

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Institut celoživotního vzdělávání**

**Výskyt bakterie *Ralstonia solanacearum* v povrchových  
vodách České republiky**

Závěrečná práce

Vedoucí práce:

Ing. Jana Víchová, Ph.D.

Vypracovala:

Ing. Lenka Wasserbauerová

Brno 2017







## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych touto cestou poděkovat vedoucí své závěrečné práce ing. Janě Víchové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky.

## **ABSTRAKT**

### **Výskyt bakterie *Ralstonia solanacearum* v povrchových vodách České republiky**

Cílem práce byl průzkum a vyhodnocení výskytu fytopatogenní bakterie *Ralstonia solanacearum*, původce bakteriální hnědé hniloby brambor, v povrchových vodách České republiky. Sledování probíhalo na řekách, Labe, Dyje a Morava, a na jejich hlavních přítocích v průběhu sedmi let. Jmenované řeky jsou nejčastěji využívány k závlaze porostů brambor a jiných lilkovitých rostlin. V současné době v České republice jsou zamořené tři vodní toky a postupně dochází v těchto vodách ke zvyšování koncentrace bakteriálních buněk. Zároveň s průzkumem povrchových vod byly odebírány na zamořených lokalitách i vzorky hostitelských rostlin, kde se potvrdil výskyt bakterie u jednoho rostlinného druhu- lilku potměchuti (*Solanum dulcamara*).

Klíčová slova: brambor, *Ralstonia solanacearum*, karanténní organismus, závlahové vody

## **ABSTRACT**

### **The occurrence of bacterium *Ralstonia solanacearum* in surface waters of the Czech Republic**

The aim of my work was survey and evaluation of occurrence phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*, causal agent of brown rot, in surface water of the Czech Republic. The survey was on the rivers Labe, Dyje, Morava and their main tributaries during 7 years. The rivers above mentioned are often used for irrigation of potatoes and other solanaceous plants. At present there are contaminated three watercourses in the Czech Republic and the concentration of bacterial cells gradually increases in these waters. At the same time with the surface water survey, samples of host plants were collected in infested localities and the presence of bacterium *Ralstonia solanacearum* was confirmed in one plant species „woody nightshade“ *Solanum dulcamara*.

Key words: potato, *Ralstonia solanacearum*, quarantine organism, irrigation water

## OBSAH

1 ÚVOD.....	9
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	10
2.1 Rostlinolékařská bakteriologie .....	10
2.1.1 Pohled do historie.....	10
2.1.2 Vývoj v českých zemích .....	10
2.2 Fytopatogenní bakterie .....	11
2.2.1 Prokaryota .....	11
2.2.2 Bakterie .....	11
2.2.2.1 Tvar a velikost bakteriální buňky .....	11
2.2.2.2 Stavba bakteriální buňky .....	12
2.2.2.3 Výživa a příjem živin.....	13
2.2.2.4 Růst a množení bakterií .....	13
2.2.2.5 Vliv vnějšího prostředí na životní cyklus bakterií .....	14
2.2.2.6 Význam bakterií pro člověka a přírodu .....	15
2.2.2.7 Klasifikace fytopatogenních bakterií .....	15
2.3 Rod <i>Ralstonia</i> .....	17
2.3.1. Charakteristika druhu <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	17
2.3.2 Epidemiologie bakteriálního vadnutí .....	19
2.3.3 Hostitelské rostliny.....	20
2.3.4 Výskyty bakterie <i>Ralstonia solanacearum</i> v závlahových vodách v Evropě. 20	
2.3.4.1 Švédsko.....	20
2.3.4.2 Holandsko .....	21
2.3.4.3 Anglie.....	22
2.3.4.4 Španělsko .....	23
2.3.5 Průzkum výskytu bakterie <i>Ralstonia solanacearum</i> v České republice .....	23
3 CÍL PRÁCE .....	24
4 MATERIÁL A METODY .....	25
4.1 Metodika odběru závlahových vod .....	26
4.2 Metodika detekce a identifikace bakterie <i>Ralstonia solanacearum</i> v závlahových vodách.....	26
4.2.1 Koncentrace patogenu .....	27
4.2.2 Selektivní izolace patogenu (kultivační test) .....	28

4.2.3	Identifikační test.....	29
4.2.4	Test patogenity .....	29
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	30
5.1	Výsledky průzkumu na řece Labi a jejích hlavních přítocích .....	31
5.2	Výsledky průzkumu na řece Moravě.....	34
5.3	Výsledky průzkumu na řece Dyji a jejích hlavních přítocích .....	35
5.3.1	Vyhodnocení situace na Dyji a jejích přítocích do roku 2016.....	36
5.3.2	Vyhodnocení průzkumu na Dyji a jejích přítocích v roce 2016 .....	37
6	ZÁVĚR .....	40
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	41



# 1 ÚVOD

Povrchová voda je v současnosti v České republice hlavním zdrojem využívaným v zemědělství k závlahám. Závlahy jsou vybudovány na celkové ploše asi 140 000 ha. Jsou situovány především do zemědělsky nejproduktivnějších ale zároveň srážkově nevyrovnaných oblastí jako jsou jižní Morava a Polabí. Využívány jsou především vody z velkých toků jako Labe a Dyje (Spitz et al., 1998).

V letech 2010–2016, kdy probíhalo sledování výskytu bakterie *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi et al. 1996, původce bakteriální hnědé hniloby, v povrchových vodách v České republice, se pěstovaly rané brambory v průměru na ploše 1523 ha. U této rostlinné komodity se množství závlahové vody v závislosti na aktuálních srážkách pohybuje v rozmezí mezi 70–110 mm/m<sup>2</sup> (Králová, 2005).

Donedávna se tvrdilo, že původce bakteriální hnědé hniloby bramboru, se vzhledem ke svým vysokým teplotním nárokům nemůže v našich podmínkách udržet. Toto tvrzení však již dnes neplatí, neboť tady máme rasu 3, která má daleko nižší teplotní optimum (okolo 27°C) a od poloviny devadesátých let minulého století se již vyskytuje v řadě evropských zemí (Olsson, 1976). Kromě bramboru a rajčete může příležitostně napadat i papriku, lilek vejcoplodý a některé lilkovité plevele.

Přítomnost fytopatogenní bakterie *Ralstonia solanacearum* v povrchových vodách by se tak mohla stát významným zdrojem jejího šíření na produkční plochy raných brambor. Pro úspěšné potlačení šíření patogena je důležité nalézt potenciální zdroje infekce a přijmout taková opatření, která by vedla k postupné dekontaminaci vodních toků od původce hnědé hniloby bramboru a tak se omezilo rozšiřování této bakterie závlahovými systémy.

## **2 LITERÁRNÍ PŘEHLED**

### **2.1 Rostlinolékařská bakteriologie**

#### **2.1.1 Pohled do historie**

Když americký botanik a fytopatolog Thomas Jonathan Burrill podal v letech 1879–1882 první důkaz o bakteriálních příčinách choroby rostlin (označil původce spály růžovitých), vyvolal u řady významných evropských vědců pochybnosti. Tyto spory vyvrcholily v letech 1893–1899, kdy další Američan Erwin Frank Smith předložil nezpochybnitelné, experimentálně doložitelné důkazy o existenci a významu bakteriálních chorob rostlin (Kůdela et al., 2002).

V první polovině dvacátého století dochází k nahromadění poznatků o existenci fytopatogenních bakterií, avšak teprve rozvoj molekulární biologie v šedesátých letech dvacátého století umožnil charakterizovat bakterie i genotypově (Kůdela et al., 2002).

#### **2.1.2 Vývoj v českých zemích**

Zakladatelem rostlinolékařské bakteriologie v českých zemích byl na přelomu devatenáctého a dvacátého století Julius Stoklasa, profesor Českého vysokého učení technického v Praze. Zabýval se problematikou spály vzcházející cukrovky a jako první provedl izolaci a identifikaci fytopatogenní bakterie. Na přelomu století vzniká v Praze i první sbírka bakteriálních kultur, kde se nacházely i některé kmeny vyizolované otcem rostlinolékařské bakteriologie E.F.Smithem (Kůdela et al., 2002).

I přes tyto slibné začátky nevzniká na našem území specializované pracoviště a tak zůstává výzkum na dlouhý čas nezabezpečený. Teprve v polovině osmdesátých let dvacátého století, v souvislosti s průnikem bakteriální spály růžovitých na naše území, bylo ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze založeno oddělení rostlinolékařské bakteriologie (Kůdela et al., 2002).

## 2.2 Fytopatogenní bakterie

### 2.2.1 Prokaryota

Prokaryota jsou evolučně velmi staré jednobuněčné organismy, které nemají typické buněčné jádro. Nositelem genetické informace je deoxyribonukleová kyselina (DNA) soustředěná do tzv. nukleotidu, který není od cytoplazmy oddělen jadernou membránou. Součástí genomu jsou u prokaryotních organismů i plazmidy – malé většinou kruhové molekuly DNA nacházející se v cytoplazmě.

Dalším významným znakem prokaryotní buňky je absence mitochondrií a chloroplastů. Jejich funkci plní plazmatická membrána. Většina prokaryotních organismů se množí příčným dělením, nemají dělicí vřeténko (Kůdela et al., 2002).

Prokaryota osídľují všechny typy prostředí, snáší široká teplotní rozmezí, vysoké hodnoty radiace a na různých površích mohou přežívat mnoho let. K prokaryotickým organismům patří bakterie spolu se sinicemi.

### 2.2.2 Bakterie

Nejrozšířenější skupinou organismů na světě jsou bakterie. Celkový počet druhů se dá jen tušit a odhady se často velmi liší od  $10^7$  k  $10^9$  druhů (Curtis et al., 2002). Můžeme je nalézt v půdě, ve vodě i ve vzduchu, žijí symbioticky uvnitř i na povrchu mnohobuněčných organismů. Jsou schopné přežít v prostředí, kde by ostatní organismy uhynuly (horké prameny, vakuum, nízké teploty apod.).

#### 2.2.2.1 Tvar a velikost bakteriální buňky

Bakteriální buňky jsou velmi malé, takže nelze uplatnit morfologickou diferenciaci. V průměru jejich délka kolísá v rozmezí 1-3  $\mu\text{m}$  a šířka v mezi 0,3-0,6  $\mu\text{m}$ . Svými rozměry tak jsou na hranici rozlišovací schopnosti světelných mikroskopů (Kůdela et al., 2002). Tvar bakteriálních buněk může být:

- kulovitý (koky, diplokoky, streptokoky, stafylokoky, sarciny)

- tyčinkovitý (tyčinky, bacily, vibria, spirila, spirochéty)
- větvený (aktinomyceta, mykobakterie, korynebakterie)
- pleomorfický (fytoplazmy)

Většina fytopatogenních bakterií má tvar tyčinkovitý (např. rody *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Erwinia*, *Pantoe*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*).

### 2.2.2.2 Stavba bakteriální buňky

Bakteriální buňka je prokaryotní organismus. Mezi stavbou buněk jednotlivých bakteriálních skupin mohou existovat značné rozdíly, ale základní rysy a struktury mají společné. Bakteriální buňka se skládá z:

- buněčné stěny- většinou tlustá, pevná a neohebná. Podle složení buněčné stěny se bakterie dělí na grampozitivní a gramnegativní.
- pouzdra- silně hydratovaná gelovitá nebo slizovitá vrstva nacházející se vně bakteriální stěny. Pomáhá bakteriím překonat nepříznivé podmínky, charakteristické pro většinu fytopatogenních bakterií.
- bičíků a fimbrií- organely, které se svým složením velmi podobají. Bičíky jsou delší a jsou organelami pohybu, kdežto fimbrie jsou kratší a jejich funkcí je uchycení k rostlinným nebo živočišným buňkám.
- plazmatické membrány- nachází se mezi buněčnou stěnou a cytoplazmou. Někdy vytváří vychlípeniny dovnitř cytoplazmy tzv. mezozomy, které mají svojí roli při dělení buněk.
- cytoplazmy- jedná se o koloidní roztok globulárních bílkovin ohraničený cytoplazmatickou membránou obsahující nukleoid (genofor), plazmidy, rybozomy a tzv. inkluze s nerozpuštěnými rezervními a odpadními látkami.
- genomu- souboru genů uložených v nukleoidu (útvár podobný jádru) a plazmidech. Nukleoid bakteriálních buněk je tvořen jedinou molekulou deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která je uzavřena do podoby prstence. Fytopatogenní bakterie, ale i mnohé jiné, obsahují v cytoplazmě plazmidy-

krátké molekuly DNA, které nesou asi 1 % genetické informace buňky (Kůdela et al., 2002).

- ribozomů- oválná tělíška rozptýlená v celé cytoplazmě. U bakterií tvoří až 40% cytoplazmy, což jim umožňuje velmi rychlou syntézu bílkovin (Kůdela et al., 2002).
- endospory- válcovité až kulovité útvary, které se vytváří pouze u některých bakterií ke konci růstové fáze. Tyto útvary mají velmi nízký obsah vody a jsou velmi odolné vůči extrémním podmínkám (sucho, radiace, teploty apod.). V jedné buňce vzniká pouze jedna endospora vyznačující se dlouhou trvanlivostí.

#### **2.2.2.3 Výživa a příjem živin**

Bakterie získávají energii oxidací organických látek- monosacharidů, polysacharidů, ale i solí organických kyselin, která může probíhat jednak fermentací (kvašením) nebo respirací. Bakterie využívající k oxidaci kyslík, který je součástí molekuly nějaké organické látky, se označují jako anaerobní. Bakterie, které energii získávají respirací a nemohou žít bez vzdušného kyslíku, se označují jako aerobní. Většina fytopatogenních bakterií se řadí mezi aerobní.

Živiny jsou bakterie schopny přijímat celým povrchem těla. Protože buněčná membrána není přizpůsobena k průchodu velkých molekul a pevných částic, je každý bakteriální druh vybaven určitým spektrem enzymů (exoenzymů), které jsou uvolňovány do vnějšího prostředí a napomáhají rozkladu organické hmoty na jednodušší molekuly.

#### **2.2.2.4 Růst a množení bakterií**

Bakterie nacházející se v prostředí, které jim zajistí vhodné podmínky, rostou a množí se. Rozlišujeme růst individuální bakteriální buňky, který je plynulý, a růst v bakteriální kultuře, kde se nachází buňky v různých fázích individuálního života (Kůdela et al., 2002).

Bakterie řadíme k nejrychleji se množícím organismům na Zemi. Generační doba je časové vyjádření doby od vzniku jedné bakteriální buňky do jejího dalšího rozdělení. U většiny bakterií a za optimálních růstových podmínek se generační doba pohybuje v rozmezí 15 až 30 minut (Kůdela et al., 2002). Takto rychlé rozmnožování má však své limity. Růst bakteriální kultury se zastaví, jakmile dojde k vyčerpání dostupných živin nebo k nakušení odpadních produktů metabolismu.

Než dojde k vlastnímu rozdělení, musí bakteriální buňka dorůst do dostatečné velikosti, musí si vytvořit přiměřenou zásobu živin a současně musí dojít k replikaci genetické informace. Většina bakterií se množí binárním příčným dělením, některé pučením, ojediněle i podélným dělením. Vlastní dělení probíhá tak, že se nejprve rozdělí nukleoid a poté se se začne tvořit buněčná přepážka, která rozdělí mateřskou buňku na dvě dceřiné. Někdy nedojde k oddělení dceřiných buněk a vytváří se shluky, které jsou charakteristické pro určité druhy bakterií a jsou jedním z pomocných determinačních znaků (řetízky, dvojice, čtveřice, hrozny apod.).

#### **2.2.2.5 Vliv vnějšího prostředí na životní cyklus bakterií**

Životní cyklus bakterií je závislý na dostatečném množství živin nezbytných pro syntézu buněčné hmoty, na využitelných zdrojích energie a na vhodných biologických, fyzikálních a chemických podmínkách. Největší význam mají tyto vnější faktory:

- voda- většina bakterií žije v prostředí s volně přístupnou vodou a při jejím nedostatku dochází k rychlé dehydrataci buněk, bakterie usychají a hynou. Ale většina fytopatogenních bakterií je k vysychání tolerantní, protože jsou chráněny bakteriálním slizem.
- teplota- většinu fytopatogenních bakterií řadíme mezi tzv. psychrofilní mikroorganismy (Kůdela et al., 2002). Začínají se rozmnožovat při teplotách okolo 5-10°C, přičemž teplotní optimum se pohybuje mezi 25-30°C. Obecně lze říci, že bakterie jsou mnohem citlivější na vyšší teploty, a nejvíce jsou poškozovány rychlým střídáním nízkých a vysokých teplot.
- hodnota pH- většině bakterií včetně fytopatogenních nejlépe vyhovuje neutrální nebo slabě alkalické prostředí, extrémní hodnoty mohou bakterie usmrtit.

- ultrafialové záření- má letální a mutagenní účinky pro většinu bakterií (odolné jsou bakterie obsahující karotenoidní barviva)
- ultrazvuk- letálně působí pouze zvukové vlny o vyšší frekvenci než 20kHz v případě nízkého kmitočtu a dosti silné intenzity

#### **2.2.2.6 Význam bakterií pro člověka a přírodu**

Protože bakterie jsou přirozenou složkou biosféry, nalezneme je ve všech životních prostředích:

- v půdě- nejvíce se jich vyskytuje v hloubce 3-10 cm pod povrchem půdy, kde se podílejí na koloběhu látek v přírodě (nitrifikační, denitrifikační a hlízkové bakterie)
- ve vodě- vyskytují se jak v mořských tak i ve sladkých vodách, jejich samočisticí schopnosti se využívá při likvidaci organického znečištění vod
- ve vzduchu- vyšší zastoupení bakterií je nad pevninou než nad mořem
- v rostlinných a živočišných organismech- vztahy mezi organismy a bakteriemi jsou různé, nejvýznamnější je vztah symbiotický, ale existuje řada patogenních bakterií vyvolávajících různá onemocnění (např. skupina fytopatogenních bakterií u rostlin)

#### **2.2.2.7 Klasifikace fytopatogenních bakterií**

Klasifikační systém bakterií je založen na podobnosti nebo rozdílnosti fenotypových a genotypových charakteristik organismů. V bakteriologii není předmětem klasifikace jedinec (buňka), ale populace identických jedinců. Orgánem odpovědným za klasifikaci prokaryot je International Committee on Systematics of Prokaryotes Bacteriology (ICSP) a jeho rozhodující komise Judicial Commission, která vydává stanoviska týkající se taxonomických záležitostí. ICSP má řadu podvýborů, které se zabývají nomenklaturou a taxonomií specifických skupin prokaryot. Patří mezi ně i podvýbor: *Burkholderia*, *Ralstonia* a příbuzné organismy (Tab. 1).

Při klasifikaci bakterií se využívají metody mikroskopické, kultivační, fyziologické, biochemické, chemické, ekologické, molekulárněbiologické, genetické, sérologické a metoda numerické taxonomie (Kůdela et al., 2002). Tyto metody jsou využívány i při identifikaci bakterií.

Tab. 1: Taxonomické začlenění fytopatogenních bakterií (Young et al., 1992; upraveno):

Doména	Oddělení	Třída	Podtřída	Čeleď <sup>1)</sup>	Rod
<b>B a c t e r i a</b>	<b>G r a c i l i c u t e s</b>	<b>P r o t e o b a c t e r i a</b>	Alfa- podtřída	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Acetobacter</i>
					<i>Gluconobacter</i>
				<i>Rhizobacteriaceae</i>	<i>Agrobacterium</i>
				<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>
			Beta- podtřída	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i>
					<i>Xylophilus</i>
				<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i> <i>Ralstonia</i>
			Gama- podtřída	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>
					<i>Erwinia</i>
					<i>Pantonea</i>
					<i>Proteus</i>
					<i>Serratia</i>
					<i>Pseudomonadaceae</i>
			<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Xanthomonas</i> <i>Xylella</i> <i>Herbaspirillum</i>	
	<b>F i r m i c u t e s</b>	<i>Firmibacteria</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	
			<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	
			<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridium</i>	
		<i>Thallobacteria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>	
				<i>Clavibacter</i>	
				<i>Curtobacterium</i>	
		<i>Actinobacteria</i>	Neurčena	<i>Rathayibacter</i>	
				<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>
					<i>Rhodococcus</i>
<i>Streptomycetaceae</i>				<i>Streptomyces</i>	
<b>Tenericutes</b>	<b>Mollicutes</b>	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>		
		Neurčena	<i>Phytoplasma</i>		
<b>Bez zařazení do vyšších taxonů</b>					<i>Rhizobacter</i> <i>Liberobacter</i>



## 2.3 Rod *Ralstonia*

Existuje více než 300 bakterií z oddělení Gracilicutes a Firmicutes, které vykazují fytopatogenní vlastnosti (Kůdela et al., 2002). Rod *Ralstonia* sice nepatří k hospodářsky početným fytopatogenním rodům (zahrnuje druhy- *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia solanacearum* complex a *Ralstonia syzygii*), ale vzhledem k poměrně širokému spektru hostitelských rostlin, může být limitujícím faktorem při produkci mnoha kulturních rostlin po celém světě (Clarence I. Kado, 2010).

### 2.3.1. Charakteristika druhu *Ralstonia solanacearum*

*Ralstonia solanacearum* je gram-negativní tyčinka z několika bičíky na jednom pólu. Roste aerobně a netvoří endospory. Pokud bakterie není v přímém kontaktu se vzduchem, je za určitých okolností schopna omezit růst a produkovat poly- $\beta$ -hydroxybutyrát sloužící jako energetická rezerva (Denny et.al, 2001) Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 0,5-0,7 x 1,5-2  $\mu$ m.

Kolonie na agarových půdách jsou nefluorescentní, nepravidelně kulaté, tekuté, slizovité, krémové barvy a často tvoří difúzní hnědý pigment (Clarence I. Kado, 2010). Na živných agarech vytváří dva typy kolonií- fluidní a nefluidní (Smith, 1964). Za určitých podmínek může dojít ke spontánní změně z fluidní na nefluidní formu, což je spojeno se snížením virulence daného kmenu. Tento jev byl pozorován v důsledku dlouhodobé kultivace na agaru (Buddenhagen et al, 1964, Kelman, 1954).

Tuto bakterii řadíme mezi Proteobacteria podtřída Betaproteobacteria. Jedná se o velmi adaptabilní organismus s širokou škálou hostitelů, který se podle biochemických vlastností člení na 5 biovarů, podle hostitelského okruhu se dělí na několik ras a podle nejnovějšího přístupu- genové sekvenční analýzy se dělí na 4 phylotypy (Janse, 2012). Nejjednodušší a nejrozšířenější je dělení podle hostitelského okruhu (Kůdela et al., 2002):

- Rasa 1 má vysoké teplotní optimum (35-37°C) a je rozšířena hlavně v tropických a subtropických oblastech pěti kontinentů včetně Evropy (Elphinstone, 2005). Rasa 1 má nejvyšší počet hostitelských rostlin. Z čeledi

lilkovitých napadá hlavně tabák, rajče, lilek vejcoplodý, brambor, z dalších pak diploidní banánovník, podzemnici olejnou, boby, slunečnici, ale i některé okrasné rostliny (*Anthurium* spp., *Dahlia* spp., *Heliconia* spp., *Lilium* spp.) a plevely (EPPO/CABI, 2005). V mírném podnebním pásu se může vyskytovat na rostlinách ve sklenících. První potvrzený nález byl v roce 2015 na okrasných rostlinách *Rosa* v Nizozemí (NPPO The Netherlands, 2015).

- Rasa 2 má stejně jako rasa 1 vysoké teplotní optimum (35-37°C) a napadá hlavně triploidní banánovník (tzv. choroba Moco) a rostliny rodu *Helicónia*, vyskytuje se hlavně v tropických oblastech jižní Ameriky a na Filipínách (Elphinstone, 2005; EPPO/CABI, 2005)
- Rasa 3 s nejnižšími teplotními nároky (27°C) má z hlediska hospodářského pro nás i ostatní evropské státy největší význam, neboť se přizpůsobila mírnému klimatu. Její výskyt byl zaznamenán ve všech pěti kontinentech nejen v tropech (Elphinstone, 2005; EPPO/CABI, 2005), ale také ve vyšších nadmořských výškách. Napadá především brambor a rajče, její okruh hostitelů je úzký. Přirozenými hostitelskými rostlinami mohou být nejen lilkovité plevely, ale i jiné plevelné druhy, které se tak mohou stát zdrojem inokula pro kulturní rostliny.
- Rasa 4 je zvláště agresivní na zázvoru, vyskytuje se v Asii (Elphinstone, 2005).
- Rasa 5 se specializuje na moruše a její výskyt je omezen na Čínu (Elphinstone, 2005).

Velké ekonomické ztráty způsobené epidemií bakteriálního vadnutí byly zaznamenány v oblastech, kde došlo k infekci rostlin rajčat, při sklizni brambor, tabáku, banánů, podzemnice olejné a zázvoru (Elphinstone, 2005). Celkově lze říci, že ekonomický dopad může být obrovský navzdory skutečnosti, že je jen malé množství informací o jeho vlivu na samozásobitelské zemědělství, konkrétně na brambory, kde je nyní obtížné přesně posoudit hospodářskou škodu (Elphinstone, 2005; Hayward, 1991). Obecně platí, že ztráty jsou závislé na místním podnebí, typech půdy, postupech pěstování plodin, volbě plodin, ale i na patogenních vlastnostech místních kmenů *R. solanacearum* (Elphinstone, 2005). V evropských

zemích, kde má patogen status karanténního organismu, se ztráty obvykle zvyšují z důvodu použití přísných opatření.

### 2.3.2 Epidemiologie bakteriálního vadnutí

Každý patogen způsobující onemocnění musí nejprve proniknout do hostitele. *Ralstonia solanacearum* obvykle vstupuje do hostitele přes různá poranění kořenů, stonků nebo přes průduchy. V době, kdy se kořeny rozrůstají a boční kořeny vynořují z pletiva, může dojít k průniku bakterií do vodivých pletiv (Kelman, 1953). Poranění kořenů mohou způsobit i různé kultivační zásahy, stejně tak jako i přítomnost hád'átek. Jakmile je patogen uvnitř rostliny, dochází ke kolonizaci cévních svazků. Tento proces může být urychlen vysokou teplotou. Horní teplotní hranicí je 40°C a dolní teplotní hranice je 4°C. Při těchto teplotách nebyl zaznamenán žádný růst (Kelman, 1953).

Charakteristickými symptomy bakteriálního vadnutí jsou ve většině případů vadnutí, krnění a žloutnutí rostlin. Symptomy se mohou vyvinout v jakékoli fázi vývoje rostliny. K úplné destrukci rostliny dochází především při napadení v raných fázích jejího vývoje (Kelman, 1953; Smith, 1920).

Jakmile dojde ke zničení hostitele, *R. solanacearum* je schopná přežívat v půdě při absenci hostitelských rostlin do 2 let, její přežití je závislé na teplotě půdy a půdní vlhkosti (Denny, 1994). Existuje několik forem přežívání bakteriálních buněk. Jednou z nich jsou životaschopné nekultivovatelné bakterie nebo tzv. hladovějící buňky a nebo bakteriální biofilmy (Álvarez et al, 2008; Álvarez et al, 2010; Roszak et al, 1987; Grey et al, 2001). Bylo popsáno přežití bakterie v čisté vodě při teplotě 20 - 25°C po více jak 40 let. *R. solanacearum* může přezimovat v závlahových vodách v těsném spojení s bezpříznakovými vodními plevelnými hostiteli a takto napomáhat k šíření patogenu pomocí vody. Kontaminovaná závlahová voda byla zdrojem mnoha výskytů bakteriálního vadnutí na různých plodinách. Patogen je obvykle zavlečen na místa polní produkce pěstováním latentně infikovaných rostlin a dál rozšiřován přes vodní cesty. Bakterie může být izolována i ve velkých vzdálenostech (více než 80 km) od zdroje inokula (Hong et al., 2014).

Latentně infikované rostliny *Solanum dulcamara* a *Urtica dioica*, které jsou součástí pobřežní vegetace, neprojevují žádné známky bakteriálního vadnutí. *Ralstonia*

*solanacearum* je schopna v těchto plevelech přezimovat a za vhodných podmínek se může začít množit (Hong et al., 2014).

### 2.3.3 Hostitelské rostliny

Bakterie *Ralstonia solanacearum* má široké spektrum hostitelů. Existuje minimálně 50 rostlinných čeledí s více než 200 různými druhy rostlin, které jsou k bakterii náchylné (Kado, 2010):

Na území České republiky se může tento patogen vyskytovat na bramborách, rajčatech, paprikách a pelargoních. Přírodními hostiteli mohou být i jiné lilkovité rostliny (*Solanum dulcamara*, *Solanum nigrum*) a plevelné druhy (*Urtica dioica*, *Rumex* spp., *Chenopodium album*, *Silene alba*, *Bidens pilosa*, *Solanum nigrum*, *Atriplex* spp.).

*Ralstonia solanacearum*, původce bakteriální hnědé hniloby bramboru, se řadí mezi škodlivé organismy sledované v ČR i EU, jejichž zavlékání a šíření je na území členských států EU zakázáno, a proti jejichž šíření je nutné přijímat předepsaná opatření. Průzkum výskytu tohoto patogenu se řídí směrnicí Rady 98/57/ES, o ochraně proti *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., v platném znění, a pro území ČR ve vyhlášce 331/2004 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření původce bakteriální kroužkovitosti bramboru a bakteriální hnědé hniloby, ve znění vyhlášky č. 328/2008 Sb.

### 2.3.4 Výskyty bakterie *Ralstonia solanacearum* v závlahových vodách v Evropě

#### 2.3.4.1 Švédsko

První zpráva o výskytu *Ralstonia solanacearum* v Evropě pochází ze Švédska. Před tím byla *R. solanacearum* striktně považována za patogena teplých oblastí zvláště tropických. Nicméně v roce 1972 byla hnědá hniloba nalezena na hlízách konzumních brambor odrůdy Bintje během rutinní inspekce. Tento vyizolovaný druh způsobil během 5 dnů vážné vadnutí mladých rostlin rajčat (odr. *Dansk Export*) a lilku (odr. *Black Beauty*). Druh byl klasifikován jako *Ralstonia solanacearum* rasa 3 biovar 2 (Olsson, 1973, 1977).

Identifikace bakterie v severním a jižním Švédsku byla naprosto neočekávaná a odhalila nedostatek znalostí o oblasti šíření patogenu. Proto byl zahájen rozsáhlý průzkum s cílem zajistit zdroj infekce. Jediná významná shoda mezi postiženými farmami byla závlaha užívající povrchovou vodu z vodního toku. Vodní tok Pinnåm byl podroben průzkumu doprovodných hostitelských rostlin z pobřežní vegetace. Na březích se vyskytoval především lilek potměchuť (*Solanum dulcamara*). Bakterie byla izolovaná z rostlin rostoucích 3 km po toku řeky od podniku zpracovávajícího brambory, který využíval brambory domácí i dovozové produkce. Odpadní voda z podniku byla vypouštěna přímo do vodního toku. V následujících pokusech byla použita voda z vodního toku v blízkosti infikovaných polí k závlaze skleníkových rostlin. Tyto rostliny byly pravidelně zalévány kontaminovanou říční vodou a nakonec uvadly. Voda z vodního toku používaného k závlaze byla určena jako významný zdroj inokula (Olsson, 1976,1979).

#### **2.3.4.2 Holandsko**

První zpráva o výskytu hnědé hniloby brambor v Holandsku byla zveřejněna v roce 1992 a předpokládá se, že *Ralstonia solanacearum* pocházela z necertifikované sadby. V roce 1995 byl patogen detekován jak v sadbových tak i konzumních bramborách. Série výskytů směřovala k jednomu pěstiteli, jehož pole byly označeny jako infikované. Na tom samém poli, kde byly pěstovány místní infikované odrůdy, byly zjištěny latentní infekce i u jiných odrůd. Zkoumání zdrojů povrchových vod v blízkosti této farmy odhalilo přítomnost bakterie a další studie naznačily souvislost mezi používáním vody na závlahy a onemocněním brambor (Janse et al, 1997).

V roce 1996 byl uskutečněn rozsáhlý průzkum na detekci bakterie *Ralstonia solanacearum* v závlahové vodě a v přilehlé pobřežní vegetaci. Přibližně 14 000 rostlinných vzorků (*Solanum dulcamara*) a vzorků vod bylo odebráno napříč celým Holandskem. Bakterie byla detekována v pěti procentech vzorků vod a v důsledku toho bylo použití vody na závlahu z těchto zdrojů zakázáno. Bakterie byla také detekována v kořenech *Solanum dulcamara* ponořených do vody. V mnoha případech byla bakterie detekována ve vodních zdrojích v těsné blízkosti podniků zpracovávajících brambory, což naznačuje, že proces čištění odpadních vod není efektivní pro usmrcení bakterie.

Aby se vysledovaly změny populace bakterie během roku, odebíraly se v roce 1996 v Holandsku vzorky vody několikrát za rok. Vzorky byly odebírány týdně ze čtyř řek. V infikovaných řekách byla bakterie detekována do zamrznutí vody a přímo po tání byla opět detekovatelná ale ve velmi nízké populaci ((Janse et al, 1997).

#### **2.3.4.3 Anglie**

Propuknutí bakteriálního vadnutí v Anglii vedlo k vývoji metod pro detekci bakterie *Ralstonia solanacearum* v rostlinách lilku (*Solanum dulcamara*) a v závlahové vodě. V roce 1992 a 1995 se objevily dvě ohniska této choroby na dvou různých farmách (Stead et al., 1996). U obou výskytů byla zdrojem infekce kontaminovaná závlahová voda, ve které přirozeně roste infikovaný lilek (*Solanum dulcamara*). Bylo odebráno 420 vzorků těchto rostlin z různých vodních toků a bakterie byla vyizolována z vláknitých postranních kořínků. Pro detekci patogenu byly použity tři metody: nepřímá ELISA, PCR a kultivace na SMSA mediu. Výsledky jednotlivých testů kolísaly a ukázalo se, že nejvíce spolehlivý přístup by byl použit všechny metody současně (Elphinstone et al., 1997).

V průběhu čtyřletého sledování zůstávaly rostliny lilku (*Solanum dulcamara*) infikované a životaschopný patogen mohl být izolován během celého roku i po dobu zimních měsíců. Infikovány byly pouze rostliny s kořeny ponořenými do vody, u ostatních vodních plevelů rostoucích podél kontaminovaných toků nebyl patogen detekován.

Při vzorkování plevelných rostlin brambor v infikovaných oblastech byl patogen detekován v méně jak 1 % dceřiných hlíz a následujícího roku již zjištěn nebyl. Na základě těchto průzkumů je usuzováno, že největším rizikem pro rozšiřování této bakterie jsou lilky (*Solanum dulcamara*), kde *Ralstonia solanacearum* přezimuje a postupně dochází k jejímu uvolňování do vodních toků používaných k závlahám.

Po národním průzkumu, který byl proveden na řekách po celé Anglii a Walesu, byly nalezeny infikované rostliny lilku *Solanum dulcamara* na řece Temži a jejích pěti přítocích, a na řece Witham. Tyto řeky byly sledovány během tří let a bakterie byla detekována pouze ve vodách, kde byl přítomen lilek *Solanum dulcamara*. Patogen byl izolován pouze v teplých letních a podzimních měsících. V chladnějších měsících byly

vzorky centrifugovány, aby se zkoncentrovala populace patogenu a obohacené vzorky byly testovány PCR. Populace bakterie *Ralstonia solanacearum* se snižovala, když poklesly teploty vody nebo se zvedla hladina, anebo odumřel lilek *Solanum dulcamara* (Elphinstone et al., 1997).

#### **2.3.4.4 Španělsko**

Rovněž ve Španělsku byla zkoumána závislost mezi teplotou vody v řekách a populacemi bakterie *Ralstonia solanacearum*. Během tříleté periody byla sledována řeka Tormes, v jejímž blízkém okolí byl popsán výskyt hnědé hniloby. Vzorky byly odebírány z 5 lokalit podél řeky a poté přímo rozetřeny na SMSA medium. Pravděpodobné kolonie byly potvrzeny IF testem a DASI – ELISA. Jakmile teplota vody v letních měsících stoupala, populace bakterie se zvyšovala, ale v zimních měsících byla bakterie nedetekovatelná (Caruso et al., 2005).

#### **2.3.5 Průzkum výskytu bakterie *Ralstonia solanacearum* v České republice**

Průzkum výskytu původce bakteriální hnědé hniloby bramboru v ČR je zaměřen především na porosty brambor a rajčete nebo na partie hlíz brambor ve skladech. Provádí se vizuální prohlídka rostlin v porostech, vizuální prohlídka hlíz na poli i ve skladech, anebo odběr a testování vzorků bezpříznakových hlíz bramboru na přítomnost *Ralstonia solanacearum* diagnostickými metodami.

Pro zajištění průzkumu rozsahu výskytu RS na území ČR se odebírají i vzorky vod z vodních zdrojů používaných k závlaze hostitelských rostlin (brambor, rajče), včetně vzorků doprovodných hostitelských rostlin z pobřežní vegetace. Vzorkují se i odpadní vody z podniků, které průmyslově zpracovávají hlízy bramboru (Vyhláška č. 328/2008 Sb.).

V České republice je výskyt bakterie *Ralstonia solanacearum* v povrchových vodách monitorován od roku 2002. V současné době jsou monitoring a diagnostika prováděny pracovníky Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (dále jen ÚKZÚZ). Odběr provádí rostlinolékařští inspektoři a vzorky jsou rozborovány na Oddělení diagnostické laboratoře Havlíčkův Brod.

### 3 CÍL PRÁCE

Ve své závěrečné práci se zabývám průzkumem výskytu původce hnědé hniloby brambor v závlahových vodách v České republice.

Dílčí cíle práce:

- Shromáždit a prostudovat dostupnou literaturu
- Vypracovat literární rešerši se zaměřením na rostlinolékařskou bakteriologii
- Na vybraných tocích v hlavních zavlažovacích oblastech České republiky vyhodnotit výskyt původce hnědé hniloby brambor a nalézt možné zdroje kontaminace povrchových vod



## 4 MATERIÁL A METODY

Podkladem pro vypracování závěrečné práce na téma Výskyt bakterie *Ralstonia solanacearum* v povrchových vodách České republiky byla osobní účast na testování této bakterie v diagnostické laboratoři Havlíčkův Brod v průběhu let 2010-2016. Oddělení diagnostická laboratoř Havlíčkův Brod spadá pod Odbor diagnostiky, který je součástí Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ).

Vzorky vyšetřovaných povrchových vod byly v letech 2010- 2016 odebírány a odesílány do laboratoře rostlinolékařskými inspektory ÚKZÚZ (do roku 2015 inspektory Státní rostlinolékařské správy) z vybraných odběrových míst. V roce 2016 se uskutečnil podrobný průzkum na řece Dyji s cílem zajistit možný zdroj opakované infekce povrchových vod bakterií *Ralstonia solanacearum*.

V Čechách je hlavním tokem využívaným k závlaze v ranobramborářských oblastech řeka Labe a její hlavní přítoky (Úpa, Metuje, Orlice, Jizera, Chrudimka), na Moravě pak řeka Dyje (s přítoky Jevišovka, Kyjovka) a Morava (Obr. 1).



Obr.1 Mapa monitorovaných toků

## 4.1 Metodika odběru závlahových vod

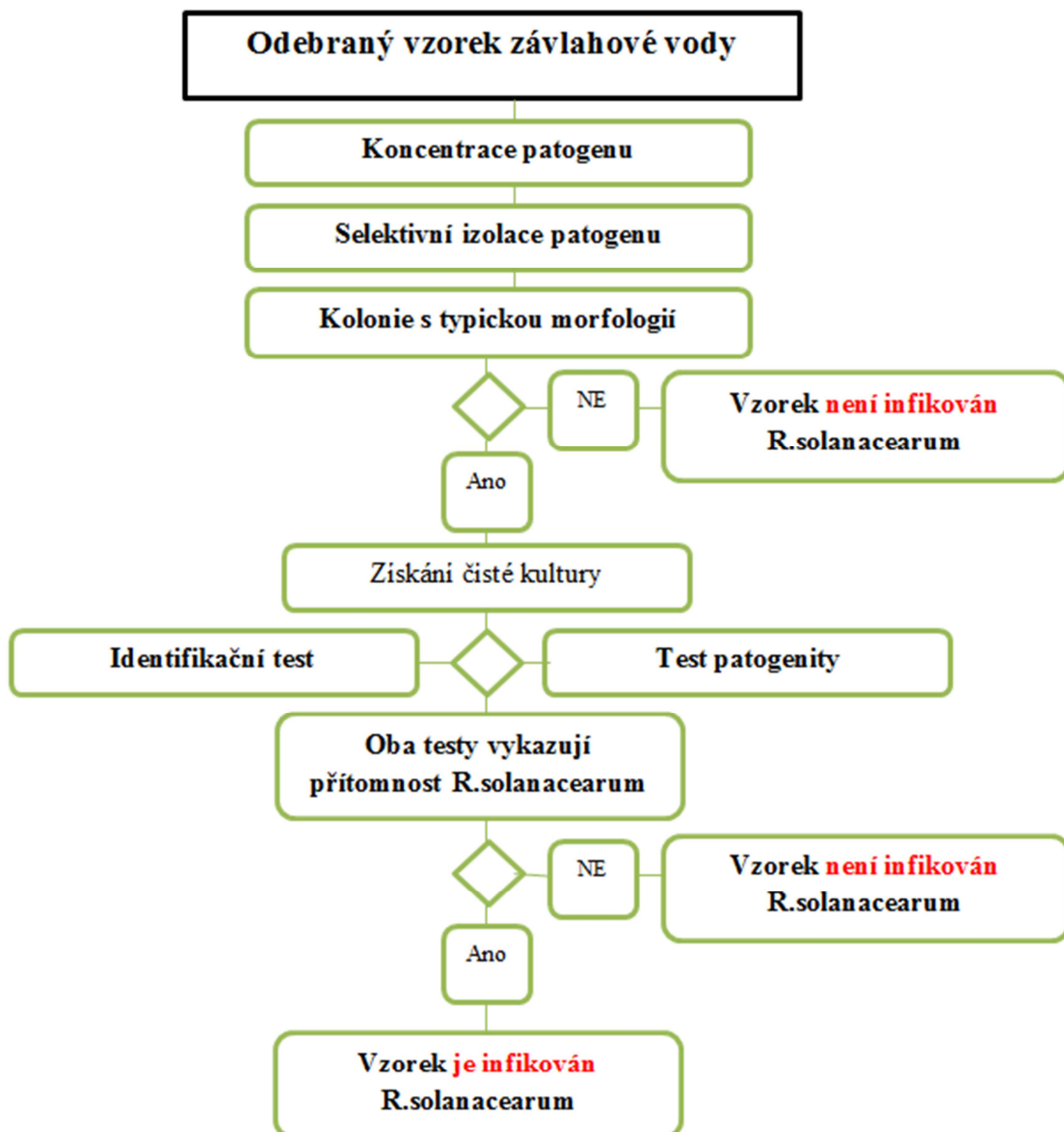
Závlahové vody se odebírají do sterilních lahví nebo nádob na jedno použití 2x ročně během vegetačního období. První odběr se provádí v období květen až červen, kdy teplota závlahové vody dosáhne 15°C. Druhý odběr probíhá v období srpen až říjen opět s přihlédnutím k aktuálním teplotám. Vzorky se odebírají z hloubky 30 - 40 cm ve vzdálenosti 2 m od okraje toku z oblastí, kde jsou zavlažovány produkční plochy brambor (Vyhláška č. 331/2004 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření původce bakteriální kroužkovitosti bramboru a původce bakteriální hnědé hniloby v aktuálním znění).

Ihned po odběru se vzorky ukládají do chladicích boxů a přepravují do laboratoře, kde se do 24 hodin od odběru zpracovávají. Doporučená velikost vzorku je 500 ml.

## 4.2 Metodika detekce a identifikace bakterie *Ralstonia solanacearum* v závlahových vodách

Metodika detekce a identifikace bakterie *Ralstonia solanacearum* se řídí příslušnými předpisy Evropského společenství (Směrnicí Rady 98/57/ES ze dne 20. července 1998 o ochraně proti *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al., a Směrnicí Komise 2006/63/ES ze dne 14. července 2006, kterou se mění přílohy II až VII směrnice Rady 98/57/ES.). Tyto předpisy jsou zpracované ve Vyhlášce č. 331/2004 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření původce bakteriální kroužkovitosti bramboru a původce bakteriální hnědé hniloby v jejím aktuálním znění.

Základní vyšetřovací metodou je metoda selektivní izolace patogenu na vhodných živných půdách, kde se sleduje nárůst typických kolonií *Ralstonia solanacearum*. Podezřelé kolonie se očkují na univerzální živné půdy s cílem získat čistou kulturu, která je pak identifikována některým ze screeningových testů (např. IF test, PCR, FISH) a testem patogenity. Citlivost testu selektivní izolace je ovlivňována především populacemi konkurenčních saprofytických bakterií. Touto metodou je možné zachytit patogen již při koncentraci 10<sup>3</sup>buněk/litr závlahové vody (Obr. 2).



Obr. 2: Postupový diagram pro detekci a identifikaci bakterie *Ralstonia solanacearum* v závlahových vodách

#### 4.2.1 Koncentrace patogenu

- Odebrané vzorky vod dodaných v plastových obalech se v první fázi zpracování zbavují případných hrubých nečistot filtrace (filtrační papír Whatman No 1).
- Získaný filtrát je nutno zkoncentrovat postupným odstředováním v centrifugačních zkumavkách o objemu 80 ml při 7000g po dobu 15 minut

- Poté se slije kapalina nad usazeninou a k usazenému sedimentu se přidá další část přefiltrované vzorku. Postup se opakuje až do zpracování celého objemu nebo minimálně 200 ml.
- Po závěrečném odstředění se k sedimentu přidá 1 ml peletového pufru a vzorek se důkladně protřepe

#### 4.2.2 Selektivní izolace patogenu (kultivační test)

- Vlastnímu testování předchází příprava inkubačních ploten (ø 9cm) s vhodným kultivačním médiem- SMSA (SM Selective Agar Base), King B (King et al., 1954)
- Připraví se ředící řada výchozí suspenze ve sterilní destilované vodě v poměru 1:10 a 1:100
- Na inkubační plotny s SMSA médiem se postupně nanáší 150 µl vzorku z připravené ředící řady a sterilní hokejkou se roztírá po celé ploše plotny.
- Stejný postup se používá pro všechna ředění i pozitivní kontrolu- *Ralstonia solanacearum* NCPPB 2505
- Plotny se inkubují při teplotě 28 °C± 2°C po dobu max. 7 dní
- Sleduje se a zaznamenává nárůst podezřelých kolonií s typickou morfologií, které se poté převedou na univerzální médium- King B, kde vytváří charakteristický hnědý pigment.
- Čisté kultury je třeba identifikovat některým ze screeningových testů (např. IF test, PCR, FISH) a založit test patogenity.

### 4.2.3 Identifikační test

- Jednorázovou kultivační kličkou se stáhne část bakteriální kultury narostlé na King B médiu a přenesse se do označené zkumavky s 500  $\mu$ l sterilní destilované vody.
- Pro vlastní testování je třeba si připravit vhodné ředění výchozí suspenze ve sterilní destilované vodě (1:10, 1:100, 1:1000).
- Pro identifikaci podezřelých kolonií lze využít tyto screeningové testy: imunofluorescenční test (IF test), fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) nebo polymerázovou řetězovou reakci (PCR). K detekci čistých kultur byl převážně využit IF test a metoda FISH.
- Pracovní postup uvedených testů je popsán ve Vyhlášce č. 331/2004 Sb.

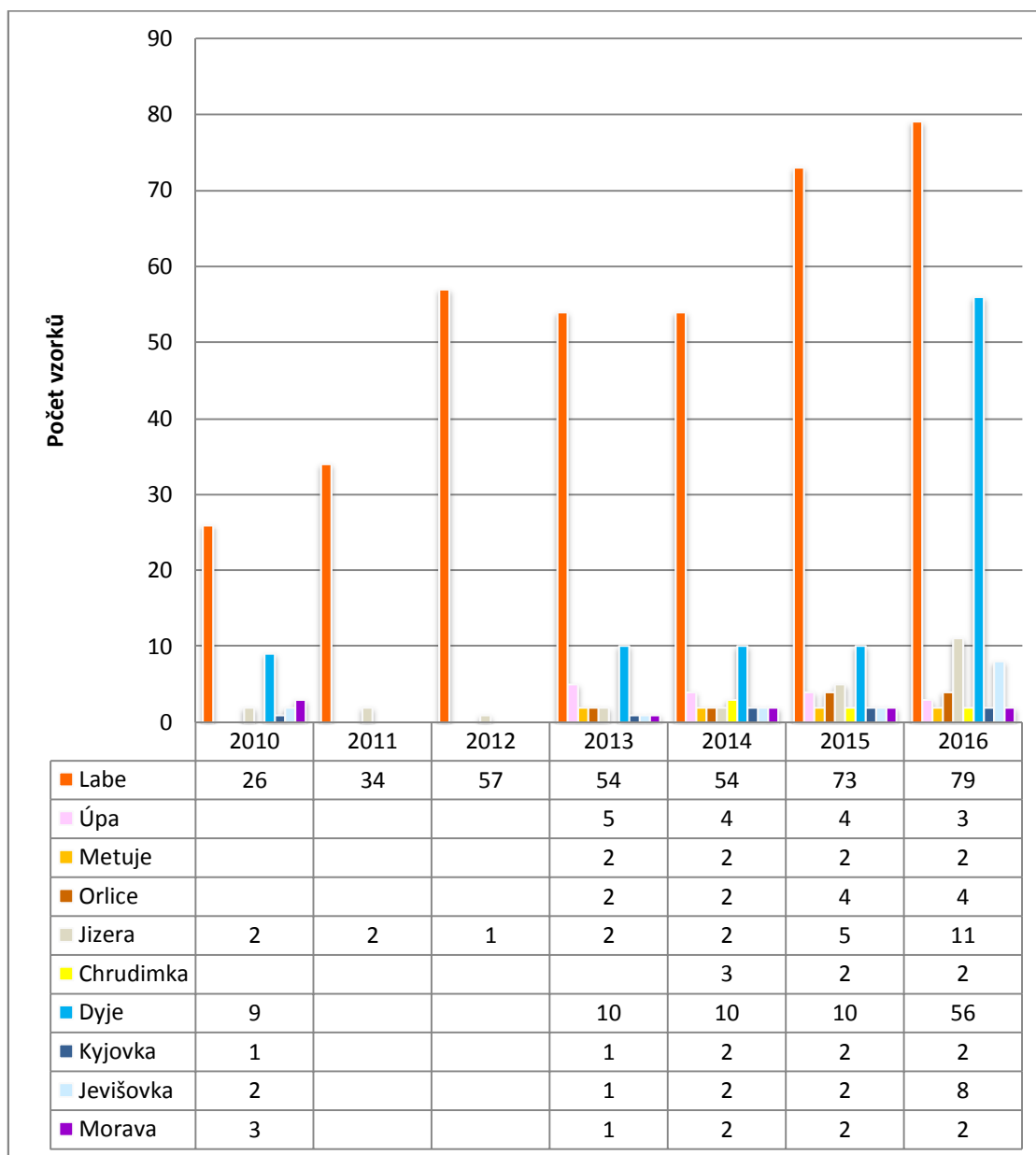
### 4.2.4 Test patogenicity

- Připravená bakteriální suspenze se dále použije k založení testu patogenicity
- Vhodnou inokulační technikou se infikují testovací rostliny (lilek vejcoplodý *Solanum melongena*- odr. Black Beauty nebo rajče jedlé *Solanum lycopersicum* L., 1753- odr. Moneymaker)
- Současně se zakládá negativní a pozitivní kontrola- sbírkový kmen *Ralstonia solanacearum* NCPPB 2505
- Inokulované rostliny se inkubují max. 20 dní při teplotách  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Sledují se a zaznamenávají charakteristické příznaky bakteriálního vadnutí rostlin

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Průzkum výskytu původce hnědé hniloby brambor v povrchových vodách České republiky probíhal na řekách Labe, Dyje a Morava a na jejich hlavních přítocích. V průběhu sedmi let bylo během vegetačního období odebráno celkem 573 vzorků povrchových vod z 84 odběrových míst (Graf 1, Příloha č. 1), kde každý je tvořen 2 dílčími vzorky o minimálním objemu 200 ml. Z celkového počtu odebraných vzorků vod bylo potvrzeno 28 pozitivních nálezů bakterie *Ralstonia solanacearum*.

Graf 1: Zastoupení jednotlivých toků a počty vyšetřených vzorků



V laboratoři bylo v souvislosti s výše uvedeným objemem vzorků za sledované období zpracováno a vyhodnoceno: 1146 kultivačních testů, 54 IF testů, 54 testů patogenity a 29 testů FISH. Některé vzorky byly současně otestovány v biochemické laboratoři Odboru diagnostiky v Olomouci metodou PCR. Současně s odběry povrchových vod byly odebírány i reprezentativní vzorky pobřežní vegetace, kde byl jako hlavní screeningový test použit IF test. Při podrobném průzkumu v roce 2016 na řece Dyji byla i u pobřežní vegetace použita jako základní vyšetřovací metoda selektivní izolace patogenu na vhodných živných půdách.

## **5.1 Výsledky průzkumu na řece Labi a jejích hlavních přítocích**

Na řece Labi je průzkum výskytu patogenu *Ralstonia solanacearum* prováděn na 46 odběrových místech rozdělených do čtyř úseků:

1. úsek: Bedřichov v Krkonoších – Jaroměř (15 odběrových míst)
2. úsek: Jaroměř – Pardubice (13 odběrových míst)
3. úsek: Pardubice – Mělník (13 odběrových míst)
4. úsek: Mělník – Děčín (5 odběrových míst)

Z celkového počtu 377 vzorků vod odebraných v celém sledovaném úseku řeky Labe bylo v průběhu sedmiletého průzkumu prokázáno celkem 7 pozitivních výskytů (Tab. 2), které se nacházely v různých úsecích toku. Teprve v letech 2015 a 2016 byl zaznamenán opakovaný nález na jedné lokalitě. Všechny výskyty až do roku 2016 pocházely z druhých odběrových termínů, tj. z období srpen až říjen. V roce 2016 však byly prokázány dva výskyty bakterie *Ralstonia solanacearum* i při prvních odběrových termínech.

Tab. 2: Odběry povrchových vod na řece Labe

Odběrová řeka	Celkový počet odebraných vzorků/ počet pozitivních nálezů						
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Labe (1. úsek)			17	14	16	24	24
Labe (2. úsek)	4	12/1	20	18	16	22/1	22/4
Labe (3. úsek)	16	16	8	8/2	8	8	8
Labe (4. úsek)	6/1	6	12	14	14	19	25
<b>Celkem vzorků</b>	<b>26/1</b>	<b>34/1</b>	<b>57</b>	<b>54/2</b>	<b>54</b>	<b>73/1</b>	<b>79/4</b>

Současně probíhaly i průzkumy na přítocích Labe: Orlice (2 odběrová místa), Metuje (4 odběrová místa), Jizera (6 odběrových míst), Úpa (3 odběrová místa) a Chrudimka (2 odběrová místa). Na těchto přítocích bylo celkem odebráno za sledované období 68 vzorků, u kterých nebyl prokázán žádný pozitivní nález (Tab. 3).

Tab. 3: Odběry povrchových vod na přítocích Labe

Odběrová řeka	Celkový počet odebraných vzorků/ počet pozitivních nálezů						
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Orlice				2	2	4	4
Metuje				2	2	2	2
Jizera	2	2	1	2	2	5	11
Úpa				5	4	4	3
Chrudimka					3	2	2
<b>Celkem vzorků</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>22</b>



## Vyhodnocení situace na řece Labi

První pozitivní nález v roce **2010** na lokalitě Počeplice (Obr. 3- bod 1) byl prvním prokázaným výskytem bakterie *Ralstonia solanacearum* na našem území. Jednalo se o druhý odběrový termín a koncentrace bakteriálních buněk se pohybovala na hranici detekovatelnosti tj.  $10^3$  buněk/litr závlahové vody.

Stejně nízká koncentrace patogenu byla i v roce **2011** na lokalitě Předměřice nad Labem (Obr. 3- bod 2), která je od místa prvotního nálezu vzdálená 165 km.

Další pozitivní výskyt byl zaznamenán až v roce **2013** a to hned na dvou lokalitách- Kovanice a Doubrava u Kostomlat nad Labem (Obr. 3- bod 3,4). Obě lokality jsou od sebe vzdálené přibližně 13 km a koncentrace patogenu se pohybovala opět na hranici detekovatelnosti.

V roce **2015** byl potvrzen pozitivní nález v druhém odběrovém termínu na lokalitě Lukovna (Obr. 3- bod 5) v části toku, která je intenzivně využívána k závlahám raných brambor.

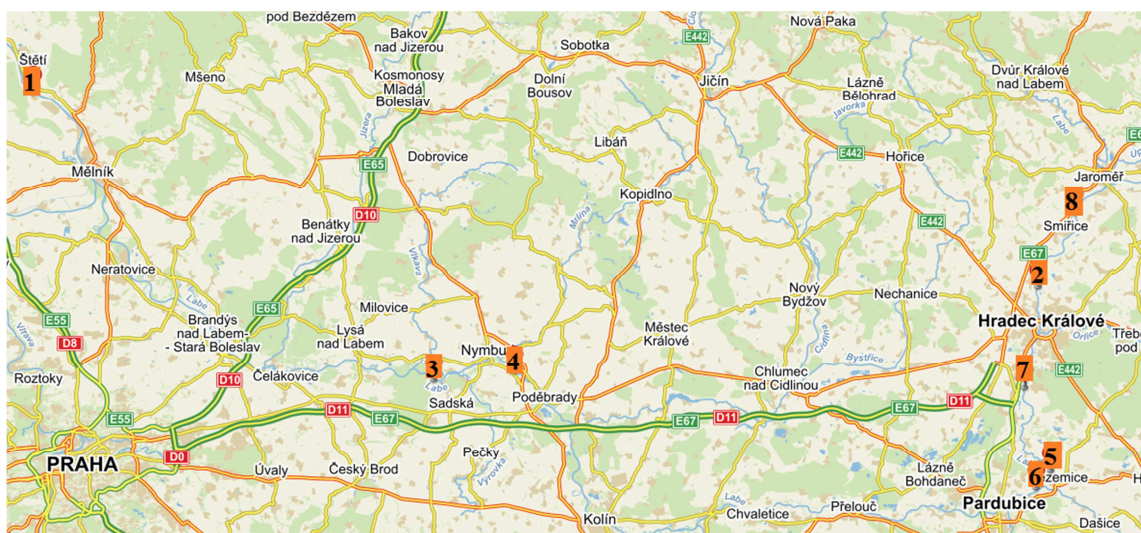
Odběry v roce **2016** nejenže potvrdily nález patogenu na lokalitě Lukovna, ale objevily se i další výskyty na blízkých lokalitách Počaply a Pohřebačka (Obr. 3- bod 6,7). Poslední pozitivní nález na Labi v roce 2016 byl potvrzen na lokalitě Černožice nad Labem (Obr. 3- bod 8) a je zároveň nejvýše položeným místem na Labi, kde byla *Ralstonia solanacearum* detekována a potvrzena. Alarmující je skutečnost, že došlo ke zvýšení koncentrace patogenu na  $10^4$  buněk/litr závlahové vody a současně byl potvrzen výskyt bakterie na lokalitě Počaply i při prvních odběrových termínech tj. v době, kdy jsou využívány tyto povrchové vody k závlahám v této ranobramborářské oblasti.

V letech **2012 a 2014** nebyl patogen na sledovaných lokalitách a v daných odběrových termínech detekován, což ale nepotvrzuje skutečnost, že by se ve vodách Labe nevyskytoval.

Stejná situace nastala i v případě odběrů pobřežní vegetace. Za celé sledované období 2010–2016 a v celém úseku toku Labe nebyl patogen v hostitelských rostlinách detekován. Největší podíl, co se týče druhového zastoupení, tvořila kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), v menším počtu pak byly odebrány i tyto plevelné druhy: dvouzubec trojdílný (*Herba bidentii tripartita*), lilek rajče (*Solanum lycopersicum*), lilek černý

(*Solanum nigrum*), lilek potměchut' (*Solanum dulcamara*) a šťovík tupolistý (*Rumex obtusifolius*).

Za sledované období se na Labi nepodařilo nalézt možný zdroj kontaminace povrchových vod bakterií *Ralstonia solanacearum*. Výskyty v povrchových vodách na jednotlivých lokalitách byly ojedinělé. Jedna z příčin, proč se nepodařilo nalézt bakterii i v přilehlé vegetaci, může být i skutečnost, že pro diagnostiku byly odebírány nevhodné segmenty z nadzemní části rostlin těsně nad povrchem půdy.



Obr. 3: Lokality s pozitivními výskyty bakterie *Ralstonia solanacearum* na řece Labi v průběhu let 2010–2016

## 5.2 Výsledky průzkumu na řece Moravě

Na řece Moravě probíhal průzkum pouze na jedné lokalitě (Příloha č. 1), kde bylo za sledované období odebráno celkem 10 vzorků, kde každý vzorek je tvořen dvěma dílčími vzorky. V žádném z odběrů povrchových vod nebyla detekována bakterie *Ralstonia solanacearum* (Tab. 4). Bakterie se neprokázala ani ve vzorcích z pobřežní vegetace.

Tab. 4: Odběry povrchových vod na řece Moravě

Odběrová řeka	Celkový počet odebraných vzorků/ počet pozitivních nálezů						
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Morava	3	0	0	1	2	2	2
<b>Celkem vzorků</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

### 5.3 Výsledky průzkumu na řece Dyji a jejích hlavních přítocích

Řeka Dyje se svými zavlažovacími kanály a přítoky jsou významným zdrojem závlahové vody na jižní Moravě. Za sledované období bylo na Dyji odebráno 95 vzorků povrchových vod z 18 odběrových míst (Příloha č. 1), které byly vždy doplněny reprezentativním vzorkem pobřežní vegetace. Každý vzorek zahrnuje dva vzorky dílčí o minimálním objemu 200 ml.

Z celkového počtu odebraných vod v celém sledovaném úseku řeky bylo v průběhu sedmiletého průzkumu prokázáno celkem 16 pozitivních nálezů (Tab. 5).

Stejný postup byl zachován i na přítocích Dyje, kde se sledovaly říčky Kyjovka s jedním odběrovým místem (Příloha č. 1) a Jevišovka (Příloha č. 1) rovněž s jednou lokalitou. Na přítocích bylo celkem odebráno 23 vzorků vod doplněných pobřežní vegetací. Z uvedeného počtu byly 3 vzorky pozitivní.

Tab. 5: Odběry povrchových vod na řece Dyji a jejích hlavních přítocích

Odběrová řeka	Celkový počet odebraných vzorků/ počet pozitivních nálezů						
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Dyje	9	0	0	10/2	10/1	10/2	56/11
Kyjovka	1	0	0	1	2	2	2

Jevišovka	2	0	0	1	2	2	8/3
<b>Celkem vzorků</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>12/2</b>	<b>14/1</b>	<b>14/2</b>	<b>64/14</b>

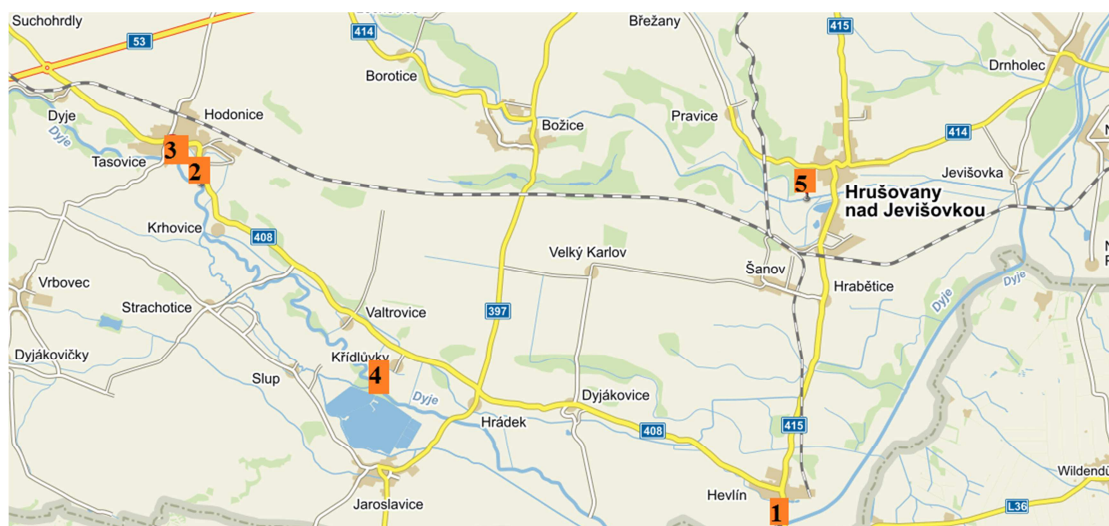
### 5.3.1 Vyhodnocení situace na Dyji a jejích přítocích do roku 2016

V letech **2010, 2011 a 2012** nebyl na Dyji zaznamenán žádný pozitivní výskyt sledované bakterie. Nutno upřesnit, že v letech 2011 a 2012 se zde odběry neuskutečnily.

V roce **2013** byla pak bakterie detekována při druhých odběrových termínech v odebraných vodách hned na dvou lokalitách Hevlín (Obr. 4- bod1) a Hodonice (Obr. 4- bod 2). Koncentrace patogenu se pohybovala okolo  $10^4$  buněk/litr závlahové vody.

V roce **2014** se při druhých odběrech opakoval pozitivní nález v Hodonicích a v roce **2015** v Hevlíně i Hodonicích (Obr. 4- bod1,2) s přibližně stejnými výše uvedenými koncentracemi patogenu ve vyšetřované vodě.

Na monitorovaných přítocích Kyjovka a Jevišovka nebyl do roku 2016 zaznamenán žádný pozitiv.



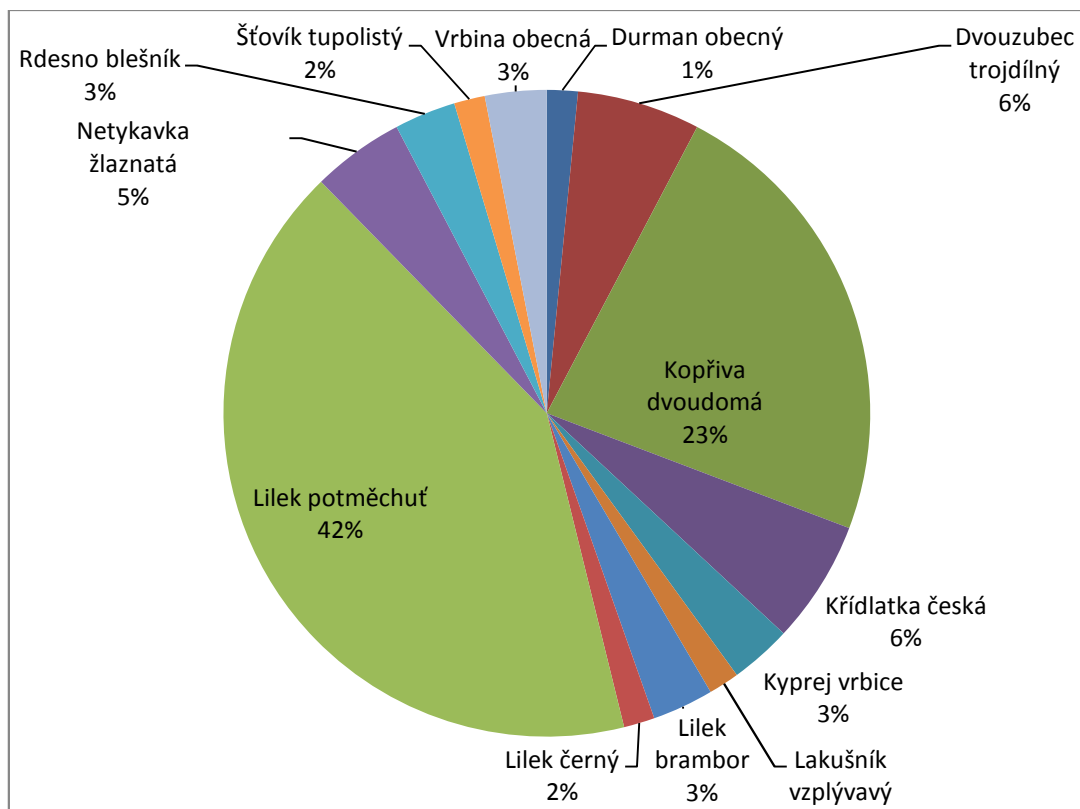
Obr. 4: Lokality s pozitivními výskyty bakterie *Ralstonia solanacearum* na řekách Dyji a Jevišovce v průběhu let 2010–2016

### 5.3.2 Vyhodnocení průzkumu na Dyji a jejích přítocích v roce 2016

Opakované výskyty patogenu na jednotlivých lokalitách vedly v roce 2016 k provedení podrobnějšího průzkumu s cílem nalézt zdroje možného zamoření bakterií *Ralstonia solanacearum* v této oblasti. Celkově bylo v roce 2016 na Dyji a Jevišovce odebráno 64 vzorků vod z různých lokalit (Příloha č. 1) a z tohoto počtu bylo potvrzeno 14 pozitivních výskytů. První pozitivní nálezy se objevily již při prvních odběrových termínech a to hned na dvou lokalitách Hodonice (Obr. 4- bod 2) a Hrušovany nad Jevišovkou (Obr. 4- bod 5). Další cílené odběry pak potvrdily výskyt patogenu ještě na dalších lokalitách – Tasovice nad Dyjí (Obr. 4- bod 3) a Křídlovky (Obr. 4- bod 4). Vysoká byla koncentrace patogenu v lokalitě Tasovice, kde se u všech pozitivních nálezů (celkem 3) pohybovala okolo  $10^5$  buněk/litr závlahové vody.

Současně s odběry povrchových vod byla odebírána i pobřežní vegetace v tomto zastoupení: durman obecný (*Datura stramonium*), dvouzubec trojdílný (*Herba bidentii tripartita*), kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*), křídlatka česká (*Reynoutria x bohemica*), Kyprej vrbice (*Lythrum salicaria*), lakušník vzplývavý (*Batrachium fluitans*), lilek brambor (*Solanum tuberosum*), lilek černý (*Solanum nigrum*), lilek potměchuť (*Solanum dulcamara*), netýkavka žláznatá (*Impatiens glandulifera*), Rdesno blešník (*Persicaria lapathifolia*), Šťovík tupolistý (*Rumex obtusifolius*) a vrbina obecná (*Lysimachia vulgaris*). Procentické zastoupení jednotlivých druhů je uveden v Grafu 2.

Graf 2: Druhové složení pobřežní vegetace při odběrech v roce 2016 na Dyji a Jevišovce



Pro diagnostiku přítomnosti bakterie v pobřežních rostlinách bylo použito stejné schéma jako pro detekci v závlahových vodách. Základní vyšetřovací metodou tedy byla selektivní izolace patogenu na vhodných živných půdách, kde se sleduje nárůst typických kolonií *Ralstonia solanacearum*.

**Z celkového počtu 65** odebraných vzorků pobřežní vegetace byl patogen detekován u **9 rostlin**. Ve všech případech se jednalo o jeden rostlinný druh – **lilek potměchuť** (*Solanum dulcamara*) a bakterie byla vyizolována z kořenů ponořených ve vodě (viz. foto- Příloha č. 3). Všechny odebrané rostliny lilku potměchuti pocházely z lokality, kde byla sledovaná bakterie detekována opakovaně i v povrchových vodách a její koncentrace se pohybovala okolo  $10^5$  buněk/litr závlahové vody. U ostatních rostlinných druhů odebraných na stejné lokalitě bakterie izolována nebyla.

Získané výsledky na sledovaných lokalitách potvrzují, že existuje vztah mezi detekcí patogenu a teplotou vody, tak jak je uvedeno v publikacích z Anglie (Elphinstone et al., 1998) a ze Španělska (Caruso et al., 2005). Výsledky průzkumu se shodují s průzkumy provedenými v 90 letech v řadě evropských zemí, kde bakterie *Ralstonia*

*solanacearum* vyvolala několik ohnisek hnědé hniloby na různých farmách (Elphinstone et al., 1997, 1998; Janse et al., 1995,1997; Stead et al, 1996).

## 6 ZÁVĚR

Sedmiletý průzkum povrchových vod na 10 českých řekách odhalil přítomnost bakterie *Ralstonia solanacearum* na třech tocích využívaných k závlaze (Labe, Dyje a Jevišovka) a současně potvrdil i její výskyt u jednoho plevelného druhu (*Solanum dulcamara*), který je součástí pobřežní vegetace sledovaných toků.

Odběry byly prováděny ve dvou termínech, přičemž při prvních odběrech (květen-červen) byla bakterie detekována pouze v jednom roce a to na 3 lokalitách. Ostatních 25 pozitivních nálezů pochází z druhých odběrových termínů (srpen-září).

V roce 2016 byla bakterie izolována z rostlin lilku potměchuti (*Solanum dulcamara*) a to v kořenovém systému ponořeném ve vodě. V rostlinách lilku potměchuti je bakterie schopna přežít nepříznivé období a do vody se začíná postupně uvolňovat až se vzrůstající teplotou vody. Kontaminovaná voda použitá k závlahám se tak může stát významným zdrojem inokula pro bakteriální vadnutí lilkovitých rostlin.



## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADAMUS, TOMÁŠ. *Základy mikrobiologie a imunologie*. 1. vyd. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita, 2007. 96 s. ISBN 978-80-248-1284-7.

ÁLVAREZ B., LÓPEZ M. M., BIOSCA E. G., *Ability of Ralstonia solanacearum phylotype II to adapt to environmental prevailing factors in water*. In: Mendez-Vilas A, ed. *Microorganisms in Industry and Environment. From scientific and industrial research to consumer products*. World Scientific Publishing Co, 2010:In press.

ÁLVAREZ B., LÓPEZ M. M., BIOSCA E. G., *Survival strategies and pathogenicity of Ralstonia solanacearum phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms*. *Microbiology* 2008;154:3590-3598.

BUDDENHAGEN I. W., KELMAN A. *Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 1964;2:203-230.

CARUSO, P., PALOMO, J., L., BERTOLINI, E., ALVAREZ, B., LÓPEZ, M., AND BIOSCA, E., *Seasonal variation of Ralstonia solanacearum biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures*, 2005. *Applied and Environmental Microbiology* (71)1 140-148

CLARENCE I. KADO, *Plant Bacteriology*, American Phytopathological Society, 2010, ISBN 0890543887, 9780890543887

CURTIS, T. P., W. T. SLOAN, AND J. W. SCANNELL. *Estimating prokaryotic diversity and its limits*. 2002. 99:10494-10499.

DENNY T. P., BRUMBLEY S. M., CARNEY B. F., CLOUGH S. J., SCHELL M. A., *Phenotype conversion of Pseudomonas solanacearum: its molecular basis and potential function*. In: Hayward AC, Hartman GL, eds. *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International, 1994:137.

DENNY T. P., HAYWARD A. C., *Ralstonia solanacearum*. In: Schaad NW, Jones JB, Chun W, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul, MN: APS Press, 2001:151.

ELPHINSTONE J. G., *The current bacterial wilt situation: A global overview*. In: Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. St. Paul, MN: APS Press, 2005:9.

ELPHINSTONE, J. G., STANFORD, H. M., AND STEAD, D. E., *Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Solanum dulcamara* and associated water. Bacterial Wilt disease. Molecular and ecological aspects*. (Ed. By Prior, P. Allen, and Elphinstone, J. G.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. 133-139.

EPPO/CABI. *Distribution maps of plant diseases: *Ralstonia solanacearum* 2003-2006*. <http://www.cabi.org/DMPD> 2006.

GREY B. E., STECK T.R., *The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:3866-3872.

HAYWARD A. C., *Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum**. *Annu Rev Phytopathol*, 1991;29:65-87.

HONG, CH., MOORMAN, G. W., WOHANKA, W., BÜTTNER, C. *Biology, Detection, and Management of Plant Pathogens in Irrigation Water*. 2014 by The American Phytopathological Society. ISBN 978-0-89054-426-6

JANSE, J. D. *Review on brown rot (*Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, phylotype iib) epidemiology and control in the netherlands since 1995: A success story of integrated pest management*. *Journal of Plant Pathology*, 2012. 94 (2), 257-272

JANSE, J. D., ARALUPPAN, F.A.X., SCHANS, J., WENNEKER, M., A WESTERHUIS, W., *Experiences with bacterial brown rot *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in the Netherlands. Bacterial Wilt disease. Molecular and ecological aspects* 1997. (Ed. by Prior, P., Allen a Elphinstone, J.G.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

KANG Y. W., LIU H. L., GENIN S., SCHELL M. A., DENNY T. P., **Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence*. *Mol Microbiol* 2002;46:427-437.

KELMAN A. *The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography*. Raleigh, N.C.:North Carolina State College, 1953.

- KELMAN A. *The relationship of pathogenicity in Pseudomonas solanacearum to colony appearance on a tetrazolium medium*. Phytopathology 1954;44:693-695
- KRÁLOVÁ, H. – *Vodní hospodářství krajiny I* (Modul M02- verze 05-11 Vodní hospodářství krajiny I, část II- Závlahy), VÚT Brno 2005, str.12- 30
- KŮDELA, V. *Rostlinolékařská bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Academia, 2002. 347 s. ISBN 80-200-0899-3.
- NPPO The Netherlands, pest report, *Ralstonia solanacearum*, (race 1): Findings in ornamental *Rosa* plants for planting for cut flower production, 2015
- OLSSON, K. *Potato brown rot bacteria (Pseudomonas solanacearum) in the water of two streams*. 1979, Växtskyddsrapporter, Jordbruk, 22, 170-182
- OLSSON, K. *A new bacterial disease in potatoes in Sweden caused by Pseudomonas solanacearum*. 1973, Växtskyddsnotiser, 37(5), 66-69
- OLSSON, K. *Current news of potato brown rot*. 1977, Växtskyddsrapporter, Jordbruk, 8, 33-37
- OLSSON, K. *Experience of brown rot caused by Pseudomonas solanacearum in Sweeden*. 1976, Bull. Oppe 6, 199-207.
- OLSSON, K., *Experience of brown rot caused by Pseudomonas solanacearum in Sweeden*. Bull. OPPE 6, 199-207
- ROSZAK D. B., COLWELL R. R., *Survival strategies of bacteria in the natural environment*. Microbiol Rev 1987;51:365-379.
- Směrnice Komise 2006/63/ES ze dne 14. července 2006, kterou se mění přílohy II až VII směrnice Rady 98/57/ES
- Směrnice Rady 98/57/ES ze dne 20. července 1998 o ochraně proti *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.
- SMITH E.F. *The brown rot of Solanaceae. Bacterial diseases of plants*. U.S.A.: Saunders Company, 1920:177.
- SPITZ, P., SLAVÍK, L., ZAVADIL, J. *Progresivní úsporná závlahová zařízení a jejich využívání*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy, 1998, 61 s.

STEAD, D. E., ELPHINSTONE, J. G., AND PEMBERTON, A. W., *Potato brown rot in Europe*. 1996,. Proceedings, Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases 1996, 1145-1152

Vyhláška č. 328/2008 Sb., kterou se mění vyhláška č. 331/2004 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření původce bakteriální kroužkovitosti bramboru a původce bakteriální hnědé hniloby

Vyhláška č. 331/2004 Sb., o opatřeních k zabezpečení ochrany proti zavlékání a šíření původce bakteriální kroužkovitosti bramboru a původce bakteriální hnědé hniloby v aktuálním znění

YAO J., ALLEN C., *The plant pathogen Ralstonia solanacearum needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host*. J Bacteriol 2007;189:6415-6424.

YOUNG JM, TAKIKAWA Y, GARDAN L, STEAD DE., *Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria*. 1992, Annu Rev Phytopathol 30:67–105

## **PŘÍLOHY**

**Příloha 1: Seznam odběrových míst na sledovaných tocích**

Lokalita	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016	
	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N	P
Bedřichov v Krkonoších							1		2		2		2	
Brod nad Labem					2		2		2		2		2	
Debrné u Mostku					2		2		2		2		2	
Heřmanice nad Labem					2						2		2	
Hořejší Vrchlabí							2		2		2		2	
Hořenice					2		2		2		2		2	
Klásterská Lhota					2		2		2		2		2	
Kuks					2									
Kunčice nad Labem							1		2		2		2	
Nový Nemojov					1									
Prosečné					2									
Slotov											2		2	
Stanovice u Kuksu					2		2		2		2		2	
Verdek											2		2	
Žireč Městys											2		2	
Černožice nad Labem					2		2		2		2		1	1
Dříteč					2		2		2		2		2	
Jaroměř					2		2		2		2		2	
Josefov u Jaroměře					2									
Kunětice											1			
Lochenice					2		2		2		2		2	
Lukovna	2		6		2		2		2			1	1	1
Počaply nad Loučnou											2		1	1
Pohřebačka											2		1	1
Předměřice nad Labem			5	1	2		2		2		2		2	
Smiřice					2		2		2		2		2	
Věkoše	2				2		2		2		2		2	
Vysoká nad Labem					2		2				2		2	
Břehy					2		2		2		2		2	
Čelákovice	2		2		1		2		2		2		2	
Doubrava u Kostomlat nad Labem					1		1	1	2		2		2	
Drahelice											1		2	
Káraný											1		2	
Kostelec nad Labem	2		2		2		2		2		2		2	
Kovanice					2		1	1	2		2		2	
Mělice					2		2		2		2		2	
Nový Vestec											1		2	
Nymburk	2		2											
Ostrá											1		3	
Řečany nad Labem					2		2		2		2		2	
Velké Zboží											1		2	

Počeplice	3	1	4		2		2		2		2		2	
Prosmyky	4		4		2		2		2		2		2	
Roudnice nad Labem											1			
Svádov	4		4		2		2		2		2		2	
Záluží u Roudnice n.L.	4		4		2		2		2		1		2	
Albrechtice nad Orlicí									2		2		2	
Krňovice							2				2		2	
Česká Skalice									1					
Městec u Nahořan							1		1					
Nahořany nad Metují											2		2	
Šestajovice u Jaroměře							1							
Debř											1		2	
Nové Benátky											1		2	
Podlázky											1		2	
Staré Benátky	2		2		1		2		2		1		1	
Tuřice													2	
Vinec											1		2	
Havlovice							2							
Slatina nad Úpou							1		2		2		1	
Zvole							2		2		2		2	
Mnětice									2		2		2	
Proseč u Seče									1					
Hevlín	2						1	1	2		1	1	8	4
Hodonice	2						1	1	1	1	1	1	4	3
Krhovice							1						2	
Lednice na Moravě	2													
Nové Mlýny	1						1		2		2		2	
Podivín							1		2		2		2	
Strachotín	2						1		2		2		2	
Dyje													5	
Dobšice													1	
Oblekovice													1	
Tasovice nad Dyjí													10	3
Dyjákovice													1	
Hrádek													2	
Křídlovky														1
Valtrovice													3	
Dobšice													2	
Vranov nad Dyjí							1							
Znojmo město							1							
Hodonín	3						1		2		2		2	
Tvrdonice	1						1		2		2		2	
Hrušovany n. Jevišovkou	2						1		2		2		5	3
Celkem	42	1	35	1	58	0	74	4	82	1	103	3	151	18

**Příloha 2:** Obrazová dokumentace diagnostiky bakterie *Ralstonia solanacearum* v podmínkách laboratoře



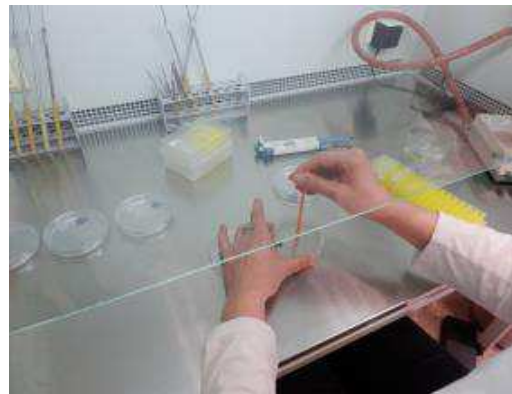
Obr. 5: Filtrace vzorku



Obr. 6: Příprava ředící řady



Obr.7: Koncentrace patogenu



Obr. 8: Kultivační test



Obr. 9: Inkubace v termostatickém boxu



Obr. 10: Kolonie bakterie *Ralstonia sol.*



**Příloha 3:** Odběr povrchových vod a pobřežní vegetace



Obr.10: Odběr povrchové vody



Obr. 11: Odběr plevelných rostlin



Obr. 12, 13: Porosty lilku potměchuti (*Solanum dulcamara*) na březích Dyje