

ZÁVĚREČNÁ ZPRÁVA
O ROZSAHU A VÝSLEDČÍCH CÍLENÉHO PRŮZKUMU VÝSKYTU VYBRANÝCH CHOROB RÉVY VINNÉ
V ROCE 2021

A NAVAZUJÍCÍ DOPORUČENÍ PRO MZe, ÚKZÚZ A PĚSTITELE

Zpracovatelé projektu:

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) – koordinátor projektu

Ústav genetiky Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Brně



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

Obsah

1. ÚVOD	3
2. METODIKA A ROZSAH	3
2.1 Rozsah průzkumu	3
2.2 Metodika odběru a zpracování vzorků	4
3. VÝSLEDKY	6
3.1 Chřadnutí keřů révy (komplex houbových patogenů – GTD/ESCA)	6
3.1.1 Masivně paralelní sekvenování DNA extrahované z pilin odebraných ze symptomatických rostlin révy vinné	6
3.2 Fytoplazmové žloutnutí a červenání listů révy (<i>Candidatus</i> Phytoplasma solani) – stolbur.....	10
3.3 Fytoplazmové zlaté žloutnutí révy vinné (Grapevine flavescence dorée phytoplasma) – GFDP	10
3.4 ToRSV a TRSV	11
3.5 Bakterie <i>Xylella fastidiosa</i>	11
4. ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ	11
4.1 Souhrn výsledků	11
4.2 Doporučená opatření proti GTD/ESCA a stolburu	12
4.3 Opatření proti GFDP	13
4.4 Závěr	13
5. LITERÁRNÍ ZDROJE	14
6. PŘÍLOHY	15
6.1 Laboratorní metody	15
6.2 Fotodokumentace	17

1. ÚVOD

V posledních letech dochází v českých a moravských výsadbách révy vinné ke zvýšenému šíření hospodářsky významných chorob fytoplazmového žloutnutí a červenání listů révy (původce = *'Candidatus' Phytoplasma solani* – „stolbur“) a chřadnutí keřů révy (původce = komplex houbových patogenů – Grapevine Trunk Diseases – GTD, potažmo „ESCA“). Rozsah napadení je odhadem značný a ochrana problematická. Riziko, na které je nutno se zejména na jižní Moravě připravit, představuje přirozené rozšíření karanténní choroby fytoplazmového zlatého žloutnutí révy vinné (Grapevine flavescence dorée phytoplasma – „GFDP“) ze sousedního Rakouska. A to především s ohledem na přítomnost jejího přenašeče kříška révového na území ČR od r. 2016 (dle zahraničních zkušeností následoval výskyt choroby cca za 5–6 let po zjištění prvního výskytu jejího přenašeče).

Réva vinná se v ČR pěstuje ve značném rozsahu v režimu ekologické a integrované produkce a její pěstování je zejména na Moravě významným odvětvím nejen z hlediska zemědělské produkce, ale také zaměstnanosti, údržby krajiny a agroturistiky. Protože potlačení šíření výše uvedených patogenů je reálné zejména pomocí insekticidní ochrany proti jejich hmyzím přenašečům, je nezbytné připravit alternativní ochranná opatření a podporu pěstitelům révy v režimech ekologického zemědělství a integrované produkce. Cílený průzkum se proto zaměřil především na zjištění rozsahu výskytu výše uvedených chorob. Součástí závěrečné zprávy je vedle zjištěných výsledků i návrh doporučení odstupňovaných opatření na potlačení výskytu těchto chorob, resp. snížení jejich škodlivosti na území ČR.

Podrobnější informace o syndromu ESCA jsou k dispozici [na webu ÚKZÚZ](#), popř. na [Rostlinolékařském portálu](#).

S ohledem na celkovou plochu vinic v ČR, která činí téměř 18 tis. ha, byl průzkum rozdělen do dvou etap. V 1. etapě (r. 2021) byl proveden průzkum rozsahu rozšíření stolburu, ESCA a možného výskytu GFDP v nejhroženější části ČR, tj. zejm. v příhraničních oblastech jižní Moravy. Průzkum byl zaměřen především na rizikové výsadby starší 8 let a vůči daným patogenům nejnáchylnější odrůdy révy.

V následujících letech se předpokládá 2. etapa, která by podobným způsobem a rozsahem zmapovala aktuální situaci v Čechách.

2. METODIKA A ROZSAH

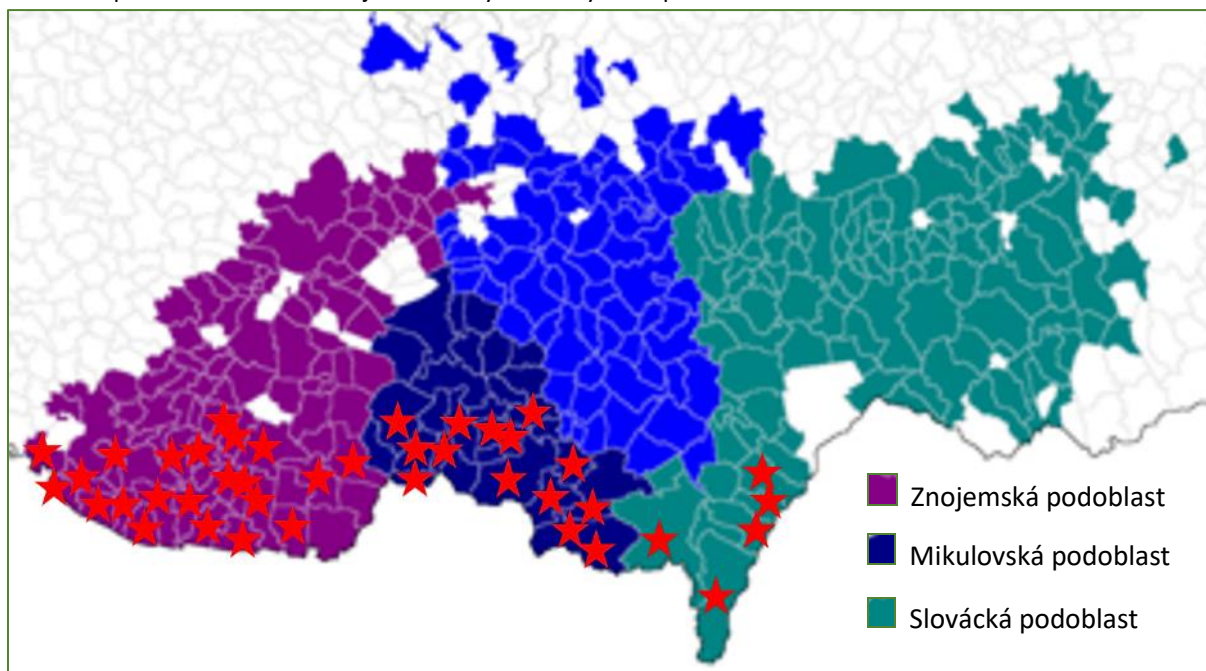
2.1 Rozsah průzkumu

V roce 2021 ÚKZÚZ realizoval komplexní průzkum vybraných **50 vinic** ležících na katastrálních územích 37 obcí Jihomoravského kraje, vinařské oblasti Morava, **vinařské podoblasti znojenské, mikulovské a částečně slovácké**, a to z důvodu hospodářského významu révy vinné pro region jižní Moravy. Jednalo se o vinice ležící v příhraničí s Rakouskou republikou, starší 8 let, ve kterých jsou pěstovány náchylné odrůdy révy vinné – viz obr. 1.

Průzkum byl zaměřen především na komplex houbových patogenů způsobujících **choroby kmínků révy** (GTD), zejm. syndrom ESCA. Současně byl proveden průzkum vinic na výskyt dalších škodlivých organismů (ŠO) révy, které způsobují rovněž předčasné chřadnutí a odumírání keřů, čímž dochází nejen ke snížení výnosu hroznů ve vinicích a jejich kvality, ale vlivem snížené životnosti i k výpadkům keřů ve výsadbách a nutnosti jejich podsady, což představuje významné ekonomické škody pěstitelům. Jednalo se o původce **stolburu**, tj. fytoplazmu *'Candidatus' Phytoplasma solani* (Potato stolbur phytoplasma – PSP), která je regulovaným nekaranténním ŠO pro rozmnožovací materiál révy vinné a která způsobuje postupné chřadnutí a předčasné odumírání keřů. S ohledem na výběr lokalit

v příhraničí a riziko zde možného prvního výskytu karanténního škodlivého organismu – Grapevine flavescence dorée phytoplasma, byl průzkum zaměřen i na původce **fytoplazmového zlatého žloutnutí révy** – GFDP. Odebrané vzorky byly současně testovány i na přítomnost dalších karanténních ŠO, kterými byli **původci virových a bakteriálních chorob révy**: virus kroužkovitosti rajčete (Tomato ringspot virus – ToRSV), virus kroužkovitosti tabáku (Tobacco ringspot virus – TRSV) a bakterie *Xylella fastidiosa*. Součástí průzkumu byl i monitoring výskytu rezervoárových plevelných hostitelských rostlin a potenciálních hmyzích přenašečů GFDP a fytoplazmy stolburu.

Obr. 1 Mapa katastrálních území jižní Moravy zahrnutých do průzkumu



Průzkum byl proveden na počátku září 2021 v období, kdy jsou nejvíce manifestovány vizuální příznaky všech sledovaných chorob a současně přítomni i přenašeči.

Průzkum spočíval především v odběru různých druhů vzorků pro následné laboratorní analýzy, tj.

- a) vzorky dřeva, resp. pilin – **detekce konkrétních původců GTD, resp. ESCA**;
- b) letorosty révy – **detekce GFDP, stolburu, ToRSV, TRSV a bakterie *Xylella fastidiosa***;
- c) hmyzí přenašeči – **potvrzení výskytu přenašečů a detekce GFDP a stolburu**;
- d) plevelné rostliny – **detekce GFDP a stolburu**.

Na každé lokalitě byla na základě symptomatických projevů zjišťována **frekvence výskytu keřů s příznaky ESCA**. Na každé lokalitě bylo provedeno vizuální hodnocení 1000 keřů.

2.2 Metodika odběru a zpracování vzorků

Vzorky dřeva

Vzorky dřeva, resp. pilin se odebíraly přednostně z keřů s viditelnými příznaky. Na kmínku révy se nejdříve z místa odběru vzorku odstranila kůra a poté se pomocí akumulátorové vrtačky odebral vzorek pilin. S ohledem na co nejvyšší pravděpodobnost odběru vzorku z infikovaného pletiva se piliny odebíraly ze 3 částí kmínku – z blízkosti kořenového krčku, ze středové části a z vrcholové části v blízkosti zapěstovaných tažňů, a to vždy ze dvou různých na sebe kolmých stran. Jeden vzorek tak tvořily piliny ze 6 vrtů. Každý vrt byl fungicidně ošetřen a zatřen štěpařským balzámem. Mezi každým

odběrem vzorku byla provedena dezinfekce použitého nářadí. Z každé lokality bylo odebráno 5 vzorků; tj. celkem 250 vzorků dřeva. **Všechny vzorkované rostliny byly z důvodu možnosti jejich dohledání označeny visačkou s kódovým označením lokality a číslem odebraného vzorku.**

Odebrané vzorky dřevní hmoty byly na místě zachlazeny, rozděleny dle předem domluveného klíče a odvezeny do laboratoře ODŠOR ÚKZÚZ a Mendeleum – ústav genetiky k následnému zpracování. Laboratoře provedly u odebraných vzorků extrakci DNA, PCR amplifikace sledovaného ITS regionu DNA a přípravu NGS knihoven. Vlastní sekvenaci metodou NGS (sekvenování nové generace) provedl u všech vzorků ústav genetiky - Mendeleum (Zahradnická fakulta Mendelovy univerzity v Brně). ÚKZÚZ nyní na základě výsledků sekvenace provedl vyhodnocení sekvenačních dat. **Cílem průzkumu nebylo pouze zjištění rozsahu výskytu komplexu GTD/ESCA, které bylo provedeno vizuálně na místě, nýbrž diagnostikovat konkrétní původce tohoto onemocnění (NGS metodou).**

Vzorky letorostů

Přednostně byly vzorkovány příznakové rostliny. Z vybraných rostlin se odebíraly 40 cm dlouhé olistěné výhony. Mezi každým odběrem byla provedena dezinfekce použitého nářadí. Z každé lokality bylo odebráno 5 vzorků, tj. celkem 250 vzorků letorostů. **Všechny vzorkované rostliny byly z důvodu možnosti jejich dohledání označeny visačkou s kódovým označením lokality a číslem odebraného vzorku.**

Odebrané vzorky byly na místě zachlazeny a odvezeny do laboratoře ÚKZÚZ k následnému zpracování. Diagnostika GFDP, fytoplazmy stolburu a bakterie *Xylella fastidiosa* byla provedena molekulárně biologickou metodou PCR. Přítomnost virů TRSV a ToRSV byla testována sérologickou metodou ELISA.

Vzorky přenašečů

Odchyty přenašečů, zejm. kříška révového a dalších druhů křísků, včetně jejich larev, se prováděl sklepáváním, smýkáním či individuálně pomocí exhaustoru. Ulovení jedinci byli usmrceni v 90 % ethanolu a převezeny do laboratoře ÚKZÚZ k dalšímu zpracování. Na každé lokalitě se odebral jeden vzorek všech ulovených jedinců.

Celkem bylo odebráno 48 vzorků přenašečů, ve kterých bylo hledáno celkem deset druhů křísků: *Scaphoideus titanus*, *Hyalestes obsoletus*, *Reptalus panzeri*, *Reptalus quinquecostatus*, *Cixius wagneri*, *Fieberiella florii*, *Nealiturus fenestratus*, *Orientus ishidae*, *Dictyophara europea*, *Phlogotettix cyclops*. **Vedle zmapování výskytu kříška révového byli laboratoři ÚKZÚZ přenašeči testováni i na přítomnost původců GFDP a fytoplazmy stolburu v jejich těle.**

Vzorky plevelných hostitelských druhů rostlin

Vzorky plevelných rostlin se odebíraly v příznakových i nepříznakových vinicích; v případě plaménku i v blízkosti vzorkovaných vinic. Vzorky svlačce rolního se odebíraly pouze z příznakových rostlin. V případě kopřivy dvoudomé, která je bezpříznaková, se vzorky přednostně odebíraly z rostlin rostoucích poblíž keřů s příznaky. V případě plaménku plotního se přednostně odebíraly vzorky z příznakových rostlin. Rostliny byly následně testovány na přítomnost GFDP (plamének) a fytoplazmy stolburu (kopřiva a svlačec). Z každé lokality se odebíraly max. 2–3 rostliny jednoho druhu. Všechny odebrané vzorky byly označeny, aby byly identifikovatelné s místem jejich odběru / lokalitou, zachlazeny a následně zpracovány v laboratoři ÚKZÚZ metodou PCR.

Podrobnější popis použitých laboratorních metod je uveden v příloze č. 1.

3. VÝSLEDKY

3.1 Chřadnutí keřů révy (komplex houbových patogenů – GTD/ESCA)

Komplex houbových patogenů GTD/ESCA byl řešen dvojím způsobem. Jednak laboratorně s cílem detekovat konkrétní původce a jednak vizuálně přímo v porostech révy s cílem zjistit frekvenci/rozsah napadení na 1000 keřů. **Rozsah napadení monitorovaných vinic se pohyboval od 0,1 % (odrůda Chardonnay) do 56,4 % (odrůda Ryzlink vlašský), přičemž průměrné napadení bylo 15,6 %.** Míra napadení jednotlivých sledovaných odrůd je uvedena v tabulce.

Tab. Vyhodnocení frekvence výskytu GTD/ESCA ve vinicích vizuálním hodnocením

Bílé odrůdy (rozpětí / počet lokalit)	Červené odrůdy (rozpětí / počet lokalit)
1. Hibernál (HI) průměr odrůdy 3,3 %; (rozpětí 3,3 %; 1 lokalita)	1. Agni (AG) průměr odrůdy; 2,3 %; (rozpětí 2,3 %; 1 lokalita)
2. Chardonnay (CH) 5,0 %; (0,1–9,8 %; 4)	2. Zweigeltrebe (ZW) 6,3 % (6,3 %; 1)
3. Müller Thurgau (MT) 7,1 %; (2,8–11,8 %; 3)	3. Svatovavřínecké (SV) 7,6 % (7,6 %; 1)
4. Rulandské šedé (RŠ) 7,8 %; (0,5–15,9 %; 5)	4. Merlot (ME) 8,1 % (8,1 %; 1)
5. Rulandské bílé (RB) 12,7 %; (2,3–23,9 %; 5)	5. Cabernet Sauvignon (CS) 9,9 %; (8,5–11,2 %; 2)
6. Pálava (PA) 13,0 %; (13,0 %; 1)	6. Frankovka (FR) 17,5 %; (1,9–54,6 %; 4)
7. Muškát moravský (MM) 13,2 %; (13,2 %; 1)	7. Rulandské modré (RM) 19,9 % (19,9 %; 1)
8. Sauvignon (SG) 13,3 %; (1,0–24,3 %; 5)	8. Modrý Portugal (MP) 21,2 %; (10,3–35,7 %; 3)
9. Ryzlink rýnský (RR) 19,6 %; (13,2–25,3 %; 3)	
10. Tramín červený (TČ) 42,7 %; (40,8–44,5 %; 2)	
11. Ryzlink vlašský (RV) 56,4 %; (56,4 %; 1)	
Průměrné napadení na lokalitu a odrůdu 15,6 %.	

Laboratorní vyhodnocení odebraných vzorků probíhalo do dubna 2022. Ze všech 250 vzorků byla v potřebné kvalitě a kvantitě izolována DNA, což bylo ověřeno fluorimetrickým stanovením její koncentrace a byly připraveny tzv. amplikonové knihovny pro masivně paralelní sekvenování, v laboratoři Mendeleum (Mendelova univerzita v Brně), která vlastní přístrojové vybavení pro masivně paralelní sekvenování. Vyhodnocení sekvenačních dat proběhlo současně v obou laboratořích (ÚKZÚZ a Mendeleum). Přehled výstupů sekvenace je součástí kapitoly 3.1.1.

3.1.1 Masivně paralelní sekvenování DNA extrahované z pilin odebraných ze symptomatických rostlin révy vinné

Byly připraveny amplikonové knihovny technologií Nextera (Špetík et al., 2022), které byly následně kontrolovány dle metodiky uvedené v publikaci Špetík et al. (2022), dále byly knihovny sekvenovány v laboratoři Mendeleum – ústavu genetiky, ZF MENDELU. Pro sekvenování těchto knihoven byl využit přístroj MiniSeq (Illumina), detailně je postup popsán v publikaci Špetík et al. (2022). Celkem bylo realizováno 13 tzv. běhů přístroje MiniSeq (Illumina Inc., San Diego, USA).

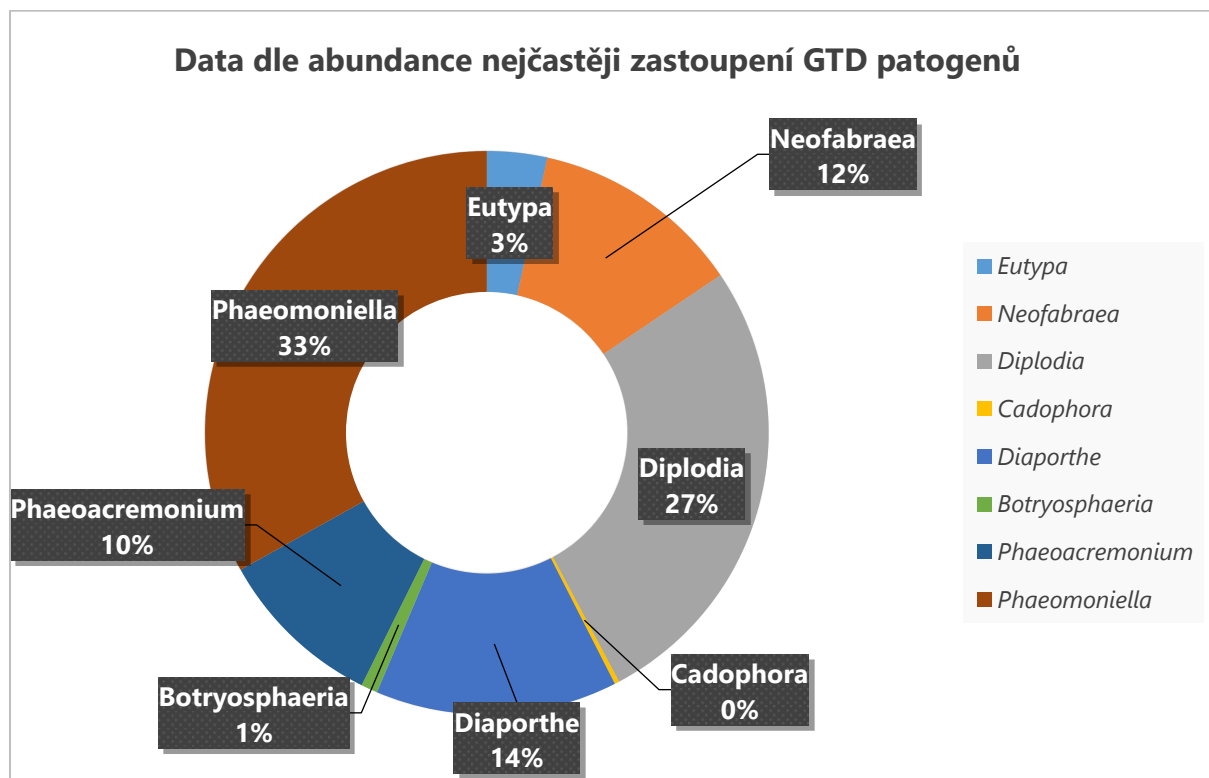
Výsledná data ve formátu fastq byla vyhodnocena pomocí software SEED v2 (Větrovský et al., 2018).

Celkem bylo vzorkováno 250 vzorků, v rámci kterých bylo detekováno více než 1000 rodů hub.

V rámci detekce byly hodnoceny abundance **GTD patogenů (patogenů způsobujících choroby kmínku révy vinné)**, přičemž **nejzastoupenější byly rody *Botryosphaeria*, *Diaporthe*, *Diplodia*, *Eutypa*, *Neofabraea*, *Phaeocremonium* a *Phaeomoniella*** (graf 1).

Nejzastoupenějším patogenem byly houby rodu *Phaeomoniella*, jejichž přítomnost ve dřevě révy vinné způsobuje symptomy choroby ESCA (či Petriho choroby) stejně jako *Phaeoacremonium*. *Diplodia* a *Botryosphaeria* způsobují symptomy Botryosphaeriového odumírání, *Diaporthe* Phomopsisový úžeh a *Eutypa* Eutypové odumírání. Významně zastoupená byla i *Neofabraea*, která má pravděpodobně vliv na expresi symptomů ESCA (Lengyel at al. 2020).

Graf 1 Prstencový graf vzájemného procentického zastoupení patogenů komplexu GTD. *Phaeomoniella* 33 % - způsobuje ESCA a Petriho chorobu; *Diplodia* 27 % - způsobuje Botryosphaeriové odumírání; *Diaporthe* 14 % - způsobuje Phomopsisový úžeh; *Neofabraea* 12 % - pravděpodobně způsobuje ESCA a Petriho chorobu; *Phaeoacremonium* 10 % - způsobuje ESCA a Petriho chorobu; *Eutypa* 3 % - způsobuje Eutypové odumírání; *Botryosphaeria* 1 % - Botryosphaeriové odumírání; *Cadophora* 0,09 % - způsobuje ESCA a Petriho chorobu

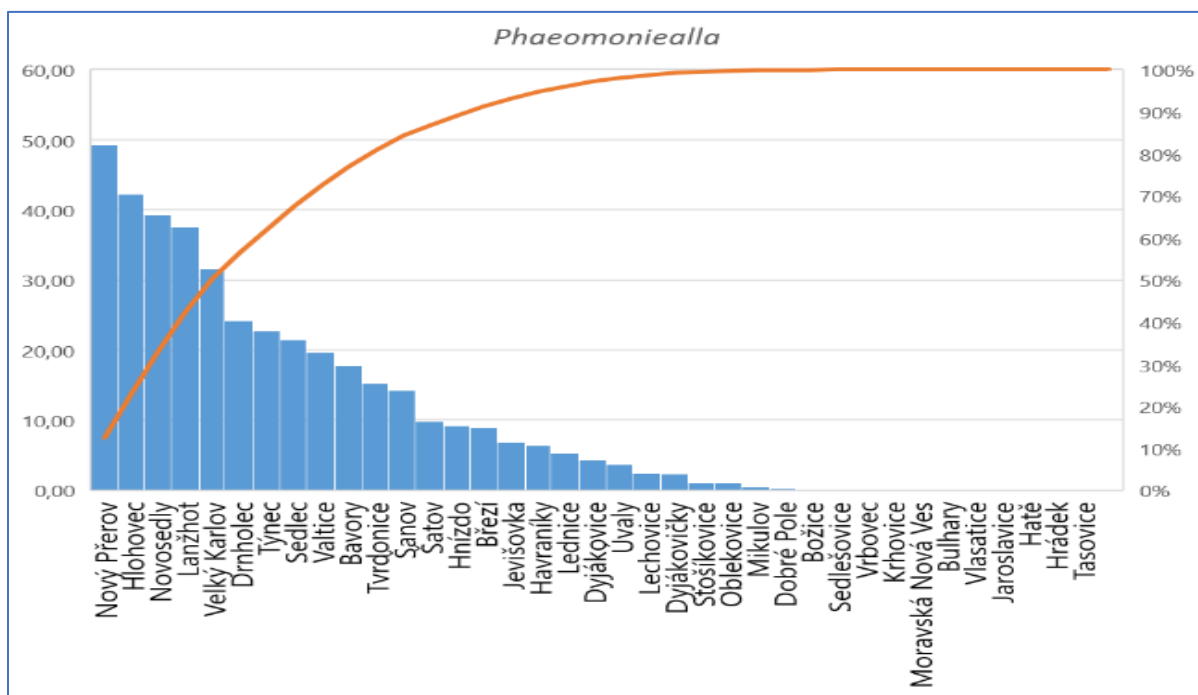


Nejzastoupenější detekovaný patogen *Phaeomoniella* byl detekován ve velmi významných hodnotách (nad 30 % vůči všem ostatním detekovaným houbám) v obcích Nový Přerov, Hlohovec, Novosedly, Lanžhot a Velký Karlov (graf 2). V těchto obcích byl detekován na odrůdách Pálava, Sauvignon Blanc, Svatovavřínecké, Rulandské bílé, Zweigeltrebe, Müller Thurgau a Ryzlink rýnský.

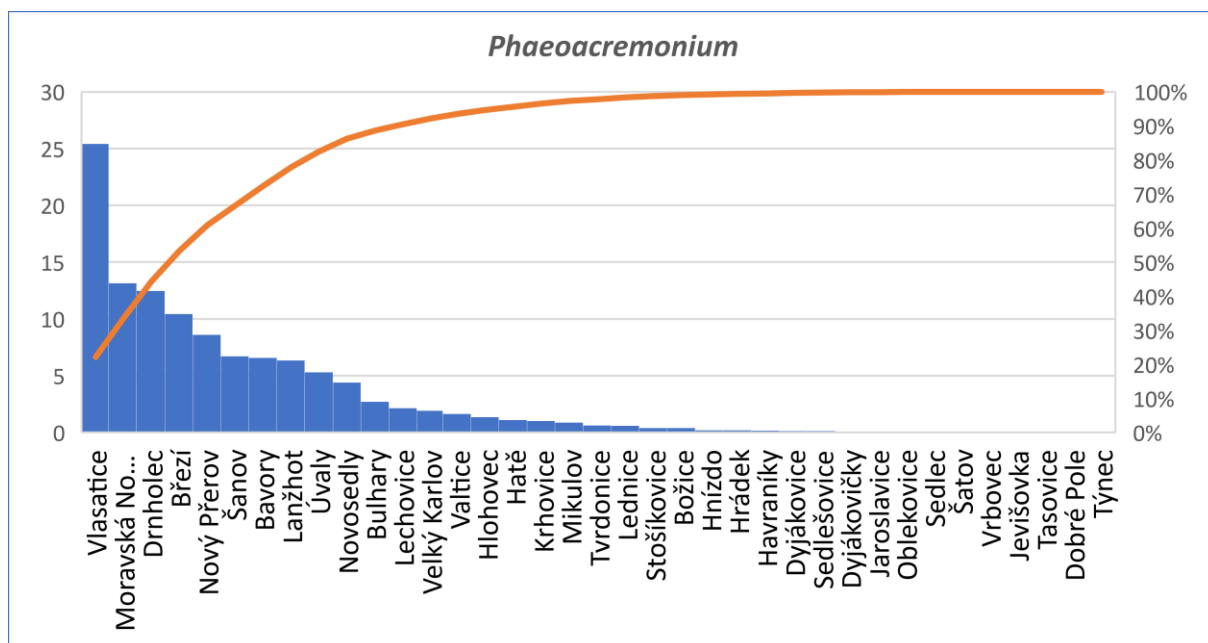
Významně zastoupeným patogenem, rovněž způsobujícím syndrom ESCA, byly houby rodu *Phaeoacremonium*, které byly v obcích Vlasatice, Moravská Nová Ves, Drnholec a Březí zastoupeny nad 10 % (graf 3), a to na odrůdách Andi, Chardonnay, Modrý Portugal, Sylvánské zelené.

Dalším faktorem, který byl sledován, byl vliv odrůdy na výskyt symptomů onemocnění a abundanci patogenů. **Nejvíce GTD patogenů bylo detekováno ve dřevě odrůdy Pálava (Nový Přerov), a to 28,85 % patogenu *Diaporthe*; 11,4 % *Neofabraea*; 20,81 % *Phaeoacremonium* a 25,7 % *Phaeomoniella*.**

Graf 2 Paretův graf s kumulativní čarou na vedlejší ose vyjadřující procento celku. Graf vyjadřuje zastoupení patogenu *Phaeomoniella* ke všem ostatním detekovaným houbám. V rostlinách révy ve vinohradech v Novém Přerově a Hlohovci bylo detekováno více jak 40 % tohoto patogenu v poměru ke všem ostatním detekovaným houbám.

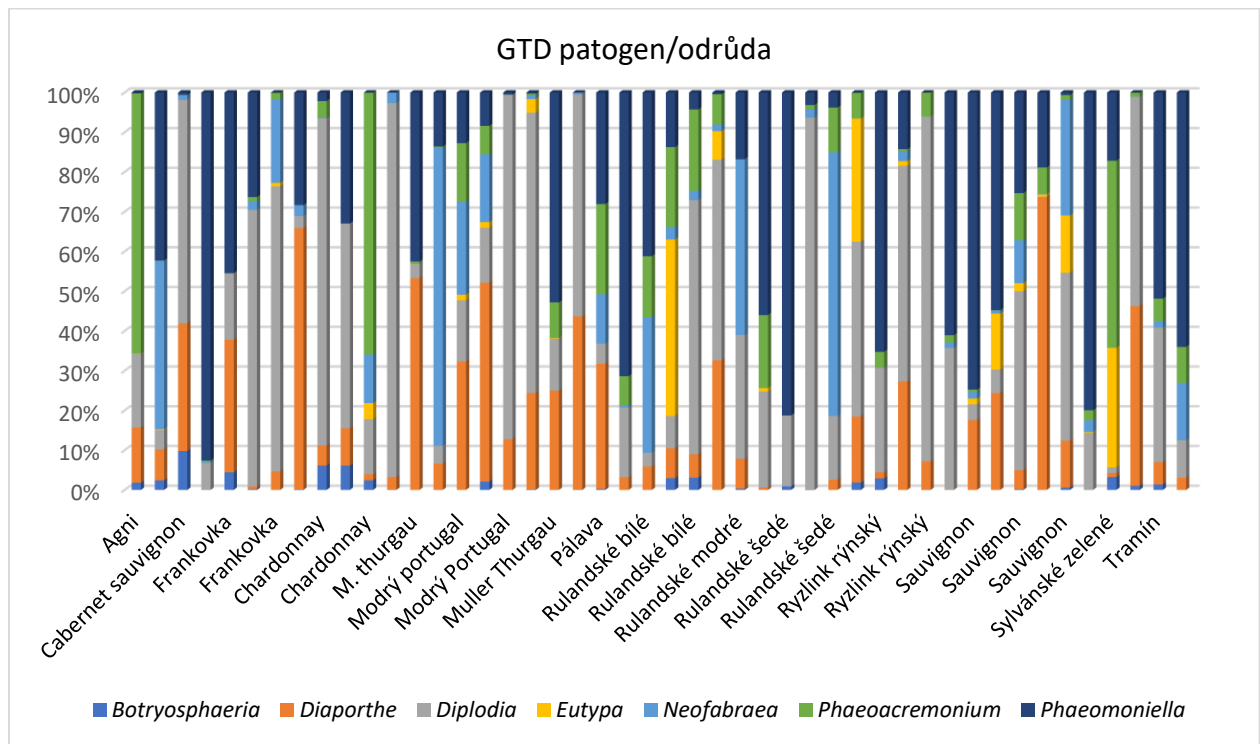


Graf 3 Paretův graf s kumulativní čarou na vedlejší ose vyjadřující procento celku. Graf vyjadřuje zastoupení patogenu *Phaeoacremonium* ke všem ostatním detekovaným houbám. V rostlinách révy v plochách obce Vlasatice bylo detekováno více jak 25 % tohoto patogenu v poměru ke všem ostatním detekovaným houbám.



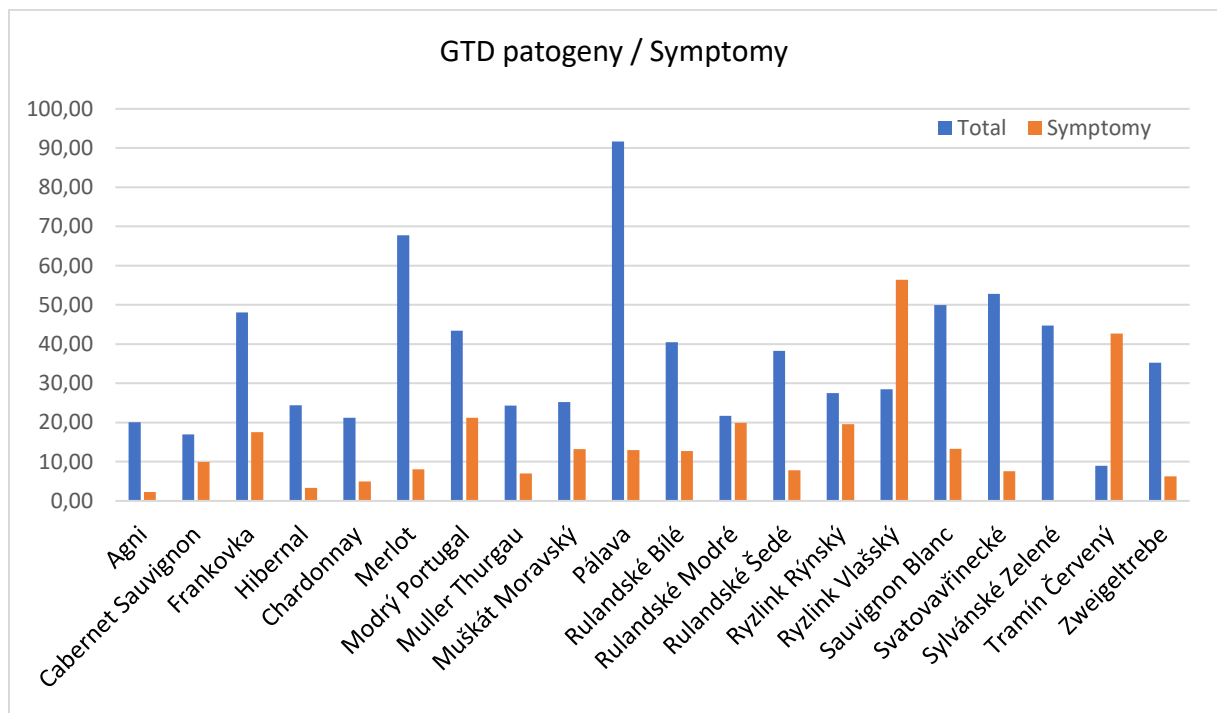
Graf 4 ukazuje složení spekter GTD patogenů přítomných ve dřevě různých odrůd. Na grafu 4 je zřetelný trend, a to že v rámci odrůd nepanuje shoda v abundanci přítomnosti patogenů, a to pravděpodobně s ohledem na agrotechniku aplikovanou v jednotlivých vinohradech a klimatické a půdní podmínky konkrétních vinohradů.

Graf 4 Skládaný sloupcový graf nejvíce abundančně detekovaných GTD patogenů v rámci šetřených odrůd



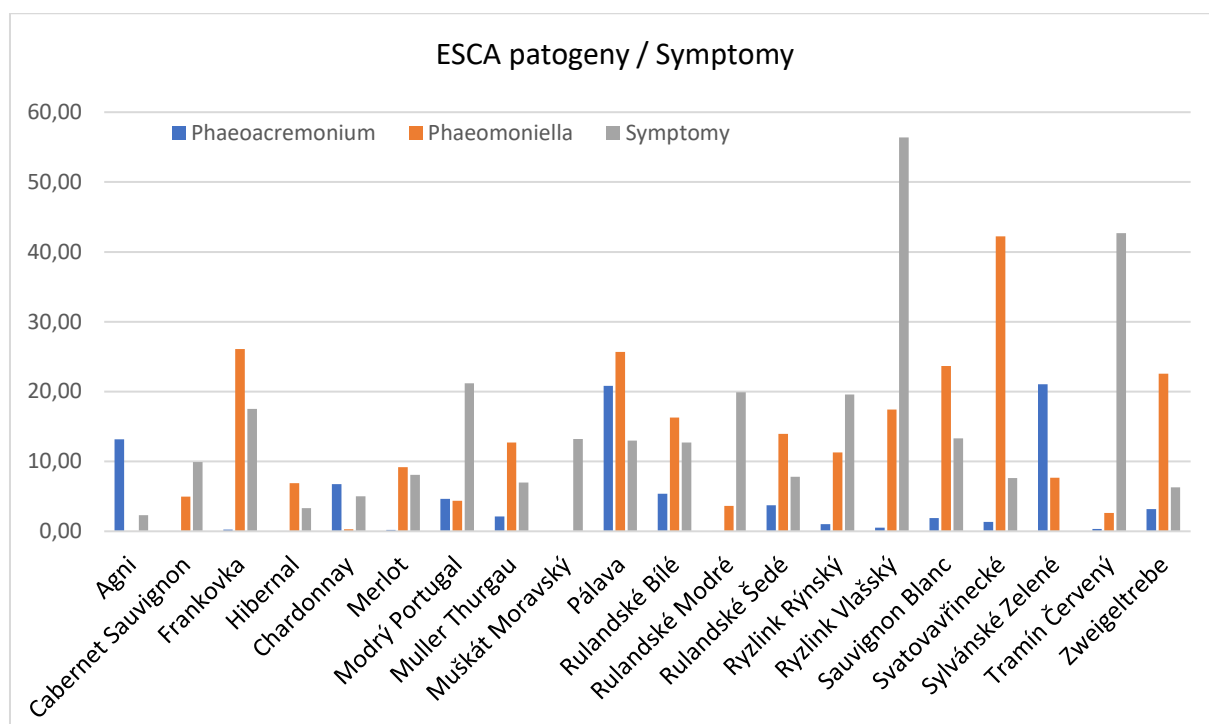
Graf 5 popisuje průměry detekovaných abundancí na odrůdy v poměru k průměrům zaznamenaných symptomů. V zásadě lze sledovat trend – pokud převyšuje hodnota modrého sloupce hodnotu oranžového sloupce, může se jednat o odrůdu se zvýšenou tolerancí (čím větší rozdíl, tím zajímavější by odrůda měla být z hlediska tolerance k GTD patogenům). Pokud je tomu naopak, jedná se zřetelně o velmi citlivou odrůdu. Ideální jsou pak odrůdy, kdy jsou oba sloupce na co nejnižších hodnotách.

Graf 5 Sloupcový graf celkového poměru abundance všech detekovaných GTD patogenů v poměru k procentickému zastoupení symptomů



Graf 6 vyobrazuje odolnost odrůd k ESCA patogenům (*Phaeoacremonium* a *Phaeomoniella*). **Jako nejodolnější odrůdy pak vychází Agni, Hibernál, Chardonnay a Zweigeltrebe. Odrůdy Ryzlink vlašský a Tramín červený jsou nejcitlivější.** Tramín červený navíc vykazuje velmi nízké abundance GTD patogenů, a přesto odrůda manifestovala velmi závažné symptomy, a to zejména symptomy choroby ESCA.

Graf 6 Sloupcový graf celkového poměru abundance ESCA patogenů (*Phaeoacremonium* a *Phaeomoniella*) v poměru k procentickému zastoupení symptomů.



3.2 Fytoplazmové žloutnutí a červenání listů révy (*Candidatus* Phytoplasma solani) – stolbur

Průzkum výskytu stolburu byl prováděn vizuálním vyhledáváním a odběrem vzorků příznakových rostlin révy, odběrem hostitelských plevelných rostlin svlačce a kopřivy a odchytem přenašeče žilnatky vironosné. Ze všech 250 testovaných vzorků révy je **161 vzorků pozitivních na fytoplazmu stolburu (64,4 %)**. Celkem byla tato fytoplazma zjištěna u minimálně jednoho z pěti testovaných vzorků na 44 z 50 vzorkovaných vinic (88 %).

Ze 42 odebraných vzorků svlačce rolního byl stolbur detekován ve 21 (50 %). U 6 vzorků kopřivy dvoudomé fytoplazma detekována nebyla. Celkem bylo rozborováno 48 vzorků na přenašeče fytoplazem ve vinicích. **Žilnatka vironosná (*Hyalestes obsoletus*) nebyla detekována v žádném z odebraných vzorků.**

3.3 Fytoplazmové zlaté žloutnutí révy vinné (*Grapevine flavescence dorée* phytoplasma) – GFDP

Průzkum výskytu GFDP byl prováděn jednak vizuální prohlídkou a odběrem vzorků z příznakových rostlin révy, jednak odběrem hostitelských plevelných rostlin plaménku plotního a jednak odchytem přenašečů, zejm. kříška révového ale i dalších druhů kříšů. U 249 vzorků révy byl výsledek negativní,

jeden vzorek **byl pozitivní na přítomnost Grapevine flavescence dorée fytoplazmy – GFDP**. Vzorek byl konfirmován s pozitivním výsledkem v EURL pro viry, viroidy a fytoplazmy ve Slovinsku (NIB).

Ze čtyř nalezených a odebraných plamének v rámci průzkumu byly **dva plaménky pozitivně testovány na přítomnost GFDP**. Ze 48 rozborovaných vzorků přenašečů byl ve 4 vzorcích potvrzen hlavní přenašeč GFDP křísek révový (*Scaphoideus titanus*). Potenciální vektor čelnatka řebříčková (*Dictyophara europea*) byla detekována ve třech vzorcích (vždy po 1 jedinci) a kříš *Neoliturus fenestratus* v jednom vzorku (3 jedinci). **Všichni odchycení jedinci byli testováni na GFDP s negativním výsledkem.**

V rámci tohoto průzkumu byl detekován první výskyt karanténního škodlivého organismu GFDP na celkem třech různých lokalitách na území ČR.

3.4 ToRSV a TRSV

Laboratorní diagnostika byla provedena u všech 250 odebraných vzorků. **Všechny vzorky jsou na přítomnost těchto karanténních virů negativní.**

3.5 Bakterie *Xylella fastidiosa*

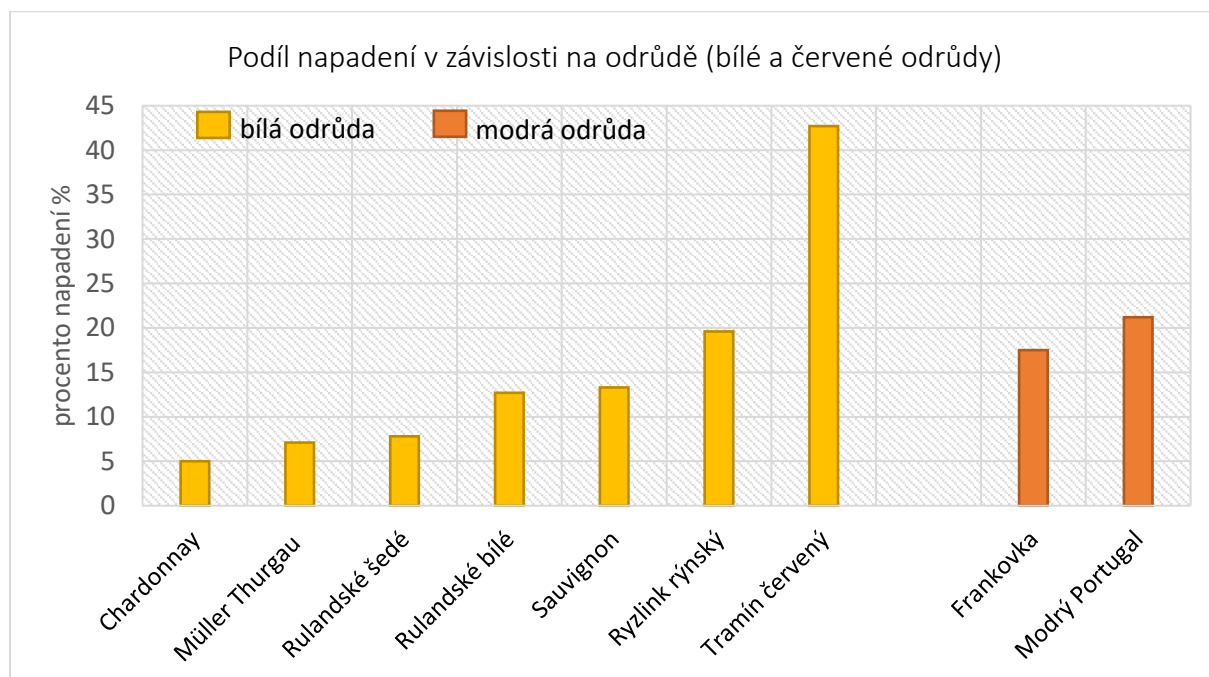
Laboratorní diagnostika byla provedena u 50 odebraných vzorků – vždy 1 vzorek na lokalitu. **Všechny vzorky jsou na přítomnost této bakterie negativní.**

4. ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ

4.1 Souhrn výsledků

Celkem bylo vizuálně monitorováno 50 000 keřů. 250 keřů z 50 lokalit (vždy 5 keřů na lokalitu) bylo vzorkováno na GTD/ESCA a 250 keřů z 50 lokalit (vždy 5 keřů na lokalitu) bylo vzorkováno na fytoplazmu stolburu a karanténní ŠO: GFDP, TRSV a ToRSV. 50 keřů z 50 lokalit (vždy 1 keř na lokalitu) bylo vzorkováno na karanténní bakterii *Xylella fastidiosa*. Uvedené množství kontrolovaných keřů a odebraných vzorků představuje reprezentativní vzorek.

Graf 7 Zjištěná průměrná intenzita výskytu příznaků GTD/ESCA v závislosti na odrůdě

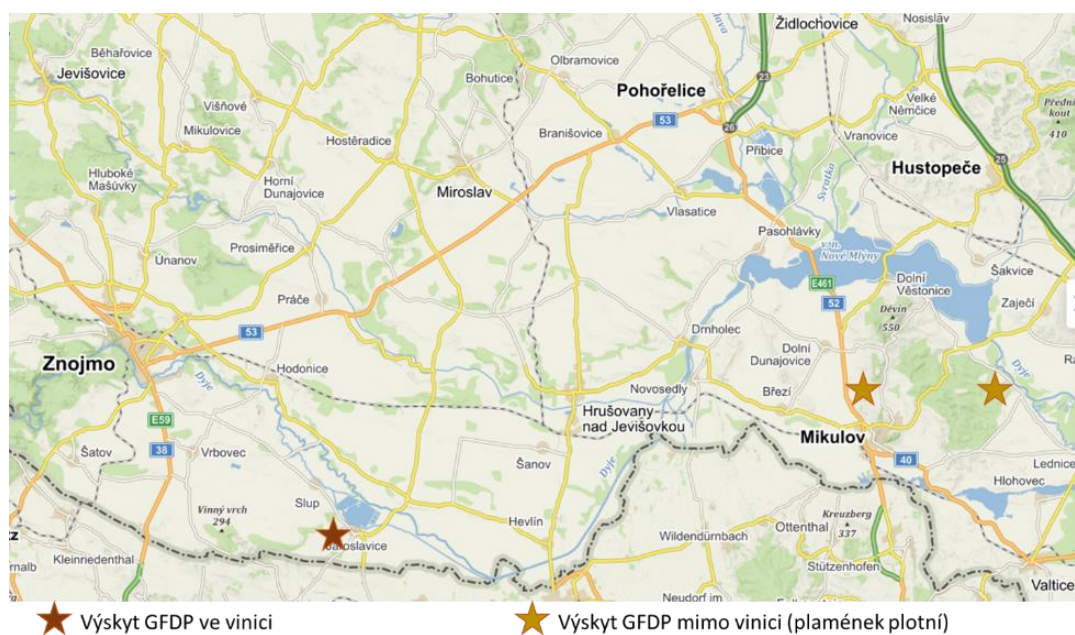


Graf je zpracován pouze pro odrůdy, které se v rámci průzkumu vyskytly alespoň 3krát.

Ze získaných údajů vyplývá, že **problém výskytu GTD/ESCA ve vinicích všech obcí a vinařských podoblastí**, kde byl proveden průzkum, **je významný a pro snížení dalšího šíření původců této choroby je třeba přijmout určitá opatření**, např. v AEKO (IP – integrovaná produkce révy vinné) aj. Škodlivost GTD/ESCA vzrůstá se stářím vinic a rovněž v závislosti na citlivosti odrůd, v jednom případě dosáhlo napadení keřů ve vinici (Havraníky, Ryzlink vlašský) 56,4 % (možná kombinace s nutričními nedostatky). Průměrná hodnota napadení byla 15,6 %, což představuje potenciální výpadek keřů z důvodu předpokládaného úhynu těchto napadených keřů v nejbližších letech (viz graf 7). Rovněž výskyt fytoplazmového žloutnutí a červenaní listů révy (stolbur) má stále stoupající tendenci, přestože nedosahuje hodnot napadení GTD/ESCA.

Potvrzený první výskyt GFDP na území ČR představuje problém, kterým je nutné se z hlediska prevence a ochrany révy zabývat. **V současné době je potvrzen 1 výskyt tohoto karanténního ŠO na révě vinné na lokalitě Oleksovičky nedaleko Znojma. Další výskyt byl potvrzen na lokalitách Bavy a Bulhary, které leží na území CHKO Pálava (viz obr. 2). Zde byl výskyt potvrzen v hostitelských rostlinách plaménku plotního.** V rámci provedeného průzkumu nebyla v tělech přenašečů potvrzena přítomnost GFDP v žádném ze 48 odebraných vzorků. Průzkum ostatních karanténních ŠO, tj. TRSV, ToRSV a bakterie *Xylella fastidiosa* přítomnost těchto organismů nepotvrdil.

Obr. 2 Mapa prvních zjištěných výskytů GFDP na území ČR



4.2 Doporučená opatření proti GTD/ESCA a stolburu

Z opatření, která je možné doporučit pěstitelům révy a která by se měla stát jako systémové řešení fixní součástí podmínek AEO se doporučuje:

- Odstraňování a likvidace odumřelých keřů révy vinné nebo jejich částí nejpozději do 15. května následujícího kalendářního roku (GTD/ESCA).
- Každoroční ošetření větších poranění a řezných ran po řezu keřů povolenými prostředky k ošetření ran (GTD/ESCA).
- Provádění vyššího počtu ošetření proti rezervoárovým plevelům, alespoň 3 ročně (stolbur).
- Aplikace herbicidů v meziřadí a manipulačním prostoru vinice proti rezervoárovým plevelům (stolbur).

Aby toto bylo možné i v režimu IP, je **nutné doplnit do Nařízení č. 75/2015 Sb.**, o podmínkách provádění agroenvironmentálně-klimatických opatření následující **aktivity omezující výskyt a šíření GTD/ESCA a stolburu.**

- a) Umožnit odstranění a likvidaci odumřelých keřů révy vinné nebo jejich části nejpozději do 15. května následujícího kalendářního roku.
- b) Zavést podmínku každoročního ošetření větších poranění a řezných ran po řezu keřů povolenými prostředky k ošetření ran.
- c) Umožnit vyšší počet ošetření proti rezervoárovým plevelům v příkmenném pásu vinice, tzn. za celé období trvání závazku nejvýše 12 aplikací herbicidů, přičemž ročně takto se provedou max. 3 aplikace herbicidů.
- d) Umožnit výjimku ze zákazu aplikace herbicidů v meziřadí a manipulačním prostoru vinice pro bodové ošetření rezervoárových plevelných rostlin stolburu.

4.3 Opatření proti GFDP

S ohledem na první výskyt karanténního patogena GFDP na území ČR ÚKZÚZ v souladu s fyto-sanitární legislativou EU (nařízení EP a Rady (EU) 2016/2031) provede v roce 2022 vymežovací průzkum v lokalitách s jeho potvrzeným výskytem, eradikuje zjištěná ohniska výskytu a nařídí dle § 76 zákona č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči dotčeným podnikům mimořádná rostlinolékařská opatření (MRO) k zamezení dalšímu šíření GFDP. Na základě nařízených opatření musí dotčení pěstitelé révy, a to včetně rozmnožovacího materiálu:

- a) sledovat nejvýznamnějšího vektora této choroby – kříška révového pomocí optických lapáků (žlutých lepových desek) a provádět proti němu insekticidní ošetření, a to i preventivně;
- b) ve vinohradech a jejich okolí sledovat a v případě zjištění stanoveným způsobem likvidovat rezervoárové rostliny GFDP (zejména plaménku plotního).

Aby toto bylo možné i v režimu IP, je nutné zajistit, aby nutnost likvidace pozitivních keřů révy a zejména insekticidní ochrana proti křískovi z důvodu výskytu GFDP na základě nařízených MRO byla ze strany SZIF posuzována jako tzv. „vyšší moc“, a tito pěstitelé neztratili nárok na dotace.

Dále ÚKZÚZ projedná s MZe, zda **doplnit do Nařízení č. 75/2015 Sb.**, o podmínkách provádění agroenvironmentálně-klimatických opatření následující **aktivity preventivně omezující výskyt a šíření GFDP v oblasti jejího výskytu:**

- a) Zavést podmínku monitorování kříška révového pomocí optických lapáků (žlutých lepových desek).
- b) V případě potvrzeného výskytu kříška révového umožnit v systémech IP a EZ ošetření (minimálně 1x; optimálně 2x) proti nymfám a dospělcům tohoto přenašeče.
- c) Umožnit likvidaci rezervoárových plevelných rostlin GFDP v prostoru vinice.

Zároveň ÚKZÚZ aktualizuje stávající metodiku monitoringu kříška révového. Dále bude potřebné téma GFDP zařadit do každoročních školení žadatelů o dotace v IP révy. Rovněž bude nutné prověřit a zajistit pro pěstitele v systému IP a EZ dostatečné množství účinných insekticidů proti přenašečům této karanténní choroby, a to s ohledem na minimalizaci rizika vzniku rezistence.

4.4 Závěr

Cílený průzkum výskytu vybraných chorob révy provedený v 50 vinohradech jižní Moravy **potvrdil významný podíl vinic poškozených komplexem houbových patogenů – GTD/ESCA, a to v průměru 15,6 %. Nejčastěji detekovaným patogenem komplexu GTD způsobující onemocnění ESCA, je *Phaeomoniella*. Na základě výsledků lze doporučit pěstování odolných odrůd Agni, Hibernál,**

Chardonnay a Zweigeltrebe, naopak velmi citlivé a vnímané vůči GTD patogenům jsou odrůdy Tramín červený a Ryzlink vlašský. V rámci provedeného průzkumu byl na území ČR potvrzen první výskyt karanténního škodlivého organismu Grapevine flavescence dorée phytoplasma – GFDP, původce fytoplazmového zlatého žloutnutí révy vinné. Vzhledem k tomu, že pěstování révy je na jižní Moravě významným odvětvím nejen z hlediska zemědělské produkce, ale také zaměstnanosti, údržby krajiny a agroturistiky, představují uvedené choroby nejen ohrožení vinohradnictví jako takového, ale i značné riziko pro ekonomickou soběstačnost celého regionu.

Z výše uvedených důvodů vyplývá, že **výskyt syndromu ESCA, stolburu a nově též karanténního škodlivého organismu je nutné řešit komplexně na úrovni rezortu MZe ČR.** S ohledem na povahu šíření GFDP je nutné **zaměřit pozornost zejména na potlačení výskytu a šíření přenašečů prostřednictvím insekticidní ochrany.** Díky značnému podílu pěstitelů révy v režimech ekologické a integrované produkce je nezbytné připravit alternativní ochranná opatření vůči GFDP a ESCA a podporu pěstitelů zejména v těchto systémech pěstování. **Systémové řešení nabízí úprava AEKO 2022–2027 a návrh vhodných témat pro projekty NAZV.**

Podrobné výsledky průzkumu provedeného inspektory ÚKZÚZ byly prezentovány odborné veřejnosti na semináři pořádaném ÚKZÚZ 12. dubna 2022 ve Znojmě. Rovněž budou prezentovány na vědeckých konferencích a v odborných publikacích.

S ohledem na míru zjištěné infestace révy komplexem GTD/ESCA, fytoplazmy stolburu, ale i prvního nálezu GFDP v ČR a významnosti vinařského odvětví a pěstování vinné révy v ČR, bude nezbytné v nejbližších letech provést vymežovací průzkumy na GFDP na jižní Moravě a zároveň pokračovat v průzkumech výskytu vybraných původců chorob révy vinné a jejich přenašečů ve vinařské oblasti Čechy.

5. LITERÁRNÍ ZDROJE

Lengyel, S., Knapp, D.G., Karácsony, Z. *et al.* *Neofabrea kienholzii*, a novel causal agent of grapevine trunk diseases in Hungary. *Eur J Plant Pathol* **157**, 975–984 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02043-4>

Špetík, M., Balík, J., Híc, P., Hakalová, E., Štůsková, K., Frejlichová, L., ... & Eichmeier, A. (2022). Lignans Extract from Knotwood of Norway Spruce—A Possible New Weapon against GTDs. *Journal of Fungi*, *8*(4), 357.

Větrovský, T., Baldrian, P., & Morais, D. (2018). SEED 2: a user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics*, *34*(13), 2292-2294.

6. PŘÍLOHY

6.1 Laboratorní metody

Chřadnutí keřů révy (komplex houbových patogenů – GTD/ESCA)

Pro analýzu chorob kmínku révy vinné byly do Laboratoře molekulární biologie ODŠOR Olomouc (ÚKZÚZ) a laboratoře Mendeleum – ústav genetiky (Mendelova univerzita v Brně) dodány vzorky pilin odebrané navrtáním kmínku. Piliny byly homogenizovány v extrakčním pufru pomocí ponorného homogenizéru typu rotor-stator (IKA Labortechnik) a DNA byla následně izolována pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel). DNA houbového ITS regionu byla amplifikována v PCR pomocí GoTaq G2 Flexi DNA polymerázy (Promega) po naředění na 1 ng/μl. Požadované amplikony byly purifikovány, kvantifikovány fluorimetricky na přístroji Qubit a naředěny na výchozí koncentraci 0,2 ng/μl pro přípravu amplikonových knihoven. Knihovny byly připraveny pomocí kitu Nextera XT DNA Library Prep (Illumina) a jejich kvalita byla ověřena pomocí High sensitivity DNA kitu na Bioanalyzeru 2100 (Agilent Technology). Připravené amplikonové knihovny z obou výše uvedených laboratoří byly sekvenovány v laboratoři Mendelium – ústavu genetiky v Lednici. NGS data byla následně zpracována opět na obou pracovištích s použitím SW SEED2.

Fytoplazmové žloutnutí a červenání listů révy (‘Candidatus’ Phytoplasma solani) – stolbur

Fytoplazmové zlaté žloutnutí révy vinné (Grapevine flavescence dorée phytoplasma) – GFDP

Přítomnost fytoplazem byla testována pouze v laboratoři OdDŠOR Olomouc (ÚKZÚZ), a to molekulárními metodami. V případě vzorků révy a plaménku byly pro izolaci DNA použity listové žilky, v případě kopřivy a svlačce celé listy. Celkem 0,5 g rostlinného materiálu bylo homogenizováno v 5 ml extrakčního pufru poloautomatickým homogenizérem Homex 6 (Bioreba) v extrakčních sáčcích Bioreba. Ze získaného homogenátu byla celková DNA izolována pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation (Roche) podle návodu výrobce. Stejný kit byl použit pro izolaci DNA z hmyzích přenašečů. Vyizolovaná DNA byla amplifikována pomocí nested PCR detekující DNA fytoplazem z 16SrV skupiny včetně GFDP a z 16SrXII skupiny včetně STOL. Pro amplifikaci byla použita DNA polymerasa od firmy Biotools. V případě pozitivního výsledku analýzy pro fytoplazmu skupiny 16SrV je následně nezbytné určit, zda se jedná o GFDP nebo jiný druh z této skupiny. U pozitivních vzorků byla tedy provedena další nested PCR detekující odlišnou DNA oblast 16SrV fytoplazem. Získaný PCR produkt byl zaslán k sekvenaci do externí laboratoře (Eurofins GATC Biotech GmbH, Německo), obdržená sekvenční data byla poté analyzována pomocí SW Geneious a porovnána s referenčními sekvencemi pro GFDP. První nález na révě byl navíc potvrzen v EURL pro viry, viroidy a fytoplazmy (NIB, Slovinsko).

Původci virových onemocnění TRSV, ToRSV

Přítomnost obou virů byla zjišťována v laboratoři OdDŠOR Havlíčkův Brod (ÚKZÚZ) z listů révy metodou ELISA (imunoenzymatická metoda založená na principu interakce antigenu se specifickou protilátkou). Listový vzorek (0,5 g) byl zhomogenizován v 5 ml extrakčního pufru poloautomatickým homogenizérem Homex 6 (Bioreba). Připravený homogenát byl testován v přímé metodě ELISA s protilátkami značky Bioreba. Absorbance byly měřeny spektrofotometrem ELx 800 TM (BioTek Instruments) při vlnové délce 405nm.

Bakterie Xylella fastidiosa

Přítomnost bakterie byla testována v laboratoři OdDŠOR Olomouc (ÚKZÚZ). Pro detekci bakterie bylo použito 0,5 g rostlinného pletiva (přednostně byly odebírány listové žilky nebo řapíky), které bylo homogenizováno v 5 ml PBS pufru poloautomatickým homogenizérem Homex 6 (Bioreba) v extrakčních sáčcích Bioreba. Pro extrakci DNA pomocí High Pure PCR Template Preparation kitu Roche v laboratoři molekulární biologie bylo využito 300 μl přefiltrovaného rostlinného extraktu. Bakterie byla detekována pomocí specifické real-time PCR (Harper et al. 2010), včetně interní PCR

kontroly detekující DNA rostlinných buněk pro ověření kvality vyizolované DNA a vyloučení přítomnosti inhibitorů reakce. Asymptomatické vzorky byly testovány stejným postupem jako vzorky rostlin s příznaky.

6.2 Fotodokumentace

obr. 1 Ukázka odběru vzorků pilin pro následnou detekci původců GTD/ESCA



obr. 2 Symptomy napadení stolburem na červené odrůdě GTD/ESCA



obr. 3 Symptomy počínající infekce na bílé odrůdě



obr. 4 Detail symptomů GTD/ESCA na listech révy vinné



obr. 5 Projevy napadení GTD/ESCA ve vinici



obr. 6 Vzoroky před převozem do laboratoře ODŠOR

