

NOVÉ METODY DETEKCE VIRŮ INFIKUJÍCÍCH ROSTLINY RODU *RUBUS* – OVĚŘENÍ V DIAGNOSTICKÉ PRAXI

NEW METHODS FOR THE DETECTION OF VIRUSES INFECTING *RUBUS* PLANTS – VERIFICATION IN DIAGNOSTIC PRACTICE

Lucie Valentová, Martina Rejlová, Radek Čmejla

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s. r. o.,
Holovousy 129, 508 01 Holovousy

e-mail: luce.valentova@vsuo.cz, ORCID: 0000-0002-7171-0080

ABSTRAKT

Viry infikující rostliny rodu *Rubus* se řadí mezi patogeny, které mohou pěstitelům způsobovat významné hospodářské ztráty. Protože není k dispozici účinná léčba, je nutné vysazovat zdravý rozmnožovací materiál, a tím tak preventivně zabránit jejich šíření. Pro testování rostlinného materiálu rodu *Rubus* byly v multiplexním uspořádání vyvinuty detekční systémy na principu real-time PCR pro diagnostiku známých virů Black raspberry necrosis virus (BRNV), Raspberry ringspot virus (RpRSV), Raspberry bushy dwarf virus (RBDV), Strawberry latent ringspot virus (SLRSV), Rubus yellow net virus (RYNV) a nově objevených virů Raspberry rubodvirus 1 (RaRV1) a Raspberry enamovirus 1 (RaEV1). Cílem práce bylo ověřit funkčnost těchto systémů na vzorcích pocházejících z živých rostlin a z výsledků testování vyhodnotit zastoupení jednotlivých virů v pěti kategoriích, které odpovídaly různému původu vzorků získaných na území České republiky. Z výsledků testování vyplývá, že z celkového počtu 297 testovaných vzorků byla v 72 % rostlin prokázána infekce buď jediným virem nebo koinfekce více virů. Nejčastěji vyskytujícím se virem byl RYNV, který byl nalezen v 51 % testovaných rostlin.

Klíčová slova: rostlinné viry, multiplex real-time PCR, přenos virů, maliník, ostružiník

ABSTRACT

Viruses infecting plants of the genus *Rubus* are among the pathogens that can cause significant economic losses to growers. As there is no effective treatment, it is necessary to plant healthy propagation material to prevent their spreading. To test plant material of the genus *Rubus*, real-time PCR-based multiplex detection systems have been developed for the diagnostics of known viruses: Black raspberry necrosis virus (BRNV), Raspberry ringspot virus (RpRSV), Raspberry bushy dwarf virus (RBDV), Strawberry latent ringspot virus (SLRSV), Rubus yellow net virus (RYNV); and the newly discovered Raspberry rubodvirus 1 (RaRV1) and Raspberry enamovirus 1 (RaEV1). The aim of the work was to verify the functionality of these systems on samples from living plants and to evaluate the presence of each virus in five categories corresponding to different origins of samples obtained in the Czech Republic. The results of the testing show that out of a total of 297 samples tested, 72 % of the plants were

1

found to be infected with either a single virus or co-infected with multiple viruses. The most frequently occurring virus was RYNV, which was found in 51 % of the plants tested.

Keywords: plant viruses, multiplex real-time PCR, virus transmission, raspberry, blackberry

ÚVOD

Ostružiník (*Rubus* L.) je poměrně rozsáhlý a systematicky velice složitý rod rostlin z čeledi růžovitých (*Rosaceae* L.) (Egger, 2022). Plody těchto rostlin jsou známé jako ostružiny a maliny. Rostliny se v rámci rodu dělí do 15 podrodů. Ostružiník maliník, známý pod názvem maliník (*Rubus idaeus* L.) a u nás v obchodech dostupný ostružiník japonský (*Rubus phoenicolasius*) jsou zástupci podrodu *Rubus* subgen. *Ideobatus*. Do podrodu *Rubus* subgen. *Rubus* je zařazen ostružiník (*Rubus fruticosus*) a do podrodu *Rubus* subgen. *Chamaebatus* korejský maliník (*Rubus pectinarioides* Hara) (Martin *et al.*, 2013). V obchodech se pak dále můžeme setkat i s různými kříženci, kteří se prodávají pod názvem malinoostružiník nebo ostružinomaliník. Všichni výše uvedení zástupci rodu *Rubus* mohou být hostiteli mnoha monofágních i polyfágních virů. Martin *et al.* (2013) uvádí, že maliníky a další druhy rodu *Rubus* mohou být infikovány více než 30 viry a virům podobnými organismy. Protože jsou viry přenosné i rozmnožovacím materiálem a není k dispozici účinná léčba, je potřeba virózy rostlin sledovat, a v případě množitelského materiálu i povinně testovat. Včasným odhalením viróz lze zabránit rozšíření infekce do dalších částí porostu.

Napadení viry se na rostlinách obecně projevuje různě zbarvenými mozaikami na listech, zesvětlením v okolí žilek listů, přítomností žlutého zbarvení okrajů listů či různě velkými světlými skvrnami na listech. Do souboru dalších příznaků můžeme zahrnout i zakrslost rostlin, která se může na rostlinách vyskytovat současně se zmenšením listů nebo jejich deformací, kdy jsou listy zkadeřené nebo ztrácejí svůj tvar, a dále i příznaky na plodech ve formě rozpadávajících se plodů. Viry často v rostlinách vyvolávají latentní infekci – virus je v rostlině přítomen, avšak navenek rostlina nevykazuje žádné symptomy. Tato infekce vede k tomu, že se viry mohou dál šířit porosty pomocí pylu, semen nebo jejich vektorů (např. mšice, háďátka). Při absenci symptomů tak nejsou podniknuty žádné kroky, např. odstranění infikovaných rostlin nebo zahájení ochrany proti přenašečům, které by mohly možnému šíření virů zabránit.

Předmětem naší studie bylo v praxi ověřit na vzorcích rostlin rodu *Rubus* funkčnost nově navržených diagnostických souprav RubusVir I qPCR-RG a RubusVir II qPCR-RG s využitím metody real-time PCR v multiplexním uspořádání. Detekční kit RubusVir I qPCR-RG je určen pro simultánní detekci Black raspberry necrosis virus (BRNV), Raspberry ringspot virus (RpRSV), Raspberry bushy dwarf virus (RBDV), Strawberry latent ringspot virus (SLRSV). Viry jsou detekovány v jedné reakci současně s interní pozitivní kontrolou (IPC; transkript mitochondriálního genu *Nad5*), která zde slouží jako indikátor kontroly kvality izolace RNA a přípravy cDNA (Valentová *et al.*, 2022). V případě kitu RubusVir II qPCR-RG se jedná o dva detekční systémy. První systém je navržen v triplexu a detekuje dva nově objevené viry Raspberry rubodvirus 1 (RaRV1) a Raspberry enamovirus 1 (RaEV1) s IPC v jedné reakci. Druhý detekční systém je navržen v duplexu pro testování Rubus yellow net virus (RYNV) a IPC v jedné PCR. Protože se RYNV vyskytuje ve dvou formách, episomální a endogenní (podrobněji popsáno níže), byly pro testování RYNV navrženy sondy a primery tak, aby nebyla detekována endogenní varianta endoRYNV-BS, kterou jsme v našich izolátech

detekovali nejčastěji (Valentová *et al.*, 2024). Obě diagnostické soupravy byly validovány dle doporučení EPPO PM 7/98 (5) 'Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity'. V rámci validace byla pro všechny viry stanovena analytická senzitivita s následujícími hodnotami, pro viry RBDV, RpRSV, SLRSV, RaEV1, RaRV1 500 kopií na reakci, pro BRNV a RYNV 1000 kopií na reakci (Valentová *et al.*, 2022; Valentová *et al.*, 2024).

Dalším cílem naší práce bylo zhodnotit výskyt výše uvedených virů na území České republiky.

Virus černé nekrózy maliníku (BRNV) patří do čeledi *Secoviridae* a je zařazen do rodu *Sadwavirus*, podrodu *Stramovirus*, jeho genom tvoří jednořetězcová RNA (ssRNA) v pozitivní orientaci (+) o délce 7572 a 6350 nukleotidů (McGavin *et al.*, 2010; Sanfaçon *et al.*, 2020). Na rostlinách se virus vyskytuje většinou v komplexu s dalšími viry maliníku: Rubus yellow net virus (RYNV), Raspberry leaf mottle virus (RLMV) a Raspberry leaf spot virus (RLSV) (Converse, 1987; McMenemy *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2013). Tyto viry mohou společně vyvolávat onemocnění mozaika maliníku (Raspberry Mosaic Disease; RMD). Podle studie McMenemy *et al.* (2009) je BRNV často prvním virem infikujícím rostlinu a až poté, co dojde k jejímu oslabení, napadají rostlinu další viry, např. RLSV. Většinou BRNV vyvolává latentní infekci, ale byly i popsány symptomy, které se projevily na rostlině jako malé zesvětlené skvrny na listech (Jones and Wood, 1979). Virus přenáší semiperzistentně mšice *Amphorophora agathonica* a *A. rubi* (Jones and Wood, 1979).

Virus keříčkové zakrslosti maliníku (RBDV) patří do čeledi *Mayoviridae*, rodu *Idaeovirus* (Higuira *et al.*, 2023). Genom RBDV se skládá ze dvou jednořetězcových molekul RNA o velikosti 5,5 kb (RNA1) a 2,2 kb (RNA2) a subgenomické molekuly RNA o velikosti 946 nukleotidů (Mayo, 1991; Natsuaki, 1991; Ziegler *et al.*, 1992). Barbara *et al.* (2001) popisuje typický příznak RBDV na malinících – „drolivé plody“, který vede ke ztrátám na výnosu, neboť ovoce nelze sklízet. Martin *et al.* (2013) uvádí, že virus vyvolává latentní infekci, symptomy se objevují později, až po napadení rostliny dalšími viry. Možnými symptomy po infekci rostliny komplexem virů mohou být: mozaiky a chlorózy listů, svinování listů, opad listů, množování postranních výhonů, zakrslý růst, opadávání a rozpadávání plodů. Přenos RBDV byl prokázán semenem a pylem (Martin, 2001).

Virus kroužkovitosti maliníku (RpRSV) je zástupcem čeledi *Secoviridae*, rodu *Nepovirus*. Jeho genom se skládá ze dvou jednovláknových RNA v pozitivní orientaci, o velikosti 7935 a 3914 nukleotidů pro RNA1 a RNA2 (Tang *et al.*, 2020). Jedná se o polyfágní virus, který napadá širokou škálu hostitelů jako je např. maliník, jahodník, rybíz, třešeň nebo réva vinná. Virová infekce se na rostlinách projevuje různými symptomy. Záleží na tom, jak je daná odrůda náchylná. U méně náchylných odrůd se příznaky projevují na listech zejména nově rašících výhonů, plodonosné výhony jsou většinou bez symptomů. Na listech se vytváří chlorotické skvrny, nebo síťovitá chloróza podél menších listových žilek, nebo nápadné žlutozelené kroužky. V případě napadení citlivých odrůd může během zimy dojít k jejich částečnému nebo úplnému úhynu, v jarních měsících vyrůstají zakrslé a křehké výhony se srolovanými listy, nebo mohou výhony od vrcholu odumírat a nekrotizovat (Murant, 1970). RpRSV se na krátkou vzdálenost šíří pomocí hádčátek *Longidorus macrosoma* a *Longidorus elongatus*. Přenos viru na delší vzdálenosti je možný semenem nebo pylem (Wetzel a Krczal, 2007).

Virus latentní kroužkovitosti jahodníku (SLRSV) je zástupcem čeledi *Secoviridae* a nedávno byl zařazen do rodu *Stralarivirus*. Jeho genom se skládá ze dvou pozitivně orientovaných molekul ssRNA o přibližné velikosti 7,5 kb pro RNA1 a 3,8 kb pro RNA2 (Dulleman *et al.*, 2020). Virus je polyfágní, napadá širokou škálu ekonomicky významných plodin, jako jsou např. jahodník, maliník, ostružiník, černý a červený rybíz, třešeň, broskvoň a slivoň. Martin *et al.* (2013) popisuje projevy na malinících a ostružinících jako žloutnutí a zakrslost rostlin (Martin, 2013). Virus je přenášen půdními háďátkami *Xiphinema diversicaudatum* (Murant, 1970; Brown, 1985).

Virus žluté síťovitosti maliníku (RYNV) patří do čeledi *Caulimoviridae*, rodu *Badnavirus* (Jones *et al.*, 2002). Dle Baltimorovy klasifikace je zařazen do VII. skupiny, jedná se o cirkulární dvouřetězcové DNA viry, které kódují reverzní transkriptázu, která je nezbytná pro jejich replikaci (Diaz-Lara *et al.*, 2015). Kalischuk *et al.* (2013) sekvenováním RYNV zjistil velikost jeho genomu, která je 7932 párů bází. Virus často vyvolává latentní infekci, v případě projevení se příznaků dochází na rostlinách k typické síťovité chloróze pletiv podél listových žilek. Napadá-li virus citlivé odrůdy, může docházet i k zakrnění nebo deformaci rostlin (Vakić *et al.*, 2022). Nebezpečným se stává v komplexu s dalšími viry BRNV, RLSV a RLMV, kdy může způsobit podle Vakić *et al.* (2022) patrně nejničivější virové onemocnění maliníku, mozaikové onemocnění Raspberry Mosaic Disease (RMD). V Evropě virus přenáší mšice *Amphorophora idaei* a v Severní Americe *A. agathonica* (Jones *et al.*, 2002; Vakić *et al.*, 2022). Virus se vyskytuje ve dvou formách – episomální, která tvoří viriony, nebo endogenní, která je schopna se integrovat do genomu hostitele. Endogenní forma viru je neaktivní, to znamená, že virus není pro hostitelskou rostlinu škodlivý, ale lze ho v rostlině pozitivně detekovat metodou PCR.

Teprve nedávno byl popsán Raspberry enamovirus 1 (RaEV1), který byl zařazen do čeledi *Solemoviridae*, rodu *Enamovirus* (Koloniuk *et al.*, 2023). Nesegmentovaný genom je cca 5,8 kbp dlouhý a je tvořen (+)ssRNA. Přítomnost viru byla prokázána v různých částech rostlin (např. v listech, stoncích, kořenech, květech, pupenech, zralých a nezralých plodech) a v hmyzích zástupcích (*Amphorophora rubi idaei*, *Aphis idaei*, *Macropsis fuscula*, *Myzus persicae* a *Psallus wagneri*), kterými prozatím nebyl potvrzen přenos viru (Koloniuk *et al.*, 2023).

Raspberry rubodvirus 1 (RaRV1) je nově popsán virus, který byl na základě struktury genomu (segmentovaná (-)ssRNA) zařazen do čeledi *Phenuiviridae*, rodu *Rubodvirus*.

MATERIÁL A METODY

V letech 2021 a 2023 bylo na výše uvedené viry testováno celkem 297 rostlin rodu *Rubus*, který byl zastoupen 266 vzorky maliníku, 28 vzorky ostružiníku, dále byly testovány čtyři malinoostružiníky, tři japonské ostružiníky a jeden korejský maliník. Vzorky byly dále rozděleny do pěti kategorií podle původu, a to: 1) rostliny, které byly nakoupeny v zahradnictvích a obchodních řetězcích ve východních a severovýchodních Čechách (53 vzorků), 2) rostliny pocházející ze soukromých zahrádek (62 vzorků), 3) vzorky odebrané v produkčních výsadbách (14 vzorků), 4) sbírkové položky (140 vzorků) a 5) rostliny zařazené do kategorie zdroj rozmnožovacího materiálu (28 vzorků).

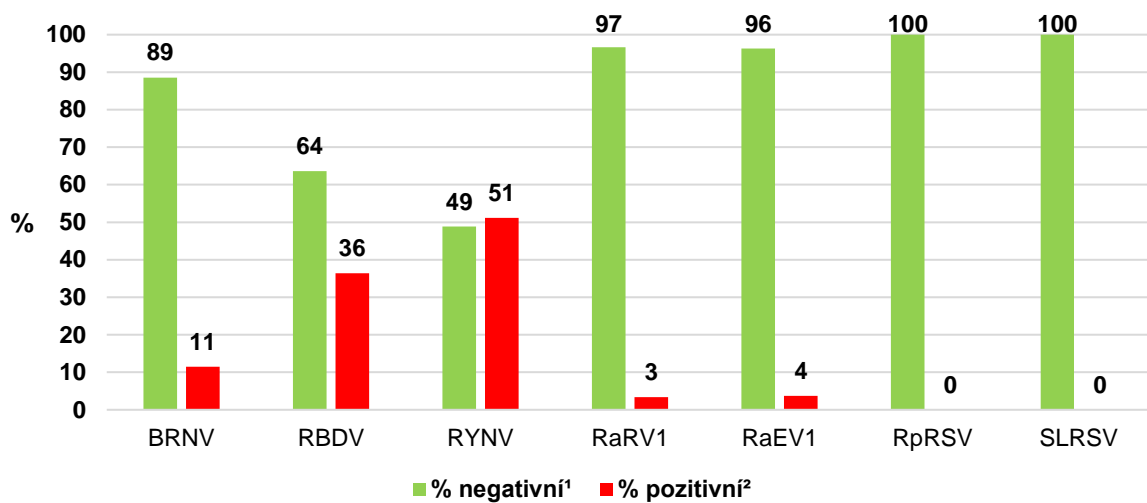
Ze všech vzorků zařazených do testování byly odebrány listy. Pro izolaci celkové RNA z rostlinného materiálu byl použit izolační kit Ribospin™ Plant dle návodu výrobce (firma

GeneAll). Izolaci předcházela homogenizace, která byla provedena v třetí misce v tekutém dusíku s navázkou 50 mg vzorku. Pro následný přepis izolované RNA do komplementární DNA (cDNA) byla použita reverzní transkriptáza M-MLV Reverse Transcriptase od firmy ThermoFisher Scientific. Takto připravená cDNA byla použita jako templát pro real-time PCR, která probíhala za přítomnosti specifických primerů a sond. Vlastní detekce virů BRNV, RpRSV, RBDV, SLRSV, RaEV1, RaRV1 a RYNV byla provedena přesně podle certifikovaných metodik (Valentová *et al.*, 2022; Valentová *et al.*, 2024). Jako interní pozitivní kontrola byla použita detekce transkriptu mitochondriálního genu *Nad5*. Veškerá testování probíhala s využitím přístroje real-time PCR cykler Rotor-Gene Q 5 plex HRM Platform (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: počáteční denaturace 94 °C 5 min, dále následovalo 40 cyklů – denaturace 94 °C 20 s; hybridizace primerů 58 °C 20 s; elongace 72 °C 20 s. Detekce hladiny fluorescence v jednotlivých barevných kanálech byla odečítána v následujících kanálech: zelený kanál pro detekci BRNV a RaEV1; žlutý kanál pro detekci RpRSV, RYNV a RaRV1; oranžový kanál pro detekci RBDV; červený kanál pro detekci SLRSV. Interní pozitivní kontrola byla detekována v zeleném nebo karmínovém kanálu podle typu multiplexní reakce.

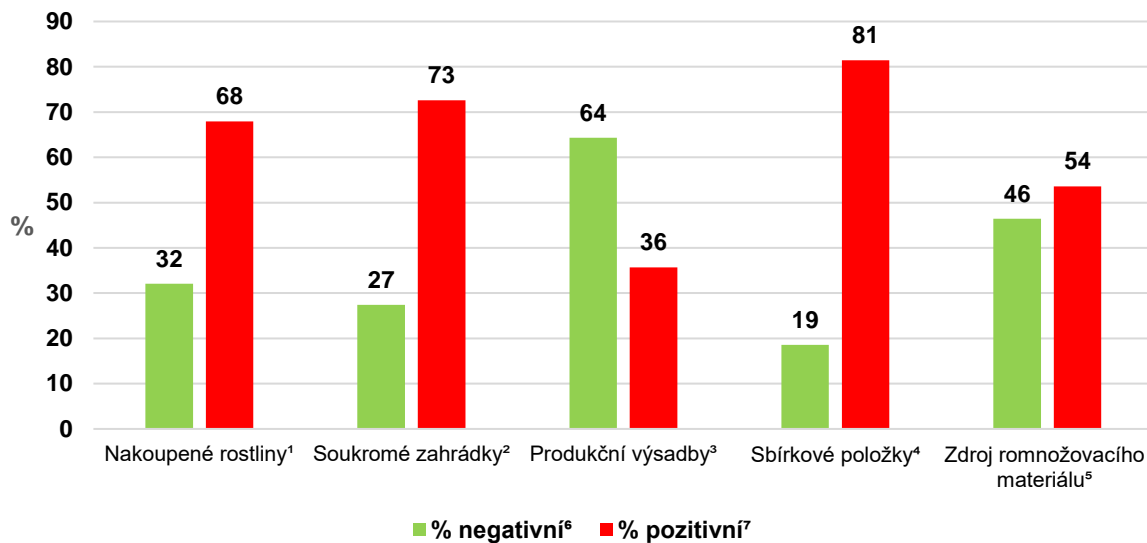
VÝSLEDKY A DISKUZE

Detekčními soupravami bylo testováno celkem 297 rostlin, z nichž bylo 82 rostlin negativních na sledované viry. Ve 215 rostlinách (72 %) byla nalezena infekce buď jediným virem nebo koinfekce více viry. V grafu 1 je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých virů v testovaných vzorcích. Celkově byly rostliny infikovány nejvíce RYNV (51 %), dále pak RBDV (36 %) a BRNV (11 %). Nově objevené viry byly detekovány ve 4 % (RaEV1) a 3 % rostlin (RaRV1). Co se týká virů SLRSV a RpRSV taxonomicky zařazených do čeledi *Secoviridae*, které jsou přenášeny hádčátky, nebyly ve vzorcích získaných na území ČR detekovány. To potvrzují i údaje z literatury, ze kterých vyplývá, že od 90. let 20. století nebyly na území České republiky zaznamenány žádné nálezy. V 90. letech minulého století přítomnost virů SLRSV a RpRSV v naší republice metodou ELISA prokázal Špak *et al.* (1997).

Nejčastěji infikovanou kategorií byly rostliny, které byly původem ze sbírky odrůd (81 %; Graf 2). V soukromých zahrádkách bylo viry nakaženo 73 % testovaných maliníků (*Rubus idaeus* L.). Ostatní podrody – ostružiníky, ostružinomaliníky a japonský ostružiník byly na testované viry negativní. Alarmující je výskyt virů v 36 nakoupených rostlinách (68 %), které jsou určeny primárně k výsadbě na soukromé zahrádky. V případě vysazování již infikovaných rostlin se tyto rostliny stávají nebezpečnými pro své okolí, neboť zde mohou sloužit jako rezervoár virů. Viry pak mohou být pomocí vektorů nebo pylu přenášeny do okolních výsadeb či soukromých zahrádek. Z grafu 2 je dále patrné, že v kategorii zdroj rozmnožovacího materiálu bylo 54 % infikovaných rostlin, což je v rostlinách, které by měly být viruprosté, poměrně vysoké procento. Nejzdravější sledovanou skupinou se jeví produkční výsadby. V tomto případě se dá předpokládat, že procento výskytu virů je nižší (36 %), protože produkční porosty byly zakládány ze zdravého viruprostého rozmnožovacího materiálu.

Graf 1. Zastoupení jednotlivých virů v 297 testovaných vzorcích (%)**Graph 1.** Presence of individual viruses in 297 tested samples (%)

1) Tested negative, 2) Tested positive

Graf 2. Míra nákazy viry rostlin v % dle jednotlivých kategorií (n = 297)**Graph 2.** Plant virus infection rate in % by category (n = 297)

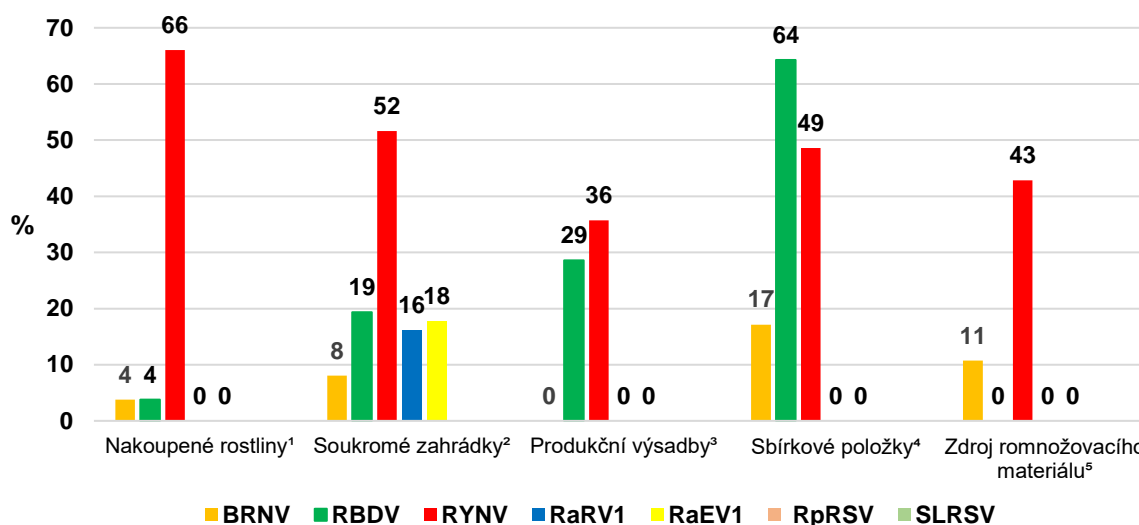
1) Plants purchased, 2) Private gardens, 3) Production plantations, 4) Collection items, 5) Source of propagation material, 6) Tested negative, 7) Tested positive

Zastoupení konkrétních virů v jednotlivých kategoriích stanovených dle původu vzorků je uvedeno v grafu 3. Nejvyšší procento zastoupení RYNV není jen ve všech testovaných vzorcích celkem, ale téměř i ve všech jednotlivých kategoriích kromě sbírkových položek, ve kterých převládá přítomnost RBDV. Dalo by se předpokládat, že tento vysoký nález RYNV potvrzuje skutečnost, že v minulosti bylo obtížné virus detekovat, neboť až v roce 2002 byla zavedena detekční metoda na principu PCR, přičemž jedním z důvodů mohla být i značná genetická diverzita izolátů RYNV (McGavin *et al.*, 2023). Virus se tak mohl pro nepřítomnost vhodné detekční metody dál šířit rostlinným materiálem. Co se týká výsledků výskytu RYNV

v jednotlivých kategoriích, byla v soukromých zahrádkách testováním zjištěna nákaza v 52 %. To je pravděpodobně dáno tím, že nově vysazované rostliny mohou být již tímto virem nakažené. Tvrzení lze doložit z našich dalších výsledků, kdy v kategorii nakoupená sadba bylo 66 % RYNV pozitivních rostlin určených právě pro hobby pěstitele. Nakažené rostliny se mohly stát zdrojem viru pro jeho další šíření pomocí hmyzích vektorů. K šíření virů navíc napomáhá i skutečnost, že hobby pěstitelé neprovádějí ochranu proti mšicím tak intenzivně, jak se tomu děje v produkčních porostech.

Graf 3. Procento pozitivních vzorků na přítomnost virů dle jednotlivých kategorií

Graph 3. Percentage of positive samples for the presence of viruses by individual category



1) Plants purchased, 2) Private gardens, 3) Production plantations, 4) Collection items, 5) Source of propagation material

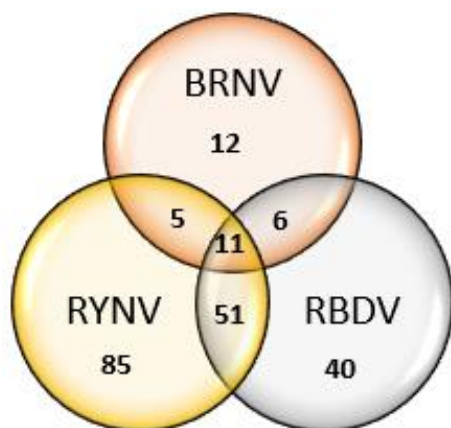
Druhým nejvíce zastoupeným virem téměř ve všech kategoriích je RBDV, který způsobuje drobnost plodů, což pro pěstitele představuje značné hospodářské ztráty, a to díky nízkým cenám za plody v nižší kvalitě, sníženým výnosům a zvýšeným nákladům na sklizeň (Quito-Avila *et al.*, 2014). RBDV nebyl nalezen pouze v kategorii zdroj rozmnožovacího materiálu. To může být dáno tím, že pro detekci RBDV je již dlouhodobě k dispozici imunochemická metoda ELISA. Rostliny jsou pak dle vyhlášky 96/2018 Sb. pravidelně testovány a případné RBDV pozitivní rostliny okamžitě odstraněny. Protože je rozmnožovací materiál uchováván v technické izolaci, kde je povinnost odstraňovat květy, je tak zabráněno šíření viru pomocí pylu. Nově objevené viry RaEV1 a RaRV1 byly detekovány pouze v kategorii soukromé zahrádky. Ve všech produkčních výsadbách byl zachycen RYNV a dále RBDV, který se mohl do výsadby dostat pomocí pylu, což je jeden z jeho možných způsobů přenosu (Murant *et al.*, 1974).

Výsledky byly hodnoceny i podle jednotlivých zástupců podrodů (maliník, ostružiník, korejský maliník, japonský ostružiník, malinoostružiník). Všechny rostliny kromě maliníku a ostružiníku byly na testované viry negativní. Ve 28 ostružinících byl nalezen pouze RBDV, který infikoval 6 rostlin (21 %). Všechny infikované ostružiníky RBDV pocházely z kategorie sbírkové položky. Nález RBDV v ostružinících potvrzuje ve své studii Martin *et al.* (2001), který uvádí, že RBDV infikuje jak maliníky, tak i různé hybridy a ostružiníky.

V jednotlivých kategoriích různého původu vzorků byly hodnoceny koinfekce přítomných virů (Graf 4, Tabulka 1). Byly porovnány pouze viry, které by se dle legislativy (Vyhláška 96/2018 Sb.) neměly vyskytovat v rozmnožovacím materiálu – BRNV, RBDV, RYNV, SLRSV a RpRSV. Nově objevené viry RaEV1 a RaRV1, které dosud nejsou předmětem kontroly při certifikaci rozmnožovacího materiálu, hodnoceny nebyly.

Graf 4. Koinfekce virů BRNV, RBDV a RYNV (n)

Graph 4. Co-infection of BRNV, RBDV and RYNV (n)



Tabulka 1. Přítomnost a výskyt zjištěných virů v rostlinách rodu *Rubus* (n=210)

Table 1. The presence and prevalence of detected viruses in plants of the genus *Rubus* (n=210)

Detekovaný virus ¹	Celkem (n) ²	Pozitivní vzorky celkem ³	Nakoupené rostliny (n) ⁴	Soukromé zahrádky (n) ⁵	Produkční výsadby (n) ⁶	Sbírkové položky (n) ⁷	Rozmnož. materiál (n) ⁸
BRNV	12	5,7 %	1	2	0	6	3
RYNV	85	40,5 %	32	24	1	16	12
RBDV	40	19,0 %	0	6	0	34	0
BRNV+RYNV	5	2,4 %	1	2	0	2	0
BRNV+RBDV	6	2,9 %	0	0	0	6	0
RYNV+RBDV	51	24,3 %	2	5	4	40	0
BRNV+RYNV+RBDV	11	5,2 %	0	1	0	10	0

1) Virus detected, 2) Total (n), 3) Total positive samples (%), 4) Plants purchased (n), 5) Private garden (n), 6) Production plantation (n), 7) Collection items (n), 8) Source of propagation material (n)

Z celkového počtu 297 testovaných vzorků bylo 210 vzorků pozitivních na přítomnost alespoň jednoho viru. U 73 vzorků byla přítomna směsná infekce několika viry současně. Maximálně byly ve vzorku přítomny 3 viry současně, a to BRNV, RYNV a RBDV, ostatní testované viry SLRSV a RpRSV nebyly v rostlinách detekovány. Z vyhodnocení všech výsledků vyplývá, že v monoinfekci byly zastoupeny viry v následujícím pořadí RYNV 40 %, RBDV 19 % a BRNV 6 %. Míra koinfekce RYNV a RBDV představovala 24 % z celkového

počtu infikovaných vzorků, což odpovídá 51 případů. Přítomnost těchto virů ve vzorcích je pravděpodobně v případě RYNV dána nedostatečným testováním rostlinného materiálu z důvodu nedostupnosti detekčního systému a výskyt RBDV rychlým šířením pomocí pylu v porostech. Zajímavým výsledkem je prevalence RYNV v monoinfekci: 32 rostlin v kategorii nakoupená sadba a 24 rostlin v kategorii soukromé zahrádka.

ZÁVĚR

Během studie byly v akreditované laboratoři pro rutinní diagnostiku rostlinných virů ověřeny dvě nové diagnostické soupravy RubusVir I qPCR-RG a RubusVir II qPCR-RG pro detekci virů maliníku BRNV, RBDV, RYNV, SLRSV, RpRSV včetně nově objevených RaRV1 a RaEV1. Pomocí detekčních kitů byla prokázána přítomnost virů v monoinfekcích i koinfekcích v jednotlivých kategoriích dle původu vzorků. Oba detekční systémy jsou spolehlivé a díky jejich použití v rutinní diagnostice rostlinných virů mohou být včas odhaleny infikované rostliny, čímž dojde k zabránění dalšímu šíření virů. V případě nově objevených virů RaRV1 a RaEV1 přispěje detekční systém k lepšímu poznání jejich biologických vlastností a případně ho lze využít při hodnocení jejich hospodářské škodlivosti, která nebyla dosud testována. Zavedení diagnostiky má velký význam pro kontrolu rozmnožovacího materiálu, neboť dojde ke zlepšení kontroly zejména virů RYNV a BRNV, pro které nebyl dosud k dispozici validovaný detekční systém pro jejich rutinní testování. Co se týká průzkumu zastoupení jednotlivých virů na území ČR, nejčastěji se vyskytoval RYNV a RBDV, a to i v kategorii zdroj rozmnožovacího materiálu. Naopak v žádném odebraném vzorku nebyly detekovány viry SLRSV ani RpRSV, které jsou přenášeny hádátky.

PODĚKOVÁNÍ

Publikace je výstupem řešení projektu „Zdravé ovoce v měnících se klimatických podmínkách: vývoj nových biotechnologických postupů diagnostiky virů, studium vektorů, ozdravování a bezpečného uchovávání jahodníku a maliníku“ (TO01000295) financovaného z fondů EHP a Technologické Agentury České republiky v rámci programu KAPPA. Poděkování patří Lence Tůmové a Lence Křivohlávkové za precizní technickou činnost v laboratoři.

LITERATURA

- BARBARA, D. J.; MORTON, A.; RAMCHARAN, S.; COLE, I. W.; PHILLIPS, A. a KNIGHT, V. H. Occurrence and distribution of Raspberry bushy dwarf virus in commercial *Rubus* plantations in England and Wales. Online. *Plant Pathology*. 2001, vol. 50, no. 6, p. 747–754. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00642.x>. [cit. 2024-04-15].
- BROWN, D. J. F. The transmission of two strains of strawberry latent ringspot virus by populations of *Xiphinema diversicaudatum* (Nematoda: Dorylaimoidea). *Nematologia Mediterranea*. 1985, vol. 13, no. 2, p. 217–223.
- CONVERSE, R. H. *Virus Diseases of Small Fruits: United States Department of Agriculture Handbook No. 631*. U.S. Government Printing Office, Washington, District of Columbia, 1987.
- DIAZ-LARA, A.; MOSIER, N. J.; KELLER, K. E. a MARTIN, R. R. A variant of Rubus yellow net virus with altered genomic organization. Online. *Virus Genes*. 2015, vol. 50, p. 104–110. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1149-6>. [cit. 2024-03-11].

- DULLEMANS, A. M.; BOTERMANS, M.; KOCK, M. J. D.; KROM, C. E.; LEE, T. A.; ROENHORST, J. W. a VLUGT, R. A. A. Creation of a new genus in the family *Secoviridae* substantiated by sequence variation of newly identified strawberry latent ringspot virus isolates. *Archives of Virology*. 2020, vol. 165, no. 1, p. 21–31. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04437-0>. [cit. 2024-01-18].
- EGGER, J. *Review of viruses in raspberry production*. Master's Thesis. 2022.
- HIGUITA, M.; PÉREZ, A.; GALLO, Y. a GUTIÉRREZ, P. A. A global analysis of the *Rubus* virome using public transcriptome data. Online. *European Journal of Plant Pathology*. 2023. Under Revision. Dostupné z: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3474898/v1>. [cit. 2024-02-25].
- JONES, A. T. a WOOD, G. A. The virus status of raspberries (*Rubus idaeus* L.) in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. Online. 1979, vol. 22, no. 1, p. 173–182. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00288233.1979.10420857>. [cit. 2024-03-01].
- JONES, A. T.; MCGAVIN, W. J.; GEERING, A. D. W. a LOCKHART, B. E. L. Identification of *Rubus* yellow net virus as a distinct badnavirus and its detection by PCR in *Rubus* species and in aphids. Online. *Annals of Applied Biology*. 2002, vol. 141, no. 1, p. 1–10. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00189.x>. [cit. 2024-03-01].
- KALISCHUK, M. L.; FUSARO, A. F.; WATERHOUSE, P. M.; PAPPU, H. R. a KAWCHUK, L. M. Complete genomic sequence of a *Rubus* yellow net virus isolate and detection of genome-wide pararetrovirus-derived small RNAs. Online. *Virus Research*. 2013, vol. 178, no. 2, p. 306–313. DOI: Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.026>. [cit. 2024-02-02].
- KOLONIUK, I.; FRÁNOVÁ, J.; PŘIBYLOVÁ, J.; SARKISOVA, T.; ŠPAK, J.; TAN, J. L.; ZEMEK, R.; ČMEJLA, R.; REJLOVÁ, M. a VALENTOVÁ, L. Molecular Characterization of a Novel Enamovirus Infecting Raspberry. Online. *Viruses*. 2023, no. 15, art. 2281. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/v15122281>. [cit. 2024-02-04].
- MARTIN, R. R. Virus diseases of *Rubus* and strategies for their control. In: *VIII International Rubus and Ribes Symposium*. 2001, no. 585, p. 265–270. Dostupné z: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.585.43>. [cit. 2024-02-11].
- MARTIN, R. R.; MACFARLANE, S.; SABANADZOVIC, S.; QUITO, D.; POUDEL, B. a TZANETAKIS, I. E. Viruses and virus diseases of *Rubus*. Online. *Plant Disease*. 2013, vol. 97, no. 2, p. 168–182. Dostupné z: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0362-FE>. [cit. 2024-03-24].
- MAYO, M. A.; JOLLY, C. A.; MURANT, A. F. a RASCHKE, J. H. Nucleotide sequence of raspberry bushy dwarf virus RNA-3. Online. *Journal of General Virology*. 1991, vol. 72, no. 2, p. 469–472. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-2-469>. [cit. 2024-04-07].
- MCGAVIN, W. J.; MCMENEMY, L. S. a MACFARLANE, S. A. The complete sequence of a UK strain of black raspberry necrosis virus. *Archives of Virology*. Online. 2010, vol. 155, no. 11, p. 1897–1899. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0807-9>. [cit. 2024-04-07].
- MCGAVIN, W.; JONES, S. a MACFARLANE, S. Distinguishing integrated sub-viral fragments from infectious *Rubus* yellow net virus in Scottish commercial red raspberry cultivars. Online. *BioRxiv*, 2023-03. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/2023.03.07.531471>. [cit. 2024-02-27].
- MCMENEMY, L. S.; MITCHELL, C. a JOHNSON, S. N. Biology of the European large raspberry aphid (*Amphorophora idaei*): its role in virus transmission and resistance breakdown in red raspberry. Online. *Agricultural and Forest Entomology*. 2009, vol. 11, no. 1, p. 61–71. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2008.00409.x>. [cit. 2024-01-08].
- MURANT, A. F. Soilborne viruses and diseases in *Rubus*. In: *Virus diseases of small fruits and grapevines, a handbook* (Ed. by Frazier, N.W.). University of California, Berkeley, California, USA. 1970, p. 132–142.
- MURANT, A. F.; CHAMBERS, J. a JONES, A. T. Spread of raspberry bushy dwarf virus by pollination, its association with crumbly fruit, and problems of control. Online. *Annals of Applied Biology*. 1974, vol. 77, no. 3, p. 271–281. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1974.tb01403.x>. [cit. 2024-02-28].

- NATSUAKI, T., MAYO, M. A.; JOLLY, C. A. a MURANT, A. F. Nucleotide sequence of raspberry bushy dwarf virus RNA-2: a bicistronic component of a bipartite genome. *Journal of General Virology*. 1991, vol. 72, no. 9, p. 2183–2189.
- QUITO-AVILA, D. F.; LIGHTLE, D. a MARTIN, R. R. Effect of Raspberry bushy dwarf virus, Raspberry leaf mottle virus, and Raspberry latent virus on plant growth and fruit crumbliness in 'Meeker' red raspberry. Online. *Plant disease*. 2014, vol. 98, no. 2, p. 176–183. Dostupné z: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0562-RE>. [cit. 2024-03-01].
- SANFAÇON, H.; DASGUPTA, I.; FUCHS, M.; KARASEV, A. V.; PETRZIK, K.; THOMPSON, J. R. a YOSHIKAWA, N. Proposed revision of the family *Secoviridae* taxonomy to create three subgenera, "Satsumavirus", "Stramovirus" and "Cholivirus", in the genus *Sadwavirus*. Online. *Archives of Virology*. 2020, vol. 165, no. 2, p. 527–533. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04468-7>. [cit. 2024-02-12].
- ŠPAK, J.; KUBELKOVÁ, D. a HONETŠLEGROVÁ-FRANOVÁ, J. Occurrence of nepoviruses in *Rubus* species in the Czech Republic. *Acta Virologica*. 1997, vol. 41, no. 3, p. 177–179.
- TANG, J.; NG, F.; KANCHIRAOPALLY, D. a WARD, L. Development of TaqMan real-time RT-PCR for sensitive detection of diverse Raspberry ringspot virus isolates. Online. *Journal of Virological Methods*. 2020, vol. 278, 113821. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113821>. [cit. 2024-01-15].
- VAKIĆ, M.; STANTON, D.; DELIĆ, D. a TZANETAKIS, I. E. Characterization of the first *Rubus* yellow net virus genome from blackberry. Online. *Virus Genes*. 2022, vol. 58, no. 6, p. 594–597. Dostupné z: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1465847/v1>. [cit. 2024-02-15].
- VALENTOVÁ, L.; REJLOVÁ, M. a ČMEJLA, R. *Real-time PCR detekce virů black raspberry necrosis virus (BRNV), raspberry ringspot virus (RpRSV), raspberry bushy dwarf virus (RBDV) a strawberry latent ringspot virus (SLRSV) v rostlinném materiálu*. Certifikovaná metodika. Holovously: VŠÚO, 2022. ISBN: 978-80-87030-87-5.
- VALENTOVÁ, L.; REJLOVÁ, M. a ČMEJLA, R. *Real-time PCR detekce virů Rubus yellow net virus (RYNV), raspberry rubodvirus 1 (RaRV1) a raspberry enamovirus 1 (RaEV1) v rostlinném materiálu*. Certifikovaná metodika. Holovously: VŠÚO, 2024. ISBN: 978-80-87030-98-1.
- Vyhláška č. 96/2018 Sb. *Vyhláška o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu ovocných rodů a druhů a jeho uvádění do oběhu*.
- WETZEL, T. a KRCZAL, G. Molecular biology of Raspberry ringspot nepovirus. *Plant Viruses*. 2007, vol. 1, no. 1, p. 45–51.
- ZIEGLER, A.; NATSUAKI, T.; MAYO, M. A.; JOLLY, C. A. a MURANT, A. F. The nucleotide sequence of RNA-1 of raspberry bushy dwarf virus. *Journal of General Virology*. 1992, vol. 73, no. 12, p. 3213–3218.