

THE INFLUENCE OF DEVELOPMENTAL STAGE OF POTATO PLANTS ON THE DETECTION OF *POTATO LEAFROLL VIRUS* (PLRV)

VLIV VÝVOJOVÉ FÁZE BRAMBORU NA DETEKCI *POTATO LEAFROLL VIRUS* (PLRV)

Krédl¹ Z., Pokorný¹ R., Dědič² P.

¹ Department of Crop Science, Breeding and Plant Medicine, , Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

² Department of Virology, Potato Research Institute, Dobrovského 2366, Havlíčkův Brod, 580 01, Czech Republic

E-mail: kredl.zdenek@centrum.cz, pokorny0@node.mendelu.cz, dedic@vubhb.cz

ABSTRACT

The work was aimed at elucidation of optimal date for detection of *Potato leafroll virus* (PLRV) in potato leaves by ELISA, the symptoms of disease and the effect of infection on the height of plants. The optimal term for PLRV detection was three weeks after tubers seeding in the greenhouse. In this term we obtained 97,6 percentage of positive results. There were 83,3 percentage and 76,2 percentage of positive results in the fifth and seventh week after tuber seeding. We did not find any correlation between expression of symptoms and relative virus concentration expressed as level of extinction in ELISA. Infection of potato plants by PLRV significantly influenced plant height.

Key words: *Solanum tuberosum*, *Potato leafroll virus*, ELISA, detection

Acknowledgments: Výsledky práce byly získány při řešení projektu NAZV QH 71123 Variabilita viru svinutky bramboru (PLRV), zvýšení spolehlivosti jeho detekce a uplatnění transgenóze v rezistentním šlechtění.

ÚVOD

Patogeni virového původu patří mezi nejdůležitější původce chorob brambor. Výskyt virových chorob je v našich klimatických podmínkách hlavním problémem, neboť výraznou měrou ovlivňují dosažené výnosy, protože brambory jsou značně vnímavé k těmto virovým patogenům, což je jejich negativní vlastnost. V našich klimatických podmínkách je ještě znásobena silným infekčním tlakem virů, vyvolaným vysokým výskytem přenašečů. Z těchto důvodů je velice obtížné udržení dobrého zdravotního stavu porostů, což se negativně projevuje především na kvalitě sadby.

Znalost spektra specifické populace patogenů umožní, aby k výsadbě byly cíleně vybírány odrůdy s uspokojivou hladinou rezistence a zároveň sadba s minimálním napadením hlíz tak, aby došlo k výnosové kompenzaci hlíz vlivem sousedících zdravých rostlin a nedošlo ke statisticky významnému snížení výnosu. K tomu se používají diagnostické sérologické metody, které v sadbě brambor bezpečně detekují výskyt patogena a umožní tak vybrat pouze zdravou sadbu, která je následně certifikována.

Jedním z nejdůležitějších faktorů preventivní ochrany porostů brambor je tedy používání zdravé certifikované sadby, která podle právních předpisů prošla kontrolou proti virovým patogenům pomocí ELISA testu na odborných pracovištích. Jako další faktory ochrany proti virovým patogenům je výběr vhodných rezistentních odrůd a dodržování správné pěstební agrotechniky. V neposlední řadě nesmíme zapomenout na ochranu porostů brambor proti přenašečům virových patogenů. Při pěstování sadby je třeba dbát na to, aby byly pečlivě prováděny negativní výběry.

Při použití certifikované sadby by na produkčních plochách neměla být podle stávající právní normy vysazována sadba s větším napadením hlíz těžkým virovým onemocněním než deset procent, popřípadě hlíz napadených lehkými virózy po přepočtu na tento výskyt pomocí koeficientu 0,33. Podle uvedených hodnot lze odvodit, že u porostů infikovaných sledovanými viry do tohoto stupně nedojde ke statisticky významnému snížení výnosu hlíz. Při vyšším stupni zamoření, ke kterému velmi snadno u porostů dochází zejména při opakovaném přesazování vlastní necertifikované sadby, vzniká výrazná výnosová deprese.

MATERIÁL A METODIKA

V experimentu bylo použito 14 odrůd bramboru, které nebyly uznány certifikačním řízením sadby brambor v důsledku zvýšené nebo vysoké hladiny napadení PLRV. Bylo tak možné v předběžných testech vybrat dostatečný počet hlíz s reálným předpokladem jejich infekce PLRV. Jednalo se o odrůdy Barbora, Belana, Claret, Colette, Ikar, Janet, Karin, Marena, Nancy, Princess, Red Anna, Vladan, Westamyl a KE 149/21. Po důkladném omytí a osušení hlíz se jednotlivé hlízy očíslovaly a narovnaly do sadbovače v počtu 94 kusů tak, aby následně mohly být po otestování dužniny přímo vybrány pouze ty, které vykazovaly odpovídající extinkční hodnoty indikující infikované, resp. zdravé hlízy. Jako metoda pro vyhodnocování vzorků byla zvolena DAS ELISA.

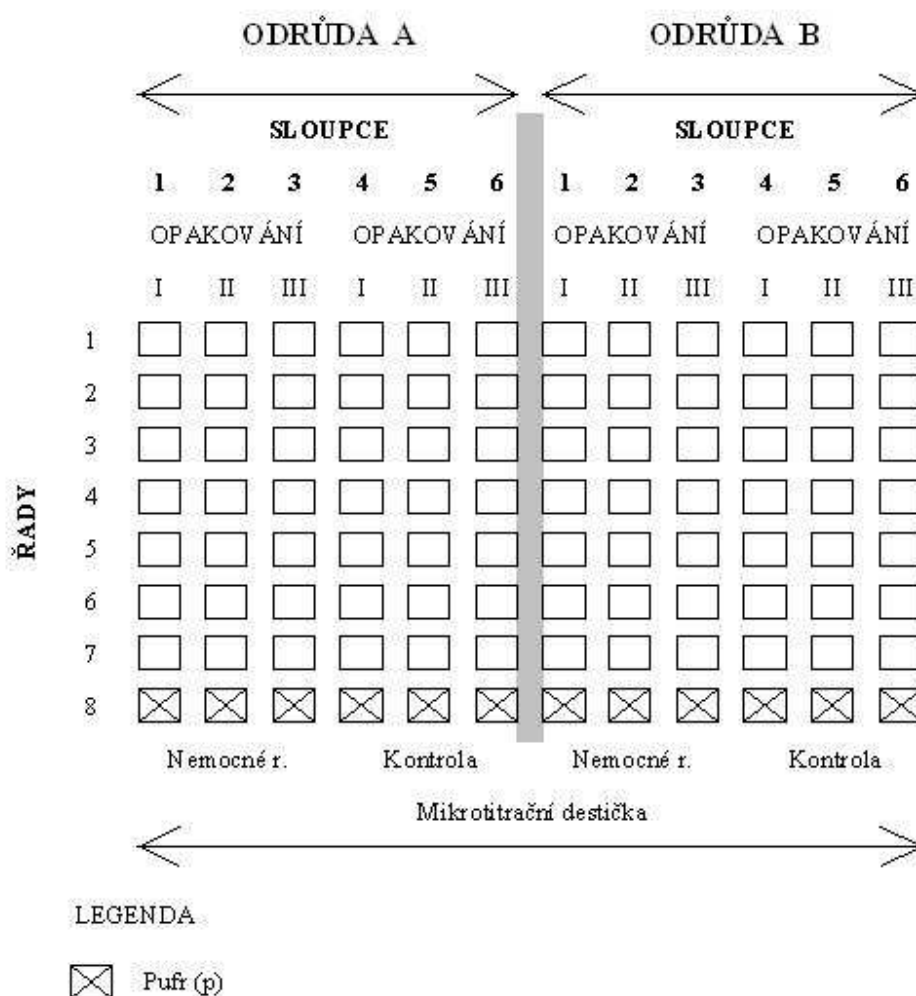
Z připravených a očíslovaných hlíz se odebral vzorek vždy pupkové části hlízy pomocí speciálního nože se dvěma ostřími. Výsledný proužek dužniny hlíz se vložil do poloautomatického lisu, odebrala se kapka rostlinné šťávy (cca 50 μ l) a smíchala s extrakčním pufrům Tris v poměru 1:10.

Ředění polyklonálních protilátek a AP konjugovaných protilátek jsme prováděli vždy dle doporučení výrobce. Ředění bylo v potahovacím i konjugátovém pufru v poměru 1:1000 protilátky/pufr. Ředění PNP v substrátovém pufru je taktéž 1:1000 PNP/pufr (1mg/ml). Na každou jamku mikrotitrační destičky jsme používali 100 μ l roztoku každé protilátky a substrátu. Jednotlivé pracovní etapy jsou po příslušných inkubačních intervalech přerušovány vymýváním nenavázaných reagensů.

Z výsledků spektrofotometru bylo vybráno z každé odrůdy 21 hlíz s nejvyššími hodnotami extinkce, zpravidla o hodnotách 0,200 až 0,500 U (absorbance při 405 nm) podle zamoření odrůdy a 21 hlíz určených jako zdravá kontrola s nižšími hodnotami extinkce, zpravidla v rozpětí 0,062 až 0,100 U. Vybrané hlízy se uskladnily při teplotě tři až pět °C až do 18. 1. 2008.

Pro stimulaci klíčení byly hlízy podélně rozříznuty a zasázeny 18. 1. 2008 do kontejnerů (o velikosti 12 x 12 cm) pupkovou částí dolů a přihrnuly se substrátem až po okraj. Zasázené hlízy v kontejnerech byly umístěny do skleníku s průměrnou teplotou 19,1 °C. Z hlediska optimalizace a efektivity pokusu byly kontejnery vyrovnány do tvaru mikrotitrační destičky, tzn., že při stávajícím počtu hlíz se na jednu destičku při vzorkování vejdu 2 odrůdy (*Obr. 1*). Každá odrůda zahrnovala 3 opakování po 7 rostlinách napadených hlíz a 3 opakování po 7 rostlinách kontrolních (nenapadených) hlíz. Každé opakování odpovídalo jednomu sloupci a rostliny řadám. Do prvních třech sloupců v pořadí od nejvyšší hodnoty extinkce až po nejnižší se vždy řadily hlízy s předpokladem jejich infekce PLRV a stejně tak se řadily i zdravé hlízy, resp. od čtvrtého do šestého sloupce. V poslední řadě všech sloupců byla vynechána místa, která byla následně při vyhodnocování označována jako pufr, neboť mikrotitrační destička má 8 řad. Jako pufr (p) byly označovány při vlastním hodnocení ELISA též všechny položky, které chyběly (rostlinky příliš malé v prvních termínech, nebo zničené hnilobou a pod.).

Obr. 1: Schéma uspořádání pokusu



Hodnocení průběhu napadení rostlin probíhalo ve třech termínech. Ve 3 týdnů po výsadbě se odebraly první vzorky listů pro hodnocení koncentrace viru v rostlinách bramboru, neboť většina rostlinek bramboru narostla během této doby do velikosti plně uspokojivé pro odebrání optimální velikosti listů pro ELISA testy. Ve skleníku se z každé rostliny, resp. z každého květináče odebral dostatečně velký spodní list a založil se do připraveného sešitu s předem očíslovanými stránkami tak, aby nemohlo dojít později k jejich záměně. Rostlinná šťáva z rozdrčených listů se smíchala s extrakčním pufrem Tris.

Dále se provedlo vizuální symptomatické vyhodnocování příznaků PLRV na jednotlivých rostlinách každých odrůd a měření výšek rostlin.

V pátém týdnů po výsadbě se uskutečnily druhé odběry vzorků listů pro vyhodnocování koncentrace viru v rostlinách bramboru a druhé vizuální symptomatické vyhodnocování příznaků PLRV na jednotlivých rostlinách každých odrůd a druhé měření vzrůstu rostlin. Vlastní průběh pokusu je totožný s vyhodnocováním výsledků ve 3 týdnů po výsadbě.

V sedmém týdnů po výsadbě se realizovaly třetí odběry vzorků listů pro vyhodnocování koncentrace viru v rostlinách bramboru a třetí vizuální symptomatické vyhodnocování příznaků

PLRV na jednotlivých rostlinách každých odrůd a třetí měření vzrůstu rostlin. Vlastní průběh pokusu je totožný s vyhodnocováním výsledků ve 3 týdnu po výsadbě.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Zjištěné výsledky četnosti výskytu PLRV v hlízách a extinkce byly hodnoceny dvoufaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA), přičemž faktory byly termín a odrůda. Následně byly hodnoceny rozdíly mezi odrůdami v jednotlivých termínech hodnocení. Výsledky analýzy byly testovány dle Tukeye na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. V jednotlivých termínech bylo statisticky vyhodnoceno také měření výšek rostlin u nemocných a zdravých rostlin v průměru za všechny sledované odrůdy. Byla použita dvoufaktorová analýza rozptylu (odrůda a zdravá x nemocná rostlina), nicméně při hodnocení byl použit pouze faktor zdraví rostlin. Výsledky analýzy byly testovány dle Tukeye na hladině významnosti $\alpha = 0,01$. Hodnocení bylo prováděno v programu UNISTAT 5.1.

Výsledky testu hlíz

Po otestování 94 hlíz bramboru z každé odrůdy na výskyt PLRV bylo potřeba vybrat 21 hlíz s reálným předpokladem infekce PLRV. Extinkční hodnota pro výrok infikovaná/zdravá hlíza byla stanovena na 0,200 U, která se vymezuje jako třínásobek průměrné extinkční hodnoty pufru + rezerva. Jak je zřejmé z Tab. 1, průběh detekce napadení PLRV z dužniny hlíz nedával uspokojivé výsledky z hlediska výše extinkčních hodnot u řady odrůd, a proto bylo potřeba vybrat hlízy s extinkční hodnotou co nejbližší stanovenému limitu. Mezi odrůdy s poměrně vysokým zastoupením hlíz infikovaných PLRV se zařadily Ikar, Janet a Claret. Tyto odrůdy vykazovaly rovněž poměrně vysokou extinkci u infikovaných hlíz. Naopak odrůdy Belana, Colette a Westamyl měly malý počet infikovaných hlíz s poměrně nízkou extinkcí vzorků. Vzhledem k tomu, že ne u všech odrůd bylo dostatečné množství napadených hlíz, byly do dalších analýz průběhu napadení rovněž vybrány i odrůdy s nižšími hodnotami extinkce: Belana, Colette, Karin, KE 149/21, Marena, Princess a Westamyl.

Tab. 1: Počet napadených hlíz a průměrné extinkce

Číslo	Odrůda	PNH	Extinkce průměr
1	Barbora	26	0,3700
2	Belana	3	0,2190
3	Claret	78	0,4640
4	Colette	5	0,2690
5	Ikar	86	0,4610
6	Janet	88	0,5810
7	Karin	13	0,3430
8	KE 149/21	11	0,3640
9	Marena	9	0,2530
10	Nancy	26	0,3710
11	Princess	15	0,3060
12	Red Anna	22	0,4120
13	Vladan	27	0,3530
14	Westamyl	5	0,2770

Symptomatické vyhodnocování průběhu napadení

Symptomatické vyhodnocování rostlin bramboru probíhalo ve třetím, pátém a sedmém týdnu po výsadbě. Infikované rostliny se porovnávaly se zdravou kontrolou.

Barbora

Ve třetím i pátém týdnu po výsadbě rostliny odrůdy Barbora nevykazovaly žádné příznaky napadení PLRV a vypadaly zdravě a svěže. První vizuálně rozpoznatelné příznaky napadení PLRV se projevily jemným prosvětlováním žilnatiny až v sedmém týdnu po výsadbě. Symptomy svinování listů nebyly pozorovány.

Belana

Symptomy slabého žloutnutí spodních listů byly pozorovány až v sedmém týdnu po výsadbě. Do této doby mezi infikovanými rostlinami PLRV a kontrolou nebyly rozpoznány vizuální změny. Pro silné napadení patogenem *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (bakteriální černání stonku) musela být tato odrůda vyloučena z dalšího vyhodnocování.

Claret

Symptomy žloutnutí apikální části listů a lehké lžícovité svinování od špiček těchto listů byly pozorovány v pátém týdnu po výsadbě. V sedmém týdnu po výsadbě již rostliny infikované PLRV vytvářely chlorózu mezižilnatiny kolem okraje celého listu a ve středním patře i slabé svinování listů.

Colette

První symptomy u odrůdy Colette byly zpozorovány až v pátém týdnu po výsadbě, které se projevily velmi slabou chlorózou listů a lehkým lžícovitým stáčením listů, aby po další dva týdny tyto příznaky nabraly na intenzitě. V jednom případě byl zaznamenán výskyt antokyanizace listové nervatury a přiléhajícího pletiva. Jednalo se o rostlinu s extinkční hodnotou 1,213 U (Hodnota extinkce naměřená v sedmém týdnu po výsadbě). Díky silnému napadení patogenem *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* byla tato odrůda vyloučena z dalšího vyhodnocování.

Ikar

Rostliny odrůdy Ikar infikované PLRV se projevily zpomalením růstu a tvorbou trsů metlovitého vzhledu již ve třetím týdnu po výsadbě. Po sedmi týdnech od výsadby

mezižilnatinová chloróza zachvátila listy napadených rostlin, které se člunkovitě stáčely a po smáčknutí vydávaly papírový zvuk.

Janet

Ve třetím týdnu po výsadbě bylo u jedné infikované rostliny s extinkční hodnotou 0,350 U pozorováno vrcholové stáčení listů. Ostatní rostliny se na pohled zdály svěží a zdravé. V pátém týdnu po výsadbě se již projevila slabá mezižilnatinová chloróza, v nízkém a středním patře lžícovité stáčení listů a ve vrcholových partiích člunkovité stáčení listů. V posledním termínu byly již listy zasaženy chlorózou kolem celého listu u všech infikovaných rostlin, včetně typického svinování listů, které po smáčknutí vydávaly papírový zvuk.

Karin

Odrůda Karin vykazovala stejné příznaky napadení PLRV v pátém i sedmém týdnu po výsadbě jako odrůda Claret pouze s tím rozdílem, že svinuté listy po smáčknutí praskaly a vydávaly typický papírový zvuk. Odrůdu Karin zasáhl z 1/4 patogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, a proto byla z dalšího vyhodnocování vyloučena.

KE 149/21

Ve všech hodnocených termínech nebyly pozorovány žádné symptomatické příznaky napadení PLRV, s výjimkou inhibice růstu. V pátém a sedmém týdnu po výsadbě byl pozorován u 3 rostlin výskyt Y virózy bramboru (*Potato virus Y*).

Marena

Odrůda Marena podobně jako KE 149/21 nevykazovala žádné příznaky napadení PLRV. Z důvodu většího napadení patogenem *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* musela být tato odrůda vyloučena z dalšího vyhodnocování.

Nancy

Infikované rostliny odrůdy Nancy vykazovaly ve třetím týdnu po výsadbě nižší růst. Již v pátém týdnu po výsadbě rostliny polehly a z 1/2 je napadl patogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Na několika infikovaných rostlinách PLRV se projevila velmi slabá chloróza mezižilnatiny bez svinování listů. Z důvodu vysoké destrukce rostlin vlivem patogena *Erwinia carotovora* byla odrůda Nancy vyloučena z dalšího vyhodnocování.

Princess

Ve všech termínech vyhodnocování infikované rostliny PLRV odrůdy Princess vytvářely nitkovité stonky. Od pátého týdne po výsadbě začaly spodní listy silně žloutnout, aby v sedmém týdnu chloróza zachvátila celé rostliny, které následně polehly.

Red Anna

Ve třetím týdnu po výsadbě 1/2 rostlin nevyrostla a v pátém týdnu po výsadbě zbylé rostliny zachvátil patogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, tudíž rostliny nemohly být symptomaticky vyhodnoceny, a tato odrůda musela být vyloučena z dalšího vyhodnocování.

Vladan

Odrůda Vladan během třetího a pátého týdne po výsadbě vypadala zdravě, bez příznaků napadení PLRV. První symptomy infekce PLRV se pozorovaly až v sedmém týdnu po výsadbě ve formě světlejší barvy listové plochy a menším vzrůstem u 4 rostlin s extinkčními hodnotami v rozpětí 1,3 – 2,5 U. Ostatní rostliny bez viditelných symptomů infekce PLRV. Pro větší napadení patogenem *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* byla tato odrůda vyloučena z dalšího vyhodnocování.

Westamyl

Již při prvním symptomatickém vyhodnocování se infikované rostliny oproti kontrole jevily nižším vzrůstem. Tato inhibice se potvrdila v dalších termínech hodnocení spolu s příznaky kadeření vrcholových listů, metlovitým vzrůstem a tvorby nepravidelných hnědých nekrotických

skvrn (Obr 18). V sedmém týdnu po výsadbě se jako další příznak napadení PLRV objevila chloróza mezižilnatiny. Pro silné napadení patogenem *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* byla tato odrůda vyloučena z dalšího vyhodnocování.

Vizuální symptomy napadení PLRV se u většiny hodnocených infikovaných odrůd objevily až v pátém týdnu po výsadbě. Největší intenzita byla však pozorována až v období sedmého týdne po výsadbě. Napadené rostliny různých odrůd PLRV se projevily inhibicí růstu, tvorbou nitkovitých stonků, prosvětlováním žilnatiny a postupnou chlorózou listové plochy od apikální části listů postupující kolem okrajů listů. Chlorotická diskolorace začínala nejdříve v nižších listových patrech, později i ve vyšších patrech a pomalu zachvacovala celé listy, které se pozvolna lžícovitě, a poté člunkovitě stáčely směrem nahoru kolem hlavního nervu. Některé stočené listy po smáčknutí vydávaly typický papírový zvuk. Na některých listech se po infekci PLRV vytvořily nepravidelné hnědé nekrotické skvrny, nebo antokyanizace listové nervatury a přiléhajícího pletiva. V několika případech bylo pozorováno vrcholové stáčení a kadeření listů. Trsy napadených rostlin měly často výrazný metlovitý vzhled. U každé odrůdy nějaké napadené rostliny nevykazovaly symptomy, jednalo se tedy o latentní infekci.

Četnosti napadení a průběh extinkce

Při hodnocení dvoufaktorovou analýzou rozptylu mezi jednotlivými odrůdami došlo v průměru za všechny tři hodnocení ke statisticky významnému rozdílu ve velikosti extinkce, avšak v četnosti napadení nikoliv (Tab. 2). Průměrné hodnoty extinkce nemají vypovídající hodnotu, neboť porovnávání odrůd podle tohoto kritéria postrádá smysl. Velikost extinkce však může poukázat na skutečnost, že u některých odrůd mohlo dojít k rychlejšímu šíření a množení patogena v hostitelské rostlině, což zřejmě souvisí s obrannými mechanizmy rostliny, nebo že některé vybrané hlízy obsahovaly ve své tkáni vyšší koncentraci viru, který se v průběhu růstu rostliny rychleji šířil a množil.

Tab. 2: Vliv odrůdy na velikost extinkce a počet napadených rostlin

Odrůda	Extinkce	Četnost
KE 149/21	0,5116 a	6,3333 a
Janet	0,5581 a	5,5556 a
Princess	0,6244 a	6,1111 a
Barbora	0,6635 ab	5,5556 a
Claret	0,6654 ab	5,7778 a
Ikar	1,0977 b	6,6667 a

Porovnávání vlivu termínu hodnocení na velikost extinkce a počet napadených rostlin udává Tab. 3. Na základě analýzy rozptylu bylo zjištěno, že rozdílné termíny hodnocení mají statisticky významný vliv na četnosti napadení. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že optimální termín pro detekci PLRV z listů rostlin je první termín, tedy třetí týden po výsadbě, neboť mezi tímto termínem a dalšími dvěma následujícími byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Závislost extinkčních hodnot na různých termínech detekce nebyla prokázána.

Tab. 3: Vliv termínu hodnocení na velikost extinkce a počet napadených rostlin

Termín	Extinkce	Četnost
I	0,8553 a	6,8333 b
II	0,6110 a	5,8333 a
III	0,5941 a	5,3333 a

Porovnávání extinkčních hodnot a četnosti napadení po jednotlivých termínech znázorňují Tab. 4, Tab. 5 a Tab. 6. V prvním termínu hodnocení nebyl statisticky významný rozdíl jak mezi extinkcemi odrůd, tak mezi četnostmi napadení (Tab. 4). U odrůdy KE 149/21, Princess a Claret se v jednom případě nepodařilo prokázat napadení PLRV, a tím došlo ke snížení průměrné četnosti napadení a potažmo i snížení průměrných extinkčních hodnot. Z těchto závěrů je zřejmé, že extinkce u tohoto neprůkazného napadení nepřesáhla hodnotu 0,200 U, což je limitní hranice pro bezpečné určení infekce PLRV. Extinkční hodnota 0,200 U je současně indukující hranice, kdy lze virus detekovat vizuálně při barevné změně substrátu.

Tab. 4: Velikosti průměrné extinkce a průměrné četnosti v I. termínu

Odrůda	Extinkce	Četnost
KE 149/21	0,6118 a	6,6667 a
Janet	0,7493 a	7,0000 a
Princess	0,5640 a	6,6667 a
Barbora	1,2421 a	7,0000 a
Claret	1,0055 a	6,6667 a
Ikar	0,9591 a	7,0000 a

Ve druhém termínu hodnocení se prokázal významný rozdíl mezi extinkcemi odrůd (Tab. 5). Odrůda Ikar se vyznačovala téměř trojnásobnými extinkčními hodnotami oproti odrůdám KE 149/21, Janet, Barbora a Claret. Stejně tak odrůda Princess měla vyšší hodnoty extinkce o více než polovinu před odrůdami KE 149/21, Janet, Barbora a Claret. V tomto termínu tedy došlo k rapidní změně koncentrace PLRV v rostlinách bramboru, kdy u odrůdy Ikar a Princess došlo k mírnému zvýšení koncentrace PLRV a u ostatních odrůd k prudkému poklesu koncentrace PLRV v porovnání s I. termínem hodnocení. Snížení hladiny průměrných extinkcí odrůd vedlo ke snížení četnosti napadení. Nejvíce patrné je to u odrůdy Barbora a Claret, kde se ve II. termínu nepodařilo prokázat napadení u 7 rostlin.

Tab. 5: Velikosti průměrné extinkce a průměrné četnosti ve II. termínu

Odrůda	Extinkce	Četnost
KE 149/21	0,4377 a	6,3333 a
Janet	0,4623 a	6,0000 a
Princess	0,7796 ab	6,6667 a
Barbora	0,3406 a	4,6667 a
Claret	0,4278 a	4,6667 a
Ikar	1,2178 b	6,6667 a

Ve třetím termínu hodnocení se rovněž nepodařilo statisticky prokázat rozdíl mezi extinkcemi odrůd a rozdíl mezi četnostmi napadení. Přesto lze z Tab. 6 vyhodnotit, že průměrné extinkce odrůd v porovnání s II. termínem zůstaly téměř shodné, pouze u odrůdy Barbora a Claret mírně narostly a jen v jednom případě extinkce klesla (odrůda Princess). Dále můžeme pozorovat závislost, kdy se u obou odrůd se zvyšující se extinkcí zvedl i počet průkaznosti napadení. Zajímavé pozorování je taktéž u odrůdy Janet, která měla nejmenší četnosti napadení, neboť se nepodařilo prokázat napadení u 10 rostlin.

Tab. 6: Velikosti průměrné extinkce a průměrné četnosti ve III. termínu

Odrůda	Extinkce	Četnost
KE 149/21	0,4855 a	6,0000 a
Janet	0,4626 a	3,6667 a
Princess	0,5296 a	5,0000 a
Barbora	0,4077 a	5,0000 a
Claret	0,5629 a	6,0000 a
Ikar	1,1161 a	6,3333 a

Hodnocení výšek rostlin

V rámci hodnocení výšek kontrolních a infikovaných rostlin se podařilo prokázat, že byl ve všech termínech statisticky průkazný rozdíl (Tab. 7). Infikované rostliny byly vždy minimálně o 1/3 nižší než zdravé rostliny. Ve třetím týdnu po výsadbě zaostávaly infikované rostliny v růstu o cca 8 cm a v pátém a sedmém týdnu shodně o cca 13 cm. Při symptomatickém hodnocení byl výškový rozdíl zaznamenán v pátém a sedmém týdnu po výsadbě (II – III termín), tudíž se rostliny dají v porostu podle tohoto kritéria detekovat, přesto je však možné zakrslost rostlin způsobenou virem PLRV snadno zaměnit za zakrslost způsobenou jinými faktory (např. faktor odrůdy, abiotické vlivy atd.).

Tab. 7: Průměrné výšky nemocných a kontrolních rostlin

Skupina	Termín		
	I	II	III
Nemocné	17,4365 a	34,3810 a	37,6984 a
Zdravé	25,1521 b	47,2336 b	50,6693 b

Diskuze

Příznaky napadení se projevily inhibicí růstu, chlorózou rostlin od špiček listů po zasažení celého jejich okraje a následným typickým člunkovitým stáčením listů kolem hlavního nervu směrem nahoru nejdříve spodního, později vyššího patra. Podobné symptomatické projevy napadení PLRV uvádějí i BENADA et al. (1958), JAYASINGHE (1988), ČAČA et al. (1990), TÁBORSKÝ & ŠEDIVÝ (1997), DĚDIČ (1998A), RASOCHA et al. (2004) a VOKÁL et al. (2004). Symptomy infekce PLRV se projevily převážně až po pěti týdnech od výsadby. Můžeme potvrdit i závěry, že ochořelé listy jsou někdy nafialovělé a při smáčknutí praskají a vydávají typický papírový zvuk, což uvádějí BENADA et al. (1958), JAYASINGHE (1988), RASOCHA et al. (2004) a VOKÁL et al. (2004). Stejně tak dokládáme výsledky totožné s BENADOU et al. (1958), kdy na špičkách listů vznikají nepravidelné hnědé nekrotické skvrnky. Podle JAYASINGHEHO (1988), RASOCHY et al. (2004) a VOKÁLA et al. (2004) mají trsy často nápadný metlovitý vzhled, což se nám podařilo potvrdit také. Podle JAYASINGHEHO (1988) je intenzita příznaků napadení PLRV závislá na odrůdě a prostředí, kdy některé odrůdy nevykazují symptomy (latentní infekce) a PLRV není možné detekovat v porostu vizuálně. Ke stejným závěrům jsme došli i my, a to s tím rozdílem, že u každé odrůdy některé napadené rostliny PLRV nevykazovaly symptomy. Jednalo se o rostliny obsahující ve své tkáni různé množství viru. Nelze tedy jednoznačně určit jakýkoli vztah extinkčních hodnot s projevem příznaků, neboť symptomy nevykazovaly rostliny jak s nízkou hodnotou extinkce, tak rostliny s vysokou hladinou extinkce

(nad 2,000 U). Výsledky též potvrzují časté maskování příznaků onemocnění rostlin bramboru PLRV ve skleníkových podmínkách

Porovnávání velikosti průměrných extinkčních hodnot mezi jednotlivými odrůdami může vypovědět o jejich specifické náchylnosti k PLRV. Odrůda Ikar měla téměř dvojnásobnou průměrnou extinkční hodnotu před ostatními odrůdami. Je tedy možné, že tato odrůda má též vyšší stupeň náchylnosti nežli ostatní odrůdy. Tomu odpovídá rovněž vysoká četnost výskytu PLRV v porostech této odrůdy. Jak uvádí ATABEKOV et al. (1984), BARKER (1987) a BARKER, (1989), šíření PLRV v nefloemové tkáni může být stimulováno, jestliže jsou rostliny společně nakaženy dalšími viry. V naší práci jsme se zaměřili pouze na hodnocení průkaznosti PLRV v různých termínech, a proto tento závěr nemůžeme potvrdit. Je ale také možné, že odrůda Ikar měla ve tkáni hlíz mnohem vyšší koncentraci viru, který se následně po růstu rostliny a příznivým podmínkám rychleji množil.

Při porovnávání termínů hodnocení četnosti detekce napadení, resp. porovnávání průkaznosti napadení, bylo zjištěno, že nejvhodnější termín pro detekci PLRV z listu rostlin je v rannějších termínech po výsadbě, kdy se podařilo prokázat největší četnosti napadení a zároveň se ve tkáních rostlin detekovala nejvyšší koncentrace viru. Tomu odpovídá též zvýšení počtu vizuálně reagujících rostlin, i když počet rostlin infikovaných PLRV, ale bez vizuálních příznaků ve skleníku může být stále poměrně vysoký. Koncentrace viru v rostlině při hodnocení v pátém týdnu po výsadbě rapidně klesla (s výjimkou odrůdy Ikar a Princess) a v sedmém týdnu víceméně stagnovala. Znamená to tedy, že okolo třetího týdne po výsadbě koncentrace viru v rostlinách kulminovala a později klesala a stagnovala. S hodnotami extinkce úzce korelovaly i zjištěné četnosti napadení. Ve třetím týdnu po výsadbě se pouze u třech odrůd nepodařilo prokázat napadení u jedné rostliny. V pátém týdnu po výsadbě se již nepodařilo prokázat v průměru více jak 3 napadení, nejvíce však u odrůdy Barbora a Claret, kde se neprokázalo napadení shodně u 7 rostlin. V sedmém týdnu po výsadbě se nepodařilo prokázat napadení v průměru u 5 rostlin na každou odrůdu, avšak nejvíce napadení se nezdařilo dokázat u odrůdy Janet, a to ze 47,6 %. Z výše uvedeného vyplývá, že při hodnocení výskytu PLRV ve třetím týdnu po výsadbě se prokáže nejvíce napadení rostlin s relativně nízkou chybou. Naproti tomu dle metodiky Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZUZ) se doporučuje diagnostika virů bramboru pomocí metody ELISA za 5 – 6 týdnů po výsadbě. Nutno je však dodat, že pro definitivní závěry, nebo pro komplexní doporučení přehodnocení metodiky by bylo třeba pokus ještě zopakovat a možná i rozšířit základní soubor, abychom dostali více dat.

V rámci hodnocení výšek kontrolních a infikovaných rostlin se podařilo prokázat, že infikované rostliny se vyznačují nižším růstem, a to zpravidla o třetinu. Jak popisuje BENADA et al. (1958), JAYASINGHE (1988), ČAČA et al. (1990), TÁBORSKÝ & ŠEDIVÝ (1997), DĚDIČ (1998A), RASOCHA et al. (2004) a VOKÁL et al. (2004), sekundární příznaky inhibice růstu je možné zaznamenat již na rostlinách vysokých 15 centimetrů.

ZÁVĚR

Metoda DAS ELISA a její modifikace jsou v současné době téměř výlučnou metodou pro sériovou detekci PLRV. Na celém světě jsou každoročně využívány miliony analýz pro detekci všech hlavních virů bramboru, včetně PLRV za použití této metody. Detekční prahový extinkční limit na úrovni 0,200 U (při absorbanzi A405 nm) zpravidla plně vyhovuje. Z našich výsledků analýzy jednotlivých termínů vhodných pro detekci PLRV z listů rostlin vyplývá, že se jako optimální termín pro detekci jeví třetí týden po výsadbě. Tento termín byl nejúčinnější, neboť ze sledovaných vzorků se podařilo prokázat 97,6 % pozitivních detekcí. V pátém týdnu po výsadbě tomu bylo již 83,3 % pozitivních detekcí a konečně v sedmém týdnu po výsadbě pouze 76,2 % pozitivních detekcí. Současně je na tomto místě třeba poukázat ještě na skutečnost, že ve třetím týdnu po výsadbě byly také detekovány nejvyšší extinkční hodnoty. Proměnlivost extinkčních hodnot, a tedy koncentrace viru ve tkáních rostlin při různé době hodnocení pravděpodobně závisí i na řadě faktorů, jako je teplota při pěstování rostlin, stáří rostlin, na translokaci, lokalizaci viru a zároveň na obranných mechanismech rostliny. Tyto faktory však mohou mít výrazný negativní vliv na spolehlivost detekce PLRV a vůbec všech virů bramboru. Proto je nezbytné pro spolehlivost diagnózy uplatnit vlastní postupy přípravy diagnostických souprav s výběrem kvalitních a účinných protilátek, jež mají zásadní význam pro spolehlivost laboratorní diagnózy.

Z výsledků hodnocení výšek rostlin jednoznačně vyplývá, že infikované rostliny se projevují inhibicí růstu zpravidla o 1/3.

Společně s inhibicí růstu se infikované rostliny projevily postupnou chlorózou listové plochy, pozvolným lžícovitým a člunkovitým stáčením listů kolem hlavního nervu, které po smáčknutí vydávaly typický papírový zvuk. V některých případech se infekce projevila tvorbou nepravidelných hnědých nekrotických skvrn a antokyanizací listové nervatury a přiléhajícího pletiva. Trsy napadených rostlin měly často nápadný metlovitý vzhled. Neméně důležité je odhalení latentní infekce, která byla pozorována u každé odrůdy na několika rostlinách s různou hladinou extinkce, a proto je obtížné určit jakýkoli vztah extinkčních hodnot s intenzitou symptomů. Proto je nezbytné využívat na úseku virologie pro sériovou kontrolu sadby brambor především metodu ELISA, která je při volbě správné diagnostické soupravy a vhodných protilátek spolehlivá a doposud nepřekonaná.

LITERATURA

ATABEKOV J. G., TALIANSKY M. E., DRAMPYAN A. H., KAPLAN I. B., TURKA I. E. (1984): Systemic infection by a phloem – restricted virus in parenchyma cells in mixed infection. Russian. *Biologicheskije nauki*. 10: 28 – 31.

BARKER H. (1987): Invasion of non – phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by *potato leafroll luteovirus* is enhanced in plants also infected with *potato Y potyvirus*. *Journal of General Virology*. 68: 1223 – 1227.

BARKER H. (1989): Specificity of the effect of sap – transmissible viruses in increasing the accumulation of luteoviruses in co – infected plants. *Annals of Applied Biology*. 115: 71 – 78.

BENADA J., BRÜCKNER F., DRACHOVSKÁ-ŠIMANOVÁ M., DRBAL J., KŘÍŽ J., KVÍČALA B., MRÁZ F., MÜLLER J., NOVÁKOVÁ-PFEIFEROVÁ J., RATAJ K., SKALICKÝ V., VIELWERTH V., VOŘÍŠEK V., ZACHA V. (1958): *Zemědělská fytopatologie: choroby polních plodin*. SZN Praha: 775 s.

ČAČA Z., DUŠEK J., ŘÍMOVSKÝ K., SVÍTIL J. (1990): *Ochrana polních a zahradních plodin*. SZN Praha: 362 s. ISBN 80-209-0171-X

DĚDIČ P. (1998): *Virové choroby brambor – současný stav řešení v České republice*. Úroda. XXXXVI (11): příloha 19 – 21. ISSN 0139-6013

JAYASINGHE U. (1988): *Potato leafroll virus PLRV*. Technical information Bulletin 22. International Potato Center Lima Peru: 21 s.

RASOCHA V., HAUSVATER E., DOLEŽAL P. (2004): *Choroby škůdci a abionózy bramboru*. Vydáno samostatně jako příloha měsíčníku *Agro – Ochrana, výživa, odrůdy*. Orin České Budějovice: 74 s. ISSN 1211 – 362 X

TÁBORSKÝ V., ŠEDIVÝ J. (1997): *Rostlinolékařství*. Credit Praha: 347 s. ISBN 80-902295-2-2

VOKÁL B., ČEPL J., ČÍŽEK M., DIVIŠ J., DOMKÁŘOVÁ J., FÉR J., HAMOUZ K., HAUSVATER E., JÚZL M., RASOCHA V., ZRŮST J. (2004): *Pěstování brambor*. Agrospoj Praha: 261 s.