

TESTOVÁNÍ PŘÍTOMNOSTI PATOGENŮ V ROZMNOŽOVACÍM MATERIÁLU OVOCNÝCH DŘEVIN JAKO ZÁKLAD PRO JEHO CERTIFIKACI

TESTING OF PATHOGENS OCCURRENCE AS THE BASIS FOR CERTIFICATION OF FRUIT TREE PROPAGATION MATERIAL

Lucie Valentová, Martina Rejlová, Radek Čmejla

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

e-mail: Lucie.VALENTOVA@vsuo.cz, ORCID: [0000-0002-7171-0080](https://orcid.org/0000-0002-7171-0080)

ABSTRAKT

Práce hodnotí význam pravidelného testování virů a fytoplazem v rozmnožovacím materiálu ovocných dřevin v podmínkách prostorové a technické izolace ve VŠÚO Holovousy v letech 2022–2024 v rámci certifikačního schématu. Testování podle vyhlášky č. 96/2018 Sb. zahrnovalo jádroviny i peckoviny, přičemž většina výsledků byla negativních. Ojedinelé pozitivní nálezy vedly k okamžité likvidaci stromů, čímž se zabránilo šíření infekce. Největší podíl testů představovala detekce viru šarky švestky (PPV). Výsledky potvrzují, že pravidelná diagnostika a cílené odstranění infikovaných stromů jsou zásadní pro zachování kvality rozmnožovacího materiálu, prevenci hospodářských ztrát a posílení konkurenceschopnosti českého ovocnářství. Studie zároveň ukazuje, že důsledné dodržování certifikačního schématu v kombinaci s moderními diagnostickými metodami je nezbytné pro zajištění stabilní a bezpečné produkce rozmnožovacího materiálu ovocných dřevin.

Klíčová slova: rostlinné viry, diagnostika patogenů, certifikační schéma, rozmnožovací materiál

ABSTRACT

This study evaluates the importance of regular testing for viruses and phytoplasmas in fruit tree propagation material under conditions of spatial and technical isolation at the Research and Breeding Institute of Pomology Holovousy during the years 2022–2024 as part of the certification scheme. Testing according to Decree No. 96/2018 Coll. included pome fruits and stone fruits, with most results being negative. Occasional positive findings led to the immediate removal of infected trees, effectively preventing the spread of infection. The largest proportion of tests was for plum pox virus (PPV). The results confirm that regular diagnostics and targeted removal of infected trees are essential for maintaining the health integrity of propagation material, preventing economic losses, and strengthening the competitiveness of Czech fruit growers. The study also shows that strict adherence to the certification scheme in combination with modern diagnostic methods is essential for ensuring stable and safe production of fruit tree propagation material.

Keywords: plant viruses, pathogen diagnostics, certification scheme, propagation material

ÚVOD

Virové a fytoplazmové choroby představují pro ovocnářství závažné riziko, protože dlouhodobě způsobují ekonomické ztráty v důsledku snížené vitality stromů, poklesu výnosů a zhoršení kvality plodů (Hančinský *et al.* 2020, Mehetre *et al.* 2021). Možnosti jejich léčby jsou prakticky nulové, jelikož nejsou k dispozici účinné chemické ani biologické prostředky, které by umožnily již infikované stromy ozdravit. Z tohoto důvodu nabývá na významu certifikace rozmnožovacího materiálu, která zajišťuje kvalitu a konkurenceschopnost rostlinného materiálu na domácích i mezinárodních trzích (Silva *et al.* 2014).

Proces certifikace rozmnožovacího materiálu spočívá v ověřování jeho zdravotního stavu a kvality podle legislativně stanovených kritérií. Představuje tak klíčový nástroj pro omezení šíření virových a fytoplazmových chorob a současně chrání pěstitele i spotřebitele. Zásadní roli přitom hraje používání zdravého, testovaného výchozího materiálu, který minimalizuje riziko zavlečení infekcí do nově zakládaných sadů. Certifikace rozmnožovacího materiálu ovocných dřevin je v České republice legislativně ukotvena ve vyhlášce č. 96/2018 Sb., Vyhláška o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu ovocných rodů a druhů a jeho uvádění do oběhu (Zákony pro lidi 2025). Jde o legislativně definovaný proces, v němž je rozmnožovací materiál ovocných dřevin rozčleněn do certifikačních kategorií, které určují jeho původ, zdravotní stav a možnosti použití. Na nejvyšší úrovni stojí matečná rostlina předstupně (SE1), pocházející z kandidátní matečné rostliny předstupně, která byla komplexně otestována na příslušné škodlivé organismy stanovené v přílohách vyhlášky. Tyto rostliny se uchovávají v podmínkách technické izolace (TI), aby nemohlo dojít k jejich nakažení prostřednictvím vektorů, pravidelně se testují v intervalech stanovených vyhláškou a slouží k založení matečných rostlin i školkařských výpěstků nižších kategorií. Na ně navazují kategorie základní matečné rostliny (E), které vznikají přímým vegetativním množením z matečných rostlin předstupně. V této kategorii může být vytvořeno více generací, označovaných E I, E II atd. Generace E I pochází přímo z matečné rostliny předstupně, další generace pak vždy z předchozí úrovně. Počet povolených generací se řídí podmínkami stanovenými pro jednotlivé druhy v příloze vyhlášky. Základní matečné rostliny se pěstují v podmínkách prostorové izolace (PI) a slouží k produkci certifikovaného materiálu (C), který se využívá k výrobě školkařských výpěstků. Prostorová izolace představuje specifický režim pěstování, jehož cílem je minimalizovat riziko přenosu škodlivých organismů z okolního prostředí. Poslední kategorií je konformní rozmnožovací materiál (CAC), který již nepodléhá přísným testovacím požadavkům a není přímo vázán na certifikaci vyšších kategorií.

Významnou roli v systému certifikace hraje také organizace EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), která vydává mezinárodní standardy pro produkci zdravého rozmnožovacího materiálu. Tyto dokumenty stanovují povinně sledované viry, viroidy a fytoplazmy u jednotlivých ovocných druhů, pravidla pro udržování izolátů a doporučené metody testování. Standardy EPPO slouží jako metodický základ pro legislativu Evropské unie i národní předpisy, včetně české vyhlášky č. 96/2018 Sb.

Certifikační systém rozmnožovacího materiálu, vycházející z požadavků národní legislativy a doporučení EPPO, je ve VŠÚO Holovousy uplatňován prostřednictvím pravidelného testování množitelského materiálu. Ten je uchováván buď v podmínkách prostorové izolace nebo technické izolace. V tabulce 1 je uvedeno spektrum testovaných virů a fytoplazem v TI a PI VŠÚO Holovousy, které vychází z vyhlášky č. 96/2018 Sb. a zahrnuje hlavní hospodářsky významné patogeny. Uvedeny jsou zde jen vybrané patogeny, které se testují u jaderovin a peckovin uchovávaných v TI a PI. S novelizací vyhlášky s platností od 31. 7. 2025 byla tato povinnost rozšířena o tomato ringspot virus (ToRSV).

Pro diagnostiku rostlinných virů a fytoplazem byla vyvinuta široká škála metod založených na různých principech – od vizuálního hodnocení symptomů a biologického indexingu, přes elektronovou mikroskopii, až po sérologické a molekulární techniky. V současné době se pro rutinní diagnostiku nejčastěji využívají metody sérologické (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a molekulárně genetické, které jsou založené na principu PCR (Polymerase Chain Reaction).

Předmětem této práce bylo shrnout a vyhodnotit výsledky testování stromů umístěných v podmínkách prostorové a technické izolace na přítomnost virů a fytoplazem, které bylo provedeno ve VŠÚO Holovousy v letech 2022–2024.

Tabulka 1. Přehled testovaných virů a fytoplazem u jednotlivých ovocných druhů

Table 1. Overview of tested viruses and phytoplasmas in individual fruit species

ACLSV – apple chlorotic leaf spot virus, **ApMV** – apple mosaic virus, **ArMV** – arabis mosaic virus, **ASGV** – apple stem grooving virus, **ASPV** – apple stem pitting virus, **CLRV** – cherry leaf roll virus, **Ca. P. mali** – 'Candidatus Phytoplasma mali', **Ca. P. prunorum** – 'Candidatus Phytoplasma prunorum', **Ca. P. pyri** – 'Candidatus Phytoplasma pyri', **LChV-1** – little cherry virus-1, **LChV-2** – little cherry virus-2, **PDV** – prune dwarf virus, **PNRSV** – prunus necrotic ringspot virus, **PPV** – plum pox virus, **RpRSV** – raspberry ringspot virus, **SLRSV** – strawberry latent ringspot virus, **TBRV** – tomato black ring virus, **ToRSV** – tomato ringspot virus

Patogen ¹⁾	Ovocné druhy ²⁾					
	Broskvoň ³⁾	Hrušeň ⁴⁾	Jabloň ⁵⁾	Meruňka ⁶⁾	Slivoň ⁷⁾	Třešeň ⁸⁾ / višeň ⁹⁾
ACLSV	x	x	x	x	x	x
ApMV	x	x	x	x	x	x
ArMV						x
ASGV		x	x			
ASPV		x	x			
Ca. P. mali			x			
Ca. P. prunorum	x			x	x	x
Ca. P. pyri		x				
CLRV						x
LChV-1						x
LChV-2						x
PDV	x			x	x	x
PNRSV	x			x	x	x
PPV	x			x	x	x
RpRSV						x
SLRSV						x
TBRV						x
ToRSV	x		x	x	x	x

1) Pathogen, 2) Fruit species, 3) Peach tree, 4) Pear tree, 5) Apple tree, 6) Apricot tree, 7) Plum tree, 8) Cherry tree, 9) Sour cherry tree

MATERIÁL A METODY

V letech 2022–2024 byly testovány rostliny určené k produkci rozmnožovacího materiálu, z něhož se odebírají očka a rouby pro další množení a prodej. Všechny testované rostliny byly umístěny buď v technické izolaci, nebo v prostorové izolaci. Testování zahrnovalo následující ovocné druhy: jablonoň (*Malus × domestica* Borkh.), hrušeň (*Pyrus communis* L.), broskvoň (*Prunus persica* (L.) Batsch), meruňku (*Prunus armeniaca* L.), slivoň (*Prunus domestica* L.), třešeň (*Prunus avium* L.) a višeň (*Prunus cerasus* L.). Výběr patogenů pro testování jednotlivých ovocných druhů a frekvence testování se řídily vyhláškou 96/2018 Sb. v aktuálním znění. Testována byla přítomnost celkem 17 patogenů, 14 virů – ACLSV, ApMV, ASPV, ASGV, PDV, PNRSV, PPV, TBRV, CLRV, RpRSV, ArMV, SLRSV, LChV-1, LChV-2 a 3 fytoplazem – *Ca. P. mali*, *Ca. P. prunorum*, *Ca. P. pyri*. Tabulka 1 uvádí spektrum patogenů, které byly testovány dle vyhlášky č. 96/2018 Sb. podle ovocného druhu, včetně zařazení ToRSV, který bude testován v následujících letech. V případě pozitivního výsledku byl vždy okamžitě vystaven Likvidační protokol a napadený strom byl odstraněn.

K diagnostice byly použity imunoenzymatická metoda ELISA a molekulárně genetické metody real-time PCR a real-time RT-PCR. Následující viry byly testovány metodou ELISA: ACLSV, ApMV, ASPV, ASGV, PDV, PNRSV, PPV, TBRV, CLRV, RpRSV, ArMV, SLRSV. Metodou real-time PCR byly analyzovány všechny fytoplazmy, zatímco pro detekci virů maloplodosti třešně (LChV-1 a LChV-2) byla použita výhradně metoda real-time RT-PCR, jelikož jiné diagnostické metody nejsou dostatečně citlivé ani specifické pro detekci těchto virů. U vybraných stromů, u kterých již byla izolována RNA pro účely detekce LChV-1 a LChV-2, byla metoda real-time RT-PCR rovněž použita pro potvrzení dalších virů ACLSV, ApMV, PDV, PNRSV, PPV. Tento přístup umožnil efektivněji využití izolované RNA.

Pro diagnostiku byly z vybraných rostlin odebírány jak listy, tak i výhony ze všech světových stran, aby byla zajištěna reprezentativnost vzorku. Zda byly odebírány výhony nebo listy, záviselo na ročním období a na testovaném patogenu. Výhony byly využívány především v obdobích, kdy na stromě ještě nebyly k dispozici listy, a vždy také pro detekci fytoplazem.

Odběr materiálu byl plánován tak, aby odpovídal biologii jednotlivých virů a fytoplazem, ale současně také s ohledem na kapacitní možnosti laboratoře. Vždy bylo přihlíženo k tomu, aby období odběru a zvolený rostlinný materiál byly v souladu s doporučeními firmy Bioreba, která dodává používané detekční kity. Odběry vzorků zpravidla probíhaly následovně: od prosince do března byly odebírány výhony peckovin pro testování ApMV a ACLSV. V období od února do května probíhaly odběry výhonů jabloní pro detekci ApMV, ACLSV, ASPV a ASGV, a zároveň výhonů peckovin pro testování PDV a PNRSV. Ve stejném období byly u třešní testovány viry LChV-1 a LChV-2. Od března do června následovaly odběry výhonů nebo listů třešní pro testování TBRV, CLRV, RpRSV, ArMV a SLRSV, zatímco od srpna do října se prováděly odběry listů peckovin pro testování na přítomnost PPV. U peckovin se dále prováděly odběry listů pro testování PDV a PNRSV od doby, kdy byly listy k dispozici, až do konce června. Ve stejném období byly ze stromů odebírány také listy pro testování ApMV a ACLSV u všech peckovin kromě slivoní. Fytoplazmy *Ca. P. mali* a *Ca. P. prunorum* se testovaly ve vzorcích odebraných v období od března do října, zatímco *Ca. P. pyri* byla testována zpravidla od září do dubna. Tento harmonogram odběrů platil obecně, avšak v odůvodněných případech byly prováděny výjimky, například z důvodu klimatických podmínek, odlišného vývoje porostů nebo laboratorní kapacity.

Pro analýzu vzorků metodou ELISA byly použity komerční kity výrobce Bioreba. Testování probíhalo dle doporučeného protokolu výrobce, přičemž pro navážku bylo použito 200 mg

rostlinného materiálu. Vzorky byly homogenizovány pomocí homogenizátoru Homex 7 (Bioreba) a absorbance byla měřena na fotometru Sunrise (Tecan).

Pro detekci fytoplazem bylo jako testovací materiál použito lýko, které bylo homogenizováno v tekutém dusíku s navázkou 100 mg. Izolace DNA probíhala za použití izolačního kitu Exgene Plant SV (GeneAll Biotechnology) podle návodu výrobce. Pro detekci virů metodou real-time RT-PCR byla homogenizace vzorků prováděna v tekutém dusíku s navázkou materiálu 50 mg. Izolace celkové RNA byla provedena pomocí izolačního kitu Ribospin Plant (GeneAll Biotechnology) podle návodu výrobce. Izolovaná RNA byla následně pomocí reverzní transkriptázy M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) přepsána do komplementární DNA, která byla použita jako vstupní materiál pro PCR reakce. Pro metody na principu PCR byly použity systémy s použitím specifických primerů a sond pro daný patogen: LChV-1 a LChV-2 (Čmejla a Valentová 2018), PDV, PNRS, PPV a fytoplazmy (Rejlová *et al.* 2021), ACLSV a ApMV (sekvence primerů a sond dostupné na vyžádání u autorů).

PCR reakce byla provedena ve směsi o celkovém objemu 20 μ l, která kromě sond a primerů obsahovala 1 \times qPCR Blue Master Mix (Top-Bio) s polymerázou a dalšími nezbytnými komponentami, 2 μ l cDNA jako templát a PCR vodu doplněnou do požadovaného objemu. Pomocí real-time PCR a real-time RT-PCR byla současně testována kvalita izolované nukleové kyseliny DNA nebo RNA. V případě kontroly kvality DNA byla v PCR reakci detekována přítomnost chloroplastové 16S rDNA a pro RNA přítomnost transkriptu pro mitochondriální gen *Nad5*. Pro testování byl použit přístroj real-time PCR cykler Rotor-Gene Q 5 plex HRM Platform (Qiagen) s následujícím teplotním profilem: počáteční denaturace 94 °C 5 min, následovalo 50 cyklů – denaturace 94 °C 20 s; hybridizace primerů 58 °C 20 s; elongace 72 °C 20 s.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Podle doporučení vyhlášky č. 96/2018 Sb. probíhalo v letech 2022, 2023 a 2024 testování zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu z hlediska přítomnosti virů a fytoplazem. V roce 2022 bylo v podmínkách technické izolace umístěno 379 rostlin a v podmínkách prostorové izolace 8 381 rostlin. V roce 2023 činily počty rostlin 424 v TI a 7 993 v PI a v roce 2024 pak 410 v TI a 8 075 v PI. U těchto rostlin byly provedeny testy, jejichž počty jsou uvedeny v tabulce 2. Z výsledků je patrné, že více testů bylo provedeno v PI než v TI, což odpovídá rozdílným počtům uchovávaných rostlin v jednotlivých typech izolátů. Počty provedených testů v PI se pohybovaly v rozmezí od 88 do 93 % všech testů provedených v jednotlivých letech.

Tabulka 2. Přehled provedených testů v podmínkách technické a prostorové izolace v letech 2022–2024

Table 2. Overview of tests performed under conditions of technical and spatial isolation in 2022–2024

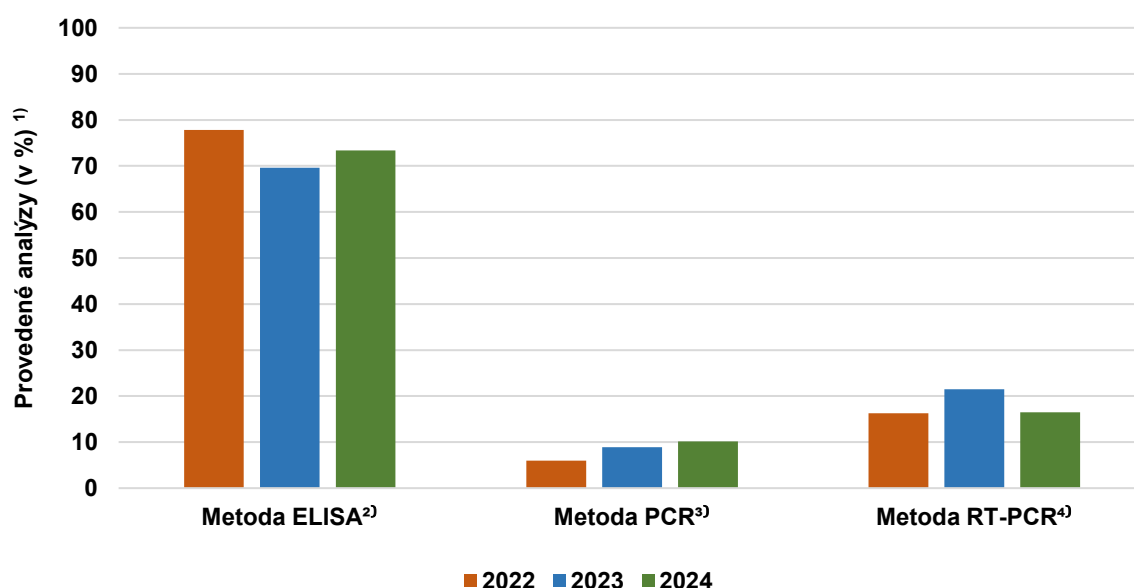
Provedené testy ¹⁾	2022		2023		2024	
	n	%	N	%	n	%
Technická izolace ²⁾	569	8	970	12	515	7
Prostorová izolace ³⁾	6882	92	6902	88	6389	93
Celkem provedeno testů ⁴⁾	7451	100	7872	100	6904	100

1) Tests performed, 2) Insect-proof greenhouse, 3) Spatial isolates, 4) Total number of tests performed

Testování virů v TI a PI bylo provedeno metodami ELISA, PCR a RT-PCR, které se podle Jeong *et al.* (2014) běžně využívají pro diagnostiku virových a bakteriálních patogenů. Tito autoři dále uvádějí, že sérologická metoda ELISA byla zavedena a celosvětově rozšířena jako diagnostický nástroj zejména díky své jednoduchosti a spolehlivosti. Po zavedení PCR byla tato metoda přizpůsobena jako srovnatelný diagnostický systém a v mnoha případech se stala významně používanou technikou. Přesto se však při testování rostlin v PI a TI nejčastěji uplatňuje metoda ELISA, a to zejména z důvodu své cenové dostupnosti a rychlosti provedení, což potvrzují také naše výsledky. Zastoupení testů provedených jednotlivými diagnostickými metodami je znázorněno v grafu 1.

Graf 1. Přehled provedených analýz rozdělený podle typu použitých metod

Graph 1. Overview of analyses performed, broken down by type of method used



1) Total number of tests performed, 2) ELISA method, 3) PCR method, 4) RT-PCR method

Ve všech třech sledovaných letech byla metoda ELISA využívána k testování v rozsahu 70–78 %. Jak uvádějí Vemulapati *et al.* (2014), jednou z hlavních výhod metody ELISA je možnost provádět testování ve standardní 96jamkové destičce, což umožňuje zpracování velkého množství vzorků současně. Tím se nejen šetří čas potřebný k testování, ale také náklady na pracovní sílu a laboratorní materiál. Na tato zjištění navazují i Boonham *et al.* (2014), kteří zdůrazňují, že právě tyto úspory zvyšují dostupnost a praktičnost metody pro rutinní diagnostiku.

Pokud srovnáme počty testů provedených molekulárně-biologickými metodami, je patrné, že jejich podíl byl nižší. Metodou PCR byly testovány pouze fytoplazmy, protože se jedná o DNA organismy, jejichž detekce nevyžaduje izolaci RNA. Naproti tomu viry, které byly předmětem testování, jsou RNA patogeny, proto pro jejich diagnostiku bylo nutné izolovat RNA a provést testy metodou RT-PCR.

Vzhledem k tomu, že se v době testování hrušně v PI vůbec nenacházely a v TI jsou zastoupeny jen v malém rozsahu, bylo testování výskytu fytoplazem zaměřeno především na '*Candidatus Phytoplasma mali*' a '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'. Testování na '*Candidatus Phytoplasma pyri*' bylo provedeno pouze v TI, a to u 51 rostlin. Počty testů metodou RT-PCR byly vyšší, zejména v důsledku intenzivnějšího testování virů maloplodosti

třešní (LChV-1 a LChV-2). Tento nárůst souvisel se závažným výskytem těchto virů, který na území České republiky zaznamenal Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ) (NAP MZe 2021). Počty provedených RT-PCR testů však neodrážejí pouze analýzy zaměřené na LChV-1 a LChV-2, ale také využití již izolované RNA, která následně posloužila k detekci dalších virů z odebraných vzorků. Z tohoto důvodu nebylo nutné provádět všechny analýzy metodou ELISA, což vedlo k úspoře času pro provedení analýz. Do budoucna se předpokládá, že počty analýz provedených metodou RT-PCR poklesnou, protože v obou typech izolátů již byly všechny třešně otestovány na přítomnost virů maloplodosti třešně. Nebude tak nutná izolace RNA a ostatní viry budou testovány metodou ELISA.

Co se týká zastoupení jednotlivých ovocných druhů v PI a TI, přehled je uveden v tabulce 3. Z ní vyplývá, že nejvyšší podíl v PI dlouhodobě zaujímají slivoně, jejichž zastoupení se ve sledovaných letech pohybovalo mezi 74–77 % ze všech uchovávaných stromů. Další významnou skupinu v PI tvoří třešně, jejichž podíl se stabilně pohyboval kolem 10 %. Ostatní ovocné druhy – jabloně, meruňky a broskvoně – byly zastoupeny v PI méně než 10 %. Jak již bylo výše zmíněno, hrušně se v PI vůbec nenacházejí; vyskytují se pouze v TI, kde jejich podíl činil 6 % v letech 2022 a 2023 a 5 % v roce 2024. V TI je zastoupení ovocných druhů rozmanitější a více vyrovnané. Nejpočetněji jsou zde zastoupeny jabloně (37 %, 33 % a 33 % v jednotlivých letech), dále pak slivoně a třešně/višně.

Tabulka 3. Přehled pěstovaných ovocných druhů v technickém (TI) a prostorovém izolátoru (PI) v období 2022–2024

Table 3. Overview of fruit species grown in the Insect-proof greenhouse (TI) and spatial isolationr (PI) in 2022–2024

Ovocný druh ¹⁾	2022				2023				2024			
	TI		PI		TI		PI		TI		PI	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Broskvoň ²⁾	10	3	263	3	10	2	241	3	8	2	231	3
Hrušeň ³⁾	22	6	0	0	26	6	0	0	21	5	0	0
Jabloň ⁴⁾	140	37	551	7	140	33	416	5	134	33	483	6
Meruňka ⁵⁾	13	3	488	6	14	3	370	5	13	3	362	4
Slivoň ⁶⁾	100	26	6228	74	141	33	6118	77	141	34	6154	76
Třešeň ⁷⁾ / višeň ⁸⁾	94	25	851	10	93	22	848	11	93	23	845	10

1) Fruit species, 2) Peach tree, 3) Pear tree, 4) Apple tree, 5) Apricot tree, 6) Plum tree, 7) Cherry tree, 8) Sour cherry tree

Ve sledovaném období 2022–2024 byly nejčastěji testovanými ovocnými druhy slivoně a třešně/višně, což odpovídá jejich vysokému zastoupení v PI i TI porostech (Tabulka 4). U slivoní tvořil podíl provedených testů v PI 50–43 % a v TI postupně klesal z 63 % v roce 2022 na 10 % v roce 2024. Vyšší počet testů u tohoto druhu je způsoben především častějším testováním na přítomnost PPV. Podle vyhlášky č. 96/2018 Sb. má PPV nejkratší dobu platnosti výsledků ve srovnání s ostatními patogeny, a proto musí být jednotlivé stromy testovány v kratších intervalech – během 10 let musí být na tento virus otestovány všechny slivoně v PI. Podrobnější údaje o testování na PPV v jednotlivých ovocných druzích a izolátech (TI a PI) ukazuje graf 2. Z výsledků vyplývá, že slivoně představovaly jednoznačně nejvíce testovaný ovocný druh. V roce 2022 byla přítomnost PPV analyzována v TI pouze u slivoní, zatímco v PI

tvořily testy na tomto druhu 89 %. V roce 2023 bylo u slivoní provedeno 135 testů v TI a 1698 v PI (81 % všech testů). V roce 2024 sice došlo k výraznému poklesu počtu testů v TI (pouze 8 stromů), avšak v PI zůstalo testování na vysoké úrovni (1520 stromů; 86 %).

Tabulka 4. Přehled provedených testů v technickém (TI) a prostorovém izolátu (PI) v letech 2022–2024 podle ovocných druhů

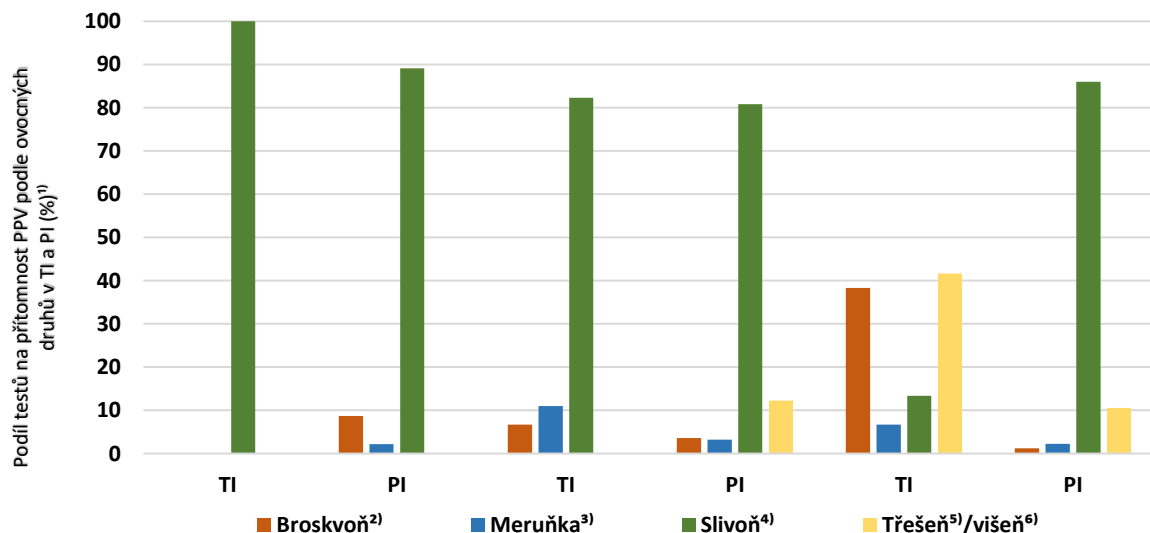
Table 4. Overview of tests performed in insect-proof greenhouse (TI) and spatial isolation (PI) 2022–2024 by fruit species

Ovocný druh ¹⁾	2022				2023				2024			
	TI		PI		TI		PI		TI		PI	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Broskvoň ²⁾	0	0	506	7	11	1,1	439	6	161	31	223	3
Hrušeň ³⁾	0	0	0	0	2	0,2	0	0	129	25	0	0
Jabloň ⁴⁾	9	2	1120	16	5	0,5	662	10	41	8	1374	22
Meruňka ⁵⁾	0	0	533	8	42	4,3	429	6	28	5	360	6
Slivoň ⁶⁾	360	63	3435	50	336	34,6	3192	46	53	10	2719	43
Třešeň ⁷⁾ / višeň ⁸⁾	200	35	1288	19	574	59,2	2180	32	103	20	1713	27
Celkem ⁹⁾	569	100	6882	100	970	100	6902	100	515	100	6389	100

1) Fruit species, 2) Peach tree, 3) Pear tree, 4) Apple tree, 5) Apricot tree, 6) Plum tree, 7) Cherry tree, 8) Sour cherry tree, 9) Total

Graf 2. Testování na přítomnost PPV v technické (TI) a prostorové izolaci (PI) podle ovocných druhů

Graph 2. Testing for the presence of PPV in insect-proof greenhouse (TI) and spatial (PI) isolation by fruit species



1) Percentage of tests for PPV presence by fruit species in TI and PI (%), 2) Peach tree, 3) Apricot tree, 4) Plum tree, 5) Cherry tree, 6) Sour cherry tree

U ostatních ovocných druhů byl rozsah testování výrazně nižší a odrážel jejich zastoupení v porostech. Broskvoň byly v roce 2022 testovány na přítomnost PPV pouze v PI (174 testů; 9 %), zatímco v následujících letech se testovaly i v TI – 11 testů v roce 2023 a 23 testů v roce

2024. Meruňky byly testovány jen v omezené míře, především v PI (44 testů v roce 2022; 68 testů v roce 2023; 40 v roce 2024), v TI se provedly pouze jednotky testů (maximálně 18 v roce 2023). Třešně a višně nebyly v roce 2022 na PPV testovány vůbec, ale v roce 2023 se již testovaly v PI (258 testů; 12 %) a v roce 2024 se jejich podíl dále zvýšil – 25 testů v TI a 187 v PI (11 %).

Celkově struktura testovaných vzorků odrážela složení PI a TI, kde dlouhodobě převažují slivoně a třešně/višně. Největší objem testů je však trvale spojen se slivoněmi, a to zejména kvůli častěji se opakujícímu testování na PPV.

Vedle PPV byly v letech 2022–2024 stromy testovány také na další významné viry a fytoplazmy, jejichž sledování a testování ukládá vyhláška č. 96/2018 Sb. Výsledky počtu provedených analýz na přítomnost jednotlivých patogenů jsou znázorněny v grafu 3 pro PI a v grafu 4 pro TI.

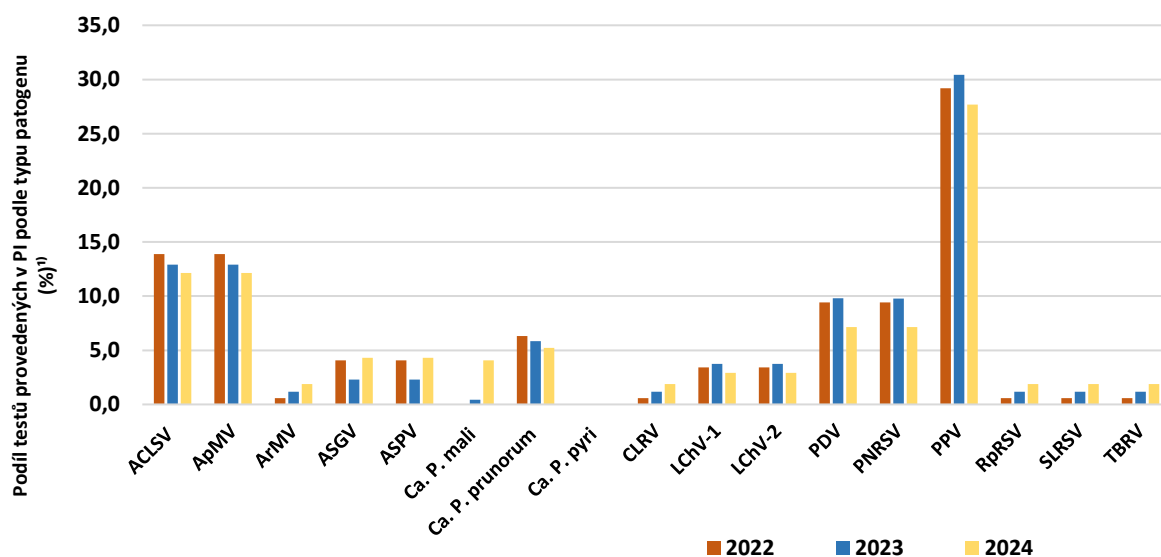
ACLSV a ApMV byly testovány jak u peckovin, tak u jádrovin, což vysvětluje jejich vysoký podíl na celkovém počtu provedených analýz. ACLSV byl v roce 2022 prověřován u 955 stromů v PI (13,9 % všech testů), v roce 2023 u 891 stromů (12,9 %) a v roce 2024 u 776 stromů (12,1 %). Podobně ApMV byl v roce 2022 testován u 955 stromů v PI, v roce 2023 u 891 stromů a v roce 2024 u 776 stromů.

U peckovin hraje klíčovou roli i testování PDV a PNRSV, které se přenášejí pylem (Mink 1993), a proto je nezbytné stromy opakovaně testovat a současně zabránit jejich kvetení v izolátech. To se zajišťuje pravidelným odstraňováním květů, aby rostliny nemohly kvést. Z tohoto důvodu musí být stromy na jejich přítomnost kontrolovány častěji, což se odráží ve vyšším počtu testů. V roce 2022 bylo provedeno 120 testů v TI a 648 v PI, v roce 2023 pak 85 testů v TI a 674–677 v PI, a v roce 2024 bylo analyzováno 42–43 stromů v TI a 456 stromů v PI.

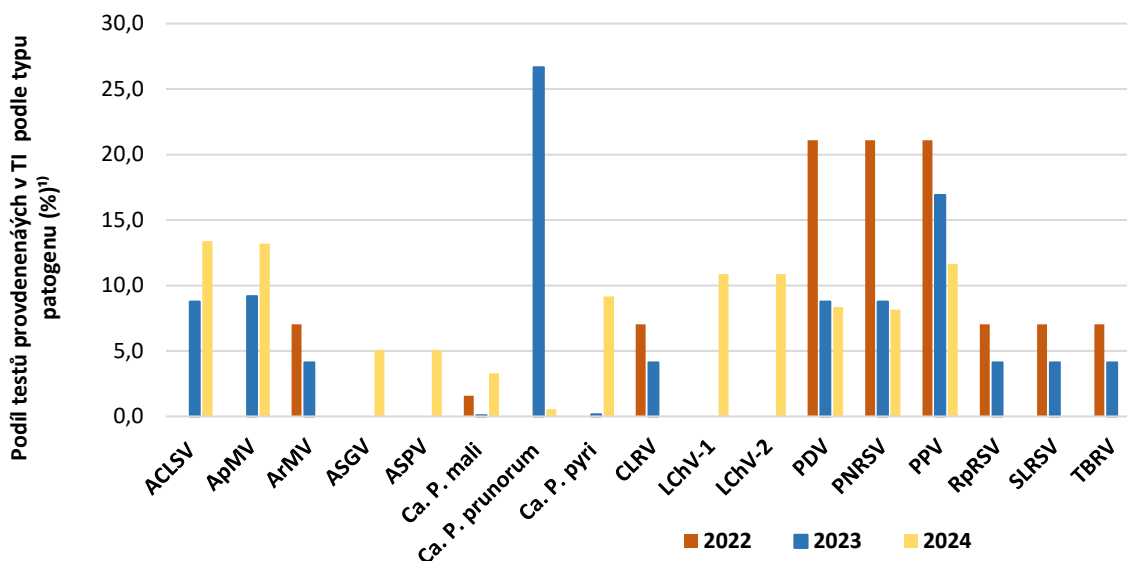
Další viry, jako ArMV, CLRV, RpRSV, SLRSV, TBRV, byly sledovány v menších počtech (zpravidla kolem 40 stromů ročně v TI i PI). Jejich zastoupení se proto pohybovalo pouze v jednotkách procent. Specifickou skupinu představují viry třešní – LChV-1 a LChV-2. Ty byly v PI i TI pravidelně testovány, a to v rozsahu od 187 do 258 stromů ročně.

Graf 3. Rozdělení provedených testů v prostorovém izolátoru dle testovaných patogenů

Graph 3. Distribution of tests performed in the spatial isolation according to the pathogens tested



1) Proportion of tests performed at PI by pathogen type (%)

Graf 4. Rozdělení provedených testů v technickém izolátoru dle testovaných patogenů**Graph 4.** Distribution of tests performed in the insect-proof greenhouse according to the pathogens tested

1) Proportion of tests performed at TI by pathogen type (%)

Okamžitá likvidace pozitivně testovaných stromů je nedílnou součástí certifikačního systému, neboť zajišťuje, že se patogeny dále nešíří na okolní stromy. V roce 2022 bylo na základě likvidačního protokolu odstraněno 10 stromů, což představovalo 0,13 % ze všech provedených testů. V roce 2023 byl počet odstraněných stromů vyšší – 20 stromů (0,25 %) a v roce 2024 pak 15 stromů (0,22 %). Tento postup představuje nezbytné opatření, které chrání zdravotní stav množitelského materiálu v izolátech. Na proces likvidace pozitivních stromů navazovalo testování okolních stromů, které umožnilo ověřit, zda nedošlo k šíření infekce v bezprostředním okolí. Vzorky rostlinného materiálu byly odebírány po řadách, zpravidla z několika po sobě rostoucích stromů, takže v případech, kdy byl některý strom vyhodnocen jako pozitivní, jeho sousední stromy již bývaly zahrnuty do stejné série testování. Tento systém odběrů zajišťoval, že okolní stromy byly většinou prověřeny již v době detekce pozitivního nálezu. Pouze v ojedinělých případech bylo nutné provést následné doplňující odběry.

Výsledky testování stromů v podmínkách prostorové izolace a technické izolace ve VŠÚO Holovousy v letech 2022–2024 potvrdily, že pravidelná diagnostika virů a fytoplazem v rámci certifikačního schématu ovocných dřevin má zásadní význam pro udržení vysoké kvality zdravotního stavu rozmnožovacího materiálu i pro prevenci šíření patogenů. Většina vzorků byla negativních, přičemž pozitivní nálezy se objevily pouze výjimečně. Tyto případy byly řešeny okamžitou likvidací infikovaných stromů, čímž se zabránilo dalšímu šíření patogenů. Tento vývoj potvrzuje, že systém testování plní především preventivní funkci, jeho cílem není odhalování rozsáhlých ohnisek infekce, ale udržování nulové prevalence patogenů v kontrolovaném prostředí. Ojedinělé pozitivní nálezy dokazují, že bez pravidelného opakovaného testování by se infekce mohly snadno rozšířit. Absence pozitivních výsledků tedy není důvodem ke snižování frekvence testování, ale naopak potvrzením jeho nezbytnosti.

Z ekonomického hlediska se preventivní přístup ukazuje jako výrazně efektivní. V jednotlivých letech byly odstraněny desítky stromů (2022: 10; 2023: 20; 2024: 15), což představuje relativně nízký zásah. Tento počet však měl zásadní význam pro ochranu produkčního materiálu – včasná likvidace zabránila vzniku tisíců potenciálně infikovaných

výpěstků, které by v případě přehlédnutí infekce mohly být distribuovány do sadů či školkařských provozů. Náklady spojené s testováním a likvidací několika stromů jsou nesrovnatelně nižší než náklady, které by vznikly při řešení rozsáhlého šíření viru v produkčních výsadbách – ať už jde o ztráty na výnosech nebo náklady na likvidaci. Tento princip potvrzuje i studie Cembali *et al.* (2003), která analyzovala ekonomické dopady virové prevence u ovocných dřevin v USA. Autoři zjistili, že přínosy preventivního programu výrazně převyšují jeho náklady – konkrétně až 420násobně. Takové výsledky jednoznačně ukazují, že investice do včasné diagnostiky a cílené likvidace jsou nejen agronomicky, ale i ekonomicky opodstatněné.

Tyto závěry potvrzují i Varveri *et al.* (2015), kteří ve své práci uvádějí, že zásadním předpokladem bezpečné produkce rozmnožovacího materiálu je používání viruprostého výchozího materiálu a pravidelná kontrola jeho zdravotního stavu. Autoři rovněž uvádějí, že zavedení testování rozmnožovacího materiálu představuje nejefektivnější preventivní opatření proti šíření patogenů, protože účinné metody léčby neexistují.

Získaná data zároveň poukazují na to, že rozsah testování se liší podle druhu ovocné dřeviny a povinně sledovaných patogenů vymezených legislativou. Významnou část tvořily testy na detekci viru šarky švestky (PPV), který je snadno přenosný mšicemi i infikovaným rostlinným materiálem a představuje celosvětově nejvýznamnější virový patogen slivoní (García *et al.* 2025). Pozornost byla věnována také virům LChV-1 a LChV-2, které mohou u třešní a višní významně snižovat výnos a kvalitu plodů (Tahzima *et al.* 2019). Podle studie NAP (NAP MZe 2021) může infekce ohrozit až 80 % úrody. Jejich systematické zařazení do testování bylo nezbytné vzhledem k prokázanému zvýšenému výskytu v produkčních výsadbách, s cílem zajistit zdravý rozmnožovací materiál určený pro zakládání produkčních sadů a tím zabránit dalšímu šíření infekce. Ve VŠÚO Holovousy proto postupně proběhlo testování všech třešní uchovávaných v technické i prostorové izolaci.

Na potřebu citlivých a spolehlivých metod testování upozorňuje i práce Naik *et al.* (2023). Ti uvádějí, že nedostatečnost jednotných certifikačních standardů v produkci révy vinné v Indii vede k šíření infekcí a ztrátě důvěry v kvalitu rozmnožovacího materiálu. Stejná doporučení jsou relevantní i pro Českou republiku, zejména s ohledem na dovážený rozmnožovací materiál třešní a višní. Na základě poznatků uvedených ve studii NAP (NAP MZe 2021) bylo proto doporučeno testovat rozmnožovací materiál pocházející ze zahraničí na přítomnost virů maloplodosti třešně, neboť právě tento materiál může představovat zdroj zavlečení nových infekcí. Tento fakt potvrzují ve své studii i Sapakhova *et al.* (2023), kteří srovnávají certifikační systémy různých zemí a ukazují, že úroveň diagnostiky a přísnost kontroly se mohou značně lišit. Přijetí jednotných postupů a využívání nejmodernějších diagnostických metod je proto nezbytné pro zajištění dlouhodobě stabilní a bezpečné produkce. Výsledky testování virů maloplodosti třešně ve VŠÚO Holovousy zároveň potvrzují, že domácí rozmnožovací materiál je díky pravidelnému testování a přísnému certifikačnímu systému prostý těchto virů. K jeho kontrole se využívá citlivá PCR metoda, vyvinutá přímo ve VŠÚO Holovousy, která umožňuje detekci již od 500 kopií viru LChV-1 a 650 kopií viru LChV-2 v jedné reakci (Čmejla a Valentová 2018).

Vyhláška č. 96/2018 Sb. se nevztahuje pouze na ovoce produkované na území České republiky, ale zahrnuje i některé druhy, které lze z hlediska pěstitelských podmínek považovat za subtropické. Typickým příkladem je rod *Citrus* a *Olea europaea*, které jsou sice součástí legislativy, avšak v podmínkách ČR se pěstují jen okrajově, zejména ve sklenících. Ostatní subtropické druhy, jako např. fíkovník smokvoň (*Ficus carica*) či kaki (*Diospyros kaki*), zatím do systému certifikace zahrnutý nejsou. Lze však očekávat, že s rozšiřováním pěstitelských

možností a klimatickými změnami bude nutné certifikační systém postupně rozšířit i na tyto druhy, aby se předešlo zavlečení nových patogenů.

Flexibilitu certifikačního schématu potvrzuje i novelizace vyhlášky č. 96/2018 Sb., která vstoupila v platnost v červenci 2025. Touto úpravou byl rozšířen seznam povinně testovaných patogenů, například o tomatu ringspot virus (ToRSV), virus přenášený háďátky, který u ovocných dřevin způsobuje chlorotické proužky, kroužky a žilkovou mozaiku na listech, zpomaluje růst a negativně ovlivňuje plodnost. Zařazení ToRSV mezi regulované nekaranténní škodlivé organismy vychází z prováděcí směrnice Komise (EU) 2025/145, která aktualizovala směrnici 2014/98/EU v návaznosti na změny fyto-sanitárního zařazení vybraných patogenů. Do 25. ledna 2025 byl ToRSV veden jako karanténní škodlivý organismus pro EU, avšak od 26. ledna 2025 byl přeřazen mezi regulované nekaranténní škodlivé organismy (RNŠO). Tento virus je zároveň uveden na seznamu A2 organizace EPPO, což potvrzuje jeho význam z hlediska rostlinolékařské regulace a potřebu jeho monitorování v rámci certifikačního systému. Tímto krokem se česká legislativa uvedla do souladu s požadavky Evropské unie a zároveň prokázala schopnost účinně reagovat na aktuální fytopatologické hrozby, čímž potvrzuje svou pružnost a připravenost přizpůsobovat se měnícím podmínkám v oblasti ochrany rostlin.

ZÁVĚR

Výsledky testování stromů v podmínkách prostorové a technické izolace ve VŠÚO Holovously v letech 2022–2024 potvrzují, že pouze důsledné testování v izolátech umožňuje udržet certifikovaný rozmnožovací materiál ve vysoké kvalitě. Certifikace tak představuje nejen legislativní požadavek, ale i klíčový praktický nástroj, který chrání pěstitele i spotřebitele, podporuje konkurenceschopnost domácí produkce a přispívá k dlouhodobé stabilitě ovocnářské výroby.

PODĚKOVÁNÍ

Vznik tohoto článku byl realizován za finanční podpory Ministerstva zemědělství ČR (projekt RO 1525). Poděkování patří Lucii Zálešákové, Lence Tůmové a Lence Křivohlávkové za precizní technickou činnost v laboratoři.

LITERATURA

- BOONHAM, N.; KREUZE, J.; WINTER, S.; VAN DER VLUGT, R.; BERGERVOET, J.; TOMLINSON, J. a MUMFORD, R. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. Online. *Virus Research*. 2014, vol. 186, p. 20–31. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.007> [cit. 26. 8. 2025].
- CEMBALI, T.; FOLWELL, R. J.; WANDSCHNEIDER, P.; EASTWELL, K. C. a HOWELL, W. E. Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the US. Online. *Crop Protection*. 2003, vol. 22, n. 10, p. 1149–1156. Dostupné z: [http://doi:10.1016/S0261-2194\(03\)00156-X](http://doi:10.1016/S0261-2194(03)00156-X) [cit. 9. 8. 2025].
- ČMEJLA, R. a VALENTOVÁ, L. *Real-time PCR detekce virů Little cherry virus 1 (LChV-1) a Little cherry virus 2 (LChV-2) v biologickém materiálu*. Certifikovaná metodika. Holovously: VŠÚO, 2018.
- DORR, A. C. a GROTE, U. The role of certification in the Brazilian fruit sector. Online. *Revista de Economia Contemporânea*. 2009, n. 13, p. 539–571. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S1415-98482009000300007> [cit. 3. 9. 2025].
- GARCÍA, J. A.; RODAMILANS, B.; MARTÍNEZ-TURIÑO, S.; VALLI, A. A.; SIMÓN-MATEO, C. a CAMBRA, M. Plum pox virus: An overview of the potyvirus behind sharka, a harmful stone fruit

- disease. Online. *Annals of Applied Biology*. 2025, vol. 186, n. 1, p. 49–75. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/aab.12958> [cit. 27. 8. 2025].
- HANČINSKÝ, R.; MIHÁLIK, D.; MRKVOVÁ, M.; CANDRESSE, T. a GLASA, M. Plant viruses infecting Solanaceae family members in the cultivated and wild environments: A review. Online. *Plants*. 2020, vol. 9, n. 5, art. 667. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants9050667> [cit. 26. 8. 2025].
- JEONG, J. J.; JU, H. J. a NOH, J. A Review of detection methods for the plant viruses. Online. *Research in Plant Disease*. 2014, n. 20, p. 173–181. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.5423/RPD.2014.20.3.173> [cit. 28. 8. 2025].
- MEHETRE, G. T.; LEO, V. V.; SINGH, G.; SOROKAN, A.; MAKSIMOV, I.; YADAV, M. K. aj. Current developments and challenges in plant viral diagnostics: A systematic review. Online. *Viruses*. 2021, vol. 13, n. 3, art. 412. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/v13030412> [cit. 27. 8. 2025].
- MINK, G. I. Pollen and seed-transmitted viruses and viroids. Online. *Annual Review of Phytopathology*. 1993, vol. 31, n. 1, p. 375–402. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.002111> [cit. 26. 8. 2025].
- NAIK, S.; BANERJEE, K. a DHEKNEY, S. A. Quality planting material of grape: need to develop plant certification standards for the Indian grape and wine industry. *International Journal of Agricultural Innovation Research*. 2023, vol. 12, n. 1, p. 15–16.
- NAP MZE. *Závěrečná zpráva o rozsahu a výsledcích cíleného průzkumu výskytu virů působících maloplodost třešni a višni v roce 2021 a navazující doporučení pro MZe, ÚKZÚZ a pěstitele*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Ovocnářská unie Čech a Moravy, 2021.
- REJLOVÁ, M.; VALENTOVÁ, L.; NAVRÁTIL, M.; ŠAFÁŘOVÁ, D. a ČMEJLA, R. Prevalence patogenů asociovaných se syndromem předčasného odumírání meruněk v komerčních výsadbách v České republice. *Vědecké Práce Ovocnářské*. 2021, vol. 27, n. 2, p. 53–69.
- SAPAKHOVA, Z.; RAISSOVA, N.; DAUROV, D.; DAUROVA, A.; ZHAPAR, K.; ZHAMBAKIN, K. a SHAMEKOVA, M. Inspection and certification systems analysis of the leading fruit crops planting material producer countries. Online. *Gylym žāne bilim*. 2023, vol. 70, n. 1, p. 124–131. Dostupné z: <https://doi.org/10.52578/2305-9397-2023-1-3-124-131> [cit. 3. 9. 2025].
- SILVA, A. C. G. C.; BARBOSA, A. S. a FONTES, C. H. D. O. Certification rules for the fruit agri-business. Online. *African Journal of Agricultural Research*. 2014, vol. 9, n. 26, p. 2805–2813. Dostupné z: http://www.academicjournals.org/article/article1410168563_Silva%20et%20al.pdf [cit. 26. 8. 2025].
- TAHZIMA, R.; FOUCART, Y.; PEUSENS, G.; BELIËN, T.; MASSART, S. a DE JONGHE, K. High-throughput sequencing assists studies in genomic variability and epidemiology of little cherry virus 1 and 2 infecting *Prunus* spp. in Belgium. Online. *Viruses*. 2019, vol. 11, n. 7, art. 592. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/v11070592> [cit. 29. 8. 2025].
- VARVERI, C.; MALIOGKA, V. I. a KAPARI-ISAIA, T. Principles for supplying virus-tested material. In: *Advances in virus research*. Online. *Academic Press*. 2015, n. 91, p. 1–32. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.10.004> [cit. 25. 9. 2025].
- VEMULAPATI, B.; DRUFFEL, K. L.; HUSEBYE, D.; EIGENBRODE, S. D. a PAPPU, H. R. Development and application of ELISA assays for the detection of two members of the family Luteoviridae infecting legumes: Pea enation mosaic virus (genus Enamovirus) and Bean leafroll virus (genus Luteovirus). Online. *Annals of Applied Biology*. 2014, vol. 165, p. 130–136. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/aab.12126> [cit. 28. 8. 2025].
- ZÁKONY PRO LIDI. *Vyhláška č. 96/2018 Sb., o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu ovocných rodů a druhů a jeho uvádění do oběhu*. Online. Sbírka zákonů České republiky, 2018, částka 49. © AION CS, s.r.o. 2010–2025. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2018-96> [cit. 25. 8. 2025].