**

KOLEKTIV AUTORŮ

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

Kolektiv autorů:

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

(Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha);

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

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

Metodika je určena pro diagnostické, zkušební a referenční laboratoře provádějící testování hladiny rezistence genotypů bramboru.

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR – odborem rostlinných komodit, bylo vydáno OSVĚDČENÍ 1/67570 – 2011 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

Oponenti

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský – Ing. Václav Čermák

Česká zemědělská univerzita v Praze – Prof. Ing. Karel Hamouz, CSc.

Jména oponentů a názvy jejich organizací

Ing. Václav Čermák

ÚKZÚZ – Oddělení zkoušek užitné hodnoty, Referát brambor

582 57 Lípa u Havlíčkova Brodu

tel.: +420 569 400 462, fax: +420 569 400 466, mobil: +420 737 267 259

email: vaclav.cermak@ukzuz.cz

Prof. Ing. Karel Hamouz, CSc.

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra rostlinné výroby

Kamýčká 129, 165 21 Praha 6 - Suchdol

tel.: +420 224 38 2548, email: hamouz@af.czu.cz

© Praha, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. 2011

© Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o. 2011

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. a VÚB Havlíčkův Brod, s. r. o.

1. UVEDENÍ DO PROBLEMATIKY

Původcem obecné strupovitosti hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) v České republice je bakterie *Streptomyces scabiei* (ex Thaxter 1891) Lambert and Loria 1989. U odrůd určených k přímému prodeji jsou strupovité hlízy konzumních odrůd bramboru pro svoji nevzhlednost a náchylnost k sekundárním patogenům nevhodné pro mytí a balení do transparentních obalů. Výskyt zejména kráterovitého typu strupovitých lézí je příčinou ekonomických ztrát i u odrůd určených především k výrobě polotovarů a potravinářských výrobků (hranolky, chipsy apod.). Zvýšené nároky na vzhled a kvalitu hlíz konzumních brambor mají za následek vzestup poptávky po odrůdách vyznačujících se rezistencí k aktinobakteriální obecné strupovitosti bramboru. Pro testování rezistence genotypů bramboru bylo doporučeno několik metod (Gun *et al.*, 1983), ale dosavadní praxe je většinou taková, že se odrůdy testují v polních podmínkách. Nevýhodou těchto testů je jejich časová náročnost, pracnost a vysoká nákladovost. Zásadním problémem je variabilita výsledků hodnocení četnosti výskytu choroby a stupně napadení na jednotlivých lokalitách v jednotlivých letech. Variabilita je způsobená jednak rozdílnými meteorologickými podmínkami, zejména v kritické fázi infekčního cyklu, jednak půdními podmínkami tj. rozdíly v zamořenosti patogenem a složení půdní mikroflóry (Pasco *et al.*, 2005). Vyjimečně se provádí hodnocení rezistence odrůd bramboru k obecné strupovitosti v hangárech nebo paňnicích s regulovanou závlahou. Sadbové hlízy testovaných odrůd jsou vysazovány do zeminy přirozeně kontaminované blíže neidentifikovaným patogenem. Tato zemina se odebírá z lokality, která je známá častým výskytem strupovitosti, například lokalita Vyklantice. I tato metoda je časově velmi náročná. Skleníkové testy na rozdíl od předchozích metod můžeme provádět celoročně. Nové nebo zajímavé odrůdy můžeme otestovat na rezistenci k obecné strupovitosti za zcela standardizovaných podmínek během období vegetačního klidu. Ušetříme tak jednu vegetační sezónu nutnou pro otestování v polních podmínkách nebo hangárech a získáme jednoznačně vypočítanou hodnotu hladiny rezistence odrůdy k aktinomycetové obecné strupovitosti. V kontrolovaných skleníkových podmínkách se nejčastěji pracuje se sadbovými hlízami nebo hlízami ze stonkových řízkovanců (Loria *et al.*, 1997, Lindholm *et al.*, 1997). Při testování rezistence odrůd bramboru na sadbových hlízách je nutné pracovat s partiemi, které jsou zcela prosté příznaků obecné strupovitosti. Provokační podmínky vytvořené ve skleníku mohou způsobit aktivaci latentně přítomné infekce v lenticelách, následně vyvolat tvorbu strupovitých lézí a zkreslit hodnocení testů

patogenity (Wang and Lazarovits, 2005). Nákladnější postup využívající *in vitro* rostliny je vhodný zejména pro testování virulence a agresivity izolátů. Kmeny je nutné testovat minimálně na třech odrůdách bramboru s rozdílnou náchylností k obecné strupovitosti. Při práci s nákazy prostými rostlinami *in vitro* je tak vyloučena možnost vzniku falešně pozitivní reakce z důvodu nepřítomnosti latentní infekce. Testování virulence izolátů se rutinně neprovádí. Inokulací sadbových hlíz nebo rostlin *in vitro* bramboru přesně definovanými izoláty původců aktinomycetové obecné strupovitosti zpřesňuje hodnocení rezistence odrůdy (Pasco *et al.*, 2005). Z výsledků průzkumu spektra původců aktinomycetové obecné strupovitosti prováděného v letech 2007–2010 vyplývá, že těmito definovanými původci by v České republice měly být virulentní izoláty *Streptomyces scabiei* (Pánková *et al.*, 2010). V literatuře je nejčastěji doporučováno dvojstupňové namnožení inokula virulentního izolátu, tj. nejprve na pevných nebo v tekutých živných médiích a následně na perlitu, který se promíchá v různých poměrech s půdním substrátem. Rychlejší alternativou je namnožení dostatečného množství virulentního izolátu na pevných živných médiích a promíchání substrátu přímo se zhomogenizovanou bakteriální kulturou včetně živného média. Vzhledem k pomalému růstu streptomycet tato metoda šetří čas a snižuje riziko kontaminace (Pánková *et al.*, 2010). Rezistence odrůdy se hodnotí na základě výpočtu průměrného indexu strupovitosti SI. Ve vzorci bývá zohledněno procento strupovitých hlíz, intenzita napadení, počet opakování, případně typ strupovitých lézí (Pasco *et al.*, 2005).

2. CÍL METODIKY

Cílem této metodiky je především standardizovat, ale i zjednodušit a urychlit postup zejména hodnocení rezistence odrůd bramboru k aktinobakteriální obecné strupovitosti, ale i hodnocení agresivity izolátů původců choroby metodou umělé infekce ve skleníkových podmínkách. Zatímco testování v polních podmínkách poskytuje informaci o horizontální druhově nespecifické rezistenci, předložená metodika poskytuje údaje o specifické rezistenci k definovaným kmenům druhu *Streptomyces scabiei*. Včasné stanovení rezistence odrůd bramboru k aktinomycetové obecné strupovitosti povede k vyloučení náchylných odrůd ze sortimentu pěstovaných konzumních odrůd bramboru a tím minimalizování ekonomických ztrát způsobených neprodejností nevzhledných strupovitých hlíz. Znalost agresivity spektra původců obecné strupovitosti povede k minimalizaci ekonomických ztrát na pozemcích s výskytem agresivních kmenů fytopatogen-

ních streptomycet a to jak volbou vhodných rezistentních odrůd bramboru, tak i úpravou agrotechnických postupů.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

3.1. Stanovení rezistence odrůd bramboru

Předpokládaný metodický postup stanovení rezistence odrůd bramboru je založen na umělých infekcích sadbových hlíz testovaných odrůd definovanými virulentními izoláty *Streptomyces scabiei*. Vlastní metodika má tyto části:

- Příprava bakteriálních suspenzí virulentních izolátů *Streptomyces scabiei*
- Inokulace naklíčených sadbových hlíz
- Hodnocení rezistence odrůd

3.1.1. Příprava bakteriálních suspenzí virulentních izolátů

Streptomyces scabiei

Při testování odrůd bramboru na rezistenci k obecné strupovitosti připravíme bakteriální suspenze 2–3 virulentních izolátů *Streptomyces scabiei*. Virulentní kmeny uchováváme v lyofilizovaném stavu nebo hluboko zamražené (–70 °C). Izoláty ožívujeme a dále kultivujeme na médiu C (5g peptonu, 3g kaseinového hydrolyzátu, 3g kvasničného extraktu, 2g maltózy, 1g laktózy a 18g agaru na 1l destilované vody) 5–7 dnů při 25 °C. Obsah 10 Petriho misek virulentního izolátu, včetně agaru, rozmixujeme na mixéru (Waring), vzniklý homogenát naředíme sterilní vodou na objem 500 ml.

3.1.2. Inokulace naklíčených sadbových hlíz

Každou odrůdu testujeme na rezistenci k aktinomycetové obecné strupovitosti s 2–3 virulentními izoláty ve 2–4 opakováních. Sadbové hlízy testovaných odrůd necháme 1–2 týdny naklíčit při pokojové teplotě. Klíčky zastříháme na délku cca 2 cm a namáčíme v bakteriální suspenzi. Po zaschnutí suspenze hlízy individuálně sázíme do nádob se zahradnickým substrátem (firma Agro). Jako pozitivní kontrolu použijeme některou z velmi náchylných odrůd (Desireé, Agria), postupujeme stejně jako u odrůd testovaných na rezistenci. Jako negativní kontrolu namáčíme vždy 2–4 naklíčené hlízy testovaných odrůd do sterilní vody. Inokulované hlízy v nádobách první týden zaléváme kropením, dále pak 6 týdnů 1× týdně spodní zálivkou. Ve skleníku udržujeme teplotu 20–22 °C.

3.1.3. Hodnocení rezistence odrůd

Po 6–8 týdnech hodnotíme počet sklizených hlíz (S), napadených strupovitých hlíz (N) a průměrnou intenzitu (plochu- P) napadení (James, 1971) 2–4 opakování jednotlivých kombinací odrůda-izolát (n). Vypočítáme průměrný index

strupovitosti $SI = 1/n \sum_{i=1}^n \frac{N_i P_i}{100 S_i}$. V intervalu $SI \langle 0; 0,1 \rangle$ hodnotíme odrůdu jako rezistentní; v intervalu $\langle 0,1; 0,4 \rangle$ jako náchylnou a při hodnotách $SI > 0,4$ jako velmi náchylnou odrůdu.



Foto 1, 2: Hodnocení rezistence odrůd Agria, Desiree umělou inokulací izolátem Madeleine

3.2. Stanovení agresivity izolátů fytopatogenních streptomycet

Předpokládaný metodický postup stanovení agresivity izolátů je založen na umělých infekcích rostlin *in vitro* šesti odrůd s rozdílnou hladinou náchylnosti/rezistence k obecné strupovitosti suspenzí testovaných izolátů.

Vlastní metodika má tyto části:

- Příprava bakteriální suspenze
- Inokulace rostlin *in vitro*
- Hodnocení testů agresivity

3.2.1. Příprava bakteriální suspenze

Původce obecné strupovitosti izolujeme z částí povrchového pletiva strupovitých lézí nebo lenticel rozmacerovaných v destilované vodě a kultivovaných na médiu C (5 g peptonu, 3 g kaseinového hydrolyzátu, 3 g kvasničného extraktu, 2 g maltózy, 1 g laktózy a 18 g agaru na 1 l destilované vody) s přidavkem 2,5 ml směsi antibiotik na 1 l média (500 mg nystatinu, 50 mg polymyxinu B, 10 mg penicilinu G, 500 mg cykloheximidinu vždy na 100 ml destilované vody). Po 5–7 dnech inkubace při 25 °C přepichujeme a roztíráme jehlou na médium C drsné matné ostře ohraničené kolonie vrůstající do živného agaru, který zabarvují dohněda. Při roztírání narušujeme hladký povrch agaru pro snadnější růst streptomycet. Po 5 dnech rozočkujeme každý izolát na 10 Petriho misek (Ø = 90 mm) média C. Po 7 dnech obsah 10 Petriho misek, včetně agaru, rozmixujeme na mixéru (Waring), vzniklý homogenát naředíme sterilní vodou na objem 500 ml. Stejným způsobem připravíme i suspenzi kontrolního agresivního kmenu.

3.2.2. Inokulace rostlin *in vitro*

Každý izolát testujeme na 2–5 rostlinách *in vitro* od každé odrůdy. Agresivitu izolátů testujeme na 3–6 odrůdách s rozdílnou hladinou rezistence k obecné strupovitosti – na 1–2 náchylných odrůdách, na 1–2 slabě rezistentních a 1–2 rezistentních odrůdách. *In vitro* rostliny napěstujeme v klimatizační komoře v plastikových dozách s agarem s růstovými látkami do stádia 6–8 lístků a výšky 10 cm. Rostliny vyjmeme z dózy, zastříhneme kořeny a ponoříme na cca 20 minut do streptomycetové suspenze. Každou rostlinu zasadíme do individuální nádoby se zahradnickým substrátem (firma Agro). Obdobně pracujeme s pozitivní kontrolou. U negativní kontroly namáčíme rostliny se zastříženými kořeny

na 20 minut do sterilní vody. Všechny rostliny zaléváme první týden kropením, dále pak po dobu 6 týdnů 1× týdně spodní závlivkou. Ve skleníku udržujeme teplotu 20–22 °C.



Foto 3, 4, 5: Inokulace rostlin *in vitro*



3.2.3. Hodnocení testů agresivity

Po 6–8 týdnech vyhodnotíme počet sklizených hlíz (S), napadených strupovitých hlíz (N) a průměrnou intenzitu (plochu – P) napadení (James, 1971) 2–5 opakovaní jednotlivých kombinací odrůda-izolát (n). Vypočítáme průměrný index strupovitosti $SI = 1/n \sum_{i=1}^n \frac{N_i P_i}{100 S_i}$. V intervalu $SI \langle 0; 0,1 \rangle$ hodnotíme izolát jako neagresivní, v intervalu $\langle 0,1; 0,4 \rangle$ jako agresivní a při hodnotách $SI > 0,4$ jako velmi agresivní izolát. Velmi agresivní izoláty můžeme v dalších testech využít jako pozitivní kontrolu. Agresivní izoláty jsou vhodné pro testování rezistence odrůd k aktinobakteriální obecné strupovitosti.

Foto 6, 7: Hodnocení agresivity izolátů Bee, Madeleine – odrůda Agria



4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika v porovnání s užívanými postupy především zcela standardizuje, ale i urychluje a zjednodušuje postup hodnocení rezistence odrůd bramboru k aktinomycetové obecné strupovitosti a hodnocení agresivity původců strupovitosti metodou umělé infekce v skleníkových podmínkách. Předpokládaný metodický postup stanovení rezistence odrůd bramboru k původci obecné strupovitosti, bakterii *Streptomyces scabiei*, využívá ověřených agresivních izolátů získaných z bramborářských lokalit České republiky. Výsledkem tohoto metodického postupu je jednoznačné stanovení náchylnosti či rezistence dané odrůdy vůči původci choroby během 6 týdnů na základě výpočtu průměrného indexu strupovitosti SI. Novost navrhovaného postupu hodnocení agresivity izolátů fytopatogenních streptomycet spočívá ve využití patogenů prostých rostlin *in vitro* tří referenčních odrůd s rozdílnou náchylností k obecné strupovitosti a v jednoznačném výpočtu agresivity izolátu na základě hodnoty průměrného koeficientu strupovitosti SI. Přímým nanášením suspenze izolátů v živném médiu na kořeny rostlin *in vitro* a narušené klíčky sadbových hlíz se snižuje pracovní a časová náročnost testů. Skleníkové testy rezistence odrůd bramboru k aktinomycetové obecné strupovitosti lze na rozdíl od polních pokusů provádět celoročně.

5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena především pro diagnostické, zkušební a referenční laboratoře SRS a ÚKZÚZ a šlechtitelské stanice provádějící testování hladiny rezistence genotypů brambor. Tato metodika má zejména standardizovat, ale i maximálně zjednodušit postup hodnocení zejména skleníkových testů rezistence odrůd bramboru k aktinobakteriální obecné strupovitosti, ale i skleníkových testů agresivity izolátů. Přímé nanášení koncentrovaného inokula na narušené klíčky sadbových hlíz nebo kořeny *in vitro* rostlin snižuje pracnost testů a urychluje rozvoj infekce a tvorbu strupovitých lézí.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Předpokládané ekonomické přínosy spočívají:

- 1) v možnosti vyloučit z nabídky sadbových brambor odrůdy velmi náchylné k aktinomycetové obecné strupovitosti, a tak zabránit ztrátám způsobeným sníženou konkurenceschopností strupovitých hlíz v potravinářském průmyslu a v obchodní síti;
- 2) v možnosti minimalizovat ekonomické ztráty správnou volbou odrůdy a agrotechnických postupů na dané lokalitě podle agresivity přítomných původců obecné strupovitosti. Předpokládané ekonomické přínosy spočívají ve snížení ztrát při zpracování a prodeji konzumních brambor pěstovaných na více jak 1/3 osázené plochy (cca 11 tis. ha). Podle infekčního tlaku choroby mohou tyto úspory v daném roce činit 5–10 tis. Kč/ha.

Náklady na otestování rezistence jedné odrůdy by se v závislosti na aktuální ceně práce, počtu testovaných odrůd, ceně za spotřebovanou elektrickou energii na topení a svícení, případně v závislosti na ceně vody měly pohybovat v rozmezí 500–1 000 Kč.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Gunn R. E., Jellisa G. J., WeBB P. J. and Starling, N. C. (1983): Comparison of three methods for assessing varietal differences in resistance to common scab disease (*Streptomyces scabies*) on potato. *Potato Res.* 26: 175–178.
- James W. C. (1971): An illustrated series of assessment keys for plant disease, their preparation and usage. *Can. Pl. Dis. Surv.* 51: 39–65.
- Lindhölm P., Kortemaa H., Koooolä M., Haahetla, K., Salkinoja-Salonen M. and Valkonen J. P. T. (1997): *Streptomyces* spp. Isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant Dis.* 81: 1317–1322.
- Loria R., Bukhalid R. A., Fry B. A. and King R. R. (1997): Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease* 81: 836–848.
- Pasco C., Jouan B. and Andrivon D. (2005): Resistance of potato genotypes to common and netted scab-causing species of *Streptomyces*. *Plant Pathology* 54: 383–392.
- Wang A. and Lazarovits G. (2005): Role of seed tubers in the spread of plant pathogenic *Streptomyces* initiating common scab disease. *Am. J. Potato Res.* 82: 221–230.
- Wilson C. R., Luckman G. A., Tegg R. S., Yuan Z. Q., Wilson A. J., Eyles A. and Conner A. J. (2009): Enhanced resistance to common scab of potato through somatic cell selection in cv. Iwa with the phytotoxin thaxtomin A. *Plant Pathology* 58: 137–144.

8. SEZNAM SOUVISEJÍCÍCH PUBLIKOVANÝCH ČLÁNKŮ

- Pánková I., Krejzar V., Kúdela V., Hausvater E., Doležal P. (2009): Indikátorové odrůdy – stanovení rizika výskytu aktinomycetové strupovitosti. *Bramborářství XVII*, 5.: 8–10.
- Pánková I., Krejzar V., Kúdela V., Hausvater E., Doležal P. (2010): Aktinobakteriální obecná strupovitost – agresivita izolátů fytopatogenních streptomycet a rezistence odrůd bramboru. *Úroda* 12, vědecká příloha, s. 313–317.



Řada PRAKTICKÉ INFORMACE – METODIKA PRO PRAXI.

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

Dobrovského 2366, CZ-580 01 Havlíčkův Brod.

Číslo 36, vydání první. Náklad 100 výtisků.

Fotografie: Ing. Václav Krejzar, Ph.D., zadní strana obálky archiv VÚB.

Grafická úprava Jiří Trachtulec. Tisk Tisk Hermann a spol.

Metodika byla naplánována a je uplatněna jako součást projektu MŠMT 2B06188 „Zvýšení kvality konzumních brambor a jejich konkurenceschopnosti redukcí výskytu fytopatogenních bakterií rodu *Streptomyces*“.

ISBN 978-80-7427-070-3

(Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha)

ISBN 978-80-86940-36-6

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

www.vubhb.cz