

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zahradnictví**



**Ozdravování hybridů třešní v *in vitro* kultuře pomocí chemoterapie**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Lucie Westfálová**

**Obor studia: Zahradnictví**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Josef Sus, CSc.**

© 2020 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Ozdravování hybridů třešní v *in vitro* kultuře" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce doc. Ing. Josefu Susovi, CSc. za trpělivost, podněty a čas který mi věnoval, dále odbornému školiteli Ing. Jiřímu Sedlákoví, Ph.D. za jeho cenné odborné rady v praktické části práce, vedoucímu oddělení Genetiky a šlechtění Ing. Luborovi Zelenému za vstřícnost při realizaci výzkumného projektu, zaměstnavateli za poskytnutí laboratorního zázemí a potřebných materiálů a samozřejmě mé rodině, která projevila bezbřehou trpělivost během celého mého studia.

# Ozdravování hybridů třešní v *in vitro* kultuře pomocí chemoterapie

## Souhrn

Bakalářská práce se zabývá ozdravováním vybraných genotypů třešně ptačí (*Prunus avium L.*) v *in vitro* kultuře pomocí chemoterapie.

Třešeň ptačí patří mezi ekonomicky významné ovocné druhy, které jsou stejně jako mnoho dalších kulturně pěstovaných ovocných dřevin napadány virovými chorobami, snižujícími vitalitu stromů a výnos plodů. Jednou z možností, jak efektivně eliminovat virové částice z infikovaných jedinců je aplikace chemoterapie v *in vitro* kultuře.

Hlavním cílem práce byla eliminace viru zakrslosti slivoně (*Prune dwarf virus – PDV*) ze tří různých kříženců třešní, vybraných z pokusné výsadby Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích. V rostlinném materiálu byl testováním metodou ELISA detekován samostatný virus PDV, bez dalších směsných virových infekcí.

Pro experimentální část této práce byla z dormantních výhonů odebraných v únoru 2018 založena aseptická *in vitro* kultura, která po dostatečném namnožení rostlinného materiálu sloužila k vlastní chemoterapii. K léčbě infikovaných explantátů bylo použito nukleosidové antivirotikum ribavirin používané v humánní medicíně k léčbě respiračních onemocnění. Koncentrace antivirotika byla stanovena na 40 mg.l<sup>-1</sup> a 80 mg.l<sup>-1</sup> a časový interval léčby 30 dní. Po chemoterapeutické léčbě byly explantáty subkultivovány na modifikovaném kultivačním médiu typu MS se 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP, kde po dobu dalších 30 dní probíhala regenerační fáze.

V tomto experimentu se podařilo eliminovat PDV při koncentraci 40 mg.l<sup>-1</sup> z většiny rostlin. Při koncentraci antivirotika 80 mg.l<sup>-1</sup> se podařilo virové částice z rostlinného materiálu taktéž odstranit, ale citlivost rostlin na léčbu byla natolik vysoká, že není zcela vhodné ji aplikovat bez předchozích testů na fytotoxicitu jednotlivých genotypů.

**Klíčová slova:** třešeň, meristémy, ozdravování, virus, chemoterapie

# Sanitation of hybrid cherries in *in vitro* culture using chemotherapy

## Summary

The bachelor thesis aims at the sanitation of selected genotypes of sweet cherry (*Prunus avium* L.) in *in vitro* culture using chemotherapy.

The sweet cherry is one of the economically important fruit species that. Similarly to many other cultivated fruit trees, it can be infested with viral diseases that reduce tree vitality and fruit yield. One way to effectively eliminate virus particles from infected individuals is to apply chemotherapy into *in vitro* culture.

The main goal of this work was to eliminate the *Prune dwarf virus* (PDV) from three different hybrids of cherries, selected from the experimental planting of the Research and Breeding Institute of Fruit Growing Holovousy. A single PDV virus was detected in the plant material by ELISA testing. Materials were free from other viral infections.

For the experimental part of this work, aseptic *in vitro* culture was established from dormant shoots taken in February 2018, which, after sufficient propagation of plant material, was used for its own chemotherapy. The nucleoside antiviral ribavirin (used in human medicine to treat respiratory diseases) has been used to treat infected explants. The antiviral concentration was 40 mg.l<sup>-1</sup> and 80 mg.l<sup>-1</sup> and the treatment interval was 30 days. After chemotherapeutic treatment, the explants were subcultured on modified MS-type culture medium with 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP, where the regeneration phase took place for another 30 days.

In this experiment, PDV at a concentration of ribavirin 40 mg.l<sup>-1</sup> was eliminated from most plants. Concerning ribavirin concentration of 80 mg.l<sup>-1</sup>, virus particles were also removed from the plant material, but the sensitivity of the plants to the treatment was so high that it is not entirely appropriate to apply it without prior tests for phytotoxicity for individual genotypes.

**Keywords:** cherry, meristems, sanitations, virus, chemotherapy

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Cíl práce.....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Třešeň ptačí (<i>Prunus avium</i> L.).....</b>	<b>10</b>
3.1.1 Taxonomické zařazení třešně.....	10
3.1.2 Původ třešně.....	10
3.1.3 Pěstování třešně .....	11
3.1.4 Morfologie třešně.....	11
3.1.5 Opylovací poměry.....	11
3.1.6 Pomologická charakteristika plodů.....	12
3.1.7 Třešňové sady v České republice.....	13
<b>3.2 Rostlinné viry.....</b>	<b>13</b>
3.2.1 Taxonomie a nomenklatura virů.....	14
3.2.2 Struktura viru.....	15
3.2.3 Struktura genomu a jeho velikost .....	15
3.2.4 Virový protein.....	16
3.2.5 Kapsida .....	16
3.2.6 Přenos viru.....	17
3.2.7 Interakce viru a hostitele.....	17
<b>3.3 Virus zakrslosti slivoně - <i>Prune dwarf virus</i> (PDV).....</b>	<b>18</b>
3.3.1 Taxonomické zařazení viru zakrslosti slivoně (PDV) .....	18
3.3.2 Symptomatické projevy.....	20
<b>4 Metodika.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Cíl práce.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 Rostlinný materiál.....</b>	<b>21</b>
4.2.1 Odběr rostlinného materiálu .....	21
4.2.2 Příprava rostlinného materiálu pro založení <i>in vitro</i> kultury.....	21
4.2.3 Příprava pracovního prostředí a pomůcek před nasazováním primárního explantátu .....	22
4.2.4 Složení kultivačního a antivirotického média.....	23
4.2.5 Založení <i>in vitro</i> kultury a podmínky kultivace.....	24
4.2.6 Množení rostlinného materiálu v <i>in vitro</i> kultuře .....	25
<b>4.3 Chemoterapie.....</b>	<b>25</b>
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Mikropropagace před ozdravováním.....</b>	<b>26</b>
<b>5.2 Chemoterapie.....</b>	<b>27</b>
5.2.1 Přežití explantátů .....	27

5.2.2	Eliminace virů.....	30
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>32</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>33</b>

# 1 Úvod

*In vitro* mikropropagace je metodou rozmnožování rostlin s řadou výhod, která probíhá bez ohledu na venkovní klimatické podmínky. Jedná se o efektivní způsob, jak v relativně krátkém časovém horizontu získat velké množství rostlin na ploše několika metrů čtverečních v kontrolovaných laboratorních podmínkách a ve sterilním prostředí. Úspěšnost *in vitro* kultury závisí na dodržení základních pravidel, které zaručují růst kvalitního a zdravého rostlinného materiálu. Při dodržení aseptických podmínek je u tohoto způsobu vegetativního rozmnožování rostlin minimální riziko mikrobiální kontaminace. K nevýhodám *in vitro* kultivace patří poměrně nákladné vybavení laboratoře, jakým jsou laminární boxy, autoklávy, horkovzdušné sušárny a podobně, stejně jako její provoz a vysoká časová náročnost (Akin-Idowu et al. 2009).

Ozdravování rostlin v *in vitro* podmínkách je účinnou metodou, jak získat bezvirózní jedince širokého spektra rostlinných kultur. Úspěšnost chemoterapie závisí na mnoha faktorech, jakými jsou například složení kultivačního média a koncentrace antivirových přípravků, doba působení antivirotika, nebo možná fytotoxicita pro daný druh nebo genotyp.



## 2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce „*Ozdravování hybridů třešní v in vitro kultuře pomocí chemoterapie*“ bylo zpracování literární rešerše na uvedené téma, metodický popis experimentální části a praktická část, která se zabývala eliminací viru zakrslosti slivoně (PDV) ze tří perspektivních genotypů třešní, pomocí nukleosidového antivirotika ribavirinu.

Nedílnou součástí praktické části práce bylo založení aseptické *in vitro* kultury a namnožení primárních explantátů potřebných pro chemoterapii. Průběh chemoterapie a působení antivirotika mělo za úkol potvrdit nebo vyvrátit hypotézu o účinnosti této metody na eliminaci PDV.

### 3 Literární rešerše

Literární rešerše je zaměřena na souhrn informací o třešni ptačí (*Prunus avium* L.), virovém onemocnění a způsobu ozdravování pomocí chemoterapie v *in vitro* podmínkách.

#### 3.1 Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.)

##### 3.1.1 Taxonomické zařazení třešně

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) je druhem z čeledi růžovitých (*Rosaceae*) patřící do rodu *Prunus*. Tento rod zahrnuje i jiné ovocné druhy, jakými jsou například švestka (*Prunus domestica* L.), meruňka (*Prunus armeniaca* L.), višně (*Prunus cerasus* L.), mandloň (*Prunus amygdalus* L.), broskvoň (*Prunus persica* L.), trnka (*Prunus spinosa* L.) a dalších přibližně 200 druhů (Horáček & Mencl 2006). Taxonomické zařazení třešně ptačí zobrazuje Tabulka 1.

**Tabulka 1:** Taxonomické zařazení třešně ptačí (*Prunus avium* L.)

**Zdroj:** [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=189261](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=189261)

TAXONOMICKÁ KATEGORIE	NÁZEV LATINSKY	NÁZEV ČESKY
Říše	<i>Plantae</i>	Rostliny
Podříše	<i>Tracheobionta</i>	Cévnaté rostliny
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i>	Krytosemenné
Třída	<i>Rosopsida</i>	Pravé dvouděložné
Řád	<i>Rosales</i>	Růžotvaré
Čeleď	<i>Rosaceae</i>	Růžovité
Rod	<i>Prunus</i>	Slivoň
Druh	<i>Prunus avium</i> L.	Třešeň ptačí

##### 3.1.2 Původ třešně

Původ třešně není zcela objasněn. Některé zdroje uvádějí jako místo původu Evropu s mírným klimatickým pásmem, jiné zase Asii. První zmínky o původu třešni sahají až do dob před naším letopočtem, kdy je měl údajně přivést do Říma vojevůdce Lucillus z válečného tažení v Malé Asii. Z jiných spisů naopak vyplývá, že plané třešně byly známy dávno předtím, než se zmíněný vojevůdce narodil a rostly jako divoké dřeviny v lesích napříč celou střední Evropou (Říha 1937). První kvalitní odrůdy pěstované v Čechách jsou datovány do 8.-9. století a jedny z nejstarších písemně doložených záznamů „o pěstování třešni na našem území ve 12.století uvádí V. Maiwald ve svém spise „Die Geschichte der Botanik in Böhmen“ (Nečas 2018).

### 3.1.3 Pěstování třešně

Třešeň patří mezi teplomilné ovocné dřeviny vhodné do teplejších oblastí s menším množstvím srážek a lehčí, propustnou půdou. Výběr klimaticko-stanovištních podmínek zajišťuje nejen dobrý zdravotní stav stromů, ale i kvalitní výnos. V nesprávně zvolené oblasti třešně trpí jednak pozdními jarními mrazíky, jež poškozují květy, ale i následným praskáním plodů v době dozrávání, kdy je sklizeň ohrožena častějším výskytem dešťových srážek. Těžká a hlinitojílovitá půda není pro pěstování třešni příliš vhodná. Ačkoliv v této půdě stromy v prvních letech rychleji rostou, zvyšuje se riziko jejich úhynu z důvodu napadení bakteriální rakovinou. Nevhodná jsou též stanoviště zamokřená, s vysokou hladinou podzemní vody a kyselou půdní reakcí. Pro pěstování třešně jsou nejvhodnější chráněná stanoviště na jižních, jihovýchodních a jihozápadních svazích, která bývají nejteplejší a dostatečně osluněná. Výběr lokality společně s volbou vhodné odrůdy i podnože, je pro pěstování třešni velmi důležitým faktorem, který napomáhá udržet výsadbu v dobrém zdravotním stavu po celou dobu její životnosti (Blažek 1998).

### 3.1.4 Morfologie třešně

Třešeň je listnatý strom s košatou, široce rozložitě vejcovitou korunou, jejíž spodní kosterní větve vodorovně odstávají, nebo mohou být lehce převislé. Výška stromu dosahuje 15, ale i 20 až 35 m. Borka je v juvenilním stádiu hladká, tmavě až šedavě hnědá, později červenohnědá, příčně se odlupující. Letorosty silné, lysé, světle hnědé. Listové pupeny jsou kuželovité a zašpicatělé. Květní pupeny, umístěné na krátkých brachyblastech, jsou zaoblené, vejcovité až kuželovité, pokryté lepkavými obalovými šupinami. Listy jsou lysé, nepravidelně pilovité, naspodu nejprve celkově hustě chlupaté, později s jemně chlupatou žilnatinou. Řapíky u báze listu jsou žláznaté, palisty čárkovité a lepkavé. Květy jsou bílé, výjimečně narůžovělé a pětičetné, vyrůstající v přisedlých okolících ve skupině dvou až šesti květů. Květní stopky jsou dlouhé až 6 cm a lysé. Kalich je široce baňkovitý, lysý, kališní lístky tupé, zpětně ohnuté a celokrajné. Plody třešni jsou peckovice. Zabarvení, velikost a tvar plodů je určen zpravidla odrůdou. Tvar plodu je srdčitý, kulovitý až srdčité vejčitý. Pecka lehce zploštělá, hladká, vejcovitá až kulovitá (Horáček & Mencl 2006).

### 3.1.5 Opylovací poměry

Třešeň je dřevina cizosprašná a hmyzosnubná s výjimkou několika samosprašných odrůd, mezi které patří například 'Halka', 'Sunburst' a 'Stella'. Určité skupiny odrůd nejsou schopny se vzájemně opylit důsledkem inkompatibility způsobené stejnými alelami sterility (S-alelami). Podle kombinace S-alel bylo do roku 2012 popsáno 47 inkompatibilních skupin, které zahrnují i skupinu 0. Odrůdy zařazené do nulté skupiny jsou nazývány univerzálními pylovými dárci a díky jedinečné S-alele mají schopnost opylit jakoukoliv jinou odrůdu. Pro pozdně kvetoucí třešně jsou vhodnými opylovači i raně kvetoucí višně, jimiž je možné nahradit odrůdy inkompatibilních třešni. Výběr opylovače, odrůd se stejnou dobou kvetení, nebo umístění hmyzích opylovačů do třešňového sadu je základem úspěšného opylení třešni. Doba kvetení je u třešni rozdělena do čtyř skupin:

- Raně kvetoucí – ‘Adélka’, ‘Kasandra’
- Středně raně kvetoucí – ‘Burlat’, ‘Christiana’, ‘Karešova’
- Středně pozdně kvetoucí – ‘Early Korvik’, ‘Halka’
- Pozdně kvetoucí – ‘Irena’, ‘Kordia’, ‘Regina’

Následná doba zrání je rozdělena do osmi třešňových týdnů. Období třešňových týdnů nekoreluje s kalendářním termínem, ale s vývojem počasí v dané lokalitě. První třešňový týden začíná na přelomu měsíců května a června a určuje se podle data, ve kterém začíná dozrávat odrůda ‘Rychlice německá’. Některé zdroje uvádějí jako počátek prvního třešňového týdne datum sklizně odrůdy ‘Rivan’, která rovněž patří mezi velmi raně zrající. Poslední, osmý třešňový týden období zrání uzavírá odrůda ‘Staccato’, která zraje ve druhé polovině července (Skřivanová & Blažková 2015; Nečas 2018). Dobu zrání podle třešňových týdnů zobrazuje Tabulka 2.

**Tabulka 2:** Rozdělení třešňových týdnů

**Zdroj:** [https://www.ctpz.cz/media/upload/1560324127\\_odrudy-tresni-vyslechtene-ve-vsuo-holovously.pdf](https://www.ctpz.cz/media/upload/1560324127_odrudy-tresni-vyslechtene-ve-vsuo-holovously.pdf); <https://izahradkar.cz/zahrada/ovoce/peckoviny/tresnove-tydny-roku-2019-zacaly-teplem-pocasi-koncem-kvetna/>

Třešňový týden 2019	Počátek / Konec	Odrůdy
1. týden	27.5. – 2.6.	‘Adélka’, ‘Rivan’
2. týden	3.6. – 9.6.	‘Helga’, ‘Burlat’
3. týden	10.6. – 16.6.	‘Marta’, ‘Sandra’
4. týden	17.6. – 23.6.	‘Early Korvik’, ‘Horka’
5. týden	24.6. – 30.6.	‘Amid’, ‘Kordia’
6. týden	1.7. – 7.7.	‘Halka’, ‘Fabiola’
7. týden	8.7. – 14.7.	‘Vilma’, ‘Irena’
8. týden	15.7. – 21.7.	‘Sweet heart’, ‘Staccato’

### 3.1.6 Pomologická charakteristika plodů

Pomologie je nauka zabývající se studiem druhů a odrůd ovocných plodin. Podle charakteristických pomologických znaků, jakými jsou barva, tvar plodů a pevnost dužniny, rozdělujeme plody odrůd třešní do pěti skupin.

- Srdcovky *Prunus avium* ssp. *juliana* – plody jsou střední velikosti, převažuje srdčitý, mírně zploštělý až kulovitý tvar. Pod tenkou, lesklou a tmavě červenou slupkou, je velice šťavnatá, navinule sladká, měkká dužnina. Na pecce střední velikosti někdy slabě ulpívá dužnina. Do této skupiny patří například odrůdy ‘Karešova’, ‘Rivan’ a ‘Kaštánka’.
- Tmavé chrupky *Prunus avium* ssp. *duracina* L. var. *melanocarpa* L. – plody jsou velké, podlouhlé i oválné a srdčité. Slupka je lesklá, lysá a má široké spektrum barev od tmavě červené, přes rudohnědou až po karmínově červenou, která má v některých případech světlejší tečky. Tuhá tmavě červená dužnina je chruplavá, šťavnatá a příjemné chuti.

Pecka je od dužniny dobře odlučitelná. Významnými zástupci jsou 'Kordia', 'Van', 'Vanda', 'Těchlovan' a 'Granát'.

- Pestré chrupky *Prunus avium* ssp. *duracina* L. var. *variegata* L. – plody jsou kulovité a velké s tenkou slupkou. Základní barva slupky je žlutá, krycí barva červená až hnědavě červená. Světle žlutá dužnina s načervenalými žilkami je tuhá, šťavnatá, aromatická a navinule sladká. Větší kulovitá pecka je dobře odlučitelná od dužniny. Typickým zástupcem pestrých chrupek je odrůda 'Napoleonova'.
- Světlé chrupky *Prunus avium* ssp. *duracina* L. var. *leucocarpa* L. – plody střední až větší velikosti srdčitého tvaru mají citronově žlutou slupku, jenž má na osluněné straně jemné červené žíhání. Polotuhá bělavá dužnina je lehce otláčitelná, má bezbarvou šťávu a mírně navinulou chuť. Pecka je převážně srdčitá a lehce odlučitelná od dužniny. Nejvýznamnější zástupce ze starých odrůd je 'Dönissenova', která je někdy zařazována do polochrupek.
- Polochrupky *Prunus avium* ssp. *duracina* L. x ssp. *juliana* L. – velké plody mají kulovitý, srdčitý i oválný tvar. Pevná lesklá slupka má hnědočervenou až tmavě rudou barvu. Dužnina je aromatická, středně tuhá, šťavnatá, navinule sladká a velmi chutná. Zabarvení je zpravidla ovlivněno odrůdou od červené až po rudou. Pecka střední velikosti je oválná a od dužniny dobře odlučitelná. Nejvýznamnějším zástupcem je odrůda 'Burlat' (Dlouhá et al. 1997).

### 3.1.7 Třešňové sady v České republice

Třešně jsou nezastupitelnou součástí ovocných sadů v České republice. Podle Českého statistického úřadu bylo k 1. 5. 2017 evidováno 16 417,26 ha ovocných sadů, z čehož 1016,58 ha připadlo na trvalou kulturu třešní. V mezikrajovém srovnání je na prvním místě uvedeno hlavní město Praha a Středočeský kraj s 266,45 ha, následuje Královéhradecký kraj se 185,16 ha a Jihočeský kraj se 114,60 ha (<https://www.czso.cz/>). Situační a výhledová zpráva 2019 Ovocnářské unie ČR uvádí, že celkový počet stromů třešní v ČR v roce 2018 dosahoval 1 391 262 ks včetně dopočtu sektoru domácností, sklizeň třešní v témže roce činila 10 050 tun a výnos ovoce byl v průměru 7,22 kg na strom. Podle rozdělení stáří sadů je patrné, že ve většině krajů převažují výsadby 25 a více let staré (Buchtová 2019).

## 3.2 Rostlinné viry

Rostlinné viry jsou celosvětově rozšířenými a ekonomicky významnými patogeny. Prakticky veškeré druhy rostlin pěstované ke konzumním účelům lidí a hospodářských zvířat, jsou infikovány alespoň jedním druhem viru. Ačkoliv rostlinné viry neohrožují bezprostředně zdraví a životy lidí, jejich nebezpečí spočívá v ovlivnění kvality rostlinné produkce a s tím souvisejícími ekonomickými ztrátami v zemědělské produkci (Carter & Saunders 2007).

### 3.2.1 Taxonomie a nomenklatura virů

Taxonomii virů vytvořili vědci – virologové, kteří považovali za užitečné, dát svým objektům zájmu určitý řád, ať už se jednalo o viry rostlinné, nebo živočišné. Na počátku byly viry rozděleny podle typu hostitele, způsobu přenosu, nebo onemocnění které způsobovaly. Pojmenování rostlinných virů úzce souviselo s konkrétním hostitelem, ve kterém byl virus nalezen a nejviditelnějšími symptomatickými projevy, například TMV – Tobacco mosaic virus. Na počátku třicátých let 20. století do klasifikace virů zasáhlo několik skutečností, které ovlivnily budoucí zařazení virů do jednotlivých skupin. Johnson spolu s Hogganem vytvořili popisný klíč, který definoval kritéria založená na pěti znacích: způsob přenosu, přirozený, nebo odlišný hostitel, dlouhověkost *in vitro*, teplotní bod smrti a charakteristické, nebo specifické příznaky. Tímto způsobem bylo identifikováno 50 virů, které byly rozděleny do jednotlivých skupin. Viry byly pojmenovány a do těchto skupin zařazeny podle rodového jména hostitele, ve kterém byly poprvé nalezeny. Později, s rozvojem technologií a rozšíření povědomí o vlastnostech a stavbě virových částic, se začaly klasifikovat podle velikosti viru, obalu, prostorového uspořádání kapsidy, druhu nukleové kyseliny a podobně. V roce 1966 pak bylo schváleno rozhodnutí, že viry musí být pojmenovány a rozděleny do skupin. Mezinárodní výbor pro taxonomii virů (ICTV) ustanovuje pravidla pro klasifikaci virů a schvaluje nové návrhy taxonomických skupin a názvy virů (Hull 2014). Podle ICTV (2019) jsou viry rozděleny na říši, kmen, třídu, řád, čeleď, rod a druh. Kritéria vymežující různé virové taxony zobrazuje Tabulka 3.

**Tabulka 3:** Kritéria vymežující různé virové taxony

**Zdroj:** Upraveno podle Hull (2014).

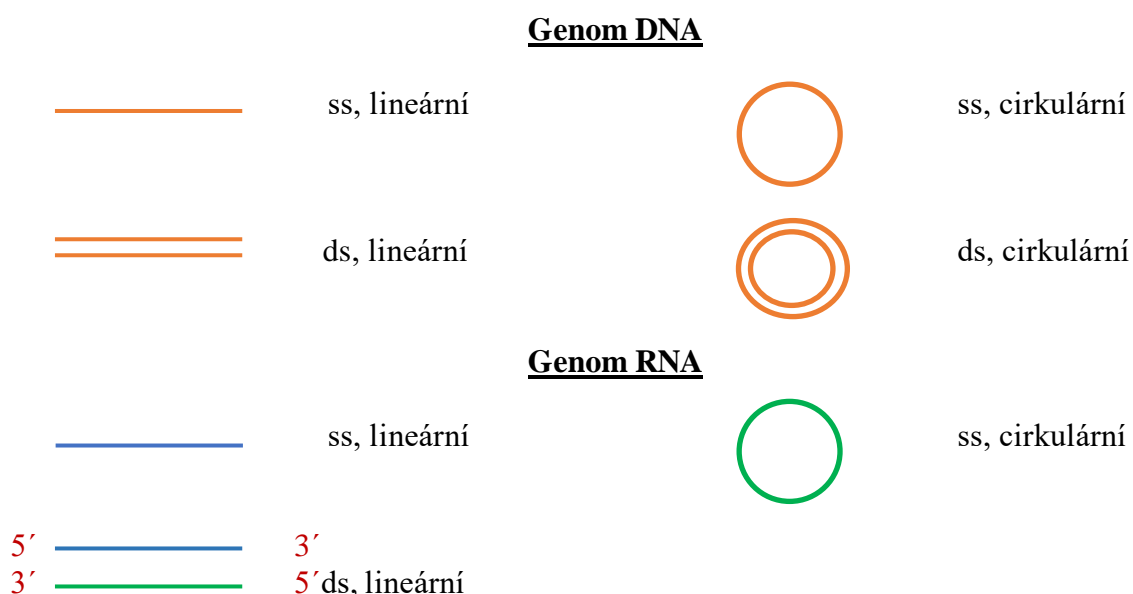
<b>I.ŘÁD: Společné vlastnosti mezi několika rodinami</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biochemické složení</li> <li>• Strategie replikace viru</li> <li>• Struktura částic (do jisté míry)</li> <li>• Obecná organizace genomu</li> </ul>
<b>II.ČELEĎ: Společné vlastnosti několika rodů</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biochemické složení</li> <li>• Strategie replikace viru</li> <li>• Druh struktury částic</li> <li>• Organizace genomu</li> </ul>
<b>III.PODČELEĎ: Společné vlastnosti několika rodů, ale používané pouze k řešení složitých hierarchických problémů</b>
<b>IV.ROD: Společné vlastnosti v rámci rodu</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strategie replikace viru</li> <li>• Velikost genomu, organizace segmentů, nebo jejich počet</li> <li>• Homologie sekvencí (hybridizační vlastnosti)</li> <li>• Vektorový přenos</li> </ul>
<b>V.DRUH: Společné vlastnosti v rámci druhu</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Přeskupení genomu</li> <li>• Homologie sekvencí</li> <li>• Sérologické vztahy</li> <li>• Vektorový přenos</li> <li>• Hostitelská oblast</li> <li>• Patogenita</li> <li>• Tkáňový tropismus</li> <li>• Geografické rozšíření</li> </ul>

### 3.2.2 Struktura viru

Virus je nebuněčný organismus, který parazituje na hostitelských buňkách a jeho životní cyklus je na nich zcela závislý. Mimo své hostitelské buňky viry přežívají jako virové částice (viriony). Viriony obsahují jednu nebo více molekul nukleové kyseliny. Jedná se buď o deoxyribonukleovou (DNA), nebo ribonukleovou (RNA) kyselinu (nikdy ne obě) a proteinovou strukturu známou jako kapsida. Kapsida je složena z jednotlivých proteinových makromolekul – kapsomer. V některých případech jsou virové částice umístěny do virového obalu, tvořeného fosfolipidovou membránou. Tyto druhy virů jsou nazývány jako obalené. Složení virového fosfolipidového obalu úzce souvisí s druhem buněčné membrány, ze které obal pochází. Neobalené viry mají pouze kapsidu chránící genom (Carter & Saunders 2007).

### 3.2.3 Struktura genomu a jeho velikost

Virové genomy rostlin mají nejčastěji (+) - vláknovou ssRNA (ss – single-stranded), někteří zástupci mají (-) - vláknovou ssRNA, dsRNA, dsDNA (ds – double-stranded), replikující se reverzní transkripcí a ssDNA genomy. U rostlinných virů nejsou známy dsDNA genomy, které by replikovaly DNA→DNA. Velikost samoreplikujících se virových genomů rostlin se pohybují v rozmezí od 2 kb do 19,3 kb, satelitní viry, které nejsou schopny samostatné replikace, mají velikost genomu asi 1 kb (Hull 2014). Strukturu virového genomu znázorňuje Obrázek 1.



**Obrázek 1:** Cirkulární a lineární virové genomy: ss – single-stranded (jednovláknové), ds – double-stranded (dvouvláknové). Nejsou známy žádné viry s cirkulární dsRNA.

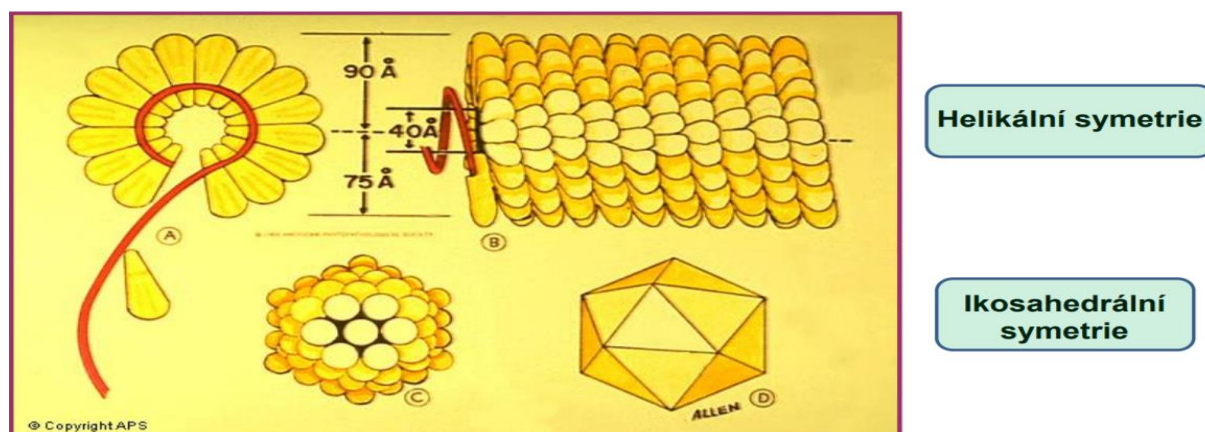
**Zdroj:** Upraveno podle Carter & Saunders (2007).

### 3.2.4 Virový protein

Nezbytnou součástí virionu jsou strukturální proteiny, jejichž množství koreluje s velikostí genomu. Tyto proteiny mají široký rozsah funkcí, mezi které patří například ochrana virového genomu, napojení virionového obalu na buněčnou membránu, nebo připevnění virionu k hostitelské buňce. Nestrukturální proteiny, které jsou virem syntetizované v infikované buňce, ale nejsou součástí virionu, zajišťují enzymatické reakce – proteázu, reverzní transkriptázu, primery pro replikaci nukleových kyselin, nebo rušení imunitní reakce hostitele (Carter & Saunders 2007).

### 3.2.5 Kapsida

Kapsida je složena z více molekul proteinů, které svým uspořádáním tvoří stabilní strukturu, jejímž úkolem je chránit virový genom. Nukleové kyseliny tvořící genom virové částice jsou velmi náchylné k chemickému, fyzikálnímu, nebo enzymatickému poškození a po opuštění hostitelské buňky jsou vystaveny riziku své inaktivace. Vnější povrch viru má schopnost rozpoznat hostitelskou buňku a navázat se na molekulu buněčného receptoru pomocí vazebného proteinu. Adheze kapsidy k hostitelské buňce umožňuje přenos infekce, kdy virový genom proniká do buněčné cytoplazmy, ve které je schopen replikace (Cann 2012). Podle prostorového uspořádání kapsidy jsou viry rozděleny do dvou strukturálních tříd na helikální a ikosahedrální (viz Obrázek 2). Helikální struktura je tvořena proteinovými podjednotkami, které se navzájem překrývají a jejich délku určuje délka nukleové kyseliny. U mnohých ssRNA virů tvoří protáhlou strukturu šroubovice opakující se kopie stejných druhů proteinů, jejichž vazby určují její pevnost. Ikosahedrální struktura je forma trojrozměrného uspořádání kapsidy, která je tvořena 20 stěnami rovnostranných trojúhelníků, 30 hranami a 12 vrcholy. Ikosahedron má dvoj, tří, nebo pětinasobné osy rotační symetrie. K vytvoření ikosahedronu jsou potřeba minimálně tři molekuly proteinů na plochu jednoho trojúhelníku a na celý ikosahedron 60 proteinových molekul. Takto pravidelný ikosahedron je velice stabilní struktura, díky rovnocennému spojení podjednotek (Carter & Saunders 2007).



**Obrázek 2:** Prostorová symetrie virových částic

**Zdroj:** [http://www.bioorganickachemiesite.upol.cz/site/wp-content/uploads/2014/10/KBCH\\_5\\_Antivirotika.pdf](http://www.bioorganickachemiesite.upol.cz/site/wp-content/uploads/2014/10/KBCH_5_Antivirotika.pdf)



### 3.2.6 Přenos viru

Virové infekce jsou výsledkem interakce mezi virem a hostitelem. V určitých případech virová infekce nemusí vést k onemocnění jedince a u malého procenta virových infekcí se neprojevují žádné symptomy. Základním předpokladem pro přenos viru je narušení integrity buněčné stěny a následné proniknutí virové částice dovnitř buňky. Díky pohybovým proteinům modifikujícím plazmodesmata, jsou viry schopny snadného transportu z buňky do buňky. Rostlinné viry mohou být přenášeny různými způsoby. U semen se jedná o jeho kontaminaci povrhu virovými částicemi, nebo infikované embryo. Nové rostliny nesoucí virové částice z infikovaného embrya tak ohrožují zdravotní stav dalších plodin. Velmi častým způsobem přenosu viru je vegetativní množení rostlin, kdy je nově získaný klon infikován použitým pracovním náradím při roubování, očkování. Různé druhy vektorů, jakými jsou bakterie, houby, roztoči, třásněnky, křísi, mšice, nebo brouci, přenášejí viry perzistentním, či neperzistentním způsobem a šíří je z rostliny na rostlinu. Tento typ přenosu virů je nebezpečný tím, že vektor s perzistentním způsobem přenosu může virové onemocnění rozšířit do velkých vzdáleností od místa primárního výskytu. Distribuci viru zajišťuje hmyz buď létáním, nebo tím, že je unášen větrnými proudy do vzdálenosti až několika stovek kilometrů. Dalším významným způsobem přenosu viru je mechanické poškození rostlinných pletiv, které je často používáno při experimentálním infikování rostlin. Tento druh přenosu je velice významný i jako přirozený způsob infekce. Virové částice mohou být přítomny v půdě a při mechanickém poškození pletiv rostlinu infikují. Přenos viru tímto způsobem je závislý na povětrnostních podmínkách, kdy je přenášen z půdy větrem prachovými částicemi, nebo deštěm, který vytváří bahnitou strukturu půdy a může rostlinu potřísnit kontaminovanými kapkami (Cann 2012).

### 3.2.7 Interakce viru a hostitele

Počátek virové infekce je způsoben vniknutím viru do rostlinné buňky. Absence receptorů na povrchu rostlinných buněk podmiňuje průnik viru do buňky narušením kutikuly způsobeným například bodavě-savým ústrojím hmyzu (Hemiptera-polokřídlí), nebo mechanickým poškozením. Po penetraci viru probíhá jeho replikace a šíření do okolních buněk skrz plazmodesmata. Viry nejsou schopny si zajistit vlastní metabolismus a mohou se rozmnožovat pouze v buňkách hostitele. Poslední fází vzniku virionu je biosyntéza proteinů bílkovinného obalu (kapsidy). Kompletní viriony se pak mohou šířit v rámci rostliny (cell to cell movement), nebo pomocí vektorů (vector – mediated transmission) do jiných pletiv (Rozák et al. 2019).

Adam (2005) ve své práci uvádí, že koncentrace a rozložení virových částic v různých částech ovocných stromů se liší i v souvislosti s ročním obdobím. Konkrétně zmiňuje tři období v roce, kdy je snížená koncentrace virových částic v rostlinných pletivech těžko detekovatelná například metodou DAS-ELISA. První z těchto období spadá na konec dubna, kdy jsou stromy odkvetlé a příliš malé listy neobsahují dostatečné množství virových částic. Druhé období je od druhé poloviny července do první poloviny srpna, kdy vysoké teploty způsobují pokles koncentrace viru, stejně jako nízké noční teploty na přelomu září a října ve třetím období.

### 3.3 Virus zakrslosti slivoně - *Prune dwarf virus* (PDV)

Virus zakrslosti slivoně byl poprvé popsán jako onemocnění švestky, ačkoliv jeho výskyt na tomto ovocném druhu je méně častý než u jiných druhů téhož rodu. Nejvíce postiženým druhem jsou višně a třešně, které v chronickém stádiu onemocnění vykazují symptomy projevující se žloutnutím listů. Vliv viru zakrslosti slivoně byl pozorován již roku 1768 ve Francii, kdy začal ovlivňovat výnos ovoce a o 70 let později se pak rozšířil do Anglie a Severní Ameriky. Na počátku 20. století se symptomatické projevy staly předmětem zájmu vědců. Zprvu bylo poškození přisuzováno zimním mrazům, ale Keitt a Clayton objevili, že symptomy nesouvisí s klimatickými podmínkami, ale s virovým onemocněním (Németh 1986). H. E. Thomas a E. M. Hildebrandt z Marylandského zemědělského ústavu ve Spojených státech amerických pak virus pojmenovali v roce 1936 (Jarošová 2009).

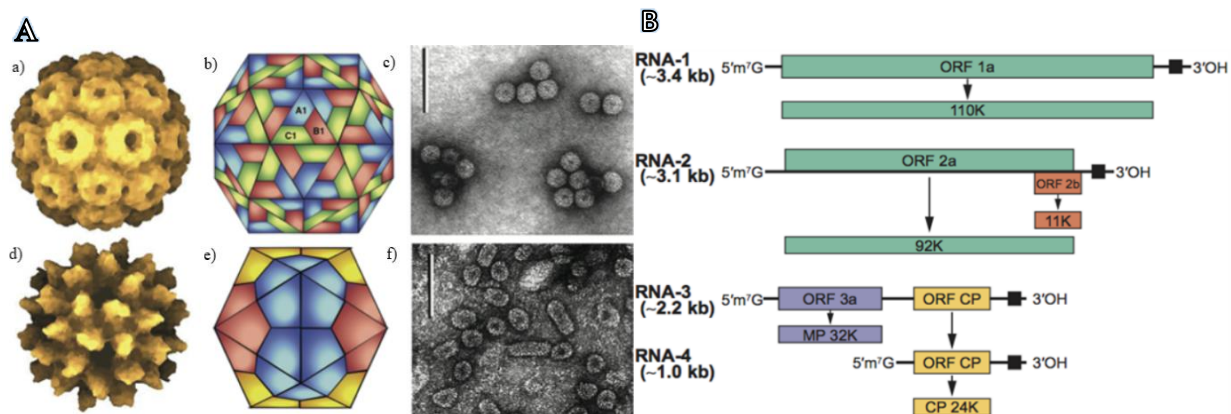
Virus zakrslosti slivoně (dále jen PDV) patří mezi ekonomicky významné viry peckovin. Rozsah poškození závisí nejen na ovocném druhu a odrůdě, ale i na kmenu viru (Németh 1986). PDV je přenosný vegetativním množením, mšicemi a u třešní, višni a mahalebek také pylem a semeny (Rozák et al. 2019). Nejčastěji jsou napadány třešně, višně, broskvoně a mandloně, výjimkami nejsou ani meruňky, trnky, myrobalány a slivoně. Patogenita je umocňována současným napadením příbuznými viry, jakými jsou například virus nekrotické kroužkovitosti slivoně (*Prunus necrotic ringspot virus* – PNRSV), virus mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus* – ApMV) z rodu *Ilavirus*, stejně tak i viry nepříbuznými jako je virus chlorotické skvrnitosti jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus* – ACLSV), virus šarky švestky (*Plum pox virus* – PPV) a virus svinutky třešně (*Cherry leafroll virus* – CLRV). Při současně probíhající infekci viru šarky švestky (PPV), nekrotické kroužkovitosti slivoně (PNRSV), zakrslosti slivoně (PDV) a jejich společném působení vzrůstá patogenita virů, jenž může mít pro hostitele letální následky (Jarošová 2009).

Virový genom PDV se skládá ze tří jednovláknových RNA s pozitivní polaritou (+ssRNA), přičemž každá RNA složka je jednotlivě balena do virových kapsid (Koziel et al. 2017). Nestrukturální protein, který se podílí na replikaci viru je kódován genomickými RNA1 a RNA2. Za přenos viru z buňky do buňky je zodpovědný polypeptid kódovaný RNA3 (pohybový protein – MP) nacházející se na 5' konci. RNA3 rovněž kóduje obalový protein (CP), který se nachází na 3' konci. Pohybový protein (MP) je podroben přímé translaci z RNA3, zatímco k translaci obalového proteinu (CP) dochází prostřednictvím subgenomické RNA4 (Rozák et al. 2019).

#### 3.3.1 Taxonomické zařazení viru zakrslosti slivoně (PDV)

Virus zakrslosti slivoně (PDV) je druhem patřícím do říše *Riboviria*, čeledi *Bromoviridae* a rodu *Ilavirus*. Čeleď *Bromoviridae* zahrnuje celkem šest rodů, které se dále dělí na více než 30 druhů. Řada virů z této čeledi obsahuje třísegmentové, jednovláknové RNA viry s pozitivní polaritou a velikostí genomu asi 8 kb. Sférické, nebo baciloformní viriony jsou přenášeny mechanicky, pylem, nebo neperzistentně hmyzími vektory. Rod *Ilavirus* je tvořen ikosahedrální (průměr 26-35 nm), nebo baciloformní strukturou o průměru 18-26 nm a délkou 30-85 nm, v závislosti na druhu viru (ICTV 2019). Schématické zobrazení virových částic a genomu čeledi

*Bromoviridae* představuje Obrázek 3 (talk.ictvonline.org). V roce 2016 bylo ve skupině virů rodu *Ilavirus* představeno ICTV nové systematické zařazení, které zobrazuje Tabulka 4.



**Obrázek 3:** A) Schematické a elektronové zobrazení virových částic čeledi *Bromoviridae*: a) Rekonstrukce částice *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) – *Bromovirus*, b), e) Schematické znázornění ikosahedrál ní částice, c) Snímek elektronového mikroskopu s kontrastem virových částic *Cucumber mosaic virus* (CMV) – *Cucumovirus*, d) Elektronová hustota částice *Alfalfa mosaic virus* (AMV) – *Alfamovirus*, f) Mikrograf s negativním kontrastem elektronů částic *Prune dwarf virus* (PDV) – *Ilavirus*. B) Schematická organizace genomu členů rodiny *Bromoviridae*

**Zdroj:** Upraveno podle [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/252/bromoviridae-figures](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/252/bromoviridae-figures)

**Tabulka 4:** Zástupci rodu *Ilavirus*

**Zdroj:** Upraveno podle [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/252/bromoviridae-figures](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/252/bromoviridae-figures)

<i>Ilavirus</i>	
<i>American plum line pattern virus</i>	APLPV
<i>Apple mosaic virus</i>	ApMV
<i>Asparagus virus 2</i>	AV-2
<i>Blackberry chlorotic ringspot virus</i>	BCRV
<i>Blueberry shock virus</i>	BIShV
<i>Citrus leaf rugose virus</i>	CiLRV
<i>Citrus variegation virus</i>	CCV
<i>Elm mottle virus</i>	EMoV
<i>Fragaria chilonensis latent virus</i>	FCILV
<i>Humulus japonicus latent virus</i>	HJLV
<i>Lilac leaf chlorosis virus</i>	LLCV
<i>Lilac ring mottle virus</i>	LiRMoV
<i>Parietaria mottle virus</i>	PMV
<i>Prune dwarf virus</i>	PDV
<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	PNRSV
<i>Spinach latent virus</i>	SpLV
<i>Strawberry necrotic shock virus</i>	SNSV
<i>Tobacco streak virus</i>	TSV
<i>Tulare apple mosaic virus</i>	TAMV

### 3.3.2 Symptomatické projevy

Vysoká variabilita symptomů viru zakrslosti slivoně je způsobena druhem hostitele, kmenem viru a teplotou. Jednotlivé kmeny viru tak mohou vyvolat různé projevy onemocnění na jednom stromě. Polymorfismus viru PDV byl zaznamenán asi na deseti druzích poruch, které se projeví především na stromech třešňí. Mezi tyto poruchy patří například chlorotická kroužkovitost, chloroticko-nekrotická kroužkovitost, žlutá mozaika, kroužkovitá skvrnitost, žloutenka višňí a další. PDV na rozdíl od převážně letálního PNRSV často způsobuje škodlivé léze, které jsou charakteristické v období května a června. Tyto léze je možné rozdělit do dvou skupin, podle jejich projevů. Na třešňích se jedná o chlorotické a nekrotické skvrny (viz Obrázek 4) na listech a u broskvoní a švestek o zakrslost (Desvignes et al. 1999). Příznaky infekce se mohou objevit v různých životních fázích stromu a jejich projev nemusí být v několika letech od nakažení vůbec zaznamenán. V některých případech se příznaky virózy objeví v prvním roce po nakažení dočasným žloutnutím listů, které se po krátké době vytratí a strom tak působí bezvirózním dojmem. Při infekci mladých a vitálních třešňí se symptomy projevují v různých částech stromu. U stromů, jenž byly napadeny jsou listy žlutozelené, zkroucené a v okolí hlavních žil zelené. Dalšími projevy infekce může být růst dlouhých vyholených větví, které připomínají vrbu a ztráta listů. U třešňí a višňí se po napadení virem mění morfologie listu. Zabarvení je normální, ale tvar listu bývá delší a užší než u viruprostého jedince. Není výjimkou, že projev symptomů může být omezen na určitou část stromu. Zasaženy bývají spodní části listové plochy, ohnisková místa, nebo jen jedna větev z celého stromu (Jarošová 2009).



**Obrázek 4:** Symptomatické projevy na listech třešňí způsobené PDV: **A)** chloróza středních a sekundárních žil; **B)** chlorotické kruhy a skvrny; **C)** mramorování a zvrásnění listů; **D)** nekrotické skvrny; **E)** chlorotické a nekrotické pruhy a skvrny; **F)** nekróza a praskání listové čepele.

**Zdroj:** Upraveno podle Kamenova et al. (2019).

## 4 Metodika

### 4.1 Cíl práce

Cílem této práce bylo ozdravení perspektivních hybridů třešni pomocí chemoterapie v *in vitro* podmínkách pomocí antivirotika ribavirinu. Pro ozdravování byly vybrány tři perspektivní genotypy třešni z pokusných výsadeb novošlechtění Výzkumného a šlechtitelského ústavu ovocnářského v Holovousích s.r.o. (dále jen VŠÚO), u nichž byla testováním metodou ELISA zjištěna přítomnost viru PDV.

### 4.2 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál pro ozdravování byl odebrán na počátku února 2018 ze tří perspektivních genotypů třešni, které svými vlastnostmi splňují veškeré předpoklady pro zařazení do šlechtitelského programu VŠÚO. U vybraných genotypů byl v laboratoři detekován pozitivní výsledek na PDV bez směsné infekce s ostatními viry. Vybrané genotypy zobrazuje Tabulka 5.

**Tabulka 5:** Vybrané genotypy třešni

**Zdroj:** Autorka

Označení genotypu	Matka	Otec
HL 13 590	'Kordia'	'Vic'
HL 16 703	('Kordia' × 'Starking Hardy Giant')	'Regina'
HL 10 100	'Van'	'Napoleonova'

#### 4.2.1 Odběr rostlinného materiálu

Pro založení nové třešňové kultury je nejvhodnější odběr rostlinného materiálu z dormantních výhonů v době vegetačního klidu, což je u třešni možné již počátkem prosince. K odběru byly zvoleny převážně jednoleté výhony s dostatečným množstvím listových pupenů. Výhony s květními pupeny nejsou zcela vhodné z důvodu malého množství diferencovaných růstových vrcholů. Výchozí rostlinný materiál byl odebrán ze čtyř světových stran koruny stromu vybraných genotypů třešni a testován v akreditované laboratoři VŠÚO na přítomnost viru zakrslosti slivoně (PDV) a viru nekrotické kroužkovitosti slivoně (PNRSV) metodou ELISA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay).

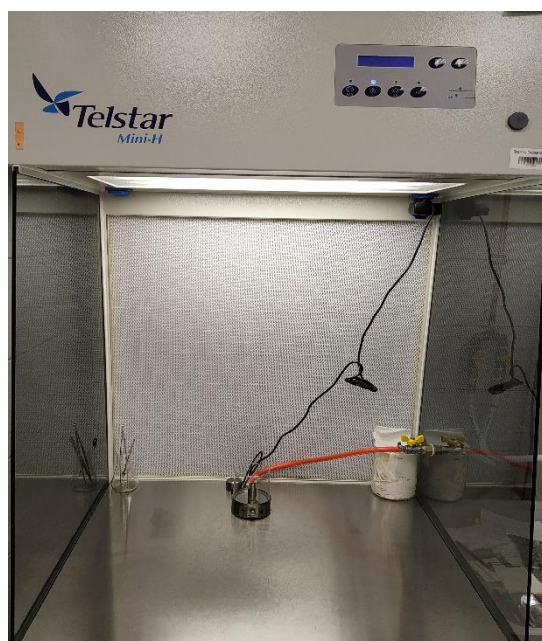
#### 4.2.2 Příprava rostlinného materiálu pro založení *in vitro* kultury

Odebrané výhony byly před dalším postupem promyty pod tekoucí čistou vodou, z důvodu eliminace mikroflóry, která na rostlinách přežívá ve venkovním prostředí. Takto ošetřené výhony byly ve spodní části šikmo seříznuty, umístěny do vhodné nádoby s čistou vodou a ponechány při běžné pokojové teplotě 2 až 3 týdny rašit. Během tohoto období probíhala průběžná kontrola stavu vody v nádobách, popřípadě její výměna, a výhony byly

s ohledem na jejich stav ve spodní části opětovně seříznuty. Po narašení listových pupenů byly odebrány primární explantáty vhodné pro založení nové *in vitro* kultury. V certifikované metodice VŠÚO Holovousy (Paprštein et al. 2017) je uvedeno, že *in vitro* kulturu je vhodné zakládat z růstových vrcholů větších než 0,2 mm, Ružic & Vujović (2008) uvádějí 0,5 mm, z důvodu uchování genetické stability.

#### 4.2.3 Příprava pracovního prostředí a pomůcek před nasazováním primárního explantátu

Před vlastním odebíráním primárních rostlinných explantátů je velice důležitá dezinfekce všech pracovních pomůcek a ploch používaných při zakládání nové *in vitro* kultury, aby se zamezilo její případné kontaminaci. Pracovní pomůcky (Petriho misky, skalpely a pinzety) byly po základním umytí v teplé vodě se saponátem a opláchnutí destilovanou vodou umístěny do horkovzdušné sušárny, kde proběhla sterilizace při 160 °C po dobu 180 minut. Sterilita pracovního prostředí byla zajištěna pomocí laminárního boxu (flow boxu), ve kterém proudí vzduch přes HEPA filtry a tím udržuje vnitřní prostor bez nežádoucích mikroorganismů (viz Obrázek 5).



**Obrázek 5:** Laminární boxy (Flow box)

**Zdroj:** Autorka

Vnitřní plocha laminárního boxu byla před začátkem prací vydezinfikována prostředkem s baktericidním, fungicidním a virucidním účinkem (Incidur), používaným v medicínské praxi a vysvícena UV zářením po dobu 30 minut. Pro průběžnou dezinfekci ploch a náradí byl použit 70 až 90% ethanol. Před započítím prací byly skalpely, pinzety a Petriho misky opáleny nad plynovým kahanem. Po celou dobu prací s rostlinným materiálem je nezbytně nutné zajistit sterilní prostředí uvnitř laminárního boxu, včetně dezinfekce rukou a pracovního náčiní. Připravené kultivační médium bylo ošetřeno v autoklávu při teplotě 120 °C a tlaku 100 kPa po dobu 25 minut.

#### 4.2.4 Složení kultivačního a antivirotického média

Pro nasazení a multiplikaci primárních explantátů bylo použito MS médium podle Murashige and Skoog (1962) s upraveným množstvím vitamínů, cukrů a fytohormonů (cytokininů). Na základě výsledků metodiky VŠÚO Holovousy (Paprštein et al. 2017) a poznatků Mansseri-Lamroui et al. (2011), bylo základní médium obohaceno o 6- benzylaminopurin (BAP) v koncentraci 4 mg.l<sup>-1</sup>, na kterém dosahovala multiplikace nejlepších výsledků. Pro ozdravování bylo použito základní MS médium s přidavkem antivirotika ribavirinu v koncentracích 40 a 80 mg.l<sup>-1</sup>. Ribavirin je preparát s virostatickými účinky, které zabraňují množení viru. Z chemického hlediska je definován jako 1-beta-D-ribofuranosyl-1-2-4-triazolecarboxamid a svým složením je podoben sacharidu D-ribose, ze kterého je odvozen (Sedlák & Paprštein 2017). Jedná se o systémové antivirotikum rozpustné ve vodě, založené na syntetickém analogu nukleosidu působícím proti některým RNA a DNA virům (<http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/ribavirin>), které má svůj původ v humánní medicíně jako lék na virová respirační onemocnění (Sedlák & Paprštein 2017). Antivirotikum lze ke kultivačnímu médiu do Erlenmeyerových baněk přidat až po sterilizaci v autoklávu pomocí mikrofiltrů s antibakteriální úpravou. Modifikované MS medium zobrazuje Tabulka 6.

**Tabulka 6:** Složení modifikovaného MS média. Prvky jsou uvedeny v mg na 1 litr média.  
**Zdroj:** Upraveno podle VŠÚO Holovousy.

Složka	mg.l <sup>-1</sup>	Složka	mg.l <sup>-1</sup>	Složka	mg.l <sup>-1</sup>
<b>Makroprvky</b>		<b>Mikroprvky</b>		<b>Vitamíny</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>	1650	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	Thiamin	0,1
KNO <sub>3</sub>	1900	KI	0,83	Pyridoxin	0,5
CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	440	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	Kyselina nikotinová	0,5
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	370	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	Myo-inositol	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8		
				<b>Ostatní v mg.l<sup>-1</sup></b>	
		MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	Glycin	2
		Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	37,3	Sacharóza	30000
		ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	Agar	7000
				BAP	1,5
				pH	5,8

#### 4.2.5 Založení *in vitro* kultury a podmínky kultivace

Narašené listové pupeny byly z jednoletých výhonů vypreparovány pomocí skalpelu s vyměnitelnou čepelí, zbaveny obalových šupin, seříznuty v bazální a listové části, přeneseny do laminárního boxu a dezinfikovány (viz Obrázek 6). K dezinfekci byl použit chlorid rtuťnatý ( $\text{HgCl}_2$ ) na základě poznatků Cieslinska (2007), Hossini et al. (2010), Paprštein et al. (2017) v 15% koncentraci s přídavkem smáčedla (Jar) po dobu jedné minuty. Po dezinfekci byly explantáty propláchnuty ve sterilní destilované vodě s kapkou smáčedla a osušeny na sterilní buničité vatě. Takto ošetřené axilární pupeny byly umístěny po jedné do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml, s obsahem 25 ml kultivačního média, uzavřeny hliníkovou fólií opálenou nad plynovým kahanem a přeneseny do kultivační místnosti. Kultivační místnost je vybavena posuvnými regály se skleněnými policemi podsvícenými zářivkami a stabilním světelným (16 hodin světlo a 8 hodin tma), a teplotním režimem ( $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ). Kultivační místnost zobrazuje Obrázek 7.



**Obrázek 6:** a) Axilární pupen před dezinfekcí, b) Primární explantát

**Foto:** Autorka



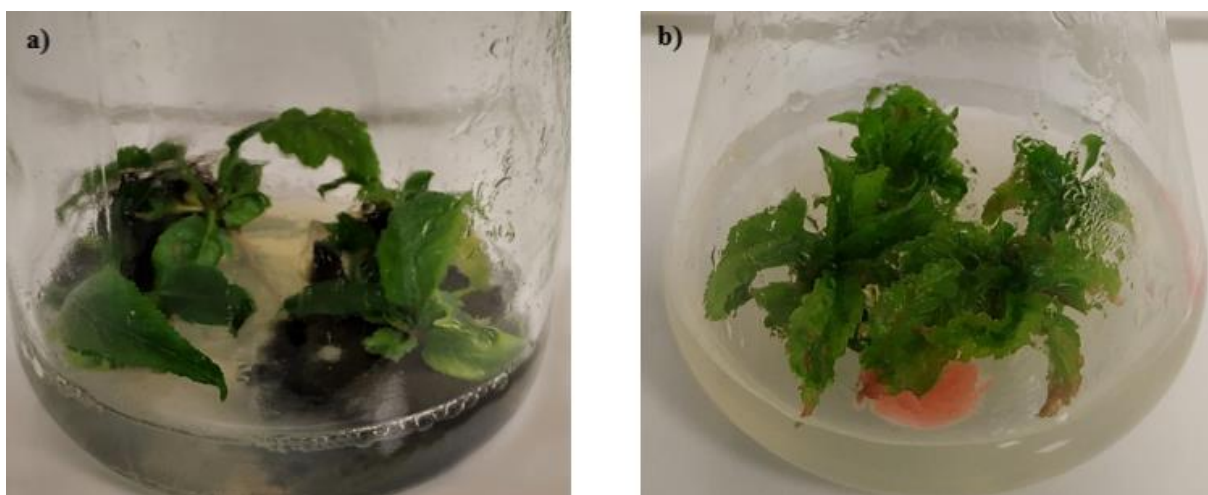
**Obrázek 7:** Kultivační místnost

**Foto:** Autorka



#### 4.2.6 Množení rostlinného materiálu v *in vitro* kultuře

Rozmnožení původního rostlinného materiálu bylo klíčovým faktorem pro budoucí chemoterapii. Dostatečné množství rostlin bylo zajištěno mikropropagací výchozích primárních explantátů na modifikovaném MS médiu s přidáním fytohormonů. Po 30 dnech na médiu MS se 4 mg.l<sup>-1</sup> BAP se zvýšil nárůst aktivní hmoty a rostliny mohly být opětovně subkultivovány. Pro další multiplikaci byly použity růstové vrcholy s meristematickými pletivy a nasazeny na nové kultivační médium (Sedlák & Paprštejn 2017). Množení jednotlivých genotypů bylo pravděpodobně ovlivněno rodičovskými kombinacemi, což se projevilo rozdílným počtem prýtů vyrůstajících z axilárních pupenů a jejich vitalitou. Během kultivace se u části multiplikovaných jedinců projevila mikrobiální kontaminace (viz Obrázek 8). Takto kontaminované rostliny byly v neotevřených Erlenmeyerových baňkách znehodnoceny v autoklávu.



**Obrázek 8:** Kontaminované explantáty: a) plíseň, b) kvasinka

**Foto:** Autorka

### 4.3 Chemoterapie

K chemoterapii byly použity namnožené výhonky vybraných třešňových genotypů a jako účinná látka širokospektrální antivirový nukleosid ribavirin v koncentraci 40 a 80 mg.l<sup>-1</sup>. Ciešlínska (2007), Sedlák & Paprštejn (2017) a Sedlák et al. (2019) uvádějí, že při koncentracích nad 40 mg.l<sup>-1</sup> vzniká velké riziko fytotoxicity, Hauptmanová & Polák (2011) uvádějí koncentrace 60 mg.l<sup>-1</sup> a vyšší. Z primárních explantátů byly po multiplikaci odebrány vrcholové části obsahující meristematická pletiva, seříznuty na velikost 0,5 – 1 cm a ponořeny celou svou plochou do Erlenmeyerových baňek s antivirotikem, kde byly ponechány po dobu čtyř týdnů. Během této doby se u některých klonů projevily známky fytotoxicity a rostliny uhynuly (viz Obrázek 9). Po čtyřech týdnech byly rostliny subkultivovány na modifikované MS médium s 1,5 mg.l<sup>-1</sup> BAP, kde byly z důvodu regenerace ponechány dalších třicet dní. V regenerační fázi pokusu došlo k úhynu dalších meriklonů následkem fytotoxicity, která se projevila různým stupněm intenzity. Významné rozdíly byly viditelné i v mezidruhovém porovnání jednotlivých genotypů.



**Obrázek 9:** Projevy fytotoxicity po 4 týdnech na antivirotickém médiu

**Foto:** Autorka

## 5 Výsledky

Na základě pozitivních výsledků testů metodou ELISA, které prokázaly přítomnost viru PDV, byly vybrány tři perspektivní genotypy třešní. Virus byl v rostlinách detekován samostatně, bez přítomnosti dalších virových patogenů a v různých koncentracích. Vzorky byly odebrány ze čtyř světových stran stromu a testovány z narašených listových pupenů. Během mikropropagace bylo zajištěno dostatečné množství rostlinného materiálu vhodného k ozdravování. Před vlastní chemoterapií byly vybrané rostliny přetestovány metodou ELISA na přítomnost viru PDV s pozitivními výsledky.

### 5.1 Mikropropagace před ozdravováním

K mikropropagaci byly použity narašené axilární pupeny dezinfikované v 0,15%  $\text{HgCl}_2$  s přidáním smáčedla (Jar) po dobu jedné minuty. Tento způsob dezinfekce jako účinnou variantu uvádí Cieslinska (2007), Mansseri-Lamrioui et al. (2011) a Paprštejn et al. (2017). Hossini et al. (2010) poukazuje na nevhodnost použití chlornanu draselného a vápenatého z důvodu vysoké kontaminace. Na základě poznatků Manseri-Lamrioui et al. (2011) a Paprštejn et al. (2017) bylo použito modifikované médium MS s přidavkem  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP, které vykazovalo nejlepší výsledky multiplikace vlivem působení cytokininů na růstové vrcholy. Během mikropropagace byly u jednotlivých genotypů třešní pozorovány rozdíly v růstu a multiplikaci primárních explantátů. U genotypu HL 10 100 ('Van' × 'Napoleonova') bylo velmi obtížné zajistit dostatečné množství rostlinného materiálu potřebného pro chemoterapii. U primárních explantátů tohoto genotypu se netvořila stabilní meristematická pletiva a při první subkultivaci se většina nasazených pupenů rozpadla. Přeživší explantáty vykazovaly omezenou schopnost multiplikace, což mohl způsobit rozdílný metabolismus cytokininů a auxinů v rostlinném pletivu (Paprštejn et al. 2017) a z toho důvodu byl k ozdravování použit menší počet rostlin. Během prvních tří měsíců od založení *in vitro* kultury se počet životaschopných jedinců stabilizoval a explantáty se začaly multiplikovat. V následujících šesti měsících se podařilo po fázi multiplikace zajistit dostatečné množství rostlinného materiálu u všech tří genotypů, které bylo možné použít pro chemoterapii.

Rostliny vykazovaly kvalitní olistění s charakteristickou barvou a dobře prorůstající prýty, což bylo základním předpokladem pro zvládnutí stresu během chemoterapie ale i po ní, ve fázi regenerace. Průběh multiplikace a počet rostlin u jednotlivých genotypů vhodných pro chemoterapii zobrazuje Tabulka číslo 7.

**Tabulka 7:** Průběh multiplikace u jednotlivých genotypů

Označení genotypu	Matka	Otec	Nasazeno pupenů (ks)	Počet rostoucích po 30 dnech (ks)	Počet rostoucích po 90 dnech (ks)	Počet rostoucích po 180 dnech (ks)
HL 13 590	'Kordia'	'Vic'	39	22	12	38
HL 16 703	('Kordia' × 'Starking Hardy Giant')	'Regina'	49	18	16	52
HL 10 100	'Van'	'Napoleonova'	14	12	5	16

## 5.2 Chemoterapie

Chemoterapie je pro rostliny velice stresujícím faktorem a při vyšších koncentracích antivirotika se mohou projevit fyto toxické reakce jakými jsou nekrózy růstových vrcholů, chlorózy, kadeření a kroucení listů a následný úhyn rostliny.

### 5.2.1 Přežití explantátů

U žádného genotypu se nepodařilo zachovat původní počet rostlin, jaký byl před ozdravováním, bez ohledu na koncentraci použitého antivirotika. Počet meriklonů, které přežily chemoterapii při koncentraci 40 mg.l<sup>-1</sup> ribavirinu po dobu třiceti dnů se u jednotlivých genotypů lišil. Vzorek HL 13 590 ('Kordia' × 'Vic') se projevil jako stabilní během chemoterapie i po ní. Ztráta rostlinného materiálu činila 30 %. Oproti ostatním genotypům nedošlo při nižší koncentraci antivirotika u tohoto vzorku k úhynu rostlin během regenerační fáze. U vzorku HL 10 100 ('Van' × 'Napoleonova') se projevíly známky fyto toxicity až v regenerační fázi, kdy došlo k úhynu 33,3 % meriklonů. Největší ztráty byly zaznamenány u vzorku HL 16 703 [('Kordia' × 'Starking Hardy Giant') × 'Regina'], kdy po chemoterapii rostlo 50 % meriklonů a po regenerační fázi pouze 25 %.

U koncentrace ribavirinu 80 mg.l<sup>-1</sup> byl největší úhyn rostlin zaznamenán až ve fázi regenerace, kdy přežilo z celkového množství nasazených rostlin pouze 5,3 % ze všech tří genotypů. Ve srovnání mezi oběma fázemi se fyto toxicita ve větší míře projevila až během regenerace na kultivačním médiu MS s 1,5 mg.l<sup>-1</sup> BAP. Vzorek HL 10 100 ('Van' × 'Napoleonova') vykazoval nejvyšší míru fyto toxicity po regenerační fázi a všechny rostliny uhynuly. Nejlépe snášel chemoterapii vzorek HL 16 703 [('Kordia' × 'Starking Hardy Giant') × 'Regina'], u kterého po třiceti dnech léčby přežilo 62 % meriklonů, následoval vzorek HL 10 100 (Van × Napoleonova) se 60 % a nejméně tolerantní k chemoterapii byl vzorek HL 13 590 ('Kordia' × 'Vic'), u kterého přežilo pouze 33,3 % meriklonů (viz Tabulka 8).

**Tabulka 8:** Průběh chemoterapie a počet testovaných rostlin

Genotyp	Počet meriklonů 40 mg.l <sup>-1</sup>	Roste po chemoterapii (ks)	Roste po chemoterapii (%)	Roste po regeneraci (ks)	Roste po regeneraci (%)	Testováno (ks)
HL 13 590	20	14	70,0	14	70,0	14
HL 16 703	24	12	50,0	6	25,0	6
HL 10 100	6	6	100,0	4	66,7	4
Genotyp	Počet meriklonů 80 mg.l <sup>-1</sup>	Roste po chemoterapii (ks)	Roste po chemoterapii (%)	Roste po regeneraci (ks)	Roste po regeneraci (%)	Testováno (ks)
HL 13 590	12	4	33,3	1	8,0	1
HL 16 703	21	13	62,0	1	4,8	1
HL 10 100	5	3	60,0	0	x	x

Ze statistického hlediska jsou u jednotlivých genotypů patrné rozdíly mezi použitými koncentracemi antivirotika a reakcí ozdravovaných rostlin na regenerační fázi. Výsledky  $\chi^2$  testu (chí-kvadrát) ukazují spojitost mezi koncentracemi antivirotika a přežitím ozdravovaných rostlin. Současně jsou též patrné rozdíly v reakci na chemoterapii v obou fázích, shodujících se s výsledky Hauptmanová & Polák (2011), kteří uvádějí, že fytoxicita se projevuje až při koncentraci antivirotika 60 mg.l<sup>-1</sup> a vyšší. Z výsledků  $\chi^2$  testu je zřejmé, že u jednotlivých genotypů s ohledem na počet přeživších rostlin, je výhodnější použití koncentrace 40 mg.l<sup>-1</sup>. Další viditelný rozdíl je mezi jednotlivými genotypy reagujícími na chemoterapii a jejich odolnost vůči antivirotiku, což je v souladu s výsledky Paunovic et al. (2007) a Sedlák & Paprštejn (2017). Genotyp HL 13 590 ('Kordia' × 'Vic') prokazatelně reagoval na chemoterapii i regenerační fázi úhynem rostlin, z čehož vyplývá jeho citlivost na vyšší koncentraci použitého antivirotika. Zajímavý je také fakt, že 2/3 genotypů reagovaly na celkový průběh chemoterapie až ve fázi regenerace. Výsledky  $\chi^2$  testu po chemoterapii a po regeneraci zobrazují Tabulky 9 a 10. Očekávané četnosti  $E_i$  (tj. zastoupení odumřelých a životaschopných rostlin v jednotlivých kategoriích očekávané v případě platnosti nulové hypotézy) se určí jako  $E_i = (\text{celkový počet odumřelých rostlin v obou variantách} \times \text{celkový počet odumřelých i životaschopných rostlin v jedné variantě}) / \text{celkový počet odumřelých i životaschopných rostlin v obou variantách}$ .

**Tabulka 9:** Výsledky  $\chi^2$  testu po chemoterapii

Zdroj: Autorka

PO CHEMOTERAPII							
HL 13 590	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem	Očekávané četnosti	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem
Odumřelé	6	8	14	Odumřelé	8,75	5,25	14
Životaschopné	14	4	18	Životaschopné	11,25	6,75	18
Celkem	20	12	32		20	12	
p =	0,04295037	p-value<0.05					

HL 16 703	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem	Očekávané četnosti	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem
Odumřelé	12	8	20	Odumřelé	10,6666667	9,33333333	20
Životaschopné	12	13	25	Životaschopné	13,33333333	11,66666667	25
Celkem	24	21	45		24	21	
p =	0,42267807	p-value>0.05					

HL 10 100	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem	Očekávané četnosti	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem
Odumřelé	0	2	2	Odumřelé	1,09090909	0,90909091	2
Životaschopné	6	3	9	Životaschopné	4,90909091	4,09090909	9
Celkem	6	5	11		6	5	
p =	0,08676817	p-value>0.05					

p-value – kritická hodnota;  $p > 0,05$  není žádná spojitost mezi hodnotami, tzn. platí nulová hypotéza;  $p < 0,05$  existuje spojitost mezi porovnávanými hodnotami, tzn. potvrzení alternativní hypotézy.

**Tabulka 10:** Výsledky  $\chi^2$  testu po regeneraci

Zdroj: Autorka

PO REGENERACI							
HL 13 590	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem	Očekávané četnosti	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem
Odumřelé	6	11	17	Odumřelé	10,625	6,375	17
Životaschopné	14	1	15	Životaschopné	9,375	5,625	15
Celkem	20	12	32		20	12	
p =	0,000714	p-value<0.05					

HL 16 703	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem	Očekávané četnosti	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem
Odumřelé	18	20	38	Odumřelé	20,26667	17,73333	38
Životaschopné	6	1	7	Životaschopné	3,733333	3,266667	7
Celkem	24	21	45		24	21	
p =	0,061658	p-value>0.05					

HL 10 100	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem	Očekávané četnosti	40 mg.l <sup>-1</sup>	80 mg.l <sup>-1</sup>	Celkem
Odumřelé	2	5	7	Odumřelé	3,818182	3,181818	7
Životaschopné	4	0	4	Životaschopné	2,181818	1,818182	4
Celkem	6	5	11		6	5	
p =	0,022097	p-value<0.05					

## 5.2.2 Eliminace virů

Pro vyhodnocení výsledků eliminace viru PDV pomocí chemoterapie byla použita metoda testování ELISA. Přeživší meriklony byly testovány po šedesáti dnech. Prvních třicet dnů probíhala vlastní chemoterapie na modifikovaném kultivačním MS médiu s ribavirinem v koncentracích 40 a 80 mg.l<sup>-1</sup>. Další čtyři týdny pak probíhala fáze regenerace na MS s 1,5 mg.l<sup>-1</sup> BAP. Výsledky testů prokázaly 100% úspěšnost léčby u genotypu HL 13 590 ('Kordia' × 'Vic') a HL 10 100 ('Van' × 'Napoleonova'). Genotyp HL 16 703 [('Kordia' × 'Starking Hardy Giant') × 'Regina'] se podařilo ozdravit z 83 % u nižší koncentrace ribavirinu. U koncentrace ribavirinu 80 mg.l<sup>-1</sup> byla úspěšnost 100%. Vzorek HL 16 703 12R40 ve výsledku testu vyšel jako PP (potencionálně pozitivní). Výsledky testů zobrazuje Tabulka 11.

**Tabulka 11:** Výsledky testování genotypů třešně

Zdroj: Autorka

Meriklon	Výsledky testů po chemoterapii 40 mg.l <sup>-1</sup>	Meriklon	Výsledky testů po chemoterapii 80 mg.l <sup>-1</sup>
HL 13 590 1R40	negativní	HL 13 590 12R80	negativní
HL 13 590 2R40	negativní		
HL 13 590 3R40	negativní		
HL 13 590 5R40	negativní		
HL 13 590 6R40	negativní		
HL 13 590 7R40	negativní		
HL 13 590 8R40	negativní		
HL 13 590 9R40	negativní		
HL 13 590 10R40	negativní		
HL 13 590 11R40	negativní		
HL 13 590 12R40	negativní		
HL 13 590 13R40	negativní		
HL 13 590 14R40	negativní		
HL 13 590 16R40	negativní		
Meriklon	Výsledky testů po chemoterapii 40 mg.l <sup>-1</sup>	Meriklon	Výsledky testů po chemoterapii 80 mg.l <sup>-1</sup>
HL 16 703 5R40	negativní	HL 16 703 15R80	negativní
HL 16 703 6R40	negativní		
HL 16 703 9R40	negativní		
HL 16 703 10R40	negativní		
HL 16 703 12R40	PP		
HL 16 703 13R40	negativní		
Meriklon	Výsledky testů po chemoterapii 40 mg.l <sup>-1</sup>		
HL 10 100 1R40	negativní		
HL 10 100 2R40	negativní		
HL 10 100 4R40	negativní		
HL 10 100 5R40	negativní		

[PP] = potencionálně pozitivní

## 6 Diskuse

Úspěšnost založení aseptické *in vitro* kultury závisí nejen na složení kultivačního média, obsahu cytokininů, dezinfekci primárního explantátu, ale i jeho původu. Ďurkovič (2005), Cieslinska (2007) a Hossini et al. (2010) se shodují v úspěšnosti dezinfekce primárních explantátů chloridem rtuťnatým ( $\text{HgCl}_2$ ). Rozmezí koncentrace tito autoři uvádějí 0,1- 0,2%  $\text{HgCl}_2$ , což koresponduje s výsledky dezinfekce v této práci, kdy byla použita 15% koncentrace této látky. Délka aplikace se ve srovnání s výše uvedenými autory liší. K eliminaci kontaminace při zakládání aseptické *in vitro* kultury bylo dostačující působení chloridu rtuťnatého po dobu jedné minuty, což je v souladu s výsledky Paprštejn et al. (2017).

Primární explantáty všech tří genotypů třešní byly nasazeny na modifikované kultivační médium MS s přídatkem  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP. Ďurkovič (2006) poukazuje na rozdíly v multiplikaci v souvislosti s použitým druhem fytohormonů, jejich koncentrací, ale i odlišnými genotypy. Manseri-Lamrioui et al. (2011) porovnával ve své práci účinky tří druhů cytokininů: BAP (6- benzylaminopurin), 2iP (2-isopentenyladenin) a Kin (kinetin). Z jeho výsledků je zřejmé, že u BAP se projeví nejlepší výsledky nejen u multiplikace, ale i u kvality explantátů. Jako nejvýhodnější uvádí koncentraci  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP. Axilární pupeny se v průměru objevovaly častěji u koncentrace 2 a  $4 \text{ mg.l}^{-1}$  BAP. Manseri-Lamrioui et al. (2011) se ve svých výsledcích shoduje s Ďurkovič (2006). Podle této práce je působení cytokininů ovlivněno nejen genotypem, ale i druhem explantátu. Rozdíly v růstu a multiplikaci jednotlivých genotypů se projeví i během mé práce. Genotyp HL 10 100 ('Van' × 'Napoleonova') vykazoval nejmenší počet životaschopných jedinců. Primární explantáty tohoto genotypu byly slabé, netvořily růstové vrcholy a během prvních třech subkultivací se rozpadaly. Explantáty, které přežily, tvořily minimální počet růstových vrcholů, vyvinutých z axilárních pupenů, potřebných k multiplikaci.

K ozdravování vybraných genotypů třešní bylo použito antivirotikum ribavirin ve dvou rozdílných koncentracích. Cieslinska (2007) a Sedlák & Paprštejn (2017) se shodují v závěru, že citlivost rostlin na léčbu ribavirinem může způsobovat projevy fytoxicity s ohledem na výši použité koncentrace antivirotika. Genotypově specifické rozdíly v reakci na chemoterapii, se podle jejich výsledků projevují nejen u zástupců jednoho rodu, druhu, ale i napříč čeledí růžovitých. Koncentrace antivirotika 40 a  $80 \text{ mg.l}^{-1}$  byla v této práci zvolena na základě poznatků Paprštejn et al. (2013), z nichž vyplývá, že nízká koncentrace ( $20 \text{ mg.l}^{-1}$ ) ribavirinu může být v některých případech při ozdravování jabloní příliš nízká. Ke stejnému výsledku ve své práci došel i Paunovic et al. (2007) u slivoní a Sedlák et al. (2019) u jahodníků. Všichni výše uvedení autoři se též shodují na tom, že úspěšnost eliminace virů použitím ribavirinu závisí nejen na druhu rostliny, viru, jeho kmenu a koncentraci virových částic v rostlině, ale i na případné směsné infekci.

Při léčbě vybraných genotypů v této práci se fytoxicita projevila u obou zvolených koncentrací, což je v souladu s výsledky, které uvádí Cieslinska (2007) a Sedlák & Paprštejn (2017). Paunovic et al. (2007) uvádí charakteristické projevy fytoxicity až u koncentrace  $80 \text{ mg.l}^{-1}$  a vyšší. Rozdílné reakce na chemoterapii se projeví i u jednotlivých genotypů použitých v této práci. U koncentrace  $40 \text{ mg.l}^{-1}$  nejlépe chemoterapii snášel genotyp HL 13 590 ('Kordia' × 'Vic'), u kterého se po chemoterapii a regenerační fázi podařilo udržet stejný počet rostlin. U genotypu HL 10 100 ('Van' × 'Napoleonova'), který vykazoval nejmenší schopnost

multiplikace, se reakce na chemoterapii projevila až ve fázi regenerace, kdy počet meriklonů klesl o 33,3 %. Nejnižší tolerance k chemoterapii byla zaznamenána u genotypu HL 16 703 [(‘Kordia’ × ‘Starking Hardy Giant’) × ‘Regina’], kdy po regenerační fázi rostlo pouze 25 % meriklonů. Projevy fytoxicity u koncentrace 80 mg.l<sup>-1</sup> byly v nejvyšší míře zaznamenány až ve fázi regenerace, kdy od genotypu HL 13 590 (‘Kordia’ × ‘Vic’) a HL 16 703 [(‘Kordia’ × ‘Starking Hardy Giant’) × ‘Regina’] přežil pouze jeden meriklon. Pro genotyp HL 10 100 (‘Van’ × ‘Napoleonova’) měla chemoterapie letální následky, čímž se potvrzují výsledky uvedené v práci Paunovic et al. (2007).

## 7 Závěr

V současné době je metoda *in vitro* mikropropagace využívána mnohými vědeckými pracovišti v oblasti různých výzkumných projektů. V přirozených podmínkách trvalých kultur je těžké udržet bezvirózní jedince v širokém spektru ovocných plodin. Tyto kultury jsou napadány různými druhy ať už jednotlivých, nebo směsných virových infekcí, což způsobuje snížení výnosu a jejich vitality. Zdravý výchozí pěstební materiál je klíčovým prvkem pro dnešní školkařství a ovocnářství (Paprštein et al. 2017).

V této práci bylo primárním cílem ozdravit perspektivní genotypy třešní pomocí chemoterapie a tím zajistit viruprosté rostliny pro budoucí šlechtitelské účely. Výsledky pokusu potvrdily hypotézu, že pomocí chemoterapie s použitím nukleosidového antivirotika ribavirinu lze úspěšně z meristémů třešní zcela odstranit virové částice, což bylo prokázáno i testováním metodou ELISA.

Od prvotního nasazení primárních explantátů byly patrné výrazné rozdíly v jejich růstu, míře multiplikace i reakci na chemoterapii. Během realizace projektu se projevil vliv kultivačních médií a koncentrace fytohormonů na celkovou vitalitu a životaschopnost primárních explantátů. Z této skutečnosti vyplývá, že složení kultivačního média, koncentrace a druh použitých fytohormonů je důležité přizpůsobit specifickým potřebám konkrétních genotypů. Každý jednotlivý genotyp však reaguje na složení kultivačního média rozdílným způsobem a najít ideální koncentraci cytokininů je vzhledem k vysokému množství rodičovských kombinací velice obtížné.

Stejně tak, jak odlišně reagovaly explantáty na složení kultivačního média, projevíly se i různé reakce po aplikaci antivirotika. Průběh a konečné výstupy chemoterapie vykazovaly rozdílnou citlivost jednotlivých genotypů k nukleosidovému antiviroviku i různé stupně fytoxicity. Získané výsledky v projektu ozdravování *in vitro* kultur a eliminace viru PDV, tak otevírají širokou škálu dalších variant pro navazující výzkum v této oblasti. Ať už by se jednalo o složení kultivačních médií a koncentrací cytokininů pro základní založení *in vitro* kultury s ohledem na jednotlivé genotypy a ovocné druhy, nebo použití antivirotik s rozdílnou koncentrací chemoterapeutické látky a doby, po kterou by byly explantáty na médiu udržovány. Souběžně s touto prací probíhá pokus, ve kterém byly explantáty z vybraného genotypu třešně s dobrými multiplikačními i růstovými vlastnostmi umístěny na antivirotické médium s koncentracemi ribavirinu 20 mg.l<sup>-1</sup>, 40 mg.l<sup>-1</sup>, 60 mg.l<sup>-1</sup> a 80 mg.l<sup>-1</sup>. Podle modelu práce Hauptmanová & Polák (2011), byly růstové vrcholky vystaveny chemoterapeutické léčbě po dobu 13 týdnů. Během tohoto období se u koncentrace 40 mg.l<sup>-1</sup> a vyšší, projevila vysoká míra fytoxicity a rostliny z větší části uhynuly, což potvrdilo výsledky Paunovic et al. (2007).



U koncentrace ribavirinu 20 mg.l<sup>-1</sup> byly rostliny vitální během léčby, i ve fázi regenerace, ve které docházelo i k multiplikaci explantátů jednotlivých meriklonů. V současné době je plánován projekt s použitím nižší koncentrace antivirotika s delší dobou působení, u kterého je větší pravděpodobnost přežití rostlinných explantátů a tím i vyšší úspěšnost aplikované chemoterapie.

## 8 Literatura

- Adam M. 2005. Stanovení korelace mezi relativní koncentrací viru *Plum pox virus* a teplotou za vegetace. Pages 139-142 in Užík M, editor. Nové poznatky z genetiky a šlechtění polnohospodářských rostlin. Výzkumný ústav rostlinné výroby Piešťany, Piešťany.
- Akin-Idowu PE, Ibitoye DO, Ademoyegun OT. 2009. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology* **8**(16): 3782-3788. Available from <https://doi.org/10.5897/AJB2009.000-9374>.
- Blažek J, Paprštejn F, Kosina J. 1998. Třešně. Pages 104-110 in Blažek a kolektiv. *Ovocnictví*. Nakladatelství Květ, Praha.
- Cann AJ, 2012. *Principles of Virology (Fifth Edition)*. Elsevier Ltd., University of Leicester, UK.
- Carter JB, Saunders VA. 2007. *Virology: Principles and applications*. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England.
- Cassells AC, Long RD. 1980. The Regeneration of Virus – Free Plants from Cucumber Mosaic Virus – and Potato Virus Y-Infected Tobacco Explants Cultured in the Presence of Virazole. *Zeitschrift für Naturforschung* **35c**: 350-351.
- Ciešlińska M. 2007. Application of Thermo-and Chemotherapy *in vitro* for Eliminating some Viruses Infecting *Prunus* sp. Fruit Trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* **15**: 117-124.
- Desvignes JC. 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, Paris.
- Dlouhá J, Richter M, Valíček P. 1997. *Ovoce*. Aventinum nakladatelství s.r.o., Praha.
- Đurkovič J. 2006. Rapid micropropagation of mature wild cherry. *Biologia Plantarum* **50**(4): 733-736.
- Hauptmanová A, Polák J. 2011. The elimination of *Plum pox virus* in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of *in vitro* cultures. *Horticultural Science* **38**: 49-53.
- Hossini AD, Moghadam EG, Anahid S. 2010. Effect of Media Cultures and Plant Growth Regulators in Micro Propagation of Gisela 6 Rootstock. *Annals of Biological Research* **1**(2): 135-141.
- Hull R. 2014. *Plant virology*. John Innes Center, Norwich, UK.

- Kamenova I, Borisova A, Popov A. 2019. Incidence and genetic diversity of *Prune dwarf virus* in sweet and sour cherry in Bulgaria, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **33**:1, 980-987, DOI: [10.1080/13102818.2019.1637278](https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1637278)
- Kozieł E, Bujarski JJ, Otulak K. 2017. Molecular Biology of *Prune Dwarf Virus*-A Lesser Known Member of the *Bromoviridae* but a Vital Component in the Dynamic Virus-Host Cell Interaction Network. *International Journal of Molecular Sciences* **18**(12): 2733.
- Mansseri-Lamrioui A, Louerguioui A, Bonaly J, Yakoub-Bougdal S, Allili N, Gana-Kebbouche S. 2011. Proliferation and rooting of wild cherry: The influence of cytokinin and auxin types and their concentration. *African Journal of Biotechnology* **10**(43): 8613-8624.
- Nečas T. 2018. Historie pěstování ovocných druhů. Pages 12-15 in Hlušek a kol. *Ovocné kultury*. Vydavatelství Profi Press, Praha.
- Nečas T. 2018. Rozdělení ovocných druhů. Pages 35-37 in Hlušek a kol. *Ovocné kultury*. Vydavatelství Profi Press, Praha.
- Németh M. 1986. *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Paprštejn F, Sedlák J, Polák J, Židová P. 2017. Certifikovaná metodika ozdravování třešně pomocí chemoterapie *in vitro* kultur. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Holovousy.
- Paprštejn F, Sedlák J, Svobodová L., Polák J, Gadiou S. 2013. Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance – Short communication. *Horticultural Science* **40**: 186-190
- Paunovic S, Ruzic D, Vujovic T, Milenkovic S, Jevremovic D. 2007. In vitro Production of Plum Pox Virus – Free Plums by Chemotherapy with Ribavirin. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **21**: 417-421. Available from <https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817486>.
- Rozák J, Gálová Z, Glasa M. 2019. Molekulárna a biologická diagnostika vybraných vírusových fytopatogénov ovocných drevín. Slovenská poľnohospodárska univerzita, Nitra.
- Ružić DV, Vujović TI. 2008. The effects of cytokinin types and their concentration on in vitro multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). *Horticultural Science* **35**: 12-21.
- Říha J. 1937. *České ovoce: Třešně, višně, slívy a švestky*. Československá grafická Unie, Praha.
- Sedlák J, Paprštejn F, 2017. Fytotoxicita antivirotika ribavirin u *in vitro* kultur třešně. *Vědecké práce ovocnářské* **25**: 123-127.
- Sedlák J, Paprštejn F, 2017. Eliminace viru PDV z odrůd třešně. *Vědecké práce ovocnářské* **25**: 129-134.
- Sedlák J, Paprštejn F, Suchá J. 2019. Influence of chemotherapy on development and production of viruses free *in vitro* strawberry plants. *Horticultural Science* **46**: 53-56.

Skřivanová A, Blažková J. 2015. Opylovací poměry vybraných odrůd třešní. Vědecké práce ovocnářské **24**: 67-72.

#### Internetové zdroje:

Brulíková L. 2017. Kapitoly z bioorganické chemie. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc. Available from [http://www.bioorganickachemiesite.upol.cz/site/wp-content/uploads/2014/10/KBCH\\_5\\_Antivirotika.pdf](http://www.bioorganickachemiesite.upol.cz/site/wp-content/uploads/2014/10/KBCH_5_Antivirotika.pdf)

Buchtová I. 2019. Situační a výhledová zpráva Ovoce. Ministerstvo zemědělství Těšnov, Praha. Available from [http://www.ovocnarska-unie.cz/pdf/Ovoce\\_2019.pdf](http://www.ovocnarska-unie.cz/pdf/Ovoce_2019.pdf) (accessed January 2020).

Bujarski L, Gallitelli D, García-Arenal F, Pallás V, Palukaitis P, Reddy MK, Wang A. 2019. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Bromoviridae*. Journal of General Virology 2019 **100**:1206–1207 DOI 10.1099/jgv.0.001282 Available from [https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/100/8/1206\\_vir001282.pdf?expires=1592743768&id=id&accname=guest&checksum=D6F137BE35AE9D1D04D53F417D4A8DF2](https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/100/8/1206_vir001282.pdf?expires=1592743768&id=id&accname=guest&checksum=D6F137BE35AE9D1D04D53F417D4A8DF2) (accessed February 2020).

Český statistický úřad Available from <https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/index.jsf?page=statisticky#katalog=30840> (accessed December 2019).

Horáček P. & Mencl J. 2006. Databáze dřevin z celého světa. Available from <http://databaze.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=934> (accessed December 2019).

Chmil V. 2019. Základní chemické vlastnosti vybraných odrůd třešní [MSc. Thesis]. Vysoké učení technické v Brně, Brno Available from [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=189261](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=189261)

ICTV. 2019. *Bromoviridae* – *Figures*. Available from [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/252/bromoviridae-figures](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/252/bromoviridae-figures) (accessed February 2020).

ICTV. 2019. *Genus: Ilarvirus* Available from [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae/1109/genus-ilarvirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/bromoviridae/1109/genus-ilarvirus) (accessed February 2020).

Jarošová J, 2009. Virus zakrslosti slivoně a jeho detekce. Profi Press, Praha. Available from <https://www.zahradaweb.cz/virus-zakrslosti-slivone-a-jeho-detekce/> (accessed March 2020).

Suran P. a kol. 2019. Odrůdy třešní vyšlechtěné ve VŠÚO Holovousy. Ministerstvo zemědělství ČR při české technologické platformě pro zemědělství, Praha. Available from [https://www.ctpz.cz/media/upload/1560324127\\_odrudy-tresni-vyslechtene-ve-vsuo-holovousy.pdf](https://www.ctpz.cz/media/upload/1560324127_odrudy-tresni-vyslechtene-ve-vsuo-holovousy.pdf) (accessed December 2019).

Velký lékařský slovník. Available from <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/ribavirin> <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/ribavirin> (accessed February 2020).

Zahrádkář. 2019. izahrádkář.cz. Český zahrádkářský svaz, z. s., Praha. Available from <https://izahradkar.cz/zahrada/ovoce/peckoviny/tresnove-tydny-roku-2019-zacaly-teplem-pocasi-koncem-kvetna/> (accessed December 2020).





