

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Příručka NRL OS	Vydání: 2 Str. 1-1–3-26
---	--------------------------	---

Metodika zkoušení osiva a sadby

2. část

Nabývá účinnosti dne

1. 7. 2016

Revidována dne

3. 1. 2024

Upozornění

Tento dokument včetně příloh je výhradně duševním vlastnictvím Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského.

Jakékoliv další využití (kopírování, opisování, předávání či prodej) lze provádět pouze se souhlasem ředitele Ústavu.

	Zpracoval:	Revidoval:	Schválil:
Jméno:	Ing. Jitka Chadová odborný referent	Ing. Jitka Rybová manažer kvality NRL OS Ing. Vladislava Gregorová vedoucí NRL OS	Ing. Barbora Dobiášová ředitelka Odboru osiv a sadby

Změnový list

Datum účinnosti	Oprava (kapitola, strana, odůvodnění)	Schváleno (datum, podpis)	Vypracováno (datum, podpis)	Distribuce (web, zápis z porady)
2. 1. 2019	Kap. 2 – přesunuta z 1. části Metodiky zkoušení osiva a sadby do 2. části			
2. 1. 2019	Kap. 3 – vložena do Metodiky zkoušení osiva a sadby, 2. část (revidovala ing. Jitka Ulrichová)	2. 1. 2019 Ing. Barbora Dobiášová	2. 1. 2019 Ing. Jitka Ulrichová	Web, školení
5.5.2020	Kap. 3.2 – úprava Postup při rozboru, str. 3-2 Kap. 3.2 – úprava tabulky č. 2, str.3-3 Vada č. 1 – úprava popisu str. 3-4 až 3-7 Vada č. 2 – úprava popisu str. 3-8 Vada č. 4 – úprava popisu str. 3-10 Vada č. 11 – vložení obrázek <i>Meloidogyne fallax</i> str. 3-20 Příloha č. 3 – úprava tabulky str 3-29 Kap. 3 –vloženo: Vada č. 7 <i>CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM</i> Vada č. 8 HÁDÁTKO HLÍZOVÉ Kap. 3 – Přečíslováno: Vada č. 9 PŘÍMĚS ZEMINY A JINÝCH NEČISTOT Vada č. 10 HLÍZY JINÝCH ODRŮD A ODCHYLNÝCH TYPŮ Vada č. 11 ŠKODLIVÉ ORGANISMY, KTERÉ JE ZAKÁZÁNO ZAVLÉKAT A ROZŠÍŘOVAT NA ÚZEMÍ EVROPSKÉ UNIE	5. 5. 2020 Ing. Barbora Dobiášová	5. 5. 2020 Ing. Jitka Ulrichová	Web, školení
3.1.2022	Celá Metodika zkoušení osiv a sadby 2. část byla upravena (došlo ke změně stránkování u jednotlivých kapitol) a byly opraveny a doplněny drobné změny v textu.	3.1.2022 Ing. Barbora Dobiášová Ing. Vladislava Gregorová <i>podepsáno elektronicky</i>	3.1.2022 Ing. Jitka Rybová <i>podepsáno elektronicky</i>	DMS
3.1.2023	Kap. 3.1, str. 1 – změna maximálního množství na 50 tun Kap. 3.5, str. 25, Příloha 1 – změna návěsek	3.1.2023 Ing. Barbora Dobiášová Ing. Vladislava Gregorová <i>podepsáno elektronicky</i>	3.1.2023 Ing. Jitka Rybová <i>podepsáno elektronicky</i>	DMS
3.1.2024	Kap. 2, str. 1 – oprava Tab. 1 Kap. 2.2, str. 1-2 – oprava textu Kap.3, str. 2 – oprava textu v Tab. 2 Kap. 3.3, str. 3-20 – úprava textu pro lepší přehlednost Kap. 3.4.4, str. 21-24 – oprava celé metody elektroforézy u brambor	3.1.2024 Ing. Barbora Dobiášová Ing. Vladislava Gregorová <i>podepsáno elektronicky</i>	3.1.2024 Ing. Jitka Rybová <i>podepsáno elektronicky</i>	DMS

2 Obsah

1	Obsah	1-1
2	Zkoušení a posuzování cibulové sazečky a sadby česneku	2-1
2.1	Posuzování vzhledu sadby.....	2-1
2.2	Laboratorní rozbor	2-1
2.3	Oznamování výsledků	2-2
3	Zkoušení a posuzování sadby brambor	3-1
3.1	Vzorkování	3-1
3.2	Postup při rozboru vzorku	3-1
3.3	Definice a popis jednotlivých vad	3-3
	Vada č. 1 MĚKKÁ HNILOBA	3-3
	Vada č. 1 SUCHÁ HNILOBA	3-5
	Vada č. 2 VLOČKOVITOST HLÍZ	3-7
	Vada č. 3 STRUPOVITOST BRAMBORU	3-8
	Vada č. 4 PRAŠNÁ STRUPOVITOST BRAMBORU	3-9
	Vada č. 5 SCVRKLÉ HLÍZY	3-10
	Vada č. 6 VNĚJŠÍ VADY ZPŮSOBENÉ MECHANICKY NEBO ŠKŮDCI, HLÍZY POŠKOZENÉ MRAZEM A ZAPAŘENÍM	3-11
	Vada č. 7 <i>CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM</i>	3-14
	Vada č. 8 HÁDÁTKO HLÍZOVÉ.....	3-15
	Vada č. 9 PŘÍMĚS ZEMINY A JINÝCH NEČISTOT	3-16
	Vada č. 10 HLÍZY JINÝCH ODRŮD A ODCHYLNÝCH TYPŮ	3-16
	Vada č. 11 ŠKODLIVÉ ORGANISMY, KTERÉ JE ZAKÁZÁNO ZAVLÉKAT A ROZŠÍŘOVAT NA ÚZEMÍ EVROPSKÉ UNIE.	3-16
3.4	Doplňkové zkoušky	3-19
3.4.1	Zkouška klíčivosti	3-19
3.4.2	Hodnocení klíčků pro stanovení odrůdové čistoty a pravosti	3-19
3.4.3	Vegetační zkouška	3-19
3.4.4	ELFO brambory (Metoda pro ověřování pravosti odrůd brambor pomocí PAGE dle UPOV)	3-21
3.5	Přílohy	3-25
	Příloha č. 1 Vzor návěsky	3-25
	Příloha č. 2 Maximální hmotnost partie, minimální velikost laboratorních vzorků, zkušebních vzorků a vzorků na vegetační zkoušky	3-25
	Příloha č. 3 Výsledek mechanického rozboru sadby brambor	3-26

2 Zkoušení a posuzování sadby cibule a česneku

Tab. 1: Seznam druhů, minimální hmotnost partie, minimální hmotnost nebo velikost laboratorních vzorků a vzorků na vegetační zkoušky sadby

Druh (česky)	Druh (latinsky)	Minimální hmotnost partie	Minimální hmotnost nebo velikost laboratorního vzorku	Minimální hmotnost vzorku na vegetační zkoušku
1	2	(kg)	(kg) nebo (ks)	(ks)
		3	4	5
cibule sazečka, cibule šalotka	<i>Allium cepa</i> ,	5 000 (10 000) *	1 kg (80 g) *	80 cibulí (70) *
česnek	<i>Allium sativum</i>	2 500 (10 000) *	100 ks (20 g) *	120 cibulí (20) *

* V závorkách jsou uvedeny hodnoty dle ISTA pravidel, jsou-li odlišné od hmotností podle předpisů EU.

2.1 Posuzování vzhledu sadby

U zkoušeného vzorku se nejprve subjektivně posuzují tyto znaky:

- celkový stav (rozpadavost cibulí, úprava apod.);
- vyrovnanost;
- odrůdová pravost a čistota (tvar a barva cibulí a hlíz);
- vlhkost - omakem.

Při hodnocení celkového stavu se vychází z toho, že sadba musí být suchá, vyžralá, v krčku zatažená, zbavená přebytečných slupek a kořínků, neporostlá. Kořínky a nat' mají být zaschlé a odrolené. Úprava, velikost a příměs jiných odrůd a zřetelně odchylných typů musí vyhovovat požadavkům vyhlášky č. 129/2012 Sb., o podrobnostech uvádění osiva a sadby pěstovaných rostlin do oběhu, ve znění pozdějších předpisů.

2.2 Laboratorní rozbor

Laboratorním rozbohem se podle potřeby stanoví objektivně:

- čistota (jen sazečka cibule);
- cibule naklíčené a mechanicky poškozené;
- neškodné nečistoty, např. hrudky, kamínky (jen u cibulové sazečky).
- velikostní třídění (jen sazečka cibule a echalion);
- cibule jiných odrůd a zřetelně odchylných typů
- cibule rozvité a porostlé;
- cibule - délka suché natě a délka kořínků;
- cibule napadené škodlivými organismy a příznaky chorob;

2.2.1 Postup při rozboru cibulové sazečky

Z průměrného vzorku 1000 g se připraví dva zkušební vzorky, každý o hmotnosti 500 g. Vzorky se prosévají na Steineckerově prosévadle 3 minuty na sítích s podélnými otvory o šířce odpovídající předepsanému velikostnímu třídění (podle nejmenšího příčného průměru).

Z jednotlivých podílů velikostního třídění se vyberou nečistoty a spojí se do těchto skupin:

- cibule naklíčené - za naklíčené se považují také cibule, u nichž se vegetační vrchol objeví v nezataženém krčku, aniž by přerostl cibuli;
- cibule poškozené;
- neškodné příměsi - prach, hrudky apod.
- cibule napadené suchou nebo mokrou hnilobou - nejméně 50 % cibulí se na krčku oloupe, aby se zjistila krčková hniloba;

Tyto skupiny se samostatně zváží. Velikostní podíly se zváží po odstranění nečistot. Přibližně 10 % cibulí se příčně překrájí pro zjištění zdravotního stavu. Některé cibule během zimy nestejnoměrně vysychají, takže na řezu mezi jednotlivými suknicemi je vzduchová mezera. Tyto cibule se sice jeví hmatem jako změkklé (fyziologicky), avšak považují se za čisté. Procento čistoty a procenta nečistot se počítají ze součtu hmotností všech podílů. Třídění, tj. procentuální zastoupení jednotlivých velikostních podílů, se počítá ze součtu hmotností čistých cibulí.

2.2.2 Postup při rozboru sadby česneku

Zkouší se 100 cibulí a jednotlivé složky se zde stanovují početně, nikoliv hmotnostně.

Nejprve se zjistí podsadba na kruhovém měřidle (měří se v největším příčném průměru), dále cibule rozvité a porostlé. Pak se všech 100 cibulí zbaví vnější obalové slupky, aby se zjistila okrajová (povrchová hniloba), způsobená většinou poškozením. Za mechanicky poškozené se považují cibule s okrajovými stroužky napadenými hnilobou maximálně do poloviny stroužků na příčném řezu. Všechny cibule se příčně rozřežou nožem z nerezové oceli a z deseti cibulí se namátkově stanoví průměrný počet stroužků v cibuli.

Při řezání se oddělují cibule se stroužky mechanicky poškozenými a cibule napadené hnilobou. Za hnilobnou se považuje cibule s jedním nebo s více napadenými vnitřními stroužky (viz poznámka). Cibule s okrajovými stroužky napadenými více než do poloviny (posuzováno na řezu) hnilobou se považují při rozboru na podzim a v zimě jako hnilobné, na jaře od 1. února jako mechanicky poškozené (stroužky jsou většinou napadené penicillinem).

Výpočet procent: každá cibule napadená hnilobou, se počítá vždy jako jedno procento. Mechanicky poškozené stroužky se sečtou, vydělí se průměrným počtem stroužků v cibuli a získá se procento cibulí mechanicky poškozených.

Poznámka:

Hniloby jsou způsobeny houbou **Stromatinia cepivorum**, bakterií **Pseudomonas fluorescens**, hád'átkem **Ditylenchus dipsaci** (houbovitá až rozbředlá dužnina stroužku, při silném napadení se snadno oddělují kořínky od cibule), roztočem **Aceria tulipae** (stroužek posátý, matný, na řezu zažloutlý, sklovitý, postupně sesychající, s vyhnívajícím vegetačním vrcholem. Škodí také trásněnka rodu **Thysanoptera** (posátí) a moucha rodu **Delia** požerky v larválním stádiu vývoje. Všechny viry a virům podobné organismy, zejména **Onion yellow dwarf virus** a **Leek yellow stripe virus**, patří mezi sledované patogeny. Hniloby se posuzují makroskopicky, ve sporných případech se ověří mikroskopicky. Stanovení hád'átka se provádí vyplavováním metodou a stanovení houbových chorob se provádí ve vlhké komůrce.

2.2.3 Stanovení odrůdové pravosti a čistoty

Zjistí-li se ve zkušebním vzorku druhová nebo odrůdová příměs (odlišná barva, velikost a tvar neodpovídající popisu odrůdy), stanoví se procentuální příměs početně z dalších 100 kusů odebraných cibulí, u cibulové sazečky hmotnostně z celého průměrného vzorku, popř. se prohlédne celá partie. Ve sporných případech rozhoduje výsledek vegetační zkoušky.

2.2.4 Hodnocení délky suché natě a délky kořínků

U cibulí sazečky cibule echalionu a šalotky se měří délka suché natě a kořínků v cm a výsledek se uvede jako hmotnostní podíl cibulí s délkou suché natě a kořínků delších, než stanoví Vyhláška č. 129/2012 Sb., v %. Zkouší se vzorek o hmotnosti 1000 g.

U česneku se zkouší 100 cibulí, měří se délka suché natě a kořínků. Jako výsledek se uvede % cibulí s délkou suché natě a kořínků delších, než stanoví Vyhláška č. 129/2012 Sb.

2.2.5 Hodnocení výsledků zkoušek

Přesahuje-li při kontrole dodávky některý podíl kromě třídění (hniloba, naklíčené, poškozené cibule) hodnotu povolenou ve Vyhlášce č. 129/2012 Sb. příloze č. 14 k, použije se tolerance v Tab. 2.

Tab. 2: Tabulka tolerancí

Hodnota dle vyhlášky (%)	Tolerance (%)
1	0
2-4	1
5-9	2
10-14	3
15-20	4

Přesahují-li rozbořem zjištěné závady hodnotu povolenou vyhláškou o více než je v toleranci, považuje se dodávka za vadnou.

2.3 Oznamování výsledků

Procentuální zastoupení jednotlivých podílů se uvádí v rubrice „Další stanovení.“

3 Zkoušení a posuzování sadby brambor

3.1 Vzorkování

Vzorky sadby se odebírají dle vyhlášky č. 61/2011 Sb., kterou se stanoví požadavky na odběr vzorků, postupy a metody zkoušení osiva a sadby, ve znění pozdějších předpisů:

- k ověření pravosti odrůdy, kdy pravost se zkouší minimálně na 10 hlízách, odchylné typy a jiné odrůdy minimálně na 100 hlízách;
- pro posouzení sledovaných vad, kdy hmotnost průměrného vzorku musí být nejméně 25 kg (dle vyhlášky č. 61/2011 Sb.);
- pro doplňkové zkoušky;
- v případě reklamace dodané sadby.

Partie sadby připravená ke vzorkování může být uložena v pytlích, velkoobjemových vacích, ohradových paletách nebo může být volně ložená. U volně ložené sadby, případně u velkoobjemových vaků, kdy nebude možné odebrat zkušební vzorek po konečné úpravě, vzorkovatel odebere dílčí vzorky v průběhu třídění. V těchto případech dodavatel oznámí termín zahájení třídění vzorkovateli nejméně 24 hodin předem. Obaly budou pod dozorem vzorkovatele opatřeny úřední návěškou a pojistkou; u volně ložené sadby je návěška přiložena k průvodnímu dokladu.

Odběr vzorků sadby na zjištění sledovaných vad:

- pro uznávací řízení se provádí po vytřídění sadby, po uložení do konečných obalů a adjustaci z volně ložené sadby, případně v průběhu třídění. Četnost odběru dílčích vzorků se řídí Tab. 1;
- dílčí vzorky se odebírají ručně hrstěmi - sevřením obou rukou, bez výběru (včetně hrubých nečistot), aby vzorek reprezentoval průměrný stav vzorkované sadby;
- odběr vzorků pro uznávací řízení je odmítnut v případě, že není možné dodržet postup dle této metodiky;
- laboratorní - zkušební vzorek může být odebrán z partie maximálního množství 50 t ($\pm 5\%$) a jeho hmotnost je minimálně 25 kg;
- je-li sadba, která má být vzorkována nejednotná a různorodá, odebere se vzorek k určení odrůdové čistoty, v případě podezření na záměnu odrůdy, pak vzorek na odrůdovou pravost;
- pokud se rozbor vzorku neprovede na místě, zasílá se k rozboru v obalech, které musí být suché, čisté a dobře prodyšné a označeny podle vzoru uvedeného v příloze č. 1. Obaly zajišťuje dodavatel.

Tab. 1

Uložení sadby	Počet dílčích vzorků	Četnost odběru dílčích vzorků
Malé obaly (do 50 kg)	10	z 10ti náhodně vybraných obalů, střídavě z horní, střední a dolní části, 3 pytle se musí úplně vysypat
Velké obaly	5	z 5ti náhodně vybraných obalů a to 2 z horní, 2 ze střední a 1 ze spodní části (1x bude obal úplně vysypán)
Volně ložená sadba	10	z 10ti stejnoměrně rozložených míst, střídavě z horní dolní a spodní vrstvy
V průběhu třídění	15	15 odběrů po vytřídění a před uložení do konečných obalů v celém průběhu přípravy partie

3.2 Postup při rozboru vzorku

Mechanický rozbor sadby brambor

Cílem zkoušky je stanovení hmotnostního procenta jednotlivých vad zkoušeného vzorku, ze kterého lze odvodit kvalitativní složení partie sadby. Mechanický rozbor se provádí před vlastní expedicí sadby.

Postup práce

Procentuální podíl jednotlivých vad se vždy počítá z celkové hmotnosti vzorku. Každá hlíza se posuzuje jednou, a to podle závažnosti vady, v pořadí uvedeném v Tab. 2. Při rozboru se postupuje v těchto po sobě následujících krocích:

- Před zahájením mechanického rozboru se celý vzorek zváží a zjistí se hmotnost čisté sadby ve vzorku. Pokud jsou hlízy silně znečištěné, operou se po předchozím mechanickém očištění hrubých nečistot, po uschnutí se čisté hlízy opět zváží a rozdíl hmotností se počítá do příměsí zeminy a jiných nečistot.
- Posoudí se pravost a čistota odrůdy podle vnějších znaků na hlízách.
- Zkontroluje se velikostní třídění,
 - hlízy nadsadbové nejvýše 3 %,
 - hlízy podsadbové nejvýše 3 %,

stanovuje se čtvercovým měřidlem s otvory o minimálním rozměru 25 x 25 mm a maximálním rozměru 60 x 60 mm; v případě použití sít větších než 35 mm je rozdíl mezi sítí dělitelný číslem 5; maximální rozdíl velikosti hlíz v rámci jedné partie je 25 mm.

V jedné partii sadby musí být zastoupeny hlízy všech velikostí ve vyrovnaném poměru.

- Posoudí se vady na povrchu hlíz a podle nich se hlízy vytřídí (dle Tab. 2 vady 1-8).
- Ke zjištění vad na řezu se rozřeže 100 hlíz, pokud se některá z vad zjistí, je nutné zkontrolovat řezem všechny hlízy zkoušeného vzorku.
- Hlízy rozdělené podle jednotlivých vad se zváží s přesností na 0,1 kg, zaznamenají se a na závěr se provede konečný výpočet procentických podílů jednotlivých vad.
- Zjištěné výsledky se zaznamenají do Přílohy č. 3: Výsledek mechanického rozboru sadby brambor.
- Procenta jednotlivých podílů se počítají na jedno desetinné místo. Základem výpočtu je vždy původní hmotnost zkušebního vzorku.

Tab. 2

Číslo vady	Vada
1	Měkká a suchá hniloba hlíz
2	Vločkovitost hlíz bramboru
3	Strupovitost bramboru
4	Prašná strupovitost bramboru
5	Scvrklé hlízy
6	Vnější vady způsobené mechanicky nebo škůdci, hlízy poškozené mrazem a zapařením
7	<i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i>
8	Hád'átko hlízové
9	Příměs zeminy a jiných nečistot
10	Hlízy jiných odrůd a odchylných typů
11	Škodlivé organismy, které je zakázáno zavlékat a rozšiřovat na území Evropské unie
Nelimitované choroby a škůdci	

Oznamování výsledků

Výsledky mechanického rozboru jsou součástí uznávacího listu nebo rozhodnutí.

3.3 Definice a popis jednotlivých vad

Vada č. 1	MĚKKÁ HNILOBA
Původce:	<i>Pectrobacterium</i> spp. <i>Dickeya chrysanthemi</i> <i>Pythium</i> spp. <i>Geotrichum candidum</i> <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Phytophthora erythroseptica</i> a další
Zdroj infekce:	půda, rostlinné zbytky
Příznaky:	Hlízy jsou mokvající a zapáchající. Původci se vyskytují v půdě. Hlízy jsou infikovány prostřednictvím mechanického poškození při sklizni.

Bakteriální černání stonků a měkká hniloba (*Pectrobacterium*, *Dickeya* atd.)

Rostliny jsou zakrslé. Listy jsou strnulé a přímé. Báze stonku černá, vodnatá, stonek se láme a lze snadno vytrhnout z půdy. Na hlízách měkká, nahnědlá bílá hniloba. Postižená oblast je často ohraničena tmavým okrajem, zapáchá. Výskyt ve vlhčích podmínkách, chladné počasí více vyhovuje *Pectrobacterium* a teplé *Dickeya*.



Vodnatá hniloba (*Pythium*)

Hnilobu způsobují houby rodu *Pythium* vyskytující se v půdě. K infekci hlíz dochází příležitostně při vyšším výskytu původců v půdě a při sklizni nad 20 °C, pokud jsou hlízy mechanicky poškozeny. Projevuje se rychlým rozkladem hlíz na mokrou vodnatou hnilobu bezprostředně po sklizni.



Plíseň bramboru (*Phytophthora infestans*)

Plíseň bramborová napadá hlízy ve vegetaci. K infekci hlíz může dojít i při sklizni, kdy se dostanou do styku poškozené hlízy a napadená nať nebo silně kontaminovaná půda. To se stává obvykle jen při časných sklizních porostů s výskytem plísně v nati, kde nebyla nať desikována nebo mechanicky včas zničena.

Ve vegetaci jsou hlízy infikovány sporangii smývanými srážkami z napadené natě do půdy. Příznaky na hlízách se objevují nejdříve za týden, obvykle však později v závislosti na teplotě a intenzitě infekce. Infikované hlízy mají na slupce obvykle rozsáhlé olovnatě šedé, nepravidelné skvrny. Na řezu pod těmito skvrnami je dužnina rezavě zbarvena a toto zbarvení proniká postupně (stromečkovitě) do hloubky. Někdy se napadení šíří jen mělce pod slupkou. Na hlízách se projevuje nejprve jako suchá hniloba, která přechází v mokrou.

**Růžová hniloba bramboru (*Phytophthora erythroseptica*)**

Tato choroba způsobuje rozklad hlíz na poli a při skladování se vyskytuje nejčastěji ve vlhkých a teplých půdách. Patogen vstupuje do hlíz z infikovaných stolonů, ale v půdách nasycených vodou může vstupovat rozšířenými lenticelami nebo ranami vznikajícími během sklizně. Jak se choroba vyvíjí, postupuje hlízou a zanechává přitom zřetelné tmavé čáry. Jak hniloba pokračuje, hlíza zůstává celistvá, ale dužnina se stává měkkou a houbovitou. Hniloba je prostá zápachu. Při manipulaci s hlízou vytéká čirá tekutina. Hniloba přežívá v půdě buď ve formě houbového mycelia, nebo rezistentních oospor.



Vada č. 1	SUCHÁ HNILOBA
Původce:	<i>Alternaria</i> spp. <i>Fusarium</i> spp. <i>Phoma foveata</i> <i>Phytophthora infestans</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Zdroj infekce:	půda, rostlinné zbytky
Příznaky:	Hlízy bramboru po sklizni hnijí suchou hnilobou – scvrkávají se, slupka se propadá, objevují se i dutiny, v místě nekrotizovaného mycelium (bělavé, růžové, žlutavé).

Fusariová hniloba bramboru (*Fusarium* spp.)

Výskyt a rozšíření hlavně v listopadu a prosinci. Slupka se na povrchu nepravidelně svažuje. Po řezu je napadené pletivo světle až tmavohnědé, později se objevuje viditelné mycelium. Od místa infekce se vytváří dutiny. Příznakem napadení hlíz jsou koncentricky zvrásněné nekrotické skvrny na slupce, později s výskytem mycelia bílé, žluté nebo růžové barvy. V pokročilejším stadiu hniloby se mohou přidružovat další saprofytické druhy fusarií. Hniloba hlíz způsobená fusarií se projevuje na řezu hlíz vrstevnatou destrukcí napadené dužniny, obvykle s bílým myceliem a někdy s malými dutinami. Při zvýšené vlhkosti ve skladu (potní vrstva, nedostatečné větrání, nadměrné množství zeminy a nedostatek vzduchu) dochází obvykle k sekundárnímu napadení bakteriemi a rozklad hlíz je dokončen měkkou hnilobou vyvolanou bakteriemi. Při dostatečném větrání napadené hlízy mumifikují.



Fomová hniloba bramboru (*Phoma foveata*)

Objevuje se při chladném a vlhkém počasí v závěru vegetace a v období sklizně. Houba napadá stonky i hlízy. Na bázích odumírajících stonků jsou podélné nekrotické skvrny s pyknidami, v nich se tvoří spory, které jsou smývány do půdy a kontaminují hlízy. K infekci hlíz pak dochází při mechanickém poškození a napadení je podporováno nízkými teplotami. Choroba se šíří především napadenou a kontaminovanou sadbou. Na slupce se tvoří propadlé nekrotické skvrny, které se postupně zvětšují. Povrch skvrn je hladký nebo nepravidelně zvrásněný, někdy s tmavými pyknidami na povrchu. Pod nekrotizací se v dužnině postupně vytvářejí dutiny pokryté fialově šedým myceliem s černými pyknidami. Dutiny jsou často rozsáhlejší než nekrotizace na slupce. Mechanické poškození je v praxi jediným zdrojem infekce hlíz.



Alternaria spp.

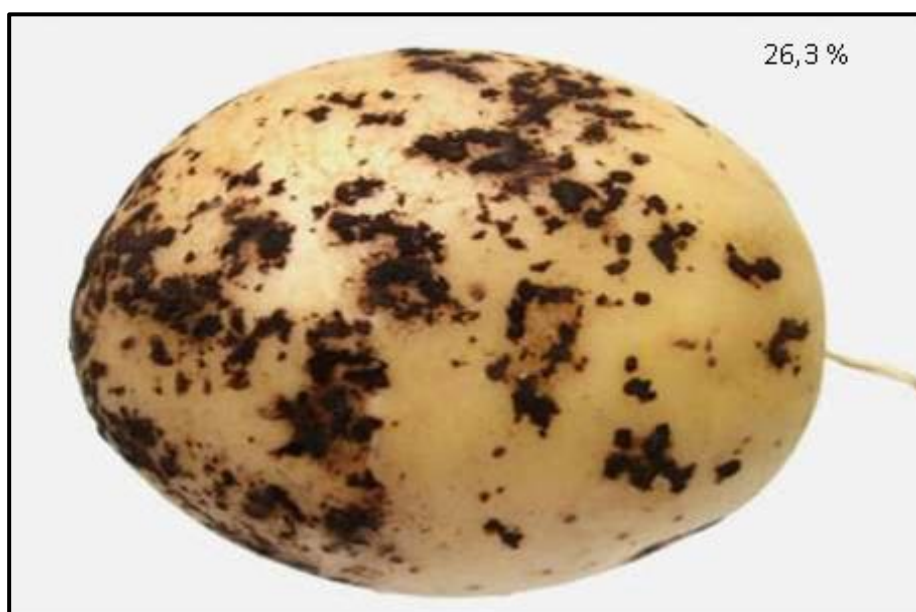
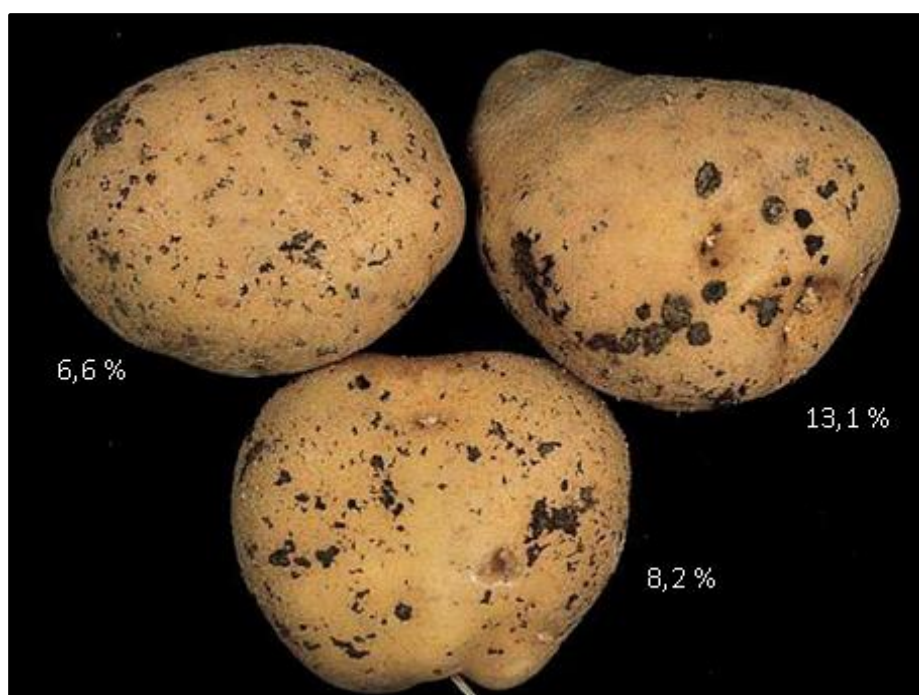
Houba přezimuje na hlízách a rostlinných zbytcích. K infekci potřebuje relativně vysokou vzdušnou vlhkost, na listech se vyskytují koncentrické skvrny, které při časných infekcích přechází na hlízy. Na hlízách se tvoří tmavé protáhlé skvrny přecházející v suchou hnilobu. Nekrózy dužiny pod napadenou slupkou obvykle nepronikají hluboko, ale při silné infekci celá hlíza sesychá.

**Sclerotinia sclerotiorum**

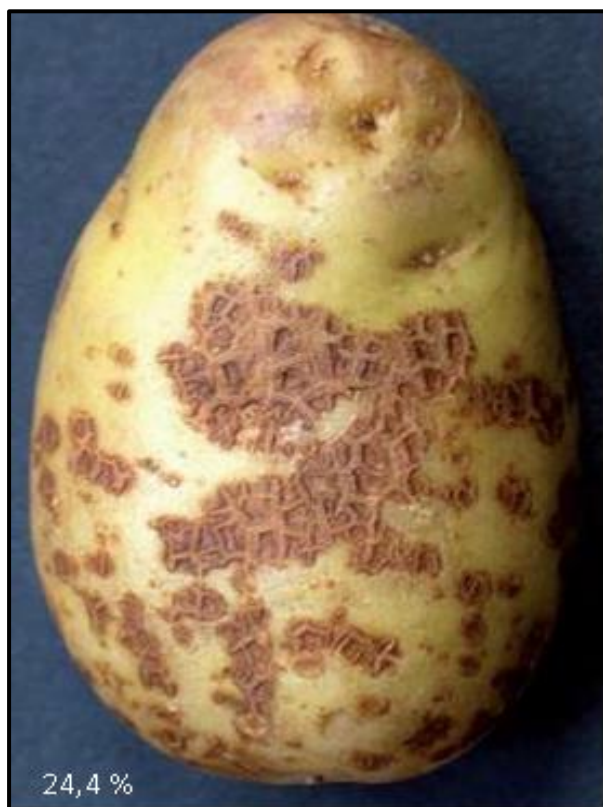
Na hlízách se může vytvořit hniloba v pupkové části, ale to je vzácné. Uvnitř je hniloba světle hnědá s chmýřitým bílým myceliem a černými sklerocii, která se vytvářejí v dutinách. Inokulace z půdy: většinou infekce pochází s větrem přenášených askospor, které produkuje houba na povrchu půdy. Nákaza je podněcována dlouhotrvající vysokou vlhkostí pod dobře vyvinutým krytem vlhkého listoví (např. závlaha postřikem na úrodné půdě). Nákaza je pravděpodobnější, pokud brambory následují po řepce, která je alternativním hostitelem.“



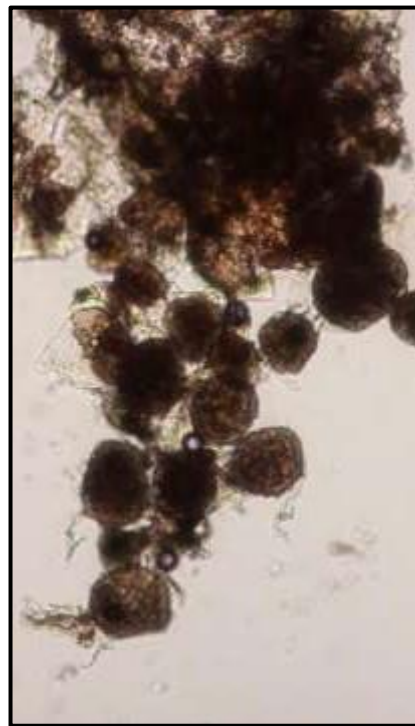
Vada č. 2	VLOČKOVITOST HLÍZ
Původce:	<i>Rhizoctonia solani</i> (<i>Thanatephorus cucumeris</i>)
Zdroj infekce:	půda, hlízy
Příznaky:	Patogen vytváří pseudosklerocia, černé vločky pevně ulpívající na povrchu hlízy, které musí pokrývat více jak 1/10 povrchu hlízy. Tvoří i tmavé nekrózy na klíčcích, nekrózy na bázi stonků pod úrovní půdy. Na stonku těsně nad povrchem půdy se může objevit bělavý povlak (plstnatost stonku). Houba přezimuje na hlízách a v půdě ve formě sklerocií.



Vada č. 3	STRUPOVITOST BRAMBORU
Původce:	<i>Streptomyces scabiei</i> – aktinobakteriální obecná strupovitost bramboru <i>Streptomyces reticuliscabiei</i> – aktinobakteriální síťovitá strupovitost bramboru <i>Streptomyces europaescabiei</i>
Zdroj infekce:	půda
Príznaky:	Populace patogena se vyskytují ve většině půd hlavně na lehčích písčitých půdách a výskyt choroby se zvyšuje při vyšším pH (nad 5,5). Napadená sadba není zdrojem infekce pro dceřiné hlízy, ale k infekci dochází výhradně z půdy. Patogen vytváří na slupce hlíz korkovité strupy. Rozlišují se tři základní formy strupovitosti podle hloubky a charakteru strupů. Strupovitost plochá, strupovitost hluboká tvořící hluboké strupy až kaverny a je nejvíce problematická. Strupovitost vystouplá je charakteristická tvorbou vysokých korkovitých strupů. Pokud jsou hlízy ve vlhké půdě, lze na nich pozorovat bílý až šedý vláknitý povlak. Za poškozené se považují hlízy, u kterých je postižená více jak 1/3 povrchu hlízy, což je dáno součtem plochy strupatých míst.



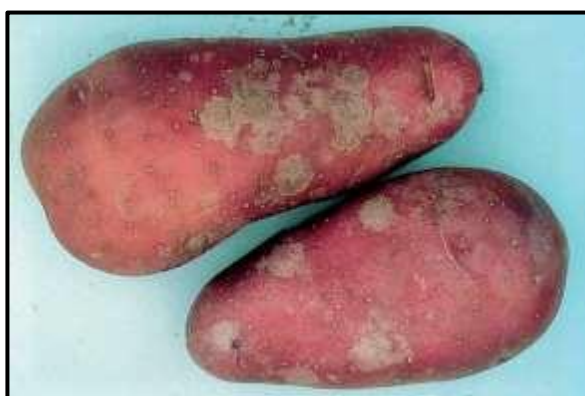
Vada č. 4	PRAŠNÁ STRUPOVITOST BRAMBORU
Původce:	<i>Spongospora subterranea</i>
Zdroj infekce:	Sadba a půda. Nejvíce převládá v těžkých půdách. Infekce je podpořena vlhkem a chladem při počátku tvorby hlíz
Příznaky:	Na slupce hlíz se tvoří kulaté vyvýšené bradavičnaté neštovičky, léze se prořezávají a je viditelná pudrovitá tkáň (klubíčka spor) prášek se uvolňuje, ve slupce zůstávají malé dutinky. Infekce v době rozvoje může vyústit ve výrůstky různých velikostí. Klubíčka kořenů mohou taktéž vznikat na výhoncích a kořenech. Výskyt choroby ve vyšších vlhčích polohách. Za napadané se považují hlízy, u kterých je postiženo více než 10 % povrchu hlízy – počítáno součtem plochy postižených míst.

Spongospora subterranea – foto SASA a NAK

Vada č. 5	SCVRKLÉ HLÍZY
Původce:	Abiotikózy <i>Helminthosporium solani</i>
Zdroj infekce:	sadba a půda
Příznaky:	Hlízy, které jsou nadměrně dehydratované a zvrásnělé včetně dehydratace způsobené stříbřitostí slupky bramboru, nadměrným větráním, dlouhodobým skladováním atd. Jako scvrklé se hodnotí hlízy, které ztratily turgor a jsou zvrásnělé.

foto NAK**Stříbřitost slupky bramboru (*Helminthosporium solani*) - foto SASA CNPPPT**

Mycelium původce choroby prorůstá mezibuněčnými prostory a proniká i dovnitř buněk ve slupce. Dužina není napadena. Příznaky napadení mohou být již při sklizni. Nejprve se na slupce objevují světle hnědé kruhové skvrny s neohrazenými okraji. Postupně mohou zasáhnou velkou část povrchu. V důsledku zavzdušňování parazitovaných buněk skvrny získávají stříbřitý lesk. Infekce je podporována teplým a vlhkým počasím po ukončení vegetace. Naskladňováním mokřích a neosušených hlíz a vyššími teplotami v průběhu skladování.



Vada č. 6	VNĚJŠÍ VADY ZPŮSOBENÉ MECHANICKY NEBO ŠKŮDCI, HLÍZY POŠKOZENÉ MRAZEM A ZAPAŘENÍM
Hlízy poškozené:	mrazem a zapařením
Příznaky:	Hlízy zapařené, přidušené sesychají a dužina je hnědá až černá. Při poškození mrazem je dužina hlíz brambor od červenohnědé až po černou. Na povrchu hlíz je tmavě hnědá mnohdy vpadlá oblast, napadena může být i dužina. Mrazem poškozená tkáň vylučuje vodu a okraje dotčených oblastí jsou zčernalé. Často se objevuje jasná linie mezi zdravou a napadenou tkání. Příčinou jsou nízké teploty (pod 1 °C) před sklizní nebo ve skladu. K poškození může také dojít jako následek teplotního šoku, kdy je sadba vystavena markantním změnám teplot.

zapařená hlíza – foto SASA**zmrzlé hlízy – foto SASA**

Hlízy poškozené:	mechanicky nebo škůdci
Příznaky:	Pomačkané nebo popraskané hlízy, případně s chybějícími kusy nebo dírami a chodbičkami v dužině. Pukliny nebo díry v hlízách mohou vést k sekundární infekci hnilobnými patogeny. Mechanické poškození je způsobeno během manipulace s hlízami a může se objevit od sklizně až po dodávku. Pomačkání je způsobeno šokem nebo tlakem. Původce poškození škůdci jsou: slimáci, larvy mûr, kovařikovití, dřepčící, hlodavci atd. Jako vada se hodnotí poškození do hloubky větší než 5 mm, rozprasky v korunkové části, pokud zasahují očka a mají vliv na klíčivost, dále pak poškození drátovcem – nejméně však tři otvory hlubší než 5 mm.

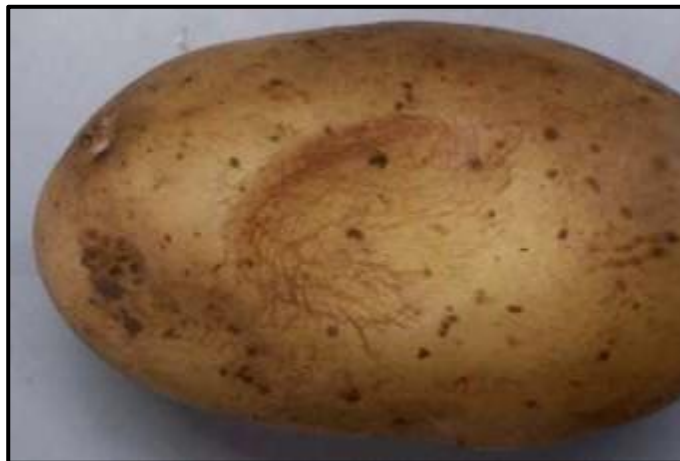
Poškození larvami dřepčků – foto Anses - LSVI a GERMICOPA



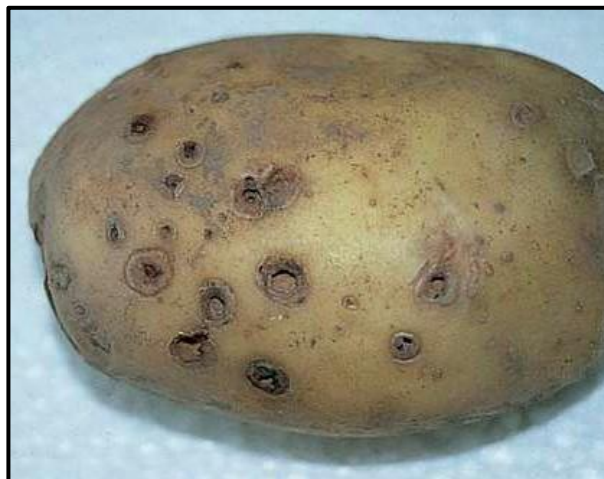
mechanické poškození – foto NAK



otlaky – foto Bretagne Plants



Poškození drátovci – foto FN3PT



Poškození makadlovkou bramborovou



Vada č. 7	CANDIDATUS LIBERIBACTER SOLANACEARUM
Původce:	původce choroby „zebra chip“
Zdroj infekce:	přenos především pomocí přenašečů – merulí, nebo mechanicky (např. při řízkování)
Příznaky:	Příznaky infekce na nadzemních částech rostlin bramboru jsou podobné jako při onemocnění fytoplazmami, tzn. zakrslost, vzpřímený růst nových listů, chlorózy a stáčení listů a jejich zbarvování do fialova, zkrácení a zesílení vrcholových internodií vedoucí k růžicovitosti, výhony vyrůstající z paždí listů a vzdušné hlízky. Na hlízách bramboru způsobuje bakterie příznaky nazvané „zebra chip“, což jsou tmavé nevzhledné proužky na řezu hlízou, výrazné především po nakrájení a usmažení hlíz na bramborové chipsy.

Příznaky napadení nadzemní části rostliny:**Příznaky napadení na hlízách:**

Vada č. 8	HÁĎÁTKO HLÍZOVÉ
Původce:	<i>Ditylenchus destructor</i>
Zdroj infekce:	Přenos je možný sadbou, zeminou, přepravou brambor v kontejnerech a dřevěných obalech.
Příznaky:	Obecně nejsou zjevné příznaky napadení na nadzemních částech rostlin bramboru, silně napadené hlízy mají za následek slabé rostliny, které obvykle odumírají. Časně infekce mohou být detekovány loupáním hlíz, které může odhalit malé, bělavé skvrny v jinak zdravé dužině. Ty se později zvětšují, tmavnou, mají "vlněnou" texturu a mohou být ve středu mírně duté. Při skladování ve vlhkých podmínkách může dojít k obecné hnilobě a rozšíření na další hlízy. Na silně infikovaných hlízách jsou obvykle mírně propadlé oblasti s popraskanou a zvrásněnou slupkou, která je lokálně oddělená od dužiny. Dužina má suchý a moučný vzhled, různě zbarvený od šedavé po tmavě hnědou nebo černou. Toto zbarvení je do značné míry způsobeno sekundární invazí hub, bakterií a volně žijících háďátek.

Foto DGALLNPV Nematology, Rennes, FR EPPOFoto Fera, York, GB EPPO

Vada č. 9**PŘÍMĚS ZEMINY A JINÝCH NEČISTOT**

Zemina, kameny, zbytky natě, dlouhé odpadlé klíče apod.

Vada č. 10**HLÍZY JINÝCH ODRŮD A ODCHYLNÝCH TYPŮ**

Hodnotí se tvar hlízy, barva a hloubka oček, utváření slupky, barva a tvar klíčků, barva a povaha dužiny na řezu. V případě pochybnosti o pravosti odrůdy nebo čistotě odrůdy se hlízy zasílají do pověřené laboratoře na stanovení elektroforézy. Dále je možné odebrat 110 hlíz pro stanovení čistoty nebo pravosti odrůdy polní vegetační zkouškou.

Vada č. 11**ŠKODLIVÉ ORGANISMY, KTERÉ JE ZAKÁZÁNO ZAVLÉKAT A ROZŠÍŘOVAT NA ÚZEMÍ EU**

Škodlivé organismy, které se nevyskytují v žádné části Evropské unie a jsou závažné pro celou Evropskou unii.

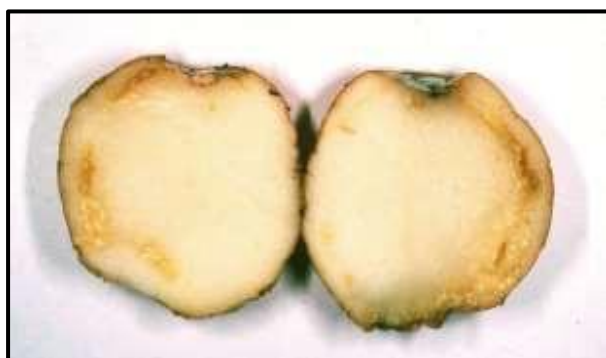
Viry a virům podobné organismy na bramboru, jako např.:

- Andean potato latent virus
- Andean potato mottle virus
- Arracacha virus B, oca strain
- Potato black ringspot virus
- Potato virus T
- neevropské izoláty Potato virus A, Potato virus M, Potato virus S, Potato virus V, Potato virus X, Potato virus Y (včetně skupin izolátů Yc, Yn)

Škodlivé organismy, které se vyskytují v Evropské unii a jsou závažné pro celou Evropskou unii.

- *Synchytrium endobioticum*
- *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
- *Ralstonia solanacearum*
- *Globodera pallida*
- *Globodera rostochiensis*
- *Meloidogyne chitwoodi*
- *Meloidogyne fallax*

Synchytrium endobioticum - © SASA



Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* - © NDSSD



Ralstonia solanacearum - © SASA



Globodera spp. - © INRA



Globodera spp. - © SASA



Meloidogyne fallax - Central Science Laboratory, York (GB) - British Crown, archiv EPPO

3.4 Doplnkové zkoušky

Zkoušky se provádí v případě poškozených hlíz v korunkové části, u sadby pomrzlé, nastydlé, zapařené, případně hlízy pro doplňkové stanovení odrůdové pravosti.

3.4.1 Zkouška klíčivosti

Zkouška klíčivosti hlíz se zakládá při podezření na sníženou vitalitu sadby, u sadby pomrzlé, nastydlé, zapařené, uložené v teple apod.

Laboratorní vzorek se připraví odběrem 100 hlíz ze souhrnného vzorku 25 kg sadby. Hlízy se uloží vedle sebe korunkovou částí nahoru a umístí do zatemněné místnosti při teplotě 15-20 °C a při vzdušné vlhkosti 90 %. Každý druhý den je třeba hlízy mlžit vodou o pokojové teplotě. Za 28 dnů se hodnotí klíčivost, tj. kdy klíčky dosáhly v průměru 10-20 mm.

Za hlízy nevhodné k sázení se považují ty, které nevytvořily více jak 2 odpovídající klíčky a ty které vytvořily klíčky zahnívající, zasychající, lehce odpadávající, zahnědlé se zčernalými vrcholy, silně větvcí, nitkovité, zřetelně slabší, případně hlízy hlízkující.

Při hodnocení se vyčíslí množství hlíz v %, které vůbec nevytvořily klíčky a hlíz, které vytvořily klíčky vadné. Jako méně vhodné k sázení jsou partie s 95 % a menší klíčivostí.

3.4.2 Hodnocení klíčků pro stanovení odrůdové čistoty a pravosti

Hlízy se umístí na 10 dnů do světlé místnosti při pokojové teplotě 20-25°C. Po 10 dnech se hodnotí odlišnosti klíčků na jednotlivých hlízách. Vypočítá se procentuální zastoupení odchýlných typů z vyklíčených hlíz.

3.4.3 Vegetační zkouška

Je zkouška k určení nebo ověření parametrů dle vyhlášky č. 61/2001 Sb.

- Vegetační zkouška umožňuje posoudit vlastnosti rozmnožovacího materiálu ve znacích, které jsou jinými metodami obtížně stanovitelné, nebo je jejich stanovení jinými metodami málo průkazné nebo příliš nákladné.
- Vegetační zkouškou se kontroluje druhová a odrůdová čistota a pravost, procento hybridnosti, popřípadě zdravotní stav. Rovněž se sleduje, zda během procesu množení osiva nedochází ke změnám znaků odrůd.
- Pravost odrůdy se posuzuje na základě vizuálního porovnávání rostlin vzešlých na kontrolní parcele oseté reprezentativním vzorkem posuzované partie a rostlin vzešlých na parcele oseté standardním vzorkem dané odrůdy. Tím se zjišťuje, zda rostliny posuzovaného vzorku odpovídají úřednímu popisu dané odrůdy.
- Úroveň čistoty odrůdy se posuzuje zjištěním počtu takových rostlin vzešlých na kontrolní parcele, které neodpovídají přesně popisu odrůdy. Tím se zjišťuje, zda posuzovaný vzorek vyhovuje stanoveným normám pro čistotu odrůdy.

3.4.3.1 Následná kontrola sadby brambor

Kontrola podléhá sadba v uznávacím řízení v kategoriích rozmnožovací materiál předstupňů (případně generace S a SE) a základní rozmnožovací materiál. Dále nové odrůdy zařazené ve státních odrůdových zkouškách, pokud je požádáno o uznávací řízení, odrůdy mající výsledek testu metodou ELISA vyšší, než je průměrný výsledek zdravotního stavu všech odrůd v daném roce, revizní vzorky a vzorky sadby dovážených a vyvážených partií.

3.4.3.2 Technologický postup

Při vegetační zkoušce se zjišťuje, zda rostliny vyrostlé na kontrolní parcele ze zkušebního vzorku odpovídají svými vlastnostmi:

- úřednímu popisu odrůdy;
- rostlinám standardního vzorku;
- hodnotám stanoveným pro posuzování množitelských porostů.

Minimální velikost vzorku na vegetační zkoušku dle vyhlášky č. 61/2001 Sb. je 110 hlíz.

Termín dodání vzorků sadby brambor pro vegetační zkoušky je 15. 3.

3.4.3.3 Hodnocení následné kontroly sadby brambor

Při zkoušce se vysazuje 100 hlíz (4 x 25 ks) na zkušební parcelu. Během vegetace se každá zkušební parcela kontroluje dvakrát, a to komisionální přehlídkou. Vegetační zkoušky se hodnotí podle požadavků na množitelské porosty.

3.4.4 ELFO brambory

Standardní referenční (srovnávací) metoda pro ověření pravosti odrůd brambor (pataniny) pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE) dle UPOV.

Chemikálie: Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak:

- voda destilovaná
- TRIS: tris (hydroxymethyl) aminomethan, $M = 121,14 \text{ g/mol}$
- Amidočern
- Bromfenolová modř
- Na_2SO_3 : siřičitan sodný
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$: disiřičitan sodný
- Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná $r(\text{HCl}) = 1,18 \text{ g/ml}$
- APS: peroxodisíran amonný
- AA: akrylamid pro elektroforézu (čistota $\geq 99 \%$)
- BIS, N, N, - methyleniakrylamid, pro elektroforézu
- CBB G250: Coomassie Brilliant Blue G250 pro elektroforézu
- CBB R250: Coomassie Brilliant Blue R250 pro elektroforézu
- TCA: Kyselina trichloroctová (čistota $\geq 99 \%$)
- Kyselina octová ledová (100 %)
- Methanol (čistota $\geq 99 \%$)
- TEMED: tetramethylethylendiamin pro elektroforézu
- ethanol
- Sacharóza
- Glycerol

Roztoky:

Kyselina chlorovodíková, HCl, zředěná, $c(\text{HCl})$ cca 10 % (v/v)

Příprava: Do 100 ml zásobní zábrusové lahve s 50 ml vody se opatrně přidá 27,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové, doplní se 22,5 ml vody do 100 ml a obsah lahve se opatrně promíchá. Při přípravě roztoku HCl se pracuje v digestoři. Nikdy nelijte vodu do kyseliny!

Roztok se může uchovávat při pokojové teplotě 1 rok.

TCA, roztok $c(\text{TCA}) = 20 \%$ (w/v)

TCA	1000 g
Doplnit destilovanou vodou do:	5000 ml

Extrakční roztok A

Siřičitan sodný	5,00 g
Disiřičitan sodný	3,75 g
Doplnit destilovanou vodou do:	100 ml

Roztok se může uchovávat 6 měsíců při teplotě 4 °C.

Extrakční roztok B

Sacharóza	500 g
Amidočern	0,3 g
Doplnit destilovanou vodou do:	1000 ml

Roztok se může uchovávat 2 měsíců při teplotě 4 °C.

Extrakční roztok C

Extrakční roztok A	10 ml
Extrakční roztok B	100 ml

Roztok se připravuje vždy čerstvý.

40 % roztok AA

Akrylamid	40 g
Doplnit destilovanou vodou do:	100 ml

2 % roztok Bis-akrylamidu

BIS-akrylamid	2 g
Doplnit destilovanou vodou do:	100 ml

2 % APS

APS	0,4 g
Doplnit destilovanou vodou do:	20 ml

10 % roztok glycerolu

Glycerol	10 ml
Doplnit destilovanou vodou do:	100 ml

TRIS – HCl, pH 8,9 (separační)

Příprava: Naváží se 75,4 g TRIS a převede se do 1000 ml kádinky, kde je cca 500 ml destilované vody. Roztok se promíchá. Pomocí 10 % HCl se pH roztoku upraví na pH 8,9.

Po rozpuštění chemikálií se doplní vodou do 1000 ml.

TRIS	75,40 g
Doplnit destilovanou vodou do:	1000 ml

TRIS – HCl, pH 6,7 (zaostřovací)

Příprava: Naváží se 16 g TRIS a převede se do 1000 ml kádinky, kde je cca 500 ml destilované vody. Roztok se promíchá. Pomocí 10 % HCl se pH roztoku upraví na pH 6,7.

Po rozpuštění chemikálií se doplní vodou do 1000 ml.

TRIS	16 g
Bromfenolová modř	100 mg
Doplnit destilovanou vodou do:	1000 ml

Roztok pro zaostřovací gel

Sacharosa	80 g
TRIS-HCl pufr, pH 6,7	280 ml
40 % AA	45 ml
2 % BIS	73 ml
Destilovaná voda	150 ml

Elektrodotový pufr (koncentrovaný)

TRIS	5,2 g
Glycin	3,5 g
Doplnit destilovanou vodou do:	1000 ml

Elektrodotový pufr ředěný (1:20)

Elektrodotový pufr konc.	50 ml
Doplnit destilovanou vodou do:	1000 ml

Roztok se připravuje vždy čerstvý

Zásobní barvicí roztok

CBB G 250	0,25 g
CBB R 250	0,75 g
Doplnit destilovanou vodou do:	100 ml

Roztok se musí míchat alespoň hodinu. Pře použitím protřepat.

Barvicí roztok

Zásobní barvicí roztok	100 ml
TCA nebo 20 % roztok TCA	240 g nebo 960 ml
Ledová kyselina octová	280 ml
Methanol	600 ml
Destilovaná voda	3300 ml nebo 2340 ml

Separační gel (pH 8,9)

Pufir na separační gel pH 8,9	60 ml
40 % akrylamidu	14 ml
2 % roztok BIS-akrylamidu	13 ml
Destilovaná voda	14 ml
2 % APS	6 ml
TEMED	100 µl

Zaostřovací gel (pH 6,7)

Roztok pro zaostřovací gel	15 ml
TEMED	60 µl
2 % APS	375 µl

Extrakce bílkovin:

Hlízy brambor i se slupkou se omyjí, opláchnou destilovanou vodou (1) a vysuší se. Hlízy se zmrazí na -20 °C (minimálně 16 hodin) a poté se nechají rozmrazit při pokojové teplotě. Rozmražené hlízy se rozzíznou a vymáčkne se 1,5 ml hlízové šťávy, která se zachytí do 2 ml mikrozkuhavky.

Pro extrakci se použije extrakční roztok C. Hlízová šťáva se v mikrozkuhavce smíchá s 400 µl extrakčního roztoku C. Vzorky v mikrozkuhavkách se protřepávají po dobu 5 minut, poté se centrifugují 15 minut při 3000 ot./min. a teplotě 10 °C. Extrakty mohou být uchovány nejdéle 1 rok při teplotě -20 °C. Před počátkem vlastního elektroforetického stanovení se extrakty rozmrazí při laboratorní teplotě.

Příprava gelu:

Sestaví se čisté a suché kazety podle návodu výrobce aparatury.

Příprava separačního gelu probíhá v digestoři. Separační gelový roztok se opatrně nalije do kazet, tak aby se předešlo vzniku bublin. Hladina separačního roztoku by měla sahát 1,5-2 cm pod hranu vnitřního (tj. kratšího) skla. Následně se gelový roztok převrství 10 % ethanolem za účelem odstranění bublin a zarovnání hladiny. Polymerace probíhá přibližně 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté se 10 % ethanol slijí a horní hrana separačního gelu se propláchne destilovanou vodou, jejíž zbytek se odsaje filtračním papírem.

Zaostřovací gelový roztok se promíchá a okamžitě se nalije do kazet na povrch separačního gelu. Do roztoku se za účelem vytvoření startovacích jamek opatrně zasunou hřebeny, tak aby pod zuby nevznikly bubliny. Roztok se nechá zhruba 1 hodinu polymerovat.

Elektroforéza:

Po ztuhnutí gelového média se hřebeny vytáhnou. Jamky se propláchnou zředěným elektrodovým pufrem. Do startovacích jamek gelu se extrakty pataninů dávkuje v množství 3-6 µl. Gelové kazety s nanesenými vzorky se pak dají do elektrodové nádoby. Podle typu aparatury se naplní elektrodová nádoba příslušným množstvím elektrodového pufru. Kazety se ponoří do zředěného elektrodového pufru. Zároveň se musí zabezpečit, aby startovací jamky s nanesenými vzorky zůstaly po celou dobu analýzy převrstvené zředěným elektrodovým pufrem. Systém se uzavře víkem a připojí se ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu. Vlastní elektroforéza probíhá při konstantním proudu 40 mA (cca 15 min) na 4 gely. Jakmile barevné čelo (bromfenolová modř) přesáhne rozhraní mezi zaostřovacím a separačním gelem, zvedne se hodnota proudu na 80 mA (cca 30 min) na 4 gely (maximální napětí 300 V). Jakmile barvivo dosáhne spodního okraje separačního gelu, elektroforéza se zastaví. V průběhu elektroforézy by se měla udržovat teplota 5-15 °C.

Fixace a barvení:

Kazety se vyjmou z elektroforetické nádoby, gely se vloží do barvicího roztoku. Misky s barvicím roztokem a gely se umístí na třepačku na 3 hodiny, poté se pokračuje v barvení bez třepačky přes noc při laboratorní teplotě. Následující den se gely dají do destilované vody za účelem odbarvení pozadí a zvýšení kontrastu. Pro prezentaci výsledků analýzy a jejich dalšího uložení se gely suší mezi dvěma vrstvami celofánu napnutými na skleněné desce. Celofán se před použitím ponoří krátce do 10 % roztoku glycerolu, aby zvláčněl a lépe přilnul ke gelu. Gely lze sušit při laboratorní teplotě přes noc nebo v teplovzdušné sušárně při cca 60 °C po dobu přibližně 2 hodin (v závislosti na tloušťce gelu). Poté lze gely přímo hodnotit. Pro hodnocení gelů se může využít prosvětlovací deska nebo dokumentační zařízení pro skenování gelů.

Hodnocení elektroforeogramů:

Výsledkem analýzy je tzv. elektroforeogram. Na elektroforeogramu jsou sloupce s příčnými, různě širokými pruhy, tzv. bandy, které odpovídají bílkovinným komplexům charakteristickým pro danou odrůdu.

Poloha jednotlivých bandů v jednotlivých sloupcích elektroforeogramu se definuje tzv. REM (relative electrophoretic mobility). Negativně nabitě proteiny se pohybují ke kladné elektrodě. Proteiny s menší molekulovou hmotností se pohybují rychleji než proteiny s větší molekulovou hmotností. Každý band má tedy svoji charakteristickou REM, která ho identifikuje. Poloha a počet těchto bandů jsou specifické pro každou odrůdu.

Oznamování výsledků:

Výsledky elektroforetického rozboru se ve zprávě uvádí takto:

- Proteinová spektra ... analyzovaných hlíz se ... krát shodují/neshodují se standardem odrůdy....
- Proteinová spektra 100 analyzovaných hlíz se shodují/neshodují se standardem odrůdy.... v ... %.
- Proteinová spektra 10 analyzovaných hlíz odchýlného typu se ... krát shodují/neshodují se spektry standardního typu odrůdy.

3.5 Přílohy

Příloha č. 1 – Vzor návěsky

Vzor návěsek vzorku na ELISA test pro sadbu z ČR nebo pro mechanický rozbor sadby.

12. Kategorie RM předstupňů, generace PB 1 – PB 4 - s rostlinolékařským pasem	13. Kategorie základní RM, generace S, SE, E - s rostlinolékařským pasem	14. Kategorie certifikovaný RM, generace A, B - s rostlinolékařským pasem
 Plant passport EU rules and standards  OSTŘEDNÍ KONTROLA A DOUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ 150 06 Praha 5, Za Openceou 4 Druh Species Odrůda Variety Kategorie, generace, případně třída Category, generation and, if desirable, grade Číslo partie Lot reference No. Hmotnost Weight Velikostní třídění Size Měsíc a rok uzavření Month and year of sealing Země výroby Country of production Číslo návěsky Label number Dodavatel a jeho registrační číslo Supplier and his identification number Neúřední část / Non - official space	 Plant passport EU rules and standards  OSTŘEDNÍ KONTROLA A DOUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ 150 06 Praha 5, Za Openceou 4 Druh Species Odrůda Variety Kategorie, generace, případně třída Category, generation and, if desirable, grade Číslo partie Lot reference No. Hmotnost Weight Velikostní třídění Size Měsíc a rok uzavření Month and year of sealing Země výroby Country of production Číslo návěsky Label number Dodavatel a jeho registrační číslo Supplier and his identification number Neúřední část / Non - official space	 Plant passport EU rules and standards  OSTŘEDNÍ KONTROLA A DOUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ 150 06 Praha 5, Za Openceou 4 Druh Species Odrůda Variety Kategorie, generace, případně třída Category, generation and, if desirable, grade Číslo partie Lot reference No. Hmotnost Weight Velikostní třídění Size Měsíc a rok uzavření Month and year of sealing Země výroby Country of production Číslo návěsky Label number Dodavatel a jeho registrační číslo Supplier and his identification number Neúřední část / Non - official space

Příloha č. 2 - Maximální hmotnost partie, minimální hmotnost nebo velikost laboratorních vzorků, zkušebních vzorků a vzorků na vegetační zkoušky.

Druh (latinsky)	Druh sadby	Maximální hmotnost partie	Minimální hmotnost nebo velikost laboratorního vzorku	Minimální hmotnost vzorku na vegetační zkoušku
		(kg)	(kg) nebo (ks)	(ks)
<i>Solanum tuberosum</i>	Sadba brambor- mechanický rozbor	50 000	25 kg	110 hlíz

Příloha č. 3 - Výsledek mechanického rozboru sadby brambor.

VÝSLEDEK MECHANICKÉHO ROZBORU SADBY BRAMBOR

Odrůda:	Kategorie a generace:
Číslo partie:	Hmotnost partie (t):

Číslo vady	Vada		Nejvyšší přípustná hmotnostní procenta vad pro jednotlivé kategorie						Zjištěná skutečnost	
			PBTC	PB	S, SE, E		A, B			
1	Měkká hniloba hlíz	Měkká a suchá hniloba celkem	0	0,2	0,2	0,5	0,2	0,5		
	Suchá hniloba hlíz				0,5		0,5			
2	Vločkovitost hlíz bramboru		0	1,0	5,0		5,0			
3	Strupovitost bramboru		0	5,0	5,0		5,0			
4	Prašná strupovitost bramboru		0	1,0	3,0		3,0			
5	Scvrklé hlízy		0	0,5	1,0		1,0			
6	Vnější vady způsobené mechanicky nebo škůdci, hlízy poškozené mrazem a zapařením		0	3,0	3,0		3,0			
7	Candidatus Liberibacter solanacearum		0	0	0		0			
8	Hádátka hlízové		0	0	0		0			
Celkem vady č. 1 až 8			0	6,0	6,0		8,0			
9	Příměs zeminy a jiných nečistot			1,0	1,0		2,0			
10	Hlízy jiných odrůd a odchylných typů				0,25		0,5			
11	Škodlivé organismy, které je zakázáno zavlékat a rozšiřovat na území Evropské unie		Nesmí se vyskytovat							

Velikost sadby:	Nejvyšší přípustné hmotnostní procento:	Zjištěná skutečnost:
hlízy nadsadbové	3	
hlízy podsadbové	3	

Velikostní třídění:

Rozbor proveden v:

dne:

Rozbor provedl:

otisk razítka a podpis

☐ pracovník ÚKZÚZ☐ pověřená osoba