

331

VYHLÁŠKA

ze dne 4. května 2004

o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlečení a šíření původce bakteriální kroužkovitosti bramboru a původce bakteriální hnědé hniloby

Ministerstvo zemědělství stanoví podle § 88 odst. 2 zákona č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, (dále jen „zákon“) k provedení § 71 odst. 1 písm. i) zákona:

§ 1

Předmět úpravy

Tato vyhláška v souladu s právem Evropských společenství¹⁾ stanoví opatření, která se uplatňují na území České republiky proti šíření *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.*, původci bakteriální kroužkovitosti bramboru, a *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, původci bakteriální hnědé hniloby, aby se

- a) zabránilo výskytu a šíření,
- b) zjistilo místo výskytu a rozsah rozšíření a
- c) při zjištění výskytu se zabránilo jejich šíření a prováděla se ochranná opatření s cílem jejich eradikace.

§ 2

Pojmy

Pro účely této vyhlášky se rozumí:

- a) původcem kroužkovitosti – bakterie *Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* ssp. *sepedonicus* (Spieckermann *et* Kotthoff) Davis *et al.*,
- b) původcem hnědé hniloby – bakterie *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*,
- c) hostitelskými rostlinami –
 1. původce kroužkovitosti – brambor (*Solanum tuberosum* L.) s výjimkou semen bramboru, a ostatní rostliny z čeledi lilkovitých (Solanaceae), u nichž byla potvrzena možnost infekce původcem kroužkovitosti v přirozených podmínkách,
 2. původce hnědé hniloby – brambor (*Solanum tuberosum* L.) s výjimkou semen bramboru, rajče jedlé (*Lycopersicon lycopersicum* L.) kromě semen a plodů, lilek potměchuť (*Solanum dulcamara* L.) a ostatní rostliny z čeledi

lilkovitých (Solanaceae), u nichž byla potvrzena možnost infekce původcem hnědé hniloby v přirozených podmínkách,

- d) detekčním průzkumem – průzkum zaměřený na zjišťování výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby v určitém území nebo v určité partii,
- e) vymešovacím průzkumem – průzkum k určení rozsahu a původu zamoření původcem kroužkovitosti nebo původcem hnědé hniloby, k určení způsobu šíření infekce a k určení hranic území, na které se vztahují mimořádná rostlinolékařská opatření podle § 76 zákona,
- f) pravděpodobným zamořením původcem kroužkovitosti nebo původcem hnědé hniloby – podezření z výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby v rostlině, zásilce, partii, zařízení, stroji, dopravním prostředku, skladu nebo jejich části a veškerých jiných předmětech včetně obalového materiálu, podle § 11 odst. 1 zákona,
- g) možným rozšířením původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby – podezření z výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby na pozemku, v objektu anebo v území, podle § 11 odst. 1 zákona,
- h) zamořením původcem kroužkovitosti nebo původcem hnědé hniloby – výskyt původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby podle § 11 odst. 1 zákona,
- i) karanténním územím – území vymezené Státní rostlinolékařskou správou (dále jen „rostlinolékařská správa“), na které se vztahují mimořádná rostlinolékařská opatření podle § 76 odst. 1 zákona z důvodu potvrzení výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby,
- j) bezpečnostní zónou – území vymezené rostlinolékařskou správou, na které se vztahují mimořádná rostlinolékařská opatření podle § 76 zákona z důvodu podezření z výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby,
- k) klonově příbuznou partií – partie hostitelské rostliny, která vznikla vegetativním množením z jedné původní partie; přitom se za:

¹⁾ Směrnice Rady 93/85/EHS ze dne 4. října 1985 o ochraně proti bakteriální kroužkovitosti bramboru.

Směrnice Rady 98/57/ES ze dne 20. července 1998 o ochraně proti *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

1. sesterské klonově příbuzné partie považují klonově příbuzné partie, které vznikly v témže roce vegetativním množením z jediné rodičovské partie,
2. rodičovskou klonově příbuznou partii považuje partie klonově příbuzná sesterským klonově příbuzným partiím, které z ní bezprostředně vznikly.

§ 3

Průzkum výskytu původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby

(1) Rostlinolékařská správa provádí každoročně v souladu s § 10 odst. 1 zákona systematický průzkum výskytu původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby v rozsahu podle odstavců 2 až 7.

(2) Detekčnímu průzkumu výskytu původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby podléhají

- a) rozmnožovací materiál bramboru²⁾ původem z České republiky v rozsahu podle § 8 odst. 2,
- b) namátkově vybrané partie rozmnožovacího materiálu bramboru²⁾ původem ze členských států Evropské unie (dále jen „členský stát“),
- c) namátkově vybrané partie nesadbových brambor původem z České republiky a z ostatních členských států,
- d) všechny partie bramboru vypěstované v bezpečnostní zóně vymezené podle § 5 odst. 1 písm. c).

(3) Vymezovacímu průzkumu na výskyt původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby podléhají všechny partie hostitelských rostlin označené jako podezřelé z výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby a všechny partie hostitelských rostlin vypěstované v karanténním území vymezeném podle § 5 odst. 1 písm. c).

(4) Zjišťování původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby při rostlinolékařské kontrole zásilek dovážených ze třetích zemí a vyvážených do třetích zemí podléhají

- a) všechny dovážené partie rozmnožovacího materiálu bramboru a namátkově vybrané partie ostatních brambor,
- b) všechny partie bramboru určené k vývozu do třetích zemí.

(5) Detekčnímu průzkumu na výskyt původce hnědé hniloby navíc podléhají

- a) porosty rostlin rajčete určených k dalšímu pěstování,
- b) vodní zdroje používané k závlaze hostitelských rostlin původce hnědé hniloby včetně doprovod-

ných hostitelských rostlin a odpadní vody ze zpracovatelských podniků, které průmyslově zpracovávají hlízy bramboru, popřípadě také pevné odpady z těchto podniků.

(6) Vymezovacímu průzkumu výskytu původce hnědé hniloby navíc podléhají v případě podezření z výskytu nebo potvrzení jeho výskytu vodní zdroje používané k závlaze partií podezřelých z výskytu a plevelné hostitelské rostliny, popřípadě také pěstební substrát v místech produkce, odkud tyto partie pocházejí.

(7) Výskyt původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby se zjišťuje

- a) laboratorním testováním vzorků hlíz bramboru odebraných v případech uvedených v odstavci 2 písm. a) a b), odstavci 3 a v odstavci 4 písm. b) z porostů nebo ze skládek, v případě uvedeném v odstavci 4 písm. a) z dovážených partií,
- b) prohlídkou celých rostlin bramboru a řezu dužninou hlíz, v porostech nebo ve skládkách, popřípadě také laboratorním testováním vzorků hlíz bramboru, v případech uvedených v odstavci 2 písm. c) a d),
- c) prohlídkou porostů rajčete ve vhodnou dobu s následným laboratorním testováním vzorků rostlin s příznaky napadení původcem hnědé hniloby v případech uvedených v odstavci 5 písm. a),
- d) laboratorním testováním vzorků vody, pěstebního substrátu, pevných odpadů nebo hostitelských rostlin pobřežní vegetace v případě uvedeném v odstavci 5 písm. b) a v odstavci 6.

(8) Způsob prohlídky partie a počet, původ, složení a dobu odběru vzorků při průzkumu, prováděném podle odstavců 2 až 7, rozsah tohoto průzkumu a způsob předávání informací o odebraných a testovaných vzorcích stanovuje v souladu s § 10 odst. 1 zákona rostlinolékařská správa na základě uznávaných vědeckých a statistických zásad a biologie původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby, s přihlédnutím k systémům produkce brambor a dalších hostitelských rostlin a v závislosti na aktuální situaci ve výskytu anebo na míře rizika zavlečení původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby a zveřejní ve Věstníku Státní rostlinolékařské správy (dále jen „Věstník“). Testování odebraných vzorků pro zjištění a určení původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby se provádí způsobem stanoveným v příloze č. 1 nebo stanoveným rostlinolékařskou správou v souladu s § 10 odst. 1 zákona a zveřejněným ve Věstníku.

(9) K průzkumu prováděnému podle odstavců 2 a 4 lze využít rovněž vzorky úředně odebrané nebo testované fyzickou nebo právnickou osobou, pověřenou k této činnosti Ministerstvem zemědělství podle

²⁾ § 2 písm. a) zákona č. 219/2003 Sb., o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů.

§ 71 odst. 1 písm. b) zákona nebo rostlinolékařskou správou podle § 72 odst. 5 písm. i) zákona, pokud bude zajištěno na základě pravidelného dohledu této správy, že vzorky budou odebírány a testovány způsobem stanoveným podle odstavce 8.

(10) Výsledky průzkumu prováděného podle odstavců 2 až 6 oznamuje písemně rostlinolékařská správa bez zbytečného odkladu právnické nebo fyzické osobě, která vlastní příslušnou partii bramboru nebo rajčete a nebo je oprávněna tuto partii uvádět na trh nebo ji pěstuje nebo pěstovala, v případě rozmnožovacího materiálu²⁾ bramboru a rajčete také Ústřednímu kontrolnímu a zkušebnímu ústavu zemědělskému.

(11) Podrobnosti o provádění průzkumu podle odstavců 2 až 8 předkládá rostlinolékařská správa v souladu s § 10 odst. 5 zákona jednou ročně v rozsahu stanoveném v příloze č. 2 části A ostatním členským státům a Komisi za účelem zajištění srovnatelné úrovně potvrzování nepřítomnosti původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby mezi členskými státy. Výsledky úředních průzkumů provedených podle odstavců 2 až 6 oznamuje rostlinolékařská správa jednou ročně ostatním členským státům a Komisi, a to v případě průzkumu v rozmnožovacím materiálu bramboru,²⁾ množeném pouze pro výsadbu na pozemcích množitele, do 1. září, v ostatních případech do 1. června. Údaje oznámení o podrobnostech a výsledcích průzkumu, týkající se porostů hostitelských rostlin, se vztahují vždy k produkci předchozího roku. Podrobnosti tohoto oznámení jsou důvěrné.

§ 4

Opatření při zjištění podezření z výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby

(1) Za podezření z výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby se v souladu s § 11 odst. 1 zákona považuje

- a) rostlinolékařskou správou ověřené zjištění vizuálních příznaků napadení těmito škodlivými organismy a v případě původce hnědé hniloby pozitivní výsledek rychlého screeningového testu podle přílohy č. 1 oddílu I číslo 1 a oddílu II, nebo
- b) pozitivní výsledek screeningového testu provedeného rostlinolékařskou správou nebo pod jejím dohledem způsobem stanoveným v příloze č. 1.

(2) V případě podezření z výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby rostlinolékařská správa v rámci odborného šetření podle § 76 odst. 7 zákona a zvláštního právního předpisu³⁾ zajistí provedení úředního laboratorního testování, a to způ-

sobem stanoveným podle § 3 odst. 8 a při dodržení podmínek stanovených v příloze č. 2 části B, s cílem toto podezření potvrdit nebo vyvrátit.

(3) Rostlinolékařská správa zahájí neodkladně po zjištění podezření z výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby odborné šetření podle § 76 odst. 2 zákona za účelem zjištění původu podezřelého výskytu a v souladu s § 11 odst. 1 zákona

- a) zakáže přesun všech partií nebo zásilek, ze kterých byly odebrány vzorky, s výjimkou těch, které jsou podrobeny opatření pod dohledem rostlinolékařské správy, které vylučuje zjiitelné riziko rozšíření původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby, a
- b) nařídí vhodná opatření založená na stupni odhadovaného rizika dalšího možného šíření původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby s cílem tomuto šíření předejít včetně zákazu přesunu nebo zajištění úředního dohledu nad přesunem všech ostatních partií hostitelských rostlin na pozemcích a v objektech spojených s podezřením z výskytu, popřípadě i mimo tyto pozemky a objekty.

(4) Při podezření na nebezpečí zamoření partií hostitelských rostlin nebo, v případě původce hnědé hniloby, povrchových vod původem z jiného členského státu nebo v některém jiném členském státě, sdělí rostlinolékařská správa neprodleně úřední rostlinolékařské službě příslušného členského státu podrobnosti týkající se tohoto podezření a bude s tímto státem vhodným způsobem spolupracovat.

(5) Pokud bude o podezření z výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby, které může mít původ v České republice nebo které může Českou republiku ohrozit, informována Česká republika, nařídí rostlinolékařská správa vhodná opatření podle odstavců 2 a 3.

§ 5

Opatření při potvrzení výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby

(1) Pokud úřední laboratorní testování odebraných vzorků způsobem stanoveným podle § 3 odst. 8 potvrdí výskyt původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby, rostlinolékařská správa v souladu s § 76 odst. 2 zákona a s přihlédnutím k aktuálním vědeckým výsledkům, biologii původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby a ke způsobu pěstování, uvádění na trh a průmyslového zpracování hostitelských rostlin

- a) označí za zamořené rostliny, zásilku, anebo partii, a zařízení, stroje, dopravní prostředky, sklady

³⁾ § 28 odst. 2 vyhlášky č. 330/2004 Sb., o opatřeních proti zavlékání a rozšiřování škodlivých organismů rostlin a rostlinných produktů.

nebo jejich části a veškeré jiné objekty včetně obalového materiálu, z něhož byl vzorek odebrán, a které přišly do styku s uvedeným rostlinným materiálem, ze kterého byl vzorek odebrán, a místo nebo místa produkce včetně těch, kde je možná úplná výměna pěstebního substrátu, a pozemek, na nichž byly zamořené rostliny vypěstovány a odkud byl vzorek odebrán,

- b) provede odborné šetření zaměřené na zjištění rozsahu pravděpodobného zamoření a prvotního zdroje nákazy v souladu s ustanovením bodu 1 přílohy č. 3 včetně testování klonově příbuzných partií hostitelských rostlin podle § 6 a stanoví v souladu s ustanovením bodu 2 přílohy č. 3 rozsah pravděpodobného zamoření prostřednictvím předsklizňového nebo posklizňového kontaktu, a na základě klonové příbuznosti, pěstování, zavlažování a zalévání nebo jiné pěstitelské vazby se zamořeným předmětem nebo objektem, označeným podle písmene a),
- c) vymezí karanténní území na základě označení zamořených předmětů nebo objektů podle písmene a) a bezpečnostní zónu na základě stanovení rozsahu pravděpodobného zamoření podle písmene b) a možného rozšíření původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby v souladu s ustanovením bodu 3 přílohy č. 3.

(2) V případě potvrzení výskytu původce hnědé hniloby s ohledem na povrchovou vodu, odpadní vodu ze zařízení na zpracování a balení brambor a s ohledem na hostitelské rostliny z čeledi lilkovitých z doprovodné vegetace, jejichž prostřednictvím by při zavlažování, zalévání nebo zaplavení povrchovou vodou mohlo být ohroženo pěstování brambor, rostlinolékařská správa

- a) zajistí úřední laboratorní testování odebraných vzorků povrchových vod a popřípadě hostitelských rostlin z čeledi lilkovitých způsobem stanoveným v příloze č. 1 ve vhodných termínech s cílem určit rozsah zamoření,
- b) označí v souladu s pozitivními výsledky úředního laboratorního testování podle písmene a) povrchovou vodu, z níž byly odebírány vzorky, za zamořenou,
- c) vymezí karanténní území na základě označení povrchové vody za zamořenou podle písmene b) a bezpečnostní zónu na základě stanovení rozsahu pravděpodobného zamoření původcem hnědé hniloby a jeho možného rozšíření podle bodu 3 přílohy č. 3.

(3) Rostlinolékařská správa neprodleně oznámí ostatním členským státům a Komisi v souladu s ustanovením bodu 4 přílohy č. 3 potvrzený výskyt původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby podle odstavce 1 písm. a), popřípadě odstavce 2 písm. b), a sdělí podrobnosti o vymezení karanténního území

a bezpečnostní zóny podle odstavce 1 písm. c), popřípadě odstavce 2 písm. c). Podrobnosti o tomto označení jsou důvěrné.

(4) Pokud jiný členský stát potvrdí výskyt původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby v rostlině, zásilce anebo partii původem z České republiky v oznámení učiněném obdobně podle odstavce 3, rostlinolékařská správa odpovídajícím způsobem a v souladu s ustanovením odstavců 1 a 2 označí zamořené předměty a objekty, stanoví rozsah pravděpodobného zamoření a vymezí karanténní území, popřípadě bezpečnostní zónu.

(5) Rostlinolékařská správa stanoví úředním sdělením ve Věstníku zásady pro vedení odborného šetření podle odstavce 1 písm. b) a pro stanovení rozsahu karanténního území a bezpečnostní zóny, vymezovaných podle odstavce 1 písm. c), odstavce 2 písm. c) a odstavce 4.

§ 6

Testování klonově příbuzných partií hostitelských rostlin

(1) Rostlinolékařská správa zajistí laboratorní testování podle § 4 odst. 2 všech dohledaných partií hostitelských rostlin klonově příbuzných k partiím, které byly označeny za zamořené podle § 5 odst. 1 písm. a), v každém případě však všechny klonově příbuzné partie rozmnožovacího materiálu, a to v rozsahu potřebném ke stanovení prvotního zdroje nákazy a rozsahu možného zamoření s cílem stanovit míru rizika dalšího šíření původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby.

(2) Podle výsledku testování podle odstavce 1 rostlinolékařská správa v případě potřeby označí další předměty a objekty za zamořené, rozšíří rozsah možného zamoření a nově vymezí karanténní území a bezpečnostní zónu podle § 5 odst. 1 písm. a), b) a c).

§ 7

Opatření proti šíření původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby

(1) Rostlinolékařská správa v souladu s § 11 odst. 1 zákona nařídí tato mimořádná rostlinolékařská opatření podle § 76 odst. 2 zákona:

- a) partie hostitelských rostlin označená za zamořenou podle § 5 odst. 1 písm. a) nesmí být sázena a pod dohledem rostlinolékařské správy se s ní naloží způsobem uvedeným v bodě 1 přílohy č. 4, pokud rostlinolékařská správa předem ověří, že neexistuje rozpoznatelné riziko rozšíření původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby a že jsou splněny požadavky na zneškodňování odpadů, stanovené v příloze č. 5, v případě průmyslového zpracování této partie,
- b) partie hostitelských rostlin označená jako pravdě-

podobně zamořená podle § 5 odst. 1 písm. b) nesmí být sázena a pod dohledem rostlinolékařské správy se s ní naloží způsobem uvedeným v bodě 2, popřípadě 3 přílohy č. 4, pokud rostlinolékařská správa předem ověří, že neexistuje rozpoznatelné riziko rozšíření původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby a že jsou splněny požadavky na zneškodňování odpadů, stanovené v příloze č. 5, v případě průmyslového zpracování této partie, a pokud není tato partie na základě výsledku testování klonově příbuzných partií hostitelských rostlin podle § 6 označena jako zamořená podle § 5 odst. 1 písm. a),

- c) zařízení, stroje, dopravní prostředky, sklady nebo jejich části a veškeré jiné objekty včetně obalového materiálu, označené za zamořené podle § 5 odst. 1 písm. a) nebo označené jako pravděpodobně zamořené podle § 5 odst. 1 písm. b), se buď zničí nebo podrobí očištění a dezinfekci pomocí vhodných metod uvedených v příloze č. 6 s tím, že po provedení očištění a dezinfekce se tyto objekty a předměty za zamořené ani za pravděpodobně zamořené nepovažují,
- d) v karanténním území a bezpečnostní zóně, vymezených podle § 5 odst. 1 písm. c), popřípadě podle § 5 odst. 2 písm. c), musí být provedena opatření stanovená v případě výskytu původce kroužkovitosti v bodě 4 přílohy č. 4 a v případě výskytu původce hnědé hniloby v bodě 5 přílohy č. 4.

(2) Rostlinolékařská správa může nařídit podle § 11 odst. 1 zákona přísnější mimořádná rostlinolékařská opatření proti šíření původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby než opatření uvedená v odstavci 1, pokud budou tato opatření odborně odůvodněná, splnitelná a účinná. Podrobnosti o těchto opatřeních a o opatřeních nařízených podle odstavce 1 písm. d) uvnitř karanténního území a v bezpečnostní zóně sděluje rostlinolékařská správa ostatním členským státům a Komisi spolu s registračním číslem dotčených povinných osob, registrovaných podle § 12 odst. 1 zákona.

(3) Rostlinolékařská správa zruší podle § 76 odst. 4 písm. b) zákona mimořádná rostlinolékařská opatření nařízená podle odstavce 1 a odstavce 2 po jejich splnění a po uplynutí doby stanovené k jejich splnění.

(4) Přechovávání původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby je v souladu s § 7 odst. 1 zákona zakázáno s výjimkou jejich přechovávání k vědeckým, šlechtitelským nebo diagnostickým účelům, které povoluje rostlinolékařská správa podle § 8 odst. 1 zákona, pokud tím nebudou narušena ochranná opatření při jejich výskytu ani nevznikne riziko jejich šíření.

§ 8

Testování rozmnožovacího materiálu²⁾ bramboru

(1) Rozmnožovací materiál²⁾ bramboru, vypěstovaný na území České republiky a uváděný na trh, musí být podroben laboratornímu testování, prováděnému v rámci detekčního průzkumu podle § 3 odst. 2, v rozsahu podle odstavce 2 a v souladu s § 3 odst. 8 a 9, a shledán prostým původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby.

(2) Testování podle odstavce 1 se v příslušném sklizňovém roce podrobí

a) rostliny šlechtitelského rozmnožovacího materiálu⁴⁾ bramboru určené k výrobě předstupňů a reprezentativní vzorky všech partií rozmnožovacího materiálu bramboru, pokud byl v posledním uplynulém sklizňovém roce v partii rozmnožovacího materiálu²⁾ bramboru původem z České republiky potvrzen výskyt původce kroužkovitosti, a nebo

b) pokud byl v posledním uplynulém sklizňovém roce v partii rozmnožovacího materiálu²⁾ bramboru původem z České republiky potvrzen výskyt původce hnědé hniloby, buď

1. rostliny šlechtitelského rozmnožovacího materiálu⁴⁾ bramboru a předstupňů a reprezentativní vzorky všech partií základního rozmnožovacího materiálu bramboru v případech potvrzené klonové souvislosti se zaměřením na tuto souvislost, nebo

2. reprezentativní vzorky všech partií základního rozmnožovacího materiálu bramboru nebo předstupňů a šlechtitelského rozmnožovacího materiálu bramboru⁴⁾ v případech, u nichž prokazatelně neexistuje žádná klonová souvislost, nebo

c) rostliny šlechtitelského rozmnožovacího materiálu bramboru⁴⁾ nebo reprezentativní vzorky všech partií základního rozmnožovacího materiálu bramboru nebo předstupňů, pokud výskyt původce kroužkovitosti ani původce hnědé hniloby nebyl v posledním uplynulém sklizňovém roce potvrzen v partii rozmnožovacího materiálu²⁾ bramboru původem z České republiky.

§ 9

Účinnost

Tato vyhláška nabývá účinnosti dnem jejího vyhlášení.

Ministr:

Ing. Palas v. r.

⁴⁾ § 2 písm. m) zákona č. 219/2003 Sb.

A. Metody detekce a diagnózy původce kroužkovitosti

1. Získání výkrojků z pupkové části hlízy

1. 1. Omyje se 200 hlíz pod tekoucí vodou a pomocí řádně vydezinfikovaného řezného nástroje se odstraní epidermis okolo pupkového konce každé hlízy; dezinfekci lze provést tak, že se nástroj smočí v 70 % roztoku etanolu a ožehne.
1. 2. Pečlivě se nožem nebo škrabkou na brambory odeberou konické výkrojky pletiva z pupkových konců brambor. Omezí se na minimum nadbytečná část pletiva nezahrnující cévní svazky. Po odebrání musí být výkrojky z pupkových konců zpracovány do 24 hodin (viz odstavec 3) nebo konzervovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu nejdéle dvou týdnů.

2. Vizuální vyšetření na přítomnost příznaků kroužkovitosti

Po odebrání výkrojků z pupkových konců se každá hlíza rozřízne napříč a prohlédne, zda nevykazuje příznaky kroužkovitosti.

Hlízy se zmáčknou a sleduje se, zda z vodivých pletiv vystupuje macerovaná hmota.

Nejranějšími příznaky jsou slabá sklovitost nebo průsvitnost pletiva bez měknutí v okolí cévního systému, zejména blízko pupku. Prstenec svazků cévních na pupkovém konci hlíz může mít nepatrně tmavší zbarvení než normálně. Prvním dobře identifikovatelným příznakem je žlutavé zbarvení prstence cévních svazků a při jemném zmáčknutí hlízy sloupky syrovité hmoty vystupující z cév. Tato hmota obsahuje milióny bakterií. V tomto stadiu mohou vodivá pletiva hnědnout. Zpočátku mohou být tyto příznaky omezeny na jednu část prstence, nemusí se vyskytovat jen blízko pupkového konce a mohou se postupně šířit na celý prstenec. S postupem infekce dochází k destrukci vodivých pletiv: vnější korová část se v tomto místě může oddělit od vnitřní korové části. V pokročilých stádiích infekce se objevují na povrchu hlízy praskliny, často s červenohnědými okraji. Druhotná houbová nebo bakteriální infekce může příznaky maskovat a může být obtížné, ne-li nemožné, rozlišit pokročilé příznaky kroužkovitosti od jiných hnilob bramboru.

3. Příprava vzorků pro Gramovo barvení, imunofluorescenční test (IF test) a test na lilku vejcoplodém

- 3.1. Homogenizují se pupkové konce hlíz až do úplné macerace v kapalině netoxické pro původce kroužkovitosti (např. 0,05 M fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku (PBS) pH 7,0) při teplotě nižší než $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; doporučuje se přidat netoxický prostředek proti vložkování (deflokulant) a netoxický protipěnový prostředek (Dodatky 1 a 2).

- 3.2. Bakterie z homogenátu se extrahují jedním z následujících postupů (alternativní metodu extrakce uvádí Dinesen, 1984):
- A. a) Odstředí se při zrychlení nejvýše 180 g po dobu 10 minut.
b) Odstředí se supernatant při zrychlení neklesajícím pod 4 000 g po dobu 10 min. Dekantuje se a odstraňuje supernatant.
 - B. a) Macerát se nechá stát 30 min., aby se usadila drť pletiv. Dekantuje se supernatant, aniž by se rozvířil sediment.
b) Supernatant se přefiltruje přes filtrační papír (Whatman No 1) umístěný v Buechnerové nálevce pomocí vodní vývěvy. Filtrát se sebere do centrifugačních zkumavek. Filtr se promyje sterilním PBS až do maximálního objemu filtrátu 35 ml.
c) Filtrát se odstředí při nejméně 4 000 g po dobu 20 minut.
- 3.3. Suspenduje se peleta ve sterilním 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,2 (Dodatek 2), aby se získal celkový objem přibližně 1 ml. Suspenze se rozdělí na dvě stejné části a jedna část se uschová pro účely srovnávání (referenční vzorek) zmrazením při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}^1$ nebo lyofilizací. Je prokázáno (Janse a Van Vaerenberg, 1987), že zmrazení může snížit životnost sledované bakterie. Tento problém lze vyřešit suspendováním pelety v 10% glycerolu. Druhá část suspenze se rozdělí na dvě poloviny. Jedna se použije na IF test a barvení podle Grama, druhá pro test na lilku vejcoplodém.
- 3.4. Je nezbytně nutné, aby se se všemi pozitivními kontrolami a vzorky kroužkovitosti zacházelo odděleně, aby se předešlo zamoření. To se týká i sklíček na IF testy a testů na lilku vejcoplodém.

4. Gramovo barvení

- 4.1. Připraví Gramovo barvení pro všechna ředění pelety (5.2.1.) a pro všechny rozříznuté hlízy (2), které vykazují sklovitost, hnití nebo jiné podezřelé příznaky. Vzorky je třeba odebírat z okraje napadených pletiv.
- 4.2. Připraví se Gramovo barvení pro známé kultury původce kroužkovitosti a pokud možno i pro pletivo infikované přirozenou cestou (5.1.).
- 4.3. Zjistí se, které vzorky obsahují typické grampozitivní koryneformní buňky. Buňky původce kroužkovitosti jsou obvykle 0,8 až 1,2 μm dlouhé a 0,4 až 0,6 μm široké.

Vhodná metoda barvení je uvedena v Dodatku 3.

V preparátech z přirozených infekcí nebo z čerstvě izolovaných kultur často převládají kokovité tyčinky, které jsou poněkud menší než buňky ze starších agarových kultur. Buňky původce kroužkovitosti jsou na většině živých médií pleomorfní koryneformní tyčinky a mohou vykazovat proměnlivou reakci podle Grama. Buňky jsou jednotlivé, ve dvojicích s charakteristickými

zahnutími do „V“ nebo „Y“ typickými pro dělení krouživým ohybem a příležitostně v nepravidelných skupinách často označovaných jako palisády a čínská písmena.

5. Schéma pro IF test

- 5.1. Použije se antisérum proti známému kmenu kroužkovitosti - ATCC33113 (NCPBP 2137) nebo NCPBP 2140. Toto antisérum musí mít větší IF titr než 1 : 600. Zařadí se jedna kontrola PBS na testovací podložní sklíčko ke stanovení, zda nedojde k nespecifické kombinaci bakteriálních buněk s konjugátem fluorescenčního isothiokyanátu a antikráličího imunoglobulinu (FITC). Specifické kmeny původce kroužkovitosti (ATCC 33113, NCPBP 2137, NCPBP 2140) se použijí jako homologická kontrola antigenů na jiném podložním sklíčku. Na stejném podložním sklíčku se pokud možno použije jako paralelní kontrola přirozeně infikované pletivo (uchované lyofilizací nebo zmrazením při -20°C) (obr. 2).

5.2. Postup

- 5.2.1. Připraví se řada tří desetinásobných ředění ($10^1, 10^2, 10^3$) výsledné pelety v destilované vodě (obr. 1).
- 5.2.2. Do jamek vícejamkového sklíčka se napipetuje z každého ředění pelety nebo suspenze původce kroužkovitosti (přibližně 10^6 buněk/ml) změřený standardní objem dostačující k naplnění jamky (přibližně 25 μl) (obr. 1)

Obrázek 1

Sklíčko se vzorkem a kontrolním fosfátovým puforem (PBS)

neředěný vzorek	ředěný vzorek			
	1:10	1:100	1:1000	
O	O	O	O	O
O	O	O	O	O
PBS	antisérum ve zvoleném ředění			

vzorek
duplikát vzorku

Obrázek 2

Sklíčko s pozitivní kontrolou

O	O	O	O	O	původce kroužkovitost 10 ⁶ /ml
O	O	O	O	O	pozitivní extrakt z bramboru
1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	ředění antiséra

- 5.2.4. Naplní se příslušné jamky antisérem původcem kroužkovitosti v doporučených ředěních roztokem 0,01 M PBS pH 7,2 (Dodatek 2), jak je uvedeno na obrázku 1. (Použije se PBS pro kontrolu FITC). Pracovní ředění antiséra by mělo mít přibližně polovinu titru IF. Jestliže se má pracovat s jinými ředěními antiséra, musí se připravit pro každé ředění, s nímž se má pracovat, samostatná sklíčka.
- 5.2.5. Inkubuje se ve vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 30 minut, není-li výrobcem stanoveno jinak.
- 5.2.6. Pečlivě se opláchne roztokem 0,01 M PBS pH 7,2. Promývá se po dobu pěti minut ve třech vždy vyměněných roztocích 0,01 M PBS pH 7,2.
- 5.2.7. Pečlivě se odstraní přebytečná vlhkost.
- 5.2.8. Do každé jamky se přidá konjugát FITC ve zředění používaném ke stanovení titru a nechá se inkubovat ve tmavé vlhké komůrce při pokojové teplotě po dobu 30 minut, není-li výrobcem stanoveno jinak.
- 5.2.9. Opláchne se a omývá jako v předcházejícím případě.
- 5.2.10. Do každé jamky se přidá přibližně 5 - 10 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7,6 s glycerinem (nebo podobnou látkou o pH neklesajícím pod 7,6) a přikryje krycím sklíčkem (Dodatek 2).
- 5.2.11. Prohlíží se pod mikroskopem, vybaveným zdrojem epifluorescenčního světla a filtry vhodnými pro práci s FITC. Vhodné je zvětšení od 400 do 1 000. Pečlivě se prohlédnou jamky v přímkách jdoucích v pravých úhlech středem a po obvodu jamky.

Pozorují se fluoreskující buňky v pozitivních kontrolách a určí se titr. Pozorují se fluoreskující buňky v jamce s kontrolou FITC/PBS a pokud se zde nevyskytují, přejde se k jamkám testovacích vzorků. V nejméně 10 mikroskopových polích se určí průměrný počet morfologicky typických fluoreskujících buněk v jednom poli a vypočítá jejich počet na 1 ml neředěné pelety (dodatek 4).

Existuje několik problémů podstatných pro imunofluorescenční test.

- V peletách bramboru se pravděpodobně vyskytnou doprovodné populace fluoreskujících buněk s atypickou morfologií a křížově reagující saprofytické bakterie s rozměry a morfologií podobnou

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*. V úvahu se berou pouze fluoreskující buňky s typickou velikostí a morfologií.

Vzhledem k možnosti křížových reakcí testují se vzorky s pozitivním imunofluorescenčním testem opětovně pomocí odlišného antiséra .

- Technický limit zjištění touto metodou je mezi 10^3 a 10^4 buněk/ml neředěné pelety. Vzorky s počtem IF typických buněk na hranici detekčního limitu jsou obvykle na původce kroužkovitosti negativní, ale mohou být postoupeny do testu na lilku vejcoplodém.

Imunofluorescenční test se považuje za negativní u kteréhokoliv vzorku, kde nebyly nalezeny morfologicky typické fluoreskující buňky. Tyto vzorky se považují za „nezamořené“ bakteriemi *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Test na lilku není požadován.

Imunofluorescenční test se považuje za pozitivní u kteréhokoliv vzorku, kde byly nalezeny morfologicky typické fluoreskující buňky.

Vzorky, u kterých byl pozitivní imunofluorescenční test u obou užitých antisér, se považují za „pravděpodobně zamořené“ bakteriemi *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Test na lilku je požadován pro všechny vzorky považované za pravděpodobně zamořené.

6. Test na lilku vejcoplodém

Podrobnosti o pěstování jsou uvedeny v Dodatku 5.

- 6.1 Peleta podle 3.3. se rozdělí mezi alespoň 25 rostlin lilku vejcoplodého ve fázi tří listů (Dodatek 5) jednou z níže uvedených metod (6.2, 6.3 nebo 6.4).

6.2 Inokulace zářezem I

- 6.2.1. Každý květináč se horizontálně podepře (pro květináče o průměru 10 cm je vhodný blok pěnového polystyrénu s vyhloubenou částí o rozměrech 5 cm hloubky, 10 cm šířky a 15 cm délky). Pro každý testovaný vzorek se mezi stonek a blok umístí proužek sterilní hliníkové fólie. Rostlinu je možno fixovat na místě gumovým páskem kolem bloku.

- 6.2.2. Pomocí skalpelu se provede mezi děložními lístky a prvním pravým listem podélný nebo mírně úhlopříčný řez dlouhý 0,5 až 1,0 cm a hluboký přibližně jako tři čtvrtiny průměru stonku.

- 6.2.3. Zářez se přidrží otevřený pomocí špičky čepele skalpelu a nanese se do něj inokulum štětečkem na oční linky nebo jemným malířským štětečkem namočeným do pelety. Zbytek petety se rozdělí mezi všechny testovací rostliny lilku.

- 6.2.4. Řez se překryje sterilní vazelínou aplikovanou injekční stříkačkou o objemu 2 ml.

6.3 Inokulace zářezem II

- 6.3.1. Na stonek rostliny držené dvěma prsty se napipetuje mezi děložními lístky a prvním pravým listem kapka (přibližně 5 až 10 μ l) suspendované pelety.

- 6.3.2. Pomocí sterilního skalpelu se udělá sešikmý zářez (v úhlu přibližně 5°), dlouhý 1,0 cm a hluboký přibližně jako 2/3 tloušťky stonku, přičemž s řezem se začne v místě kapky suspendované pelety .
- 6.3.3. Řez se zakryje sterilní vazelínou z injekční stříkačky.
- 6.4. *Inokulace injekční stříkačkou*
- 6.4.1. Pro snížení vnitřního napětí buněk (turgoru) se rostliny lilku den před inokulací nezalévají.
- 6.4.2. Stonky lilku vejcoplodého inokulujte těsně nad děložními lístky pomocí injekční stříkačky s podkožní jehlou (ne méně než 23G). Peleta se rozdělí mezi testovací rostliny lilku vejcoplodého.
- 6.5. Inokuluje se 25 rostlin stejnou inokulační metodou (6.2, 6.3 nebo 6.4) známou kulturou původce kroužkovitosti a kde je to možné i pletivem z přirozeně infikovaných hlíz bramboru (5.1).
- 6.6. Inokuluje se 25 rostlin sterilním 0,05 M PBS stejnou inokulační metodou (6.2, 6.3 nebo 6.4).
- 6.7. Po inokulaci se rostliny nechají inkubovat ve vhodných podmínkách (Dodatek 5) po dobu 40 dní. Pravidelně po osmi dnech se spočítají rostliny vykazující příznaky. Původce kroužkovitosti působí u lilku vejcoplodého vadnutí listů, které může začít jako okrajová nebo mezižilková ochablost (ztráta turgoru). Zvadlé pletivo může zprvu být tmavozelené nebo strakaté, ale před znekrotizováním zesvětlí. Povadlá místa mezi žilnatinou mívají často mastně vodnatý vzhled. Nekrotická pletiva mívají často jasně žlutý okraj. Rostliny vždy neodumírají; čím déle trvá období do objevení se příznaků, tím je větší naděje na přežití. Rostliny mohou infekci odrůst. Mladé rostliny lilku vejcoplodého jsou mnohem citlivější vůči nízkým koncentracím původce kroužkovitosti než starší rostliny, proto je nezbytné používat rostliny ve fázi tří listů a nebo krátce před ní. Vadnutí mohou také způsobovat populace jiných bakterií nebo hub přítomných v peletě z pletiv hlízy. Patří k nim *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* a *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, *Phoma exigua* var. *foveata*, jakož i velké koncentrace saprofytických bakterií. Tyto případy vadnutí lze odlišit od případů způsobených původcem kroužkovitosti, jelikož rychle vadnou celé listy nebo celé rostliny.
- 6.8. Připraví se Gramovo barvení (4) pro všechny partie lilku vejcoplodého vykazující příznaky napadení. Použijí se části zvadlých listových pletiv a pletivo ze stonků rostlin a izolují je na vhodných živných médiích (7). Listy a stonky lilku vejcoplodého se povrchově dezinfikují otřením 70% etanolem.
- 6.9. Za určitých okolností, zejména pokud nejsou růstové podmínky optimální, se může stát, že infekce zůstává v rostlinách lilku vejcoplodého latentní dokonce i po 40 denní inkubaci. Takové infekce mohou mít za následek zakrnělost a ztrátu vitality inokulovaných rostlin. Pokud je IF test je považován za pozitivní, je nezbytné další testování. Je proto důležité porovnávat rychlost

růstu všech testovacích rostlin lilku vejcoplodého s kontrolami inokulovanými sterilním 0,05 M PBS a sledovat podmínky prostředí ve skleníku.

Pro další testování se stanoví tato doporučení:

- 6.9.1. Odříznou se stonky nad místem inokulace a odstraní se listy.
- 6.9.2. Stonky se macerují v roztoku 0,05 M PBS s pH 7,0, jak je uvedeno v bodech 3.1 až 3.2.
- 6.9.3. Polovina pelety se použije k provedení Gramova barvení (4) a testu IF (5).
- 6.9.4. Druhá polovina pelety se použije k provedení dalšího testu na lilku vejcoplodém (6), pokud je Gramovo barvení anebo IF test pozitivní. Jako kontrola se použijte známá kultura původce kroužkovitosti a sterilní 0,05 M PBS. Pokud v následující testu nejsou příznaky napadení pozorovány, považuje se vzorek za negativní.

7. Izolace původce kroužkovitosti

Diagnóza může být potvrzena pouze tehdy, je-li původce kroužkovitosti izolován a takto identifikován (8). Ačkoliv je původce kroužkovitosti náročným organismem, je možno ho izolovat z pletiv projevujících příznaky napadení. Mohou jej však přerůst rychle rostoucí saprofytické bakterie, a proto se nedoporučuje provádět izolaci přímo z pelety pletiva hlízy (3.3). Lilek vejcoplodý je výtečným selektivním obohacovacím živným médiem pro růst původce kroužkovitosti a zároveň je také vhodný pro použití k potvrzujícímu testu pomocí hostitelské rostliny. Izolace je třeba provést ze všech hlíz bramboru a rostlin lilku vejcoplodého vykazujících příznaky napadení (4.6). Kde je to nezbytné, je třeba provést maceraci stonků lilku jako v bodech 3. a 6.9.

- 7.1. Rozetře se suspenze na jedno z následujících médií: (složení uvedena v Dodatku 6):

živný dextrosový agar (pouze pro subkultury),
kvasničný pepton glukosový agar,
živný kvasničný dextrosový agar,
agar z kvasničného extraktu s minerálními solemi.

Inkubuje se po dobu maximálně 20 dní při teplotě 21 °C.

Původce kroužkovitosti pomalu roste a obvykle vytváří za 10 dnů kolonie velikosti špendlíkové hlavičky, vyklenuté, smetanově zbarvené.

Pro zaručení čistoty kultury se provede rekultivace novým roztěrem.

U subkultur se zlepšuje rychlost růstu. Typické kolonie jsou smetanově bílé nebo barvy slonoviny, jsou okrouhlé, hladké, vyvýšené, konvexně vyklenuté, slizovitě tekuté, s rovnými okraji a obvykle mají v průměru 1 - 3 mm

Identifikace

Ze zdravých i nemocných rostlin bramboru a lilku je možné izolovat mnohé grampozitivní koryneformní bakterie se znaky kolonií podobnými jako u původce kroužkovitosti. V této souvislosti musí být původce kroužkovitosti identifikován následujícími testy:

IF test (5.1),

test na lilku vejcoplodém,
nutriční a fyziologické testy (Dodatek 7),

- oxidačně fermentační testy (O/F),
- oxidasový test,
- růst při 37 °C,
- tvorba ureasy,
- hydrolýza eskulinu,
- hydrolýza škrobu,
- tolerance k 7% roztoku NaCl ,
- indolový test,
- katalasový test,
- tvorba H₂S,
- využití citrátu,
- hydrolýza želatiny,
- tvorba kyseliny z: glycerolu, laktosy, rhamnosy a salicinu,
- Gramovo barvení.

Všechny testy musí zahrnovat kontrolu se známým kmenem původce kroužkovitosti. Nutriční a fyziologické testy musí být provedeny s inokulem ze subkultur na živném agaru. Morfologická srovnání se provádějí z kultur z živného dextrosového agaru.

Pro IF test hustota populace buněk musí být upravena na 10⁶ buněk/ml. IF titr musí být podobný titru známé kultury původce kroužkovitosti.

Pro test na lilku vejcoplodém musí být hustota populace buněk upravena na 10⁷ buněk/ml. Testy na lilku vejcoplodém musí zahrnovat 10 rostlin pro každý testovaný organismus, opět za použití kontrol tvořených známou kulturou kroužkovitosti a sterilní vodou. U čistých kultur by mělo během 20 dnů nastat typické vadnutí, avšak rostliny, které nevykazují žádné příznaky napadení po této době, je nutno inkubovat celkem 30 dní při teplotách příznivých pro růst lilku, ale nepřesahujících 30 °C (Dodatek 5). Jestliže se po 30 dnech příznaky napadení nevyskytují, nemůže být kultura považována za patogenní formu kroužkovitosti.

<i>Test</i>	<i>Původce kroužkovitosti</i>
O/F	inertní nebo slabě oxidační
Oxidasa	-
Katalasa	+
Redukce nitrátů	-
Aktivita ureasy	-
Tvorba H ₂ S	-
Tvorba indolu	-
Využívání citrátu	-
Hydrolýza škrobu	- nebo slabá
Růst při 37 °C	-
Růst v 7% NaCl	-
Hydrolýza želatiny	-
Hydrolýza eskulinu	+
Tvorba kyseliny z:	
- glycerolu	-
- laktosy	- nebo slabá
- rhamnosy	-
- salicinu	-

*Dodatek 1***SLOŽENÍ MACERAČNÍHO ROZTOKU DOPORUČENÉ LELLIOTEM A SELLAREM, 1976**

D C silikonový protipěnový prostředek MS A (Hopkins & Williams Ltd., kat. č. 9964-25, Chadwell Heath, Essex, England)	10 ml	
vložky Lubrol W (ICI Ltd)	0,5 g	
pyrofosforečnan čtyřsodný	1 g	
0,05 M fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku (PBS) pH 7,0 (dodatek 2)		1 litr

*Dodatek 2***PUFRY****0,05 M PBS pH 7,0**

Tento pufr může být použit pro maceraci pletiv hlíz (2.1.)

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
NaCl	8,0 g
destilovaná voda do	1 litru

0,01 M PBS pH 7,2

Tento pufr se používá pro ředění antiséra a omývání sklíček pro IF

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,7 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
destilovaná voda do	1 litru

0,01 M fosfátový pufr s glycerinem pH 7,6

Tento pufr se používá v IF testu jako krycí tekutina na podložní sklíčko ke zvýšení fluorescence.

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g
glycerol	50 ml
destilovaná voda	100 ml

*Dodatek 3***GRAMOVO BARVENÍ V HUCKEROVĚ MODIFIKACI (DOETSCH, 1981)****Roztok krystalové violeti**

Rozpustí se 2 g krystalové violeti v 20 ml 95% ethanolu.

Rozpustí se 0,8 g šťavelanu amonného v 80 ml destilované vody.

Smíchají se oba roztoky.

Lugolův jódový roztok

jód	1 g
jodid draselný	2 g
destilovaná voda	300 ml
Společně se pevné látky rozetřou pomocí tloučku v misce. Nasypou se do vody a míchají v uzavřené nádobě do rozpuštění.	

Safraninový roztok kontrastního barviva

Zásobní roztok:

safranin O	2,5 g
95% etanol	100 ml

Zamíchá se a uloží.

Ředěním 1:10 se připraví pracovní roztok.

Postup barvení:

1. Připraví se roztěry, vysuší na vzduchu a fixují zahřátím.
2. Zaliže se sklíčko roztokem krystalové violeti a nechá 1 minutu působit.
3. Krátce se omyje pod tekoucí vodou.
4. Zaliže se Lugolovým jódovým roztokem a nechá působit po dobu 1 minuty.
5. Opláchne se pod tekoucí vodou a vysuší savým papírem.
6. Odbarví se pomocí po kapkách přidávaného 95% etanolu tak dlouho, pokud se vyplavuje barvivo, nebo se ponoří za jemného pohybování do etanolu na dobu 30 sekund.
7. Opláchne se pod tekoucí vodou a vysuší savým papírem.
8. Zaliže se na dobu 10 s safraninovým roztokem.
9. Opláchne se pod tekoucí vodou a vysuší savým papírem.

Grampozitivní bakterie se barví fialově modře, gramnegativní bakterie se barví růžově červeně.

Dodatek 4

STANOVENÍ KONCENTRACE IF POZITIVNÍCH BUNĚK

Plocha (S) jednoho pole na podložním sklíčku s více jamkami
 $= \pi D^2/4$ (1)

kde D = průměr pole.

Plocha (s) pole objektivu
 $= \pi d^2/4$ (2)

kde d = průměr pole objektivu

Vypočítá se d buď přímým měřením, nebo z následujícího vzorce:

$s = \pi i^2 / G^2 K^2 \cdot 4$ (3)

kde i = koeficient pole (závisí na typu okuláru mikroskopu a pohybuje se v rozmezí od 8 do 24),

K = tubusový koeficient (1 nebo 1,25),

G = zvětšení objektivu (100x, 40 x atd.),

ze vzorce (2) $d = \sqrt{4s/\pi}$

ze vzorce (3) $d = \text{druhá odmocnina výrazu } [(4 \times \pi i^2 / G^2 K^2 \cdot 4) / \pi] = i / GK$ (4)

Zjistí se počet typických fluoreskujících buněk v jedné pozorovací poli (c).

Vypočítá se počet typických fluoreskujících buněk v jamce (C).

$C = c \cdot S/s$

Vypočítá se počet typických fluoreskujících buněk na 1 ml pelety (N)

$N = C \cdot F \cdot 1000/y$,

kde y = objem pelety v jamce,

kde F = zředovací faktor pelety.

Dodatek 5

PĚSTOVÁNÍ LILKU VEJCOPLODÉHO

Vysejí se semena lilku vejcoplodého (*Solanum melongena* cv. Black Beauty) do sterilního výsevního substrátu. Semenáčky s plně rozvinutými děložními lístky (10 až 14 dní) se přepichjí do sterilního pěstebního substrátu.

Používají se rostliny ve fázi 3 listů, kdy mají dva, ale ne více než tři plně rozvinuté pravé listy.

Lilek se pěstuje ve skleníku za následujících podmínek:

délka dne: 14 hodin nebo přirozená délka dne, pokud je delší;

teplota: - den: 21 až 24 °C,
- noc: 15 °C.

Poznámka: Kroužkovitost neroste při teplotách > 30 °C. Pokud noční teploty neklesnou na 15 °C, může dojít k poškození chromozomů (stříbřitá nekróza).

Poškození kořenů larvami smutnic lze zabránit užitím vhodného insekticidu.

Osivo lilku vejcoplodého odrůdy Black Beauty lze získat od:

1. AB Hammenhögs Frö,
270 50 Hammenhögs,
Švédsko;
2. HURST Seeds Ltd,
Avenue Road,
Witham,
Essex CM8 2DX,
Anglie;
3. ASGRO Italia Sp A,
Corso Lodi, 23,
Milan;
Itálie
4. KÜPPER
Mitteldeutsche Samen GmbH,
Hessenring 22,
D-37269 Eschwege
Spolková republika Německo.

*Dodatek 6***MÉDIA PRO RŮST A IZOLACI KROUŽKOVITOSTI****Živný agar (NA)**

Baktoagar (Difco) v destilované vodě podle instrukcí výrobce. Sterilizuje se v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Živný dextrosový agar (NDA)

Baktoagar (Difco) obsahující 1 % D(+) glukosy (monohydrátu). Sterilizuje se v autoklávu při 115 °C po dobu 20 minut.

Kvasnico-pepton-glukósový agar (YPGA)

Kvasnicový bakto extrakt (Difco) (č. 0127)	5 g
Baktopepton (Difco) (č. 0118)	5 g
D(+)-glukosa (monohydrát)	10 g
Čistý baktoagar (Difco) (č. 0560)	15 g
destilovaná voda	1 litr

Sterilizují se 0,5 litrové objemy média v autoklávu při 115 °C po dobu 20 minut.

Médium s kvasničným extraktem a minerálními solemi (YGM)

Kvasnicový baktoextrakt (Difco)	2,0 g
D(+)-glukosa (monohydrát)	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,015 g
NaCl	0,05 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,0055 g
čistý baktoagar (Difco)	18 g
destilovaná voda	1 litr

Sterilizují se 0,5 litrové objemy média v autoklávu při 115 °C po dobu 20 minut.

Dodatek 7

NUTRIČNÍ A FYZIOLOGICKÉ TESTY PRO IDENTIFIKACI KROUŽKOVITOSTI

Všechna média jenutno inkubovat při 21 °C a po šesti dnech vyhodnotit. Pokud nedošlo k žádnému růstu, inkubují se po dobu nejvýše 20 dní.

– **Oxidačně fermentační test** (Hugh & Leifson), 1953 – O/F test.

Základní médium:

KCl	0,2 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g
baktopepton (Difco)	1,0 g
čistý bactoagar (Difco)	3,0 g
D(+)-glukosa (monohydrát)	10,0 g
bromothymolová modř	0,03 g
destilovaná voda	1 litr

Smíchá se a upraví pomocí 1N KOH pH na 7,0 až 7,2.

Rozdělí se do kultivačních zkumavek Pyrex 16 mm x 100 mm (objem 12 ml) po 5 ml a 10 ml.

Sterilizuje se v autoklávu při 115 °C po dobu 10 minut.

Vpichem se naočkují 5 ml a 10 ml zkumavky každou kulturou. Asepticky se přidá do 10 ml zkumavky 1 až 2 ml sterilního tekutého parafinu a inkubuje se.

Pozitivní reakce:

Zkumavka	Zbarvení	Interpretace
otevřená/zavřená	žluté/žluté	fermentační
otevřená/zavřená	žluté/modro-zelené	oxidační
otevřená/zavřená	zelenavé/modro-zelené	oxidační nebo inertní

– **Oxidasový test** (Kovacs, 1956)

Kovacsovo oxidasové činidlo:

1% vodní roztok tetramethylparafenyldiamin- dihydrochloridu (BDH č. 30386) v destilované vodě.

Toto činidlo by mělo být čerstvě připravováno 1 ml objemech nebo může být uchováváno v lahvi z hnědého skla při 5 °C po dobu 1 až 4 týdnů.

Jedna kapka činidla se kápne na filtrační papír v čisté Petriho misce. Ihned se pomocí platinové kličky rozetře některá z testovaných kultur z živného agaru.

Pozitivní reakce: Během 10 sekund se vyvine purpurové zbarvení. Kultury vybarvující se během 10 až 30 sekund jsou slabě pozitivní.

Poznámka: Je důležité používat platinové kličky a NA kultury (kultury z živného média), protože stopy železa nebo vysoký obsah cukru v živném růstovém médiu mohou způsobit falešné pozitivní výsledky.

– **Tvorba kyseliny z laktosy, rhamnosy, salicinu, glycerolu**

Připraví se Hugh & Leifsonovo O/F médium bez glukosy. Rozdělí se do zkumavek po 5 ml. Sterilizuje se v autoklávu při teplotě 115 °C po dobu 10 minut. K roztavenému základu při 45 °C se přidá asepticky 0,5 ml filtrací sterilizovaného 10% vodního roztoku glycerolu, laktosy, rhamnosy nebo salicinu. Pečlivě se promíchá.

Pozitivní reakce: Změna zbarvení modrozeleného na žluté indikuje tvorbu kyseliny.

– **Katalasový test**

Kápka třicetiprocentního peroxidu vodíku se kápne na čisté podložní sklíčko a pomocí platinové kličky se vytvoří emulze se zkoumanou kulturou.

Pozitivní reakce: Tvorba bublinek kyslíku v kapce indikuje přítomnost katalasy.

– **Aktivita nitrátoreduktasy a denitrifikace (Bradbury, 1970)**

Kultivační médium:

KNO ₃ (prostý dusitanu)	1 g
kvasnicový bactoagar (Difco)	1 g
K ₂ HPO ₄	5 g
destilovaná voda	1 litr

Rozdělí se po 10 ml do 20ml lahviček. Sterilizuje se v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Činidlo A:

H ₂ SO ₄	8 g
5N kyselina octová	1 litr

Činidlo B:

naftylamin	5 g
5N kyselina octová	1 litr

Naočkuje se nitrátové médium ve dvou opakováních. Po 10 a 20 dnech se přidá po jedné kapce Lugolova jodového činidla, 0,5 ml činidla A a 0,5 ml činidla B. Pokud se médium nezbarví do červena, přidá se přibližně 50 mg zinkového prášku. Sleduje se barevná reakce.

Pozitivní reakce:

Barevná reakce

	Stadium 1	Stadium 2
Žádná redukce dusičnanu	bezbarvá	červená
Redukce dusičnanu i dusitanu (pouze nitrátoreduktasa)	červená	-
Snížení dusičnanu mimo dusitan (denitrifikace – nitrit a nitrátoreduktasa)	bezbarvá	bezbarvá

Tvorba ureasy (Lelliott, 1966)

Základní médium:

základ pro oxid močovinový agar (CM53)	2,4 g
--	-------

destilovaná voda 95 ml
Sterilizuje se v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Zchladí se roztavený základ na 50 °C a asepticky se přidá 5 ml filtrací sterilizovaného 40% vodního roztoku močoviny (Oxoid SR20). Řádně se promíchá.
Rozdělí se po 6 ml do sterilních zkumavek (16 x 100 mm) a nechá ustát v šikmé poloze na vhodné podložce.
Pozitivní reakce: Za přítomnosti aktivní ureasy se žlutooranžové médium barví třeshově červeně nebo fuchsinově (zelenožlutě) růžově.

Využívání citrátu (Christensen) (Skerman, 1947)

základ citrátového agaru (Merck 2503) 23 g
destilovaná voda 1 litr

Rozpusť se mícháním za současného zahřívání. Rozdělí se po 6 ml jako u močovinnového média. Sterilizuje se v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a nechá ustát v šikmé poloze.
Pozitivní reakce: Využívání citrátu se projeví změnou barvy média z oranžové na červenou.

– Tvorba sirovodíku (Ramamurthi, 1959)

Médium:

baktotrypton (Difco č. 0123) 10 g
K₂HPO₄ 1 g
NaCl 5 g
destilovaná voda 1 litr

Rozpusť se a rozdělí po 6 ml do zkumavek 16 x 100 mm. Sterilizuje se v autoklávu při teplotě 115 °C po dobu 10 minut.
Inokuluje se a na okraj zkumavky se asepticky zavěsí papírek s octanem olovnatým (Merck 9511). Papírek se upevní víčkem. Inkubuje se po dobu nejvýše 20 dní.
Pozitivní reakce: Tvorba sirovodíku (H₂S) z tryptonu se projeví vývojem černohnědého zbarvení testovacího papírku.

– Tvorba indolu (Ramamurthi, 1959)

Médium:

Jako u testu na H₂S.

Odstraní se papírek s octanem olovnatým a přidá 1 až 2 ml diethyleteru a jemně se protřepete. Nechá se chvíli stát (pět minut) k oddělení vrstev. Po stěně nakloněné zkumavky se přidá opatrně 0,5 ml činidla podle Kovacse (Merck 9293).

Pozitivní reakce: Přítomnost indolu se projeví vývojem červeného zbarvení ve žluté vrstvě mezi etherovou a vodní frakcí.

– Růst při 37 °C (Ramamurthi, 1959)

Médium:

baktobujon (Difco č. 0003) 8 g
destilovaná voda 1 litr

Rozmíchá se, rozpusť a rozdělí po 6 ml do zkumavek.
Sterilizuje se v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.
Inokuluje se a inkubuje se při teplotě 37 °C.
Pozitivní reakce: projevy růstu.

– **Růst v 7% chloridu sodném (Ramamurthi, 1959)**

Médium:

baktobujon (Difco č. 0003)	8 g
NaCl	70 g
destilovaná voda	1 litr

Rozmíchá se, rozpustí a rozdělí po 6 ml do zkumavek.

Sterilizuje se v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Pozitivní reakce: projevy růstu.

– **Hydrolýza želatiny (Lelliott, Biling & Hayward, 1966)**

Médium:

baktoželatina (Difco č. 0143)	120 g
destilovaná voda	1 litr

Rozmíchá se, rozpustí a rozdělí po 6 ml do zkumavek.

Sterilizuje se v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

Pozitivní reakce: Želatina se stává tekutou, i když je uchovávána při teplotě 5 °C po dobu 30 minut.

– **Hydrolýza škrobu**

Médium:

baktoagar (Difco) (roztavený)	1 litr
rozpuštěný bakt. škrob (Difco č. 0178)	2 g

Rozmíchá se a sterilizuje v autoklávu při teplotě 115 °C po dobu 10 minut.

Rozlije na plotny. Inokulují se plotny bodově.

Po dosažení dobrého růstu (10 až 20 dní) se odebere část narostlé kultury a přelije Lugolovým jodovým roztokem.

Pozitivní reakce: Hydrolýza škrobu se projeví čirými zónami pod vyrostlými koloniemi bakterií nebo kolem nich, zbývající médium se barví purpurově.

– **Aktivita hydrolasy eskulinu (Sneath & Collins, 1974)**

Médium:

baktopepton (Difco)	10 g
eskulin	1 g
citronan železitý (Merck 3862)	0,05 g
citronan sodný	1 g
destilovaná voda	1 litr

Zamíchá se až do rozpuštění a rozdělí po 6 ml do zkumavek. Sterilizuje se v autoklávu při teplotě 115 °C po dobu 10 minut.

Médium je čiré, ale fluoreskuje do modra.

Pozitivní reakce: Hydrolýza eskulinu se projeví vznikem hnědé barvy společně s mizením fluorescence. Toto lze prověřit pomocí ultrafialové (UV) lampy.

Literatura

Bradbury, J. F., 1970. Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Rev. Pl. Path., 49, 213 – 218.

Dinesen, I. G., 1984. The extraction and diagnosis of *Conyobacterium sepedonicum* from diseased potato tubers. EPPO Bull. 14 (2), 147 – 152.

Doetsch, R. N., 1981. Determinative methods of light microscopy. V: Manual of methods for general bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, 21 – 23.

Hugh, R a Leifson, F., 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact., 66, 24 – 26.

Janse, J. D. a J Van Vaerenbergh. The interpretation of the EC method for the detection of latent ring rot infections (*Conyobacterium sepedonicum*) in potato. EPPO Bull., č. 17, 1987, pp. 1 – 10.

Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, Lond., 178, 703.

Lelliott, R. A., 1966. The plant pathogenic coryneform bacteria. J. appl. Bact., 29, 114 – 118.

Lelliott, R. A., E. Billing a A. C. Hayward, 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads J. appl. Bact., 29, 470 – 489.

Lelliott, R. A. a P. W., Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Conyobacterium sepedonicum* (Spiek. et Kotth.) Skapt. Et. Burkh.) in potato stocks. EPPO Bull., 6 odst. 2, 101 – 106.

Ramamurthi, C. S., 1959. Comparative studies on some Gram-positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem. Cornell agric. Exp. Sta., 366, 52 pp.

Skerman, V. B. D., 1967. A guide to the identification of the genera of bacteria. 2. Edd.,

William and Wilkins Company, Baltimore.

Sneath, P. H. A. a V. G. Collins, 1974. A study in test reproductibility between laboratories: report of *Pseudomonas* working party. Antonie van Leeuwenhoek, 40, 481 – 527.

B. Metoda diagnózy, detekce a identifikace původce hnědé hniloby

V příloze jsou popsány různé postupy pro diagnózu, detekci a identifikaci hnědé hniloby.

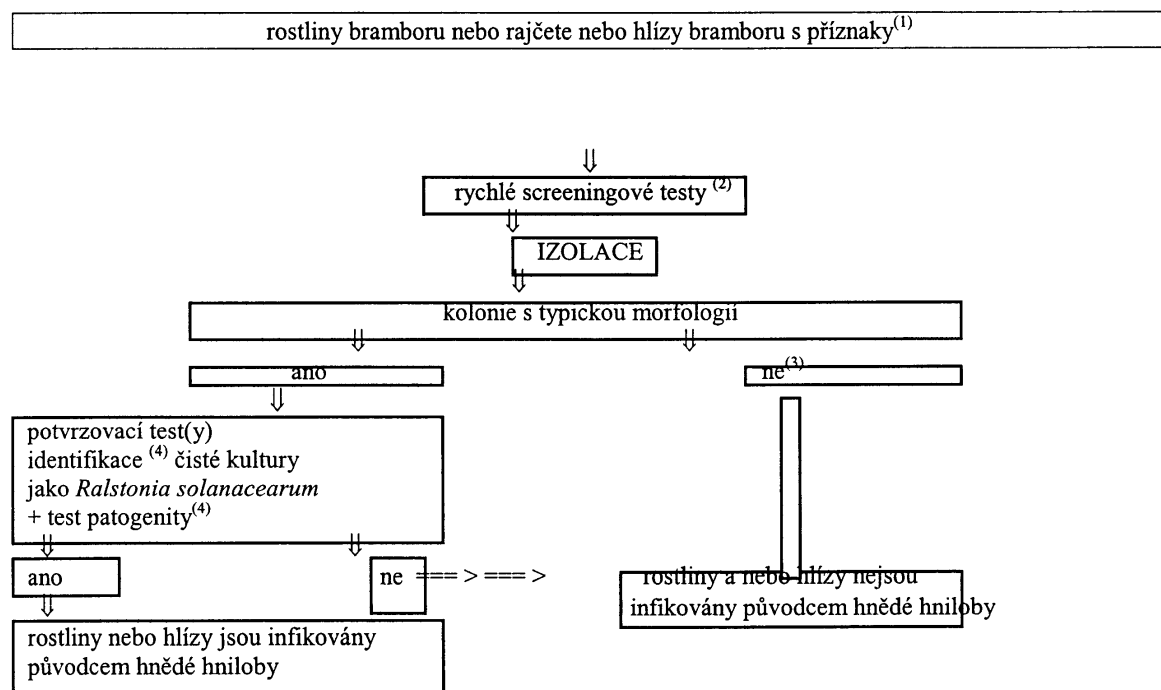
V dodatcích je podrobně vysvětlena příprava materiálů k testům, tzn. živných médií, pufrů, roztoků a reagensů.

ODDÍL I: Použití schématu testování

1. Diagnóza hnědé hniloby

Testovací postup je určen pro hlízy bramboru, které vykazují typické příznaky hnědé hniloby bramboru nebo příznaky vyvolávající podezření z jejího výskytu, a pro rostliny bramboru a rajčete, které vykazují typické příznaky bakteriálního vadnutí nebo příznaky vyvolávající podezření z jeho výskytu. Zahrnuje rychlý screeningový test, izolaci původce nemoci z infikovaného vodivého pletiva na diagnostických médiích a - při pozitivním nálezu - identifikaci kultury

Postupový diagram



Poznámky k postupovému diagramu:

(1) Popis příznaků je v Oddíle II.1.

(2) Rychlé screeningové testy ulehčující předběžnou diagnózu.

Vhodnými testy jsou:

- test na výtok slizu ze svazků cévních (oddíl II.2.),
- test na přítomnost granulí poly- β -hydroxybutyrátu (oddíl II.2.),
- IF-test (oddíl III.2),
- ELISA-test (oddíl III.3),
- PCR-test (oddíl III.4).

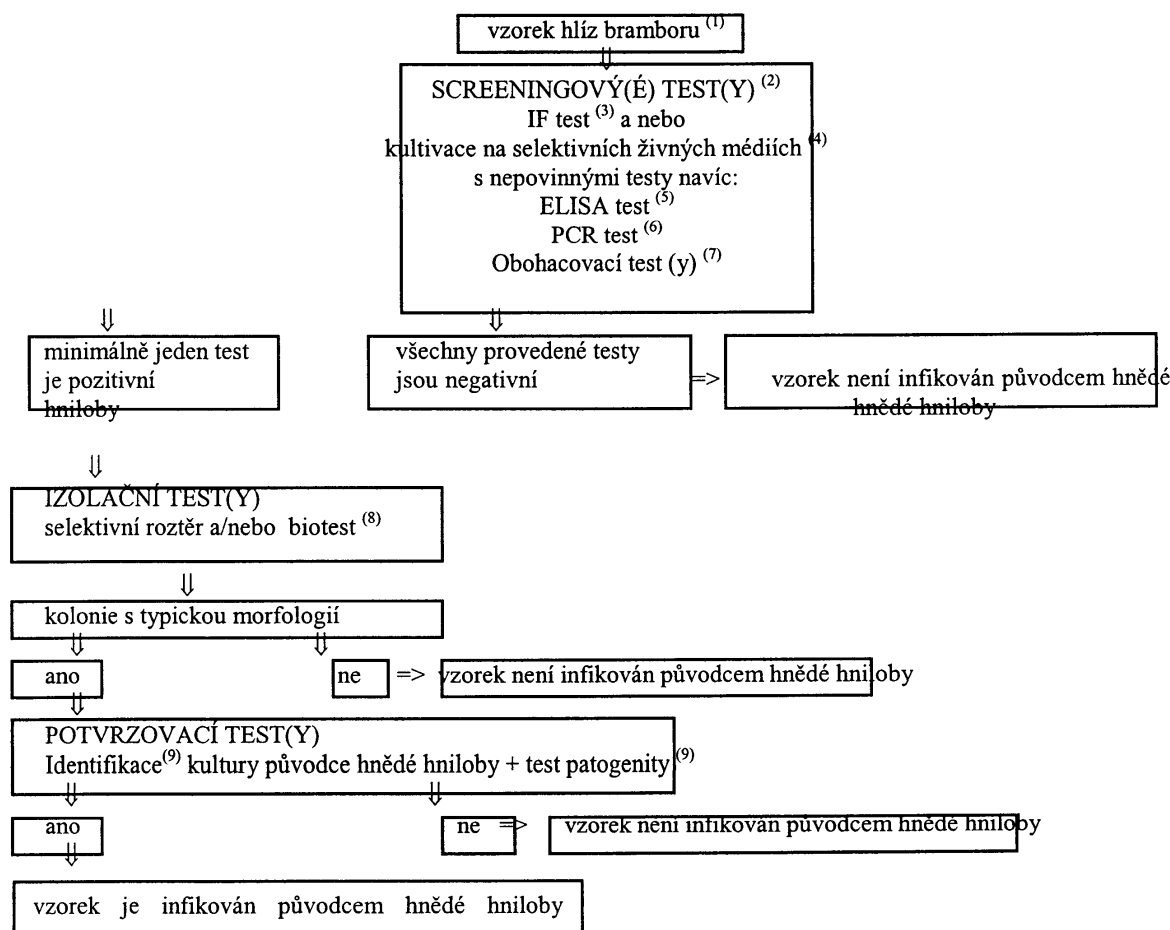
(3) Ačkoli je izolace původce hnědé hniloby z rostlinného materiálu s typickými symptomy metodou zředovacích roztěrů relativně jednoduchá, může v pokročilých stádiích infekce zakládání kultur ztroskotat. Saprofytické bakterie, které rostou na nemocném pletivu, mohou původce nemoci na izolačním médiu přerůst nebo inhibovat. Je-li izolační test negativní, ale příznaky onemocnění jsou typické, pak je nutno izolaci opakovat, a to přednostně kultivací na selektivních živných půdách.

(4) Čistá kultura původce hnědé hniloby je spolehlivě identifikována minimálně jedním z testů uvedených v oddíle II.4.1 v kombinaci s testem patogenity (oddíl II.4.3). Stanovení kmenů patogena není povinné, avšak doporučuje se je provést pro každý nový případ.

2. Detekce a identifikace hnědé hniloby ve vzorcích hlíz bramboru

Postup je určen k detekci latentní infekce v hlízách bramboru pomocí jednoho nebo raději více screeningových testů, které jsou při pozitivním nálezů doplněny izolací původce hnědé hniloby a v případě izolace typických kolonií jeho identifikací v čisté kultuře.

Postupový diagram



*Poznámky k postupovému diagramu:***(1) Velikost vzorku**

Standardní velikost vzorku je 200 hlíz, metoda je však vhodná i pro vzorky s méně než 200 hlízami.

(2) Screeningový(é) test(y)

Pouze jeden test nemusí být dostatečně citlivý nebo spolehlivý k detekci původce hnědé hniloby ve vzorku. Proto se doporučuje provádět více testů, které se zakládají pokud možno na různých biologických principech.

(3) Imunofluorescenční test (IF test)

IFtest je osvědčeným screeningovým testem. To je výhoda proti jiným typům testů, které ještě nejsou zcela vyvinuty nebo ověřeny. Test se používá u mnoha jiných karanténních bakterií, např. u původce kroužkovitosti. Podle parametrů uváděných pro tuto metodu se jedná o citlivý test (hranice detekovatelnosti 10^3 - 10^4 buněk v jednom mililitru pelety z bramborového extraktu).

Pro spolehlivost výsledku testu je rozhodující kvalita antiséra. Přijatelné je pouze antisérum s vysokým titrem (minimálně 2 000 pro surové antisérum) a všechny testy musí být prováděny při titru antiséra nebo při jednom zředění pod úroveň titru. Upřednostňuje se nepřímá metoda. Přímou metodu lze použít, pokud je citlivost a specifická testu stejná jako u nepřímé metody.

IF test má výhodu subjektivního vyhodnocení buněčné morfologie a intenzity fluorescence, které vypovídají o specifickosti reakce. Časté jsou křížové reakce se sérologicky příbuznými baktériemi stejné buněčné morfologie jako má původce hnědé hniloby, které se vyskytují na povrchu hlízy nebo pocházejí z okolní půdy. IFtest lze provádět jako jediný kontrolní test, avšak existuje-li podezření na výskyt křížových reakcí, měl by být proveden další test spočívající na jiném biologickém principu. V takovém případě je nejvhodnější kultivace na selektivních živných médiích.

(4) Kultivace na selektivních živných médiích

S modifikovaným médiem SMSA a metodologií testování používanou při této metodě se jedná o citlivý a selektivní test na hnědou hnilobu. Výsledek je k dispozici za 3 - 6 dnů po přípravě vzorku. Původce choroby se získá přímo v kultuře a lze ho snadno identifikovat. Má-li být potenciál testu plně využit, musí být /pupkové části hlíz pečlivě připraveny, aby byly vyloučeny sekundární bakterie z hlíz, které si na živném médiu s hnědou hnilobou konkurují a mohou tak vývoj patogena ovlivňovat. Některé kmeny mohou špatně růst, protože složky živného média mohou ovlivnit cílový organismus. Je třeba též pečlivě postupovat při odlišení hnědé hniloby od jiných bakterií, které se na médiu mohou vyvíjet. Selektivní plotnový roztěr lze použít jako jediný screeningový test, avšak při negativním výsledku, u nějž je podezření, že k němu došlo inhibicí hnědé hniloby jinými

bakteriemi v médiu, je třeba vzorek znovu testovat při použití odlišného testu, aby se diagnóza potvrdila nebo vyvrátila. Nejvhodnější je v takových případech IF-test.

(5) ELISAtest

ELISA test je v zásadě méně citlivý než IF-test (hranice detekovatelnosti 10^4 - 10^5 bakterií na jeden mililitr pelety z bramborového extraktu). Je levný a rychlý, avšak všeobecně častěji vykazuje falešné pozitivní výsledky (křížové reakce) a falešné negativní výsledky (inhibice fenolovými molekulami v bramborovém extraktu). Požadavky na specifčnost antiséra jsou neobyčejně vysoké. ELISAtest nelze provádět samostatně jako jediný screeningový test.

(6) PCRtest

PCRtest je potenciálně velice citlivý detekční test, i když může být snadno ovlivněn některými složkami extraktu z rostlin nebo z hlíz, které vedou k falešným negativním výsledkům testu. Některé odrůdy brambor obsahují více inhibitorů než jiné. Proto musí být tyto inhibitory nejprve odstraněny. Jednou z možností je zředění, avšak přitom dojde i ke zředění populací původce hnědé hniloby. Ve všech fázích přípravy vzorku a testu musí být postupováno neobyčejně obezřetně, aby se zabránilo kontaminacím, které vedou k získání falešně pozitivních výsledků. Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytnout i díky homologním sekvencím u jiných organismů. Proto nelze ani PCR test používat jako jediný screeningový test.

(7) Obohacovací testy

Inkubace vzorků pelety z bramborového extraktu v semiselektivním bujónu, jako je např. modifikovaný SMSA-bujón, umožňuje rozmnožení původce hnědé hniloby. Ještě důležitější je možná skutečnost, že tímto způsobem dojde i ke zředění potenciálních inhibitorů ELISA testu a PCR testu. Původce hnědé hniloby lze tak detekovat v obohaceném bujónu pomocí IF, ELISA a PCR testů. Přímé kultivace z obohaceného bujónu se nedoporučují. Tyto obohacovací metody však nebyly dostatečně důkladně vyzkoušeny a otestovány. Jsou sem zahrnuty pouze díky jejich vysokému potenciálu. Protože je však doposud k dispozici málo zkušeností s těmito postupy, nelze je použít jako jediné detekční metody.

(8) Biotest

Tento test se používá pro izolaci původce hnědé hniloby z pelet bramborového extraktu selektivním obohacením na hostitelské rostlině a lze jej provést na rostlinách rajčete nebo lilku vejcoplodého. Vyžaduje optimální inkubační podmínky podle údajů této metody. Bakterie, které na médiu SMSA inhibují původce hnědé hniloby, s nejvyšší pravděpodobností výsledky tohoto testu neovlivní.

(9) Ověřovací test(y)

Čistou kulturu původce hnědé hniloby lze spolehlivě identifikovat minimálně jedním z testů uvedených v oddílu II.4.1 v kombinaci s testem patogenity (oddíl II.4.3). Charakteristika kmene není povinná, doporučuje se však u každého nového případu.

ODDÍL II: Diagnóza původce hnědé hniloby

1. Příznaky

1.1. Příznaky napadení bramboru hnědou hnilobou

1.1.1. Příznaky na listech a stoncích

Prvním příznakem onemocnění u brambor je mírné vadnutí horních listů během nejteplejších denních hodin. Zprvu je vadnutí vratné (v noci většinou pomine). Na příčném řezu stonku nízko nad zemí (cca 2,5 cm) jsou cévní svazky hnědě zbarvené. Velmi často se na řezu vylučuje šedobílý, slizovitý až vláknitý exsudát, aniž by bylo nutné stonek stisknout. Při ponoření rozříznutého stonku do vody ve svislé poloze samovolně vytékají z cévních svazků slizová vlákna.

1.1.2. Příznaky na hlízách

Na příčném řezu pupkovou částí hlízy se v rané fázi infekce projevuje sklovitě žlutou až světle hnědou barvou prstence cévních svazků, ze kterého po několika minutách buď samovolně nebo po lehkém stisknutí hlízy v blízkosti řezné plochy vytéká bledý, krémově zbarvený slizovitý exsudát. Později je zbarvení cévních svazků výrazně hnědé a nekróza se může rozšířit do parenchymatického pletiva. V pokročilém stádiu se infekce šíří od pupkové části hlíz a z oček, což vede ke vzniku červenavě hnědých lehce vmáčknutých lézí na slupce. Z nich může vytékat bakteriální sliz, na nějž se nalepují půdní částice.

1.2. Příznaky napadení rajčete hnědou hnilobou

Prvním příznakem na rostlině je povadlý vzhled nejmladších listů. Za podmínek příznivých pro patogena (teplota půdy asi 25 °C při nasycené vzdušné vlhkosti) je jedna strana rostliny nebo celá rostlina během několika dnů postižena epinastií a vadnutím, což vede k úplnému odumření rostliny. Za méně příznivých podmínek (teplota půdy pod 21 °C) se na stonku může tvořit velké množství postranních výhonů. Na stonku je možno pozorovat slizovitý pás, což je viditelným znakem nekrózy vodivých pletiv. Na příčném řezu stonku je hnědě zbarvené vodivé pletivo, z něhož vytékají kapky bílého nebo žlutavého bakteriálního slizu.

2. Rychlé screeningové testy

Rychlé screeningové testy umožňují předběžně stanovit diagnózu. Je třeba provést jeden nebo více z následujících testů:

Vytékání bakteriálního slizu z cévních svazků

V případě podezření na hnědou hnilobu lze předběžně stanovit diagnózu i v terénu zjištěním přítomnosti patogena v cévních svazcích stonku rostliny bramboru nebo

rajčete: Odřízneme stonek nízko nad zemí a řeznou plochu vložíme do sklenice s vodou. Krátce poté začnou z cévních svazků samovolně vytékat vlákna bakteriálního slizu. Tento příznak nezpůsobuje žádná jiná bakterie napadající brambor a rajče.

Detekce granulí poly- β -hydroxybutyrátu (PHB)

Granule PHB v buňkách původce hnědé hniloby jsou nejprve zviditelněny obarvením nilskou modří A nebo sudánskou černí B.

Poté připravíme buď roztěr slizovitého exkretu nebo suspendovaného pletiva na podložním sklíčku nebo roztěr ze 48hodinové kultury na živné půdě YPGA nebo SPA (Dodatek 1). Připravíme pozitivní kontrolní roztěry kmene biovaru 2/rasa 3 a v případě potřeby i negativní kontrolní roztěr heterologního kmene. Necháme vyschnout. Spodní stranu podložního sklíčka několikrát rychle protáhneme přes plamen, dokud není roztěr fixován.

Test nilskou modří

1. Fixovaný roztěr přelijeme 1 % vodním roztokem nilské modří. Inkubujeme 10 minut při teplotě 55°C.
2. Barvicí roztok se nechá odtéct. Krátce opláchneme pod tekoucí vodovodní vodou. Zbylou vodu vysajeme savým papírem.
3. Roztěr přelijeme 8% vodním roztokem kyseliny octové. Inkubujeme 1 minutu při pokojové teplotě.
4. Opláchneme pod slabě tekoucí vodou z vodovodu. Osušíme savým papírem.
5. Znovu navlhčíme kapkou vody. Přikryjeme krycím sklíčkem.
6. Pozorujeme obarvený roztěr jako preparát v epifluorescenčním mikroskopu při vlnové délce 450 nm pod olejovou imersí při zvětšení 1:1 000.

Pozorně sledujeme přítomnost sytě oranžově zbarvených zrn PHB. Pozorování provádíme i při normálním světle, abychom se ujistili, že granule jsou vnitrobuněčné a morfologie buňky je typická pro původce hnědé hniloby.

Test sudánskou černí

1. Fixovaný roztěr přelijeme 0,3% roztokem sudánské černě B v 70% etanolu. Inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě.
2. Necháme roztok barviva odtéci. Krátce oplachujeme vodou z vodovodu. Přebytečnou vodu vysušíme savým papírem.
3. Roztěr nakrátko ponoříme do xylolu. Po vytažení opět osušíme savým papírem.
Pozor! Xylol je zdraví škodlivá látka. Nutno pracovat v digestoři!

4. Roztěr přelijeme 0,5% (hmotnost/objem) vodním roztokem safraninu a necháme jej 10 sekund stát při pokojové teplotě. *Pozor!* Safranin je zdraví škodlivá látka. Nutno pracovat v digestoři!
5. Opláchneme pod slabě tekoucí vodou z vodovodu. Osušíme savým papírem. Přiložíme krycí sklíčko.
6. Obarvený roztěr pozorujeme jako preparát v mikroskopu s procházejícím světlem pod olejovou imersí a při zvětšení 1:1 000. Granule PHB v buňkách původce hnědé hniloby jsou modro-černě zbarvené. Buněčné stěny mají barvu růžovou.

Jiné testy

Z dalších testů je vhodný IFtest (oddíl III.2), ELISA-test (oddíl III.3) a PCRtest (oddíl III.4).

3. Postup při izolaci

- 3.1. Odebereme slizovitý exkret nebo části pletiva se změněnou barvou z prstence cévních svazků bramborové hlízy nebo z vodivých pletiv ve stonku rostliny bramboru nebo rajčete.

Suspendujeme v malém objemu sterilní destilované vody nebo v 50 mM fosfátovém pufru a necháme 5 až 10 minut stát.

- 3.2. Připravíme minimálně dvě desetinná ředění suspenze (1/10 a 1/100), v případě potřeby i více těchto ředění.
- 3.3. Převeďme standardní objem suspenze a jednotlivých ředění na universální živné médium NA, YPGA a SPA (Dodatek 1) a/nebo na Kelmanovo tetrazoliové médium (Dodatek 1) a nebo na selektivní SMSAmédium (Dodatek 7). Potom je vhodnou metodou rozetřeme na plotny. Může být užitečné připravit samostatné plotny každého media se zředěnou kulturou buněčné suspenze virulentního kmene biovar 2/rasa 3 původce hnědé hniloby jako pozitivní kontrolu.
- 3.4. Plotny necháme při teplotě 28 °C po dobu 3 dnů inkubovat. Při pomalém růstu lze inkubovat až 6 dnů, přičemž se však kolonie bakterií na médiu SMSA často stávají atypickými a odumírají.

Na universálních živných substrátech vytvářejí virulentní izoláty původce hnědé hniloby perlově bílé, ploché, nepravidelné a fluidní kolonie, často s charakteristickými spirálkami.

Na Kelmanově tetrazoliovém médiu vytvářejí virulentní izoláty původce hnědé hniloby typické, krémově zbarvené, ploché, nepravidelné fluidní kolonie s krvavě červeně zabarvenými spirálkami uprostřed. Nevirulentní formy původce hnědé hniloby naproti tomu vytvářejí máslovité, tmavočervené kolonie.

Na SMSA-médiu vytvářejí virulentní izoláty původce hnědé hniloby mléčné bílé, ploché, nepravidelné a fluidní kolonie s krvavě červeně zabarveným středem.

Nevirulentní formy původce hnědé hniloby vytvářejí na SMSA médiu kolonie méně fluidní, které jsou celé růžové až červené.

- 3.5. Kolonie s charakteristickou morfologií převedeme do čisté kultury subkultivací na některém universálním médiu. Je třeba se vyhnout pravidelnému přeočkovávání, které může vést ke ztrátě virulence.

4. **Potvrzovací test(y)**

4.1. Identifikace původce hnědé hniloby

Čisté kultury původce hnědé hniloby identifikujeme minimálně jedním z následujících postupů:

Výživové a enzymatické testy

Upozornění: Do každého testu je nutno zahrnout vhodné kontrolní kmeny.

Následující fenotypové vlastnosti původce hnědé hniloby jsou buď vždy přítomny nebo chybí:

fluorescenční pigment	-
Inkluze PHB	+
oxidačně fermentační test	O+/F-
kataláza	+
oxidáza podle Kovacse	+
redukce dusičnanů	+
využití citrátů	+
růst při 40°C	-
růst v 1% NaCl	+
růst v 2% NaCl	-
arginin-dihydroláza	-
ztekucení želatiny	-
hydrolýza škrobu	-
hydrolýza eskulinu	-
produkce levanu	-

Média a metody viz Lelliot & Stead (1987).

IF test

Připravíme suspenzi o hustotě 10^6 buněk na jeden ml z testované kultury a kontrolního kmene (kontrolních kmenů). Připravíme řadu dvojnásobných zředění antiséra. Použijeme IF metodu (oddíl III.2). IF titr kultury musí odpovídat IF titru pozitivní kontroly.

ELISA test

Připravíme suspenzi o hustotě 10^6 buněk na jeden ml z testovací kultury a kontrolního kmene (kontrolních kmenů). Použijeme metodu ELISA (oddíl III.3). Extinkční hodnota kultury musí odpovídat extinkční hodnotě pozitivní kontroly

PCR test

Připravíme suspenzi o hustotě 10^6 buněk na jeden ml z kultury a kontrolního kmene (kontrolních kmenů). Použijeme metodu PCR (oddíl III.4). PCR produkt kultury musí mít stejnou velikost a stejný vzor restrikční analýzy enzymů (REA vzor) jako má produkt pozitivní kontroly.

Fluorescenční hybridizace in situ (FISH)

Připravíme suspenzi o hustotě 10^6 buněk na jeden ml z kultury a kontrolního kmene (kontrolních kmenů). Použijeme metodu FISH (van Beuningen et al., 1995) s PCR primerem OLI-1 (Seal et al., 1993). Kultura musí vykazovat stejnou reakci jako pozitivní kontrola.

Analýza proteinů

Denaturované proteiny celých buněk jsou rozděleny polyakrylamidovou-G-elektroforézou (PAGE) (Stead, 1992a).

Analýza mastných kyselin

Kulturu a pozitivní kontrolu necháme růst 48 hodin při teplotě 28 °C na tryptikázosójovém agaru a použijeme metodu FAP (Jasen 1991; Stead 1992a, Stead 1992b). Profil kultury musí být shodný s profilem pozitivní kontroly. Charakteristické mastné kyseliny za daných podmínek jsou 14:0 3OH, 16:0 2OH, 16:1 2 OH a 18:1 2OH.

3.2. Charakteristika kmenů

Charakteristika kmene není povinná, avšak doporučuje se ji provádět pro každý nový případ při použití nejméně jednoho z následujících testů:

Určení biovaru

Ralstonia solanacearum je členěna na biovary podle schopnosti vytvářet kyseliny ze tří alkoholů a tří cukrů (Hayward 1964, 1994);

	biovar				
	1	2	3	4	5
Využití :					
- maltózy	-	+	+	-	+
- laktózy	-	+	+	-	+
- celobiózy	-	+	+	-	+
- mannitu	-	-	+	+	+
- sorbitu	-	-	+	+	-
- dulcitu	-	-	+	+	-

Dalšími testy lze biovar 2 členit na subfenotypy (Hayward 1994):

	biovar 2	biovar 2-A	biovar 2-T
Využití :	-	+	+
- trehalózy			
- inositolu	+	-	+
- D-ribózy	-	-	+
pektinolytická aktivita	nízká	nízká	vysoká

Determinace ras

Určení rasy (Buddenhagen et al., 1962) se provádí na základě testů patogenity na rostlinách rajčete nebo lilku vejcoplodého a na rostlinách tabáku a také testem na hypersenzitivní reakci (HR) na listech tabáku (Lozano et Sequeira, 1970):

reakce u:	rasa (*)		
	1	2	3
- rostlin rajčete nebo lilku vejcoplodého	vadnutí	žádná reakce	vadnutí
- rostlin tabáku	vadnutí	žádná reakce	žádná reakce
- listů tabáku	nekróza (48 hod) a vadnutí (7-8 dnů)	HR (12 - 24 hod)	chloróza (2-8 dnů)

(*) Rasa 4 (patogenní na zázvorovníku a některých dalších hostitelích) a rasa 5 (patogenní pouze na moruši) není v tabulce zahrnuta.

Určení rasy testem patogenity nebo testem hypersenzitivní reakce tabáku nemusí být příliš spolehlivé a místo toho lze na příslušnost k rase usuzovat podle biovaru a původního hostitele.

Kulturu lze dále charakterizovat pomocí:
genomového fingerprintu:

Molekulární odlišení kmenů komplexu *Ralstonia solanacearum* lze provádět: analýzou RFLP (Cook et al., 1989)
repetitivní sekvencí PCR (REP-, ERIC & BOX-PCR (Louws et al., 1995; Smith et al., 1995).

3.3. Test patogenity

Tento test slouží k potvrzení diagnózy původce hnědé hniloby a k potvrzení virulence kultur identifikovaných jako původce hnědé hniloby.

Z kultury a pozitivního kontrolního kmene připravíme inokulum o hustotě 10^6 buněk na jeden mililitr. Poté inokulujeme 5 - 10 rostlin rajčete nebo lilku vejcoplodého nejlépe ve stadiu třetího listu nebo stadiu starším (oddíl III.6). Inkubujeme až dva týdny při teplotách 22 - 28 °C a vysoké relativní vzdušné vlhkosti a denně zavlažujeme. Dáváme pozor na výskyt vadnutí a nebo epinastie, chlorózy, krnění.

Z rostlin vykazujících charakteristické příznaky provedeme izolaci takto:

- Odebereme část pletiva ze stonku 2 cm nad místem inokulace.
- Rozmělníme a suspendujeme v malém množství sterilní destilované vody nebo ve fosfátovém pufru 50mM, pak rozetřeme na plotny, inkubujeme a poté vyhodnotíme na výskyt typických kolonií hnědé hniloby.

ODDÍL III: Detekce a identifikace původce hnědé hniloby ve vzorcích hlíz bramboru

Upozornění: Standardní velikost vzorku je 200 hlíz. Postup je však vhodný i pro vzorky s méně než 200 hlízami.

1. Příprava vzorku pro testování

Upozornění: Peletu bramborového extraktu získanou tímto postupem lze použít i pro detekci původce kroužkovitosti.

Pokud to bude považováno za účelné, je možné před testováním:

- nechat vzorek inkubovat po dobu až 2 týdnů při teplotě 25 - 30°C, aby se podpořilo rozmnožení slabých populací původce hnědé hniloby;
- oprat hlízy pod tekoucí vodou s vhodným dezinfekčním a čistícím prostředkem. Hlízy pak nechat na vzduchu oschnout.

- 1.1. Čistým a dezinfikovaným řezným nástrojem odstraníme slupku hlízy na její pupkové části, tak aby bylo vidět vodivá pletiva. Z vodivých pletiv na pupkovém části každé hlízy opatrně vyřízneme malý kónický výkrojek (3 - 5 mm v průměru). Přitom je třeba dbát na to, aby současně bylo vyříznuto co nejméně nevodivých pletiv. Toto provedeme na každé hlíze ve vzorku.

Upozornění: V této fázi můžeme hlízy důkladně vizuálně prohlédnout. Hlízy vykazující příznaky nebo silnou hnilobu je třeba vyřadit a zkoumat odděleně (oddíl II).

- 1.2 Pupkové části hlíz dáme do uzavřené nádoby a neprodleně zpracujeme. Pokud to není možné, neměly by být skladovány déle než 24 hodin nebo při teplotě 4 °C déle než 72 hodin.
- 1.3 Pupkové části hlíz zpracujeme jedním z následujících postupů:
 - 1.3.1. Pupkové části hlíz vložíme do vhodné nádoby.
Přidáme dostatečný objem maceračního pufru (Dodatek 2), aby došlo k přikrytí pupkových částí hlíz.
Kousky rozmělníme až do úplné homogenizace v mixeru Waring Blender nebo Ultra-Turrax. Je však třeba zamezit příliš silné homogenizaci.
Macerát necháme 15 - 30 minut máčet.
 - 1.3.2. Pupkové části hlíz vložíme do vhodné nádoby.
Přidáme dostatečný objem maceračního pufru, aby došlo k překrytí pupkových částí hlíz.
Nádobu dáme do rotační třepačky.
Udržíme při 50 - 100 otáčkách za minutu po dobu 4 hodin při teplotě 20 - 22 °C nebo po dobu 16 - 24 hodin při teplotě 4 °C.
 - 1.3.3. Pupkové části hlíz vložíme do pevného jednorázového maceračního sáčku (např. sáček Stomacher, rozměry 105 x 150 mm, sterilizován ozářením).
Pupkové části hlíz rozmělníme vhodným nástrojem, např. kladivem, až k úplné homogenizaci.
Přidáme dostatečné množství maceračního pufru, aby došlo k překrytí rozmělněných pupkových částí hlíz.
Macerát necháme 15-30 minut odstát.
- 1.4. Z takto zpracovaných pupkových částí hlíz se bakterie extrahují některým z následujících postupů:
 - 1.4.1. Macerát opatrně nalijeme do centrifugační zkumavky, tuhý zbytek přitom ponecháme v nádobě nebo sáčku. Je-li slitý macerát kalný, odstředíme při teplotě pod 10 °C po dobu 10 minut při odstředivé síle ne větší než 180 g.

Slitý macerát či supernatant z prvního odstředování odstředíme po dobu 15 minut při 7 000 g nebo 10 minut při 10 000 g při teplotě pod 10 °C.

Supernatant vylijeme tak, abychom neporušili vzniklou peletu.
 - 1.4.2. Macerát přefiltrujeme přes filtrační systém s velikostí pórů 40 - 100 µm. Filtraci posílíme vakuovým čerpadlem.
Filtrát shromáždíme v centrifugační zkumavce.
Filtr promyjeme maceračním pufrem.
Filtrát odstředíme po dobu 15 minut při 7 000 g nebo 10 minut při 10 000 g a při teplotě pod 10°C.
Supernatant vylijeme tak, abychom neporušili vzniklou peletu.
- 1.5. Peletu resuspendujeme v 1 ml peletového pufru (Dodatek 2).
Rozdělíme na dva stejné díly a každý z nich nalijeme do jedné mikrozkušavky.

Pro test používáme jen jednu mikrozkušavku. Zbytek tohoto extraktu skladujeme po dobu testu při teplotě 4 °C.

Do druhé mikrozkušavky přilijeme 10-25 objemových procent sterilního glycerinu.

Protřepeme. Skladujeme při teplotě - 18 °C (týdny) nebo při teplotě - 70 °C (měsíce).

2. IF test

Použijeme antisérum pro původce hnědé hniloby, nejlépe pro rasu 3/biovar 2. Určíme titr u suspenze o hustotě 10^6 buněk na mililitr homologního kmene hnědé hniloby s vhodným zředěním konjugátu fluorescenčního isothiokyanátu (FITC) podle doporučení výrobce. Surové antisérum by mělo mít IF titr minimálně 1 : 2 000.

Použijeme víceokénkové podložní sklíčko nejlépe s 10 okénky o průměru nejméně 6 mm.

Na každé podložní sklíčko nanese kontrolu konjugátu FITC. Test by měl být opakován s kontrolou PBS, pokud kontrola FITC vykáže nějakou pozitivní buňku.

Odděleně připravíme pozitivní kontrolní podložní sklíčka se suspenzí o hustotě 10^6 buněk na mililitr některého kmene příslušné rasy a biovaru hnědé hniloby. V každé sérii testování použijeme jedno podložní sklíčko.

2.1. Podložní sklíčka připravíme jedním z následujících postupů:

2.1.1. Pro pelety s relativně malým obsahem škrobu:

Odměřený standardní objem (15 μ l postačuje pro okénko o průměru 6 mm - u větších okének je nutno použít odpovídající větší objem resuspendované pelety) nanese pipetou na řadu okének. Další řada může být použita jako duplikát nebo pro druhý vzorek, jak je znázorněno na obr. 1.

2.1.2. Pro jiné pelety:

Připravíme desetinná ředění, tzn. 1/10, 1/100 a 1/1 000 resuspendované pelety v peletovém pufru. Odměřený standardní objem (15 μ l postačuje pro okénko o průměru 6 mm - u větších okének je nutno použít odpovídající větší objem) resuspendované pelety a každého ředění nanese pipetou na řadu okének. Zbývající řada může být použita jako duplikát nebo pro druhý vzorek, jak je znázorněno na obr. 2.

2.2. Kapky necháme vyschnout. Bakteriální buňky fixujeme na podložním sklíčku buď zahřátím, ožehnutím nebo 95% etanolem.

2.3. Postup při IF testu

2.3.1. Při přípravě podložního sklíčka podle 2.1.1.:

Připravíme sadu dvojnásobných zředění antiséra v IFpufru (Dodatek 3): 1/4 titru (T/4), 1/2 titru (T/2), titr (T) a dvojnásobek titru (2T)

2.3.2. Při přípravě podložního sklíčka podle 2.1.2.:

Připravíme pracovní ředění antiséra v IFpufru. Pracovní ředění je ředění antiséra s optimální specifičností a obvykle má polovinu hodnoty titru.

Obrázek 1

Příprava podložního sklíčka postupem podle 2.1.1. a 2.3.1.

Standardní ředění resuspendované pelety

$T = \text{titr}$

	FITC	T/4	T/2	T	2T (dvojnásobná zředění antiséra)
vzorek 1	●1	●2	●3	●4	●5
duplikát vzorku 1 nebo vzorek 2	●6	●7	●8	●9	●10

Obrázek 2

Příprava podložního sklíčka postupem podle 2.1.2. a 2.3.2.

	FITC	Pracovní zředění antiséra			
	neředěno	neředěno	1/10	1/100	1/1000
			(desetinná zředění resuspendovaného peletu)		
vzorek 1	●1	●2	●3	●4	●5
duplikát vzorku 1 nebo vzorek 2	●6	●7	●8	●9	●10

2.3.3. Podložní sklíčka vyložíme na vlhký savý papír.

Všechna testovací okénka pokryjeme ředěním(i) antiséra. Na okénka FITC nanese fosfátový pufr PBS. Objem antiséra nanášený na okénka musí odpovídat objemu naneseného extraktu.

2.3.4. Inkubujeme zakryté po dobu 30 minut při pokojové teplotě.

2.3.5. Kapky antiséra setřese z podložního sklíčka a podložní sklíčka opatrně opláchneme IFpuftrem. Omýváme 5 minut v roztoku IF pufru Tween a poté 5 minut v IF pufru. (Dodatek 3).
Přebytečnou vlhkost pečlivě odstraníme.

2.3.6. Podložní sklíčka vyložíme na vlhký savý papír.
Testovací okénka a okénko s FITC pokryjeme ředěním konjugátu FITC použitým pro stanovení titru. Objem konjugátu nanášený na okénka musí odpovídat objemu aplikovaného antiséra.

2.3.7. Inkubujeme zakryté po dobu 30 minut při pokojové teplotě.

2.3.8. Kapky konjugátu setřeme z podložního sklíčka. Opláchneme a omýváme stejně jako v bodě 2.3.5. Přebytečnou vlhkost pečlivě odstraníme.

- 2.3.9. Na každé okénko napipetujeme 5 - 10 μ l 0,1 M glycerolu pufrovaného fosfátem (Dodatek 3) nebo jinou podobnou krycí kapalinu a přiložíme krycí sklíčko.

2.4. Hodnocení IF testu

Podložní sklíčka prohlížíme pod epifluorescenčním mikroskopem s filtry vhodnými pro excitaci FITC, pod olejovou imersí při zvětšení 500 - 1 000 x. Každé okénko mikroskopicky prohlížíme ve dvou navzájem kolmých průměrech a rovněž po obvodu.

Nejprve prohlížíme podložní sklíčka s pozitivní kontrolou. Buňky musí jasně fluoreskovat a být plně zbarveny. Upozornění: *Při odchylném zbarvení je třeba test opakovat.*

Poté prohlížíme podložní sklíčka s testovanými vzorky. Nejprve prohlížíme preparáty z hlediska absence fluoreskujících buněk v okénkách s kontrolou FITC. Fluoreskující buňky v kontrolním okénku FITC ukazují na nespecifickou vazbu konjugátu, na autofluorescenci nebo na kontaminaci. *Upozornění: Pokud toto pozorujeme, je třeba test opakovat.*

V testovacích okénkách pozorujeme jasně fluoreskující buňky s charakteristickou morfologií původce hnědé hniloby. Intenzita fluorescence musí odpovídat pozitivnímu kontrolnímu kmenu při stejném ředění antiséra. Na buňky s neúplným zabarvením nebo se slabou fluorescencí nebereme ohled, ledaže by bylo takových buněk přítomno velmi mnoho (viz vyhodnocení výsledku IF testu).

2.4.1. Vyhodnocení výsledku IF testu

- a) Nejsou-li nalezeny silně fluoreskující buňky s charakteristickou morfologií, je IF test negativní.
- b) Jsou-li nalezeny jasně fluoreskující buňky s charakteristickou morfologií, určíme průměrný počet buněk na mikroskopické pole a vypočteme počet buněk na jeden mililitr (hodnota N) resuspendované pelety (Dodatek 4).

Hustota bakterií v hodnotě asi 10^3 buněk na jeden mililitr resuspendované pelety je považována za hranici detekce IF-testu,

- u vzorků s $N > 10^3$ buněk na 1 ml resuspendované pelety se výsledek IF testu hodnotí jako pozitivní,
 - u vzorků s $N < 10^3$ buněk na 1 ml resuspendované pelety může být výsledek IF testu hodnocen jako pozitivní
- c) Je-li zjištěn vysoký počet ($> 10^5$ buněk na 1 mililitr) neúplně nebo slabě fluoreskujících buněk při titru antiséra, měl by být proveden druhý test:
- buď test založený na odlišném biologickém principu nebo

- opakovaný IF test, buď s druhým antisérem nebo s desetinásobným zředěním pelety.

3. ELISA test

(podle Robinsona-Smitha et al., 1995)

Použijeme antisérum pro původce hnědé hniloby, nejlépe pro rasu 3/biovar 2. Titr stanovujeme u suspenze o hustotě 10^6 na 1 ml buněk homologního kmene původce hnědé hniloby.

Doporučuje se používat mikrotitrační destičky NUNC-Polysorb.

Do testu zahrneme negativní kontrolu bramborového extraktu a kontrolu fosfátového pufru (PBS).

Jako pozitivní kontrolu použijeme suspenzi o hustotě $> 10^6$ buněk na 1 ml z kmene vhodné rasy/biovaru původce hnědé hniloby. Test provádíme stejně jako u vzorku, avšak odděleně od vzorků na mikrotitrační destičce.

- 3.1. Odpipetujeme 100 - 200 μ l resuspendované pelety do mikrozkušavky. Po dobu čtyř minut zahříváme při teplotě 100 °C. Mikrozkušavky pak položíme na led.
- 3.2. Přidáme stejný objem dvojnásobně silného uhličitanového krycího pufru (Příloha 5). Promícháme.
- 3.3. Do nejméně dvou jamek v mikrotitrační destičce dáme vždy po 100 μ l. Po dobu jedné hodiny inkubujeme při teplotě 37 °C nebo přes noc při teplotě 4 °C.
- 3.4. Extrakty z jamek zcela odstraníme. Jamky vymyjeme třikrát fosfátovým pufrem (PBS) s Tweenem (Dodatek 5); poslední mycí roztok by v jamkách měl zůstat alespoň 5 minut.
- 3.5. Připravíme vhodné ředění antiséra původce hnědé hniloby v blokačním (antilátkovém) pufru (Dodatek 5). Do jamek dáme po 100 μ l ředěného antiséra. Inkubujeme po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C.
- 3.6. Antisérum z jamek zcela odstraníme. Jamky vymyjeme stejným způsobem, jak je popsáno výše (3.4.).
- 3.7. Připravíme vhodné ředění konjugátu alkalické fosfatasy v blokačním (antilátkovém) pufru. Do jamek dáme 100 μ l ředěného konjugátu. Inkubujeme po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C.
- 3.8. Konjugát z jamek zcela odstraníme. Jamky vymyjeme stejným způsobem, jak je popsáno výše (3.4., 3.6.).

3.9. Připravíme substrátový alkalický roztok fosfatasy (Dodatek 5). Dáme 100 μ l do jamek. Inkubujeme po dobu mezi 30 minutami a 1 hodinou ve tmě při pokojové teplotě.

3.10. Odečteme absorbanci při vlnové délce 409 nm.

Vyhodnocení výsledku ELISA testu:

ELISA test je negativní tehdy, je-li optická hustota (OD) vzorku $< 2 \times$ OD negativní kontroly.

ELISA test je pozitivní tehdy, je-li optická hustota (OD) vzorku $> 2 \times$ OD negativní kontroly.

4. PCR test

(podle Seala et al., 1993)

Upozornění: U všech kroků přípravy vzorku i všech ostatních činností v souvislosti s PCR musí být používány špičky pipet s filtrem.

Jako pozitivní kontrolu připravíme suspenzi kmene původce hnědé hniloby rasy 3/biovar 2 o hustotě 10^6 buněk na 1 ml. Test u této kontroly provádíme stejným postupem jako u vzorku(ů).

4.1. Odpipetujeme 100 μ l resuspendované pelety do mikrozkušavky.

Alternativně lze dát 90 μ l resuspendované pelety do mikrozkušavky, která obsahuje 10 μ l 0,5M NaOH. Mícháme opakovaným převrácením mikrozkušavky.

4.2. Zahříváme po dobu 4 minut při teplotě 100 °C. Mikrozkušavku pak ihned přemístíme na led.

4.3. Připravíme minimálně dvě desetinná ředění, např. 1/10 a 1/100 (v případě potřeby i více) ve sterilizované destilované vodě nebo ultračisté vodě (UPW).

4.4. Ve sterilní mikrozkušavce připravíme reakční směs pro PCR (Dodatek 6) tak, že přidáváme následující složky v tomto pořadí:

Pro reakční objem 50 μ l

složka koncentrace	množství	konečná
sterilní destilovaná voda nebo UPW	30,8 μ l - 33,8 μ l	
10 x PCR pufř	5,0 μ l	1 x
d-ATP	1,0 μ l	0,2 mM
d-CTP	1,0 μ l	0,2 mM

d-GTP	1,0μl	0,2 mM
d-TTP	1,0μl	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 μM)	2,5μl	1 μm M
Primer Y-2 (20 μM)	2,5μl	1 μm M
Taq-polymeráza (5U/1 μl)	0,2μl	1,0 U
Celkový objem	45 μl - 48 μl	

Pro více reakcí

Vypočítáme množství každé složky pro požadovaný počet reakcí.

Složky smícháme a 45 μl - 48 μl směsi dáme do sterilních mikrozkušavek PCR.

Mikrozkušavky s reakční směsí PCR položíme na led.

Pro reakční objem 25 μl:

Množství složek odpovídajícím způsobem zmenšíme.

4.5. PCR amplifikace

- 4.5.1. Nepovinně: Mikrozkušavky s povařeným vzorkem a pozitivní kontrolou pulzačně (velmi krátce) odstředíme. Do mikrozkušavek s reakční směsí PCR přidáme v uvedeném pořadí 2 - 5 μl vzorku, vodní kontrolu a pozitivní kontrolu. Mikrozkušavky postavíme do ohřívacího bloku termocykleru DNA.

- 4.5.2. Provedeme následující program:

1 cyklus

a) 2 minuty při teplotě 96 °C; denaturace matrice

50 cyklů

b) 20 sekund při teplotě 94 °C; denaturace

c) 20 sekund při teplotě 68 °C; připojení (anelace) primerů

d) 30 sekund při teplotě 72 °C; prodlužování primerů

1 cyklus

e) 10 minut při teplotě 72 °C; další prodlužování;

1 cyklus

f) uchováváme při teplotě 4 °C.

Upozornění: Tyto parametry se vztahují na termocykler Perkin Elmer 9600. U jiných termocyklerů je případně nutná vrstva minerálního oleje v reakčních zkumavkách PCR a nebo změna trvání kroku b), c) a d) v amplifikačním profilu.

- 4.5.3. Mikrozkušavky vyjmeme z termocykleru. Analyzujeme PCR produkt. Pokud toto nelze provést ihned, uložíme mikrozkušavky pro použití v tomtéž dni při teplotě 4 °C a pro použití za delší dobu je skladujeme při teplotě - 18 °C.

4.6. Analýza PCR produktu

Fragmenty PCR se detekují agarózovou gelovou elektroforézou a obarvením ethidiumbromidem.

- 4.6.1. Připravíme vhodný agarózový gel tak, že agarózu opatrně povaříme v elektroforetickém tris-octanovém pufru (TAE).
- 4.6.2. Roztavenou agarózu ochladíme na teplotu asi 50-60 °C, naplníme jí gelovou nalévací komoru elektroforézni aparatury a nasadíme hřeben. Roztok necháme ztuhnout.
- 4.6.3. Hřeben vyjmeme. Gel ponoříme do pufru TAE tak, aby byl pokryt vrstvou pufru silnou asi 2 - 3 mm.
- 4.6.4. Na Parafilm nanese kapku nanášecího pufru o objemu 3 μ l. Přidáme 12 μ l produktu PCR ze vzorků, z pozitivní kontroly nebo vodní kontroly a před naplněním zamícháme jemným odsátím do špičky pipety. Uvedené objemy mohou být upraveny v závislosti na kapacitě jamek v agarózovém gelu.
- 4.6.5. Jamky v gelu pečlivě naplníme. Do nejméně jedné jamky dáme pro porovnání příslušný DNA markér.
- 4.6.6. Zapojíme elektroforetickou aparaturu do sítě. Elektroforézu provádíme při hodnotách 5-8 V/cm, pokud se čelo značeného indikátoru nebude nacházet ve vzdálenosti do 1 cm od okraje gelu.
- 4.6.7. Vypneme přívod proudu do elektroforetické aparatury.
Gel opatrně odstraníme a namáčíme jej po dobu 30 - 45 minut v roztoku ethidiumbromidu.
Upozornění: Při manipulaci s ethidiumbromidem, který je silně mutagenní látkou, používáme vždy jednorázové rukavice!
- 4.6.8. Barvivo z gelu vymýváme v destilované vodě po dobu 10 až 15 minut.
- 4.6.9. Zesílený(é) fragment(y) DNA zviditelníme ultrafialovou transiluminací. PCR-produkt hnědé hniloby s primery OLI-1 a Y-2 má délku 288 párů bází. Porovnáme s DNA markérem a s pozitivní kontrolou.
Upozornění: Vodní (=negativní) kontrola musí být v každém případě negativní. Pokud by vycházela jako pozitivní, musí být test opakován.
- 4.6.10. Za účelem dokumentace gel případně vyfotografujeme.
- 4.6.11. Pravost zesíleného fragmentu potvrdíme analýzou restrikčním enzymem (REA).

4.7. Analýza restrikčním enzymem (REA)

- 4.7.1. 8,5 µl PCR produktu (4.5.3.) dáme do nové mikrozkušavky. Přidáme 1 µl 10x enzymového pufru a 0,5 µl restrikčního enzymu Ava 11.
- 4.7.2. Mícháme jemným odsáváním do špičky pipety. Pokud na stěnách mikrozkušavky zůstávají kapičky, vzorek pulsním způsobem odstředíme v mikroadstředivce. Inkubujeme asi hodinu při teplotě 37 °C.
- 4.7.3. Digerovaný fragment PCR analyzujeme jako předtím (4.6) agarózovou gelovou elektroforézou.

Vyhodnocení výsledků PCR testu:

PCR test je negativní, pokud nebyl prokázán charakteristický fragment 288 bp a tento fragment byl přitom detekován u pozitivního kontrolního kmene hnědé hniloby.

PCR test je pozitivní, jestliže byl prokázán 288 bp fragment a analýza REA ukazuje, že amplifikovaný fragment je identický s pozitivním kontrolním kmenem hnědé hniloby.

5. Test na selektivním živném médiu (podle Elphinstona et al. 1996).

5.1. Test se provádí vhodnou zřed'ovací technikou roztěrů, např.:

- a) Připravíme minimálně dvě desetinná ředění, tzn. 1/10 a 1/100 nebo více resuspendované pelety v peletovém pufru. Odměřený standardní objem (50 - 100 µl) resuspendované pelety a každého ředění napipetujeme na modifikované selektivní SMSA médium (Dodatek 7) a skleněnou tyčinkou rozprostřeme po celé ploše média.

Pokud se to ukáže jako účelné, provedeme 10 µl očkem zřed'ovací roztěr resuspendované pelety. Mezi roztěry očko plamenem sterilizujeme.

- b) Odměřený standardní objem (50 - 100 µl) resuspendované pelety nanese na modifikované selektivní SMSA médium a skleněnou tyčinkou rozetřeme po celé ploše média. Tyčinkou bez ožehnutí plamenem provedeme roztěry na nejméně dvě další plotny s modifikovaným substrátem SMSA.

- 5.2. Stejnou zřed'ovací technikou roztěru nanese suspenzi virulentního kmene původce hnědé hniloby rasa 3/biovar 2 o hustotě 10^6 buněk v 1 ml jako pozitivní kontrolu na sadu samostatných ploten s modifikovaným SMSA médiem.
- 5.3. Plotny inkubujeme při teplotě 28 °C. Po 3 dnech provedeme první kontrolu ploten. Při negativním nálezů inkubujeme dále až do 6 dnů. Kolonie virulentních izolátů původce hnědé hniloby jsou mléčně bílé, ploché, nepravidelné a fluidní, jejich střed je rudě zabarvený s proužky nebo spirálkami.

- 5.4. Kolonie s charakteristickou morfologií převedeme přeočkováním do čisté kultury na universálním médiu (Dodatek 1).
- 5.5. Čisté kultury identifikujeme (oddíl II. 4.1) a kultury původce hnědé hniloby potvrdíme testem patogenity (Oddíl II 4.3.).

Vyhodnocení výsledků testu na selektivním živném médiu.

Test na selektivním živném médiu je negativní, pokud po šesti dnech nelze izolovat žádné kolonie bakterií nebo pokud nejsou izolovány žádné charakteristické kolonie původce hnědé hniloby, za předpokladu, že není podezření z inhibice koloniemi jiných bakterií a že v pozitivních kontrolách byly zjištěny charakteristické kolonie původce hnědé hniloby.

Test na selektivním živném médiu je pozitivní, jestliže byly izolovány charakteristické kolonie původce hnědé hniloby.

6. Biotest

(podle Janse, 1988)

- 6.1. Pro každý vzorek použijeme 10 testovacích rostlin náchylných semenáčků rajčete nebo lilku vejcoplodého se stadiu třetího listu. Testované rostliny po dobu 24 hodin před inokulací nezaléváme.
- 6.2. 100 μ l resuspendované pelety rozdělíme mezi testované rostliny. Inokulujeme stonek mezi dělohami a na jednom nebo více dalších místech.
- 6.3. Stejnou technikou inokulujeme 10 semenáčků suspenzí virulentního kmene původce hnědé hniloby rasa 3/biovar 2 o hustotě 10⁶ buněk v 1 mililitru jako pozitivní kontrolu a peletovým pufrům jako negativní kontrolu. Abychom zabránili křížové kontaminaci, oddělíme pozitivní kontrolní rostliny od ostatních.
- 6.4. Testované rostliny necháme dále růst při teplotách 22 °C až 28 °C a při vysoké relativní vzdušné vlhkosti až do 4 týdnů. Denně rostliny zaléváme. Pozorujeme příznaky vadnutí, epinastie, chlorózy a (nebo) krnění.
- 6.5. Z infikovaných rostlin provedeme izolaci (oddíl II). Identifikujeme čisté kultury s charakteristickou morfologií (oddíl II.4.1.) a kultury původce hnědé hniloby potvrdíme testem patogenity (oddíl II.4.3.).
- 6.6. V případě potřeby přezkoumáme u těch testovaných rostlin, jež nevykazují žádné příznaky infekce, zda skutečně k infekci nedošlo. Z každé testované rostliny odebereme 2 cm nad místem naočkování 1 cm dlouhý úsek stonku. Odebrané části pletiv homogenizujeme v maceračním pufru. Provedeme test zředovací technikou (oddíl III. 5.1.). V případě pozitivního nálezu identifikujeme čisté kultury s charakteristickou morfologií (oddíl II. 4.1.) a kultury původce hnědé hniloby potvrdíme provedením testu patogenity (oddíl II.4.3.).

Vyhodnocení výsledku biotestu:

Biotest je negativní, jestliže testovací rostliny nejsou infikovány původcem hnědé hniloby, za předpokladu, že původce hnědé hniloby byl detekován v pozitivních kontrolách.

Biotest je pozitivní, jestliže testovací rostliny jsou infikovány původcem hnědé hniloby.

7. Obohacovací testy

(podle J.G. Elphinstona et al., 1996)

- 7.1. Vložíme 100 μ l resuspendované pelety do 3 ml modifikovaného živného média SMSA (Dodatek 7).
- 7.2. Inkubujeme po dobu 48 hodin, v žádném případě však ne déle než 72 hodin, při teplotě 28 °C, a to při volně nasazeném víčku mikrozkušavky za účelem větrání.
- 7.3. Upevníme víčko mikrozkušavky a protřepeme. Rozdělíme množství pro IFtest (tento oddíl, bod 2), pro ELISA-test (tento oddíl, bod 3) a/nebo PCR-test (tento oddíl, bod 4).

8 Test patogenity

Viz oddíl II.4.3.

Dodatek 1

Živná média pro izolaci a kultivaci původce hnědé hniloby

Živný agar (NA)

živný agar (Difco)	23 g
destilovaná voda	1 l

V 1-litrové baňce připravíme 0,5 litru objemu média.

Látky rozpustíme.

Sterilizujeme 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.

Ochladíme na 50 °C. Provedeme rozliv ploten.

Kvasnično-pepton-glukózový agar (YPGA)

kvasničný extrakt (Difco)	5 g
baktopepton (Difco)	5 g
D(+)-glukóza (monohydrát)	10 g

baktoagar (Difco) 15 g
destilovaná voda 1 l
V jednolitrové baňce připravujeme 0,5 litru objemu média.
Látky rozpustíme.
Sterilizujeme 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.
Ochladíme na 50 °C. Provedeme rozliv ploten.

Sacharózo-peptonový agar (SPA)
sacharóza 20 g
pepton 5 g
K₂HPO₄ 0,5 g
MgSO₄ · 7H₂O 0,25 g
baktoagar (Difco) 15 g
destilovaná voda 1 l

V jednolitrové baňce připravujeme 0,5 litru objemu média.
Látky rozpustíme. V případě potřeby upravíme pH na 7,2 - 7,4.
Sterilizujeme 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.
Ochladíme na 50 °C. Provedeme rozliv ploten.

Kelmanovo tetrazoliové médium

kyseliny kasaminové (=kasein hydrolyzát) (Difco) 1 g
baktopepton (Difco) 10 g
dextróza 5 g
baktoagar (Difco) 15 g
destilovaná voda 1 l
V jednolitrové baňce připravujeme 0,5 litru objemu média.
Látky rozpustíme.
Sterilizujeme 15 minut v autoklávu při teplotě 121 °C.
Ochladíme na 50 °C.
Přidáme filtrem sterilizovaný vodní roztok trifenyl-tetrazoliumchloridu (Sigma) až do dosažení konečné koncentrace 50 mg/l.
Provedeme rozliv ploten.

Dodatek 2

Materiál pro přípravu vzorku

Macerační pufr: 50 mM fosfátový pufr, pH 7,0

Tento pufr se používá pro macerování pletiv.

Na₂HPO₄ 4,26 g
KH₂PO₄ 2,72 g
destilovaná voda 1 l

Látky rozpustíme a zkontrolujeme pH. Podle potřeby provedeme alikvotaci.
Sterilizujeme v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C.

Při provádění přímého PCR testu se doporučuje přidání 5% polyvinylpyrolidonu 40.000 MWT (PVP-40), aby se snížil rozsah inhibice amplifikace aromatickými molekulami v extraktu.

Při použití homogenizačních metod pomocí Waring-Blender nebo Ultra-Turrax k maceraci výkrojků pletiva bramboru se doporučuje přidání deflokulačního prostředku, prostředku proti tvorbě pěny nebo antioxidantu.

lubrolové vločky	0,5 g/l
antipěnidlo DC-silikon	1,0 ml/l
tetrapyrofosfát sodný	1,0 g/l

Autoklávuje odděleně. Přidáváme až do dosažení žádané koncentrace.

Peletový pufr: 10 mM fosfátového pufru, pH 7,2

Tento pufr se používá pro resuspendování a ředění pelet a pupkových částí bramborových hlíz .

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g
destilovaná voda	1 l

Látky rozpustíme a zkontrolujeme pH. Podle potřeby provedeme alikvotaci. Sterilizujeme v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C.

Dodatek 3

Materiál pro IF test

IF-pufr: 10 mM roztoku chloridu sodného pufrovaného fosfátem (PBS), pH 7,2

Tento pufr se používá pro ředění antiséra.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g
NaCl	8,0 g
destilovaná voda	1 l

Látky rozpustíme a zkontrolujeme pH. Podle potřeby provedeme alikvotaci. Sterilizujeme v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C.

IF pufr Tween

Tento pufr se používá k omytí podložních sklíček. K IF pufru se přidává 0,1 % Tween.

0,1 M glycerin pufovaný fosfátem, pH 7,6

Tento pufr se používá ke zvýšení fluorescence jako krycí tekutina na okénkách IFpodložního sklíčka.

Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ . 2 H ₂ O	0,15 g
glycerol	50 ml
destilovaná voda	100 ml

Dodatek 4

Stanovení stupně kontaminace v IF testu

Plocha (S) jednoho okénka na podložním sklíčku s více okénky

$$= \pi D^2/4,$$

přičemž D = průměr okénka (1).

Plocha (s) pole objektivu

$$= \pi d^2/4,$$

kde d = průměr pole objektivu (2);

d stanovíme buď přímým měřením nebo z následujících vzorců:

$$s = \pi i^2/G^2K^2 \times 4$$

kde i = koeficient pole (závisí na typu okuláru mikroskopu a může mít hodnotu od 8 do 24),

K = tubusový koeficient (1 nebo 1,25)

G = (100násobné, 40násobné apod.) zvětšení objektivu;

ze vzorce (2):

$$d = \text{odmocnina } 4s/\pi;$$

ze vzorce (3):

$$d = \text{odmocnina } 4 \times \pi i^2/G^2K^2 \times 4/\pi = i/GK.$$

Zjistíme počet typických fluoreskujících buněk v jednom poli - c.

Vypočítáme počet typických fluoreskujících buněk v celém okénku - C.

$$C = c S/s$$

Vypočítáme počet typických fluoreskujících buněk na jeden ml pelety (N).

$$N = C \times F \times 1000/y,$$

kde y = objem pelety na okénku podložního sklíčka

F = zředovací faktor pelety.

Dodatek 5

Materiál pro ELISA test

Dvojnásobný uhličitanový povlakový pufr, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	6,36 g
NaHCO ₃	11,72 g
destilovaná voda	1 l

Látky rozpustíme a změříme pH. Podle potřeby provedeme alikvotaci.
Sterilizujeme v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C.

Pokud extrakt obsahuje vysoký podíl aromatických molekul, lze přidat siřičitan sodný s konečnou koncentrací 0,2 % jako antioxidant.

Desetinásobný roztok chloridu solného pufovaný fosfátem (PBS), pH 7,4

NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	29 g
KCl	2 g
destilovaná voda	1 l

Látky rozpustíme a změříme pH. Podle potřeby provedeme alikvotaci.
Sterilizujeme v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C.

Roztok chloridu sodného - Tween - pufovaný fosforečnanem (PBS-T)

10 x PBS	100 ml
10% Tween 20	5 ml
destilovaná voda	895 ml

Blokační (antilátkový) pufr (musí být použit čerstvý)

10 x PBS	10 ml
polyvinylpyrrolidon 44.000 MWT(PVP-44)	2 g
10% Tween 20	0,5 g
sušené mléko	0,5 g
destilovaná voda	na 100 ml

Alkalický substrátový roztok fosfatázy, pH 9,8

dietanolamin	97 ml
destilovaná voda	88 ml

Smícháme a koncentrovanou HCl ustálíme na pH 9,8.

Doplníme destilovanou vodou na objem 1 litru.

Přidáme 0,2 g MgCl₂.

V každých 15 ml roztoku rozpustíme 2 tablety substrátové fosfatázy (5 mg) (Sigma).

Dodatek 6

Materiál pro PCR test

Sekvence oligonukleotidového primeru

Primer OLI-1 5'- GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC-3'

Primer Y-2 5'- CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

potřebné chemikálie viz Seal et al., 1993.

Dodatek 7

Materiál pro test selektivních živných médií a obohacovací testy

Selektivní medium SMSA (Engelbrecht, 1994, modifikováno podle Elphingstona et al., 1996)

Základní medium

kaseinový hydrolyzát (Difco)	1 g
baktopepton (Difco)	10 g
glycerol	5 ml
agar (Difco)	15 g
destilovaná voda	1 l

V litrové baňce připravíme objem 0,5 l substrátu.

Látky rozpustíme a zkontrolujeme hodnotu pH. V případě potřeby před autoklávováním upravíme hodnotu pH na 6,5. Při pH nad 7,0 neroste původce hnědé hniloby na tomto substrátu dobře.

Sterilizujeme v autoklávu po dobu 15 minut při teplotě 121 °C.

Ochladíme na 50 °C.

Pro dosažení konečných koncentrací přidáme následující látky (všechny od firmy Sigma):

krystalová violet'	5 mg/l	
polymixin-B-sulfát	100 mg/l (cca 600 000 jednotek)	Sigma P-1004
bacitracin (*)	25 mg/l (cca 1250 jednotek)	Sigma B-0125
chloramfenikol	5 mg/l	Sigma C-3175
penicilin-G	0,5 mg/l (cca 825 jednotek)	Sigma P-3032
tetrazoliové soli	50 mg/l	

Látky rozpustíme v 70% etanolu na koncentrace uvedené pro objem připravovaného média. Některé látky, jako je např. polymixin B nebo chloramfenikol, je třeba přitom lehce zahřát a protřepat.

SMSA bujón (Elphinstone et al., 1996)

Příprava jako u selektivního substrátu SMSA, avšak bez agaru.

Naplníme alikvotní množství 3 ml do 30 ml jednorázových univerzálních zkumavek.

(*) V případě potřeby lze kontaminaci saprofytickými bakteriemi snížit zvýšením koncentrace bacitracinu na 300 ppm, aniž by tím bylo negativně ovlivněno izolování původce hnědé hniloby

Literatura

Buddenhagen, I. W. - Sequeira, L. - Kelman, A.: Description of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52 (1962):726.

Cook, D. - Elizabeth, B. - Sequeira, L.: Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probes that specify virulence and hypersensitive respons. Molecular Plant-Microbe Interactions 2 (1989): 113 - 121.

Dinesen, I. G. - DeBoer, S. H.: Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. American Potato Journal 72 (1995): 133 - 142.

Elphinstone, J. G. et al.: Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potato tuber extracts. EPPO Bulletin 26 (1996).

Engelbrecht, M. C.: Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. ACIAR Bacterial Wilt Newsletter 10 (1994): 3 - 5.

Hayward, A.C.: Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of Applied Bacteriology 27 (1964): 265 -277.

Hayward, A.C.: Systematic and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Bacterial Wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (eds. A. C. Hayward and G. L. Hartman) CABI Oxford, 1994: 127 - 135.

Janse, J. D.: A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. EPPO Bulletin 18 (1988): 343 - 351.

Janse, J. D.: Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14 (1991): 335 - 345.

Kelman, A.: The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 64 (1954): 293 - 295.

- Lelliot, R. A. - Stead, D. E.: Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. (T. F. Preece ed.) Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987, 216 s.
- Louws, F. J. et al.: Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85 (1995): 528 - 536.
- Lozano, J. C. - Sequeira, L.: Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology* 60 (1970): 838
- Mirza, M. S. et al.: Specific 16S ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Canadian Journal of Microbiology* 39 (1993): 1029 - 1034.
- Robinson-Smith, A. et al.: Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and Agricultural Immunology* 7 (1995): 67 - 79.
- Seal, S. E. et al.: Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii*, *P. picketti* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology* 139 (1993): 1587 - 1594.
- Smith, J. J. et al.: Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (1995): 4262 - 4268.
- Stead, D. E.: Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. In: *Techniques for rapid detection of plant pathogens* (eds. J. M. Duncan and L. Torrance). Blackwell Scientific Publications, Oxford 1992a, s. 76 - 111.
- Stead, D. E.: Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42 (1992b): 281 - 295.
- Van Beuningen, A. - Derks, H. - Janse, J. D.: Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent in-situ hybridisation (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. *Züchtungsforschung* 2 (1).

A. Rozsah informace o provedeném průzkumu výskytu původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby podle § 3 odst. 12

Informace o provedeném průzkumu výskytu původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby podle § 3 odst. 12 obsahuje:

a) při zjišťování výskytu původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby v porostech, ve skládkách a v zásilkách bramboru:

- rozdělení na rozmnožovací materiál¹⁾ (rozdělení podle kategorií) a ostatní brambory (rozdělení na brambory pro konzumní a průmyslové účely),
- počet a výměra prohlédnutých a vzorkovaných porostů v hektarech,
- počet a hmotnost (v tunách) prohlédnutých a vzorkovaných partií v ČR sklizených nebo do ČR dovezených hlíz,
- doba odběru a počet vzorků odebraných z porostů brambor, skládek a zásilek sklizených hlíz a výsledky testování;

b) při zjišťování výskytu původce hnědé hniloby v porostech rajčete:

- počet kontrolovaných podniků,
- počet kontrol a prohlédnutých rostlin (i odhad),
- počet odebraných vzorků a výsledky testování;

c) při zjišťování výskytu původce hnědé hniloby v porostech jiných hostitelských rostlin než je brambor a rajče, včetně hostitelských rostlin z čeledi lilkovitých v pobřežní vegetaci:

- počet kontrolovaných podniků, druh a počet (i odhad) prohlédnutých rostlin,
- počet odebraných vzorků rostlin, druh provedených testů a výsledky testování,
- pro hnědou hnilobu - počet a označení vodních útvarů, odkud byly odebírány vzorky rostlin;

d) při zjišťování výskytu původce hnědé hniloby ve vodních zdrojích používaných k závlaze hostitelských rostlin a v odpadních vodách z podniků, které průmyslově zpracovávají brambory:

- počet a označení vodních útvarů a počet podniků, odkud byly odebrány vzorky vody,
- počet odebraných vzorků vody, doba odběru, druh provedených testů a výsledky testování;

B. Uchování testovaných vzorků a partií a dokladování testování

1. Vznikne-li podezření z výskytu původce kroužkovitosti na základě pozitivního výsledku imunofluorescenčního testu nebo jiného screeningového testu, provedeného podle postupu uvedeného v příloze č. 1, musí být až do potvrzení nebo vyvrácení tohoto výsledku dalším postupem podle přílohy uchovány a konzervovány:

- celá partie rostlin, z níž byl odebrán vzorek, nebo část této partie v původním obalu s etiketou, je-li to možné,

¹⁾ § 2 písm. a) zákona č. 219/2003 Sb., o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů.

- všechny hlízy nebo rostliny odebraného vzorku, a

- veškeré zbytky suspenzí a sklíček připravených pro imunofluorescenční test.

2. V případě potvrzení výskytu původce kroužkovitosti musí být minimálně po dobu jednoho měsíce od úředního oznámení výsledku testu způsobem stanoveným v § 3 odst. 11 uchovány a vhodným způsobem konzervovány:

- materiál specifikovaný v bodě 1.,

- vzorek infikovaných rostlin lilku jedlého naočkovaných extraktem z hlízy nebo rostliny a

- izolovaná kultura původce kroužkovitosti.

3. Vznikne-li podezření z výskytu původce hnědé hniloby na základě pozitivního výsledku testování provedeného postupy podle přílohy č. 1, a ve všech ostatních případech, kdy úředně provedené testování přináší pozitivní výsledek, musí být až do potvrzení nebo vyvrácení tohoto výsledku dalším postupem podle přílohy č. 1. uchovány a vhodným způsobem konzervovány:

- celá partie rostlin, z níž byl odebrán vzorek, nebo část této partie v původním obalu s etiketou, je-li to možné,

- podle možnosti zbytek rostlin, který ve vzorku zůstal,

- veškeré zbytky suspenzí a další materiál, připravený pro provedení kontrolních testů (např. sklíčka připravená pro imunofluorescenční test),

a uchovány všechny odpovídající doklady.

4. V případě potvrzení výskytu původce hnědé hniloby musí být minimálně po dobu jednoho měsíce od úředního oznámení výsledku testu způsobem stanoveným v § 3 odst. 11, popř. v § 5 odst. 3 a vhodným způsobem konzervovány:

- materiál specifikovaný v bodě 3., případně vzorek infikovaných rostlin lilku jedlého nebo rajčete, naočkovaných extraktem z hlízy nebo rostliny, a

- izolovaná kultura původce hnědé hniloby.

Způsob provádění odborného šetření a stanovení rozsahu pravděpodobného zamoření původcem kroužkovitostí nebo původcem hnědé hniloby a rozsahu jejich možného rozšíření a náležitosti oznámení potvrzeného výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby

1. Odborné šetření podle § 5 odst. 1 písm. b) je zaměřeno na :

- místo produkce,

- v němž byly nebo jsou pěstovány rostliny bramboru, jež jsou klonově příbuzné s rostlinami partie bramboru, ve které bylo potvrzeno zamoření původcem kroužkovitosti nebo původcem hnědé hniloby,
- v němž byly nebo jsou pěstovány rostliny rajčete původem z téže partie osiva nebo sadby rajčete jako rostliny, v nichž bylo potvrzeno zamoření původcem hnědé hniloby,
- v němž byly nebo jsou pěstovány rostliny bramboru, a v případě původce hnědé hniloby také rajčete, jež byly z důvodu podezření na výskyt původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby podrobeny odbornému šetření podle § 4 odst. 3,
- v němž byly nebo jsou pěstovány rostliny bramboru, a v případě původce hnědé hniloby také rajčete, a které leží v sousedství zamořeného místa produkce, včetně místa produkce, kde byly společně nebo prostřednictvím společného smluvního partnera použity zemědělské stroje nebo zařízení,
- na němž byla k závlaze nebo postřiku použita povrchová voda ze zdroje u něhož bylo potvrzeno, že je zamořeno původcem hnědé hniloby nebo které je ze zamoření původcem hnědé hniloby podezřelé,
- na němž byla k závlaze nebo postřiku použita povrchová voda ze zdroje, používaného v téže době k závlaze nebo postřiku také pro jiné místo produkce, u něhož bylo potvrzeno, že je zamořeno původcem hnědé hniloby nebo které je ze zamoření původcem hnědé hniloby podezřelé,
- které bylo nebo je zaplaveno povrchovou vodou zamořenou původcem hnědé hniloby nebo povrchovou vodou z tohoto zamoření podezřelou,

a

- povrchovou vodu, která byla použita k závlaze nebo postřiku pozemku nebo místa produkce, u nichž bylo potvrzeno, že jsou zamořeny původcem hnědé hniloby, nebo která tato pole nebo místa produkce zaplavila.

2. Při stanovení rozsahu pravděpodobného zamoření původcem kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby podle § 5 odst. 1 písm. b) je nutno posoudit zejména:

- hostitelské rostliny pěstované v místě produkce, označené za zamořené podle § 5 odst. 1 písm. a),

- místo produkce nebo prostor s určitým pěstitelským propojením na hostitelské rostliny označené za zamořené podle § 5 odst. 1 písm. a), včetně těch, které mají společné pěstitelské zařízení a vybavení a ve kterých byly společně používány zemědělské stroje, a to přímo nebo prostřednictvím společného smluvního partnera,
 - hostitelské rostliny pěstované v místě(-ech) produkce uvedeném(-ých) v předcházející odrážce nebo nacházející se v takovém(-ých) místě(-ech) během období, kdy se hostitelské rostliny označené za zamořené podle § 5 odst. 1 písm. a) nacházely v takových prostorách nebo místech produkce uvedených v první odrážce,
 - společné sklady skladující hostitelské rostliny z výše uvedených míst produkce,
 - zařízení, stroje, dopravní prostředek, sklad nebo jeho části a veškeré jiné objekty včetně obalového materiálu, které mohly přijít do styku s hostitelskými rostlinami označenými za zamořené podle § 5 odst. 1 písm. a) během předcházejících 12 měsíců nebo kratšího období, pokud je to odborně odůvodněno,
 - hostitelské rostliny, které se skladují nebo jsou v kontaktu se stavbami nebo objekty vyjmenovanými v předcházející odrážce, a to do provedení očisty a dezinfekce těchto staveb nebo objektů způsobem stanoveným v bodě 3 přílohy č.4,
 - hostitelské rostliny, které mají na základě testování podle § 6 stejný klonový původ jako hostitelské rostliny označené za zamořené podle § 5 odst. 1 písm. a), a u kterých rostlinolékařská správa na základě odborného šetření podle § 76 odst. 2 zákona označí zamoření za pravděpodobné,
 - místo produkce, ve kterém byly hostitelské rostliny uvedené v předchozí odrážce pěstovány nebo skladovány,
 - místo produkce, ve kterém se používala povrchová voda k postřiku nebo k zavlažování původem ze zdroje, označeného podle § 5 odst. 2 písm. b) za zamořený původcem hnědé hniloby,
 - hostitelské rostliny vypěstované na pozemcích zaplavených vodou, označenou podle § 5 odst. 2 písm. b) za zamořenou původcem hnědé hniloby.
3. Při stanovení rozsahu možného rozšíření původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby podle § 5 odst. 1 písm. c) je nutno posoudit zejména:
- blízkost ostatních míst produkce, kde se pěstují brambory či jiné hostitelské rostliny,
 - místa výsadby anebo užívání společně skladovaných sadbových brambor,
 - místo produkce, na němž jsou hostitelské rostliny zavlažovány nebo postřikovány povrchovou vodou, pokud existuje nebo existovalo nebezpečí, že tato voda zaplavila místo produkce označené podle § 5 odst. 1 písm. a) za zamořené původcem hnědé hniloby,
 - místo produkce, na němž jsou hostitelské rostliny pěstovány bezprostředně vedle povrchové vody označené podle § 5 odst. 2 písm. b) za zamořenou původcem hnědé hniloby, nebo které mohou být touto povrchovou vodou zaplaveno,

- každá jednotlivá zavlažovací nádrž, která je spojena s povrchovou vodou označenou podle § 5 odst. 2 písm. b) za zamořenou původcem hnědé hniloby.

4. Oznámení potvrzeného výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby podle § 5 odst. 2 zahrnuje:

- datum zjištění podezření z výskytu a potvrzení výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby podle § 4 a § 5, popřípadě datum odběru vzorků v rámci provádění detekčního a vymezovacího průzkumu podle § 3,
- identifikaci příslušného rostlinolékařského osvědčení podle § 21 odst. 1 písm. d) zákona, popř. rostlinolékařského pasu nebo alespoň registrační číslo pěstitele, obchodníka nebo dovozce podle § 12 odst. 1 zákona pro každou zásilku, dodávku nebo partii hostitelských rostlin, označenou za zamořenou,
- název odrůdy a kategorii úředně uznaného rozmnožovacího materiálu pro partie sadbových brambor a v případě potřeby také pro partie ostatních hostitelských rostlin,
- popis předmětů a objektů označených za zamořené a rozsah vymezeného karanténního území, popřípadě bezpečnostní zóny,
- dostupnost suspenze, připravených imuno fluorescenčních sklíček, infikovaných rostlin lilku jedlého nebo rajčete a izolované kultury původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby ze zkoušky, při které bylo provedeno pozitivní potvrzení jejich přítomnosti,
- jiné údaje k potvrzenému výskytu původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby, pokud si je Komise vyžádá.

Opatření po potvrzení přítomnosti původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby

1. Způsob naložení s partií hostitelské rostliny označenou za zamořenou

S partií hostitelské rostliny, označenou za zamořenou podle § 5 odst. 1 písm. a), musí být naloženo na základě nařízení rostlinolékařské správy podle § 7 odst. 1 písm. a) některým z níže uvedených způsobů:

a) odvoz do řízené skládky a okamžité převrstvení vhodným materiálem (zemina, suť apod.) tak, aby nemohlo dojít ke zcizení hlíz a k dalšímu šíření původce kroužkovitosti ani původce hnědé hniloby; pro hlízy napadené původcem hnědé hniloby mohou být přitom využity jen takové skládky, u nichž je vyloučeno nebezpečí průsaku na zemědělsky využívanou ornou půdu nebo do povrchových vod využívaných k zavlažování zemědělské půdy;

b) v případě hlíz bramboru tepelné zpracování v pařících zařízeních, při němž jsou hlízy vystaveny teplotě nejméně 75 °C po dobu nejméně deseti minut, a následné zkrmení hospodářskými zvířaty;

c) v případě hlíz bramboru prostřednictvím přímé a okamžité dodávky partie do zpracovatelského podniku tepelné zpracování hlíz pro průmyslové nebo potravinářské účely, při němž jsou hlízy vystaveny teplotě nejméně 75 °C po dobu nejméně deseti minut nebo, v případě naložení s partií na území České republiky, zpracovány takovým technologickým postupem, schváleným rostlinolékařskou správou, který vylučuje další šíření původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby; přesun zamořených partií povolí rostlinolékařská správa jen do podniků touto správou písemně k tomu účelu schválených, a to na základě ověření, že v podniku funguje systém dezinfekce skladovacích prostor a odvozových vozidel a že podnik splňuje požadavky na zneškodňování odpadů, stanovené v příloze č. 5,

d) v případě původce kroužkovitosti zpracování hlíz silážováním se silážní kukuřicí za podmínky rozřezání hlíz a jejich rovnoměrného rozvrstvení do celého objemu silážované kukuřice; rostlinolékařská správa posoudí konkrétní podmínky silážování před použitím tohoto opatření a stanoví konkrétní postupy, které vyloučí možnost šíření původce kroužkovitosti,

e) jiné opatření, které bylo předem písemně schváleno rostlinolékařskou správou a při kterém neexistuje rozpoznatelné riziko rozšíření původce kroužkovitosti ani hnědé hniloby, takové opatření musí být rostlinolékařskou správou nařízeno určité povinné osobě včetně stanovení podmínek pro bezrizikové naložení s odpady.

Opatření pod písm. a) je možné použít k naložení s partií označenou jako zamořená jen v případě, kdy nebylo možné zcela využít postup v odstavcích b) až e). Opatření nařízená v souladu s písm. d) a e) sděluje rostlinolékařská správa neprodleně Komisi a ostatním členským státům. Pokud má být opatření pod písmeny a) až e) provedeno na území jiného členského státu, povinná osoba o tom informuje rostlinolékařskou správu, která tuto informaci sdělí úřední organizaci rostlinolékařské péče příslušného členského státu.

2. Způsob naložení s partií hostitelské rostliny označenou za pravděpodobně zamořenou

S partií hostitelské rostliny, označenou za pravděpodobně zamořenou podle § 5 odst. 1 písm. b), musí být naloženo na základě nařízení rostlinolékařské správy podle § 7 odst. 1 písm. b) některým z níže uvedených způsobů:

a) konzumace hlíz bramboru balením upravených pro přímé dodání do místa spotřeby a použití bez přebalování jako konzumní brambory; přesun partií podezřelých ze zamoření původcem hnědé hniloby povolí rostlinolékařská správa jen do míst touto správou písemně k tomu účelu schválených, a to na základě ověření, že v podniku funguje systém dezinfekce skladovacích prostor a odvozových vozidel a že podnik splňuje požadavky na zneškodňování odpadů, stanovené v příloze č. 5,

b) v případě hlíz bramboru tepelné zpracování v pačicích zařízeních, při němž jsou hlízy vystaveny teplotě nejméně 75 °C po dobu nejméně deseti minut, a následně zkrmení hospodářskými zvířaty;

c) v případě hlíz bramboru prostřednictvím přímé a okamžité dodávky partie do zpracovatelského podniku tepelné zpracování hlíz pro průmyslové nebo potravinářské účely, při němž jsou hlízy vystaveny teplotě nejméně 75°C po dobu nejméně deseti minut nebo, v případě naložení s partií na území České republiky, zpracovány takovým technologickým postupem, schváleným rostlinolékařskou správou, který vylučuje další šíření původce kroužkovitosti a původce hnědé hniloby; přesun partií podezřelých ze zamoření povolí rostlinolékařská správa jen do podniků touto správou písemně k tomu účelu na území České republiky schválených, a to na základě ověření, že v podniku funguje systém dezinfekce skladovacích prostor a odvozových vozidel a že podnik splňuje požadavky na zneškodňování odpadů, stanovené v příloze č. 5,

d) v případě původce kroužkovitosti zpracování hlíz silážováním se silážní kukuřicí za podmínky rozřezání hlíz a jejich rovnoměrného rozvrstvení do celého objemu silážované kukuřice; rostlinolékařská správa posoudí konkrétní podmínky silážování před použitím tohoto opatření a stanoví konkrétní postupy, které vyloučí možnost šíření původce kroužkovitosti,

e) jiné opatření, které bylo předem písemně schváleno rostlinolékařskou správou a při kterém neexistuje rozpoznatelné riziko rozšíření původce kroužkovitosti ani původce hnědé hniloby, takové opatření musí být rostlinolékařskou správou nařízeno určité povinné osobě včetně stanovení podmínek pro bezrizikové naložení s odpady.

Opatření nařízená v souladu s písm. d) a e) sděluje rostlinolékařská správa neprodleně Komisi a ostatním členským státům. Pokud má být opatření pod písmeny a) až e) provedeno na území jiného členského státu, povinná osoba o tom v předstihu informuje rostlinolékařskou správu, která tuto informaci sdělí úřední organizaci rostlinolékařské péče příslušného členského státu tak, aby bylo možno zajistit úřední kontrolu nad plněním nařízeného opatření.

3. Ošetření celých rostlin a posklizňových zbytků rostlin

Všechny rostliny partie podezřelé ze zamoření nebo zamořené se odstraní z pozemku nebo objektu a uloží do řízené skládky odpadů v souladu se zněním v bodě 1. písm. a) nebo spálí způsobem, kterým nedojde k porušení zákonných ustanovení o ochraně ovzduší. Tento způsob se doporučuje zejména pro rostliny rajčete.

Pěstované rostliny partie podezřelé ze zamoření nebo zamořené je možno v případě původce kroužkovitosti namísto opatření uvedených v bodech 1. a 2. nebo spálení likvidovat totálním

herbicidem do doby, kdy lze zaručit i likvidaci podzemních částí rostlin, a následně porost zaorat.

Opatření nařízená podle tohoto bodu sděluje rostlinolékařská správa neprodleně Komisi a ostatním členským státům.

4. Opatření v karanténním území po potvrzení výskytu původce kroužkovitosti

4.1. V karanténním území, které zahrnuje místo produkce označené za zamořené původcem kroužkovitosti podle § 5 odst. 1 písm. a), rostlinolékařská správa po potvrzení výskytu původce kroužkovitosti nařídí podle § 7 odst. 1 písm. d), že uživatel pozemků v tomto území:

4.1.1. na pozemku označeném za zamořený původcem kroužkovitostí podle § 5 odst. 1 písm. a):

a) nesmí po dobu čtyř vegetačních období následujících po roce potvrzení výskytu původce kroužkovitosti pěstovat brambor a musí systematicky vyhledávat a likvidovat planě rostoucí rostliny bramboru /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/
nebo

musí tento pozemek po čtyři vegetační období udržovat jako černý úhor nebo zatravnit nebo osít pícninou (jetel, jetelotráva, vojtěška, vojtěškotráva) a porost na nich udržovat sekáním jako co nejnižší strniště a musí na nich vyhledávat a odstraňovat planě rostoucí rostliny bramboru /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/;

b) smí pěstovat brambor v prvním roce, který následuje po splnění ustanovení uvedených pod písm. a), ale jen s podmínkou, že

- během předcházejících dvou let bylo na základě písemné žádosti uživatele pozemku rostlinolékařskou správou ověřeno, že pozemek byl shledán prostým planě rostoucích rostlin bramboru,

- k výsadbě bude použit rozmnožovací materiál¹⁾, a

- sklizeň bude určena pouze ke konzumním účelům nebo k průmyslovému zpracování

/§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

c) smí po splnění ostatních mimořádných rostlinolékařských opatření nařízených v karanténním území podle bodu 4 a po uplynutí odpovídajícího rotačního cyklu poprvé na tomto pozemku pěstovat brambor nebo jinou hostitelskou rostlinu původce kroužkovitosti, pouze použije-li rozmnožovací materiál¹⁾, který byl úředně uznán podle zvláštního zákona²⁾, a musí o zamýšleném prvním pěstování hostitelských rostlin na tomto pozemku informovat písemně rostlinolékařskou správu v takovém předstihu, aby bylo možno provést vymezovací průzkum výskytu původce kroužkovitosti podle § 3 odst. 3.

4.1.2. na pozemku jiném než označeném za zamořený původcem kroužkovitosti podle § 5 odst. 1 písm. a), na kterém byl v roce potvrzení výskytu původce kroužkovitosti pěstován brambor, nesmí po dobu dvou následujících vegetačních období pěstovat brambor;

/§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

¹⁾ § 2 písm. a) zákona č. 219/2003 Sb., o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů.

²⁾ § 6 zákona č. 219/2003 Sb., o uvádění do oběhu osiva a sadby pěstovaných rostlin a o změně některých zákonů.

4.1.3. na pozemku jiném než označeném za zamořený původcem kroužkovitosti podle § 5 odst. 1 písm. a), na kterém nebyl v roce potvrzení výskytu původce kroužkovitosti pěstován brambor, smí ve vegetačním období, které následuje po roce potvrzení výskytu původce kroužkovitosti, pěstovat brambor, ale jen s podmínkou, že

- rostlinolékařská správa protokolárně neshledá žádné riziko šíření původce kroužkovitosti planě rostoucími rostlinami bramboru ani jinými planě rostoucími hostitelskými rostlinami původce kroužkovitosti, a

- sklizeň bude určena pouze ke konzumním účelům nebo k průmyslovému zpracování
/§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

4.1.4. musí po dobu čtyř úplných vegetačních období od potvrzení výskytu původce kroužkovitosti vyhledávat a likvidovat planě rostoucí rostliny bramboru a jiné planě rostoucí hostitelské rostliny původce kroužkovitosti /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/;

4.1.5. musí zabezpečit oddělenou manipulaci a oddělené skladování rozmnožovacího materiálu¹⁾ bramboru od ostatních rostlin bramboru /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona /;

4.1.6. musí způsobem uvedeným v příloze č. 6:

- jednorázově provést očistu a dezinfekci objektů a předmětů, které přišly do kontaktu se zamořenou partií anebo s partií pravděpodobně zamořenou, a to nejpozději do té doby, než přijdou do styku s jinými partiemi hostitelských rostlin /§ 76 odst.1 písm. c) zákona/;

- provádět očistu strojů, dopravních prostředků, skladovacích prostor, třídících linek, obalů, palet a jiných předmětů po každém použití při výrobě hlíz bramboru po dobu stanovenou rostlinolékařskou správou³⁾ /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/;

- provádět po dobu tří úplných vegetačních období od potvrzení výskytu původce kroužkovitosti závěrečnou očistu sklizňové techniky po ukončení sklizně a závěrečnou očistu a dezinfekci všech strojů, dopravních prostředků, třídících linek, obalů, palet a jiných předmětů použitých při posklizňové úpravě, naskladnění a vyskladnění, která musí být ukončena před novým použitím /§ 76 odst.1 písm.a) bod 2. zákona/;

4.1.7. smí k pěstování bramboru po dobu tří let následujících po roce potvrzení výskytu původce kroužkovitosti používat jen rozmnožovací materiál¹⁾ /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

4.1.8. nesmí vysazovat krájené hlízy bramboru nebo vysazovat hlízy bramboru pomocí napichovacích sazečů /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

4.1.9. nesmí množit rozmnožovací materiál¹⁾ bramboru ani pro vlastní potřebu ve vegetačním období bezprostředně následujícím po vegetačním období, v němž nebo z jehož sklizně byl výskyt původce kroužkovitosti zjištěn /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

4.1.10. smí přemísťovat mimo toto území pouze partie bramboru, které byly úředním laboratorním testováním shledány prostými původce kroužkovitosti a partie označené rostlinolékařskou správou jako zamořené nebo pravděpodobně zamořené při splnění všech podmínek v nařízeném opatření /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/.

³⁾ Provádí se očista :

- strojů po ukončení jejich práce na jednom pozemku s alespoň jedním porostem bramboru;
- skladovacích prostorů, obalů, palet, třídíček, dopravních prostředků a jiných předmětů vždy po vyskladnění jedné partie nebo ukončení práce s jednou partií.

Sklizené hlízy bramboru balením upravené pro přímé dodání do místa spotřeby na území České republiky a určené k použití bez přebalování jako konzumní brambory lze přemísťovat mimo karanténní území ihned po odběru úředního vzorku, pokud byla příslušná partie prohlédnuta v době sklizně rostlinolékařskou správou na výskyt příznaků původce kroužkovitosti, včetně prohlídky řezu dužniny hlíz, s negativním výsledkem.

4.1.11. smí vyvážet rostliny bramboru vypěstované v tomto území do třetích zemí pouze pokud budou dodrženy úřední dovozní karanténní podmínky, stanovené orgánem rostlinolékařské péče dovážející země /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

4.1.12. nesmí používat zemědělské nářadí a mechanizační prostředky, používané při pěstování, sklizni, posklizňové úpravě, přepravě a skladování brambor, které přišly do kontaktu se zamořenými partiemi, po dobu jednoho roku od doby potvrzení výskytu původce kroužkovitosti mimo toto území bez řádné očisty a dezinfekce provedené způsobem uvedeným v příloze č. 6 /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/;

4.2. Při potvrzení původce kroužkovitosti v produkčních systémech, kde je možná úplná výměna pěstebního substrátu (např. ve sklenících šlechtitelů či při pěstování minihlízek, meristémů a pod.) uživatel pozemků:

a) nesmí pěstovat brambor, pokud nedojde pod kontrolou rostlinolékařské správy k eradikaci původce kroužkovitosti, včetně odstranění všech rostlin bramboru nebo jiných rostlin čeledi Solanaceae, úplné výměně pěstebního substrátu a vyčištění a dezinfekce veškerých objektů, strojů a zařízení provedené způsobem uvedeným v příloze č. 6 /§ 76 odst.1 písm. a) zákona/;

b) musí další pěstování bramboru založit z rozmnožovacího materiálu odvozeného z rostlin testovaných na výskyt původce kroužkovitosti s negativním výsledkem /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/.

4.3. Zjištění planě rostoucích rostlin bramboru v karanténním území podle bodu 4.1.4. musí uživatel pozemků v tomto území ohlásit rostlinolékařské správě a před likvidací těchto rostlin musí umožnit jejich úřední testování na přítomnost původce kroužkovitosti. Při potvrzení výskytu původce kroužkovitosti při tomto testování se příslušný pozemek považuje za pozemek zamořený /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/.

4.4. Rostlinolékařská správa provádí namátkově dohled nad pozemky a objekty, ve kterých se pěstují či skladují rostliny bramboru nebo se s těmito rostlinami nakládá, zejména nad prováděním očisty a dezinfekce mechanizace, která je využívána v porostech bramboru a ve sklizených hlízách bramboru také v jiných místech produkce.

4.5. V bezpečnostní zóně, vymezené v místě produkce na základě pravděpodobného zamoření a nebo možného rozšíření původce kroužkovitosti podle § 5 odst. 1 písm. c), rostlinolékařská správa nařídí podle § 7 odst. 1 písm. d), že uživatel pozemků v tomto území musí po dobu tří úplných vegetačních období od potvrzení výskytu původce kroužkovitosti:

a) provádět závěrečnou očistu sklizňové techniky po ukončení sklizně a závěrečnou očistu a dezinfekci všech strojů, dopravních prostředků, třídících linek, obalů, palet a jiných předmětů použitých při posklizňové úpravě, naskladnění a vyskladnění, která musí být ukončena před zahájením nové pěstitelské sezóny /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/;

b) musí zabezpečit oddělenou manipulaci a oddělené skladování rozmnožovacího materiálu bramboru¹⁾ od ostatních rostlin bramboru /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

c) musí k pěstování bramboru používat jen rozmnožovací materiál¹⁾ /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/.

5. Opatření v karanténním území po potvrzení výskytu původce hnědé hniloby

5.1. V karanténním území, které zahrnuje místo produkce označené za zamořené původcem hnědé hniloby podle § 5 odst. 1 písm. a) nebo povrchovou vodu označenou za zamořenou podle § 5 odst. 2 písm. b), rostlinolékařská správa po potvrzení výskytu původce hnědé hniloby nařídí podle § 7 odst. 1 písm. d), že uživatel pozemků v tomto území:

5.2.1. na pozemku označeném za zamořený původcem hnědé hniloby podle § 5 odst. 1 písm. a):

a) nesmí po dobu čtyř vegetačních období pěstovat hostitelské rostliny původce hnědé hniloby a jiné rostliny prokazatelně umožňující její přenos, tj. rostliny, u nichž se sklízí části, které jsou v bezprostředním kontaktu s půdou a na kterých po sklizni ulpívá zemina (např. rostliny určené k pěstování s kořeny, některé druhy rodu *Brassica*, bulevnaté, cibulové a hlíznaté květiny) /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/, a musí vyhledávat a likvidovat planě rostoucí hostitelské rostliny včetně plevelů /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/

nebo

b) musí tento pozemek po první tři vegetační období udržovat jako černý úhor nebo na něm pěstovat obiloviny, často sekané či intenzívně spásané trvalé pícniny či trávy na semeno /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/ a v dalších dvou letech na něm smí pěstovat jen nehostitelské rostliny, které neumožňují přežití či přenos původce hnědé hniloby, a musí se na něm v průběhu těchto pěti let vyhledávat a likvidovat planě rostoucí hostitelské rostliny včetně plevelů /§ 76 odst.1 písm. a) zákona/;

c) smí v případě režimu podle písm. a) pěstovat brambor nebo rajče v prvním vegetačním období, které následuje po splnění ustanovení uvedených pod písm. a), ale jen s podmínkou, že

- během předcházejících dvou let bylo na základě písemné žádosti uživatele pozemku rostlinolékařskou správou ověřeno, že pozemek byl shledán prostým planě rostoucích rostlin bramboru, rajčete a jiných hostitelských rostlin, včetně plevelů z čeledi lilkovitých, a v případě pěstování brambor

- bude k výsadbě použit rozmnožovací materiál¹⁾, a

- sklizeň bude určena pouze ke konzumním účelům nebo k průmyslovému zpracování, a následně smí pěstovat brambor nebo rajče až po uplynutí vhodné rotace plodin stanovené rostlinolékařskou správou a v případě pěstování brambor

- bude k výsadbě použit rozmnožovací materiál¹⁾, a

- sklizeň bude určena pouze ke konzumním účelům nebo k průmyslovému zpracování

/§ 76 odst.1 písm.a) bod 1. zákona/;

d) smí v případě režimu podle písm. b) pěstovat brambor nebo rajče v prvním vegetačním období, která následuje po splnění ustanovení uvedených pod písm. b), ale jen s podmínkou, že v případě pěstování brambor

- bude k výsadbě použit rozmnožovací materiál¹⁾, a

- sklizeň bude určena pouze ke konzumním účelům nebo k průmyslovému zpracování

/§ 76 odst.1 písm.a)bod 1. zákona/;

e) smí po splnění ostatních mimořádných rostlinolékařských opatření nařízených v karanténním území podle bodu 5 a po uplynutí odpovídajícího rotačního cyklu poprvé na tomto pozemku pěstovat brambor nebo jinou hostitelskou rostlinu původce hnědé hniloby, pouze použije-li rozmnožovací materiál¹⁾, který byl úředně uznán podle zvláštního zákona²⁾, a musí o zamýšleném prvním pěstování hostitelských rostlin na tomto pozemku informovat písemně rostlinolékařskou správu v takovém předstihu, aby bylo možno provést vymezení průzkum výskytu původce hnědé hniloby podle § 3 odst. 3.

f) nesmí být prováděna umělá závlaha po dobu pěti vegetačních období následujících po roce potvrzení výskytu původce hnědé hniloby */§ 76 odst.1 písm.a) bod 2. zákona/.*

5.2.2. na pozemku jiném než označeném za zamořený původcem hnědé hniloby podle § 5 odst. 1 písm. a):

a) nesmí ve vegetačním období následujícím po vegetačním období, v němž nebo z jehož sklizně byl zjištěn výskyt původce hnědé hniloby, pěstovat brambor nebo jiné hostitelské rostliny původce hnědé hniloby a musí cíleně vyhledávat a likvidovat planě rostoucí rostliny rajčete, bramboru a jiných hostitelských rostlin, včetně hostitelských druhů plevelů */§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/;*

b) smí k pěstování bramboru po dobu tří let následujících po roce potvrzení výskytu původce kroužkovitosti používat jen rozmnožovací materiál¹⁾ */§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/;*

c) musí ihned po zjištění výskytu až do doby prvního přípustného pěstování bramboru nebo rajčete na zamořených pozemcích každoročně čistit a dezinfikovat způsobem uvedeným v příloze č. 6 všechny stroje a skladovací zařízení používané při pěstování bramboru nebo rajčete */§ 76 odst. 1 písm. a) bod 2. zákona/;*

d) smí provádět závlahu jen se souhlasem a pod dohledem rostlinolékařské správy za předpokladu, že je vyloučeno jakékoliv zjiitelné nebezpečí šíření původce hnědé hniloby */§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/.*

5.3. nesmí vysazovat krájené hlízy bramboru nebo vysazovat hlízy bramboru pomocí napichovacích sazečů */§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;*

5.4. smí přemísťovat mimo toto území pouze partie bramboru, které byly úředním laboratorním testováním shledány prostými původce hnědé hniloby a partie označené rostlinolékařskou správou jako zamořené nebo pravděpodobně zamořené při splnění všech podmínek v nařízeném opatření */§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/.*

Sklizené hlízy bramboru balením upravené pro přímé dodání do místa spotřeby na území České republiky a určené k použití bez přebalování jako konzumní brambory lze přemísťovat mimo karanténní území ihned po odběru úředního vzorku, pokud byla příslušná partie prohlédnuta v době sklizně rostlinolékařskou správou na výskyt příznaků původce hnědé hniloby, včetně prohlídky řezu dužniny hlíz, s negativním výsledkem.

5.5. smí vyvážet rostliny bramboru vypěstované v tomto území do třetích zemí pouze pokud budou dodrženy úřední dovozní karanténní podmínky, stanovené orgánem rostlinolékařské péče dovážející země /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

5.6. nesmí používat zemědělské nářadí a mechanizační prostředky, používané při pěstování, sklizni, posklizňové úpravě, přepravě a skladování brambor, které přišly do kontaktu se zamořenými partiemi, po dobu jednoho roku od doby potvrzení výskytu původce hnědé hniloby mimo toto území bez řádné očisty a dezinfekce provedené způsobem uvedeným v příloze č. 6 /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/;

5.7. Při potvrzení původce hnědé hniloby v produkčních systémech, kde je možná úplná výměna pěstebního substrátu (např. ve sklenících šlechtitelů či při pěstování minihlízek, meristémů a pod.) uživatel pozemků:

a) nesmí pěstovat brambor nebo jiných hostitelských rostlin původce hnědé hniloby včetně rajčete, pokud nedojde pod kontrolou rostlinolékařské správy k eradikaci původce hnědé hniloby, včetně odstranění všech rostlin bramboru a rajčete, úplné výměně pěstebního substrátu a vyčištění a dezinfekce veškerých objektů, strojů a zařízení provedené způsobem uvedeným v příloze č. 6 /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/;

b) musí další pěstování bramboru založit po souhlasu rostlinolékařské správy z rozmnožovacího materiálu získaného z rostlin testovaných na výskyt původce hnědé hniloby s negativním výsledkem /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

c) smí uměle zavlažovat porosty bramboru nebo rajčete jen se souhlasem rostlinolékařské správy a umožní rostlinolékařské správě provádět úřední kontrolu zavlažovacích systémů v karanténním území /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/.

5.8. Zjištění planě rostoucích rostlin bramboru nebo rajčete v karanténním území podle bodu 5.2.2. písm. a) musí uživatel pozemků v tomto území ohlásit rostlinolékařské správě a před likvidací těchto rostlin musí umožnit jejich úřední testování na přítomnost původce hnědé hniloby. Při potvrzení výskytu původce hnědé hniloby při tomto testování se příslušný pozemek považuje za pozemek zamořený /§ 76 odst.1 písm. a) bod 2. zákona/.

5.9. Rostlinolékařská správa provádí namátkově dohled nad pozemky a objekty, ve kterých se pěstují či skladují rostliny bramboru a rajčete nebo se s těmito rostlinami nakládá, zejména nad prováděním očisty a dezinfekce mechanizace, která je využívána v porostech bramboru a rajčete a ve sklizených hlízách bramboru také v jiných místech produkce.

5.10. V bezpečnostní zóně, vymezené v místě produkce na základě pravděpodobného zamoření a nebo možného rozšíření původce hnědé hniloby podle § 5 odst. 1 písm. c), rostlinolékařská správa nařídí podle § 7 odst. 1 písm. d), že uživatel pozemků v tomto území musí po dobu tří úplných vegetačních období od potvrzení výskytu původce hnědé hniloby:

a) provádět závěrečnou očistu sklizňové techniky po ukončení sklizně a závěrečnou očistu a dezinfekci všech strojů, dopravních prostředků, třídících linek, obalů, palet a jiných předmětů použitých při posklizňové úpravě, naskladnění a vyskladnění, která musí být ukončena před zahájením nové pěstitelské sezóny /§ 76 odst.1 písm.a) bod 2. zákona/;

b) zabezpečit oddělenou manipulaci a oddělené skladování rozmnožovacího materiálu¹⁾ bramboru od ostatních rostlin bramboru /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/;

c) musí k pěstování bramboru používat jen rozmnožovací materiál¹⁾ /§ 76 odst.1 písm. a) bod 1. zákona/.

5.11. V karanténním území, vymezeném podle § 5 odst. 2 písm. c) na základě označení povrchové vody za zamořenou původcem hnědé hniloby nebo v bezpečnostní zóně vymezené podle § 5 odst. 2 písm. c) rostlinolékařská správa:

a) provádí průzkum výskytu původce hnědé hniloby, v případě potvrzení výskytu původce hnědé hniloby každoročně, a to vzorkováním a testováním povrchové vody a vhodných hostitelských rostlin z čeledi lilkovitých u dotýčných zdrojů vody způsobem stanoveným rostlinolékařskou správou;

b) provádí kontrolu zavlažovacích systémů a popř. stanoví takové podmínky umělého zavlažování hostitelských rostlin původce hnědé hniloby, aby se zabránilo jejímu šíření;

c) v případě zamoření odpadních vod provádí kontrolu zneškodňování zamořených odpadních vod z průmyslových zpracovatelských a balicích závodů, které manipulují s bramborami.

Požadavky na zneškodňování odpadů při průmyslovém zpracování partie hostitelské rostliny označené za zamořenou podle § 5 odst. 1 písm. a) nebo pravděpodobně zamořenou podle § 5 odst. 1 písm. b)

Způsob a místo zneškodňování odpadů při průmyslovém zpracování partie hostitelské rostliny musí být v souladu se zvláštním právním předpisem¹⁾ Rostlinolékařskou správou povolený podnik pro zpracování zamořené nebo pravděpodobně zamořené partie hostitelské rostliny pro průmyslové nebo potravinářské účely podle přílohy č. 4 odstavce 1 písm. c) a odstavce 2 písm. c) musí splňovat následující požadavky na zneškodňování odpadů, aby bylo vyloučeno riziko šíření původce kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby:

1. Pevný odpad ze zpracování hlíz brambor a rostlin rajčete

Vyhozené hlízy bramboru, bramborové slupky nebo plody rajčete a jiný pevný odpad vzniklý při zpracování hlíz bramboru a rostlin rajčete musí být odvezeny do řízené skládky odpadů a okamžitě převrstveny vhodným materiálem (zemina, suť apod.). Odpad musí být přivezen přímo na skládku a musí být zabalen tak, aby bylo během transportu vyloučeno nebezpečí vypadnutí odpadu z dopravního prostředku.

Pro hlízy napadené původcem hnědé hniloby mohou být přitom využity jen takové skládky, u nichž je vyloučeno nebezpečí průsaku na zemědělsky využívanou ornou půdu nebo do povrchových vod využívaných k zavlažování zemědělské půdy;

2. Odpadní vody při zpracování hlíz brambor a rostlin rajčete

Před zneškodněním je nutno odpadní vody, které obsahují na povrchu pevný plovoucí materiál, přefiltrovat nebo odvést do usazovací nádrže, aby byly tyto vody unášených materiálů zbaveny. Usazeniny musí být zneškodněny postupem uvedeným pod bodem 1.

Odpadní vody je pak nutno :

- před vypuštěním zahřát po dobu minimálně 30 minut při teplotě minimálně 70 °C nebo
- jinak zneškodnit způsobem předem schváleným rostlinolékařskou správou tak, aby bylo vyloučeno riziko, že odpad přijde do styku se zemědělskou půdou nebo vodními zdroji, které by mohly být používány k zavlažování zemědělské půdy; podrobnosti o takovém způsobu zneškodnění sdělí rostlinolékařská správa ostatním členským státům a Komisi.

¹⁾ Zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech, ve znění pozdějších předpisů.

Očista a dezinfekce objektů a předmětů zamořených nebo podezřelých ze zamoření původcem kroužkovitosti nebo původcem hnědé hniloby

1. Mechanická očista objektů a předmětů a likvidace nečistot a zbytků

Všechny pevné nečistoty, zbytky rostlin a hlíz se shromáždí (smetením, vysátím průmyslovým vysavačem, popřípadě vyfoukáním nepřístupných míst strojů a zařízení stlačeným vzduchem) a zavezou do skládky odpadu¹⁾. Pro bezpečnější likvidaci je vhodné materiál předem asanovat podle dále uvedeného postupu nebo jej před převrstvením zeminou prosypat chlorovým vápnem nebo páleným vápnem v množství 5 kg na 1 m³.

Způsob a místo likvidace musí být v souladu se zvláštním právním předpisem¹⁾ a musí je schválit rostlinolékařská správa.

2. Mytí a dezinfekce objektů a předmětů

Jakékoliv aplikaci dezinfekčního přípravku anebo prostředku musí předcházet důkladná mechanická očista dezinfikovaných objektů a předmětů podle bodu 1 této přílohy. Následně se objekty, stroje a zařízení omyjí tlakovou vodou se saponátem, opláchnou čistou vodou a nechají oschnout. Poté se dezinfikují dostupnými a k použití proti původci kroužkovitosti nebo původce hnědé hniloby rostlinolékařskou správou schválenými přípravky anebo dezinfekčními prostředky, použitými v souladu s etiketou anebo rostlinolékařskou správou schváleným technologickým postupem.

3. Asanace předmětů horkou vodou a párou

Provádí se máčením po dobu nejméně 30 minut při teplotě vody 65 °C nebo 15 minut při teplotě vody 80 °C.

K asanaci horkou párou se používají stabilní nebo přenosné vyvíječe páry, teplota tlakové páry musí dosahovat nejméně 80 °C při době expozice nejméně 30 minut. Při teplotě nad 100 °C lze dobu expozice snížit na 15 minut.

4. Dezinfekce zeminy a organických odpadů

Provádí se propařením při teplotě 120 °C nebo opakovaným propařením při teplotě 70 - 80 °C, nebo varem v tekuté fázi s vodou.

¹⁾ Zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech, ve znění pozdějších předpisů.