

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ

Zahradnická fakulta v Lednici



**Aplikace kryoterapie při ozdravování regenerantů**

***Prunus persica* (L.) Batsch od rostlinných virů**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce

Dr. Ing. Helena Fišerová

Vypracovala

Bc. Hana Fronková

V Lednici 2017

### **Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem práci: **Aplikace kryoterapie při ozdravování regenerantů *Prunus persica* (L.) Batsch od rostlinných virů** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici, dne:

.....

podpis

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala Dr. Ing. Heleně Fišerové, vedoucí mé diplomové práce, za praktické rady v průběhu konání pokusu v explantátové laboratoři Ústavu biologie rostlin Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně a za vstřícnost během provedených konzultací.

Ráda bych také poděkovala členům výzkumného týmu Fyziologie a kryobiologie rostlin Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni, Ing. Jiřímu Zámečnickovi, CSc., RNDr. Aloisi Bilavčíkovi, Ph.D. a Ing. Miloši Faltusovi, Ph.D. při výběru způsobu provedení pokusu a umožnění provedení pokusu na jejich pracovišti. Zvláštní poděkování pak patří Ing. Miloši Faltusovi, Ph.D. za odborné vedení a konzultace během konání pokusu na pracovišti v Praze.

Poděkování patří také Ing. Martině Kudělkové za pomoc při výběru tématu a poskytnutí rostlinného materiálu a Ing. Vladimíře Dvořákové za konzultace spojené s prací v *in vitro* laboratoři.

Velké poděkování patří také mé rodině a příteli za podporu během celé doby mého studia.

## Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíl .....	8
3	Literární přehled .....	9
3.1	Obecná charakteristika broskvoní .....	9
3.1.1	Botanický popis .....	9
3.1.2	Sortiment .....	11
3.1.3	Odrůda 'Redhaven' .....	11
3.1.4	Pěstování broskvoní na území České republiky .....	12
3.1.5	Choroby a škůdci na broskvoních.....	13
3.2	Viry na broskvoních .....	14
3.2.1	Rod <i>Trichovirus</i> .....	15
3.2.2	Rod <i>Ilarvirus</i> .....	16
3.2.3	Ostatní viry napadající broskvoně .....	19
3.3	Broskvoně v <i>in vitro</i> kultuře .....	22
3.3.1	Kultivace.....	22
3.3.2	Kultivační média.....	23
3.3.3	Vliv etylenu na rostliny .....	24
3.3.4	Problémy v podmínkách <i>in vitro</i> během kultivace .....	24
3.4	Metody eliminace virů na broskvoních v podmínkách <i>in vitro</i> .....	25
3.4.1	Izolace vrcholového meristému .....	25
3.4.2	Termoterapie (thermotherapy, heat therapy).....	26
3.4.3	Chemoterapie (chemotherapy).....	27
3.5	Kryoprezervace .....	28
3.5.1	Kryoprotektanty (kryoprotektiva) .....	29
3.5.2	Metody kryoprezervace .....	31
3.5.3	Kryoprezervace broskvoní.....	36

3.6	Kryoterapie.....	37
3.6.1	Princip kryoterapie.....	37
3.6.2	Použití kryoterapie pro eliminaci virů.....	39
3.6.3	Použití kryoterapie pro eliminaci fytoplasem a bakterií .....	40
3.7	Detekce virů .....	40
3.7.1	Hodnocení příznaků na rostlinách .....	40
3.7.2	Biologické testy .....	41
3.7.3	Elektronová mikroskopie .....	41
3.7.4	Metody založené na sérologických vlastnostech virových proteinů ..	41
3.7.5	Metody detekce nukleové kyseliny .....	42
4	Materiál a metodika .....	43
4.1	Laboratoř.....	43
4.1.1	Vybavení pro kultivaci broskvoní.....	43
4.1.2	Vybavení pro proces kryoterapie .....	44
4.2	Rostlinný materiál .....	44
4.3	Příprava médií .....	45
4.3.1	Médium QL .....	45
4.3.2	Médium QL + ProClin 200.....	46
4.3.3	Média pro kryoterapii.....	47
4.4	Multiplikace broskvoní .....	47
4.4.1	Stanovení etylenu, etanu a oxidu uhličitého a rychlosti růstu rostlin	49
4.5	Příprava rostlinného materiálu a provedení kryoterapie .....	50
4.5.1	Příprava materiálu a transport.....	53
4.5.2	Izolace vzrůstných vrcholů a dehydratace.....	53
4.5.3	Kryoterapie .....	57
4.6	Hodnocení životnosti a regenerace.....	60
5	Výsledky a diskuse .....	61

5.1	Výběr média .....	61
5.2	Kultivační podmínky .....	62
5.2.1	Vliv kultivačních podmínek na růst a tvorbu dceřiných rostlin .....	62
5.2.2	Vliv kultivačních podmínek na tvorbu etylenu, etanu a oxidu uhličitého	65
5.3	Fáze multiplikace.....	68
5.4	Kryoterapie.....	72
5.4.1	DSC.....	72
5.4.2	Hodnocení životnosti .....	74
5.4.3	Hodnocení regenerace .....	76
6	Závěr .....	78
7	Abstrakt.....	80
8	Seznam použité literatury.....	81
9	Seznam obrázků, tabulek a grafů.....	95

# 1 ÚVOD

Pěstování broskvoní na našem území i přes dlouholetou tradici jejich pěstování zaznamenává výrazný pokles. K důležitým faktorům ovlivňujícím pěstování broskvoní v České republice patří rozšíření virových chorob, které způsobují nemalé ekonomické škody. Mezi nejrozšířenější virová onemocnění broskvoní na našem území patří *Plum pox virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Prunus necrotic ringspot virus* a *Prune dwarf virus*.

Do současné doby nebyl nalezen způsob eliminace viru z rostliny *in situ*. Eliminace viru z rostliny je však možná díky explantátovým kulturám. Mezi nejčastěji využívané metody ozdravování rostlin od virových patogenů patří izolace vrcholového meristému, termoterapie a chemoterapie. Metody jsou blíže popsány v bakalářské práci „Metody eliminace virů u meruněk a broskvoní“ (Fronková, 2015). Mezi nejnovější metody ozdravování rostlin v *in vitro* podmínkách patří kryoterapie, jejíž problematikou se zabývá tato diplomová práce.

Kryoterapie vychází z kryoprezervačních metod, které jsou využívány k dlouhodobému uchování rostlinného materiálu.

Kryoterapie je metoda, při níž jsou ničeny buňky obsahující virové částice působením tekutého dusíku v aseptickém prostředí. Viruprosté buňky obsažené v meristému při nastavení optimálních podmínek zpravidla přežívají. Výsledkem je získání bezvirózní rostliny regenerací buněk meristematických.

## 2 CÍL

Cílem práce je získání informací o kultivaci broskvoní v *in vitro* kultuře a využití kryoterapie jako metody k ozdravování rostlin od virových patogenů. Teoretické znalosti budou dále prakticky využity při optimalizaci kultivačních podmínek broskvoní a multiplikačním procesu. Cílem multiplikace bude získání dostatečného množství rostlinného materiálu vhodného k procesu kryoterapie.

Na namnožený rostlinný materiál bude aplikován kryoprotokol, který je využíván výzkumným týmem Fyziologie a kryobiologie rostlin Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni. Následně bude zhodnocena míra životnosti a regenerace rostlin po aplikaci kryoterapie. Rostliny, které přežijí kryogenní teploty, budou dále testovány na přítomnost virů pomocí imunoenzymatického stanovení (ELISA).



### 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

#### 3.1 Obecná charakteristika broskvoní

Dnešní pěstované odrůdy pochází z botanického druhu *Persica vulgaris* Mill. (Vávra, 1963).

##### 3.1.1 Botanický popis

*Prunus persica* (L.) Batsch (broskvoň obecná) patří do čeledi *Rosaceae*, podčeledi *Amygdaloideae*, rodu *Prunus* a podrodu *Amygdalus* (United States Department Of Agriculture: Agricultural Research Service, 2015).

Synonyma: *Amygdalus persica* var. *camelliiflora* (hort. ex L. H. Bailey) Ricker, *Amygdalus persica* var. *densa* (Makino) Ricker, *Prunus persica* var. *camelliiflora* hort. ex L. H. Bailey, *Prunus persica* var. *densa* Makino (United States Department Of Agriculture: Agricultural Research Service, 2015).

Kořenový systém broskvoně obvykle dosahuje hloubky kolem 2 m. Ve volné přírodě se broskvoň vyskytuje ve formě keře. V komerčních podmínkách je nejčastěji využíván nízkokmen s výškou 60 až 90 cm. Typická je pro broskvoně tvorba vlků (silné, dlouhé výhony s vegetativními pupeny) při nesprávně provedeném řezu (Bažant a kol., 2003). Listy mají protáhle kopinatý tvar se zubatými až pilovitými okraji (Hladík, 1966; Bažant a kol., 2003). Květní pupeny se vytvářejí na jednoletých výhonech. Květy broskvoní se dělí na dva druhy – květy růžokvěté (miskovité) a zvonkovité. Zabarvení květů se liší podle jejich typu. Miskovité květy mají bílé až sytě růžové zabarvení korunních plátků. Květy zvonkovité jsou růžové (Bažant a kol., 2003). Doba kvetení je 4 až 5 dní (Hričovský a kol., 2004).

Plodem je peckovice. Hmotnost plodů raných odrůd se pohybuje okolo 50 až 80 g, hmotnost plodů odrůd středně a pozdně zrajících bývá 150 až 200 g (Bažant a kol., 2003).

### **3.1.1.1 Obsahové látky plodu**

Broskve jsou pěstovány nejen pro své dobré chuťové vlastnosti, ale i pro vysoký obsah důležitých nutričních látek (Bažant a kol., 2003).

90 % plodu zabírá dužnina. Hlavní složkou plodu je voda (Salunkhe a Kadam, 1995). Obsah sušiny plodu se pohybuje v rozmezí od 9 do 22 %. Cukry jsou v sušině obsaženy z 5,7 až 14,9 %, převládajícím cukrem je sacharóza (Bažant a kol., 2003). Obsah proteinů v plodu je 0,6 až 1,1 %, tuku 0,3 %. (Salunkhe a Kadam, 1995).

Mezi organické kyseliny vyskytující se v plodech patří kyselina chininová, kyselina jablečná a kyselina citronová (Bažant a kol., 2003). Z důležitých prvků pro lidský organismus obsahují broskve např. draslík (453 mg/100 g), vápník (15 mg/100 g), hořčík (21 mg/100 g), a fosfor (41 mg/100 g) (Salunkhe a Kadam, 1995).

Broskve obsahují velké množství provitaminu A, vitamin A1, B1, B2, B9, C a E. Energetická hodnota 1 kg broskví je rovna asi 2190 kJ (Bažant a kol., 2003).

### **3.1.1.2 Nároky na pěstování**

Severní hranici pro pěstování broskvoní tvoří Česká republika, kde jsou broskvoně pěstovány v teplých regionech (Blažek, 1998).

Broskvoně pro svůj ideální růst vyžadují průměrnou vegetační teplotu 16 až 17 °C a roční sumu teplot 2600 až 2900 °C (Hričovský a kol., 2004). V našich podmínkách snáší broskvoně krátkodobé poklesy teplot na -22 až -25 °C. Nejcitlivější jsou k poškození mrazy květy ve fázi opadu květních plátků a mladé plody, které bývají poškozovány náhlými poklesy teplot v předjaří při teplotě -2 °C (Bažant a kol., 2003).

Vzhledem k náročnosti broskvoní na světelné podmínky jsou vhodnými stanovišti pro pěstování jižní mírné svahy s nadmořskou výškou 200 až 250 m n. m (Blažek, 1998). Pro pěstitelský tvar duté koruny je nejčastěji volen spon 5 až 6 × 3 až 4 m (Bažant a kol., 2003).

Vysoké nároky broskvoní na půdní vláhu (roční úhrn srážek nejméně 500 mm) vyžadují pro komerční pěstování použití závlahy (Bažant a kol., 2003).

Pro komerční pěstování volíme půdy kvalitní, středně těžké, hlinité nebo písčito-hlinité s obsahem jílových částic 20 až 40 % a obsahem humusu alespoň 1,5 %. Půdní

reakce neutrální až mírně alkalická s obsahem  $\text{CaCO}_3$  do 5 %. Při výsadbě broskvoní do půd s vyšším obsahem  $\text{CaCO}_3$  hrozí výskyt chloróz listů (Blažek, 1998).

Broskvoně jsou diploidní ( $2n = 16$ ). Většina pěstovaných odrůd je samosprašná, ale při opylování se doporučuje přítomnost 1 až 2 včelstev na ha výsadby (Blažek, 1998). Dosud nebyla zjištěna pylová inkompabilita při vzájemném opylování (Hričovský a kol., 2004). Ovocný strom se obvykle dožívá věku 15 až 20 let (Vávra, 1963).

### **3.1.2 Sortiment**

Ve Státní odrůdové knize je zapsáno 55 broskvoňových odrůd a 7 broskvoňových podnoží (ÚKZÚZ, 2017). Mezi pěstitelsky nejatraktivnější patří odrůdy 'Earligo', 'Sunhaven', 'Favorita Morettini 3', 'Harbrite', 'Redhaven', 'Krasava', 'Envoy', 'Fairhaven' a 'Cresthaven' (Bažant a kol., 2003).

### **3.1.3 Odrůda 'Redhaven'**

Odrůda 'Redhaven' byla vyšlechtěna roku 1940 (Bažant a kol., 2003). Odrůdu vyšlechtil Stanley Johnston, který vedl dnes již zaniklé pokusné stanice Michiganské státní univerzity (The Herald Palladium, 2000). Mezi další kultivary, které Johnston vyšlechtil, patří 'Fairhaven', 'Sunhaven', 'Richhaven', 'Glohaven' a 'Cresthaven'.

Odrůda 'Redhaven' vznikla opylením odrůd 'Halehaven' a 'Kalhaven' (Layne a Bassi, 2008). Jedná se o komerčně nejpěstovanější odrůdu broskví ve světě i u nás (Bažant a kol., 2003). Do Státní odrůdové knihy byla zapsána v roce 1963 (ÚKZÚZ, 2017) a je povolenou odrůdou pro komerční výsadbu pro rok 2016 v rámci Svazu pro integrované systémy pěstování ovoce (Buchtová, 2016).

Odrůda je adaptabilní, je vhodná do širokého spektra stanovištních podmínek (Blažek, 1998). Je řazena k íránské skupině broskví (Hladík a kol., 1966).

Růst stromu odrůdy 'Redhaven' je středně bujný, korunu vytváří široce rozkladitou s velkým množstvím plodného obrostu (Blažek, 1998). Květní pupeny se tvoří v horních dvou třetinách plodného obrostu. Letorosty mají výraznou hnědočervenou barvu (Bažant a kol., 1974) s velkými vystouplými lenticelami oválného tvaru (Kalášek a Richter, 1989).

Květy jsou tvaru zvonkovitého, barva okvětních plátků je temně karmínová. Blizna zřetelně vystupuje nad čnělku (Kalásek a Richter, 1989). Jedná se o samosprašnou odrůdu (Bažant a kol., 1974; Hladík a kol., 1966). Listy mají barvu zelenou s oranžovým nádechem (Bažant a kol., 2003). Listové žlázy jsou ledvinité (Hladík a kol., 1966).

Peckovice jsou kulovité až oválné, tvarově vyrovnané. Slupka plodů je středně silná, jemně plstnatá. Základní barva slupky plodů je žlutá, na více jak polovině plodu se vyskytuje tmavé, karmínově červené líčko (Blažek, 1998). U vybarvených plodů přechází líčko do fialové barvy. Dužnina je žlutá, jemně zrnitá, kolem pecky načervenalá (Hladík a kol., 1966). Konzistence dužniny je pevná. Plody jsou jemně aromatické. V plné zralosti je dužnina lehce oddělitelná od pecky (Blažek, 1998). Pecka je menší, slabě rýhovaná a plochá (Hladík a kol., 1966).

Plody jsou vhodné pro přímý konzum i pro průmyslové zpracování. Probírka plodů výrazně zvyšuje jejich kvalitu i velikost. Odolnost vůči škůdcům je střední (Blažek, 1998). Vůči mrazovému poškození je odrůda značně odolná (Hričovský a kol., 2004).

Doba zrání připadá na období 3. – 8. srpna (Blažek, 1998).

#### **3.1.4 Pěstování broskvoní na území České republiky**

Pěstování broskvoní na našem území má velmi dlouhou tradici. (Bažant, 2003). Postupem času ale dochází na území České republiky ke snižování produkce broskví. Produkce broskví v České republice tvoří jen 0,1 % celkové produkce v Evropské unii. Největšími producenty v zemích EU jsou Španělsko (34,4 %), Itálie (32,9 %) a Řecko (23,2 %) (Buchtová, 2016).

Byl zaznamenán pokles produkčních ploch a zastarávání sadů. V průběhu tří let (2013 – 2015) došlo k snížení počtu broskvoňových stromů v sadech z 1 103 886 na 1 008 849. Sklizeň kolísá v závislosti na klimatických podmínkách. Např. v roce 2014 bylo sklizeno 7 310 t broskví, v roce 2015 vlivem velmi dobrých klimatických podmínek 11 796 t broskví. V roce 2016 se ale předpokládalo se snížením celkového výnosu až o 72 % vzhledem k jarním mrazům, které významně poškodily kvetoucí broskvoně (Buchtová, 2016).

Příčinami poklesu pěstování broskví v České republice mohou být nízké výkupní ceny, stárnoucí výsadba, podpora importu a také rozšiřující se virus šarky švestky (Ondrášek a Krška, 2014).

### **3.1.5 Choroby a škůdci na broskvoních**

#### **3.1.5.1 *Fyziologické poruchy***

Poškození broskvoní nízkými teplotami nastává při střídání teplých dnů a studených nocí na přelomu zimy a jara a při inverzních mrazech vyskytujících se v září a říjnu (Bažant a kol., 2003).

Chlorózy listů jsou způsobovány nejčastěji nevhodnými půdními podmínkami, poškozením vegetativních orgánů nízkými teplotami, nevhodně zvolenou odrůdou pro konkrétní podnož a poruchami výživy (Hričovský a kol., 2004).

Kořenová asfyxie se vyskytuje v půdách, které jsou těžké, zamokřené a studené (Bažant a kol., 2003).

Kalcioza je způsobena nedostatečným příjmem železa blokováním vysokým obsahem uhličitanu vápenatého v půdě. Vyskytuje se v půdách s obsahem uhličitanu již od 5 %. Při zvýšeném množství uhličitanu vápenatého v půdě lze zvolit vhodnou podnož netrpící na kalciozy (Bažant a kol., 2003).

#### **3.1.5.2 *Choroby***

Klejetoková rakovina je způsobena bakterií *Pseudomonas syringae* a houbovým patogenem *Lecostoma cincta*. Způsobují odumírání větví i celého stromu v důsledku ucpání cévních svazků (Bažant a kol., 2003).

Kadeřavost broskvoně je způsobena houbou *Taphrina deformans*. Způsobuje deformace listů v podobě puchýřků, na plodech se projevuje červenofialovými skvrnami a jejich deformacemi (Bažant a kol., 2003).

Padlí broskvoňové (*Sphaerotheca pannosa* var. *persicea*) je choroba postihující listový aparát a plody. Na plodech se projevuje zprvu malými bílými skvrnami, které následně tmavnou. Dochází k praskání plodů (Bažant a kol., 2003; Hričovský a kol., 2004).

Moniliová spála a moniliová hniloba napadá květy a letorosty v době vlhkého a teplého počasí (Bažant a kol., 2003).

Strupovitost peckovin je způsobena houbou *Stigmina carpophilum* a *Venturia cerasi*. Projevuje se ostře ohraničenými skvrnami na plodech a dírkovitostí listů (Hričovský a kol., 2004).

### 3.1.5.3 Škůdci

Mezi nejvýznamnější škůdce broskvoní patří mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), mšice hnízdotvorná (*Brachycaudus Schwartzi*), mšice švestková (*Hyalopterus pruni*), makadlovka broskvoňová (*Anarsia lineatella*), obaleč východní (*Cydia molesta*) a zobonoska obecná (*Rhynchites bakchus*) (Bažant a kol., 2003).

## 3.2 Viry na broskvoních

Viry jsou obligátní parazité, jejichž reprodukce závisí na buněčném cyklu jejich hostitele. Hostitelem může být jakýkoliv živý organismus (živočich, rostlina, houba a bakterie), avšak virus napadá vždy jen jeden z uvedených typů hostitelů (Kaya a Yilmaz Gokdogan, 2015). Projevem přítomnosti viru v rostlině je tzv. viróza.

Rostlinný virus (fytovirus) je mikroparazit s velikostí v řádech nanometrů (Šafránková a kol., 2013), jehož přežití i multiplikace je plně závislá na rostlinné buňce svého hostitele (Kaya a Yilmaz Gokdogan, 2015). Reprodukce viru je popsána v několika krocích: vstupem viru do buňky, uvolnění a replikací virového genomu, skládáním virionů a uvolněním virionů z buňky (Navrátil, 2010, cit. dle Kudělková, 2010). Virion je částice viru, která je schopna samostatně infikovat rostlinnou buňku (Rosypal, 2000). Vstup viru do rostlinné buňky neprobíhá aktivně. Virus není obvykle schopen infikovat rostlinu přes nepoškozenou buněčnou stěnu (Agrios, 2005). K infekci dochází při mechanickém poškození buňky (Navrátil, 2010, cit. dle Kudělková, 2010).

Nejčastějšími způsoby přenosu a šíření viru jsou vegetativní přenos spojovaný s lidskou činností pomocí množitelského materiálu a kontaminovaných pracovních nástrojů, generativní přenos pomocí semen, kde jsou viry vázány na embrya, endosperm a testu, nebo pomocí pylu (Navrátil, 2010, cit. dle Kudělková, 2010), přenos houbovými organismy a přenos pomocí vektorů, tzv. zoochorie (Agrios, 2005). V rostlině se virus šíří pomocí cévních svazků nebo z buňky do buňky pomocí plasmodesmat (Navrátil, 2010, cit. dle Kudělková, 2010).

Virus je složen z řetězce jedné nebo více molekul nukleových kyselin (Matthews, 1991). Nukleové kyseliny tvoří 5 – 40 % viru (Agrios, 2005). Molekuly kyselin jsou uzavřené v ochranném plášti tvořeném lipoproteiny nebo proteiny (Matthews, 1991). Samotný protein není infekční (Agrios, 2005). Tvarově lze viry dělit na vláknité, izometrické, baciliformní a komplexní (Navrátil, 2010, cit. dle Kudělková, 2010).

Jako první byl objeven virus mozaiky tabáku (*Tobacco mosaic virus*, TMV) v roce 1892 (Smolák, 1954). Fytoviry způsobují na rostlinách mnoho poškození a jsou zodpovědní za velké ekonomické ztráty při pěstování užitkových plodin (Kaya a Yilmaz Gokdogan, 2015).

Vir je optickým mikroskopem nepozorovatelný (Šafránková a kol., 2013). Optickým mikroskopem lze sledovat histologické změny, které jsou vyvolané infekcí – neúplná diferenciací mezofylu u mozaik, méně intercelulárních prostorů apod. Pro diagnostické účely je využíváno elektronové mikroskopie (Špak, 2010).

Viry dělíme podle druhu nukleové kyseliny do dvou skupin – viry obsahující kyselinu deoxyribonukleovou (kruhová dvouvláknová DNA, lineární dvouvláknová DNA a kruhová jednovláknová DNA) a ribonukleovou (dvouvláknová RNA, negativní jednovláknová RNA, pozitivní jednovláknová RNA a satelitní viry s dvouvláknovou RNA). Z taxonomického hlediska viry dělíme do čeledí (druh, forma a členění nukleové kyseliny), rodů (tvar a velikost virových částic), druhů (populace virů vyvolávajících charakteristické onemocnění), kmenů (sérologicky příbuzné viry) a izolátů (původ podle hostitelské rostliny nebo země) (Špak, 2010).

### **3.2.1 Rod *Trichovirus***

Rod *Trichovirus* patří do čeledi *Betaflexiviridae*. Velikost virových částic tohoto rodu se pohybuje v rozmezí od 640 nm do 800 nm v délce a 12 nm v šířce. Viriony obsahují 5 % nukleové kyseliny.

*Trichovirus* má strukturu jednořetězcové pozitivní RNA.

Společně s ekonomicky významným virem škodícím na broskvoních *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) patří do rodu *Trichovirus* také *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* (APCLSV), *Cherry mottle leaf virus* (ChMLV), *Grapevine berry inner necrosis virus* (GINV), *Grapevine Pinot gris virus*, *Peach mosaic virus* (PMoV) a *Phlomis mottle virus* (PhMV) (Description of Plant Viruses, 2013).

### 3.2.1.1 *Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)*

Virus chlorotické skvrnitosti jabloně (Klušák, 2013).

Synonyma: *Pear ring pattern mosaic virus*, *Apple latent virus* (Description of Plant Viruses, 2013).

Virové částice: Virové vlákno je dlouhé 720 nm a široké 12 nm. Tepelná inaktivace viru je možná při teplotě vyšší jak 55 °C. Virus bez hostitelské buňky je schopen v *in vitro* podmínkách přežít 7 hodin při teplotě 24 °C. ACLSV je schopen infikovat rostlinný materiál při pH 5,5 až 9,9 (Verma a Sharma, 1999).

Přenos: U dřevitých hostitelů je virus přenášen roubováním. Nebyl zaznamenán přenos viru semeny nebo pylem (Description of Plant Viruses, 2013). Hlavním zdrojem přenosu viru je lidská činnost (Verma a Sharma, 1999). Dosud nebyl objeven žádný přirozený přenašeč viru (Loebestein a Katis, 2015).

Geografické rozšíření a ekonomický význam: Virus je rozšířen v místech, kde jsou komerčně pěstované jabloně (Description of Plant Viruses, 2013).

Hostitelé: Přirozenými hostiteli viru ACLSV jsou rostliny z čeledi *Rosaceae* – jabloně, hrušně, slivoně, kdouloně, třešně, višně, jeřáby, meruňky a broskvoně (Klušák, 2013).

Symptomy: Příznaky napadení rostliny virem se objevují na listech, ale také na plodech a kmeni (Diekmann a Putter, 1996). Asimilační plocha stromu je snižována průhlednými skvrnami na listech, listovými deformacemi, zmenšení velikosti listů a předčasným opadem. Dochází také k odumírání terminálních pupenů. Ačkoliv virus napadá ve velké míře jabloně, vyskytuje se u nich často v latentní podobě. U broskvoní, hrušní, kdouloní a meruněk se projevuje v agresivnější formě (Verma a Sharma, 1999).

### 3.2.2 Rod *Ilarvirus*

Rod *Ilarvirus* patří do čeledi *Bromoviridae* a zahrnuje 10 podskupin virů. Velikosti virových částic tohoto rodu se pohybuje v rozmezí od 26 nm do 35 nm v průměru (Description of Plant Viruses, 2013). Jedná se o viry s pozitivní jednovláknovou RNA. Replikace viru probíhá v buňce hostitele v cytoplasmě (ViralZone, 2017).



Do rodu *Ilarvirus* patří *American plum line pattern virus* (APLPV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Asparagus virus 2* (AV-2), *Blackberry chlorotic ringspot virus* (BCRV), *Blueberry shock virus* (BIShV), *Citrus leaf rugose virus* (CiLRV), *Citrus variegation virus* (CVV), *Elm mottle virus* (EMoV), *Fragaria chiloensis latent virus* (FCILV), *Humulus japonicus latent virus* (HJLV), *Lilac leaf chlorosis virus* (LLCV), *Lilac ring mottle virus* (LiRMoV), *Parietaria mottle virus* (PMoV), ***Prune dwarf virus*** (PDV), ***Prunus necrotic ringspot virus*** (PNRSV), *Spinach latent virus* (SpLV), *Strawberry necrotic shock virus* (SNSV), *Tobacco streak virus* (TSV) a *Tulare apple mosaic virus* (TAMV) (ViralZone, 2017).

### 3.2.2.1 *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)

Virus nekrotické kroužkovitosti třešně (Nečas a Krška, 2006a).

Synonyma: *Peach ringspot virus*, *Cherry (sour) necrotic ringspot virus*, *Necrotic ringspot virus*, *Prunus ringspot virus* (Descriptions of Plant Viruses , 2013). Jako první byl virus pojmenován *Peach ring spot virus* (Nyland a kol., 1976).

Virové částice: Virus obsahuje RNA s izometrickými částicemi okolo 23 nm velkými v průměru (Descriptions of Plant Viruses , 2013). K inaktivaci virové částice dochází při teplotě 54 až 62 °C v *in vitro* podmínkách a při teplotách vyšších než 38 °C působících 2 až 3 týdny v podmínkách *in vivo* (Nyland a kol., 1976).

Přenos: Stejně jako *Prune dwarf virus* je *Prunus necrotic ringspot virus* šířen pylem. Virová částice se může přenést do semene v případě, kdy je pyl přenesen do oslabeného květu. Přenos viru pylem přispívá k celosvětovému rozšíření tohoto viru. S přenosem viru pylem souvisí také přenos viru semeny. Dalším způsobem šíření viru je použití infikovaného rostlinného materiálu při roubování. Dosud nebyl zjištěn žádný přenašeč hmyzího původu. Při teplotě 30 °C je přenos viru z infikovaného materiálu na zdravou rostlinu uskutečněn za 72 hodin, při teplotě 18 °C je k infekci potřeba 168 hodin (Nyland a kol., 1976).

Geografické rozšíření a ekonomický význam: Virus je rozšířen celosvětově vzhledem k jednoduchému způsobu přenosu. Rozšiřuje se pylem i semeny (Owaga a English, 1991). Z tohoto důvodu je nutné dodržovat izolační vzdálenost komerčních sadů od zdrojů onemocnění. Mezi významného přenašeče viru patří také třásněnka, která virus přenáší sáním (Strand, 1999). Ekologickou významnost podtrhuje

skutečnost, že některé formy viru mohou způsobit odumření mladých stromů ve stáří 3 až 4 let v následujícím roce po infekci (Nyland a kol., 1976).

Hostitelé: Mezi hostitele viru PNRSV patří téměř všechny ekonomicky významné druhy rodu *Prunus* (Nyland a kol., 1976).

Symptomy: Virus je extrémně variabilní a existuje v mnoha formách, které se vzájemně liší podle typu hostitele. Obecně lze říci, že se virus projevuje chlorózami a nekrózami na listech, deformacemi listů a zakrslostí. Chlorózy se objevují v podobě kroužků a skvrnitostí. Pupeny, listy, výhony, větve a kořeny mohou trpět nekrózami, které jsou projevem silnější infekce. Svěšování a vrásčitost listů mohou být přítomny jako doprovodný jev infekce. Celé rostliny jsou zakrslé a ustává růst. V následujícím roce po infekci broskvoně virem dochází k retardaci rašení, odumírání listových i květních pupenů a odumírání výhonů narostlých v předešlém roce (Nyland a kol., 1976). Infikované broskvoně trpí chlorózami listů a deformací listů v podobě jejich krabacení (Owaga a English, 1991). Často dochází k viditelným příznakům jen v průběhu prvních dvou let po infekci (Nečas a Krška, 2006a).

### 3.2.2.2 *Prune dwarf virus (PDV)*

Virus zakrslosti slivoně (Nečas a Krška, 2006b).

Synonyma: *Sour cherry yellows virus*, *Chlorogenus cerasae*, *Cherry chlorotic ringspot virus*, *Peach stunt virus* (Description of Plant Viruses, 2013).

Virové částice: Virová částice izometrického tvaru s velikostí 22 nm v průměru. Virová částice je schopna života v rozmezí teplot od -78 °C do 54 °C.

Přenos: Nejsou známy žádné přirozené vektory přenosu. Virus je přenášen pylem a semeny (Description of Plant Viruses, 2013). Častým způsobem přenosu viru je také roubování (Diekmann a Putter, 1996). Vzhledem ke schopnosti viru infikovat zdravé rostliny přes pyl je důležité dodržovat izolační vzdálenost sadů od zdrojů infekce (Nečas a Krška, 2006b).

Geografické rozšíření a ekonomický význam: PDV je rozšířen v oblastech pěstování rostlin z rodu *Prunus* (Description of Plant Viruses, 2013). Ekonomicky významný je tento virus z důvodu jeho působení na životnost pupenů. Pupeny odumírají, a tím je také snižována sklizeň ovoce (Nečas a Krška, 2006b).

Hostitelé: Hlavními hostiteli viru jsou rostliny z rodu *Prunus*. Pro diagnostiku viru pomocí indikátorových rostlin je využíváno *Cucumis sativus* L., *Cucurbita maxima* Duchesne, *Crotalaria spectabilis* Roth, *Momordica balsamina* L., *Tithonia rotundifolia* (Mill.) S. F. Blake a *Prunus serrulata* Lindl. (Description of Plant Viruses, 2013).

Symptomy: PDV se na broskvoních projevuje typickou zakrslostí (Diekmann a Putter, 1996). Kromě celkové vzrůstnosti stromu ovlivňuje virus také listový aparát. Na listech jsou patrné různě velké skvrny, proužky a kresby. Postupem času dochází k nekrotizaci skvrn a deformaci, čímž je výrazně snižována asimilační plocha stromu. K redukci asimilační plochy dochází také vlivem zúžení listové čepele, která je projevem přítomnosti PDV u broskvoní a třešní. Během chladného počasí jsou symptomy více viditelné, horké letní dny příznaky inhibují (Nečas a Krška, 2006b).

### **3.2.3 Ostatní viry napadající broskvoně**

Kromě dále zmiňovaných virů napadají broskvoně také *Weak peach virus* (WPS), *Red suture virus* (RSV), *Peach calico virus* (PCV), *Peach wart virus* (PWV), *Phony virus* (PV), *Stubby twig virus* (STV), *Peach blotch virus*, *Strawberry latent ringspot virus*, *Tomato black ringspot virus* (TmBRV) (Layne a Bassi, 2008), *Peach enation virus* (PhEnV), *Peach line pattern and leaf curl virus* (PhLnPtLCIV) (Šutič a kol., 1999).

#### **3.2.3.1 Plum pox virus (PPV)**

Virus šarky švestky patří k nejrozšířenějším rostlinným virům. Významné ekonomické škody způsobuje na slivoních, meruňkách a broskvoních (Diekmann a Putter, 1996). Ze sedmi známých kmenů viru šarky švestky jsou na našem území rozšířené 3 kmeny: PPV-D, PPV-M a PPV-Rec. Broskvoně napadá kmen PPV-M, méně PPV-D. Ve světě je nejvíce rozšířen kmen PPV-D (Schlesingerová, 2011). U nás byl poprvé objeven v roce 1952 (Polák, 2010).

PPV je tvořen jednořetězcovou RNA (Diekmann a Putter, 1996). Virová částice je ze 7 % složena z nukleové kyseliny. Velikost virové částice je 750 nm na délku a 13 nm na šířku. Inaktivace viru probíhá při teplotě 52 °C trvající po dobu 10 minut (Polák, 2010).

Mezi hostitele patří rostliny rodu *Prunus*. Častými hostiteli jsou hospodářsky významné rostliny jako např. slivoně, broskvomandloně, meruňky, broskvoně, trnky,

třešně nebo višně. Přenos viru mšicí broskvoňovou a mšicí chmelovou je hlavním důvodem vysoké rozšířenosti viru ve světě (Polák, 2010).

PPV způsobuje ekonomické ztráty projevujícími se symptomy na plodech rostlin. Způsobuje pokles cukrů a kyselin v plodech a barevnými změnami v dužnině plodu (Nečas a Krška, 2006c). Na listech se projevuje chlorotickými kroužky, které následně nekrotizují (Diekmann a Putter, 1996).

### **3.2.3.2 *Peach mosaic virus (PMV)***

Byl objeven roku 1931 v Coloradu. Následně byla nemoc objevena také v Arizoně, Arkansasu, Kalifornii, Novém Mexiku, Oklahomě a Utahu. Hlavními hostiteli jsou broskvoně a nektarinky. Virus může také napadat mandloně, meruňky, třešně a slivoně.

Symptomy PMV zahrnují poškození květů, zmenšení květů, barevné změny v květu, defoliaci, deformaci listů a plodů a abnormální růst rostliny. U některých kultivarů jsou symptomy tak mírné, že jejich identifikace je velmi náročná.

*Peach mosaic virus* je přenášen roztočem *Eriophyes insidiosus*. Přirozeně je virus šířen z broskvoně na broskvoň, výjimečně z broskvoně na meruňku. Dále je virus přenášen vlivem agrotechnických operací prováděných člověkem (Pine a Gilmer, 1976).

### **3.2.3.3 *Asteroid spot virus (ASV)***

Jako první byl objeven v Kalifornii roku 1938. Později byl objeven také v Coloradu, Oregonu, Utahu, Washingtonu a Mexiku. Napadá broskvoně, nektarinky a třešně. Možnými hostiteli jsou také mandloně, meruňky, mahalebky. Je přenášen roubováním.

Virus se na broskvoních a nektarinkách projevuje malými žlutavými skvrnami na listech, které později expandují na celou listovou čepel. Největší skvrny se mohou projevit jako žluté kroužky se zeleným středem, což vede často k záměně tohoto viru s PPV. Skvrny mohou nekrotizovat a drolit se, ke konci léta může dojít k úplné defoliaci stromu. Infekce se nejsilněji projevuje v prvním roce infekce. Virus se více projevuje na broskvoních s bělomasými plody (Williams a kol., 1976).

#### **3.2.3.4 *Peach rosette virus (PRV)***

Hostitelé viru PRV jsou slivoně, méně významnými hostiteli jsou mandloně, meruňky a třešně. Na broskvoních se projevuje virus zčervenáním nervatury listu a následnou defoliací. Květy na napadených větvích se nevyvíjejí, nedochází k vytvoření plodů. Nejčastějším způsobem přenosu viru na zdravou rostlinu je použití infikovaného rostlinného materiálu při roubování (Kenknight, 1976).

#### **3.2.3.5 *Peach stem pitting virus (PSPV)***

*Peach stem pitting virus* napadá především broskvoně a nektarinky. Stromy napadené PSPV jsou zakrslé, terminální růst se vyznačuje zkrácenými internodií, objevují se chlorózy a podélné zkroucení listů. Borka je ztloustlá a zvrásněná, u kořenového krčku se objevují drážky (Mircetich a kol., 1970). Objevují se nekrózy cévních svazků a kořenů (Mircetich a Fogle, 1976).

#### **3.2.3.6 *Peach yellows virus (PYV)***

*Peach yellows virus* napadá broskvoně, nektarinky, meruňky a mandloně. Vyznačuje se zakrslými listy a žloutnutím listů, které vede k nekrotám a vytvářením tenkých větví, které v pokročilém stádiu infekce odumírají. Stromy odumírají do 2 až 3 let po objevení prvních symptomů infekce. Plody na infikovaných stromech dozrávají o několik dní až tři týdny dříve a vyznačují se zvětšenou velikostí, avšak sníženou kvalitou, obvykle mají nahořklou chuť (Pine a Gilmer, 1976).

#### **3.2.3.7 *Rosette mosaic virus (RMV)***

RMV je rozšířen v Michiganu, New Yorku a Itálii. Virus se na broskvoních projevuje pozdějším olistěním, chlorotickou kropenatostí a zkracováním internodií. Infikované stromy mají tmavší zelenou barvu než stromy zdravé. Přenos viru je umožněn roubováním, semeny, ale také pomocí hlístice *Xiphomena americanum* (Klos, 1976).

#### **3.2.3.8 *Stubby twig virus (STV)***

Virus je rozšířen v Kalifornii, Oregonu a Missouri, Itálii a Turecku. Hostiteli jsou broskvoně a nektarinky. Primárními a sekundárními symptomy jsou chlorotické skvrny objevující se na listech v pozdním jaru a začátkem léta. Virus ovlivňuje také plody

vyrůstající na infikovaných větvích. Je přenosný pouze roubováním (Wagnon a kol., 1976).

### **3.2.3.9 *X-disease virus (XDV)***

XDV je vysoce variabilní virus napadající broskvoně, nektarinky, slivoně, višně a třešně. Na broskvoních se projevuje nepravidelnými žlutými nebo červenými skvrnami po 6 týdnech od rašení listů. Listy jsou chlorotické a křehké. Napadené větve se stávají méně odolné vůči mrazovému poškození během dormance. Plody na infikovaných větvích opadávají nebo mění svůj tvar ve špičatý (Gilmer a Blodgett, 1976).

### **3.2.3.10 *Yellow bud mosaic virus (YBMV)***

*Yellow bud mosaic virus* napadá především broskvoně, nektarinky, třešně, mandloně a slivoně v oblasti Kalifornie. Infekce se projevuje vyrašením krátkých trsů světle žlutých listů, které následně hnědnou a odumírají před dosažením délky 2 až 5 mm. Na nově infikované rostlině se virus projevuje mozaikou na napadených listech (Schlocker a Traylor, 1976).

## **3.3 Broskvoně v *in vitro* kultuře**

Meristémové kultury broskvoní mají největší využití pro eliminaci patogenů z rostlin a pro rychlé množení. *In vitro* kultury broskvoní jsou využívány k množení specifických podnoží vhodných pro evropské půdní podmínky (Bajaj, 1986).

Na růst broskvoní v *in vitro* kultuře má vliv zvolená fotoperioda, světelné podmínky, typ média a vlhkost (Layne a Bassi, 2008).

### **3.3.1 Kultivace**

#### **3.3.1.1 *Proliferace axilárních pupenů***

K proliferaci axilárních pupenů je využíváno cytokininů, které redukuje apikální dominanci. Pro broskvoně je nejvíce využívaným růstovým regulátorem 6-benzyladenin (BA) a kinetin v množství 0,5 – 0,6 mg · l<sup>-1</sup> až 1 – 1,2 mg · l<sup>-1</sup> v závislosti na použitém rostlinném materiálu. K proliferaci výrazně přispívá přidání dusíku do média. K přemístění axilárních výhonků na nové médium dochází po 15 až 20 dnech po iniciaci proliferace (Layne a Bassi, 2008).

Světelné podmínky střídající 4 h světlo a 2 h tma stimulují axilární proliferaci. Ukázalo se, že tento světelný cyklus je z tohoto hlediska vhodnější než klasický 16 h světlo a 8 h tma (Morini a kol., 1990).

### **3.3.1.2 *Zakořeňování***

Zakořeňování rostlin získaných z proliferace axilárních pupenů probíhá na médiu s přidavkem auxinů. Nejvyužívanějšími auxiny pro tento účel jsou kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina indolyl-3-octová (IAA) a kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (NAA) v koncentraci 0,5 až 1,5 mg · l<sup>-1</sup>. Během indukce zakořeňování může docházet ke žloutnutí listů vlivem vzrostlé koncentrace auxinů. Při nadměrné koncentraci auxinů se zpomaluje, až ustává a růst vrcholů. To může mít negativní vliv během aklimace, kdy rostlinky nebudou schopny obnovit rychlý růst vrcholů (Layne a Bassi, 2008).

Zakořeňování kromě fytohormonů ovlivňují další faktory. Jedná se např. o stáří matečné rostliny, fyziologický stav rostliny, teplota, světelné podmínky a fotoperioda (Deberg a Read, 1991).

### **3.3.1.3 *Převod rostlin in vivo***

Převod rostlin do nesterilních podmínek je kritickým krokem v procesu kultivace broskvoní. Po vymytí zbytků sterilního média z kořenové soustavy rostliny následuje přenesení broskvoně do substrátu. Vyšší úspěšnost převedení rostlin do nesterilních podmínek je zajištěna umístěním rostlin do podobných podmínek, ve kterých byly rostliny kultivovány doposud – teplota, vlhkost. Vlhkost je povolna snižována až na stupeň běžné vlhkosti. Přizpůsobení rostliny vnějším podmínkám probíhá obvykle po dobu 20 až 30 dní, během kterých rostlina naroste do výšky 15 až 20 cm (Layne a Bassi, 2008).

### **3.3.2 Kultivační média**

Úspěšnost mikropropagace rostlin závisí ve velké míře na typu použitého média. Médium je složeno z makro a mikroelementů, vitaminů, růstových regulátorů, želírovacího činidla (agar) a sacharózy jako zdroje energie (Layne a Bassi, 2008).

Určení ideálního média je velmi těžké, jelikož nároky na médium se liší podle zvolených podmínek kultivace, zvoleného kultivaru rostliny i jednotlivých laboratoří (Layne a Bassi, 2008).

Nejvíce využívaným médiem je MS médium (Murashige a Skoog, 1962). Pro kultivaci broskvoní jej např. využil Laimer a kol. (2006), Navaro a kol. (1982) nebo Barba a kol. (1995).

Dalšími médii využívanými pro kultivaci broskvoní *in vitro* jsou DKW médium (Driver a Kuniyuki, 1984) a QL médium (Quoirin a Lepoivre, 1977).

### **3.3.3 Vliv etylenu na rostliny**

Složení atmosféry v kultivační baňce má na rostliny pěstované v *in vitro* kultuře velký vliv. Etylen je nejjednodušší uhlovodík. V rostlinách vzniká etylen přeměnou L-metioninu společně se vznikem oxidu uhličitého (Kende, 1993).

Etylen je plynný hormon, jehož tvorbu ovlivňuje sluneční záření, kultivační teplota nebo koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého v atmosféře kultivační baňky (Procházka a kol., 1998). Při působení stresových faktorů na rostlinu dochází k jeho zvýšené produkci (u listů pšenice např. při snížení vody o 9 % dojde k nárůstu tvorby etylenu o 300 %). Mezi stresové faktory řadíme sucho nebo právě nadbytek vody, teplotní extrémy (nízká nebo vysoká teplota) či zasolení substrátu. K nárůstu etylenu dochází již po několika desítkách minut po vystavení rostliny stresovým faktorům (Macháčková, 1997).

Etylen inhibuje prodlužovací růst a způsobuje defoliaci. V praxi je nejvíce používán při urychlování dozrávání plodů (Procházka a kol., 1998). Etylen u rostlin ovlivňuje vyšší příjem iontů, aktivuje enzymatickou činnost a jeho produkce rostlinou je při různých fyziologických procesech rozdílná, např. během dormance jeho produkce klesá (Fišerová a kol., 2016).

### **3.3.4 Problémy v podmínkách *in vitro* během kultivace**

Zvláště v jarním období je běžná kontaminace rostlin bakteriemi nebo houbami. Příčina kontaminace často spočívá v nesprávném zacházení s rostlinným materiálem v laminárním boxu nebo nedostatečnou sterilitou pracovního nářadí. Kontaminace bakteriální povahy se mohou objevit u báze explantátu, který je v dlouhodobé kultivaci. Bakterie endogenní povahy se objevují v případech, kdy jsou nastoleny optimální podmínky pro růst. Během proliferace vrcholů je možné zabránit kontaminacím použitím PPM (Plant Preservative Medium), které je schopno redukovat mikrobiální kontaminace v tkáňové kultuře (Layne a Bassi, 2008).



### **3.4 Metody eliminace virů na broskvoních v podmínkách *in vitro***

V současné době neznáme způsob eliminace virů, který by ozdravoval infikovanou rostlinu v podmínkách *in situ* (Ravelonandro a kol., 2004). Existují ale metody, které umožňují ozdravení infikovaného rostlinného materiálu v podmínkách *in vitro* (Loebestein a Katis, 2015).

Dostupnost bezvirózního rostlinného materiálu je zásadní pro vysoké výnosy a kvalitu pěstovaných plodin. Plodiny množené vegetativním způsobem a ošetřované řezem jsou zvláště náchylné na ztráty způsobené viry, které jsou přenášeny z rostliny na rostlinu (Wang a kol., 2008a).

Nejčastěji využívanými metodami ozdravování rostlin od virových patogenů jsou izolace vrcholového meristému, termoterapie, chemoterapie a nově kryoterapie. V praxi často dochází ke kombinaci jednotlivých metod pro zvýšení procenta úspěšnosti získání ozdraveného rostlinného materiálu (Loebestein a Katis, 2015).

#### **3.4.1 Izolace vrcholového meristému**

Dle Loebestein a Katis (2015) je izolace vrcholového meristému hlavní metodou určenou k eliminaci virů z vegetativně množených rostlin.

Metoda vychází z předpokladu, že meristémová část rostliny je viruprostá (Wang a kol., 2008a). Ozdravení probíhá formou izolace meristému z infikované rostliny, následné kultivace v *in vitro* podmínkách a převedení ozdravené rostliny do nesterilních podmínek (Loebenis a Katis, 2005).

Viruprostý rostlinný materiál pomocí izolace vrcholového meristému úspěšně obdržel v roce 1986 Isac. Byla použita rostlina *Prunus domestica* L. infikovaná virem *Plum pox virus* (Isac, 1986).

Izolace vrcholových meristémů se ve většině případů používá v kombinaci s jinou metodou eliminace virů (Loebestein a Katis, 2015).

### **3.4.2 Termoterapie (thermotherapy, heat therapy)**

Termoterapie je nejstarší metodou používanou k produkci bezvirózního materiálu. Metoda byla poprvé použita roku 1869 ve Skotsku na cibulích, které byly ponořovány do horké vody před jejich zasazením. U broskvoní byla termoterapie poprvé použita v roce 1936 k ozdravení rostlin od žloutenky (Loebestein a Katis, 2015).

Principem termoterapie je inhibice šíření viru v rostlinném pletivu při zvýšených teplotách (Křižan a kol., 2005) vlivem snížení replikace virů (Bhojwani a Dantu, 2013). Teplota působící na rostlinný materiál se liší podle rostlinného viru (35 až 54 °C). Liší se také doba působení, jedná se o minuty až týdny (Matthews a kol., 2002).

Termoterapie byla v České republice blíže studována v zemědělském výzkumu „Výzkum a vývoj standardních metod ozdravení pomocí termoterapie a *in vitro* kultur odrůd ovocných dřevin a révy vinné od virů, fytoplasem a karanténních patogenů pro systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu (Křižan a kol., 2009).

Rozlišujeme termoterapii *in vivo* a *in vitro*.

#### **3.4.2.1 Termoterapie *in vivo***

Termoterapie *in vivo* se dále dělí na termoterapii horkým vzduchem a termoterapii horkou vodou. Společným znakem obou variant je realizace metody v nesterilních podmínkách.

Termoterapie horkým vzduchem byla provedena v České republice v roce 2009 na infikovaných broskvoních (Křižan a kol., 2009). Principem je umístění celých kontejnerovaných rostlin do termokomory a následné působení vysokých teplot (30 až 40 °C) na rostliny po blíže specifikovanou dobu (Koubouris a kol., 2007). Broskvoně hůře snášejí působení vysokých teplot než meruňky. Nejvhodnější teplotou, kterou přežilo 87 % rostlin, je 32/30 °C. Doba působení těchto teplot byla 45 dní. Po provedení termoterapie následuje převedení apikálních částí do *in vitro* kultury a izolace vrcholových meristémů (Křižan a kol., 2009).

Termoterapie horkou vodou byla provedena k ozdravení rostlin od evropské žloutenky peckovin. Bylo použito horké vody o teplotě 45 °C působící na rostlinu 75 minut (Křižan a kol., 2008).

### 3.4.2.2 *Termoterapie in vitro*

Principem termoterapie *in vitro* je působení vysokých teplot na části infikovaných rostlin převedených do sterilních podmínek (Loebenis a Katis, 2015). Během působení vysokých teplot dochází k intenzivnějšímu přirůstání vrcholových částí, které jsou následně izolovány (Křížan a kol., 2005).

U rostlin z rodu *Prunus* byla termoterapie *in vitro* úspěšně aplikována k ozdravení od *Prune dwarf virus* z *Prunus mahaleb* L. (Saponari a kol., 1999), *Plum pox virus*, *Prune dwarf virus* a *Prunus necrotic ringspot virus* z *Prunus domestica* L. (Laimer a kol., 2006) a *Prunus necrotic ringspot virus* z *Prunus domestica* L. (Dziedzic, 2008).

Při ozdravování broskvoní je využíváno působení teplot 37 až 38 °C po dobu 21 až 22 dní (Gella a Errea, 1998; Stein a kol., 1991).

### 3.4.3 Chemoterapie (chemotherapy)

Principem chemoterapie je využití chemických látek (tzv. antivirotik) přidávaných do kultivačního média k zastavení množení viru. Po určené době působení antivirotik na rostlinu jsou odebrány apikální části a přeneseny na nové médium bez přídavku antivirotik (Křížan a kol., 2012).

Mezi nejčastěji využívaná antivirotika řadíme azidothymidin, acykloguanosin, acyklovir, 2-thiouracil a ribavirin. Vysoká koncentrace některých antivirotik v médiu může mít na rostliny toxické účinky (Loebestein a Katis, 2015).

Při ozdravování *Prunus domestica* L. od *Plum pox virus* je využíváno koncentrace ribavirinu v médiu 40 až 60 mg · l<sup>-1</sup> média. Při této koncentraci a době působení 6 týdnů je možno obdržet s následnou izolací apikálních částí bezvirózní rostliny (Paunovic a kol., 2007). Při ozdravování meruněk byla použita koncentrace ribavirinu 5 mg · l<sup>-1</sup> média při délce působení 12 až 20 týdnů (Polák a Hauptmanová, 2008).

### 3.5 Kryoprezervace

Rostlinná biodiverzita je zásadní pro lidský život. Více než 50 000 druhů je používáno jako potrava nebo pro medicínální potřeby. Dostupnost široké škály biologického materiálu je nezbytná pro moderní šlechtění, proto bylo vyvinuto několik metod uchování genetických zdrojů. Tradiční způsob uchování cenných klonů a kultivarů je založen na pěstování v polních podmínkách, kde jsou rostliny vystaveny patogenům a mohou být kompletně ztraceny v důsledku nepříznivých růstových podmínek (Al-Khayri a kol., 2016). Těmto rizikům se vyhýbají metody konzervace rostlinných zdrojů *ex situ*. Mezi způsoby uchovávání rostlinných zdrojů *ex situ* patří *in vitro* kultivace, konzervace zpomaleným růstem v podmínkách *in vitro* a kryoprezervace (Dotlačil, 2005; Al-Khayri a kol., 2016).

Kryoprezervace je způsob dlouhodobého skladování rostlinného materiálu při extrémně nízké teplotě (Wang a kol., 2008a; Vsuo, ©2015-2017b) s nízkými riziky ztráty skladovaných vzorků (Al-Khayri a kol., 2016). Zvolená forma skladování se liší v závislosti na rostlinném druhu a důvodu skladování. Je možno skladovat semena, pyl, rostlinné vrcholy, dormantní pupeny, zygotická a somatická embrya, kalusy a kalusové kultury (Reed, 2008).

Rostlinný materiál je možno skladovat při teplotě  $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$  v tekutém oxidu uhličitém, v hlubokomrazících mrazácích při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , v parách tekutého dusíku při  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  nebo v tekutém dusíku (Chawla, 2002). Obvykle je jako chladicí médium využíváno tekutého dusíku (Wang a kol., 2008a). Kapalný dusík je bezbarvá kapalina bez zápachu. Jedná se o nehořlavou látku. Bod tání tekutého dusíku je při  $-210\text{ }^{\circ}\text{C}$  a bod varu při  $-195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Linde Vítkovice, 2004).

Dlouhodobé uchování rostlinného materiálu je umožněno pozastavením buněčného dělení a metabolických procesů vlivem velmi nízké teploty. Výhodou tohoto skladování je také úspora místa a velmi nízké nároky na údržbu skladovaného materiálu (Wang a kol., 2008a). Kryoprezervace eliminuje nutnost pravidelného obnovování kolekcí rostlin, a tím snižuje riziko genetických změn způsobovaných chorobami a škůdci, klimatickými podmínkami nebo znečištěním. Snižuje také riziko poklesu produktivity, který je spojován s dlouhodobým trváním kultury (Al-Khayri a kol., 2016). Rostliny převedené do *in vitro* podmínek jsou pro proces kryoprezervace vhodné z hlediska jejich snadné manipulace, dostupnosti i mimo vegetační období a lepší

regenerovatelnosti po dlouhodobém skladování v kapalném dusíku (Wang a kol., 2008a).

Při kryoprezervaci se setkáváme s dvěma hlavními problémy, které mohou vést k nezvratnému poškození rostlinného materiálu. Jedná se o porušení buněčné struktury vlivem tvorby ledových krystalů a dehydrataci (Faltus a kol., 2005).

K porušení buněčné struktury buněk vlivem tvorby ledových krystalů při zmrazování rostlinného materiálu může docházet při použití klasické metody kryoprezervace (dvoustupňová metoda kryoprezervace). V případě mrznutí intracelulární vody dochází k poškození buňky proniknutím ledových krystalů do membránové struktury (Wang a kol., 2008a), naopak při mrznutí vody extracelulární si buňka zachovává životnost. Pro podpoření mrznutí vody extracelulární se používá otužení materiálu před samotným zamrazováním a poklesem obsahu vody v rostlinných pletivech (Faltus a kol., 2005). Otužování obvykle probíhá kultivací rostlin při teplotě 4°C (Baldwin a kol., 1998).

Kritickým krokem u vitrifikačních metod je proces dehydratace vzrůstných vrcholů před ponořením rostlin do kapalného dusíku. Dehydratace vzorku je nutná z hlediska tvorby ledových krystalů (Wang a kol., 2008a).

Dehydratace může být provedena několika odlišnými způsoby – vystavením samotných nebo eknapsulovaných vzrůstných vrcholů vysoce koncentrovanému roztoku (např. PVS2 – Plant Vitrification Solution no. 2) nebo vysoušením vzduchem (Wang a kol., 2008a). V případě silné dehydratace buňka odumírá (Faltus a kol., 2005).

### **3.5.1 Kryoprotektanty (kryoprotektiva)**

Kryoprotektanty jsou látky, které napomáhají rostlinnému materiálu překonat extrémní teploty při působení tekutého dusíku. Přídavek kryoprotektantů kontroluje tvorbu ledových krystalů v rostlinné buňce a chrání ji před nadměrnou dehydratací (Chawla, 2002). Zvyšují množství osmoticky aktivních látek v buňce (Reed, 2008).

Některé kryoprotektanty se v buňce vyskytují přirozeně a napomáhají rostlině přežití nízkých teplot během zimy. Přirozeně vyskytujícími se protektanty jsou cukry, proteiny a aminokyseliny (Trigiano a Gray, 2011).

Jako první kryoprotektant pro kryoprezervaci byl použit glycerol v roce 1949 k ochraně ptačích spermií před mrazem (Polge, 1949). Nejvíce používanými

kryoprotektanty jsou DMSO (dimethyl sulphoxide), glycerol, etylenglykol, sacharóza (Vsuó, ©2015-2017a) a metanol. Občas je také využíváno etanolu (Reed, 2008).

Kryoprotektanty dělíme na látky se schopností proniknout do buněk (DMSO) a látky bez schopnosti proniknout do buněk (glycerol, sacharóza). Kryoprotektanty pronikající do buněk nahrazují molekuly vody v buňce. Kryoprotektanty, které nejsou schopny proniknout do buněk, odstraňují vodu z buňky pomocí osmózy (Ostró a kol., 2009). V případě použití kryoprotektantů, které nepronikají do rostlinné buňky, může docházet k osmotickému poškození buňky (Reed, 2008).

DMSO je velmi účinným kryoprotektantem. Mezi jeho vlastnosti patří nízká molekulová hmotnost, dobrá rozpustnost, netoxičita při nízkých koncentracích, snadné pronikání do buněk a jednoduché vymývání z prostředí buňky (Chawla, 2002).

### **3.5.1.1 Vitřifikační roztoky**

Kombinace kryoprotektantů tvoří vitřifikační roztoky využívané při vitřifikačních metodách kryoprezervace.

Mezi nejvíce využívané vitřifikační roztoky je řazen PVS2, MPVS a roztok podle Langis a Steponkus (Langis a Steponkus, 1990).

Plant Vitrification Solution no. 2 (PVS2) je obecně používán pro rostliny z mírného i tropického pásma. Chrání buňky dvěma kryoprotektivními mechanismy – nahrazuje celulární vodu a mění vlastnosti zbývající vody v buňce při procesu mrznutí (Reed, 2008). PVS2 je složen z etylenglykolu (15 % w/v), glycerolu (30 % w/v) a DMSO (15 % w/v) v 0,4 M sacharóze (Sakai a kol., 1991).

Plant Vitrification Solution (PVS1) je modifikací PVS2. Je složen z etylenglykolu (13 % w/v), glycerolu (19 % w/v), propylenu (13 % w/v) a DMSO (6 % w/v) (Uragami a kol., 1989).

Malus Plant Vitrification Solution (MPVS) má složení jako plant vitřifification solution obohacené o propylenglykol (Sufferheld a kol., 1991).

Vitřifikační roztok dle Langis a Steponkus (1990) je složen z etylenglykolu (24 % w/v), sorbitolu (30 % w/v) a hovězího séra albuminu (30 % w/v) rozpuštěného ve vodě (Langis a Steponkus, 1990).

### **3.5.2 Metody kryoprezervace**

Kryoprezervaci dělíme z hlediska rychlosti zchlazování do dvou základních skupin – dvoustupňovou metodu kryoprezervace a vitrifikační metody (Vsuo, ©2015-2017a, Vsuo, ©2015-2017b).

#### ***3.5.2.1 Dvoustupňová metoda kryoprezervace (metoda řízeného zchlazování)***

První použitou kryoprezervační technikou byla metoda řízené rychlosti zchlazování (Controlled rate cooling). Byla poprvé použita v roce 1980 (Withers a King, 1980). Metoda je vhodná k uchování velkých rostlinných kolekcí (Reed, 2008) a je využívána především u rostlin schopných přežít v minusových teplotách (Bilavčík a kol., 2005). Nevýhodou je potřeba speciálního vybavení (nákladné zařízení pro programovatelné mrznutí) a nízká aplikovatelnost na tropické druhy rostlin (Reed, 2008, Faltus a kol., 2005).

Při této metodě je využíváno řízeného poklesu teploty na -30 až -40 °C (Vsuo, ©2015-2017a), kdy dochází k promrzání pletiv a mrazové dehydrataci (Bilavčík a kol., 2005). Začíná extracelulární mrznutí a postupné vymrzání volné vody z buněk (Faltus a kol., 2012a). Rychlost mražení závisí na velikosti rostlinného vzorku. Abdin a kol. uvádí rychlost zamrazování 0,5 až 50 °C za minutu, avšak při použití rychlosti poklesu teploty vyšší než 2 °C za minutu dochází ke snižování počtu regenerujících rostlin (Abdin a kol., 2017). Pokud je v této fázi zamrazování provedeno vyšší rychlostí, než vyžaduje konkrétní rostlinný materiál, nastává možnost krystalizace vody. Naopak při nízké rychlosti zmrazování může dojít k letálnímu poškození buněk dehydratací. Po dosažení teploty -40 °C nastává druhý krok zamrazování materiálu – ponoření do tekutého dusíku. V tomto kroku dojde k vitrifikaci cytoplasmy. Rychlost ohřevu rostlin musí být vysoká, jinak dojde ke krystalizaci vody (Trigiano a Gray, 2011).

Základní protokol obsahuje tyto kroky: kultivace rostlin *in vitro*, aklimace rostlin se střídajícími se teplotami 22 °C a -1 °C, izolace 1 mm velké apikální části rostliny a působení kryoprotektantu (5% DMSO) v médiu po dobu 48 hodin v chladných podmínkách, přidání dalších kryoprotektantů na růstové vrcholy s působením 30 minut, ponechání rostlin při teplotě 0 °C po dobu 30 min, řízené zchlazování na teplotu -40 °C rychlostí 0,1 až 0,5 °C za minutu, působení tekutého dusíku, rozmrazení vzorků v 45 °C vodě po dobu 1 minuty a následné ponoření do vody o teplotě 25 °C po dobu 2 minut, regenerace rostlin (Reed, 2008).

Mezi nejčastěji využívané kryoprotektanty při této metodě patří DGS (1 M DMSO, 1 M glycerol, 1 M sacharóza), DGP (1 M DMSO, 1 M glycerol, 2 M prolin), DGSP (1 M DMSO, 1 M glycerol, 1 M sacharóza, 1 M proline), DGlú (2,5 M DMSO, 1,1 M M D-glukóza), DMSO (5 % nebo 10 %), PGD (10 % PEG, 10 % glukóza, 10 % DMSO), DMSO-sucrose (10 % DMSO, 0,6 M sacharóza) (Trigiano a Gray, 2011).

### 3.5.2.2 *Vitrifikační metody*

První vitrifikační metoda byla objevena v roce 1989 (Uragami a kol., 1989). Od té doby se vitrifikační metody staly nejvíce využívanými kryoprezervačními metodami (Abdin a kol., 2017).

Vitrifikační metody jsou založeny na principu tvorby biologických skel (Bilavčík a kol., 2005). Vitrifikace je přeměna vody do pevného stavu bez tvorby krystalů (Reed, 2008). Voda ve skelném stavu je charakteristická vysokou viskozitou (1013 Pa) a pomalou difuzí molekul (Bilavčík a kol., 2005). Při přechodu vody v amorfni sklovitou hmotu je omezeno poškození buněk vlivem tvorby intracelulárního ledu (Vsuo, ©2015-2017a, Vsuo, ©2015-2017b).

Vitrifikace vody v biologickém materiálu závisí na vzrůstající hustotě buněčného roztoku (Reed, 2008). Čistou vodu je těžké vitrifikovat (Schneider, 2010). Vitrifikační stav je velmi nestabilní, v důsledku ohřívání může dojít k vytvoření krystalického ledu. Z tohoto důvodu se využívá rychlého rozmrazování vzorků, které vede k vyššímu procentu přeživších rostlin (Reed, 2008). Při rychlém ponoření rostlinných částí do kapalného dusíku dojde k poklesu teplot sta až tisíce stupňů Celsia za minutu (Bilavčík a kol., 2005).

Provedení vitrifikačních metod je možné, pokud dojde ke zvýšení buněčné viskozity, při které bude inhibována tvorba ledových krystalů po vystavení vzorku kryogenním teplotám. K dosažení správné viskozity buněk jsou používány dva principy – přidavek ktyoprotektivních aditiv ve velmi vysoké koncentraci a odstranění vody evaporací a osmotickou dehydratací (využíváno při alginátové enkapsulaci). V praxi jsou tyto dva principy často kombinovány. (Reed, 2008).

Nejčastěji používanými kryoprotektanty při vitrifikačních metodách jsou sacharóza (0,75 M), PVS 2 a PVS 3 (40 % glycerol, 40 % sacharóza) (Trigiano a Gray, 2011). Použití vitrifikačních roztoků často předchází použití LS roztoků (loading



solution – ve 100 ml roztoku 14,37 ml glycerolu a 13,68 g sacharózy), které mají osmoprotektivní funkci. Doba působení LS bývá obvykle 30 minut při pokojové teplotě (Abdin a kol., 2017).

Detekci skelného stavu je možné provést několika způsoby – vizuální metodou, nízkoteplotní skenovací elektronovou mikroskopií, nukleární magnetickou rezonancí a termickými metodami. Vizuální metoda je využívána pro čiré roztoky, avšak není plně spolehlivá. Nízkoteplotní skenovací elektronová mikroskopie umožňuje lokalizaci skelných a krystalických oblastí v rostlinném materiálu. Mezi metody termické patří diferenční termická analýza, termomechanická analýza a diferenční kompenzační kalorimetrie (Bilavčík a kol., 2005).

Diferenční kompenzační kalorimetrie – differential scanning calorimetry DSC. Jedná se o nejcitlivější metodu pro určení fázových přechodů a skelného stavu (Vsuo, ©2015-2017a). Metoda zkoumá tepelné vlastnosti vzorku při nastaveném teplotním programu, teplotu tání, teplotu skelného přechodu, různé druhy krystalizace, tepelnou kapacitu a tepelnou degradaci (Kučerik, 2011). Při přechodu vzorku do skelného stavu dochází ke změně tepelné kapacity. Teplota, při které dochází k přechodu vody do skelného stavu, se nazývá teplota skelného přechodu – glass transition temperature,  $T_g$  (Reed, 2008). Vzorek je v přístroji ohříván nebo chlazen společně se vzorkem kontrolním v inertní atmosféře (Kučerik, 2011). Diferenční kompenzační kalorimetrie měří teplo uvolněné či přijaté rostlinným vzorkem při řízeném lineárním zchlazování a ohřevu. Zchlazování nejčastěji probíhá rychlostí 10 °C za minutu. Rozsah teplot měřitelných přístrojem je řádově od -150 °C do 700 °C. Hodnota  $T_g$  se určuje při ohřevu vzorku (Bilavčík a kol., 2005).

Původně byla metoda zmrazování buněk s absencí ledových krystalů používána pro živočišné tkáně (Fahy, 1986), následně byla metoda vyzkoušena také na tkáně rostlinné (Sakai, 2004). V porovnání s klasickou metodou kryoprezervace jsou vitrifikační metody vhodnější k uchování rostlinných orgánů (vegetační vrcholy, embrya) obsahující různé typy buněk (Faltus a kol., 2005).

Mezi vitrifikační metody patří enkapsulační dehydratace, kapková vitrifikace, desikace a metoda využívající vitrifikačních roztoků (Bilavčík a kol., 2005). V praxi může dojít ke kombinaci těchto metod, jako např. enkapsulace – vitrifikace, která byla použita na kryoprezervaci karafiátů (Tannoury a kol., 1991).

**Enkapsulační dehydratace** (Encapsulation dehydration) je poměrně novou vitrifikační metodou. Poprvé byla popsána v roce 1990 (Farbe a Dereuddre, 1990). Jedná se o metodu, při níž jsou vzrůstné vrcholy obaleny (enkapsulovány) alginátem sodným. Po obalení vrcholů následuje předkultivace na médiu s vyšším obsahem sacharózy (Vsuo, ©2015-2017a, Vsuo, ©2015-2017b, Bilavčík a kol., 2005). Délka trvání předkultivace je 1 až 7 dní. Dehydratace vzrůstných vrcholů probíhá nad silikagelem nebo v proudu sterilního vzduchu v laminárním boxu. Snížení obsahu vody v rostlinném materiálu a v alginátové kapsuli má velký vliv na tvorbu ledových krystalů v průběhu zamrazování vzorku a jeho odtávání. Po dehydrataci vzorku na obsah vody 20 % (závisí na rostlinném materiálu) následuje zmrazování vzorků přímým ponořením do kapalného dusíku (Faltus a kol., 2005). Enkapsulace chrání rostliny během procesu vitrifikování (Abdin a kol., 2017). Před aplikací enkapsulace je možné zařadit přípravnou fázi otužování rostlin (Vsuo, ©2015-2017a, Vsuo, ©2015-2017b). Rozmrazování vzorků probíhá rychlým ponořením do 40 °C teplé vody, které umožňuje snadnější překonání fáze tvorby ledových krystalů. Doba rozmrazování je 1 až 2 minuty (Bilavčík a kol., 2005). Metoda je aplikovatelná na rostliny mírného i tropického klimatu (Engelmann, 1997), avšak ne všechny rostliny jsou tolerantní k tak vysoké koncentraci sacharózy (Reed, 2008). Metoda enkapsulační dehydratace je využívána k zamrazování buněčných suspenzí a somatických embryí (Tessereau a kol., 1994). Výhodou metody enkapsulační dehydratace je vysoká regenerace vzorků po provedení kryoprezervace (Abdin a kol., 2017).

**Kapková vitrifikace** (Droplet vitrification) je metoda, při níž je zamrazovaná rostlina přenesena na hliníkový plíšek společně s kapkou kryoprotektantu a ponořena do kapalného dusíku (Vsuo, ©2015-2017a, Bilavčík a kol., 2005). Kapková vitrifikace byla speciálně vyvinuta pro kryoprezervaci meristému *Manihot esculenta* Crantz (Kartha, 1985). Po použití LS a PVS roztoků jsou rostlinné vzorky ponechány společně s kapkou kryoprotektantu na vysterilizované hliníkové fólii nastříhané na malé části. Následně je celá hliníková folie i s rostlinnými vzorky ponořena do kryozkumavky s kapalným dusíkem. Po kryoprezervaci jsou vytaženy celé hliníkové plíšky a rozehráty (Abdin a kol., 2017). Výhodou kapkové vitrifikace s použitím hliníkového plíšku je rovnoměrné mrznutí rostlinného materiálu vlivem dobré tepelné vodivosti hliníku (Kartha, 1985) a možnost využití této metody pro tropické rostliny, které je jinak těžké uchovávat v tekutém dusíku (Panis a kol., 2005).

**Desikace** je nejjednodušší vitrifikační metodou. Je použitelná u rostlinného materiálu, který je schopen přežít silnou dehydrataci – zygotická embrya, pupeny ovocných dřevin. Vysoušení probíhá v proudu vzduchu laminárního boxu nebo za použití silikagelu. Kryogenním teplotám jsou vystavovány vzorky s obsahem vody 10 až 20 % (Faltus a kol., 2005).

**Metoda využívající vitrifikačních roztoků** (vitrifikační metoda) je využívána pro vegetační vrcholy, buněčné suspenze a somatická embrya (Sakai, 1995). Poprvé byla použita v roce 1991 (Sakai a kol., 1991). Při této metodě je rostlinný materiál ponořen do silně koncentrovaných vitrifikačních roztoků a následně vystaven kryogenním teplotám. Vitrifikační roztoky obsahují kryoprotektanty. Nejčastěji jsou jako vitrifikační roztoky používány PVS2, MPVS a vitrifikační roztok dle Langis a Steponikus (Bilavčík a kol., 2005). Po zamrazení vzorků následuje rychlé rozmrazení a vymytí kryoprotektantů. Výhodou je přístrojová a časová nenáročnost. Rostliny lze vystavit kryogenním teplotám i bez přípravné fáze otužování. Nevýhodou je toxicita některých vitrifikačních roztoků (Faltus a kol., 2005). K úspěšnému provedení této metody také patří opatrné načasování změn jednotlivých vitrifikačních roztoků (Reed, 2008).

**Cryo – plate metoda** je metoda vyvinutá v roce 2011. Kombinuje enkapsulační dehydrataci a kapkovou vitrifikaci. Růstové vrcholy jsou přilepeny tenkou vrstvou alginátu vápenatého na hliníkové plíšky. Následně je na ně působeno LS roztokem a PVS roztokem. Zamrazování je provedeno přímým ponořením plíšku do tekutého dusíku. Rychlost zamrazování je (jako v případě kapkové vitrifikace) velmi vysoká, neboť rostlinný materiál přichází do přímého styku s tekutým dusíkem (Engelmann, 2014).

Kryogenní techniky byly úspěšně aplikovány na velké množství rostlinných druhů včetně zemědělských a zahradnických plodin z tropického i mírného pásma. Kryoprezervace vzrůstných vrcholů je využívána v některých genobankách pro dlouhodobé skladování genetických zdrojů vegetativně množených rostlin jako např. *Solanum tuberosum* L. v Německu a v Peru v International Potato Center, *Musa* spp. v Belgii nebo *Pyrus communis* L. v USA.

Některé kryoprezervační techniky mohou být speciálně navrženy pro eliminaci patogenů z rostlinného materiálu (Wang a kol., 2008a).

### **3.5.3 Krvoprezervace broskvoní**

Kryoprezervace za pomoci enkapsulační dehydratace byla na broskvoních použita v roce 2011 z důvodu nalezení vhodného kryoprezervačního protokolu pro tento ovocný druh. Byly použity apikální segmenty kultivarů broskvoní 'Summer Grand', 'San Giorgio' a 'Babygold 6' převedené do *in vitro* podmínek. Apikální segmenty ve velikosti 2 mm byly enkapsulovány v 3% alginátových kuličkách a kultivovány po dobu 1, 3, 5 a 7 dní v tekutém médiu obsahujícím sacharózu v koncentraci 0,5 M, 0,75 M, 1 M a 1,25 M. Vysoušení vrcholů probíhalo pomocí silikagelu po dobu 0, 4, 6, 9, 14, 20 a 24 hodin.

Po vysoušení následovalo umístění rostlinných vzorků do kryozkumavek a ponoření do tekutého dusíku. Doba působení tekutého dusíku byla 24 hodin. Rozmrazování vzorků probíhalo v proudu vzduchu v laminárním boxu. Po rozmrazení vzorků byly rostliny umístěny do Petriho misek s kultivačním médiem QL a ponechány v běžných kultivačních podmínkách bez přítomnosti světla po dobu jednoho týdne, následně po dobu 15 dní při nízké světelné intenzitě. Po přesunutí rostlin na nové QL médium byly nastaveny standardní světelné podmínky pro kultivaci broskvoní.

Hodnocení životnosti rostlin proběhlo po 7 dnech od působení tekutého dusíku. Stanovení životnosti proběhlo pomocí FDA (fluorescein diacetate). Hodnocení počtu regenerantů proběhlo 75 dní po rozmrazení vzorků. Bylo zjištěno, že s klesajícím procentem vody v rostlině se zvyšuje procento přeživších a regenerujících rostlin po aplikaci kryoterapie. Životnost broskvoní rapidně klesá při dosažení 17% vody v rostlině. Největší procento živých a regenerujících rostlin vykazovaly všechny tři kultivary při dehydrataci na 19 – 20% vody v rostlinném materiálu (Damiano a kol., 2011).

## 3.6 Kryoterapie

Kryoterapie růstových vrcholů je nová metoda eliminace patogenů založená na kryoprezervačních technikách. Rostlinné choroby způsobované viry, viroidy, fytoplasmami a bakteriemi jsou problematické u vegetativně množených rostlin z důvodu jejich snadného přenosu z generace na generaci (Wang a kol., 2008a).

### 3.6.1 Princip kryoterapie

Principem kryoterapie je poškození diferencovaných buněk obsahujících virové částice za použití krátkého působení tekutého dusíku a následná regenerace meristematických buněk v bezvirózní rostlinu (Engelmann a Dussert, 2013; Loebestein a Katis, 2015; Wang a Valkonen, 2009). K ozdravení explantátu dojde za předpokladu, že nediferencované meristematické buňky nejsou infikovány virem (Faltus a kol., 2012a)

Výsledkem kryoterapie je vysoké procento rostlin v bezvirózním stavu. Metodou kryoterapie lze ozdravit rostlinu od virů, fytoplasm i bakterií. Získání ozdravené rostliny je možné za předpokladu nerovnoměrného rozmístění virů v rostlině. (Reed, 2008). V infikované rostlině je nejmladší část rostliny (meristém) bezvirózní nebo obsahuje jen malou koncentraci virů či fytoplasm. Se vzrůstající vzdáleností od meristému rostliny stoupá množství virových částic (Wang a kol., 2008a). Nerovnoměrnost rozmístění viru v rostlině je spojena s pohybem viru v rostlinném materiálu. Virus se po rostlině pohybuje pomocí vaskulárního systému. V meristému samotném není ale vaskulární systém doposud vyvinut, proto je znemožněna infekce meristému touto cestou. Nepřítomnost viru v meristému je také podpořena vysokou metabolickou aktivitou buněk v aktivně se dělícím meristému, která zabraňuje replikaci viru. Replikace viru je také inhibována vysokou koncentrací endogenního auxinu v meristému (Bhojwani a Razdan, 1996).

Nerovnoměrného rozmístění viru v rostlině využívá také metoda eliminace virů pomocí izolace meristémů a jejich následná regenerace v podmínkách *in vitro*. Pro tuto metodu je využíváno segmentů 0,1 až 0,25 mm dlouhých v závislosti na druhu rostliny. Taková izolace je však obtížná, časově náročná a regenerace problematická (Wang a kol., 2008a). Růstové vrcholy používané pro kryoterapii jsou definovány přítomností apikálního nebo laterálního meristému ve velikosti 1 až 1,5 mm se třemi až čtyřmi listovými primordii (Reed, 2008). Meristematické buňky jsou schopny regenerace a

tvorby dceřiných buněk, které následně diferencují a tvoří rostlinné orgány. Meristematické buňky k sobě přiléhají a jsou charakteristické velkým jádrem, značným množstvím cytoplasmy a vysokou intenzitou látkové přeměny (Kincl a kol., 2006). Vakuoly jsou malé a roztroušené v buňce. Protoplasma obsahuje velké množství buněčných organel. Se vzrůstající vzdáleností buněk od apikálního dómu vzrůstá velikost buněk a vakuol, snižuje se naopak množství nukleoplasmy (Wang a kol., 2008a).

V kryoterapii je využíváno letálního poškození buněk jako prostředku k ozdravení rostliny. Buňky lokalizované ve větší vzdálenosti od apikálního dómu jsou s větší pravděpodobností infikované a jsou náchylnější k poškození vlivem působení tekutého dusíku než buňky umístěné blízko v meristematické zóně. Vysoké procento získaných viruprostých regenerantů je dáno schopností přežití buněk apikálního dómu. U meristémových kultur je procento přežívajících a zregenerovaných rostlin vyšší než po aplikaci kryoterapie, avšak procento získaných ozdravených rostlin je vyšší právě po použití kryoterapie (Wang a kol., 2008a).

Během kultivace lze rostlinný materiál připravit na působení tekutého dusíku kultivací v chladových podmínkách. Otužování probíhá při teplotě 2 °C po dobu 7 až 10 dní (Faltus a kol., 2012a).

Testování rostlin na přítomnost viru je prováděno nejčastěji pomocí imunoenzymatického stanovení ELISA. Testování je prováděno po 2 měsících od zakořenění rostliny z její vrcholové části. Pokud ve vrcholové části rostliny nebyly nalezeny žádné virové části, je bazální část rostliny uznána za bezvirózní (Feng a kol., 2013).

Kryoterapie umožňuje ozdravení velkého počtu rostlinného materiálu se ziskem vysokého procenta ozdravených rostlin. K ozdravení rostlin od virových patogenů je zapotřebí dostupnost tkáňové kultury daného druhu rostliny a vhodný kryoprezervační protokol (Loebenis a Katis, 2015).

### 3.6.2 Použití kryoterapie pro eliminaci virů

Jako první použil kryoterapii jako prostředek k získání bezvirózních rostlin Marthe Brison roku 1997. Jako výchozí materiál použil podnož rodu *Prunus* ('Fereley-Jaspi') infikovanou virem *Plum pox virus*. Byl použit kryoprezervační protokol pro metodu řízené rychlosti zchlazování. Jako kultivační médium bylo použito médium Murashige-Skoog (1962). Vitřifikační směs byla použita PVS2 působící 20 až 40 minut. Výsledkem bylo obdržení 45 až 60 % viruprostých rostlin nezávisle na velikosti růstového vrcholu (Brison a kol., 1997).

V České republice byla vytvořena metodika pro ozdravování chmele od *Apple mosaic virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, *Hop mosaic virus*, *Hop latent virus* a *Hop latent viroid*. Metodika vychází z kryoprezervační metody kapkové vitřifikace (Faltus a kol., 2012a). Další metodikou je zpracování postupu pro ozdravování brambor od viru svinutky bramboru a viru Y bramboru (Faltus a kol., 2012b).

Pomocí kryoterapie bylo možné ozdravit povijnici batátovou (*Ipomea batatas* L.) od *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) a *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV). SPFMV a SPCSV jsou nejvíce rozšířenými virovými chorobami na povijnici a způsobují až 90% ztráty při pěstování v polních podmínkách. Pomocí kryoterapie bylo dosaženo 100 % ozdravených rostlin. Při aplikaci izolace meristému bylo dosaženo pouhých 7 až 10 % ozdravených regenerantů (Feng a kol., 2011).

Dalšími viry eliminovanými z rostliny pomocí kryoterapie byly *Potato leaf roll virus* (PLRV) a *Potato virus Y* (PVY). Procenta ozdravených rostlin se liší v závislosti na zvolené metodě kryoterapie v rozmezí od 83 % do 95 % (Wang a kol., 2006).

Úspěšně byla kryoterapie aplikována také na *Musa* spp. k eliminaci *Cucumber mosaic virus* (CMV) a *Banana streak virus* (BSV). Procento ozdravených regenerantů bylo až 90 % (Helliot a kol., 2002). Dalšími rostlinami úspěšně ozdravenými od virů byly *Rubus idaeus* L. (Wang a kol., 2008b), *Citrus* ssp. (Ding a kol., 2008), *Vitis vinifera* L. (Wang a kol., 2003).

### **3.6.3 Použití kryoterapie pro eliminaci fytoplasem a bakterií**

Závislost velikosti růstového vrcholu použitého pro kryoterapii a úspěšnosti ozdravení byla zkoušena na rostlině napadené fytoplasmodou *Sweet potato little leaf* (SPLL). Nejvyšší procento živých rostlin po kryoterapii bylo obdrženo při použití 0,5 až 1,5 mm velkého růstového vrcholu (83 až 87 % živých rostlin) a 1 až 1,5 mm velkého růstového vrcholu (80 až 86 % živých rostlin), oproti tomu při použití vrcholu velkého 0,5 mm přežilo terapii jen 15 % rostlin. Procento ozdravených rostlin u 1 mm velkého apikálu bylo 100 %.

Zelenání citrusů (citrus HLB disease) je způsobeno třemi druhy G- bakterií a je rozšířen ve více než 40 zemích v Asii, Americe a Africe. V Asii je způsoben bakterií *Candidatus Liberibacter asiaticus*, v Africe *Candidatus Liberibacter africanus* a v Americe *Candidatus Liberibacter americanus*. Především napadá rostliny rodu *Citrus*, kumquat (*Fortunella*) a citronečník (*Poncirus*). S úspěšností 98 % získaných bezvirózních regenerantů provedl kryoterapii na pomerančovník čínský (*Citrus chinensis* L. Osbeck) Ding a kol. (2008). Kryoterapie byla také aplikovaná k eliminaci stejné bakterie u *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus grandis* (L.) Osbeck, *Citrus limon* (L.) Burm.f (Wang a kol., 2008a).

## **3.7 Detekce virů**

Dnešní metody detekce jsou založeny na mnoha principech – hodnocení příznaků onemocnění, biologické testy, elektronová mikroskopie, sérologické vlastnosti virových proteinů, zjišťování virové nukleové kyseliny (Špak, 2010).

### **3.7.1 Hodnocení příznaků na rostlinách**

Hodnocení příznaků na rostlinách (symptomatologie) je vizuální metodou detekce virů. Viry jsou hodnoceny dle specifických viditelných příznaků objevujících se na rostlinných orgánech (Brčák, 1983).



### **3.7.2 Biologické testy**

Biologické testy využívají rostlin citlivých na virové infekce. Indikátorová rostlina by měla být co nejvíce příbuzná hostitelské rostlině, ze které je virus přenesen. Virus je přenášen na indikátorovou rostlinu očkováním, roubováním nebo vektory jako např. mšice a křísi. Nevýhodou biologických testů je časová náročnost, vyhodnocení probíhá 1 až 6 měsíců po inokulaci, a nutnost přítomnosti odborníka, který test vyhodnocuje. Pokusné rostliny je nutné prostorově izolovat a chránit proti chorobám a škůdcům (Špak, 2010).

### **3.7.3 Elektronová mikroskopie**

Elektronová mikroskopie identifikuje přítomnosti virů pomocí obarvení izolovaných virionů protilátkami (Dovas a kol., 2001). Příprava preparátu probíhá metodou negativního kontrastu nebo metodou ultratenkého řezu (Špak, 2010). Nevýhodou elektronové mikroskopie je vysoká finanční nákladnost při pořizování přístrojového vybavení, avšak jedná se o jedinou metodu, při níž je výstupem vizualizace tvaru a velikosti viru (Špak, 2010; Rabinowitch a Currah, 2002).

### **3.7.4 Metody založené na sérologických vlastnostech virových proteinů**

Metody založené na sérologických vlastnostech virových proteinů dělíme na sérologické metody a metody imunoenzymatické. Obě metody využívají protilátek vytvořených vložením viru do jiného organismu (nejčastěji králíka). Sérologické metody využívají kompletního antiséra, metody imunoenzymatické využívají izolované imunoglobuliny G (IgG) – specifické protilátky (Špak, 2010).

Imunoenzymatické stanovení (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay – ELISA) je dnes nejrozšířenější metodou využívanou ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení viru. Poprvé byla použita v roce 1976 (Clark a kol., 1976). Metoda má mnoho modifikací, nejčastěji je ale používána dvojitá sendvičová metoda. Je složena z několika kroků: navázání IgG na povrch stěn jamek, promývání promývacím pufrem, navázání testovaného vzorku (předem zhomogenizovaný, k homogenizaci lze použít tekutého dusíku), vymývání desek od rostlinné šťávy, navázání konjugátu IgG a enzymu, opětné promývání, inkubace reakcí enzymovým substrátem a vyhodnocení. Výhodou je dobrá dostupnost diagnostických souprav pro množství ekonomicky významných virů (Špak, 2010). Výsledkem je barevná změna jamky ukazující přítomnost viru (Nayudu, 2008).

### **3.7.5 Metody detekce nukleové kyseliny**

Metody detekce nukleové kyseliny jsou využívány v případech, kdy není známa specifická protilátka viru nebo při nedostatečné citlivosti předešlých metod pro stanovení přítomnosti viru. Zejména je využívána při stanovení virů u ovocných dřevin a drobného ovoce. Mezi metody detekce nukleové kyseliny patří izolace dvouvláknové ribonukleové kyseliny, molekulární hybridizace a polymerázová řetězová reakce (Špak, 2010).

Polymerázová řetězová reakce (PCR – Polymerase chain reaction) byla vyvinuta v roce 1988 (Saiki a kol., 1988). PCR pracuje na principu exponenciálního namnožení určitých úseků DNA v *in vitro* podmínkách. Metoda je složena z následujících kroků: denaturace DNA (RNA) při vysoké teplotě, annealing primerů na cílovou molekulu DNA (RNA), syntéza úseku DNA za použití termostabilní polymerázy (Špak, 2010). Její výhodou je rychlost, vysoká citlivost a univerzálnost (Bhojwani a Dantu, 2013). Metoda je velmi citlivá, dokáže rozpoznat i jednu virovou částici v rostlinném materiálu (Špak, 2010).

Reverse transcription – polymerase chain reaction – RT-PCR je využívána k detekci fytovirů s genomovou RNA. Metoda RT-PCR byla poprvé použita v roce 1990 (Vunsh a kol., 1990). Kritickým krokem je izolace RNA z rostliny (Borja a Ponz, 1992).

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Laboratoř

Pokus byl uskutečněn v explantátové laboratoři na Agronomické fakultě na Ústavu biologie rostlin Mendelovy univerzity v Brně a na Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni pod výzkumným týmem Fyziologie a kryobiologie rostlin.

#### 4.1.1 Vybavení pro kultivaci broskvoní

Laboratoř na Ústavu biologie rostlin Mendelovy univerzity je vybavena pro kultivaci rostlin *in vitro* veškerým potřebným vybavením.

Laboratoř je složena z místnosti určené k přípravě kultivačních médií a zároveň kultivačním stojanem, místnosti určené pro manipulaci s laboratorním sklem a místnosti určené k manipulaci se sterilním materiálem a skladem kultivačních médií.

Místnost pro přípravu kultivačních médií je vybavena chladničkou a mrazákem, laboratorním sklem potřebným pro přípravu médií (Erlenmeyerovy baňky, skleněné tyčinky, odměrné válce, kultivační baňky o objemu 370 ml určené pro potravinářské účely, pipety) a drobnými nástroji potřebnými k přípravě médií (plastové váženky, skalpely, nůžky, lžičky, pH metr, míchadla) myčkou pro laboratorní sklo, přepravkami pro uchování laboratorního skla, elektronickým míchadlem s ohřevem, horkovzdušným sterilizátorem a demineralizační soustavou pro úpravu vody. Dále je v místnosti umístěn stojan s policemi pro kultivaci rostlin, který je vybaven kultivačními zářivkami ovládanými spínacími hodinami. V místnosti je také umístěna klimatizační jednotka.

Místnost pro manipulaci s kultivačními médii je vybavena třemi autoklávy a prostorem pro likvidaci použitých médií.

Místnost pro manipulaci se sterilním materiálem je vybavena dvěma laminárními boxy, klimatizační jednotkou, sterilizační UV-C zářivkou ovládanou spínacími hodinami a policemi pro uchování kultivačních médií. Pro práci s explantáty v prostředí laminárního boxu jsou využívány sterilní pracovní nástroje (kovové pinzety, skalpely a nůžky) umístěné ve skleněném odměrném válci, Petriho misky a plynový kahan.

V laboratoři jsou používány běžné chemické látky potřebné při práci s *in vitro* kulturami.

#### **4.1.2 Vybavení pro proces kryoterapie**

Laboratoř vybavená pro proces kryoterapie je složena z místnosti určené pro přípravu médií, místnosti pro práci s *in vitro* kulturami, kultivační místností, skladem tekutého dusíku v Dewarových nádobách a místnosti pro měření tepelných vlastností rostlinného materiálu.

Kromě klasického vybavení využívaného pro práci s *in vitro* kulturami (autokláv, kultivační box, laminární box, pH metr, kuličkový sterilizátor nástrojů apod.) disponuje laboratoř vybavením pro práci s tekutým dusíkem – Dewarovy nádoby, polystyrénová nádoba na tekutý dusík, polystyrénová nádoba na kryozkumavky, kryozkumavky, hliníkové plíšky, ochranný obličejový štít.

Laboratoř je také vybavena přístrojem DSC (Diferenční kompenzační kalorimetrie) určeným pro termické analýzy.

Kromě chemických látek běžně využívaných při práci s *in vitro* kulturami byl využit tekutý dusík, LS roztok (2 M glycerol, 0,4 M sacharóza v destilované vodě) a vitrifikační roztoky PVS a PVS s poloviční koncentrací (1/2 PVS)

#### **4.2 Rostlinný materiál**

Výchozím materiálem použitým v pokusu byly rostliny druhu *Prunus persica* (L.) Batsch odrůdy 'Redhaven' převedené do *in vitro* podmínek. Použitý rostlinný materiál pocházel z explantátové laboratoře ústavu Mendeleum Zahradnické fakulty Mendelovy univerzity v Lednici.

Rostliny byly do *in vitro* kultury zavedeny v roce 2013. V červenci roku 2015 byly testovány na přítomnost virů. Použitá varianta pro tento pokus s pracovním označením R57 byla pozitivní na viry *Prunus necrotic ringspot virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus* a *Prune dwarf virus*. Dalšími variantami byly rostliny infikované *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Prune dwarf virus* a *Plum pox virus* s pracovním označením R50 v počtu 1 ks, rostliny s pracovním označením R58 infikované *Apple chlorotic leaf spot virus* a *Prune dwarf virus* v počtu 1 ks, rostliny s pracovním označením R61 infikované *Prunus necrotic ringspot virus* a *Apple chlorotic leaf spot virus* v počtu 1 ks a rostliny s pracovním označením Z64 infikované *Apple chlorotic leaf spot virus* a *Prune dwarf virus* v počtu 1 ks.

### 4.3 Příprava médií

Hlavními médii využitými pro kultivaci rostlin a kryoterapii byla multiplikační média QL (Quoirin a Lepoivre, 1977), QL + ProClin 200, QL + sterilní voda a médium QL se zvýšeným obsahem sacharózy.

#### 4.3.1 Médium QL

Médium QL (Quoirin a Lepoivre, 1977) bylo vybráno jako nejlepší na základě předchozích testů různých médií a jejich variant. Směs makroelementů, mikroelementů, vitaminů a roztoku železa byla připravena zvlášť.

##### 4.3.1.1 *Příprava zásobních roztoků*

Jednotlivé zásobní roztoky byly připraveny pro 40 l média rozpuštěním chemických sloučenin v destilované vodě o laboratorní teplotě. Roztoky byly nadávkovány do plastových zkumavek a skladovány při teplotě -25 °C. Roztok v jedné zkumavce představoval množství makroelementů, mikroelementů nebo vitaminů určené pro 1 l média. Zásobní roztok  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  byl připraven zvlášť a skladován při teplotě 8 °C v uzavřené baňce.

##### 4.3.1.2 *Postup přípravy média*

Obvyklé množství připravovaného média bylo 3 l.

Před samotnou přípravou média byly jednotlivé zásobní roztoky vytaženy z mrazáku a při laboratorní teplotě rozmrazeny. Zároveň bylo odměrným válcem odměřeno požadované množství roztoku železa.

Do cca 1 l destilované vody v Erlenmeyerově baňce o objemu 3 l bylo přidáno 21 g agarů a směs byla přivedena k varu. Následně bylo do baňky přidáno 75 g sacharózy rozpuštěné v cca 250 ml vody, směs makroelementů, směs mikroelementů, směs vitaminů a roztok železa. Nakonec byl do média přidán 6-benzyladenin (BA) v množství 1,2 mg rozpuštěný v kapce 1 N KOH. pH bylo upraveno roztokem 1 N KOH na hodnotu 6,5.

Po upravení pH média bylo horké médium rozlito do předem připravených kultivačních skleniček o objemu 370 ml. Do jedné skleničky bylo nalito cca 50 ml média. Skleničky byly uzavřeny šroubovacími víčky opatřenými molitanovým septem umožňující výměnu plynů v kultivační nádobě a následně vysterilizovány v autoklávu.

#### 4.3.1.3 Složení QL média pro kultivaci broskvoní

##### Makroelementy:

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ :  $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ :  $1200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
 $\text{KNO}_3$ :  $2100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :  $360 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :  $270 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

##### Vitaminy:

Myo-inositol:  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
Thiamin HCl:  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
Kyselina nikotinová:  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
Pyridoxin HCl:  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
Kyselina askorbová:  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
Glycin:  $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
Kyselina citronová:  $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

##### Mikroelementy:

$\text{H}_3\text{BO}_3$ :  $6,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ :  $22,3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :  $0,6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :  $0,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ :  $0,025 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$   
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ :  $0,025 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

KI:  $0,83 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :  $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :  $55 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

##### Ostatní:

BA:  $0,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Agar:  $7000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Sacharóza:  $25000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Výsledné pH 6,5

#### 4.3.2 Médium QL + ProClin 200

V případě přítomnosti kontaminace v kultivační baňce bylo jako záchranné médium použito médium QL (Quoirin a Lepoivre, 1977) s přidavkem komerčního biocidního přípravku určeného pro *in vitro* kultury ProClinu 200 (dostupné na [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)). Pro provedení pokusu bylo toto médium označeno pracovním názvem QL A.

Příprava média QL probíhala způsobem popsaným výše až do kroku úpravy pH média. Před samotnou úpravou pH byl do horkého média přidán ProClin v objemu  $0,5$  až  $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$  média. Po přidání ProClinu bylo klasickým způsobem upraveno pH a připraveno médium na sterilizaci v autoklávu.

### 4.3.3 Média pro krvoterapii

#### 4.3.3.1 *Média se zvýšeným obsahem sacharózy*

Pro počáteční dehydrataci vzrůstných vrcholů pro kryoterapii byla použita média QL se zvýšeným obsahem sacharózy. Média byla připravována postupem popsaným při přípravě varianty média QL bez Proclinu.

Byla připravena ve třech variantách se zvýšeným obsahem sacharózy: 0,3 M (102,68 g sacharózy na 1 média), 0,5 M (171,14 g sacharózy na 1 média) a 0,75 M (256 g sacharózy na 1 média). Po vysterilizování médií v autoklávu byla média v prostředí laminárního boxu přelita do 8,5 cm plastových sterilních Petriho misek. Po vychladnutí média v Petriho miskách byly misky připraveny na transport zafixováním Parafilmem.

#### 4.3.3.2 *Regenerační médium*

Jako regenerační médium bylo použito médium QL (0,4 mg · l<sup>-1</sup>BA) v plastových Petriho miskách s průměrem 6 cm. Následně bylo použito médium QL A připravené do klasických kultivačních skleniček o objemu 370 ml.

## 4.4 **Multiplikace broskvoní**

Do explantátové laboratoře v Brně byly rostliny převezeny v březnu 2016 v množství R50 1 ks, R57 3 ks, R58 1 ks, R61 1 ks a Z64 1 ks z explantátové laboratoře v Lednici, kde byly kultivovány Ing. Kudělkovou.

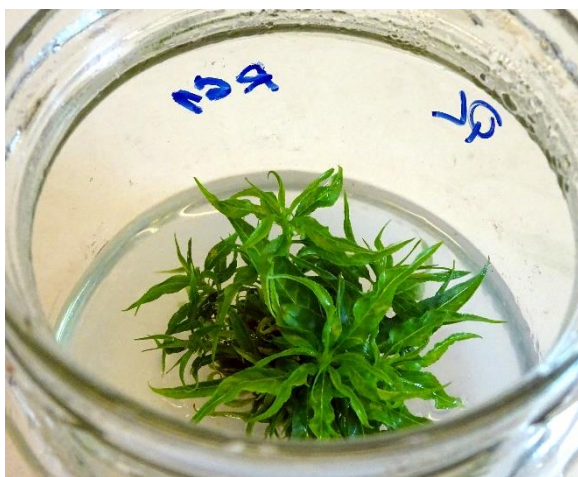


Obrázek 1 Počáteční stav rostlinného materiálu (foto: H. Fronková, 21. 3. 2016)

Pro multiplikaci bylo vybráno médium QL a kultivační baňky o objemu 370 mm. Jako uzávěr baňky byla zvolena potravinářská fólie z důvodu lepší propustnosti světla oproti v laboratoři běžně používaným kovovým šroubovacím vrškům s molitanovým septem.

Rostliny byly kultivovány při světelném režimu 16 h světlo a 8 h tma. Teplota v kultivační místnosti byla udržována na 22 °C. Pro kultivaci broskvoní byly použity zářivky Philips Master TL-D 36W/840.

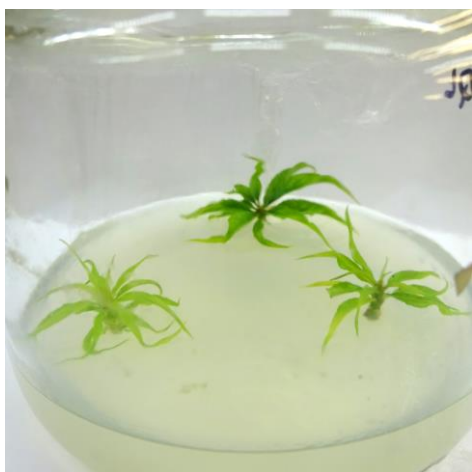
Multiplikace probíhala dvěma základními způsoby: rozdělením mateřské rostliny a rostlin vyrůstajících z axilárních pupenů a rozdělením vysoké nevětvené mateřské rostliny řezem na cca 1 cm dlouhé segmenty.



Obrázek 2 Mateční rostlina připravená k dělení (foto: H. Fronková, 30. 6. 2016)



Obrázek 3 Mateční rostlina připravená k řezu (foto: H. Fronková, 30. 6. 2016)



Obrázek 4 Rostliny získané dělením mateřské rostliny (foto: H. Fronková, 3. 1. 2017)



Intervaly mezi jednotlivými pasážemi rostlin se pohybovaly v rozmezí od 3 do 5 týdnů v závislosti na konkrétním stavu rostliny.

V průběhu multiplikace byly infikované rostliny odstraňovány. Pokud se jednalo o lehkou infekci, byl z rostliny šetrně odebrán apex způsobem, při kterém se pracovní nástroj nedotýkal infikovaného média. Následně byly vrcholy rostlin přemístěny na médium s obsahem ProClinu. Po několikátýdenním působení tohoto média byly rostliny opět převedeny na médium QL bez přídatku ProClinu.

Pro podpoření růstu byla rostlina v kultivační nádobce krátkodobě (na dobu 3 týdnů) přelita sterilní destilovanou vodou do výšky cca 0,5 cm.

#### **4.4.1 Stanovení etylenu, etanu a oxidu uhličitého a rychlosti růstu rostlin**

Stanovení obsahu etylenu, etanu a oxidu uhličitého v plynné složce kultivační baňky bylo provedeno z důvodu interakce těchto plynů a růstových vlastností rostlin v rozdílných kultivačních podmínkách. Měření probíhalo na plynových chromatografech.

Pro měření koncentrace uvedených plynů v atmosféře kultivační nádoby byly zvoleny 4 typy kultivačních podmínek a dvě rozdílná multiplikační média.

Kultivační média pro pokus byla zvolena QL a QL A. Do jednotlivých kultivačních skleniček o objemu 370 ml s připravenými médii byly přeneseny vrcholové části rostlin o velikosti 5 až 19 mm. V jedné kultivační baňce bylo vždy umístěno 5 rostlin. Jako uzávěr kultivačních baněk bylo zvoleno šroubovací kovové víčko se septem umožňujícím odběr plynů pro měření. Skleničky s rostlinami byly uchovány v rozdílných kultivačních podmínkách po dobu 5 týdnů.

Pro první variantu byly zvoleny kultivační podmínky 16 h světlo a 8 h tma při laboratorní teplotě 22 °C (teplo-světlo). Druhá varianta byla uchována při 24 h tma a teplotě 22 °C (teplo-tma). Pro třetí variantu byly zvoleny podmínky 16 h světlo a 8 h tma při teplotě 6 °C (chlad-světlo) a pro čtvrtou variantu byly podmínky nastaveny na 24 h tma a teplotu 6 °C (chlad-tma).

Měření plynů probíhalo po 24 h, 48 h a 72 h od založení pokusu a následně po 10, 17 a 38 dnech od založení pokusu. Pomocí injekční stříkačky o objemu 2 ml byl z kultivační baňky přes septum odebrán plyn. Objem plynu byl pak v injekční stříkačce upraven na 1 ml a vstříknut do plynového chromatografu. Měření etylenu a etanu

probíhalo na plynovém chromatografu od firmy Master DANI Instruments S. p. A., Italy s kapilární 30 m dlouhou kolonou RT-Q-BOND/divinylbenzen s teplotou detektoru 220 °C a teplotou nástřiku 100 °C a kolony 50 °C. Stanovení obsahu oxidu uhličitého proběhlo na plynovém chromatografu CHROM 5 s kartharometrem s náplňovou kolonou o délce 1,5 m plněnou PORAPAKem Q. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny na standard etylenu a oxidu uhličitého v objemu 1 ml ovzduší v prostoru baňky (Prokeš a kol., 2006). Výsledky měření jsou zpracovány graficky.

Stanovení vlastností růstu rostlin bylo provedeno na rostlinách, na kterých byla sledována produkce výše uvedených plynů. Byla sledována rychlost růstu jednotlivých rostlin a množství vytvořených dceřiných rostlin na konci sledované doby trvání pokusu. Pokus trval 4 týdny. Rychlost růstu byla změřena vždy po 1 týdnu, celkem bylo tedy provedeno 5 měření včetně měření kontrolního v den založení pokusu. Výška rostlin byla měřena posuvným měřítkem. Výsledky jsou uvedeny v grafech č. 1 a 2.

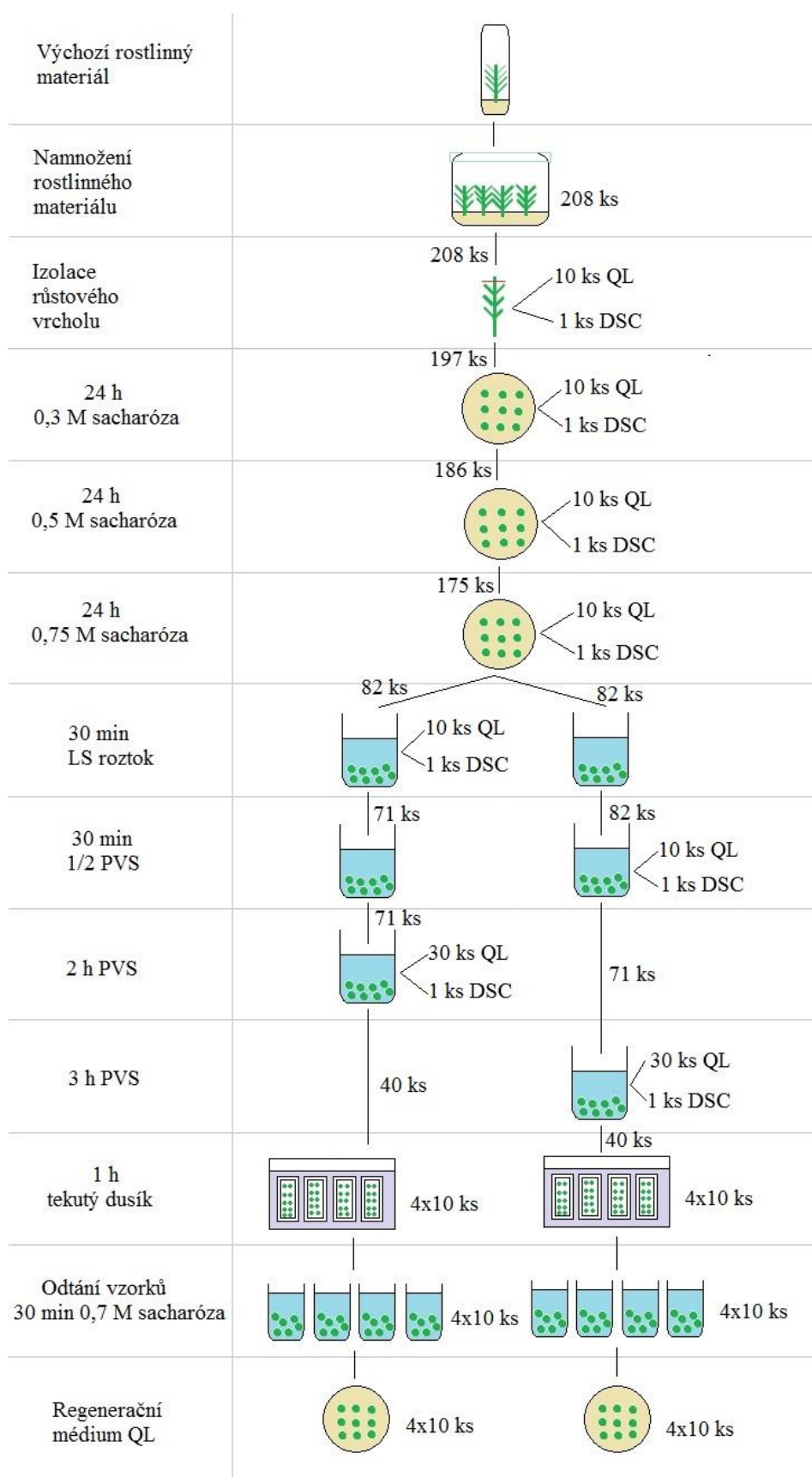
#### **4.5 Příprava rostlinného materiálu a provedení kryoterapie**

Příprava rostlin pro proces kryoterapie a samotná kryoterapie probíhala v následujících krocích:

- 1) Příprava rostlinného materiálu na izolaci vrcholů
- 2) Izolace růstových vrcholů
- 3) Dehydratace růstových vrcholů na médiích se zvýšenou koncentrací sacharózy
- 4) Působení kryoprotektivních roztoků na růstové vrcholy
- 5) Vystavení růstových vrcholů kryogenním teplotám
- 6) Rozmrazení vzorků a přenesení na regenerační média

Kryoterapie byla provedena na Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni pod výzkumným týmem Fyziologie a kryobiologie rostlin.

## Schéma postupu:



Obrázek 5 Schéma pokusu (vytvořila H. Fronková)

Během dehydratace rostlin pomocí sacharózy a následně pomocí vitrifikačních roztoků byla provedena měření teploty tání a obsahu intracelulární vody ve vrcholech na přístroji DSC (diferenční kompenzační kalorimetrie). Současně byly odebírány růstové vrcholy na regenerační média s účelem zjištění životnosti a regenerace rostlin v jednotlivých stupních dehydratace. Vzhledem k časové náročnosti měření a krátké doby působení jednotlivých roztoků bylo nutno rozdělit rostlinný materiál do dvou skupin s odlišnými časy startu pokusu. Měření pak bylo prováděno dle výše uvedeného schématu.

#### Počty rostlin v pokusu:

Fáze pokusu	Celkový počet vrcholů v určité fázi pokusu (ks)	Vrcholy na regeneračním médium (ks)	Měření vrcholů na DSC (ks)
Izolace vrcholů	208	10	1
Médium 0,3 M sacharóza	197	10	1
Médium 0,5 M sacharóza	186	10	1
Médium 0,75 M sacharóza	175	10	1
30 min LS roztok	164	10	1
30 min ½ PVS roztok	153	10	1
2 h PVS	71	30	1
3 h PVS	71	30	1
Působení tekutého dusíku	80	-	-
Rozmrazení a regenerace	80	80	-

Tabulka 1 Počet růstových vrcholů v jednotlivých fázích pokusu

#### **4.5.1 Příprava materiálu a transport**

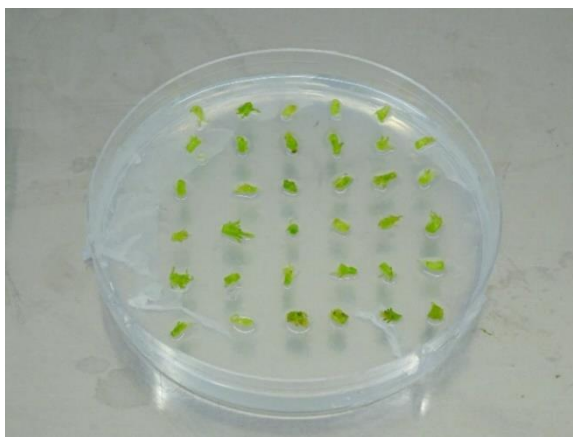
Rostliny byly tři dny před transportem připraveny do nových kultivačních baněk. Příprava probíhala vybráním vitálních rostlin obsahujících vrcholový meristém. Rostliny byly rozděleny na cca 1,5 cm velké vrcholové části a zbývající bazální část.

Vrcholové části byly přeneseny na nové médium v počtu 15 ks vrcholů/baňku a uzavřeny kovovým šroubovacím víčkem. Bazální část byla přenesena na nové médium a ponechána při běžných kultivačních podmínkách.

#### **4.5.2 Izolace vzrůstných vrcholů a dehydratace**

Po transportu na oddělení výzkumného týmu Fyziologie a kryobiologie rostlin byly izolovány vrcholové části rostlin o délce do 3 mm. Celkem bylo izolováno 208 vrcholů. Izolace vzrůstných vrcholů probíhala v prostředí laminárního boxu odstraněním obalových listů a provedením příčného řezu oddělujícího vrchol od zbytku rostliny. Jednotlivé vrcholy byly po izolaci ponořeny do sterilní destilované vody o běžné laboratorní teplotě s účelem zamezení vysychání vrcholů během procesu izolace.

10 ks růstových vrcholů bylo těsně po jejich izolaci přeneseno na regenerační médium QL jako kontrolní vzorek a umístěno do kultivační komory s podmínkami vhodnými k růstu broskvoní. Zároveň byl během izolace odebrán jeden růstový vrchol, který byl použit pro termickou analýzu DSC. Na přístroji DSC byla změřena teplota tání vody obsažené v růstovém vrcholu a množství intracelulární vody v %. Po izolaci byly zbývající vrcholy (197 ks) vysázeny na dehydratační médium s obsahem sacharózy 0,3 M. Na tomto médium byly vrcholy ponechány po dobu 24 hodin při běžných kultivačních podmínkách.

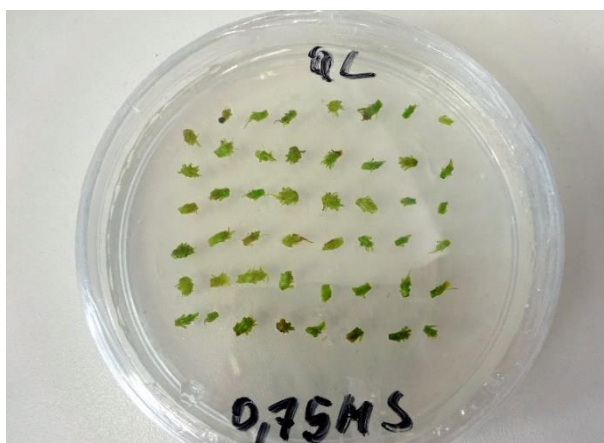


Obrázek 6 Umístění vzrůstných vrcholů na dehydratační médium QL 0,3 M sacharóza (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Po 24 hodinách od přenesení vrcholů na médium s obsahem sacharózy 0,3 M byl odebrán jeden růstový vrchol a změřen obsah vody a teplota tání vzorku. Dále bylo odebráno 10 růstových vrcholů a přeneseno na regenerační médium. Zbývající růstové vrcholy (186 ks) byly přeneseny na médium s obsahem sacharózy 0,5 M a ponechány 24 hodin.

Po 24 hodinách kultivace vrcholů na médiu s obsahem sacharózy 0,5 M byl odebrán jeden růstový vrchol a podroben termické analýze. 10 růstových vrcholů bylo přeneseno na regenerační médium a umístěno do kultivační komory. Zbývající vrcholy (175 ks) byly vysázeny na médium s obsahem sacharózy 0,75 M a ponechány v běžných kultivačních podmínkách po dobu 24 hodin.

Po uplynutí 24 hodin byl odebrán jeden růstový vrchol a byla provedena termická analýza. Zároveň bylo 10 vrcholů vysázeno na regenerační médium a uloženo do kultivační komory. Zbývající vrcholy (164) byly přeneseny na poslední dehydratační médium s obsahem sacharózy 0,75 M. Doba kultivace na tomto médiu byla 24 hodin.



Obrázek 7 Umístění vzrůstných vrcholů na dehydratačním médiu QL 0,75 M sacharóza (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Po 24 h kultivace na médiu s obsahem sacharózy 0,75 M byl odebrán jeden růstový vrchol a byla provedena termická analýza. Dále bylo odebráno 10 růstových vrcholů a přeneseno na regenerační médium.

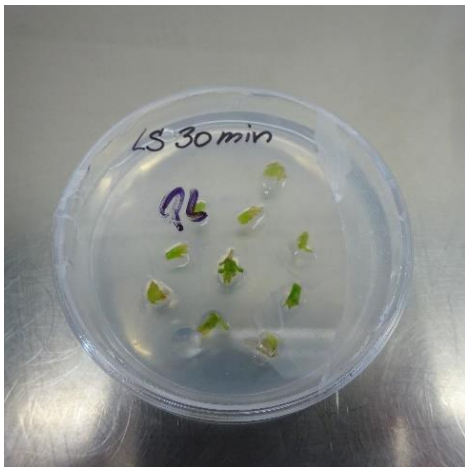
Růstové vrcholy byly rozděleny rovnoměrně na dvě skupiny (82 a 82 ks). Růstové vrcholy varianty 1 byly přeneseny z média s 0,75 M obsahem sacharózy do sterilní kádinky s 40 ml LS roztoku o laboratorní teplotě. Doba působení LS roztoku byla 30 minut. Stejný postup byl aplikován na růstové vrcholy varianty 2 s časovým posunem 45 minut.



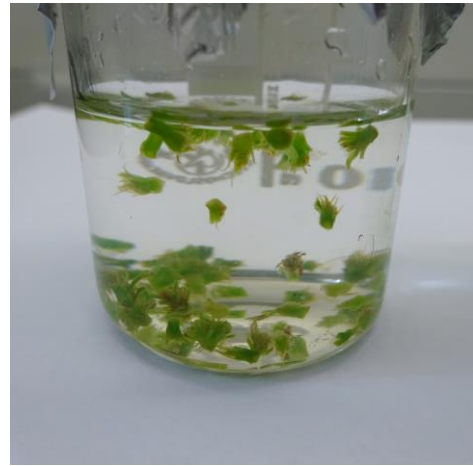
Obrázek 8 Působení LS roztoku na růstové vrcholy (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Po uplynutí doby působení LS roztoku byl z kádinky varianty 1 odebrán 1 růstový vrchol a podroben termické analýze. Dále bylo odebráno 10 růstových vrcholů na regenerační médium a umístěno do kultivační komory. Po odebrání růstových vrcholů na regenerační médium byl z kádinky plastovou pipetou odstraněn LS roztok a nahrazen vitrifikačním roztokem  $\frac{1}{2}$  PVS. Doba působení tohoto roztoku byla 30 minut. Během těchto 30 minut byly vrcholy (71 ks varianta 1) v roztoku několikrát promíchány, aby bylo dosaženo rovnoměrného přístupu roztoku k vrcholům.

U varianty 2 nebylo v tomto kroku provedeno termické měření ani vysázení vrcholů na regenerační médium. Po uplynutí působení 30 minut LS roztoku byl roztok z kádinky odebrán plastovou pipetou a nahrazen vitrifikačním roztokem  $\frac{1}{2}$  PVS s dobou působení 30 minut. Růstové vrcholy (82 ks) byly, stejně jako v případě varianty 1, po dobu působení  $\frac{1}{2}$  PVS roztoku několikrát promíchány.



Obrázek 9 Umístění vzrůstných vrcholů na dehydratační médium (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)



Obrázek 10 Působení 1/2 PVS roztoku na růstové vrcholy (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Po uplynutí 30 minut působení roztoku 1/2 PVS byl odebrán z kádinky varianty 2 jeden vrchol pro termickou analýzu a dalších 10 ks vrcholů bylo převedeno na regenerační médium a opět uloženo do kultivační komory. Následně byl roztok 1/2 PVS odsát a nahrazen roztokem PVS. Vrcholy (71 ks) v něm byly ponechány po dobu 3 hodin. U varianty 1 nebylo v tomto kroku provedeno termické měření ani vysazení vrcholů na regenerační médium. Stejně jako v případě varianty 1 byl vyměněn roztok 1/2 PVS za roztok PVS. Varianta 1 (71 ks růstových vrcholů) byla ponechána v roztoku PVS po 2 hodiny.



Obrázek 11 Působení PVS roztoku na růstové vrcholy (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)



Po uplynutí 2 hodin působení PVS roztoku na růstové vrcholy varianty 1 byl odebrán jeden růstový vrchol a provedena termická analýza. Současně bylo odebráno 30 ks vrcholů a přeneseno na regenerační médium a následně umístěno do kultivační komory.

Po uplynutí 3 hodin působení PVS roztoku na růstové vrcholy varianty 2 byl proveden stejný postup jako v případě varianty 1.

Zbývající vrcholy (40 ks vrcholů varianty 1 a 40 ks vrcholů varianty 2) byly připraveny na působení kryogenních teplot.

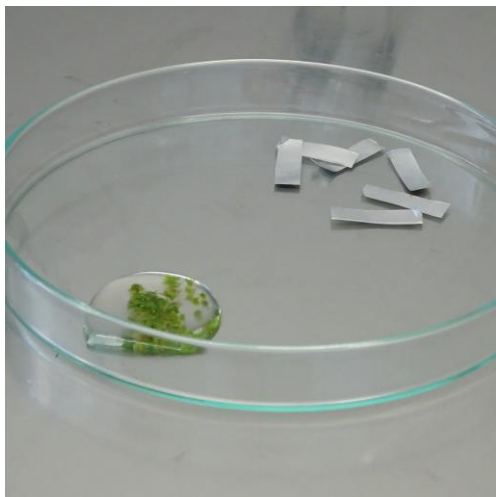
#### **4.5.2.1 Měření na DSC**

Během dehydratační přípravné fáze vrcholů na kryoterapii byla provedena termická analýza pomocí diferenční kompenzační kalorimetrie. Během procesu snižování vody v růstových vrcholech byly odebírány kontrolní růstové vrcholy a byla změřena teplota tání vody obsažené ve vrcholech a množství intracelulární vody.

Růstový vrchol byl odebrán po skončení dané fáze dehydratace a přenesen na měrné místo v přístroji. Při odebírání jednotlivých vrcholů byly vybírány vzorky o podobné velikosti a hmotnosti. Výsledkem měření byla křivka ukazující teplotu tuhnutí a tání vody a množství vody obsažené v meristému. Z této křivky byly odečteny hodnoty a přeneseny do formy grafu č. 9 a 10.

#### **4.5.3 Kryoterapie**

Kryoterapie byla provedena pro růstové vrcholy ponechané v roztoku PVS 2 hodiny a 3 hodiny. Po uplynutí doby působení PVS roztoku byl roztok odejmut z kádinky pomocí plastové pipety. Růstové vrcholy byly přesunuty na sterilní Petriho misku s kapkou vitrifikačního roztoku. Zároveň byly přichystány sterilní hliníkové plíšky potřebné k zamrazování rostlinného materiálu. Jednotlivé růstové vrcholy (při rozlišení varianty 1 a 2) pak byly umístěny na hliníkové plíšky. Jeden hliníkový plíšek obsahoval 10 růstových vrcholů.

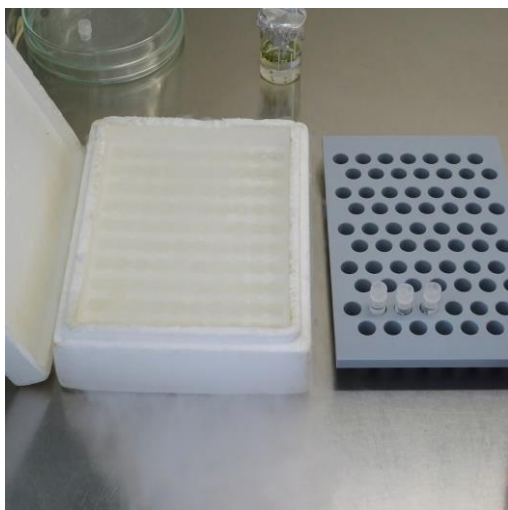


Obrázek 12 Růstové vrcholy připravené na kryoterapii (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

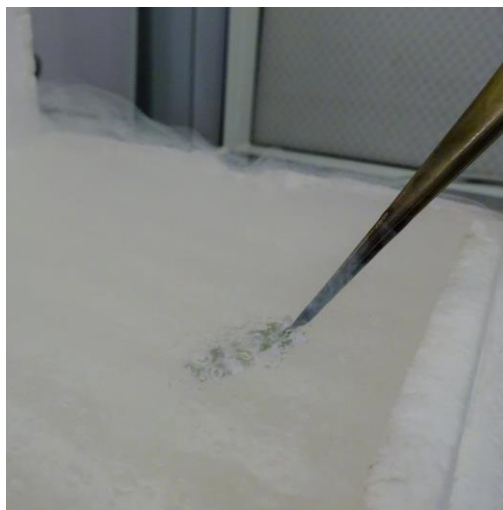


Obrázek 13 Růstové vrcholy na hliníkovém plíšku (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

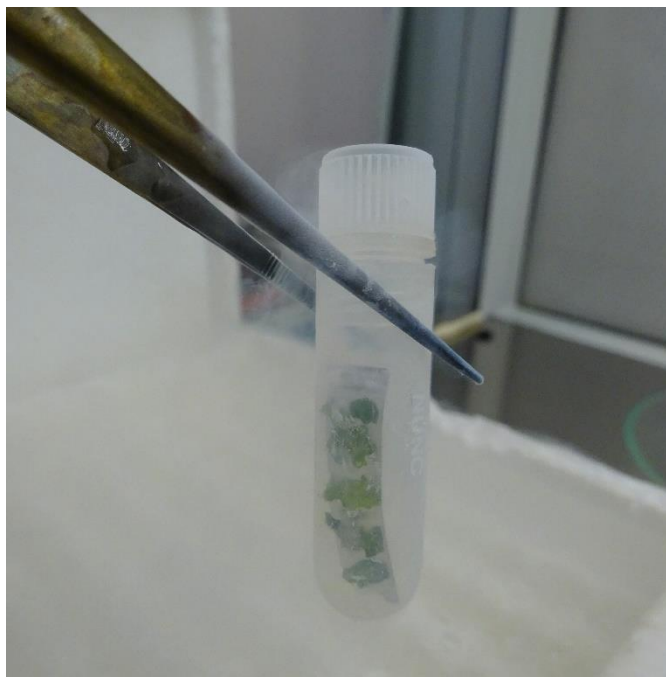
Po umístění vrcholů na plíšek následovalo rychlé ponoření plíšku do tekutého dusíku. Při práci s tekutým dusíkem byl používán ochranný obličejový štít. Jakmile došlo k uklidnění bouřlivé reakce dusíku vznikající při styku s rostlinným materiálem, byl plíšek umístěn do kryozkumavky předem naplněné tekutým dusíkem. Zkumavka byla uzavřena šroubovacím víčkem. Uzavření zkumavky nesmí být těsné, aby bylo umožněno úniku plynného dusíku. Po umístění zkumavky do stojánu na kryozkumavky vyplněného tekutým dusíkem byla zkumavka ponechána působení kryogenních teplot po dobu 1 h.



Obrázek 14 Kryozkumavky a stojan na kryozkumavky s tekutým dusíkem (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)



Obrázek 15 Ponoření růstových vrcholů do tekutého dusíku (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)



Obrázek 16 Plíšek s růstovými vrcholy umístěný v kryozkumavce s tekutým dusíkem (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Během působení tekutého dusíku na rostliny byl roztok 0,7 M sacharózy upraven na teplotu 40 °C a rozlit do osmi sterilních kádínek. První sada 4 kádínek byla přichystána pro růstové vrcholy varianty 1 (působení PVS 2 hodiny), druhá sada kádínek byla přichystána pro variantu 2 (působení PVS 3 hodiny). Objem roztoku sacharózy v každé kádince byl 20 ml.

Po vytažení kryozkumavky z tekutého dusíku bylo odšroubováno víčko a její obsah byl opět doplněn tekutým dusíkem. Plíšek byl ze zkumavky vytahován pinzetou a ponořen do 40°C teplého roztoku sacharózy. Vytažení plíšku ze zkumavky pinzetou a ponoření do roztoku sacharózy musí být provedeno rychle. Po odlepení rostlin z plíšku byl odebrán plíšek a rostliny byly ponechány po dobu 30 minut v roztoku sacharózy.



Obrázek 17 Rozmrazování růstových vrcholů po kryoterapii: varianta PVS 2 h (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)



Obrázek 18 Rozmrazování růstových vrcholů po kryoterapii: varianta PVS 3 h (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Po uplynutí doby působení roztoku 0,7 M sacharózy byly růstové vrcholy přeneseny na regenerační médium a převezeny do explantátové laboratoře na Ústavu biologie rostlin v Brně. V běžných kultivačních podmínkách byly rostliny ponechány po dobu 3 dní v Petriho miskách s regeneračním médiem překryté bílým kancelářským papírem. Následně byly vrcholy přeneseny na běžné kultivační médium s přídavkem ProClinu a kultivovány v běžných kultivačních podmínkách.

#### **4.6 Hodnocení životnosti a regenerace**

Životnost všech růstových vrcholů odebraných na regenerační médium v přípravné fázi kryoterapie a po aplikaci kryoterapie byla provedena po uplynutí doby 2 týdnů od aplikace kryoterapie. Hodnocení bylo provedeno vizuální metodou. Za živé vrcholy byly považovány vrcholy se zeleným zabarvením. Vrcholy našedlé a hnědé byly vyhodnoceny jako neživé.

Vyhodnocení regenerace růstových vrcholů bylo provedeno po 7 týdnech od aplikace kryoterapie. Za regeneranta byla považována rostlina, která vytvořila alespoň jeden nový list.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Výběr média

Pro růst rostlin bylo vyzkoušeno několik typů médií. Bylo vyzkoušeno médium QL, QL A, QL + sterilní voda, WPM 1,7 BA (Lloyd a McCown, 1980). Pokus probíhal po dobu 4 týdnů. V průběhu doby pokusu byl sledován růst jednotlivých rostlin a nově přirůstající rostliny. Pokus byl hodnocen vizuálně.

Na médiu QL docházelo k vyrovnanému růstu. U bazálních segmentů získaných z matečných rostlin docházelo k vyšší tvorbě postranních přírůstků.

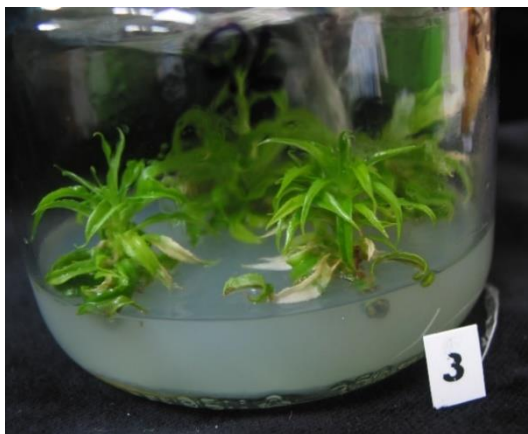
Médium QL A bylo využíváno jako ozdravné médium pro části rostlin pocházející z infikované rostliny či kultivační baňky. Ve většině případů došlo k potlačení infekce a rostlina po zařazení zpět do kultury bez použití ProClinu dále prosperovala. Značnou nevýhodou tohoto typu média bylo inhibiční působení na růst rostliny. Docházelo ke zkracování internodií a v některých případech k etiolizaci listů.

Při použití média WPM 1,7 BA docházelo ke zpomalení růstu a zkracování internodií. Po přenesení rostlin na médium QL byla indukována tvorba postranních prýtů ve větší míře, než při klasickém použití samotného QL média.

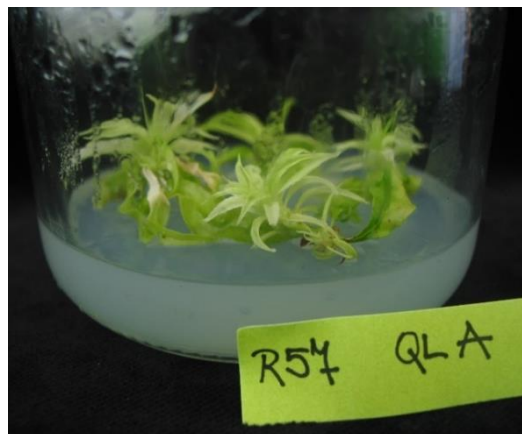
V případě použití média QL se zálivkou sterilní destilovanou vodou docházelo ke zvýšené rychlosti růstu a vyššího množství vytvořených postranních prýtů. Sterilní destilovaná voda byla k explantátu přidána v den jeho přenesení na nové médium. Množství sterilní vody bylo použito vždy v závislosti na výšce rostliny. Vždy bylo dbáno na to, aby nebyla ponořena více jak polovina rostliny a aby nebyl ponořen vzrůstný vrchol.

Přídavek vody podpořil růst vyššího počtu dceřiných rostlin i vyššího množitelského koeficientu. Rostliny působily zdravým dojmem, listy měly rovnoměrně rozmístěné a v porovnání s klasickou kulturou byla jejich barva sytě zelená. Další přenesení rostlin na kultivační médium již bez použití přidané vody bylo možné po uplynutí cca 2 týdnů. Zároveň byla ale pozorována vyšší citlivost rostlinného pletiva na vnější poškození, rostlinné pletivo bylo vlivem vyššího množství vody křehké. Použitím sterilní vody nebyl pozorován žádný výrazný efekt na četnost výskytu infekcí. V konečné fázi multiplikace byl tento krok vynechán z důvodu potřeby snižování obsahu vody v rostlinách pro potřeby kryoterapie.

Růst rostlin mohl být podpořen vlivem změny koncentrace média a změnou osmotického potenciálu, naředěním nutričních složek média či změnou příjmu látek. Vliv koncentrace ztužujících látek v médiu uvádí Kadlecová (2014). Vyšší koncentrace ztužující látky v médiu snižuje hyperhydricitu a zároveň snižuje výtěžnost množení.



Obrázek 19 Růst rostlin na médiu QL, stáří rostlin 4 týdny (foto: H. Fišerová, 3. 10. 2016)



Obrázek 20 Růst rostlin na médiu QL A, stáří rostlin 4 týdny (foto: H. Fišerová, 3. 10. 2016)



Obrázek 21 Růst rostlin na médiu WPM 1,7BAP, stáří rostlin 4 týdny (foto: H. Fišerová, 3. 10. 2016)



Obrázek 22 Růst rostlin na médiu QL+sterilní voda, stáří rostlin 4 týdny (foto: H. Fišerová, 3. 10. 2016)

## 5.2 Kultivační podmínky

Kultivační podmínky byly sledovány za účelem zjištění jejich vztahu k rychlosti růstu rostliny a tvorby postranních dceřiných rostlin včetně interakce koncentrace etylenu, etanu a oxidu uhličitého v kultivační nádobě.

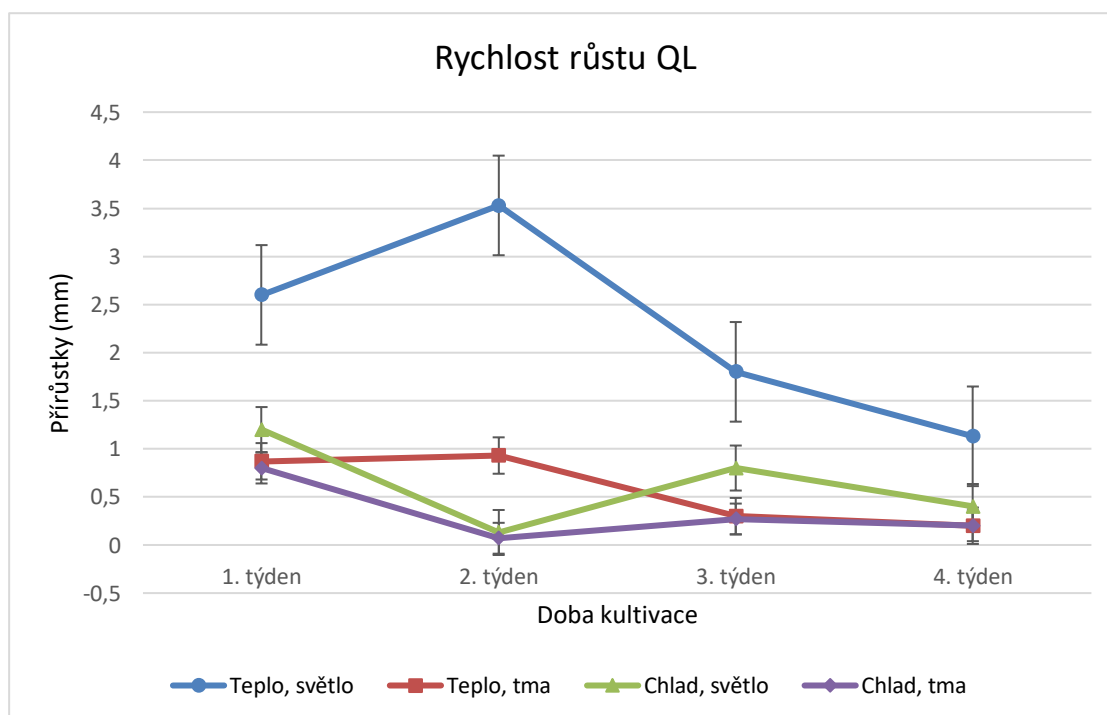
### 5.2.1 Vliv kultivačních podmínek na růst a tvorbu dceřiných rostlin

Vliv kultivačních podmínek byl sledován z důvodu optimalizace růstových podmínek pro rychlý nárůst výšky rostlin a postranních výhonů. Byly srovnány růstové vlastnosti rostlin na médiu QL a QL A v rozdílných podmínkách.

Nejvyšší rychlost růstu projevovaly rostliny kultivované na médiu QL při běžných laboratorních podmínkách, tedy variantě teplo-světlo. Průměrný přírůstek v prvním týdnu trvání pokusu byl 2,6 mm. Největšího přírůstku, jak už v rámci varianty světlo-teplo média QL, tak i celkového hodnocení, dosáhly rostliny ve druhém týdnu kultivace, a to 3,53 mm. Růstový rozdíl byl statisticky průkazný. V příštích týdnech kultivace měl přírůstek klesající tendenci, avšak pořád dosahoval nejvyšší hodnoty z měřené varianty QL.

Nejmenších přírůstků dosahovaly rostliny varianty chlad-tma. Inhibice růstu chladovými podmínkami je dána zpomalením metabolických procesů (Wang a kol., 2008a). Pro proces multiplikace není tato varianta vhodná právě z hlediska pozastavení růstu rostlin.

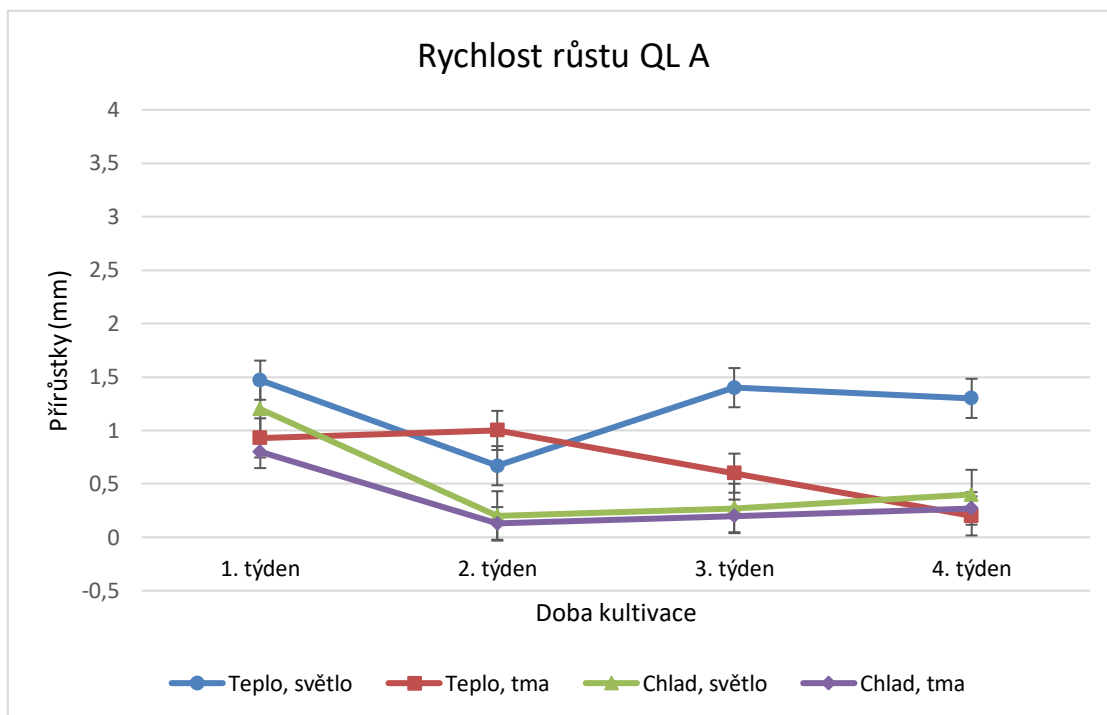
Ve čtvrtém týdnu hodnocení byl zaznamenán úhyn některých rostlin. U varianty QL teplo-světlo bylo zaznamenáno 53,3 % uhynulých rostlin, ve variantě QL teplo-tma také 53,3 %, u varianty QL A teplo-světlo 6,67 % a u QL A teplo-tma 46,67 % uhynulých rostlin. Vysoká úmrtnost rostlin lze snížit včasným přenesením rostliny na nové médium. V chladových podmínkách nebyl zaznamenán v tomto měření úhyn žádné rostliny, což potvrzuje možnost uchování rostlin v chladových podmínkách po dobu 1 až 2 měsíců.



Graf 1 Rychlost růstu rostlin na médiu QL (mm/týden)

Na médiu QL A dosahují rostliny menší rychlosti přírůstků než při běžném QL médiu. Nejvyšších přírůstků v rámci varianty QL A dosahovaly rostliny při variantě teplo-světlo.

Růst rostlin na médiu QL A je pozastaven vždy v druhém týdnu kultivace (kromě varianty teplo-tma). Po překonání druhého týdne následuje však zvýšený růst rostlin.



Graf 2 Rychlost růstu rostlin na médiu QL A (mm/týden)

Na konci pozorovacího období byl vyhodnocen počet dceřiných rostlin v jednotlivých variantách. Celkový počet vytvořených dceřiných rostlin byl přepočítán na počet dceřiných rostlin vytvořených jednou mateřskou rostlinou. Nejvíce dceřiných rostlin vytvořila varianta QL A teplo-světlo.

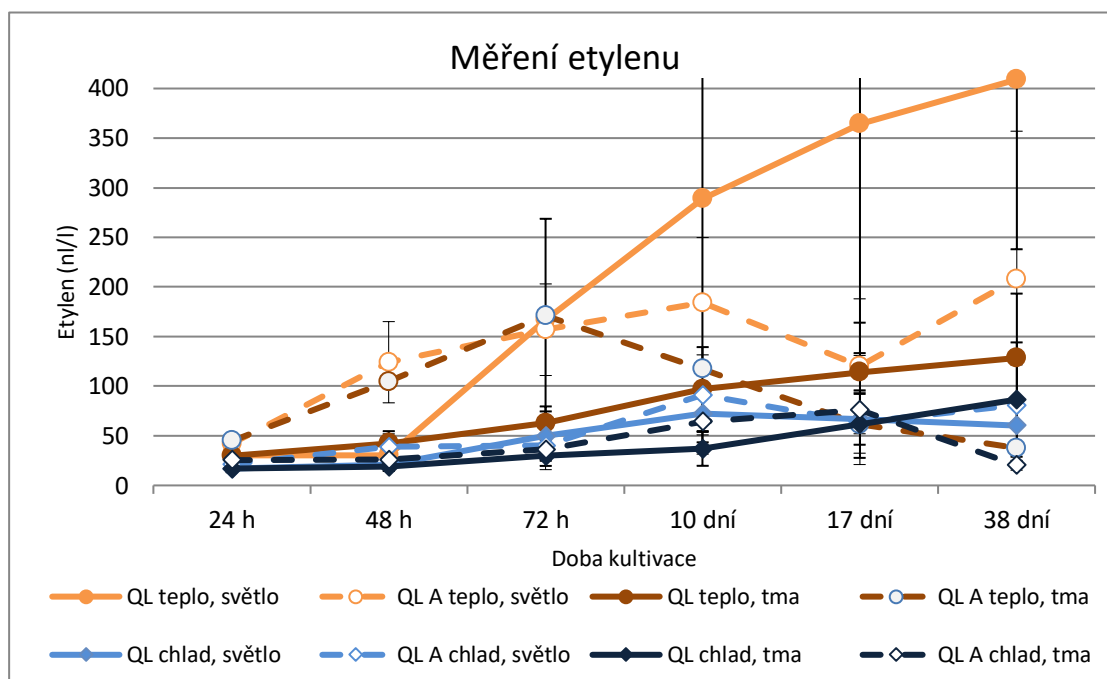
	QL	QL A
	Počet dceřiných rostlin	Počet dceřiných rostlin
Teplo, světlo	0,4	1,07
Teplo, tma	0	0,14
Chlad, světlo	0,2	0,14
Chlad, tma	0,27	0

Tabulka 2 Dceřiné rostliny



### 5.2.2 Vliv kultivačních podmínek na tvorbu etylenu, etanu a oxidu uhličitého

Během kultivace rostlin byl v časovém horizontu 5 týdnů měřen obsah etylenu, etanu a oxidu uhličitého v kultivačních nádobkách umístěných v různých kultivačních podmínkách.



Graf 3 Koncentrace etylenu v kultivačních nádobkách při rozdílných podmínkách kultivace

Graf měření etylenu znázorňuje koncentraci etylenu v kultivačních baňkách při různých kultivačních podmínkách a jiném typu média. V městských aglomeracích je koncentrace etylenu v atmosféře v rozmezí od 30 do 700  $\text{nl} \cdot \text{l}^{-1}$ , v neznečištěném prostředí 1 až 5  $\text{nl} \cdot \text{l}^{-1}$  (Goliáš, 2014). K fyziologické účinnosti dochází při koncentraci 0,01 až 1  $\mu\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$  (Burg a Burg, 1968).

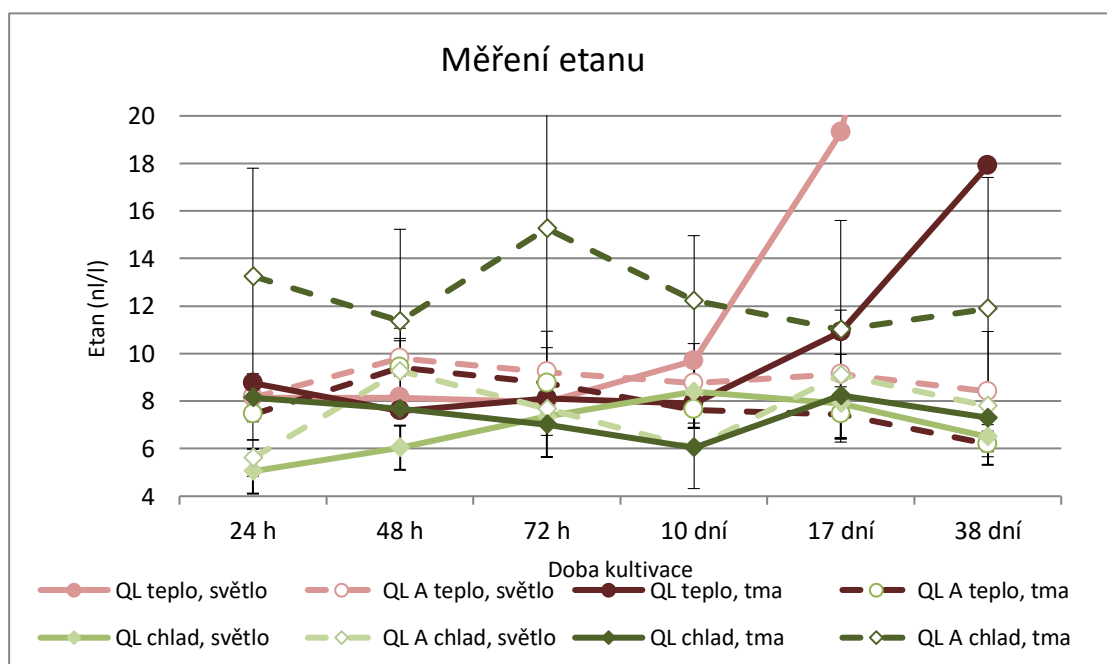
V počáteční fázi měření etylenu po 24 h od založení pokusu se naměřené hodnoty lišily velmi málo. Koncentrace etylenu byla u všech naměřených variant 16,99 až 44,81  $\text{nl} \cdot \text{l}^{-1}$ . Průměrná počáteční hodnota etylenu u kultivačních baňek s médiem QL byla 23,53  $\text{nl} \cdot \text{l}^{-1}$  a u baňek s médiem QL A 33,49  $\text{nl} \cdot \text{l}^{-1}$ . Přítomnost ProClinu v tomto případě podporovala tvorbu etylenu.

Zvýšená produkce etylenu je spojována se smrtí buňky (Woltering a kol., 2003). Nejvyššího úhynu rostlin v pokusných variantách bylo zaznamenáno u varianty teplo-světlo a teplo-tma na médiu QL. U těchto variant byla také naměřena nejvyšší koncentrace etylenu, která mohla vyvolat odumření rostlin. Při odumření 53,3 % rostlin byla zaznamenána hodnota etylenu 409  $\text{nl} \cdot \text{l}^{-1}$  u varianty teplo-světlo a 128,4  $\text{nl} \cdot \text{l}^{-1}$  u

varianty teplo-tma. U variant kultivačních podmínek, kde nebyl zaznamenán úhyn rostlin, se naměřené hodnoty etylenu pohybovaly v rozmezí od 16,99 do 25,61 nl · l<sup>-1</sup>. Nízké hodnoty etylenu mohou být také spojeny s nízkou buněčnou aktivitou vlivem působení chladových podmínek.

Zvýšená koncentrace etylenu také souvisí se zpomalením proliferačního růstu (Kevers a kol., 1991). Nejvyššího rozdílu mezi rychlostí růstu v jednotlivých týdnech dosahovala varianta teplo-světlo na médiu QL. Rapidního poklesu rychlosti růstu dosáhla ve třetím týdnu kultivace, kdy byla naměřena koncentrace etylenu 409 nl · l<sup>-1</sup>. V případě varianty teplo-světlo na médiu QL A kopíruje růstová křivka rostlin křivku obsahu etylenu v kultivační nádobce. Společně s poklesem rychlosti růstu poklesla hladina koncentrace etylenu.

Při zvýšené koncentraci etylenu dochází ke zvýšené tvorbě kalusu a zmenšování velikosti listů (Abeles, 1973). U pozorovaných rostlin nedošlo ani v žádném případě při rozdílné koncentraci etylenu od 16,99 do 409 nl · l<sup>-1</sup> ke zmenšení velikosti přirůstajících listů ani k tvorbě kalusu při bazální části explantátu, avšak doba působení vysoké koncentrace etylenu byla patrně pro vyvolání morfologických změn krátká.

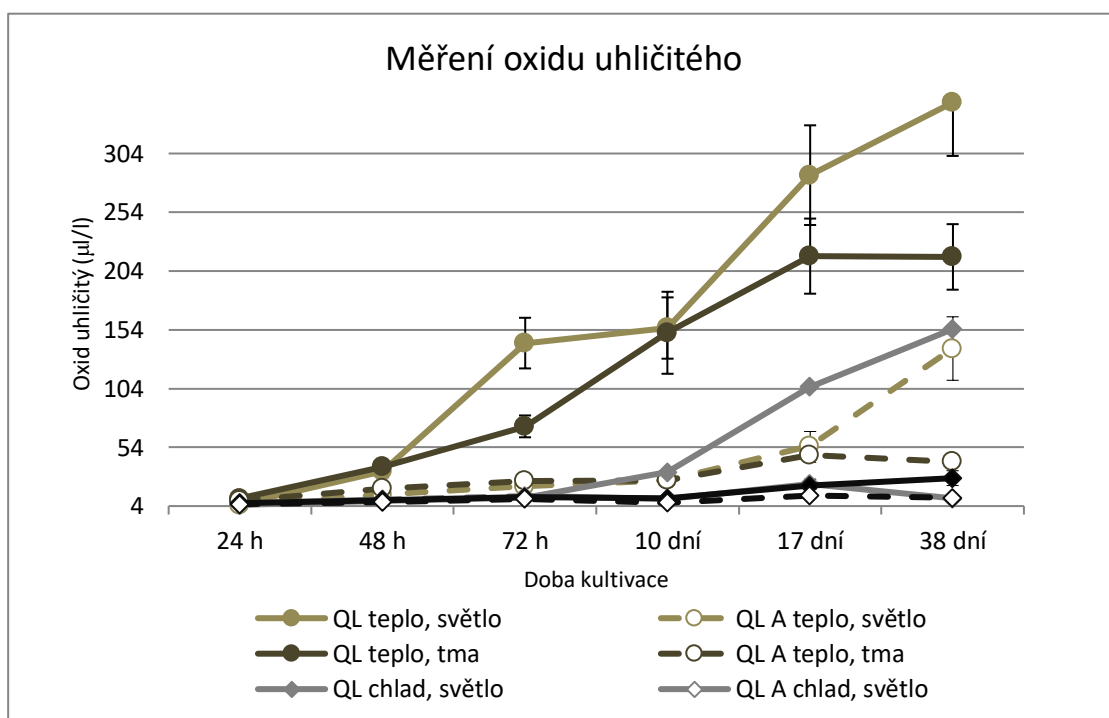


Graf 4 Koncentrace etanu v kultivačních nádobách při rozdílných podmínkách kultivace

Etan je produkován rostlinami, které se nachází ve stresových podmínkách. Produkce etanu je odezvou na mechanické poškození rostlin. Současné měření etylenu a etanu je využíváno k zjištění hodnoty stresu, ve kterém se rostlina nachází (Kimmerer a Kozlowski, 1982).

Náhlé snížení koncentrace etanu mohou být dány pozastavením tvorby etanu v průběhu regenerace rostlin. V růstových podmínkách bez přítomnosti světla je tvorba etanu nižší, než v podmínkách se světelnou periodou (Roshchina a Roshchina, 1993). Vyšší koncentrace etanu a její následná konstantní hodnota u většiny variant byla dána prvotním poškozením rostliny vlivem provedení řezu při založení pokusu. V následujících dnech trvání pokusu byla tvorba etanu pozastavena vlivem regenerace poškozených rostlin.

Nejvyššího zvýšení koncentrace etanu v kultivační baňce bylo změřeno u varianty QL teplo-světlo ( $43,69 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a QL teplo-tma ( $17,9 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Výrazný nárůst koncentrace může být prisuzován vyššímu počtu odumřelých rostlin v kultivačních baňkách těchto dvou variant. Nízké koncentrace etanu byly naměřeny u variant držných v chladových podmínkách. Produkce etanu rostlin rostoucích na médiu QL byla nižší ( $7,52 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ ) v porovnání s rostlinami rostoucími na médiu QL A ( $8,61 \text{ nl} \cdot \text{l}^{-1}$ ).



Graf 5 Koncentrace oxidu uhličitého v kultivačních nádobách při rozdílných podmínkách kultivace

Podobně jako u etylenu a etanu i koncentrace oxidu uhličitého výrazně vzrůstá při variantě QL teplo-světlo a QL teplo-tma. Vyšší koncentrace oxidu uhličitého vedou k podpoření fotosyntézy, a tím také ke zvýšení růstu rostlin (Aitken-Christie a kol., 1995). Vyšší koncentrace oxidu uhličitého v kultivačních nádobách byla změřena u variant, které nebyly vystaveny světelné periodě. Průměrná koncentrace oxidu

uhličitého v kultivačních nádobkách variant bez světelné periody byla  $7,8 \mu\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$ , v kultivačních nádobkách variant se světelnou periodou  $5,5 \mu\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$ . Vyšší koncentrace tohoto plynu v podmínkách bez přítomnosti světla je dána respirací. Ve světelných podmínkách nastává snížení koncentrace oxidu uhličitého v kultivačních nádobách vlivem fotosyntetické aktivity (Lumsden a kol., 1994). Koncentrace oxidu uhličitého byla naměřena ve vyšší míře u rostlin rostoucích na médiu bez přídatku ProClinu (průměrně  $6,94 \mu\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$ ). U média s přídatkem ProClinu byla průměrná koncentrace naměřena na  $6,33 \mu\text{l} \cdot \text{l}^{-1}$ .

### 5.3 Fáze multiplikace

Pro fázi multiplikace bylo zvoleno médium QL. V případě nálezu infekce byly rostliny umístěny na médium QL s přídatkem ProClinu.

Již v počáteční fázi multiplikace se projeví výrazné rozdíly mezi jednotlivými variantami rostlin. Rozdílem byla výška rostlin, množství prorážejících vedlejších prýtů i celková vitalita rostlin.

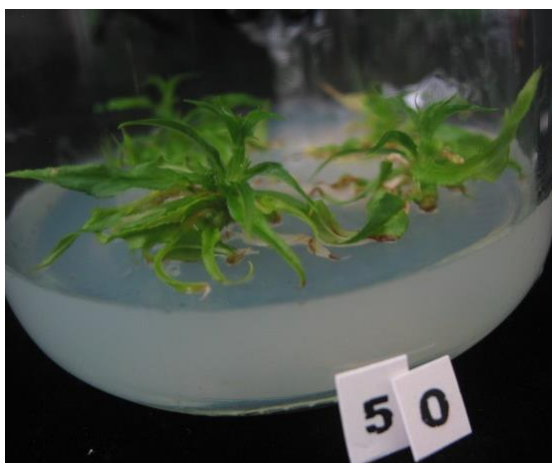
Varianta R50 se projevovala zpomaleným růstem a neochotně vytvářela postranní přírůstky.

Varianta R57 se z těchto variant projevila v oblasti růstu nejlépe. Ochoťně vytvářela postranní přírůstky a rychlost prodlužovacího růstu byla v průměru 1 mm za týden.

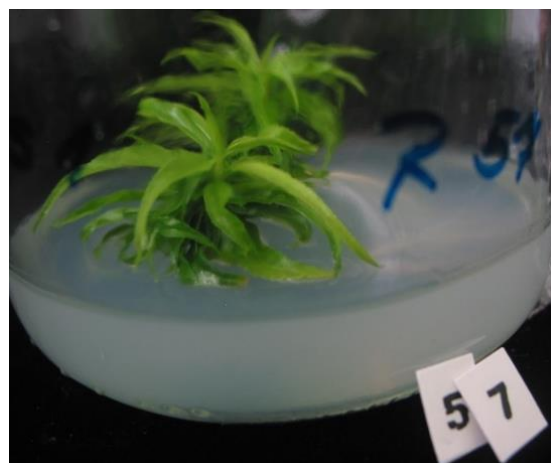
Varianta R58 a R61 projevila taktéž dobré množitelenské vlastnosti. Oproti variantě R57 se projevila pomalejším růstem, který se dal zrychlit použitím sterilní vody.

Z hlediska růstových vlastností varianta Z64 projevila nejhorší vlastnosti. Nevytvářela postranní obrost a prodlužovací růst byl pozastaven.

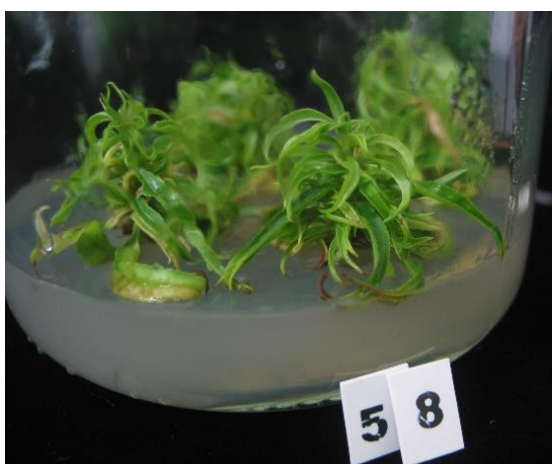
Rozdíly mezi jednotlivými variantami ukazují následující fotografie pořízené 4 týdny po přenesení dceřiných rostlin na nové médium.



Obrázek 23 Varianta R50 (foto: H. Fišerová, 21. 8. 2016)



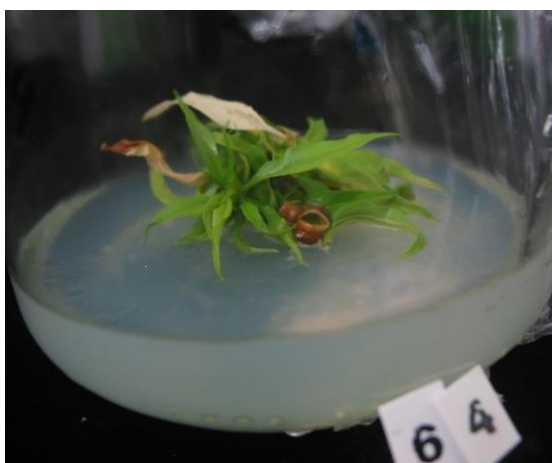
Obrázek 24 Varianta R57 (foto: H. Fišerová, 21. 8. 2016)



Obrázek 25 Varianta R58 (foto: H. Fišerová, 21. 8. 2016)

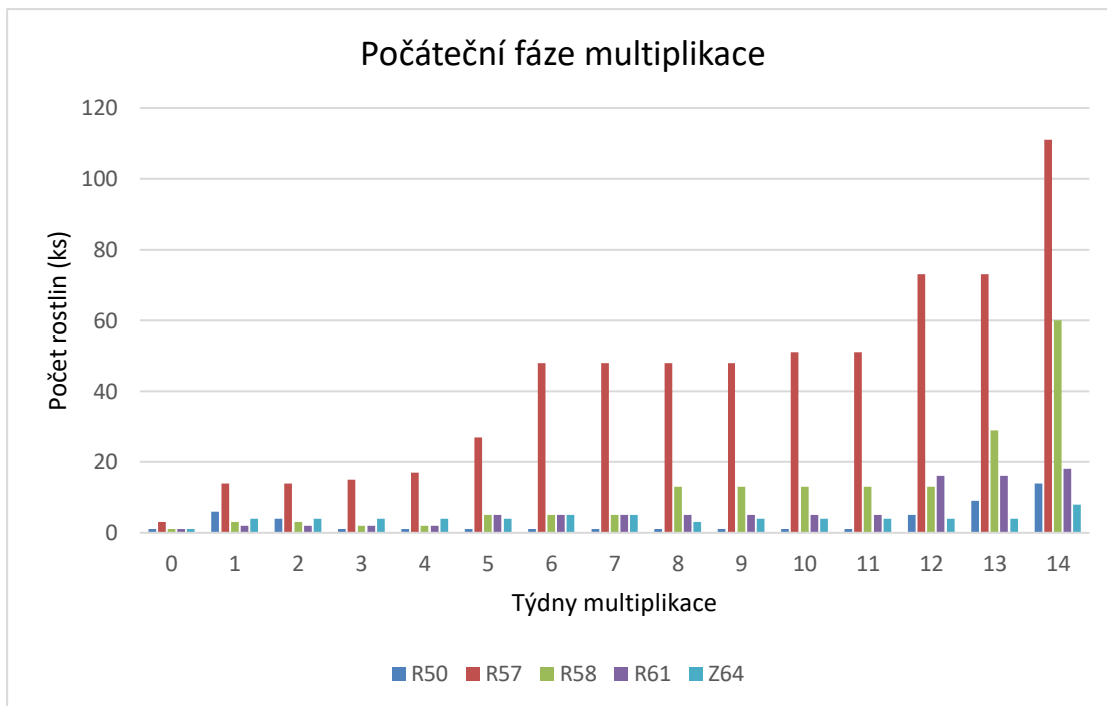


Obrázek 26 Varianta R61 (foto: H. Fišerová, 21. 8. 2016)

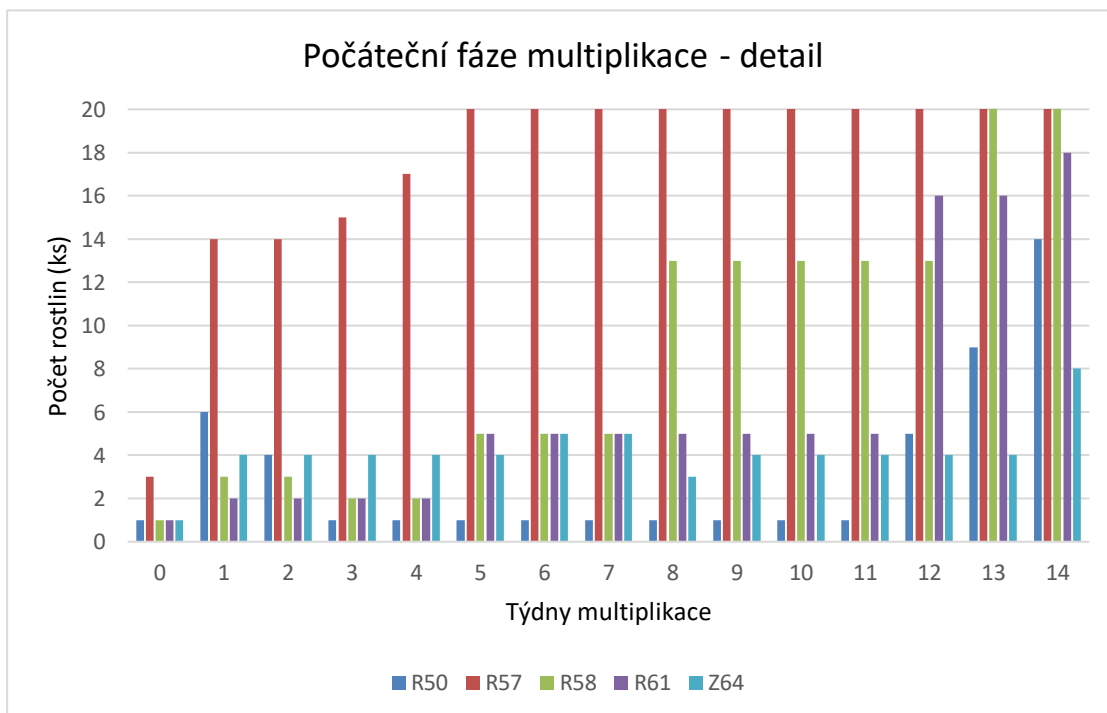


Obrázek 27 Varianta Z64 (foto: H. Fišerová, 21. 8. 2016)

Následující graf popisuje množství rostlinného materiálu v jednotlivých týdnech počátku multiplikace. Týden 0 značí počáteční stav rostlinného materiálu. Z grafu jsou patrné výrazné rozdíly mezi jednotlivými variantami. U všech variant bylo použito stejné kultivační médium i stejné kultivační podmínky. Počet rostlin v jednotlivých týdnech udává celkový počet rostlin získaný ke konkrétnímu datu bez rozdílů čerstvě namnožených rostlin a rostlin rostoucích.

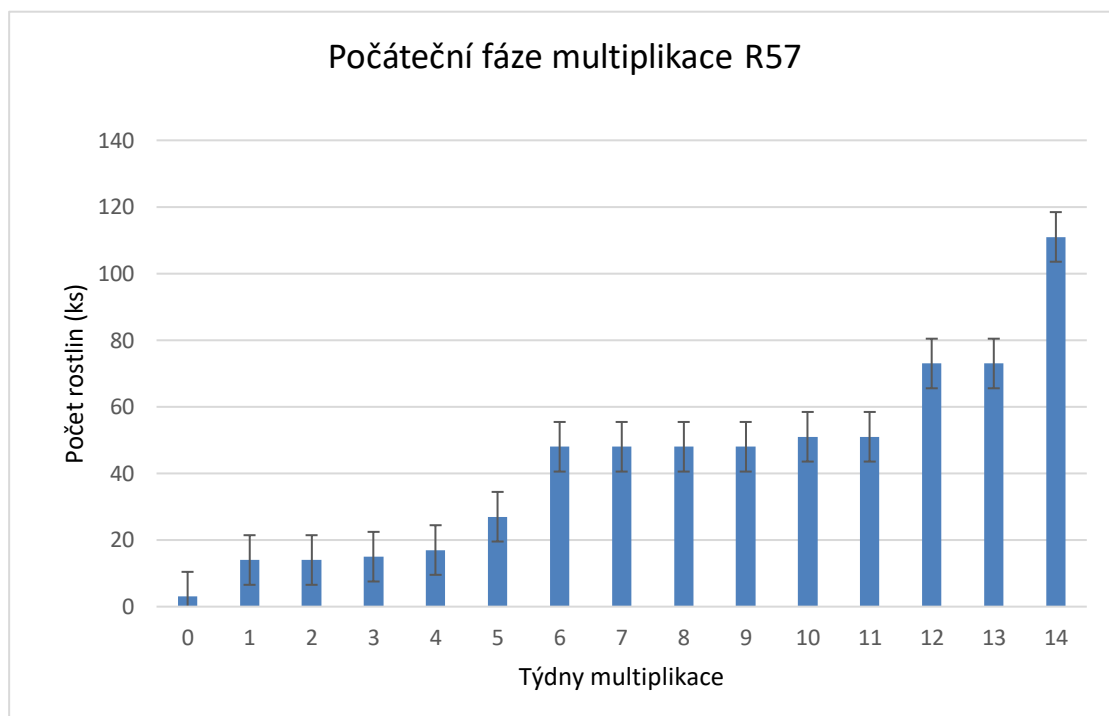


Graf 6 Počet rostlin v počáteční fázi multiplikace



Graf 7 Počet rostlin v počáteční fázi multiplikace – přibližný detail

Vzhledem k náročnosti kryoterapie na množství rostlinného materiálu byla vybrána jediná varianta R57 pro další intenzivnější multiplikaci a samotnou kryoterapii. Ostatní varianty byly od listopadu 2016 ponechány v udržovací kultuře s delšími rozestupy mezi jednotlivými pasážemi na nová média v počtu R50 17 ks, R58 56 ks, R61 133 ks a Z64 9 ks. V listopadu bylo množství namnožených rostlin varianty R57 348 ks rostlin (počítány rostliny s apikálním vrcholem i několikanodální segmenty bez apikálu).



Graf 8 Počet rostlin R57 v počáteční fázi multiplikace

Při kultivaci se objevily problémy, které brzdily multiplikaci a koncový počet rostlin s růstovým vrcholem. Hlavním problémem byla přítomnost infekcí. Infekce se objevovaly při bazální části explantátu a postupně snižovaly jeho životnost. Při včasné přenesení rostliny na médium a obsahem ProClinu byla infekce ve většině případů potlačena. Pokud nebyla rostlina včas přenesena na ozdravovací médium, došlo k odumření rostliny.



Obrázek 28 Odumření rostliny vlivem infekce  
(foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)

Závažným problémem bylo také odumírání růstových vrcholů rostlin doprovázené defoliací. Velké množství životaschopných vegetačních vrcholů bylo nutno zajistit z důvodu jejich následného použití při ozdravování rostlin. K odumírání růstových vrcholů docházelo při delším intervalu mezi jednotlivými pasážemi. Při použití kovového šroubovacího uzávěru s molitanovou zátkou docházelo k odumírání vrcholů v menší míře, avšak celkový stav rostlin se zhoršoval v důsledku horších světelných podmínek. K dřívějšímu úhynu rostlin také docházelo při vystavení rostlin teplotě 4°C při aplikaci běžné kultivační světelné periody. Z tohoto důvodu byl také vynechán krok otužování rostlin před samotným provedením kryoterapie.

## 5.4 Kryoterapie

Na růstové vrcholy broskvoně odrůdy 'Redhaven' byla aplikována kryoterapie provedená kapkovou vitrifikací. Byl aplikován obecný kryoprezervační protokol využívaný na VURV v Praze.

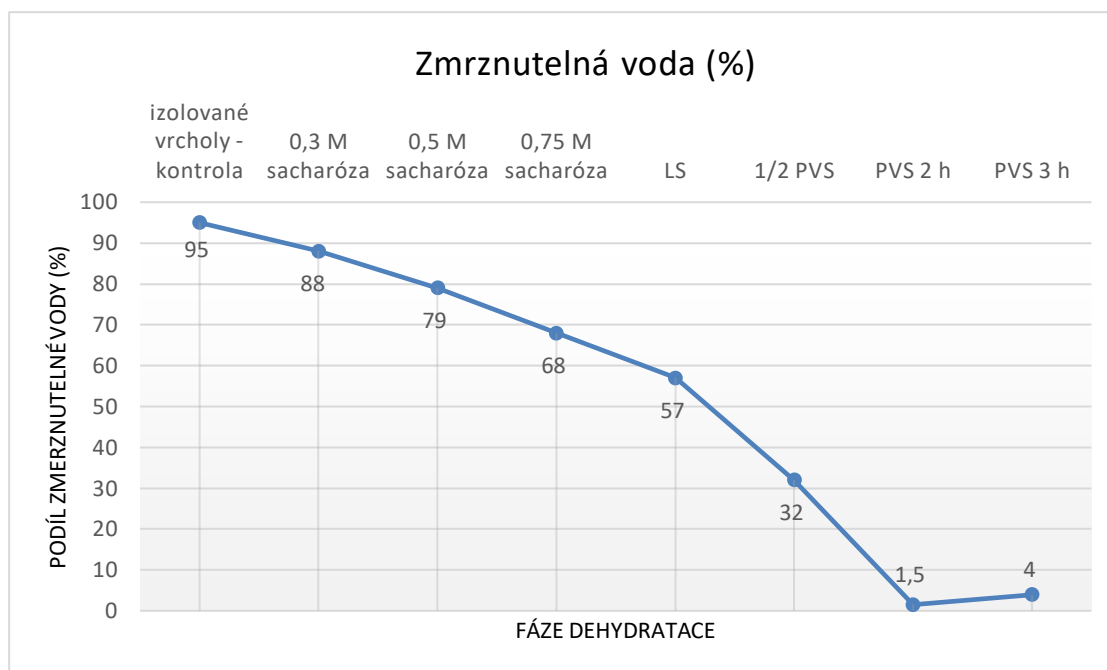
### 5.4.1 DSC

Během přípravné fáze rostlin na kryoterapii bylo provedeno termické měření. Byla zjištěna procenta intracelulární vody zbývající ve vrcholech. Pro přežití rostliny ultranízkej teploty je nutné, aby procenta intracelulární vody v buňce byla co nejmenší. 100 % zmrazitelné vody může být přirovnáno ke 100% poškození rostliny.

První měření bylo provedeno pro vyizolovaný růstový vrchol bez jakéhokoliv působení dehydratačních látek. Výsledná hodnota intracelulární vody byla stanovena na 95 %. Vlivem působení vyšší koncentrace sacharózy v médiích docházelo k plynulé dehydrataci vrcholu a snižování množství zmrazitelné vody. Plynulé snižování vody v rostlině trvalo po dobu 72 hodin. Po 72 h kultivace vzrůstných vrcholů na médiích s vyšším obsahem sacharózy klesl obsah intracelulární vody ve vrcholu na 68 %.

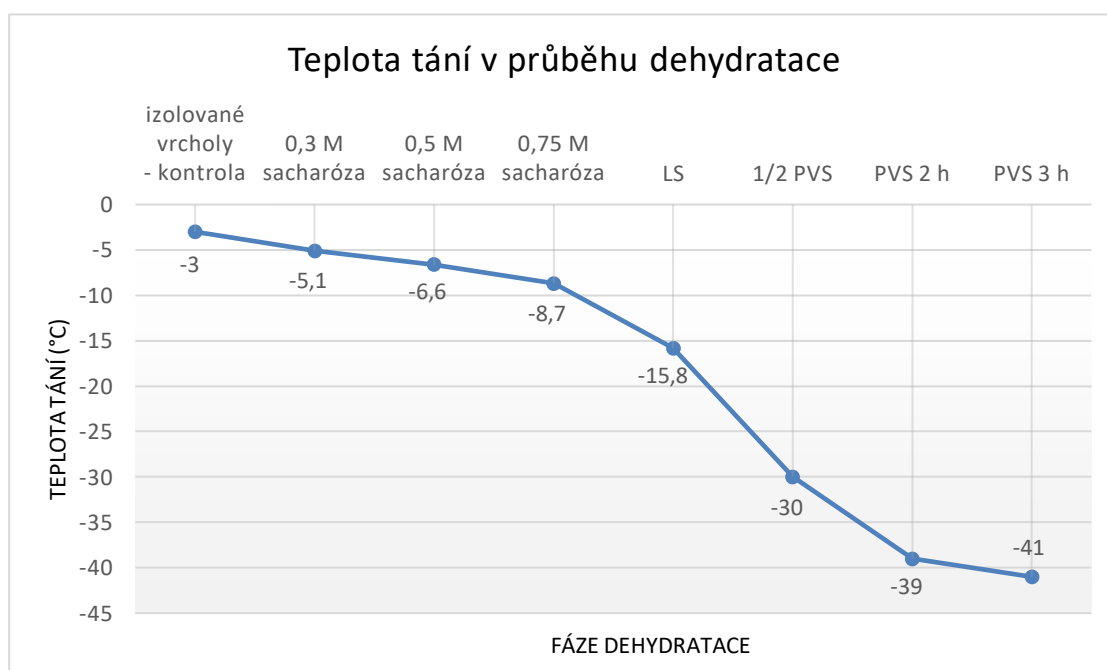


Po použití LS roztoku a zejména vitrifikačních roztoků došlo během 3 až 4 hodin k snížení zmrazitelné vody až o 66,5 %, zatímco během předešlých 72 h došlo ke snížení obsahu vody ve vrcholu o 27 %.



Graf 9 Stanovení množství zmrazitelné vody v růstovém vrcholu

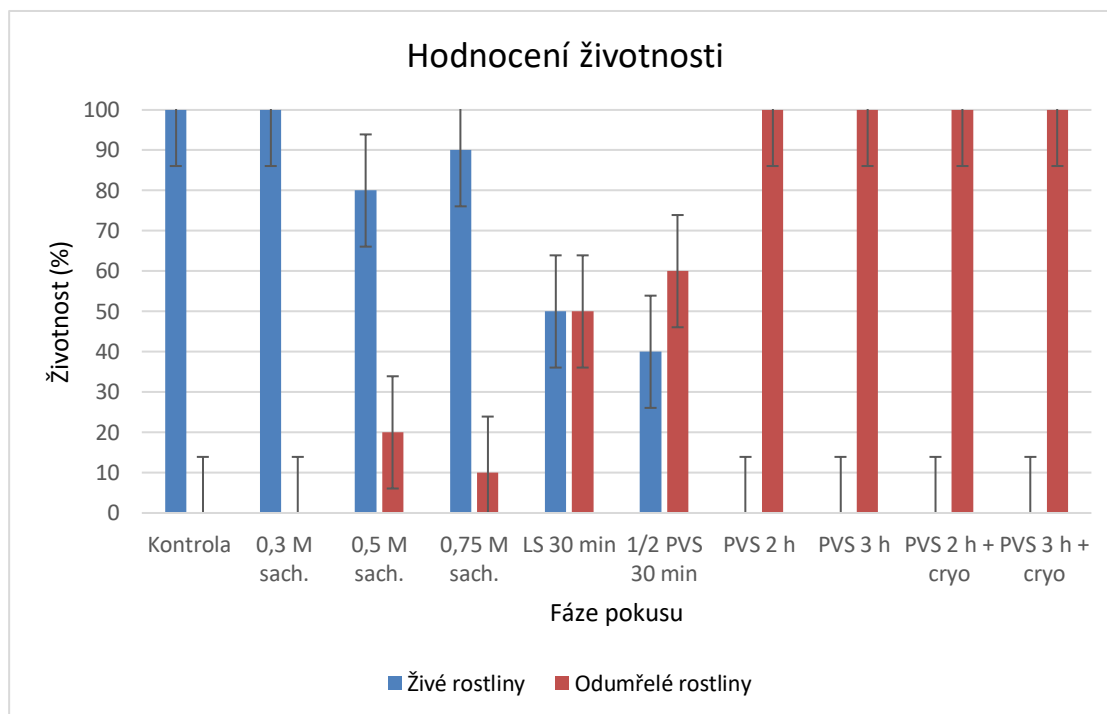
Vlivem snižování koncentrace zmrazitelné vody v buňce docházelo také ke snižování teploty tání vody v rostlině. Snižování teploty tání má velký vliv na schopnost rostliny přežít v minusových teplotách.



Graf 10 Stanovení teploty tání v průběhu dehydratace

### 5.4.2 Hodnocení životnosti

Po dvou týdnech od provedení kryoterapie bylo provedeno měření životnosti rostlin ze všech růstových vrcholů odebraných na regenerační médium v procesu dehydratace rostlin a kryoterapie. Životnost rostlin byla přepočítána na procentuální vyjádření.



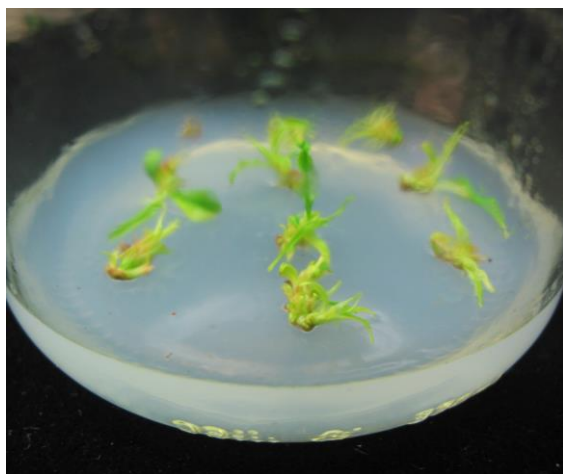
Graf 11 Hodnocení životnosti

Životnost růstových vrcholů broskvoně se snižovala v závislosti na snižujícím se obsahu vody v rostlině. Při obsahu intracelulární vody 95 % přežilo 100 % izolovaných vrcholů. Při snížení množství vody na 88 % vlivem působení média s 0,3 M sacharózou došlo k přežití 100 % růstových vrcholů. Při 79 % vody bylo obdrženo 80 % živých vrcholů a při obsahu vody 68 % bylo získáno 90 % živých vrcholů. Při použití LS roztoku a vitrifikačních roztoků došlo k vysokému snížení zisku živých vrcholů. Při obsahu vody 57 % při použití LS roztoku bylo získáno 50 % živých vrcholů a při použití vitrifikačního roztoku 1/2 PVS byla životnost už jen 40 %. Při dalším použití vitrifikačních roztoků a snížení obsahu vody na 32 % nebyl získán žádný živý růstový vrchol.

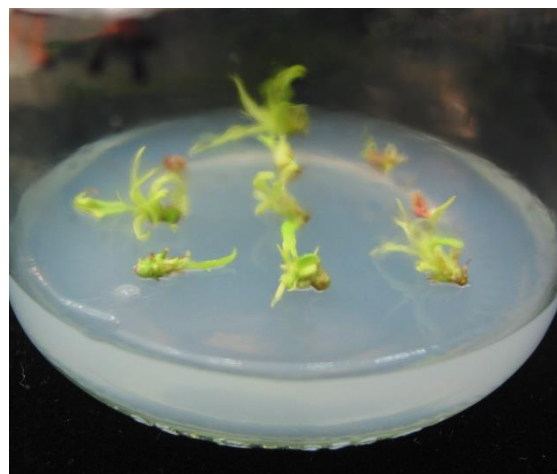
Růstové vrcholy vystavené působení tekutého dusíku s obsahem vody 1,5 a 4 % nepřežily žádné. Životnost rostlin byla ovlivněna stavem dehydratace. Vrcholy s obsahem vody menším než 40% nebyly schopné přežití, a to ve variantě obsahující působení tekutého dusíku i bez něj. Z tohoto důvodu lze říci, že buňky byly poškozeny

vlivem vysoké dehydratace, nikoliv působením kryogenních teplot a tvorbou krystalické struktury. Absence aplikace chladné periody na růstové vrcholy před kryoterapií nemá na životnost vrcholů v tomto případě vliv, jelikož za neživé byly vyhodnoceny také růstové vrcholy, na něž nebylo působeno tekutým dusíkem.

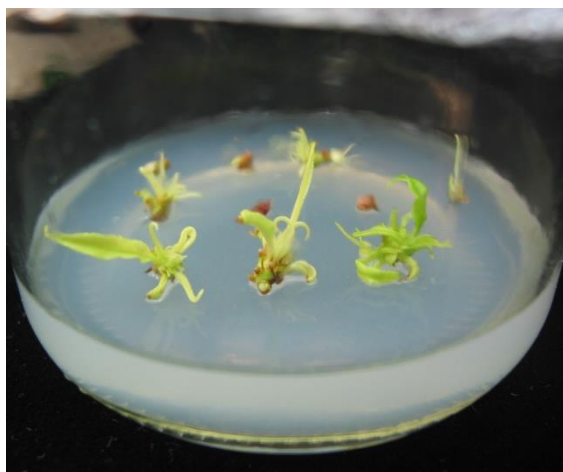
Stupeň neletální dehydratace vrcholů nebo jiných částí rostlin se liší podle druhu, ale také i podle jednotlivých kultivarů rostlin. Schopnost přežití růstových vrcholů broskvoní v kryogenních teplotách byla dokázána při obsahu vody 23 až 17 % u odrůd 'Summer Grand', 'San Giorgio' a 'Babygold 6' (Damiano a kol., 2011). V našem případě samotné přežití růstových vrcholů odrůdy 'Redhaven' bylo možné jen při množství vody vyšší než 40%.



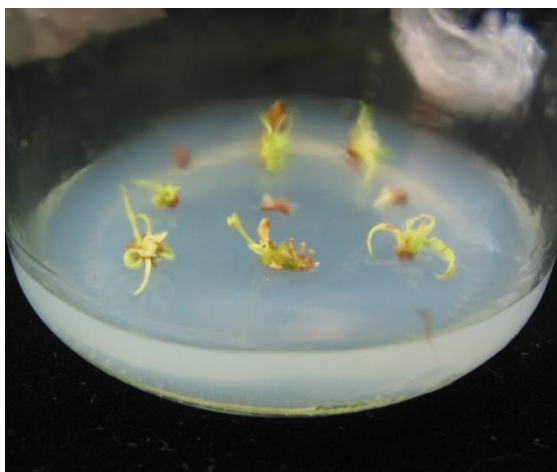
Obrázek 29 Hodnocení životnosti vrcholů – kontrola (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)



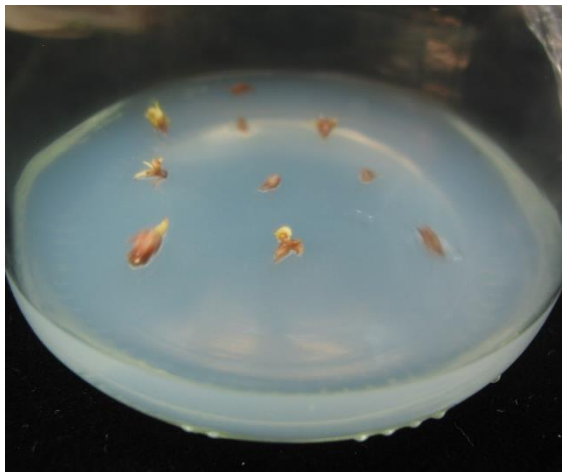
Obrázek 30 Hodnocení životnosti vrcholů – médium 0,3 M sacharóza (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)



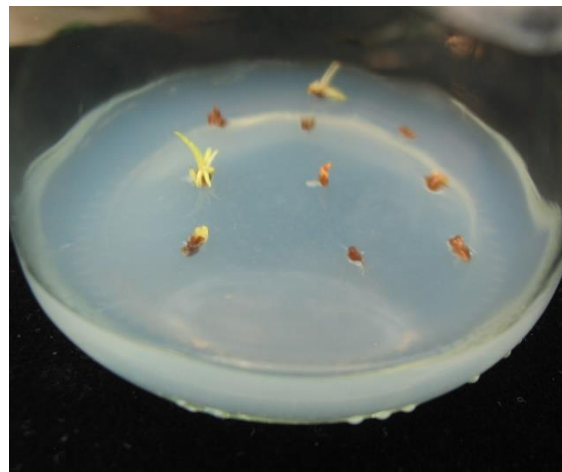
Obrázek 31 Hodnocení životnosti vrcholů – médium 0,5 M sacharóza (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)



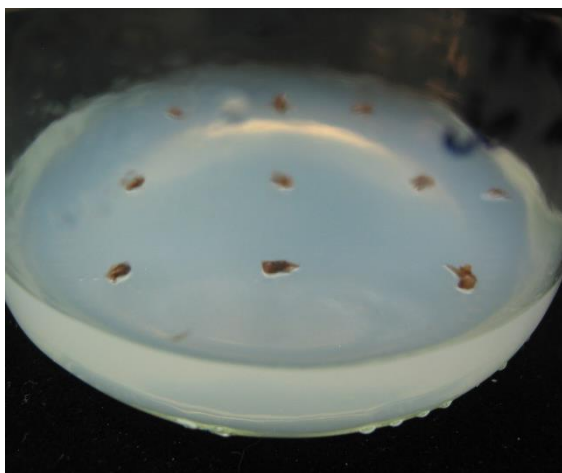
Obrázek 32 Hodnocení životnosti vrcholů – médium 0,75 M sacharóza (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)



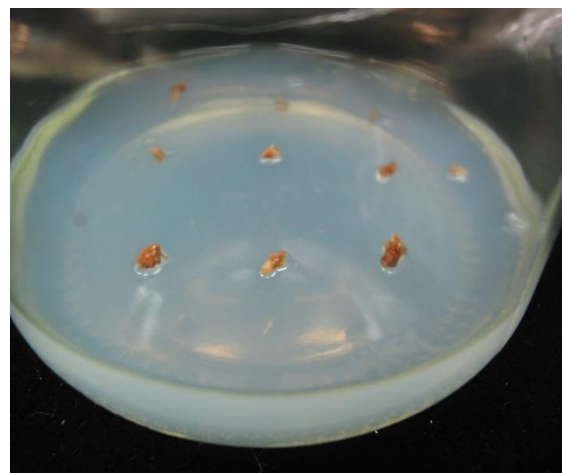
Obrázek 33 Hodnocení životnosti vrcholů – LS roztok (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)



Obrázek 34 Hodnocení životnosti vrcholů – 1/2 PVS (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)



Obrázek 35 Hodnocení životnosti vrcholů – 2 h PVS (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)



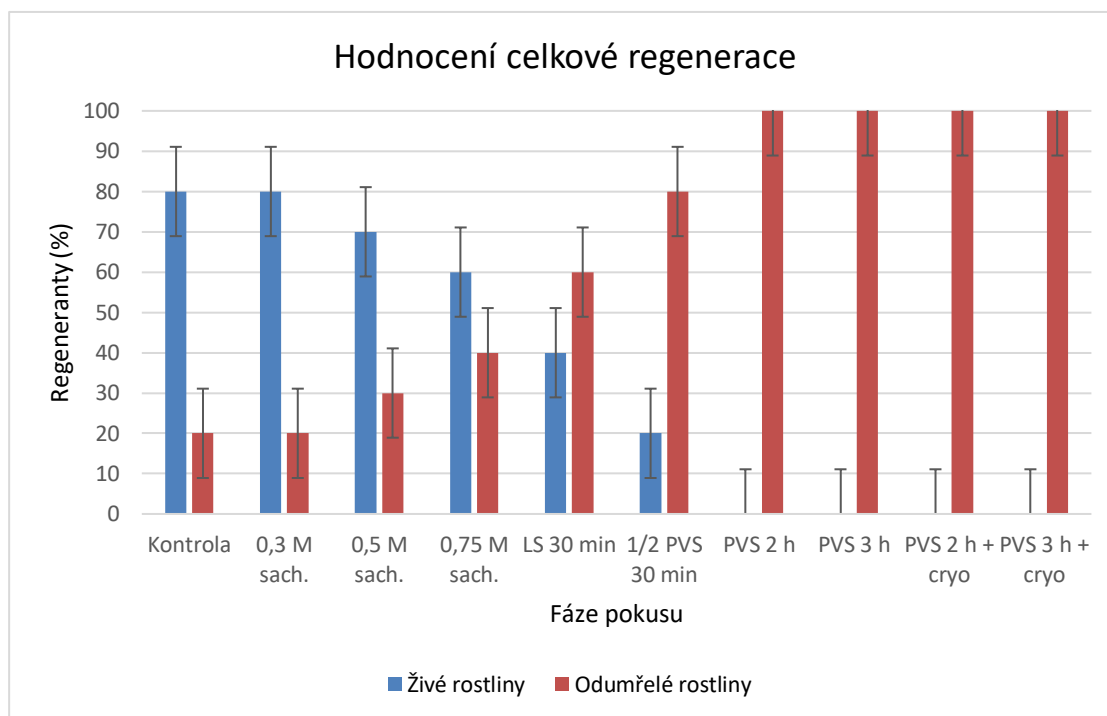
Obrázek 36 Hodnocení životnosti vrcholů – 3 h PVS (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)

### 5.4.3 Hodnocení regenerace

Hodnocení regenerace růstových vrcholů bylo provedeno po 7 týdnech od aplikace kryoterapie.

Byla vyhodnocena celková regenerace vycházející z celkového počtu růstových vrcholů umístěných na regenerační médium.

Nejvíce regenerantů (80 %) bylo obdrženo z variant kontrolní izolace růstových vrcholů a 24 h kultivace na médiu s 0,3 M sacharózou. U vrcholů odebraných z média se zvýšeným obsahem sacharózy 0,5 M bylo dosaženo 70% regenerace. Regeneranty bylo ještě možné obdržet z vrcholů odebraných po působení 1/2 PVS roztoku v množství 30 %. Vyšší stupně dehydratace nepřežil žádný růstový vrchol, proto nebylo možno získat žádnou zregenerovanou rostlinu z variant při použití vitrifikačních roztoků PVS 2 h, PVS 3 h a za působení kryogenních teplot.



Graf 12 Hodnocení regenerace

Brison a kolektiv (1997) uvádí, že při působení PVS 2 roztoku na růstové vrcholy *Prunus domestica* L. po dobu až 40 min a následném působení tekutého dusíku bylo dosaženo 70% regenerace vrcholů o velikosti 1,5 až 2 mm. Při snižování velikosti vrcholu docházelo ke snižování procent regenerantů. Neuvádí však množství vody ve vrcholu, díky kterému byly rostliny schopny přežít.

Regenerace růstových vrcholů po procesu kryoterapie je důležitá z hlediska zisku dostatečného množství rostlinného materiálu, který bude následně testován na přítomnost virů v rostlině, a širokého okruhu potencionálních bezvirózních vzorků. Regenerace růstových vrcholů proběhla pouze u variant samotné izolace růstových vrcholů, u médií s 0,3 M, 0,5 M a 0,75 M sacharózy, při použití LS roztoku a při použití vitrifikačního roztoku 1/2 PVS. Z vrcholů, které byly vystaveny kryogenním teplotám, se nepodařilo získat žádného regeneranta. Z tohoto důvodu neproběhla následná analýza rostlin na přítomnost virů pomocí ELISA testu. V konečné fázi pokusu neproběhla ani multiplikace zregenerovaných rostlin, jelikož vrcholy, z nichž rostliny byly zregenerovány, nebyly vystaveny kryogenním teplotám, tudíž s vysokou pravděpodobností nebyly ozdraveny. Ozdravení by bylo možné samotnou izolací meristému v případě, kdyby byly izolovány růstové vrcholy o menších rozměrech.

## 6 ZÁVĚR

Diplomová práce byla zpracována na téma Aplikace kryoterapie při ozdravování regenerantů *Prunus persica* (L.) Batsch od rostlinných virů.

Literární část práce popisuje obecnou charakteristiku broskvoní se zaměřením na obecný botanický popis broskvoní zahrnující podmínky pěstování a obsahové složky plodů broskvoní, dále zhodnocení dnešního sortimentu komerčně pěstovaných broskvoní a bližší popis nejrozšířenější odrůdy 'Redhaven'. Dále je zhodnocen stav pěstování broskvoní v České republice a nejrozšířenější choroby a škůdci vyskytující se na broskvoních. Součástí literární části je také popis třech ekonomicky významných virů, se kterými je dále pracováno v praktické části. Součástí literární rešerše je také popis *in vitro* kultur broskvoní. Krátce jsou představeny hlavní obecné metody eliminace virů.

Problematiku kryoterapie rozširuje kapitola pojednávající o kryoprezervaci, kde jsou uvedeny základní principy dlouhodobého uchování rostlinného materiálu v ultranízkých teplotách a zacházení s rostlinným materiálem před metodou kryoprezervace, popř. kryoterapie. Je popsána samostatná metoda kryoterapie a její využití v praxi u konkrétních případech eliminace virů či fytoplasem. Na závěr literární části jsou popsány jednotlivé metody detekce virů.

Praktickou částí diplomové práce byla aplikace kryoterapie na růstové vrcholy za účelem jejich ozdravení od virů. Samotné kryoterapii předcházelo namnožení rostlinného materiálu a optimalizace kultivačních podmínek pro broskvoň odrůdy 'Redhaven'. Byly změřeny růstové charakteristiky a byly porovnány vlastnosti růstu u několika typů vyzkoušených multiplikačních médií. Následně byla na Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni provedena izolace růstových vrcholů a byl na ně aplikován obecný kryoprotokol využívaný výzkumným týmem Fyziologie a kryobiologie rostlin. Při aplikaci kryoprotokolu byl změřen obsah intracelulární vody obsažené ve vrcholech a teplota tání.

Výsledky práce ukazují, že aplikovaný kryoprotokol nebyl pro plodinu broskvoně vhodný. Při aplikaci kryoprotokolu došlo k vysoké dehydrataci vrcholů, která negativně ovlivnila jejich životnost. Růstové vrcholy odrůdy 'Redhaven' byly schopny přežít dehydrataci na 40 % intracelulární vody ve vzorku. Žádného živého růstového vrcholu nebylo dosaženo při dehydrataci vzrůstných vrcholů na 1,5 až 4 % vody při použití

kryogenních teplot i při běžných laboratorních podmínkách. Životnost vrcholů byla ovlivněna vysokou mírou dehydratace, nikoliv letálním poškození vlivem působení kryogenních teplot.

## 7 ABSTRAKT

Diplomová práce byla zpracována na téma Aplikace kryoterapie při ozdravování regenerantů *Prunus persica* (L.) Batsch od rostlinných virů. Pokus byl uskutečněn na Agronomické fakultě Mendelovy univerzity v Brně a na Výzkumném ústavu rostlinné výroby v Praze-Ruzyni.

V literární části jsou popsány informace o kultivaci a ozdravování broskvoní metodou kryoterapie. Informace byly následně využity v praktické části pokusu. Pro praktickou část byl použit rostlinný materiál odrůdy broskvoně 'Redhaven' v podmínkách *in vitro*. Kryoterapie byla aplikována na růstové vrcholy. Po aplikaci kryoterapie byla zhodnocena životnost a regenerace růstových vrcholů.

**Klíčová slova:** 'Redhaven', *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, *Prune dwarf virus*, kryoprezervace, dehydratace, broskvoně *in vitro*

Final thesis was worked out on theme Application of cryotherapy as a tool for plant viruses eradication from *Prunus persica* (L.) Batsch regenerants. Experiment was conducted on Faculty of Agronomy of the Mendel University in Brno and in the Crop Research Institute in Prague-Ruzyně.

Literary research describes information about peach cultivation *in vitro* and plant pathogen eradication by cryotherapy. These information has been used in practical part of the final thesis. Plant material of the 'Redhaven' variety of peach was used for virus eradication by cryotherapy. Cryotherapy was applied on shoot tips. In the end of final thesis shoot tips viability and regeneration were evaluated.

**Key words:** 'Redhaven', *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, *Prune dwarf virus*, cryopreservation, dehydration, peach *in vitro*



## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABDIN M. Z., KIRAN U., ALI A., KAMALUDDIN. *Plant Biotechnology: Principles and Applications*. Singapore: Springer Nature, 2017. ISBN 978-981-10-2959-2.

ABELES F. B. *Ethylene in plant biology*. New York: Academic Press, 1973. ISBN 0120414503.

AGRIOS G. N. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Elsevier. Academic Press, 2005. ISBN 0-12-044565-4.

AITKEN-CHRISTIE J., KOZAI T., SMITH M. A. L. *Automation and environmental control in plant tissue culture*. New Zealand: Springer Science + Business Media Dordrecht, 1995. ISBN 978-90-481-4405-1.

AL-KHAYRI J. M., JAIN S. M., JONHSON D. V. *Advances in plant breeding strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools* [online]. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland, 2016 [cit. 2017-03-19]. ISBN 978-331-9225-203.

BAJAJ, Y. P. S. In vitro preservation of genetic resources – techniques and problems. In: *Int Symp Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement*. Vienna: IAEA, 1986, s. 43-57. ISBN 92-0-010086-4.

BALDWIN B. D., BANDRA N. S., TANINO K. K. Is tissue culture a viable system with which to examine environmental and hormonal regulation of cold acclimation in woody plants? *Physiol Plant*. 1998, 102:201-209.

BARBA M., CUPIDI A., LORETI S., FAGGIOLI F. MARTINO L. In vitro micrografting: a technique to eliminate peach latent mosaic viroid from peach. *Acta Hort*. 1995, 386:531-535.

BAŽANT Z. a kol. *Pěstujeme broskvoně*. 1. vyd. Praha: Grada, 2003, 105 s., [8] s. barev. obr. příl. ISBN 80-7169-518-1.

BAŽANT Z., KALÁŠEK J., VACHŮN Z., VÁVRA M., ZACHA V. *Pěstování meruněk a broskvoní*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1974.

BHOJWANI S. S., DANTU P. K. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. New Delhi: 2013. ISBN 978-81-322-1025-2.

BHOJWANI S., RAZDAN M. *Plant tissue culture: theory and practice*. Rev. ed. New York: Elsevier, 1996. 767 s. ISBN 04-448-1623-2.

BILAVČÍK A., FALTUS M., ZÁMEČNÍK J. Teoretické základy uchování rostlin a jejich částí v ultranízkyých teplotách. In: *Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin a Dostupnost využívání genetických zdrojů rostlin a podpora biodiversity*. Praha: 2005, s. 28-34. ISBN 80-86555-71-2.

BLAŽEK J. *Ovocnictví*. Praha: Květ, 1998. ISBN 80-85362-33-3.

BORJA M. J., PONZ F. An appraisal of different methods for the detection of walnut strain of cherry leafroll virus. *J. Virol. Methods*. 1992, 36:73-83.

BRČÁK J. Rostlinné viry. In: URBAN Z. *Základy fytopatologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1983, s. 32-52.

BRISON M., DE BOUCAND M. T., PIERRONNET A., DOSBA F. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. Prunus rootstock experimentally contaminated with plum pox potyvirus. *Plant Science*. 1997, 123:189 – 196.

BUCHTOVÁ, I. *Situační a výhledová zpráva: Ovoce*. Praha: Ministerstvo zemědělství, 2016. ISBN 978-80-7434-256-1.

BURG S. P., BURG E. A. Ethylene formation in pea seedlings. Its relation to the inhibition of bud growth caused by indole-3-acetic acid. *Plant Physiol*. 1968, 43:1069-1074.

CLARK M. F., ADAMS A. N., BARBARA D. J. The detection of plant viruses by Enzyme-linked Immunodorbent Assay (ELISA). *Acta Hort*. 1976, 57:43-49.

DAMIANO C., SGUEGLIA A., ARIAS M., FRATTARELLI A., CONDELLO E., CABONI E. Cryopreservation of peach shoot tips by encapsulation dehydration. *Acta Hort*. 2011, 918:121-124.

DEBERG P. C., READ P. E. Microtopagation. In: DEBERG P. C., ZIMMERMANN R. H. a kol. *Micropropagation: Technology and Application*. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1991, s. 1-14.

DIEKMANN M., PUTTER C. *Stone fruits*. Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm, 1996. 109 s. ISBN 92-904-3160-1.

DING F., JIN S., HONG N., ZHONG Y., CAO Q., YI G., WANG G. *Vitrification–cryopreservation, an efficient method for eliminating Candidatus Liberobacter asiaticus, the citrus Huanglongbing pathogen, from in vitro adult shoot tips*. 2008. DOI: 10.1007/s00299-007-0467-8. ISBN 10.1007/s00299-007-0467-8. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00299-007-0467-8>

DOTLAČIL. L. Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin - současné problémy a přístupy k jejich řešení. In: *Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin a Dostupnost využívání genetických zdrojů rostlin a podpora biodiversity*. Praha: 2005, s. 5-11. ISBN 80-86555-71-2.

DOVAS C. I., HATZILOUKAS E., SALOMON R., BARG E., SHIBOLETH Y., KATIS N. I. Comparison of methods for virus detection in *Allium* spp. *Journal of Phytopathology*. 2001, 149:731-737 s.

DRIVER J. A., KUNIYUKI A. H. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*. 1984, 19:507-509.

DZIEDZIC E. Elimination of Prunus necrotic ringspot virus (PRNSV) from plum 'Earliblue' shoots through thermotherapy in vitro. *J. Fruit Ornamental Plant Res*. 2008, 16:10-109.

ENGELMANN F. Cryopreservation of clonal crops: a review of key parameters. *Acta Hort*. 2014.

ENGELMANN F. In vitro conservation methods. In: FORD-LLOYD B. V., NEWBURY J. H., CALLOW J. A. a kol. *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*. Wellingford: CABI, 1997, s. 119-162.

ENGELMANN F., DUSSERT S. Cryopreservation In: NORMAH M. N., CHIN H. F., REED B. M. a kol. *Conservation of tropical plant species*. New York: Springer, 2013, s. 107-109.

FAHY G. M. Vitrification: A new approach to organ cryopreservation. *Prog. Clin Biol Res*. 1986, 224:305-35.

FALTUS M., ZÁMEČNÍK J., BILAVČÍK A. Metody kryoprezervace. In: *Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin a Dostupnost využívání genetických zdrojů rostlin a podpora biodiversity*. Praha: 2005, s. 35-40. ISBN 80-86555-71-2.

FALTUS M., ZÁMEČNÍK J., DĚDIČ P., HORÁČKOVÁ V. *Využití kryoterapie pro ozdravení bramboru od virových patogenů*. Praha, 2012b. ISBN 978-80-7427-108-3.

FALTUS M., ZÁMEČNÍK J., SVOBODA P. *Využití metody kryoterapie pro ozdravení chmele od virových patogenů: certifikovaná metodika*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012a. ISBN 978-80-7427-109-0.

FARBE J., DEREUDDRE J., Encapsulation dehydration – a new approach to cryopreservation of Solanum shoot-tip. *Cryo Lett.* 1990, 11:413-426.

FENG CH., WANG R., LI J. a kol. Production of Pathogen-Free Horticultural Crops by Cryotherapy of In Vitro-Grown Shoot Tips. In: *Protocols for Micropropagation of Selected Economically Horticultural Plants*. 2012, s. 463-482. DOI: 10.1007/978-1-62703-074-8\_35.

FENG CH., YIN Z., MA Y. a kol. Cryopreservation of sweetpotato (Ipomea batatas) and its pathogen eradication by cryotherapy. *Biotechnology Advances*. 2011, 29: 84-93.

FIŠEROVÁ H., VYHNÁNEK T., STAŇKOVÁ Z., KOZÁK V., KLEMŠ M., HAVEL L. Effect of garlic genotype on cloves formation under in vitro conditions. *Hort. Sci.* Praha: 2016, 43:142-148. DOI: 10.17221/151/2015-HORTSCI.

FRONKOVÁ H. *Metody eliminace virů u meruněk a broskvoní*. Lednice: 2015. Bakalářská práce. Mendelova univerzita. Vedoucí práce Martina Kudělková.

GELLA R., ERREA P. Application of in vitro therapy for Ilarvirus elimination in three Prunus species. *J. Phytopathology*. 1998, 146:445-449.

GILMER R. M., BLODGETT E. C. Virus diseases of peach: X-disease. In: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. Washington, D.C: 1976, 437:145-155.

GOLIÁŠ J. *Skladování a zpracování ovoce a zeleniny*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014. ISBN 978-80-7509-195-6.

HLADÍK F., MALIK T., VACHŮN Z. a kol. *Malá pomologie IV: Meruňky, broskve, mandle, ořechy vlašské a lískové*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1966.

HLADÍK, F. *Meruňky, broskve, mandle, ořechy vlašské a lískové*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1966, 320 s.

HRIČOVSKÝ I., BENEDIKOVÁ D., KRŠKA B. *Meruňky a broskvoně*. Bratislava: Příroda, 2004. ISBN 80-07-01228-1.

CHAWLA H. S. *Introduction to plant biotechnology*. 2nd ed. Enfield N.H.: Science Publishers, 2002. ISBN 15-780-8228-5.

ISAC M. Obtaining plum varieties free of viruses by in vitro technique. *Acta Hort*. 1986, 193:213-216.

KADLECOVÁ, E. *Studium složení kultivačních médií pro množení odrůd meruňek metodou in vitro*. Lednice: 2014. Bakalářská práce. Mendelova univerzita. Vedoucí práce Břetislav Křížan.

KALÁŠEK J., RICHTER M. *Meruňky, broskvoně na zahrádce*. 2. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989.

KARTHA K. K. *Cryopreservation of plant cells and organs*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1985. ISBN 0-8493-6102-8.

KAYA E., YILMAZ GOKDOGAN E. Virus eradication from plants via novel biotechnological processes: one step freezing methods based on vitrification of cryotherapy techniques. *Mugla Journal of Science and Technology*. 2015, 2:34-40.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev.* 1993, 44:283.

KENKNIGHT G. Virus diseases of peach: Peach rosette. In: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. Washington, D.C.: 1976, 437:73 - 76.

KEVERS C., BOYER N., COURDUROUX J. C., GASPAR T., CAO Q., YI G., WANG G. *The influence of ethylene on proliferation and growth of rose shoot cultures*. ISBN 10.1007/BF00055514.

KIMMERER T. W., KOZLOWSKI T. T. Ethylene, Ethane, Acetaldehyde, and Ethanol Production By Plants under Stress. *Plant Physiol*. 1982, 69:840-847.

KINCL L., KINCL M., JAKRLOVÁ J. *Biologie rostlin: Pro 1. ročník gymnázií*. 4. Praha: Fortuna, 2006. ISBN 80-7168-947-5.

KLOS E. Virus diseases of peach: Rosette mosaic. In: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. Washington, D.C.: 1976, 437:135-138.

KLUŠÁK J. *Chlorotická skvrnitost jabloně*. Zahradnictví JIKL [online]. 2013 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.jikl.cz/jadroviny/2052-chloroticka-skvrnitost-jablone.html>.

KOUBOURIS, MALIOGKA, EFTHIMIOU, KATIS, VASILAKAKIS. Elimination of Plum pox virus through in vitro thermotherapy and shoot tip culture compared to conventional heat treatment in apricot cultivar Bebecou. *Journal of General Plant Pathology*. 2007, 5:370-373.

KŘÍŽAN B., BARÁNKOVÁ K., ONDRUŠIKOVÁ E., ADAM M., HOLLEINOVÁ V., PIDRA M. Thermotherapy of grapevines and apricots by reason of viruses and phytoplasma elimination. In: GALAYAN K., ERTUNC F., XX *International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperature Fruit Crops – Fruit Tree Diseases*. 1. Vyd. Leuven – Acta Hort. 2008, 781:93-98. ISBN 978-90-6605-080-8.

KŘÍŽAN B., ONDRUŠIKOVÁ E. Thermotherapy of apricot cultivars. *Acta Hort*. 2009, 839:55-56. ISSN 0567-7572.

KŘÍŽAN B., ONDRUŠÍKOVÁ E., MOUDRÁ J., EICHMEIER A., HOLLEINOVÁ V. Ozdravování rostlin odrůd meruňky a broskvoně od virů pomocí chemoterapie. *Zahradnictví*. 2012, roč. 2011, č. 12. ISSN: 1213-7596.

KŘÍŽAN B., ONDRUŠIKOVÁ E., TRČKOVÁ K., Vliv složení kultivačního média na růst rostlin révy vinné během in vitro termoterapie. In: *Konference Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin*. Praha, Sborník abstraktů, 2005 s. 163, ISBN: 80-86555-63-1.

KUČERIK J. Termická analýza - Diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC). *ChemPoint* [online]. [cit. 2017-04-17]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/kucerik-2>.

KUDĚLKOVÁ M.. *Eliminace virů u odrůd česneku kuchyňského v podmínkách in vitro*. Lednice: 2010. Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Ing. Břetislav Křížan, Ph.D.

LAIMER M., HANZER V., MENDONCA D., KRISTON E., TOTH E. K., KIRILLA Z., BALLA I. Elimination and detection of pathogens from tissue cultures of *Prunus* sp. *Acta Hort.* 2006, 725:319-324.

LANGIS R., STEPONKUS P. L. Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. *Plant Physiol.* 1990, 92:666-671.

LAYNE D. R., BASSI D. *The peach: botany, production and uses*. Cambridge, MA: CABI, 2008, xvi, s. 615. ISBN 978-184-5933-869.

LLOYD G., MCCOWN. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 1980 30:42.

LOEBENSTEIN, KATIS. Advance in VIRUS RESEARCH: *Control of Plant Virus Diseases: Vegetatively-Propagated Crops*. London: Academic Press, 2015. ISBN 978-0-12-802762-2.

LUMSDEN P. J., NICHOLAS J. R., DAVIES W. J. *Physiology, Growth and Development of Plant in Culture*. New Zealand: Springer Science + Business Media Dordrecht, 1994. ISBN 978-94-010-4339-7.

MACHÁČKOVÁ I. Etylen. In PROCHÁZKA S. a kol. *Regulátory rostlinného růstu*, Praha: Akademie, 1997, s. 92-101. ISBN 80-200-0597-8.

MATTHEWS R. E. F. *Plant Virology*. 3rd edition. London: Academic Press, 1991, 835 s.

MATTHEWS R., HULL R., MATTHEWS R. *Matthews' plant virology*. 4th ed. /. San Diego: Academic Press, 2002, xx, 1001 s. ISBN 01-236-1160-1.

MIRCETICH S. M., FOGLE H. W. Virus diseases of peach: Peach stem pitting. In: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. Washington, D.C.: 1976, 437:77-87.

MIRCETICH S. M., FOGLE H. W., CIVEROLO E. L. *Peach Stem Pitting: Transmission and Natural Spread*. 1970.

MORINI S., FORTUNA P., SCIUTTI R., MULEO R. Effect of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots cultured in vitro. *Advances in Horticultural Science*. 1990, 4:163-166.

MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962, 15:473-479.

NAVARRO L., LLACÉR G., CAMBRA M., ARREQUI J. M., JUÁREZ J. Shoot-tip grafting in vitro for elimination of viruses in peach plants (*Prunus persica* Batsch.). *Acta Hort*. 1982, 130:185-192.

NAYUDU, M. V. *Plant viruses*. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 2008. ISBN 9780070656604.

NEČAS T., KRŠKA B. Plum pox virus (PPV) šarka švestek. *Multimediální učební skriptum ovocnictví: Interaktivní databáze chorob a škůdců ovocných plodin* [online]. 2006c [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: [http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav\\_551/aplikace/soubory/ppv.pdf](http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/aplikace/soubory/ppv.pdf)

NEČAS T., KRŠKA B. Prune dwarf virus (PDV) zakrslost slivoně. *Multimediální učební skriptum ovocnictví: Interaktivní databáze chorob a škůdců ovocných plodin* [online]. 2006b [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: [http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav\\_551/aplikace/soubory/pdv.pdf](http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/aplikace/soubory/pdv.pdf)

NEČAS T., KRŠKA B. Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) nekrotická kroužkovitost třešně. *Multimediální učební skriptum ovocnictví: Interaktivní databáze chorob a škůdců ovocných plodin* [online]. 2006a [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: [http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav\\_551/aplikace/soubory/pnrsv.pdf](http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/aplikace/soubory/pnrsv.pdf)

NYLAND G., GILMER R. M., MOORE J. D. Virus diseases of peach: "Prunus" ring spot group. In: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. Washington, D.C.:1976, 437:104-132.

OGAWA J. M., ENGLISH H. *Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops*. Oakland, Calif.: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, 1991, 461 s. ISBN 0-931876-97-4.

ONDRÁŠEK I., KRŠKA B. Současný stav produkce broskví v ČR. *Zahradnictví*. 2014, č. 2. ISSN: 1213-7596



OSTRÓ A., PILKA L., LESNÍK F., Kryobiologie gamet a embryí In: *Reprodukční medicína – současnost a perspektivy*. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2009.

PANIS B., PIETTE B., SWENNEN R. Droplet vitrification of apical meristem: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Sci.* 2005, 168:635-640.

PAUNOVIC S., RUZIC D., VUJOVIC T., MILENKOVIC S., JEVREMOVIC D. In vitro production of plum pox virus – free plums by chemotherapy with ribavirin. *Biotechnol. & Biotechnol.* 2007, 21:417-421.

PINE T. S., GILMER R. M.. Virus diseases of peach: Peach yellows. In: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. Washington, D.C., 1976, 437:91-95.

POLÁK J. *Šarka peckovin - současný stav problematiky v České republice a v Evropě*: Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2010, 66 s. ISBN 978-80-7427-039-0.

POLÁK J., HAUPTMANOVÁ A. *Metodika ozdravování odrůd slivoně a meruňky infikovaných virem šarky švestky metodou termoterapie in vivo a chemoterapie in vitro kultur: uplatněná metodika*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008, 18 s. ISBN 978-80-87011-81-2.

POLGE C., SMITH A. U., PARKES A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949, 164:666.

PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J. *Fyziologie rostlin*. Praha, 1998.

PROKEŠ J., FIŠEROVÁ H., HELÁNOVÁ A., HARTMANN J. Význam oxidu uhličitého a thylenu v procesu sladování. *Kvasny Prum.* 52, 2006, 11-12, s. 349-352. ISSN 0023-5830.

QUOIRIN M., LEPOIVRE P. Improved medium for in vitro culture of Prunus sp. *Acta Hort.* 1977, 78:437-442.

RABINOWITCH H. D., CURRAH L. *Allium crop science: Recent Advantages*. CAB International, Wallingford: 2002.

RAVELONANDRO M., MINOIU N., SCORZA R. Investigation of potential environmental impacts in the release of transgenic plums. *Acta Hort.* 2004, 657:325-329.

REED B. M. *Plant cryopreservation: a practical guide*. New York: Springer, 2008. ISBN 0387722750.

ROSHCHINA V. V., ROSHCHINA V. D. *The Excretory Function of Higher Plants*. 1993. ISBN 978-3-642-78132-2.

ROSYPAL S. *Úvod do molekulární biologie: Díl třetí. Molekulární biologie virů, mutageneze, kancerogeneze a rekombinace. Opravy poškozené DNA*. 3. vyd. Brno: 2000, s. 604-900. ISBN 80-902-5622-8.

SAIKI R. K., GELFAND G. H., STOFFEL S. J., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988, 239:487-491.

SAKAI A. Cryopreservation for germplasm collection in woody plants. In: JAIN, S., GUPTA P., NEWTON R. a kol. *Somatic embryogenesis in woody plants*, Vol. 1, Kluwer: Dordrecht, 1995, s. 293– 315.

SAKAI A. Plant cryopreservation In: FULLER B., LANE N., BENSON E. E. a kol. *Life in the Frozen State*. London, New York: CRC Press, 2004, s. 329-345.

SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I., Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus chinensis* Osb. var. *Brasiliensis* Tanaka) by a simple freezing method. *Plant Sci.* 1991, 74:243-248.

SALUNKHE D. K., KADAM S. S. *Handbook of fruit science and technology: production, composition, storage, and processing*. New York: M. Dekker, 1995. ISBN 08-247-9643-8.

SAPONARI M., BOTTALICO G., SAVINO V. In vitro propagation of *Prunus mahaleb* and its sanitation from Prune dwarf virus. *Adv. Hort.* 1999, 13:56-60.

SEUFFERHELD M. J., FITZPATRICK J., WALSH T. M., STUSHNOFF C. Cryopreservation of dormant buds from cold tender taxa using a modified vitrification procedure. In: *28th Annual Cryobiology Meeting, Cryobiology*. 1991, 28:576.

SCHLESINGEROVÁ. Ministerstvo zemědělství ČR ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou. *Virus šarky švestky: Plum pox virus*. Praha, 2011, 8 s. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/file/141183/PPV.pdf>.

SCHLOCKER A., TRAYLOR J. A. Virus diseases of peach: Yellow bud mosaic. In: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. Washington, D.C.: 1976, 437:156-165.

SCHNEIDER, H. *Determining the Effectiveness of Cryotherapy to Eliminate Plant Virus in Potato*. 2010.

SMOLÁK J. *Ochrana rostlin: Příručka pathologie rostlin*. 1.vyd. Praha: SZN, 1954, 526 s. příl.

STEIN A., SPIEGEL S., FAINGERSH G., LEVY, S. Responses of micropropagated peach cultivar to thermotherapy for elimination of prunus necrotic ringspot virus. *Ann. Appl. Biol.* 1991, 119:265-271.

STRAND L. *Integrated pest management for stone fruits*. Oakland, California:1999, 264 s. ISBN 1-879906-36-8.

ŠAFRÁNKOVÁ I., MATOUŠKOVÁ J., BUCHTOVÁ A. *Choroby a škůdci orchidejí*. 1. vyd. Praha: Grada, 2013, 96 s., [16] s. obr. příl. Česká zahrada, 108. ISBN 978-802-4746-067.

ŠPAK J. *Diagnostika rostlinných virů: Studijní text ke kurzu EKOTECH Diagnostika rostlinných patogenů*. České Budějovice: 2010.

ŠUTIĆ D. D., FORD R. E., TOŠIĆ M. T. *Handbook of plant virus diseases*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1999, xxiii, 553 s. ISBN 08-493-2302-9.

TANNOURY M., RALAMBOSOA J., KAMINSKI M., DEREUDDRE J. Cryopreservation by vitrification of coated shoot-tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultured in vitro. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. Paris 313: Série III, 1991, s. 633–638.

TESSEREAU H., FLORIN B., MESCHINE M. C., THIERRY C., PÉTIARD V. Cryopreservation of somatic embryos: a tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. *Annals of Botany*. 1994, 74, 547–555.

TRIGIANO R. N., GRAY D. J. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. Taylor and Francis Group, 2011. ISBN 978-1-4200-8327-9.

URAGAMI A., SAKAI A., NAGAI M., THAKASHI T. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell*. 1989, 8:418:421.

VÁVRA M. *Komora meruněk, broskví a hroznů*. 1. vyd. Brno: Krajské nakladatelství, 1963, 146 s.

VERMA L. R., SHARMA R. C. *Disease of Horticultural Crops: Fruits*. New Dehli: Elegant Printers, 1999. ISBN 81-7387-095-0.

VUNSH R., ROSNER A., STEIN A. The use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of bean yellow mosaic in gladiolus. *Annals of Applied Biology*. 1990, 117:661-669.

WAGNON H. K., WILLIAMS H. E., TRAYLOR J. A. Virus diseases of peach: Stubby twig. In: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. Washington, D.C.: 1976, 437:139-143.

WANG Q. C., CUELLAR W. J., RAJAMÄKI M. L., HIKARA Y., VALKONEN J. P. T. Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants. *Molecular Plant Pathology*. 2008b, 9:237-250.

WANG Q. C., MAWASSI M., LI P., GAFNY R., SELA I., TANNE E. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*. 2003, 165:321-327.

WANG Q. C., PANIS B., ENGELMANN F., LAMBARDI M., VALKONEN J.P.T. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology*. 2008a, 154(3):351-363.

WANG Q., LIU Y., XIE Y., YOU M. Cryotherapy of Potato Shoot Tips for Efficient Elimination of Potato Leafroll Virus (PLRV) and Potato Virus Y (PVY). *Potato Research*. 2006, 49:119-129. DOI: 10.1007/s11540-006-9011-4.

WANG Q., VALKONEN J. P. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in plant science*. 2009, 14(3):119-122.

WILLIAMS H. E., WADLEY B. N., WAGNON H. K. Virus diseases of peach: Asteroid spot. In: *Virus diseases and noninfectious disorders of stone fruits in North America*. No. 437. Washington, D.C: 1976.

WITHERS L. A., KING P. J. A simple freezing unit and cryopreservation method for plant cell suspensions. *Cryo-Letters*. 1980, 1:213-220.

WOLTERING E. J., DE JONG A. J., IAKIMOVA E., KAPCHINA V., HOEBERICHTS F. A. Ethylene: mediator of oxidative stress and programmed cell death in plants. In: VENDRELL M., KLEE H., PECH J. C., ROMOJARO F a kol. *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene III*. Amsterdam, The Netherlands: IOS Press, 2003, s. 315-323.

### **Internetové zdroje**

Bezpečnostní list: Dusík, hluboce zchlazený, kapalný. *Linde Vítkovice* [online]. Ústí nad Labem, 2004 [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://www.linde-vitkovice.cz/pdf/dusik-kapalny.pdf>

Databáze odrůd. ÚKZÚZ: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [online]. Brno, 2017 [cit. 2017-04-14]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/app/sok/odrudyNouRL.do>

*Description of Plant Viruses* [online]. 2013 [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: <http://www.dpvweb.net/index.php>

Fruit pioneer Johnston, who headed South Haven station, is honored for his work. *The Herald Palladium* [online]. USA, 2000 [cit. 2016-12-29]. Dostupné z: [http://www.heraldpalladium.com/localnews/fruit-pioneer-johnston-who-headed-south-haven-station-is-honored/article\\_5da81461-0733-51e0-82e0-813e89176de2.html](http://www.heraldpalladium.com/localnews/fruit-pioneer-johnston-who-headed-south-haven-station-is-honored/article_5da81461-0733-51e0-82e0-813e89176de2.html)

Genofondy a genové banky ovocných plodin: Metodické listy OPVK. VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY. *Vsuo* [online]. Holovousy, ©2015-2017a [cit. 2017-04-05]. Dostupné z: [http://www.vsuo.cz/common/cms\\_files\\_pr/files\\_to\\_download/A1\\_Genofondy\\_ovocnych\\_plodin.pdf](http://www.vsuo.cz/common/cms_files_pr/files_to_download/A1_Genofondy_ovocnych_plodin.pdf)

Iarvirus. *ViralZone* [online]. Switzerland: Swiss Institute of Bioinformatics, 2017 [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/136.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/136.html)

*Prunus persica* (L.) Batsch. *United States Department Of Agriculture: Agricultural Research Service* [online]. USA, 2015 [cit. 2016-12-29]. Dostupné z: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=30065>

Využití moderních in vitro biotechnologií v ovocnářství: Metodické listy OPVK. VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY. *Vsuo* [online]. Holovousy, ©2015-2017b [cit. 2017-04-05]. Dostupné z:

[http://www.vsuo.cz/common/cms\\_files\\_pr/files\\_to\\_download/A8\\_Vyuziti\\_in\\_vitro\\_bio\\_tehnologii.pdf](http://www.vsuo.cz/common/cms_files_pr/files_to_download/A8_Vyuziti_in_vitro_bio_tehnologii.pdf)

## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

### Obrázky:

Obrázek 11 Počáteční stav rostlinného materiálu (foto: H. Fronková, 21. 3. 2016)

Obrázek 12 Mateční rostlina připravená k dělení (foto: H. Fronková, 30. 6. 2016)

Obrázek 13 Mateční rostlina připravená k řezu (foto: H. Fronková, 30. 6. 2016)

Obrázek 14 Rostliny získané dělením mateřské rostliny (foto: H. Fronková, 3. 1. 2017)

Obrázek 15 Schéma pokusu (vytvořila H. Fronková)

Obrázek 16 Umístění vzrůstných vrcholů na dehydratační médium QL 0,3 M sacharóza (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 17 Umístění vzrůstných vrcholů na dehydratačním médiu QL 0,75 M sacharóza (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 18 Působení LS roztoku na růstové vrcholy (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 9 Umístění vzrůstných vrcholů na dehydratační médium (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 10 Působení ½ PVS roztoku na růstové vrcholy (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 11 Působení PVS roztoku na růstové vrcholy (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 12 Růstové vrcholy připravené na kryoterapii (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 13 Růstové vrcholy na hliníkovém plišku (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 14 Kryozkumavky a stojan na kryozkumavky s tekutým dusíkem (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 15 Ponoření růstových vrcholů do tekutého dusíku (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 16 Plíšek s růstovými vrcholy umístěný v kryozkumavce s tekutým dusíkem (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 17 Rozmrazování růstových vrcholů po kryoterapii: varianta PVS 2 h (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 18 Rozmrazování růstových vrcholů po kryoterapii: varianta PVS 3 h (foto: H. Fronková, 2. 3. 2017)

Obrázek 19 Růst rostlin na médiu QL, stáří rostlin 4 týdny (foto: H. Fišerová, 3. 10. 2016)

Obrázek 20 Růst rostlin na médiu QL A, stáří rostlin 4 týdny (foto: H. Fišerová, 3. 10. 2016)

Obrázek 21 Růst rostlin na médiu WPM 1,7BA, stáří rostlin 4 týdny (foto: H. Fišerová, 3. 10. 2016)

Obrázek 22 Růst rostlin na médiu QL+sterilní voda, stáří rostlin 4 týdny (foto: H. Fišerová, 3. 10. 2016)

Obrázek 23 Varianta R50 (foto: H. Fišerová, 21. 8. 2016)

Obrázek 24 Varianta R57 (foto: H. Fišerová, 21. 8. 2016)

Obrázek 25 Varianta R58 (foto: H. Fišerová, 21. 8. 2016)

Obrázek 26 Varianta R61 (foto: H. Fišerová, 21. 8. 2016)

Obrázek 27 Varianta Z64 (foto: H. Fišerová, 21. 8. 2016)

Obrázek 28 Odumření rostliny vlivem infekce (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)

Obrázek 29 Hodnocení životnosti vrcholů – kontrola (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)

Obrázek 30 Hodnocení životnosti vrcholů – médium 0,3 M sacharóza (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)

Obrázek 31 Hodnocení životnosti vrcholů – médium 0,5 M sacharóza (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)

Obrázek 32 Hodnocení životnosti vrcholů – médium 0,75 M sacharóza (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)



Obrázek 33 Hodnocení životnosti vrcholů – LS roztok (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)

Obrázek 34 Hodnocení životnosti vrcholů – ½ PVS (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)

Obrázek 35 Hodnocení životnosti vrcholů – 2 h PVS (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)

Obrázek 36 Hodnocení životnosti vrcholů – 3 h PVS (foto: H. Fronková, 20. 3. 2017)

### **Tabulky:**

Tabulka 3 Počet růstových vrcholů v jednotlivých fázích pokusu

Tabulka 4 Dceřiné rostliny

### **Grafy:**

Graf 1 Rychlost růstu rostlin na médiu QL (mm/týden)

Graf 2 Rychlost růstu rostlin na médiu QL A (mm/týden)

Graf 3 Koncentrace etylenu v kultivačních nádobách při rozdílných podmínkách kultivace

Graf 4 Koncentrace etanu v kultivačních nádobách při rozdílných podmínkách kultivace

Graf 5 Koncentrace oxidu uhličitého v kultivačních nádobách při rozdílných podmínkách kultivace

Graf 6 Počet rostlin v počáteční fázi multiplikace

Graf 7 Počet rostlin v počáteční fázi multiplikace – přiblížený detail

Graf 8 Počet rostlin R57 v počáteční fázi multiplikace

Graf 9 Stanovení množství zmrazitelné vody v růstovém vrcholu

Graf 10 Stanovení teploty tání v průběhu dehydratace

Graf 11 Hodnocení životnosti

Graf 12 Hodnocení regenerace