



¹Kokošková Blanka, ^{1,2}Marhulová Gabriela, ²Zouhar Miloslav

**TEST PATOGENITY
PRO SPÁLU RŮŽOVITÝCH ROSTLIN
TECHNIKOU EXPLANTÁTOVÝCH KULTUR**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA PRO PRAXI



¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

²Česká zemědělská univerzita v Praze

2009



Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i. 2009

ISBN: 978-80-7427-016-1

Metodika vznikla za finanční podpory MZe ČR a byla vypracována v rámci projektů MZE0002700603 - Systémy ochrany rostlin a skladovaných produktů před škodlivými organismy zajišťující zdravotní nezávadnost a kvalitu rostlinných produktů a neohrožující životní prostředí, MZE0002700604 - Patogeneze chorob rostlin a regulace patogenů v agroekosystémech a projektu Setrvalé zemědělství, kvalita zemědělské produkce, krajinné a přírodní zdroje MSM 6046070901.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 2009

ISBN: 978-80-7427-016-1

**TEST PATOGENITY
PRO SPÁLU RŮŽOVITÝCH ROSTLIN
TECHNIKOU EXPLANTÁTOVÝCH KULTUR**

¹Kokošková Blanka, ^{1,2}Marhulová Gabriela, ²Zouhar Miloslav

CERTIFIKOVANÁ METODIKA PRO PRAXI

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.
²Česká zemědělská univerzita v Praze

2009

Test patogenity technikou explantátových kultur pro *Erwinia amylovora*, původce spály růžovitých rostlin

Předmětem metodiky je inovovaný biologický test pro původce spály růžovitých rostlin, karanténní bakterii *E. amylovora*. Choroba, kterou tato bakterie způsobuje, zapříčiňuje značné ekonomické ztráty v porostech jaderovin a náchylných okrasných rostlin, především hlohů. Potvrzení identity bakterie v rostlinném vzorku se obvykle provádí testem patogenity na nezralých plůdcích náchylné odrůdy hrušně. Tento test lze provádět pouze určitou část roku, kdy jsou nezralé plody dostupné v přírodě nebo krátkou dobu poté, jsou-li skladovány při teplotách 4-8 °C. Test patogenity na explantátových kulturách náchylné odrůdy hrušně, které jsou dostupné kdykoliv v průběhu roku, je srovnatelný s testem patogenity na nezralých hruškách. Proto ho doporučujeme pro rutinní využití v diagnostických laboratořích Státní rostlinolékařské správy a dalších pracovištích.

Test of pathogenicity using a technique of plant tissue culture for *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight

The aim of this methodology is an innovated bioassay for the causal agent of fire blight, quarantine bacterium *E. amylovora*. The disease (fire blight) causes high economic losses in plantations of pome-fruit trees and susceptible ornamental plants, in particular in *Crataegus* sp. The confirmation of bacterium identity in plant tissue is usually carried out in bioassay on immature pear fruits of susceptible variety. The use of pear bioassay is limited because immature fruits are available in nature for just a short period of time and also can only be stored at 4-8 °C. An innovated biological test using a plant tissue culture of sensitive pome-tree variety without limitation to a year season is comparable with bioassay on immature pear fruits. That is why we recommend it for routine use in diagnostic laboratories of the Plant Administration Service and other workplaces.

Oponenti:

Ing. Jaroslav Horký, CSc.

Státní rostlinolékařská správa, Olomouc

Ing. Jana Víchová, Ph.D.

Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

Metodika byla schválena odborem vědy a výzkumu MZe pod č.j.:

Ministerstvo zemědělství doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

Obsah:

1) ÚVOD	9
II) CÍL METODIKY.....	12
III) VLASTNÍ POPIS METODIKY.....	13
1. MATERIÁL.....	13
2. KULTIVAČNÍ PODMÍNKY	13
3. METODA INOKULACE EXPLANTÁTOVÝCH KULTUR.....	14
4. PROVEDENÍ TESTU PATOGENITY NA EXPLANTÁTOVÝCH KULTURÁCH.....	15
5. HODNOCENÍ TESTU PATOGENITY NA EXPLANTÁTOVÝCH KULTURÁCH.....	16
6. MATEMATICKÉ ZPRACOVÁNÍ.....	17
7. SHRNUÍ NA ZÁKLADĚ VLASTNÍCH VÝSLEDKŮ	17
IV) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	21
V) POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY.....	21
VI) SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	22
VII) SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORŮ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH VYPRACOVÁNÍ METODIKY	24
VIII) DODATKY	25

1) ÚVOD

Spála růžovitých rostlin, způsobená fytokaranténní bakterií *Erwinia amylovora* [(Burrill) Winslow et al. 1920], je jednou z nejvýznamnějších bakteriálních chorob. Rozšířena je v mnoha státech světa, včetně České republiky (Kúdela 1990). Spála podléhá přísným karanténním opatřením (EPPO/CABI, 1997).

Infikovány bývají náchylné druhy a odrůdy užitkových i okrasných dřevin čeledi *Rosaceae*, jako jsou jabloň, hrušeň, kdouloň a některé okrasné nebo divoce rostoucí keře a stromy, především hloh, skalník, jeřáb aj. (Van der Zwet, Beer 1991; Sobiczewski et al. 1997; Vanneste 2000).

Prokázání spálové bakterie v rostlinných vzorcích, ať už infikovaných nebo zdánlivě zdravých nemusí být vždy jednoduchou záležitostí. Diagnostický protokol EU pro *E. amylovora* zahrnuje kromě testů imunochemických, biochemických a molekulárních také biologický test závazně používaný pro potvrzení nebo vyvrácení identity patogena (Anonymous 2004; Kokošková et al. 2007).

Pro testy patogenity je možné zvolit různé typy testů. V laboratorních i skleníkových podmínkách se často používá inokulace odříznutých růstových výhonů semenáčků náchylných druhů jaderovin i hlohů, a to nejčastěji ve fázi prodlužovacího růstu výhonů (Hunter a Bonn 1998; Korba et al., 1998; Vanneste 2000). Testy jsou vhodné pro získání orientačních informací o virulenci kmenů patogena a rezistenci odrůd a novošlechtění proti spále u mnoha druhů rostlin čeledi růžovitých (Van der Zwet, Beer 1991; Sobiczewski et al. 1997; Korba et al., 2002; Korba a Kúdela, 2004).

Obvykle se test patogenity provádí na nezralých plodech náchylných odrůd hrušní, případně jabloní (Anonymous 2004). Vychází se z předpokladu, že na pletivu nezralých hrušek náchylné odrůdy můžeme dobře pozorovat projev napadení v podobě slizových kapek. Bohužel, nezralé hrušky jsou

k dispozici pouze krátkou část roku i v případě vhodného skladování (Kokošková 1999).

Postup je následující: sklídí se nezralé plody náchylné odrůdy (např. Konference) v průměrné velikosti 2,5 až 3 cm a uchovávají se při teplotách kolem 5 °C. Po povrchové dezinfekci plodu se do jamek vyhloubených v pletivu přenese suspenze spálové bakterie. Ošetřené plody se inkubují při 28 °C a vysoké relativní vzdušné vlhkosti. V průběhu týdne se hodnotí intenzita tvorby slizových kapek na plodech. Ta je přímo úměrná napadení spálovou bakterií. Do testu se zpravidla zařazuje kontrola se streptomycinem (0,01 až 0,02 %), neboť je jedním z nejúčinnějších preparátů používaných proti spále (Isenbeck 1983; Klement et al. 1990).

Tímto testem je možné zjišťovat také inhibiční aktivitu potenciálních antagonistů k patogenu nebo testovat účinnost chemických preparátů (Isenbeck 1983; Nachtigal a Ficke 1989; Klement et al. 1990; Kokošková 1999). Kromě testu na nezralých hruškách se k ověření potenciální účinnosti preparátů i antagonistů používají též semenáčky jádrowin. Uvádí se, že výsledky hruškového testu jsou v dostatečné korelaci s výsledky polních testů (Mc Intyre et al. 1975; Norelli a Gilpatrick 1982).

Nabízí se i další způsob testování, a to biologický test na principu explantátových kultur, který by byl efektivnější než test na nezralých hruškách a mohl by být prováděn nezávisle na ročním období.

Technika explantátových kultur byla použita nejprve k zjišťování virulence kmenů *E. amylovora*, a to v 80. letech minulého století v USA (Norelli et al. 1987). Testy se prováděly na odrůdě jabloně „Novole“ napěstované v laboratorních podmínkách.

Vrcholky zelených výhonků byly namnoženy, zakořeněny a inokulovány *in vitro* nůžkami ponořenými v suspenzi spálové bakterie, kterými byly odstřiženy jeden nebo více vrcholových

lístků. Čtrnáct dní poté se na rostlinkách odrůdy Novole inokulovaných virulentním kmenem *E. amylovora* ukázaly charakteristické spálové příznaky včetně systémových nekrotizací a vodnatění rostlinných pletiv (Norelli et al. 1987).

Po vyhodnocení testovaných kmenů *E. amylovora* na virulenci vůči odrůdě Novole se zjistila vysoká korelace mezi údaji získanými z laboratorních a skleníkových testů. Pokud jde o projev příznaků, i když nebyly zjištěny významné rozdíly v testech, nárůst bakterie *E. amylovora* se v obou případech výrazně lišil. Ve skleníkových testech se populace patogena významně snížily ve srovnání s testy *in vitro* na explantátových kulturách.

Test *in vitro* technikou explantátových kultur byl použit pro prověření virulence téměř 150 izolátů *E. amylovora* z různých geografických oblastí v Severní Americe či Evropě. Technika explantátových kultur byla použita i k stanovení rezistence odrůd jabloně a hrušně (Viseur et al. 1987). Výsledky laboratorních a polních testů byly v dobré korelaci.

II) CÍL METODIKY

Cílem metodiky je funkční inovovaný biologický test pro potvrzení identity bakterie *Erwinia amylovora*, původce spály růžovitých rostlin.

III) VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Materiál

Pro testy na explantátových kulturách je zapotřebí vybrat některou z odrůd náchylných k původci spály. Doporučujeme používat např. odrůdy Clappova máslovka či Konference.

2. Kultivační podmínky

Kontrolní sbírkové kmeny *Erwinia amylovora* by měly pocházet z české (CCM= Česká sbírka mikroorganismů, Brno) nebo zahraničních sbírek (viz dodatek č. 1). Mohou se kultivovat na masopeptonovém agaru, King B médiu nebo živném médiu s levanem (viz dodatek č. 2). V testech se používají jako jednodenní kultury.

Prostředí, kde probíhají testy na explantátových kulturách, musí být naprosto sterilní. Explantátové rostlinky se pěstují ve sterilních skleničkách na speciálním kultivačním médiu (viz dodatek č. 3). Používají se skleničky o výšce 7,0 cm a průměru 5,5 cm uzavíratelné umělohmotným víčkem (Sigma Aldrich kat. číslo V8630-100EA a B8648-100EA).

Po zchladnutí skleniček s médiem je možné pasážovat rostlinky. Pro kontrolu sterility je vhodnější ponechat skleničky s médiem na laboratorním stole 1-2 dny a poté kontaminované skleničky vyřadit. Pro pasážování se používají jak vrcholové části rostlin, tak i jednodálňní segmenty. Nevětvené rostliny se nastříhají na malé části, z nichž každá část nese alespoň jeden list s jedním axiálním pupenem. Po vložení části rostlinky dovnitř se sklenička uzavře víčkem a ováže parafilmem.

Skleničky s explantátovými kulturami jsou kultivovány v termostatu při teplotě 25-26°C a při světelném režimu 16/8 (den/noc). Po čtyřtýdenní kultivaci jsou explantáty zpravidla

dorostlé do požadované délky a vhodné pro inokulaci. Nejmenší explantáty, které jsou ještě použitelné pro inokulaci, dosahují přibližně délky 4 cm. Menší rostlinky nejsou vhodné, neboť jen malá část rostlinky zůstává k dispozici pro hodnocení. Větší rostlinky se před hodnocením zkracují nůžkami tak, aby se hodnotily stále stejné části rostlinek. Rostlinky, které nenarostly do stanovené velikosti nebo byly kontaminované, se z pokusu vyřadí. Proto je vždy důležité při pasážování počítat s určitým procentem neúspěšně napěstovaných explantátových kultur.

3. Metoda inokulace explantátových kultur

Používá se technika odstřížení vzrostného vrcholu a nanesení inokula pipetou do místa stříhu. Inokulují se explantáty narostlé přibližně v délce 5 cm. Odstřihne se asi 1 cm vzrostného vrcholu. Všechny odstřížené části se ze skleničky odstraní, aby nekontaminovaly prostředí. Poté se na místo stříhu nanese pipetou kapička inokula připraveného v sterilní destilované vodě v dávce asi 3-4 μl a sklenička se uzavře. Se skleničkou se musí manipulovat opatrně, aby kapka inokula neskápla na kultivační médium nebo na neporaněné části rostlinky, kde by se infekce projevila později. Aplikuje se takové množství bakteriální suspenze, které se při inokulaci udrží na vzrostném vrcholu rostlinky a nestéká dolů po rostlině.

Nejvyšší koncentrace bakteriální suspenze (ca 10^8 cfu/ml), která odpovídá naměřené optické hustotě (OD) $\sim 0,1$ při 620 nm, se měří na spektrofotometru, ostatní koncentrace se připraví desetinným ředěním. Na každý testovaný izolát v odpovídající koncentraci připadá 6 skleniček, z toho 2 jsou použity jako kontrolní, u nichž se pipetou místo bakteriální suspenze nanese sterilní voda. Skleničky s explantátovými kulturami se kultivují při 26°C.

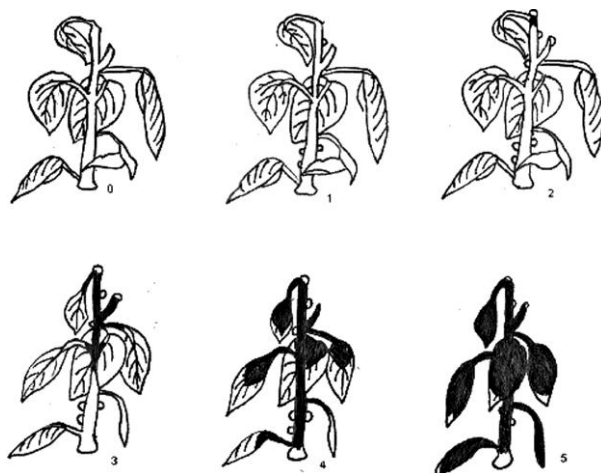
Inokulaci rostlin je vhodné provádět tak, aby mohly být rostlinky hodnoceny od třetího do 7 dne po inokulaci. Testované kmeny stejně jako pozitivní kontrola se používají jako jednodenní kultury napěstované na vhodném živném médiu, např. masopeptonovém. Jako kontrolní kmen spálové bakterie doporučujeme např. kmen *CCM 1114* z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity v Brně. Bakteriální kultury se kultivují při stejné teplotě jako explantáty.

4. Provedení testu patogenity na explantátových kulturách

Testujeme-li neznámé kmeny, používáme přibližně koncentraci 10^5 buněk/ml, ověřujeme-li virulenci testovaných kmenů, použijeme zpravidla koncentraci 10^6 buněk/ml.

Hodnocení testu patogenity na explantátových kulturách se provádí podle šestibodové stupnice. Příznaky napadení se hodnotí podle počtu bakteriálních kapek na stonku a charakteristického zbarvení na listech a také podle velikosti nekrotické plochy na povrchu listu. Příznaky napadení se objeví zpravidla již 3. den po inokulaci. Hodnocení probíhá 5 následujících po sobě jdoucích dnů, vždy ve stejnou denní dobu.

5. Hodnocení testu patogenity na explantátových kulturách



Obrázek 1: Stupnice napadení explantátových kultur.

Tabulka 1: Stupnice hodnocení příznaků.

Stupeň napadení	Příznaky napadení	Plocha poškození (%)
0	Bez příznaků	0
1	Drobné bílé kapky na stonku nebo v místě stříhu	5
2	Drobné bílé kapky na stonku a bílá kapka v místě stříhu, stonek v místě stříhu začíná nekrotizovat	25
3	Předchozí příznaky, stonek z poloviny nekrotický,	50
4	kapka v místě stříhu může být oranžová Předchozí příznaky, celý stonek nekrotický,	75
5	řapík listu nekrotický, oranžové kapky na nekrotických místech Odumřelá rostlina	100

6. Matematické zpracování

Výpočet: Koeficient napadení.

Součástí vizuálního hodnocení může být koeficient napadení (KN), který se používá, pokud hodnotíme stupeň virulence testovaných kmenů.

$$KN = \frac{0.n^0 + 1.n^1 + 2.n^2 + 3.n^3 + 4.n^4 + 5.n^5}{n}$$

n – celkový počet rostlin

$n^0, n^1, n^2, n^3, n^4, n^5$ – počet rostlin v jednotlivých stupních napadení

0, 1, 2, 3, 4, 5 - stupeň napadení

Data by měla být zpracována statisticky a to analýzou variance následované Tukeyho testem. Pro tento účel se autorskému týmu osvědčil program STATISTIKA 8.0.

7. Shrnutí na základě vlastních výsledků

Inovace biologického testu patogenity pro spálu růžovitých rostlin technikou explantátových kultur zahrnovala ověřování různých inokulačních technik, počtu rostlin na vzorek, množství inokula pro jednu aplikaci, rozsahu koncentrací inokula a hodnocení příznaků napadení, aby bylo možné zvolit optimální parametry.

Ze tří vybraných inokulačních technik byly na explantátových kulturách testovány dvě. Zmačknutí vzrostného vrcholu pinzetou (obrázek 2 v pravo) a nanesení inokula pipetou do poraněné části se neosvědčilo z důvodu možné záměny mechanicky poškozeného rostlinného pletiva

s příznaky choroby. Technika spočívající v odstřížení vzrostného vrcholu a nanesení inokula pipetou na místo stříhu byla pro testy na explantátových kulturách tou nejvhodnější (obrázek 2 vlevo).

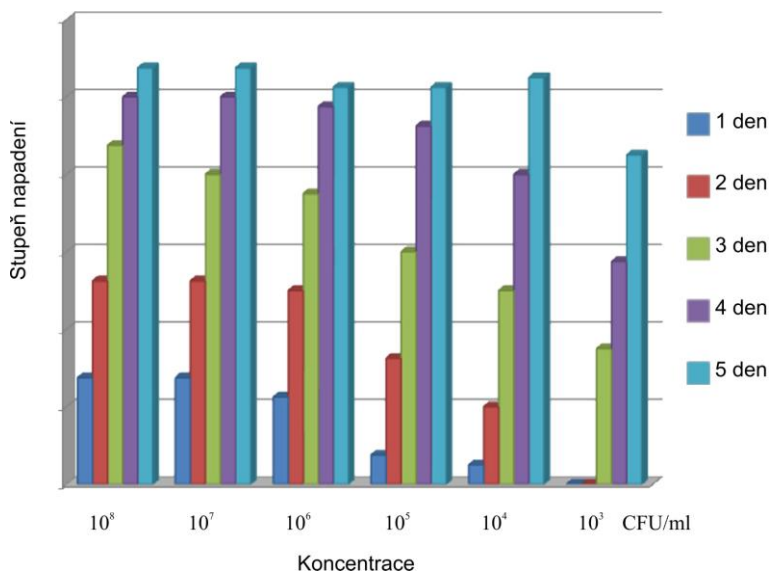


Obrázek 2: Porovnání dvou metod inokulace (vlevo odstřížení vzrostného vrcholu, vpravo zmáčknutí pinzetou).

V případě snahy snížit finanční náklady na test je možné počet rostlin na vzorek snížit ze 6 včetně dvou negativních kontrol na 4 včetně jedné negativní kontroly. Optimální množství inokula pro jednu aplikaci vychází přibližně na 3-4 μl .

Optimální koncentrace inokula pro explantátové kultury byla ověřována v rozsahu šesti koncentrací, a to od 10^8 do 10^3 buněk/ml na virulentním sbírkovém kmenu *E. amylovora* RICP 8/95. Hustota inokula 10^5 buněk/ml představovala nejnížší koncentraci, při níž byly příznaky napadení zřetelně rozeznatelné již třetí den po inokulaci.

V testu na explantátových kulturách doporučujeme aplikovat inokulum v koncentraci 10^6 nebo 10^5 buněk/ml. Pro prokázání přítomnosti spálové bakterie v podezřelém vzorku rostliny doporučujeme raději koncentraci vyšší (10^6 buněk/ml),

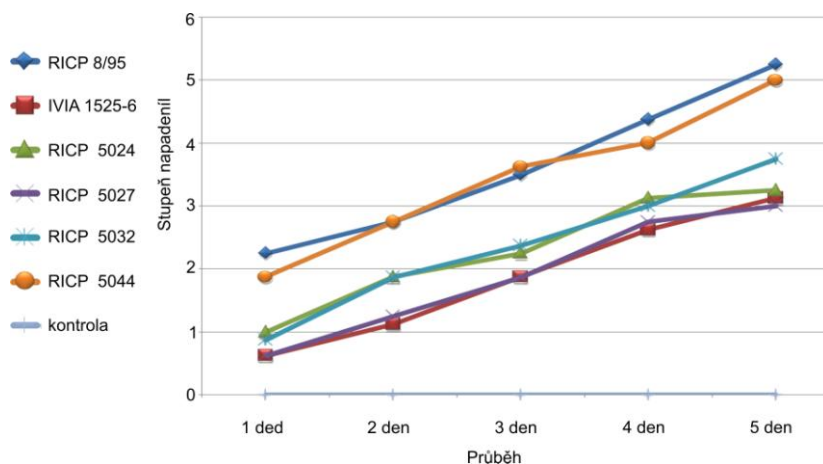


Graf 1: Průběh infekce na explantátových kulturách.

aby byly podchyceny i velmi slabě virulentní kmeny *E. amylovora*. Pro stanovení hladiny virulence testovaných kmenů pak raději koncentraci nižší (10^5 buněk/ml), neboť se snadněji rozliší příznaky napadení jednotlivými kmeny na infikovaných rostlinách explantátových kultur. Vyšší koncentrace, a to 10^7 a 10^8 cfu/ml se ukázaly příliš vysoké pro rozlišení hladiny virulence kmenů *E. amylovora*.

Na souboru různě virulentních kmenů *E. amylovora* byla ověřena srovnatelnost obou testů patogenity, testu na nezralých hruškách a testu na explantátových kulturách. Do testů byly zařazeny kmeny spálové bakterie vybrané ze sbírky bakterií a

protilátek oddělení bakteriologie, VÚRV, v. v. i. Po vyhodnocení výsledků obou testů se zjistila shoda u 4 ze 6 testovaných kmenů, a to u obou silně virulentních, jednoho středně a jednoho slabě virulentního kmene. I slabě virulentní kmeny byly podchyceny bez ohledu na typ testu a tím byla spolehlivost obou testů prokázána. Test na explantátových



Graf 2: Test patogenity na explantátových kulturách.

kulturách může nahradit test na nezralých hruškách, je-li použita náchylná odrůda.

Test patogenity na explantátových kulturách doporučujeme pro rutinní využití v diagnostických laboratořích Státní rostlinolékařské správy a dalších diagnostických pracovištích, která se zabývají problematikou původce spály růžovitých rostlin. Test může být použit jak pro potvrzení či vyvrácení identity patogena, tak pro zjišťování hladiny virulence izolátů *E. amylovora*. Test patogenity na explantátových kulturách je však ve srovnání s hruškovým testem pracnější, materiálově, časově a finančně nákladnější.

IV) SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Inovovaný biologický test pro spálu růžovitých rostlin představuje zcela novou techniku, která byla vypracována na základě cílené žádosti odboru diagnostiky Státní rostlinolékařské správy. Laboratoře SRS zaměřené na fytozabíjecí bakterie, jejich detekci, determinaci a testy patogenity již řadu let postrádali další techniku pro diagnostiku původce spály růžovitých rostlin. Test umožňuje potvrzení či vyvrácení identity bakterie *E. amylovora* izolované ze vzorků rostlin podezřelých z napadení původcem spály. Výhodou testu na explantátových kulturách je jeho neomezené použití po celý rok na rozdíl od testu patogenity na nezralých hruškách při zachování srovnatelnosti obou testů. Tato metodika je vzorovým příkladem spolupráce prováděcích orgánů státní správy a odborů výzkumu, které na základě požadavku SRS operativně vytvořil metodiku, která bude uplatněná v praxi.

V) POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena orgánům státní správy, šlechtitelským organizacím a zemědělské praxi. Předmětem uplatňované metodiky je inovovaný test patogenity pro *E. amylovora*, původce spály růžovitých rostlin, který je určen především pro rutinní využití v diagnostických laboratořích Státní rostlinolékařské správy.

VI) SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- ANONYMOUS (2004): SMT project SMT-4-CT98-2252. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants. Diagnosis of *Erwinia amylovora*. Published at www.csl.gov.uk/special/Interest/Erwinia.pdf
- EPPO/CABI (1997): Quarantine pests for Europe. Second edition (Ed. by Smith J.M., Mc Namara D.G., Scott P.R., Holderness, M.): 1001-1007. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK.
- ISENBECK M. (1983): Entwicklung einer biologischen Pflanzenschutzmethode gegen den Feuerbranderreger „*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.“ an Ziergehölzen. *Dissertation*, Christian-Albrechts – Univ. Kiel: 158p.
- HUNTER D.M., BONN W.G. (1998): Selection for fire blight resistance in pear seedling populations using field and greenhouse screening with virulent strains *Erwinia amylovora*. *ISHS Acta Hort.* 489: VIII Internat. Workshop on Fire Blight: 209-211.
- KLEMENT L., RUDOLPH K., SANDS D. S. (1990): Part I. Identification/Diagnosis Chapter I. 5. Inoculation of plant tissues. *Methods in Phytobacteriology*: 101-102. Akadémiai Kiadó, Budapest 1990.
- KOKOŠKOVÁ B. (1999): Možnosti chemické a biologické ochrany proti spále růžovitých rostlin. *Agro. č.* 10: 6-9.
- KOKOŠKOVÁ B., MRÁZ I., HÝBLOVÁ J. (2007): Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for reliable detection of *Erwinia amylovora*. *Folia Microbiol.* 52 (2): 175-182.
- KORBA J., KŮDELA V. (2004): Evaluation of the fire blight susceptibility of pear genotypes following inoculation , In: *Proceedings of the "XVI. Slovak and Czech Plant Protection Conference"* organised at Slovak Agricultural University in Nitra, Slovakia, (*Acta fytotechnica et zootechnica* 7 - special number): 144-146.
- KORBA J., PATÁKOVÁ S., KŮDELA V. (1998): Rezistence hlohů ke spále růžovitých rostlin. *Plant Protect. Sci.* 34: 53-58.
- KORBA J., PATÁKOVÁ S., KŮDELA V. (2002): Effect of rootstock clones on fire blight susceptibility in scion apple cultivars In:

- Proceedings (Second Part) from "6th Conference of European Foundation for Plant Pathology", Prague, Czech Republic, 8-14 September 2002 (Plant Protect. Sci. 38 (Special Issue 2): 552-554.
- KŮDELA V. (1990): Spála růžovitých rostlin (Fire Blight). Výstavnictví zemědělství a výživy České Budějovice: 163s.
- MC INTYRE J., KUC J., WILLIAMS E. B. (1975): Protection of Bartlett pear against fire blight with desoxyribonucleic acid from virulent *Erwinia amylovora*. Physiol. Plant Pathol. 7. 153-170.
- NACHTIGALL M., FICKE W. (1989): Methoden der Prüfung bakterizider Substanzen *in vivo* an Augewählten Wirt-Pathogen-Kombinationen. Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz. 25: 497-505.
- NORELLI J. L., GILPATRICK J. D. (1982): Techniques for screening chemicals for fire blight control. Plant Dis. 66: 1162-1165.
- NORELLI J. L., ALDWINCKLE H. S., BEER S. V. (1987): An assay for the virulence of *Erwinia amylovora* using malus tissue culture. ISHS Acta Hort. 217: 283.
- SOBICZEWSKI P., DECKERS T., PULAWSKA J. (1997): Fire Blight (*Erwinia amylovora*). Some aspects of epidemiology and control. Res. Inst. of Pomology and Floriculture, Skierniewice, Poland, 71p.
- VAN DER ZWET, T., BEER, S. V. (1991): Fire blight - Its Nature, Prevention, and Control. A Practical Guide to Integrated Disease Management. Agricultural Information Bulletin no. 631. US Department of Agriculture, Washington (DC).
- VANNESTE J. (2000): Fire blight, the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. CABI Wallingford, UK.
- VISEUR J., TAPIA Y FIGUEROA M. (1987): *In vitro* co-culture as a tool for the evaluation of fire blight resistance in pears and apples. ISHS Acta Hort. 217: IV Internat. Workshop on Fire Blight: 273-282.
- Obrázek na deskách byl získán z veřejných webových stránek <http://commons.wikimedia.org/wiki/User:Ninjatacoshell>

VII) SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORŮ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH VYPRACOVÁNÍ METODIKY

- KOKOŠKOVÁ B., MRÁZ I., FOUSEK J. (2005): Limitations in reliability of fire blight (*Erwinia amylovora*) diagnostic methods. *Phytopathologica Polonica*, 35, 69-72.
- KOKOŠKOVÁ B., MRÁZ I. (2005): Reliability of diagnostic techniques for *Erwinia amylovora*, the causative agent of fire blight disease. *Folia Microbiologica* 50 (3), 217-221.
- KOKOŠKOVÁ B., MARHULOVÁ G., ZOUHAR M. (2009): An innovated test of pathogenicity for *Erwinia amylovora*, the causative agent of fire blight. In: Šafránková I., Šefrová H. (eds.) XVIII. Czech and Slovak plant protection conference. Sborník abstraktů. MZLU v Brně, 2.-4. září 2009: 49.
- KOKOŠKOVÁ B., MARHULOVÁ G., ZOUHAR M.: Využití explantátových kultur k testu patogenity pro spálu růžovitých rostlin (v přípravě)
- KOKOŠKOVÁ B., MARHULOVÁ G., ZOUHAR M.: Comparison of the two biological tests for *Erwinia amylovora* diagnosis (v přípravě)

VIII) DODATKY

Dodatek č. 1

Sbírkové kmeny

Jako pozitivní kontroly do testů jsou doporučovány sbírkové kmeny *E. amylovora*, např. kmen NCPPB683 (= CCM 1114^T) ze sbírky National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB), Central Science Laboratory, York, Velká Británie a kmen CFBP 1430 ze sbírky Collection Francaise de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA Station Phytobactériologie, Angers, Francie.

Dodatek č. 2:

Živná média pro kultivaci *E. amylovora*

King B médium (King et al. 1954): pepton N° 3 20 g; glycerol 10 mL; K₂HPO₄ 1,5 g; MgSO₄ · 7 H₂O; agar 15 g; destilovaná voda do 1 L. Upravit pH na 7,0 - 7,2. Sterilizovat v autoklávu 15 minut při 120 °C.

Médium s levanem: kvasničný extrakt 2 g; bakteopepton 5 g; NaCl 5 g, sacharóza 50 g; agar 20 g; destilovaná voda do 1 L; Upravit pH na 7,0 - 7,2. Sterilizovat v autoklávu 15 minut při 120 °C.

MPA (masopeptonový) agar: živný agar č. 2 40 g; glukóza 7 g; agar 22 g; destilovaná voda do 1 L; Upravit pH na 7,0 - 7,2. Sterilizovat v autoklávu 15 minut při 120 °C.

Dodatek č. 3

Živné médium pro explantáty

agar – 3 g/0,5 L; sacharosa – 15 g/0,5 L; Murashige skoog medium (Duchefa) – 2,2026 g/0,5 L; BAP – 5 ml/0,5 L. Upravit pH na 5,5 - 5,8. Do každé skleničky nalít 20 ml kultivačního média. Sterilizovat v autoklávu 15 minut při 120 °C.

Autoři:

Ing. Blanka Kokošková, CSc. ¹

Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D. ²

Ing. Gabriela Marhulová ^{1,2}

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.,

Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

²Česká zemědělská univerzita v Praze,

Kamýcká 129, 165 21, Praha 6 Suchdol

Název:

Test patogenity pro spálu růžovitých rostlin technikou
explantátových kultur

Vydal:

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507,
161 06 Praha 6 – Ruzyně

Tisk a vazba:

Powerprint, Kamýcká 1219, Praha 6 – Suchdol, 165 21.

Vyšlo v roce 2009

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: bkokoskova@vurv.cz; zouhar@af.czu.cz

Autor fotografií: B. Kokošková, G. Marhulová

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 2009

