

Výskyt maloplodosti třešně v ČR

Chroboková Eva¹, Suchá Jana¹, Ludvíková Hana¹, Zouhar Miroslav²

¹ Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy 1, 508 01 Hořice, Česká republika

² Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchdol, Česká republika

Úvod

- maloplodost třešně (Little Cherry Disease, LChD) je způsobena viry z čeledi *Closteroviridae* (*closter* – řecky vlákně), LChV-1, LChV-2 a dalšími izoláty (formami) těchto virů
- symptomy maloplodosti se vyvíjejí pod vlivem extrémních povětrnostních a klimatických podmínek, zvláště u vysoce citlivých odrůd, náchylnější jsou odrůdy s velkými tmavočervenými plody
- maloplodost třešně může významně snížit kvalitu plodů a výnos produkce
- v letech 2009 – 2011 byl zaznamenán výskyt maloplodosti v České republice (Ludvíková et al. 2011; Ludvíková, Suchá 2011)
- virus maloplodosti třešně LChV (neevropské izoláty) je karanténní ve všech členských zemích EU podle směrnice rady 2000/29/ES o ochranných opatřeních proti zavlečení škodlivých organismů

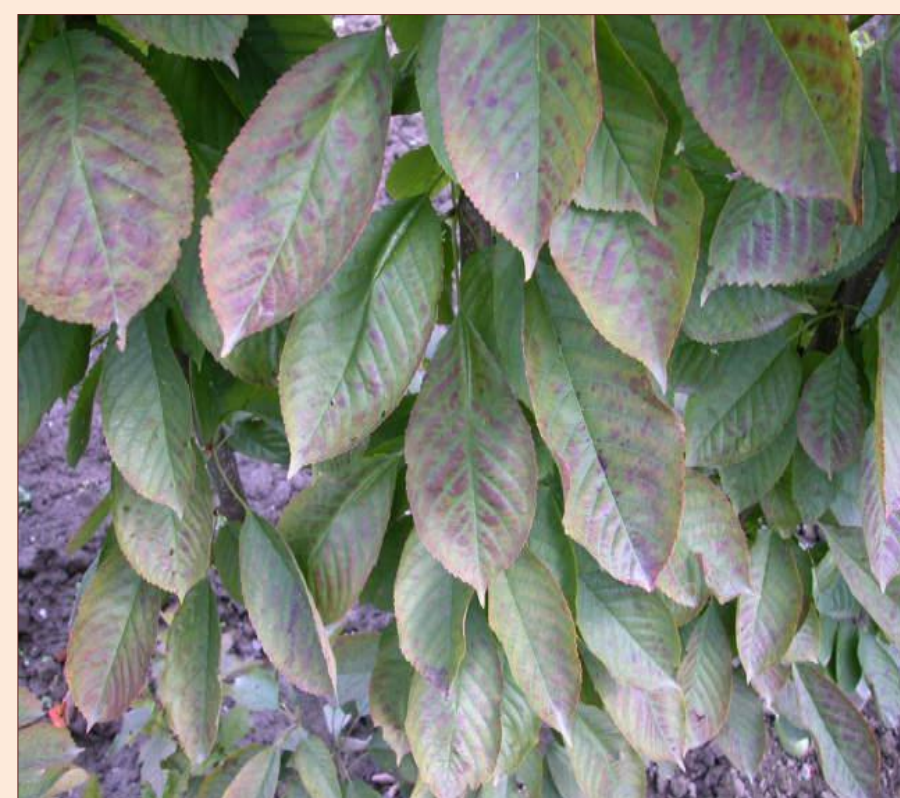
Příznaky – plody

- světle červená barva
- zašpičatělý tvar
- nahořklá chuť
- menší plody
- setrvání plodů na stromech



Příznaky – listy

- předčasná změna zbarvení listů (koncem léta)
- červeno-fialové až bronzové listy



Příznaky – stromy

- snížená životaschopnost
- zmenšený habitus



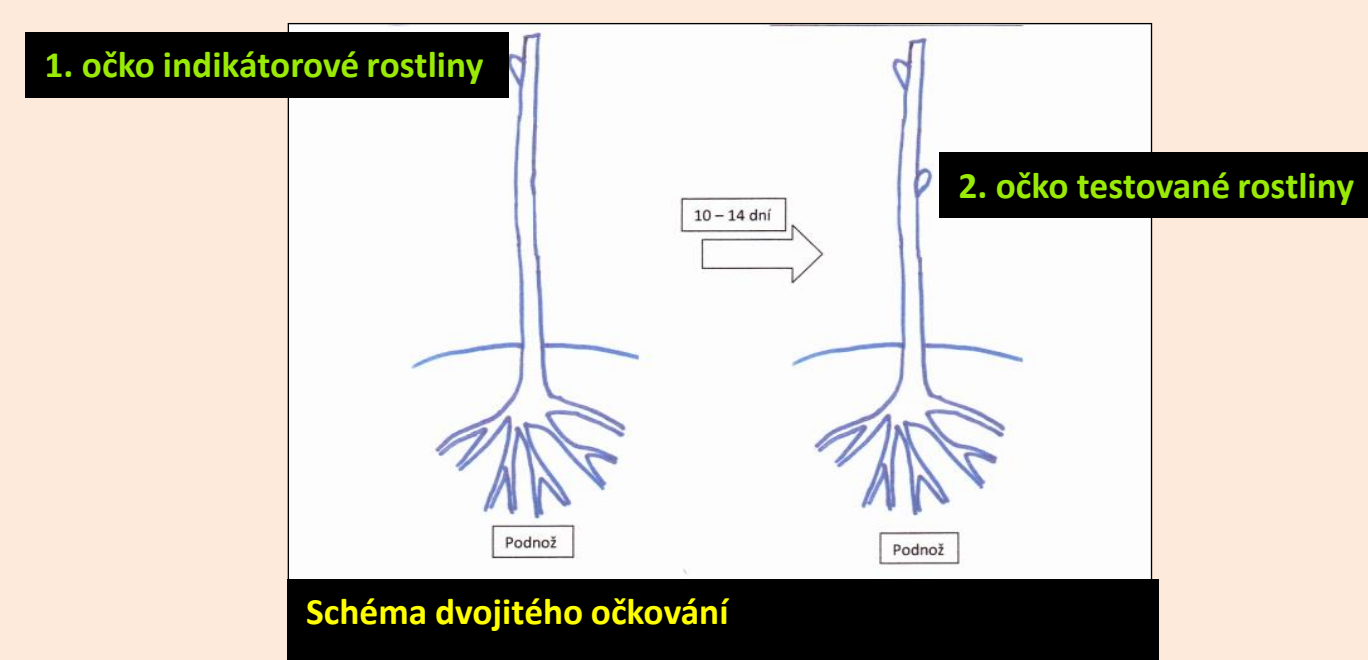
Možnosti detekce maloplodosti třešně

- monitoring symptomů (vizuální sledování příznaků)
- biologické testování (dřevinné indikátory)
- molekulární testování (metoda OneStep RT-PCR)

Materiál a metoda

A) Biologické testování – metoda dvojitého očkování

- v dubnu - zaškolování podnoží
- v srpnu - naočkování indikátoru (12 – 15 cm nad zemí), po 14 dnech naočkování očka testované rostliny (5 – 8 cm nad zemí) pod očko indikátoru



B) Molekulární testování – metoda OneStep RT-PCR

- odběr vzorků: z podezřelých třešní a višní jsou odebírány pupeny, květy nebo listy z celé koruny celkem 4 – 12 listů
- termín odběru: březen až květen
- izolace RNA: postupem podle MATOUŠEK et al. (2007) s využitím roztoku Concert Plant Rna Purification Reagent (INVITROGEN)
- metoda OneStep RT-PCR: založena na principu polymerázové řetězové reakce (PCR), během RT-PCR dojde k transkripci nukleové kyseliny RNA na DNA
- příprava reakční směsi RT-PCR reakce: podle návodu výrobce kitu
- primerový pár LCV3EC/LCV16659 (VITUSHKINA et al. 1997)
- kontrola PCR produktů na agarózové elektroforéze (90 V, 50 min)

Výsledky a diskuze

A) Výsledky biologického testování

- pomocí biologického testování byly testovány 4 stromy třešní a 2 stromy višní, u kterých byla nalezena pozitivní reakce pomocí molekulárních metod
- příznaky maloplodosti na indikátoru *P. avium* cv. Canindex v 1. roce testování (obr. 1), případně v 2. roce testování (obr. 2)
- hodnocení je doporučeno provádět minimálně dva roky
- dřevinné indikátory potvrdily přítomnost onemocnění maloplodosti u 2 stromů višní.

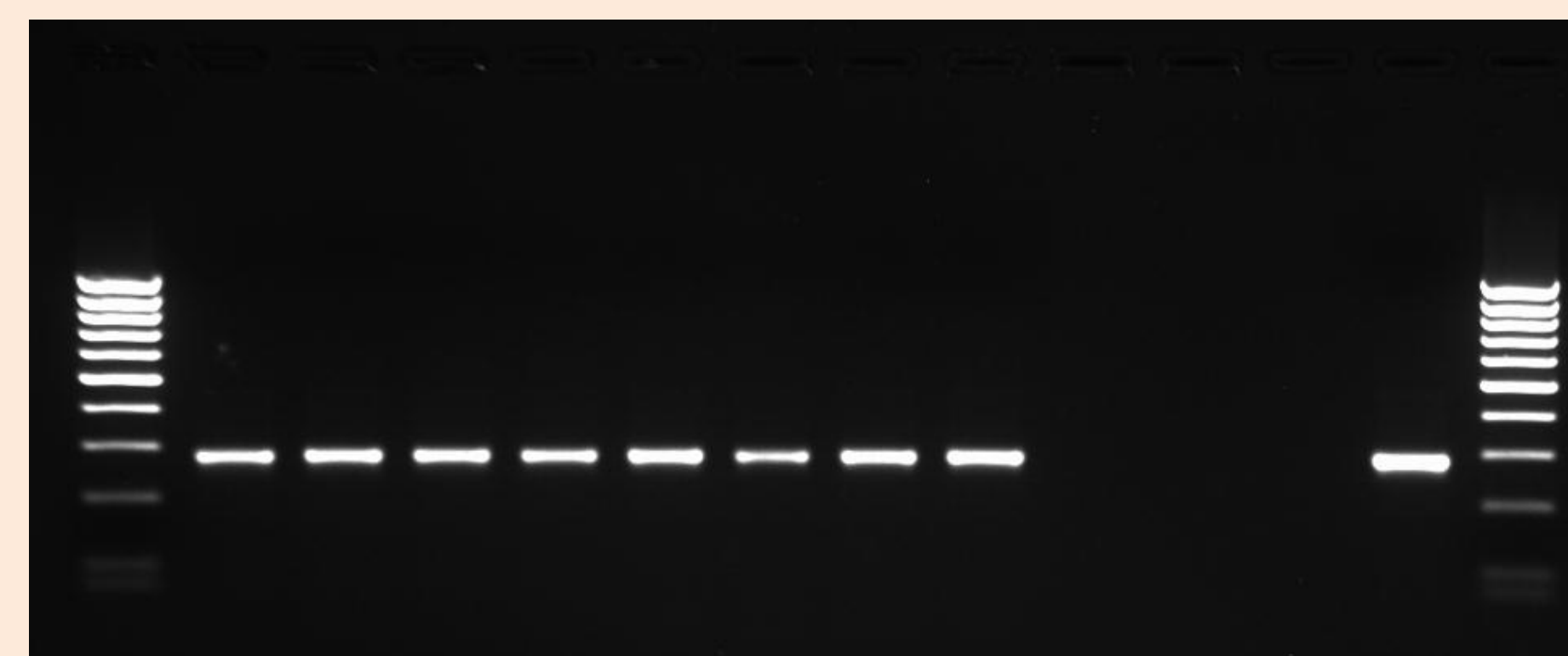


Obr. 1 (vlevo). Červeno-fialové listy jako symptom maloplodosti na dřevinném indikátoru *Prunus avium* cv. Canindex – 1. rok pozorování (foto: Ing. Hana Ludvíková).

Obr. 2 (vpravo). *Prunus avium* cv. Canindex – 2. rok pozorování (foto: Ing. Hana Ludvíková).

B) Výsledky molekulárního testování

- v letech 2009-2011 bylo nalezeno 5 symptomatických stromů třešní a 6 stromů višní
- z výsadby podezřelých na přítomnost maloplodosti bylo odebráno 195 vzorků třešní a višní
- metoda RT-PCR potvrdila pozitivní reakci u 4 stromů třešní a 2 stromů sladkovišní
- PCR produkty získané pomocí OneStep RT-PCR jsou vyhodnoceny na agarózovém gelu pomocí elektroforézy.
- velikost PCR produktů je stanovena na základě porovnání s velikostním standardem FastRunner DNA Ladder 50bp-2000bp (obr. 3)



Obr. 3. Elektroforetická separace PCR produktů, pár primerů LCV3EC/LCV 16659 (VITUSHKINA et al. 1997), amplifikace PCR produktu, 276 bp (foto: Ing. Miroslav Zouhar, Ph.D.).

Pořadí vzorků: M (velikostní standard); pozitivní vzorky (světlé pruhy na snímku) - č. 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28; negativní vzorky (nepřítomnost pruhů na snímku) - č. 29, 41, W (negativní kontrola, nepřítomnost pruhu na snímku); + pozitivní kontrola (světlý pruh na snímku), M (velikostní standard).

M: velikostní standard FastRunner DNA Ladder 50bp – 2000bp (shora 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp); 20 – izolát LChD (Německo), 22 – třešně 20/16, 23 – třešně 18/81, 24 – třešně 18/48, 25 – třešně 20/78, 26 – sladkovišň Hortenzie II, 27 – sladkovišň Hortenzie II, 28 – izolát LChD (Německo); 29* – izolát LChD na indikátoru Canindex (Německo), 41 – slivoň (technický izolát, K-), W negativní kontrola (voda), + pozitivní kontrola (PCR produkt)

* izolát LChD byl inokulován na dřevinný indikátor *Prunus avium* cv. Canindex, který po inokulaci projevoval symptomy onemocnění LChD.

Závěr

- v průběhu této studie byla optimalizována metoda diagnostiky LChD pomocí RT-PCR (primery LCV3EC/LCV16659, Vitushkina et al. 1997)
- onemocnění LChD bylo diagnostikováno u 4 stromů třešní a 2 stromů višní pomocí RT-PCR, biologické testy potvrdily LChD u 2 stromů višní
- v současnosti je optimalizována metodika detekce viru LChV-1 pomocí páru primerů LCV1U1 16390/LCV1L1 16809 a detekce viru LChV-2 pomocí páru primerů LCV2UP2/LCV2LO2 (Rott, Jelkmann 2001)