

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA Z GENOTYPIZACE FYTOPLAZMOVÉHO ŽLOUTNUTÍ A ČERVENÁNÍ LISTŮ RÉVY



Zpracovatel projektu: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ)

Kontakt: Ing. Štěpánka Radová Ph.D., ÚKZÚZ (stepanka.radova@ukzuz.cz)

Obsah

1	ÚVOD	3
2	METODIKA A ROZSAH.....	5
2.1	Rozsah průzkumu	5
2.2	Metodika odběru a zpracování vzorků	5
2.2.1	Odběr rostlin.....	5
2.2.2	Detekce a genotypizace fytoplazmy stolburu v rostlinných vzorcích	5
3	VÝSLEDKY	6
3.1	Výsledky genotypizace rostlinných vzorků.....	6
4	ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ	9
4.1	Souhrn výsledků.....	9
4.2	Prevence a doporučení k eliminaci šíření fytoplazmového žloutnutí a červenání listů révy...	9
5	LITERÁRNÍ ZDROJE	10

1 ÚVOD

V posledních letech dochází v českých a moravských výsadbách révy vinné ke zvýšenému šíření hospodářsky významné choroby fytoplazmového žloutnutí a červenání listů révy (původce = '*Candidatus*' *Phytoplasma solani* – „fytoplazma stolburu“). Rozsah napadení je značný a ochrana problematická. Réva vinná se v ČR pěstuje ve velkém rozsahu v režimu ekologické a integrované produkce a zejména na Moravě představuje významné odvětví nejen z hlediska zemědělské produkce, ale také zaměstnanosti, údržby krajiny a agroturistiky.

Původce stolburu infikuje širokou škálu kulturních i planě rostoucích rostlin. K jeho šíření dochází prostřednictvím hmyzích přenašečů. Hlavním vektorem je žilnatka vironosná (*Hyalesthes obsoletus*). Jedná se o polyfágní druh, který saje na mnoha druzích rostlin. V infekčním cyklu hrají důležitou roli též tzv. mezihostitelské rostliny, které fungují jako rezervoáry fytoplazmy. Mezi ně patří zejména kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) a svlačec rolní (*Convolvulus arvensis*).

Existuje několik genetických typů fytoplazmy stolburu a předpokládá se, že jsou spojeny s různými přirozenými epidemickými cykly. Ke studiu genetické variability mezi izoláty fytoplazmy stolburu se využívá amplifikace neribozomálních genů, jako je tuf gen, vmp1 gen, secY gen a map gen. Genetická typizace fytoplazmy stolburu je v této studii založena na amplifikaci části neribozomální oblasti DNA kódující translační elongační faktor Tu (gen tuf). Na základě restriční analýzy cílové sekvence je možné rozlišit dva hlavní typy, a to: tuf-a a tuf-b. V Německu se typ tuf-a šíří epidemickým cyklem zahrnujícím jako hlavního mezihostitele *U. dioica* a tuf-b je spojen převážně s cyklem zahrnujícím jako dominantní rezervoárovou rostlinu *C. arvensis*. Třetí, minoritní genotyp tuf-c byl detekován v omezené oblasti Německa u opletníku plotního (*Calystegia sepium*) jako alternativní hostitelské rostliny. Z hlediska zeměpisného rozšíření jednotlivých genotypů fytoplazmy stolburu v Evropě je tuf-a nejběžnější v Německu, Švýcarsku, severní Francii, severní Itálii a Rakousku, zatímco tuf-b je rozšířen ve většině zemí Evropy a Asie. Studie provedená na vinné révě v Íranu prokázala dominanci tuf-b svázaného s epidemiologickým cyklem zahrnujícím mezihostitele svlačec rolní.

V Rakousku je původce stolburu rozšířen ve všech vinařských oblastech. Výzkumy v letech 2003 až 2008 potvrdily infekci fytoplazmou stolburu často u *C. arvensis* a révy vinné, zatímco infekce *U. dioica* nebyly běžné a byly omezeny jen na jižní oblast země (Štýrsko). Genetická typizace prokázala výhradně přítomnost typu tuf-b. Avšak jiná studie z roku 2013 odhalila masový výskyt *H. obsoletus* na kopřivách a s ním spojenou infekci tohoto mezihostitele. Sekvenční analýza následně odhalila, že genotyp fytoplazmy stolburu z kopřiv odpovídal svým restričním profilem typu tuf-b, který byl dříve považován za svázaný s mezihostitelem svlačcem.

Hlavním cílem studie byla genotypizace fytoplazmy stolburu z hostitelských rostlin (révy vinné a dalších rostlinných druhů) a určení převažujícího genotypu (tuf-typu) na Moravských vinicích. Studie zabývající se genotypizací fytoplazmy stolburu v ČR byly provedeny před více než 10 lety a nebyl při nich zjištěn výskyt genotypu tuf-a. **Druhým cílem**

studie bylo ověřit, zda se situace za poslední roky nezměnila, a tedy že genotyp tuf-b v ČR stále převažuje. Součástí závěrečné zprávy je vedle zjištěných výsledků i návrh doporučení opatření na potlačení výskytu fytoplazmového žloutnutí a červenání listů révy.

Studie byla podpořena prostředky z [Národního akčního plánu](#) (dále NAP). Na základě zjištěných poznatků jsou navržena doporučení pro státní správu a pěstitele révy.

Podrobnější informace o fytoplazmovém žloutnutí a červenání listů révy jsou k dispozici na webových stránkách [Rostlinolékařského portálu ÚKZÚZ](#).

2 METODIKA A ROZSAH

2.1 Rozsah průzkumu

Na základě průzkumu chorob révy v roce 2021 (více viz [Závěrečná zpráva o rozsahu a výsledcích cíleného průzkumu výskytu vybraných chorob révy vinné v roce 2021](#)) bylo potvrzeno plošné rozšíření fytoplazmy stolburu ve vinicích jižní Moravy. Celkem byla tato **fytoplazma detekována v 88 % odebraných vzorků révy vinné**, tedy ve 44 z 50 vzorkovaných vinic a **v 50 % vzorků svlačce rolního** (ve 21 vzorků z 42 odebraných). V rámci vymežovacích průzkumů na výskyt karanténní choroby fytoplazmového zlatého žloutnutí révy byla fytoplazma stolburu potvrzena v roce 2022 v 88 vzorcích révy z 256 (tj. 34 %) a v roce 2023 to bylo 92 vzorků z 245 (tj. 38 %). Z důvodu výše uvedeného byla v roce 2023 z vybraných pozitivních vzorků révy a svlačce rolního odebraných v letech 2017–2023, provedena genotypizace fytoplazmy stolburu. Vzorky z let 2017-2022 byly uchovány ve formě extrahované DNA při -80°C. Celkem bylo za účelem odhalení zdroje šíření z rezervoárových rostlin testováno 127 vzorků. Pro genotypizaci byly vybrány vzorky z různých lokalit jižní Moravy, aby byla pokryta co nejširší část území.

Genotypizace byla provedena za finanční podpory Národního akčního plánu pro bezpečné používání pesticidů.

2.2 Metodika odběru a zpracování vzorků

Z pohledu účelu odběru a navazujících detekčních metod byly odebírány vzorky z příznakových rostlin révy vinné i svlačce rolního. V případě kopřivy dvoudomé, která je v případě infekce fytoplazmou stolburu bezpříznaková, se přednostně odebíraly vzorky z rostlin rostoucích poblíž keřů révy s příznaky infekce.

2.2.1 Odběr rostlin

Odběr vzorků se prováděl v době vegetace. V případě révy byly odebírány olistěné výhony o přibližné délce 40 cm, zatímco u svlačce a kopřivy byla vždy odebírána celá nadzemní část rostliny. Odebrané vzorky byly vloženy do plastového sáčku, označeny, ihned zchlazeny a transportovány do laboratoře Odboru diagnostiky škodlivých organismů rostlin ÚKZÚZ k následnému zpracování.

2.2.2 Detekce a genotypizace fytoplazmy stolburu v rostlinných vzorcích

Přítomnost fytoplazmy stolburu ve vzorcích byla zjišťována pomocí specifické metody dvoukrokové polymerázové řetězové reakce (nested PCR). Pro amplifikaci cílové DNA byly v prvním kroku PCR použity obecné primery pro fytoplazmy P1, P7 (Deng a Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995), zatímco v druhém kroku byly použity specifické primery fSTOL, rSTOL (Maixner et al., 1995). U vzorků s pozitivním výsledkem testu na přítomnost fytoplazmy stolburu byla následně provedena genotypizace s využitím tuf-PCR-RFLP analýzy. Gen tuf byl amplifikován v nested PCR s primery Tuf1f, Tuf1r v prvním a TufAYf, TufAYr v druhém kroku (Schneider et al., 1997). Získaný PCR produkt o přibližné velikosti 940 bp byl štěpen restriční endonukleasou *HpaII* a výsledný restriční profil analyzován elektroforézou na 3% agarosovém gelu. U vzorků s odlišným RFLP profilem, než byl očekávaný tuf-b, byla

provedena také podrobnější sekvenční analýza PCR produktu (Eurofins Genomics, Kolín nad Rýnem, Německo).

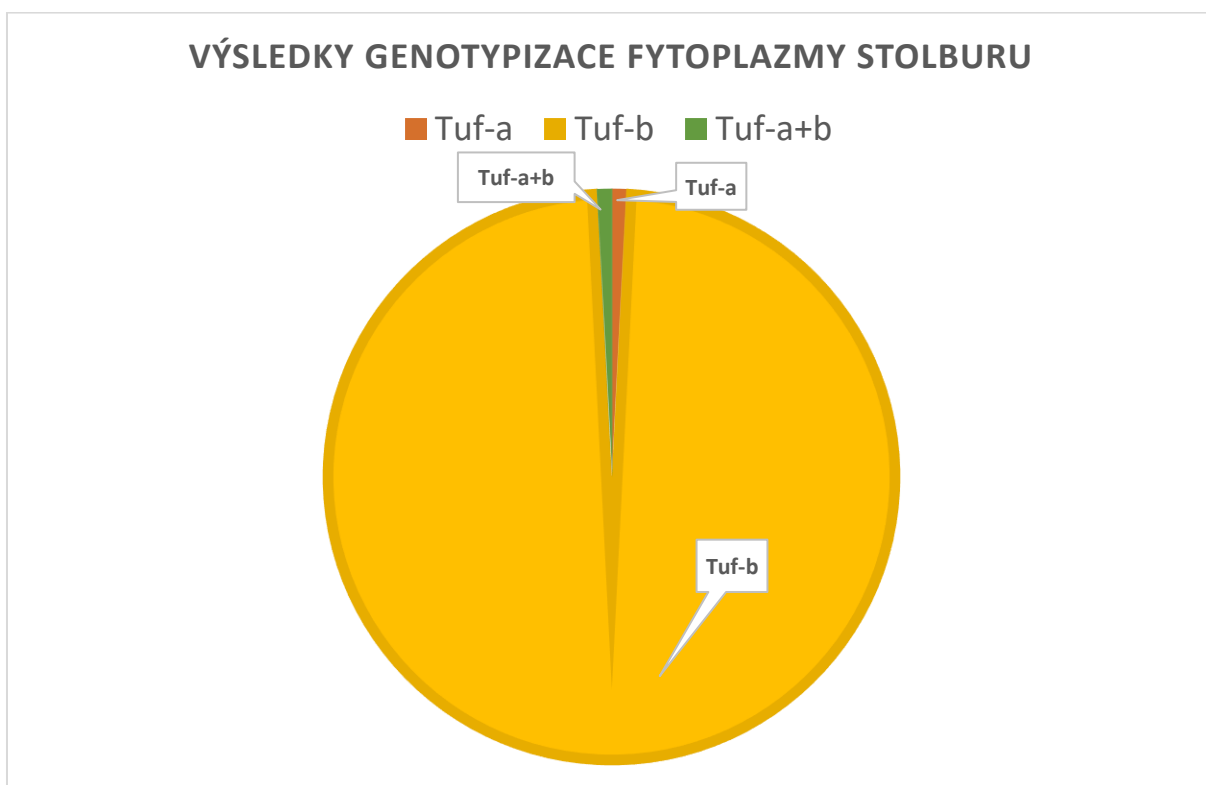
3 VÝSLEDKY

3.1 Výsledky genotypizace rostlinných vzorků

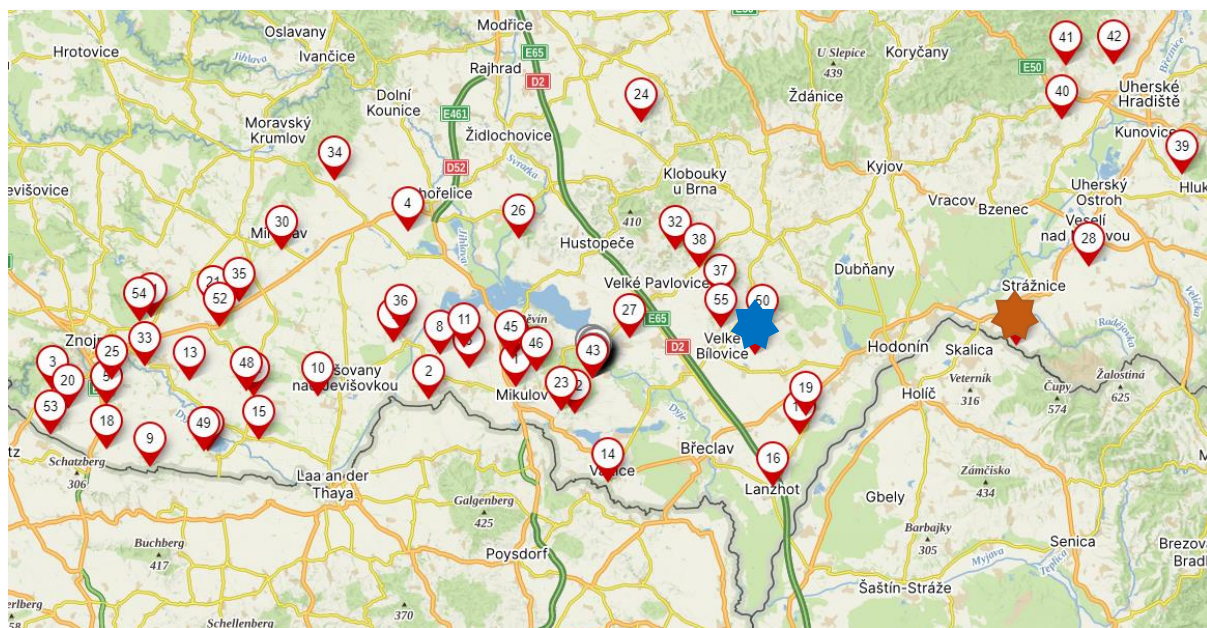
Genetická typizace fytoplazmy stolburu byla provedena u celkem 127 vzorků révy vinné a svlačce rolního odebraných v letech 2017-2023. Z těchto 127 vzorků bylo celkem 125 vzorků révy vinné (1 vzorek z roku 2017, 3 vzorky z roku 2019, 33 vzorků z roku 2021, 10 vzorků z roku 2022 a 78 vzorků z roku 2023) a 2 vzorky svlačce z roku 2021. Všechny odebrané vzorky kopřivy (celkem 6 vzorků z roku 2021) byly negativní na fytoplazmu stolburu, proto nebyly do analýz zahrnuty.

U více než 98 % vzorků révy a 100 % svlačců byl genotypizací potvrzen typ tuf-b. V jednom vzorku révy vinné byl zjištěn typ tuf-a v dalším směs obou typů tuf-a+b viz Graf 1. Seznam testovaných vzorků a výsledků genotypizace fytoplazmy stolburu je uveden v Tabulce 1.

Graf 1 Podíl genotypů fytoplazmy stolburu ve vzorcích révy vinné a svlačce rolního



Mapa 1 Mapa katastrů odebraných vzorků (ve vybraných katastrech bylo analyzováno více vzorků)



Modrá hvězda= tuf-a, oranžová hvězda= tuf-a+b

Tabulka 1 Seznam odebraných vzorků a výsledků genotypizace fytoplazmy stolburu

Č. vzorku	Hostitel	tuf typ	Lokalita	rok	Č. vzorku	Hostitel	tuf typ	Lokalita	rok
1	réva	b	Kozojídky	2017	65	réva	b	Bulhary	2023
2	réva	b	Němčičky u Hustopečí	2019	66	réva	b	Bulhary	2023
3	réva	b	Nový Poddvorov	2019	67	réva	b	Perná	2023
4	réva	b	Moravský Žižkov	2019	68	réva	b	Perná	2023
5	svlačec	b	Mikulov	2021	69	réva	b	Perná	2023
6	svlačec	b	Nový Přerov	2021	70	réva	b	Perná	2023
7	réva	b	Havraníky	2021	71	réva	b	Perná	2023
8	réva	b	Vlasatice	2021	72	réva	b	Perná	2023
9	réva	b	Vrbovec	2021	73	réva	b	Perná	2023
10	réva	b	Dobré Pole	2021	74	réva	b	Perná	2023
11	réva	b	Nový Přerov	2021	75	réva	b	Perná	2023
12	réva	b	Drnholec	2021	76	réva	b	Perná	2023
13	réva	b	Novosedly	2021	77	réva	b	Perná	2023
14	réva	b	Micmanice	2021	78	réva	b	Perná	2023
15	réva	b	Šanov nad Jevišovkou	2021	79	réva	b	Perná	2023
16	réva	b	Dolní Dunajovice	2021	80	réva	b	Perná	2023
17	réva	b	Božice	2021	81	réva	b	Perná	2023
18	réva	b	Krhovice	2021	82	réva	b	Perná	2023
19	réva	b	Valtice	2021	83	réva	b	Perná	2023
20	réva	b	Dyjákovice	2021	84	réva	b	Perná	2023
21	réva	b	Lanžhot	2021	85	réva	b	Perná	2023
22	réva	b	Týnec na Moravě	2021	86	réva	b	Perná	2023
23	réva	b	Dyjákovičky	2021	87	réva	b	Bavory	2023
24	réva	b	Moravská Nová Ves	2021	88	réva	b	Bavory	2023
25	réva	b	Šatov	2021	89	réva	b	Bavory	2023

26	réva	b	Stošikovice na Louce	2021	90	réva	b	Bulhary	2023
27	réva	b	Sedlec u Mikulova	2021	91	réva	b	Bulhary	2023
28	réva	b	Mikulov na Moravě	2021	92	réva	b	Bulhary	2023
29	réva	b	Těšany	2021	93	réva	b	Bulhary	2023
30	réva	b	Oblekovice	2021	94	réva	b	Bulhary	2023
31	réva	b	Pouzdrány	2021	95	réva	b	Bulhary	2023
32	réva	b	Pouzdrány	2021	96	réva	b	Perná	2023
33	réva	b	Lechovice	2021	97	réva	b	Bavory	2023
34	réva	b	Lechovice	2021	98	réva	b	Bulhary	2023
35	réva	b	Šatov	2021	99	réva	b	Klentnice	2023
36	réva	b	Valtice	2021	100	réva	b	Jaroslavice	2023
37	réva	b	Valtice	2021	101	réva	b	Jaroslavice	2023
38	réva	b	Drnholec	2021	102	réva	b	Jaroslavice	2023
39	réva	b	Drnholec	2021	103	réva	b	Hrádek u Znojma	2023
40	réva	b	Pouzdrány	2022	104	réva	b	Jaroslavice	2023
41	réva	b	Přítluky	2022	105	réva	b	Jaroslavice	2023
42	réva	b	Kozojídky	2022	106	réva	b	Jaroslavice	2023
43	réva	b	Petrov u Hodonína	2022	107	réva	b	Jaroslavice	2023
44	réva	b	Mirotslav	2022	108	réva	b	Oleksovičky	2023
45	réva	b	Suchohrdly u Znojma	2022	109	réva	b	Bulhary	2023
46	réva	b	Němčičky u Hustopečí	2022	110	réva	b	Bulhary	2023
47	réva	b	Pouzdrány	2022	111	réva	b	Bulhary	2023
48	réva	b	Pouzdrány	2022	112	réva	b	Bulhary	2023
49	réva	b	Suchohrdly u Znojma	2022	113	réva	b	Bulhary	2023
50	réva	b	Tasovice nad Dyjí	2023	114	réva	b	Bulhary	2023
51	réva	b	Olbramovice u Moravského Krumlova	2023	115	réva	b	Bulhary	2023
52	réva	b	Oleksovice	2023	116	réva	b	Perná	2023
53	réva	b	Mikulov na Moravě	2023	117	réva	b	Perná	2023
54	réva	b	Drnholec	2023	118	réva	b	Perná	2023
55	réva	b	Vrbice u Velkých Pavlovic	2023	119	réva	b	Perná	2023
56	réva	a+b	Petrov u Hodonína	2023	120	réva	b	Perná	2023
57	réva	b	Kobylí na Moravě	2023	121	réva	b	Perná	2023
58	réva	b	Hluk	2023	122	réva	b	Perná	2023
59	réva	b	Boršice u Buchlovic	2023	123	réva	b	Perná	2023
60	réva	b	Tupesy na Moravě	2023	124	réva	b	Perná	2023
61	réva	b	Jalubí	2023	125	révy	b	Perná	2023
62	réva	b	Bulhary	2023	126	réva	b	Perná	2023
63	réva	b	Bulhary	2023	127	réva	a	Velké Bílovice	2023
64	réva	b	Bulhary	2023					

4 ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ

4.1 Souhrn výsledků

Fytoplazmové žloutnutí a červenání révy vinné, jehož původcem je fytoplasma stolburu (*Ca. P. solani*) patří mezi ekonomicky významné onemocnění révy vinné. Studium genetické variability jednotlivých izolátů fytoplazmy stolburu slouží k pochopení vzájemných vazeb mezi rezervoárovými rostlinami a vektorem. Studie vycházela ze zjištění, že rozšíření fytoplazmy stolburu na vinicích jižní Moravy je plošné a dosahuje hodnot 34 až 88 % (hodnoty vychází ze studie v roce 2021 a výsledků vymezovacích průzkumů v letech 2022 a 2023). Z tohoto důvodu byla v roce 2023 provedena genotypizace fytoplazmy stolburu ze vzorků odebraných v letech 2017–2023, za účelem odhalení zdroje šíření z rezervoárových rostlin. Pro genotypizaci byly vybrány vzorky z různých lokalit jižní Moravy, aby byla pokryta co nejširší část území.

V této studii byla provedena genotypizace fytoplazmy stolburu s využitím tuf-PCR-RFLP analýzy. Celkem bylo analyzováno 127 vzorků révy vinné a svlačce rolního pocházejících z 64 lokalit v 55 katastrálních územích vinařské oblasti Morava.

- **Genetickou typizací bylo potvrzeno, že z 98 % se na Moravských vinicích vyskytuje fytoplasma stolburu, typ tuf-b. Životní cyklus genotypu b je spjat se svlačcem rolním jako dominantní rezervoárovou rostlinou. Tento genotyp je více rozšířený.**
- **Ve dvou vzorcích révy vinné byl poprvé v ČR zachycen typ tuf-a, spjatý s cyklem zahrnujícím kopřivu jako rezervoárovou rostlinu. Z výsledků vyplývá, že genotyp tuf-b, je v ČR stále převládajícím genotypem fytoplazmy stolburu.**

4.2 Prevence a doporučení k eliminaci šíření fytoplazmového žloutnutí a červenání listů révy

1. Zajistit pravidelnou důslednou fyto-sanitární kontrolu množitelských porostů a testování a ozdravování výchozích šlechtitelských a množitelských materiálů, zakládání množitelských výsadb v oblastech bez výskytu fytoplazem a likvidaci napadených rostlin.
2. Omezovat výskyt vektorů, především křisa žilnatky vironosné a výskytu hostitelských, především planě rostoucích rezervoárových rostlin patogenu a současně hostitelů vektora především svlačce rolního, popř. kopřivy dvoudomé.
3. Dále se zaměřit na omezení výskytu ostatních hostitelů patogenu (především druhy čeledi lilkovité a některé druhy čeledi hvězdnicovité a bobovité, a dvouděložných plevelů vůbec (vhodným řešením je ztravnění).
4. Z přímých nechemických metod je možné doporučit: Zmlazení silně napadených keřů a následné zapěstování nových kmínků, odstranění velmi silně napadených keřů, v mladých vinicích napadené keře likvidovat a provést na jaře podsadbu. V plodných vinicích označené keře sledovat, případně v předjaří zmladit a zapěstovat nový kmínek, v následujících vegetačních obdobích označené nebo zmlazené keře dále sledovat.

5 LITERÁRNÍ ZDROJE

- Aryan A., Brader G., Mörtel J., Pastar M., Riedle-Bauer M. (2014) An abundant 'Candidatus *Phytoplasma solani*' tuf b strain is associated with grapevine, stinging nettle and *Hyalesthes obsoletus*. *Eur J Plant Pathol.* 2014 Oct 1;140(2):213-227. doi: [10.1007/s10658-014-0455-0](https://doi.org/10.1007/s10658-014-0455-0).
- Deng S., Hiruki, C. (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *J. Microbiol. Methods* 14, 53-61.
- Maixner M., Ahrens U., Seemüller E. (1995) Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Eur. J. Plant Pathol.* 101, 241-50.
- Schneider B, Gibb KS & Seemuller E (1997) Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143, 3381–3389.
- Schneider B, Seemüller E, Smart CD & Kirkpatrick BC (1995) Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology* (Eds Razin S & Tully JG), Vol. 1, pp. 369–380. Academic Press, San Diego, CA (US). 483 pp.