

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ

Zahradnická fakulta v Lednici



## **Metody eliminace virů u meruněk a broskvoní**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce

Ing. Martina Kudělková

Vypracovala

Hana Fronková

V Lednici 2015

### **Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem práci: **Metody eliminace virů u meruněk a broskvoní** 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 Ing. Martině Kudělkové, vedoucí mé bakalářské práce, za odborné vedení při zpracovávání tématu a za ochotu i čas poskytnutý během konzultací. Dále bych ráda poděkovala všem, zejména rodině, kteří mi pomáhali a poskytli mi cenné rady a informace.

## Obsah

1	Úvod .....	6
2	Cíl .....	7
3	Metody eliminace virů u meruněk a broskvoní .....	8
3.1	Význam a pěstování meruněk a broskvoní .....	8
3.1.1	Botanická charakteristika broskvoní .....	8
3.1.2	Původ a rozšíření broskvoní .....	11
3.1.3	Nároky na pěstování broskvoní .....	13
3.1.4	Význam pěstování broskvoní v České republice.....	14
3.1.5	Choroby a škůdci broskvoní .....	15
3.1.6	Botanická charakteristika meruněk .....	16
3.1.7	Původ a rozšíření meruněk .....	18
3.1.8	Nároky na pěstování meruněk .....	19
3.1.9	Význam pěstování meruněk v České republice.....	20
3.1.10	Choroby a škůdci .....	21
3.2	Popis a charakteristika virů .....	21
3.2.1	Obecná charakteristika virů .....	21
3.2.2	Rostlinné viry .....	22
3.2.3	Virus chlorotické skvrnitosti jabloně – <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV) .....	23
3.2.4	Virus nekrotické kroužkovitosti třešně – <i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV).....	24
3.2.5	Virus zakrslosti slivoně – <i>Prune dwarf virus</i> (PDV).....	25
3.2.6	Virus šarky švestky – <i>Plum pox virus</i> (PPV) .....	25
3.3	Metody eliminace virů .....	27
3.3.1	Vybavení a materiál potřebný k ozdravení.....	27
3.3.2	Izolace vrcholového meristému.....	31

3.3.3	Termoterapie.....	33
3.3.4	Chemoterapie.....	37
3.3.5	Kryoterapie .....	39
3.3.6	Zakořeňování a převedení rostlin do nesterilních podmínek .....	41
4	Diskuse .....	43
5	Závěr.....	45
6	Souhrn a resume, klíčová slova .....	47
7	Seznam použité literatury .....	48

# 1 ÚVOD

Broskvoně a meruňky patří již několik desítek let k tradičně pěstovaným ovocným druhům v České republice.

Broskvoně i meruňky se řadí do rodu *Prunus*, kam také patří u nás pěstovaná slivoň švestka (*Prunus domestica*), mandloň obecná (*Prunus dulcis*), višně obecná (*Prunus cerasus*), třešeň ptačí (*Prunus avium*) nebo trnka obecná (*Prunus spinosa*).

Komerční pěstování broskvoní a meruněk na území České republiky se postupem času stává čím dál méně častým. Naopak je hojně využíváno zahrádkáři. Vysoká konkurence, nedostatečné možnosti uplatnění se na českém i zahraničním trhu, nepravidelné výnosy v jednotlivých letech a přestárlost meruňkových a broskvoňových stromů v sadech, to jsou všechno důvody, proč velkopěstování obou plodin mizí z našich oblastí.

Neméně důležitým aspektem hrajícím roli v produkci meruněk a broskví u nás je rozšíření virových onemocnění v sadech. Jedná se především o virus šarky švestky, virus chlorotické skvrnitosti jabloně, virus nekrotické kroužkovitosti třešně a virus zakrslosti slivoně, které významně snižují výnosy u těchto dvou zmiňovaných plodin.

Tato virová onemocnění jsou z větší části přenášena lidskou činností, použitím infikovaného materiálu jako zdroj pro množení, využíváním napadených podnoží nebo neopatrnou manipulací s infikovanými nástroji. Aby již dále nedocházelo k napadení meruněk a broskvoní při vegetativním způsobu množení, byl v České republice zaveden systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu ovocných dřevin a révy vinné.

Pro potřeby ozdravení již infikovaného rostlinného materiálu byly vypracovány metodiky, které popisují postup ozdravení meruněk a broskvoní od virových onemocnění různými metodami. Jedná se především o proces chemoterapie, termoterapie, izolaci vrcholového meristému a kryoterapii.

## 2 CÍL

Cílem práce bylo shrnutí botanické charakteristiky meruněk a broskvoní a obecná charakteristika významu a pěstování meruněk a broskvoní na území České republiky. Ve druhé části práce bylo cílem popsat rostlinné viry napadající broskvoně a meruňky. V poslední části práce bylo cílem shrnout a popsat metody zaměřené na eliminaci virů u broskvoní a meruněk.

## 3 METODY ELIMINACE VIRŮ U MERUNĚK A BROSKVONÍ

### 3.1 Význam a pěstování meruněk a broskvoní

#### 3.1.1 Botanická charakteristika broskvoní

##### 3.1.1.1 *Botanické zařazení*

V roce 1753 byla broskvoň zařazena Carlem von Linné do rodu *Amygdalus* jako *Amygdalus persica*. Dnes je broskvoň pod názvem *Prunus persica* (L.) Batsch řazena do rodu *Prunus*. Broskvoně tedy řadíme do oddělení krytosemenných rostlin (*Magnoliophyta*), třídy dvouděložných vyšších rostlin (*Rosopsida*), řádu růžotvarých (*Rosales*), čeledi růžovitých (*Rosales*) a rodu slivoně (*Prunus*) (Blaha a kol., 1966).

Odrůdy pěstované v našich klimatických podmínkách patří k druhu *Persica vulgaris* Mill. (broskev obecná). *Prunus vulgaris* Mill. se dále dělí na *Prunus persica subsp. vulgaris*, *Prunus persica subsp. laevis* a *Prunus persica subsp. platycarpa* (Bažant, 2003).

Rozdělení na následující čtyři skupiny je uváděno z hlediska pomologického. Jedná se o pravé broskve, které mají plstnatou slupku a dužninu odlučitelnou od pecky, tvrdky se slupkou plstnatou a dužninou lpící na pecece, nektarinky s hladkou slupkou a dužninou odlučitelnou od pecky a bryňonky, které mají lysou slupku a dužninu neodlučitelnou od pecky (Bažant, 2003; Hladík, 1966).

Podle Rjabova můžeme dále rozdělit broskvoně na 4 skupiny. První skupina je ferganská, kam patří odrůdy pěstované ve ferganském údolí. Pecky broskví této skupiny jsou zploštělého tvaru a rýhy jsou rovnoběžné. Druhotná žilnatina na listech vychází z hlavní žilky. Dále se pod tupým úhlem zvedá k okraji listu. Druhou skupinou je skupina severočínská. Do této skupiny jsou zařazeny mrazuvzdorné odrůdy s dlouhým vegetačním klidem. Severočínská skupina se dále dělí na další tři podskupiny s obvyklými plody, s tuhou dužninou a s plody ranými. Dužnina plodů této skupiny je většinou bílá. Další skupinu, jihočínskou, tvoří odrůdy s krátkou vegetační dobou klidu. Tyto odrůdy brzy kvetou, což má za následek časté poškození mrazy. Větve těchto broskvoní jsou slabší, celkový vzrůst je střední a jejich plody jsou malé. Dužnina je bílá nebo nažloutlá, sladké chuti. Čtvrtou skupinou je skupina íránská. Sem patří většina evropských i amerických odrůd. Tato skupina se dále dělí na podskupinu s obvyklými



plody a podskupinu s tuhou dužninou, kam patří odrůdy s dužninou lpící na pece (Vávra, 1963; Bažant, 2003; Hladík, 1966; Nečas, 2004).

### **3.1.1.2 Botanická charakteristika**

Broskvoň je ovocný strom, který v přirozených podmínkách dorůstá výšky 5 – 6 m. Koruna dosahuje 4 – 5 m. Celkové rozměry stromu však závisí na odrůdě a na použité podnoži, dále pak na kvalitě půdy a způsobu jejího ošetřování, obsahu živin v půdě, závlaze a dalších podmínkách (Litschmann, Oukropec, 2007; Hladík, 1966). Jedná se o diploidní ( $2n = 16$ ) ovocný druh (Nečas, 2004). Obvyklá délka života je 15 – 20 let, může však dosahovat i věku 25 let (Vávra, 1963).

Kořenový systém je tvořen křovitým kořenem, bočními kořeny a kořenovým vlášením. Růst kořenů probíhá na jaře, když se teplota půdy pohybuje v rozmezí 7 – 8°C, a na podzim, jakmile teplota půdy sestoupí na 4 – 2°C. Křovitý kořen sahá do hloubky až 2 m. Postranní kořeny se rozprostírají v hloubce 30 – 70 cm a mají oranžové zbarvení. Starší strom má kořeny tmavší, červenavé. Větvení a růst kořene závisí na podnoži, obecně však platí, že plocha kořenové soustavy je 2 – 3krát větší, nežli je plocha koruny (Bažant, 2003; Hladík, 1966).

Kořenový krček je místem přechodu mezi nadzemní a podzemní částí rostliny. Radiální cévní svazky tu z kořenů přecházejí v kolaterální cévní svazky kmene. Typický kořenový krček nemají vegetativně množené podnože. Adventivní kořeny jsou u nich tvořeny z kolaterálních svazků cévních (Bažant a kol, 2003).

Broskvoň nacházející se ve volné přírodě netvoří kmen, rostou tedy jako keř. Kmen rozeznáváme u broskvoní ošetřených řezem. Jeho barva je popelavě hnědá, borka je nepravidelně rozpraskaná. Tloušťka kmene může být až 20 cm. Kmen se větví na větve prvního řádu, tzv. kosterní větve, a větve druhého a třetího řádu, tzv. polokosterní větve. Na větvích druhého a třetího řádu se zakládají jednoleté výhony. Nové výhony bývají zcela hladké, světle zelené až oranžově nahnědlé. Tyto výhony mohou být růstové, předčasné, kyticové, vlky, pravé plodné a nepravé plodné. Růstové výhony jsou důležité při zapěstování mladých stromů, jsou dlouhé a silné. Objevují se jen v prvních letech a jsou neplodné. Předčasné výhony vyrůstají na výhonech růstových, objevují se na nich květní pupeny, které však v našich klimatických podmínkách nejsou schopné úplné diferenciace. Kyticové výhony jsou krátké, do 10 cm. Zakládají se na nich květní pupeny, proto jsou pro některé odrůdy důležité. Životnost těchto výhonů je 2 – 3 roky.

Vlky jsou výhony, které jsou silné a dlouhé, vytváří předčasný obrost. Tyto výhony vyrůstají z kosterních větví při silném řezu stromu nebo v neúrodném roce. Obvykle nesou jen vegetativní pupeny. Aby se zabránilo konkurenci v oblasti výživy, tyto výhony je nutné odstranit. Při poškození větve je možné její nahrazení právě tímto výhonem. Právě plodné výhony jsou pro plodnost stromu nejdůležitější. Bývají 40 – 80 cm dlouhé a nevětvené. Nepravé plodné výhony mají pouze vrchní listový pupen, další pupeny jsou květní. Při řezu bývají tyto výhony odstraňovány (Bažant, 2003; Litschmann, Oukropec, 2007; Hladík, 1966; Vávra, 1963).

Listy jsou protáhle kopinaté se zubatými až pilovitými okraji. Velikost listů se odvíjí od odrůdy a pozice v koruně stromu (Hladík, 1966). Průměrně však bývají listy dlouhé 8 – 14 cm a široké 2 – 3,5 cm, délka řapíku se pohybuje od 1 do 1,5 cm. Pro listovou čepel je charakteristické její zvlnění (Litschmann, Oukropec, 2007; Nečas, 2004).

Květní a listové pupeny se tvoří na jednoletých výhonech. Květní pupeny jsou zaoblené. Listové pupeny mají tvar špičatý (Bažant, 2003; Hladík, 1966).

Květy broskvoní jsou oboupohlavní. Jsou složeny z 5 lístků kališních a 5 volných korunních plátků. Květ obsahuje jeden pestík, zřídka 2 – 3, a nažloutlé tyčinky (Nečas, 2004). Většina pěstovaných odrůd broskvoní je samosprašná (Bažant, 2003). Velikost květů je v průměru 2,5 cm. Vyrůstají jednotlivě na krátkých stopkách a kvetou v průměru 4 – 5 dní. Barva květu se v průběhu vegetace mění. Před opylením jsou květy vždy světlejší, po opylení se květy vybarvují dočervena (Blaha a kol, 1966). Květy dělíme u broskvoní podle tvaru na růžokvěté a zvonkokvěté (Nečas, 2004). Růžokvěté květy jsou rozložené a široké. Korunní plátky jsou kulaté, široce vejčité, někdy mírně zvlněné. Barva je spíše světlejší, světlorůžová nebo bílá. Zvonkovité květy bývají menší. Úzké, podlouhlé korunní plátky jsou vždy růžové. Kališní lístky jsou chlupaté, široce klínovité. Zbarvení vnitřní strany kališních lístků je totožné se zbarvením dužniny. Na povrchu semeníku jsou bílé chloupky (Bažant, 2003; Blaha a kol, 1966; Hladík, 1966).

Plodem je peckovice. Velikost plodu se liší v závislosti na odrůdě a agrotechnických zásadách (Bažant, 2003). Plody ranějších odrůd broskvoní bývají v porovnání s plody pozdních odrůd drobnější. Jejich průměrná hmotnost se pohybuje okolo 50 – 80 g. Průměrná hmotnost plodů odrůd pozdních je pak 150 – 200 g

(Oberbeil, Lentzová, 2001). Dužnina tvoří asi 90% váhy plodu. Obsah sušiny se pohybuje od 9 do 22% v závislosti na odrůdě. Cukry jsou v dužnině zastoupeny 5,7 – 14,9%, z toho nejvíce zastoupená je sacharóza. Kyseliny se v plodech nachází od 0,2 do 0,8%, především kyselina chininová, citronová a jablečná. Soli jsou zastoupeny v dužnině z 0,3 – 0,8% a pektiny 0,5 – 0,9% (Bažant, 2003). Z látek důležitých pro člověka obsahuje plod broskvoně především soli draslíku, vápníku, sodíku, hořčíku a jiných prvků. Dále jsou to provitamin A, vitamin C, A1, B1, B2, B9 a E (Oberbeil, Lentzová, 2001).

### **3.1.2 Původ a rozšíření broskvoní**

Za pravlast broskvoní se považuje Čína. Divoké formy broskvoní se dodnes vyskytují v provinciích Šensu a Kansu v okolí Pekingu. Zmínky o pěstování broskvoně pochází z 10. stol. př. Kr. z děl starých čínských spisovatelů. O broskvoní se též zmiňuje Konfucius v 5. stol. př. Kr. Druhotným centrem pěstování broskvoní se stala Persie, kterou Římané mylně považovali za pravlast broskvoní (*Malum percisum*). Začátkem našeho letopočtu byly broskvoně rozšířeny do Itálie a následně do Řecka. V knize Historie přírody z 1. století n. l. popisuje Plinius konzumaci broskví Římány pro uklidnění nervů a zvýšení chuti k jídlu. Do Evropy pak byly broskvoně rozšířeny během 5. století a následně skoro zapomenuty. Do Ameriky byly broskvoně rozšířeny v 16. – 17. století Španěly a Portugalci (Hričovský a kol., 2004; Bažant, 2003; Blaha a kol., 1966; Vávra, 1963).

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

Důkazy o pěstování broskvoní na našem území se objevily při archeologických průzkumech slovanských hradišť. V době renesance bylo u nás pěstování broskvoní obnoveno. Od roku 1848 jsou poznatky o pěstování broskvoní zaznamenávány v literatuře (Bažant, 2003; Hladík, 1966).

Další pěstování bylo omezeno na ojedinělé stromy v zahradách a vinohradech na jižní Moravě. První ucelená výsadba byla založena roku 1951 v Žabčicích na školním statku Vysoké školy zemědělské v Brně zásluhou Ing. Františka Hladíka. Po roce 1922 zažilo pěstování broskvoní krizi. Důvodem byl rozpad velkoobchodní sítě hlavních partnerů, družstev a státních podniků. Dalším problémem byl tlak odběratelů na snižování cen pod úroveň nákladů na pěstování, problémy s podnožemi a závlahou nebo

zastaralý sortiment nabízených odrůd. Zvyšuje se dovoz broskví z Itálie, Řecka a Španělska (Ondrášek, Krška, 2014; Litschmann, Oukropec, 2007; Bažant, 2003).

V dnešní době byly v sadech zavedeny některé inovace, které dopomohou pěstiteli ke zvýšení zisku. Jedná se především o zahuštění sponu, zavedení závlahy, změnu sortimentu ('Sunhaven', 'Redhaven', 'Fairhaven' a 'Cresthaven') nebo zatravnění meziřadí. Zájem o pěstování broskvoní v zahradách stoupá, zatímco pěstování v sadech zaznamenalo pokles (Litschmann, Oukropec, 2007).

Od roku 1995 do roku 2014 bylo v České republice vyklučeno 1475,8 ha broskvoňových sadů. Nahrazena novými byla pouze třetina původní plochy, 449,5 ha. Dnešní produkční plocha broskvoňových sadů byla vyměřena na 564,1 ha. V roce 2013 bylo v sadech 1103886 broskvoňových stromů, což je oproti roku 2012 o 112236 stromů méně (Buchtová, 2014).

Celková sklizeň broskví pro rok 2013 činila 9502 t. To je o necelé 3000 t více než v roce předešlém. Ceny broskví za tunu mají kolísavý charakter. Od roku 2009 jsme mohli sledovat zvyšování cen, ovšem dva poslední roky ukázaly tendenci opačnou. Průměrné spotřebitelské ceny broskví se v roce 2014 pohybovaly okolo 77,15 Kč/Kg. V roce 2013 stál kilogram broskví o 10,55 Kč více (Buchtová, 2014).

V České republice nadále dochází ke snižování exportu. V roce 2010 činil vývoz broskví 3715 t. V roce 2014 bylo vyvezeno pouhých 2530 t broskví. Pozvolný pokles zaznamenává též import. Nejvíce tun broskví bylo do České republiky přivezeno roku 2011 (Buchtová, 2014).

Výše popsané charakteristiky rozšiřuje tabulka 1.

Tabulka 1 – ekonomické aspekty u broskvoní

Rok	2014*	2013	2012	2011	2010	2009	2008
Celková sklizeň v ČR (t)	Údaje neznámé	9502	6506	8348	8080	12705	11924
Počet stromů v ČR (ks)	Údaje neznámé	1103886	1216122	1371108	1411535	1455755	1585224
Cena Kč/t	13505	13339	15179	13004	12855	9891	12010
Dovoz (t) nektarinky + broskve	25097	27148	31334	35674	34417	32985	26349
Vývoz (t) nektarinky + broskve	2530	2902	3123	3764	3715	3498	2073

Poznámka: \* údaje za období 1. 1. – 31. 8. 2014

### 3.1.3 Nároky na pěstování broskvoní

Broskvoně patří mezi ovocné druhy bujně rostoucí a zároveň velmi brzy plodící. Brzká plodnost způsobuje krátkověkost dřeviny. Průměrný věk broskvoně je odhadován na 15 let (Vávra, 1963).

Naše klimatické podmínky odpovídají nejsevernější hranici pěstování broskvoní. Průměrná vegetační teplota spadá do intervalu od 16 do 17°C. Roční suma teplot se pohybuje od 2600 do 2900°C. Rostlina je odolná ke krátkodobým teplotám -25°C. Nebezpečné jsou pro rostlinu skokové poklesy teplot v předjaří, kdy jsou nejvíce citlivé na poškození mrazem květní pupeny. Malé plody jsou poškozeny při -6°C (Hričovsk a kol., 2004; Bažant, 2003).

Broskvoním se nejlépe daří v nadmořské výšce 200 – 250 m. Vyžadují teplé půdy z důvodu mělkého kořenění. Nejčastěji rostou na písčnato-hlinitých až hlinitých půdách s obsahem humusu alespoň 1,5%. Na půdách s obsahem jílovitých částic více jak 40% dochází k odumírání kořenového systému z důvodu nedostatku kyslíku. Půdní

reakci vyžadují broskvoně neutrální až mírně alkalickou. Pokud se v půdě vyskytuje  $CaCO_3$  nad 5%, zvyšuje se nebezpečí výskytu chlorózy listů. Nároky na závlaku jsou vysoké. Nejvíce vody potřebuje rostlina v době po odkvětu do propadu plodů a tři týdny před sklizní, kdy dochází k nabývání plodů na hmotnosti (Hričovský a kol., 2004; Bažant, 2003).

Broskvoně jsou náročné na světlo, vyžadují proto pozemky s mírným sklonem a východní, jižní a západní expozicí. Na severních svazích se fenofáze opožďují. Množství světla dopadajícího na koruny broskvoní je možno ovlivnit sponem výsadby. Pro duté koruny je doporučován spon 5 až 6 × 3 až 4 m. Pro tvary větvenité je doporučován spon 4 až 5 × 3m (Hričovský a kol., 2004; Bažant, 2003).

#### **3.1.4 Význam pěstování broskvoní v České republice**

Pěstování broskvoní má v České republice dlouholetou tradici. Celkem s meruňkami a slivoněmi tvoří 22% plochy ovocných sadů (Polák a kol., 2010). V současné době však zaznamenáváme pokles pěstování broskvoní v sadech. Příčinami mohou být nízké výkupní ceny, podpora importu, stárnoucí výsadba či rozšiřující se virus šarky švestky. Největší odbyt nachází místní pěstitelé na lokálních trzích (Ondrášek, Krška, 2014).

Pěstování broskvoní je důležitým ekonomickým aspektem. Celkem 11,92% exportu veškerého ovoce v roce 2014 tvořily broskve (Buchtová, 2014). Po jabloních jsou broskvoně v Evropě druhým nejpěstovanějším ovocným druhem. V Evropě je nejúspěšnějším pěstitelem broskvoní Itálie, následuje Španělsko, Řecko a Francie (Litschmann, Oukropec, 2007; Bažant, 2003).

Broskvoně jsou pěstovány i pro léčivé účinky broskví. Broskve zlepšují imunitní systém a chrání před volnými radikály. Příznivý vliv mají na krevní oběh, cévy a srdce. Jsou známy pro svůj uklidňující vliv. Vitamin B3 ve spojení s hořčíkem, zinkem a selenem potlačuje vnitřní neklid a nervozitu. Dále působí jako laxativum a diuretikum. (Oberbeil, Lentzová, 2001).

### **3.1.5 Choroby a škůdci broskvoní**

Mezi fyziologické poruchy broskvoní řadíme chlorózu listů. Jedná se o stav, kdy se listy zbarvují dožluta v důsledku nadbytku vápna (Hričovský a kol., 2004). Působení nízkých teplot může mít za následek vznik mrazových desek na kmenu, úhyn pletiv až odumření celého stromu. Na těžkých a studených půdách může dojít ke kořenové asfyxii (Bažant, 2003).

Mezi houbová a bakteriální onemocnění patří kadeřavost broskvoní způsobená houbou *Taphrina deformans*, padlí broskvoňové způsobené *Sphaerotheca pannosa* var. *persicae*, strupovitost peckovin způsobená *Clasteosporium carpophilum* a *Venturia cerasi* a bakteriální nádorovitost způsobená *Agrobacterium tumefaciens* (Hričovský a kol., 2004). Dále pak klejotoková rakovina způsobená bakterií *Pseudomonas syringae* a houbou *Leucostoma cincta*, odumírání pupenů, skvrnitost plodů a suchá skvrnitost listů broskvoně způsobená *Stigmina carpophila* (Bažant, 2003). Jako další houbová onemocnění se uvádí padlí růžové způsobené *Sphaerotheca pannos* a čerň broskvová způsobená *Megacladosporium carpophilum* (Blaha a kol., 1966).

Ze škůdců na broskvoni škodí mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) a mšice švestková (*Hyalopterus pruni*), obaleč východní (*Cydia molesta*) a makadlovka broskvoňová (*Anarsia lineatella*) (Hričovský a kol., 2004). Další mšicí napadající broskvoně je mšice hnízdotvorná (*Brachycaudua Schwartzi*). Zobonoska obecná (*Rhynchites bakchus*) je brouk ožirající parenchym mladých listů (Bažant, 2003). Sáním škodí na plodech třásněnky (*Thrips major*, *Taeniothrips meridionalis*). V posledních letech jsou problémem puklice švestková (*Sphaerolecanium prunastri*) a štítenka zhoubná (*Quadraspidiotus perniciosus*) (Litschmann, Oukropec, 2007).

Z roztočů škodí zejména sviluška ovocná (*Panonychus ulmi*) a roztoči rodu *Aculus* (Bažant, 2003).

### **3.1.6 Botanická charakteristika meruněk**

#### **3.1.6.1 Botanické zařazení**

Dnešní pojmenování meruňky *Prunus armeniaca* pochází od Carla von Linné, který převzal toto pojmenování ze starého latinského názvu *Melon armeniaca* (Vávra, 1963).

*Prunus armeniaca*, česky meruňka obecná, patří do rostlinné říše (*Plantae*), oddělení krytosemenných rostlin (*Magnoliophyta*), třídy vyšších dvouděložných rostlin (*Rosopsida*), řádu růžotvarých (*Rosales*) a čeledi růžovitých (*Rosaceae*), podčeledi *Prunoideae* a rodu slivoně (*Prunus*) (Hladík, 1966).

Ušlechtilé odrůdy meruněk, které jsou pěstovány u nás, vznikly z botanického druhu *Armeniaca vulgaris* Lam. (= *Prunus armeniaca* L., *Prunus armeniaca* var. *typica* Maxim).

Podle A. N. Venjaminova jsou dále meruňky děleny na tři skupiny. Na skupinu asijskou, jejíž typy meruněk jsou pěstovány ve střední Asii, Indii a Číně, dále skupinu iránsko-kavkazskou a skupinu evropskou. Typy meruněk patřící do skupiny evropské jsou přizpůsobeny klimatickým podmínkám Evropy (Vávra, 1963).

Dalšími kulturními odrůdami meruněk jsou meruňka mandžuská (*A. manshurica* Kohe), meruňka sibiřská (*A. sibirica* T.), meruňka korejská (*A. ansu* Kom.) a japonská (*A. mime* Sieb.) (Hladík, 1966).

#### **3.1.6.2 Botanická charakteristika**

Meruňka je ovocný strom dorůstající výšky 3 – 7 m. (Vávra, 1963) Jedná se o diploidní ( $2n = 16$ ) druh. Většina odrůd pěstovaných v České republice je samosprašná (Hričovský a kol., 2004).

Kořenová soustava je velmi dobře vyvinutá a je tvořena z mohutných kořenů, které zasahují do značné hloubky. Barva těchto kořenů je višňově růžová. Meruňka velmi dobře odolává suchu právě díky velké hloubce kořenění. Bohaté kořenové vlášení vytváří meruňka v půdách hlinitých (Vávra, 1963). Nejvíce kořenové hmoty zasahuje do hloubky 15 – 80 cm (Hladík, 1966).

Výška kmene závisí na použitém pěstitelském tvaru. Rozlišujeme zákrskový tvar s výškou kmene do 60 cm, tvar čtvrtkmenný o výšce kmene 80 – 100 cm, polokmenný



tvár s výškou kmene 125 – 150 cm a vysokokmen nad 180 cm (Hladík, 1966). Koruna stromu je v prvních letech vzpřímená. Po několika sklizních mění svůj tvar v korunu široce vejčitou. Letorosty meruňky jsou hladké s 1 až 2 očky při základu letorostu. Další očka jsou umístěna ve skupinách. Barva letorostů je narůžovělá. Meruňka má charakteristické lenticely. Jsou umístěny na popelavých větvích, ze kterých se odlupuje borka (Vávra, 1963). Lenticely jsou okrouhlé, široce protáhlé nebo protáhlé (Hladík, 1966).

Velikost i tvar listu závisí na použité odrůdě, avšak obecně lze říci, že listy mají tvar vejčitý. Okraje jsou zoubkované, vrcholek listu je krátce zašpičatělý. Řapík je narůžovělý, 5 – 8 cm dlouhý. Barva řapíku je hnědočerná a na spodní straně zelená. Čepel listu je hladká a tmavě zelená (Vávra, 1963, Hladík, 1966).

Květ se začíná diferencovat od konce července do srpna, na konci roku je jeho pupen větší než pupen listový (Hladík, 1966). Velikost květu se pohybuje okolo 2,5 cm. Jsou umístěny po jednom v květním pupenu. Barva květu je růžová až bělavá (Vávra, 1963). Některé odrůdy nakvétají bíle a při plném květu jsou růžové. Délka pestíku je 15 – 24 mm. Semeník je zelený a ochmýřený, čnělka je bílá a lysá. Počet tyčinek je 26 – 32 (Hladík, 1966). Kvetení probíhá začátkem dubna (Vávra, 1963).

Plodem je peckovice a vyznačuje se tvarovou různorodostí, od plodů kulovitých přes vejčité až kulovitě smáčklé. Na povrchu plodu jsou malé chloupky. Barva peckovice je žlutě oranžová, někdy zelenavě žlutá nebo bělavá s narůžovělými nebo načervenalými líčky. Dužnina je oranžová až nažloutlá. Pecky lze snadno oddělit od dužniny (Vávra, 1963). Dužnina plodu je složena z vody (81%), kyseliny jablečné (1%), cukru (3,9%) a extraktivních látek (11,8%). Dále obsahuje provitamin A a vitamin B<sub>2</sub>, draslík, fosfor, síru, vápník, hořčík, sodík, železo a chlor. Na snižování cholesterolu má vliv vysoký podíl pektinových látek (0,3 – 0,8%). Semeno meruňky obsahuje 39 – 41% oleje (Hričovský a kol., 2004). Pecky meruňek jsou jedovaté, protože obsahují glykosid amygdalin (Oberbeil, Lentzová, 2001).

### **3.1.7 Původ a rozšíření meruněk**

Stejně jako u broskvoní se za pravlast meruněk považuje Čína (Hladík, 1966; Blaha a kol., 1966). Zde roste jako planá forma ve velkém množství (Blaha a kol., 1966). Jako kulturní dřevina byla meruňka pěstována již v roce 2000 př. n. l. Přes střední Asii a Írán byly meruňky rozšířeny do Řecka, kde byly označovány jako arménská jablka. Ve střední Evropě byly meruňky pěstovány až ve 14. století (Hladík, 1966).

#### ***3.1.7.1 Pěstování meruněk na území České republiky***

Pěstování meruněk na našem území je známo od 17. století, kdy bylo výsadou vyšších panských vrstev (Blaha a kol., 1966). Ze zámeckých a klášterních zahrad byly meruňky rozšířeny k drobným pěstitelům. Na počátku 19. století byly meruňky společně s broskvoněmi pěstovány nejen na volných prostranstvích, ale i ve sklenících na Moravě. Roku 1818 byla v Brně Lužánkách zřízena mateční školka pro výrobu roubov 11 meruňkových a 16 broskvoňových odrůd. K šíření ušlechtilých odrůd meruněk docházelo pomocí výstav. Zájem o pěstování meruněk se začal zvyšovat. Od 70. let nastal trend vysazování rychle rostoucích a brzy plodících ovocných dřevin. Na Velkopavlovicku měla velký význam Státní ovocná školka založená roku 1923, o jejíž založení se přičinil Alois Horňanský (Vávra, 1963).

Během několika posledních let zaznamenalo pěstování meruněk v České republice pokles, avšak celková situace je lepší než u broskvoní. Výhodou pro pěstitelé meruněk je slábnoucí konkurence ze zahraničí a lepší uplatnění v síti supermarketů (Polák, 2010).

V letech 1955 – 2014 bylo u nás vyklučeno 1276,3 ha meruňkových sadů. Za stejný časový interval se vysadilo pouze 691 ha meruňkových sadů, z toho v roce 2014 jen 7,8 ha. Celková plocha produkčních meruňkových sadů byla k roku 2014 stanovena na 1061,19 ha, což je o polovinu více než sadů broskvoňových. V roce 2013 bylo v sadech 1326278 meruňkových stromů (Buchtová, 2014).

Pěstování meruněk v našich klimatických podmínkách s sebou nese rizika, která se značně projevují na celkové sklizni. Sklizeň v jednotlivých letech se od sebe velmi výrazně liší, nedá se tedy určit, zda mají sestupnou či vzestupnou tendenci. Od celkové sklizně se pak odvíjí cena za tunu meruněk. V roce 2012 bylo sklizeno pouhých 5089 t

meruněk. Cena za t se pohybovala okolo 24120 Kč. Zatímco v roce 2013 bylo sklizeno 12506 t meruněk a cena za t se pohybovala okolo 22835 Kč. V roce 2014 byla cena za t meruněk stanovena na 21924 Kč (Buchtová, 2014).

Do roku 2012 měl dovoz meruněk do České republiky vzestupnou tendenci. Celkem bylo v roce 2012 dovezeno 6761 t meruněk. Celkový dovoz byl tedy větší, než celková sklizeň meruněk u nás. Rok 2013 a 2014 znamenal pro Českou republiku podporu exportu vlastních meruněk. Z 289 t z roku 2012 stoupl export na 344 t meruněk za rok 2014 (Buchtová, 2014).

Výše popsané charakteristiky rozšiřuje tabulka č. 2.

Tabulka 2 – ekonomické aspekty u meruněk

Rok	2014*	2013	2012	2011	2010	2009	2008
Celková sklizeň v ČR (t)	Údaje neznámé	12506	5089	8116	6352	13989	9002
Počet stromů v ČR (ks)	Údaje neznámé	1326278	1360652	1355077	1431102	1427622	1538407
Cena Kč/t	21924	22835	24120	20143	19884	14584	19182
Dovoz (t)	5967	5472	6761	4348	4718	5340	3823
Vývoz (t)	344	316	289	182	271	307	276

Poznámka: \* údaje za období 1. 1. – 31. 8. 2014

### 3.1.8 Nároky na pěstování meruněk

Meruňky se vyznačují krátkou dormancí. V dormanci snesou květní poupata meruněk i dlouhodobé mrazy -20°C (Hričovský a kol., 2004). K nízkým teplotám jsou odolnější než broskvoně (Blaha a kol., 1966). Konec doby odpočinku nastává koncem prosince a začátkem ledna. Velikost úrody ovlivňují teplotní výkyvy na jaře a v období květu, proto je důležité zvolit oblasti, kde nedochází k častým jarním poklesům teploty (Hričovský a kol., 2004).

Nejvhodnější polohy pro pěstování meruněk jsou v nadmořských výškách 200 až 250 m n. m. Preferují mírné svahy vystavené teplým větrům (Hričovský a kol., 2004). Otevřené polohy nepříznivě působí na šíření houbových chorob, proto jsou meruňky vysazované na otevřených polohách relativně chráněné. Meruňky patří mezi krátkodenní rostliny (Blaha a kol., 1966).

Meruňky patří mezi rostliny náročné na půdu. Nejlépe snáší půdy s obsahem jílovitých částic do 40%. Vyhovují jim středně těžké půdy. Jsou náročné na vysoký obsah vzduchu v půdě. Při jeho nedostatku trpí asfyxií. Na lehkých půdách je nutné meruňky zalévat. Ideální půdní reakce půdy je do hodnot pH 7 – 7,5 (Hričovský a kol., 2004). Meruňky patří k ovocným druhům velmi odolným k suchu. Nejvíce vody vyžadují v červenci a srpnu při vytváření pupenů pro rok příští (Blaha a kol., 1966).

Při hnojení musíme dbát dostatečného přísunu draslíku, fosforu a vápníku. Dusík přihnojujeme jen v menších dávkách (Hričovský a kol., 2004).

### **3.1.9 Význam pěstování meruněk v České republice**

Pěstování meruněk má na území České republiky, stejně jako pěstování broskvoní, dlouholetou tradici. Celkem s broskvoněmi a slivoněmi tvoří 22% plochy ovocných sadů (Polák a kol., 2010).

Pěstování meruněk je důležitým ekonomickým aspektem. V roce 2014 bylo z České republiky vyvezeno 344 t meruněk (Buchtová, 2014).

Meruňky jsou pro člověka důležité také z hlediska výživy. Kromě karotenů obsahují také vitamin A. Působí proti napětí (kyselina nikotinová), podporují krev tvorbu a růst buněk (kyselina listová) a odbourávají tuky (kyselina pantotenová). Dále podporují imunitní systém, jelikož obsahují velké množství vitamínu C (Oberbeil, Lentzová, 2001).

Oberbeil a Lentzová (2001) také doporučují nákup ovoce v sezóně, jelikož ovoce, které je dostání v zimě, má za sebou dlouhé skladování nebo je pěstováno ve sklenících a obsah vitamínů již není ideální.

### **3.1.10 Choroby a škůdci**

Mezi houbová a bakteriální onemocnění meruněk patří moniliová spála (úžeh) způsobená parazitní houbou *Monilia laxa*, hnědnutí listů meruněk způsobené *Gnomonia erythrostoma*, dírkovitost listů způsobená houbou *Stigmina carpophila* (syn. *Clasteosporium carpophlum*), předčasné odumírání meruněk (klejotoková rakovina) způsobené houbou *Leucostoma* a bakterií *Pseudomonas syringae* a verticiliové vadnutí způsobené půdní houbou *Verticillium spp.* (Hričovský a kol., 2004). Velmi zřídka se na meruňkových listech vyskytuje rez švestková způsobená *Tranzchelia pruni spinosae*. Stejně jako na broskvoních, tak i na meruňkách, se vyskytuje čerň broskvoňová způsobená *Megacladosporium carpophilum* (Blaha a kol., 1966).

Ze škůdců se na meruňkách vyskytují píďalka podzimní (*Operophtera brumata*), mšice slivová (*Hyalopterus pruni*) a obaleč meruňkový (*Ernarmonia formosana*). (Hričovský, Benediková, Krška, 2004) V nejteplejších oblastech republiky se vyskytuje zlatohlávek huňatý (*Epicotemis hirta*), zobonoska třešňová (*Rhynchites auratus*) a bělásek ovocný (*Aporia crataegi*). Původcem červivosti meruněk je obaleč jablečný (*Ernarmonia pomonella*) (Blaha a kol., 1966).

## **3.2 Popis a charakteristika virů**

### **3.2.1 Obecná charakteristika virů**

Virus byl definován jako infekční agens s jedním druhem nukleové kyseliny. Rosypal (2000) definuje virus jako: „Virus je nukleoproteinová částice vyznačující se schopností infikovat hostitelskou buňku a v ní se reprodukovat v závislosti na jejím translačním systému.“

Jedná se o organismy submikroskopických rozměrů (Schneidler, 2014). Velikost viru se uvádí v řádech nanometrů (Šafránková a kol., 2013). Obecně jsou viry velké 25 až 400 nm (Rosypal, 2000). Pro své malé rozměry mohou být viry pozorovány pouze elektronovým mikroskopem, nikoliv světelným (Šafránková a kol., 2013).

Virus se skládá z nukleové kyseliny, RNA nebo DNA, a proteinů tvořících obal viru, kapsid. U živočišných virů se můžeme setkat s dalším obalem tvořeným lipoproteiny. Každá částice, která je schopna infikovat buňku, se nazývá virion (Rosypal, 2000).

Rozmnožování viru je vázáno na hostitele (Schneider, 2014). Virus je schopen infikovat pouze ty buňky, které mají na svém povrchu receptor příslušný k určitému typu viru. Podle typu hostitele rozlišujeme bakteriální viry (bakteriofágy) a eukaryální viry, kam řadíme mykofágy (viry hub), viry živočišné a viry rostlinné (Rosypal, 2000). Projevem přítomnosti viru v rostlinné buňce je tzv. viróza (Šafránková a kol., 2013).

### **3.2.2 Rostlinné viry**

K prvním objeveným rostlinným virům patřil virus mozaiky tabáku. Byl objeven roku 1892 ruským vědcem D. J. Ivanovskim (Smolák, 1954). Asi polovina všech dosud popsáných virů je tvořena viry rostlinnými. Rostlinné viry, fytoviry, jsou vnitrobuněční obligátní parazité. Obvykle nejsou schopny infikovat rostlinu přes celulózovou buněčnou stěnu. Tělo rostlinného viru je tvořeno z 5 – 40% nukleovou kyselinou DNA nebo RNA a z 60 – 95% z proteinu. Samotný protein není infekční (Agrios, 2005).

#### **3.2.2.1 Všeobecné příznaky virových onemocnění**

Virová onemocnění rostlin jsou za přirozených podmínek zpravidla nevyléčitelná. Infikovaná rostlina většinou odumírá pomalu, i několik let. Některá virová onemocnění vyvolávají dva i více druhů virů současně. Nejčastěji se viry v rostlinách nacházejí v nadzemní části a šíří se z buňky do buňky (Smolák, 1954).

Virové onemocnění se obecně projevuje zakrnělým vzrůstem, skvrnitostí, barevnými změnami, chlorózami či deformitacemi (kadeřavost, svinování okrajů čepelí).

#### **3.2.2.2 Přenos virových onemocnění**

Nejčastěji dochází k infikování rostliny rostlinnou šťávou při manipulaci s rostlinou. Dalším možným přenašečem je hmyz. Dále se některé viry mohou šířit pylem či semenem (Šafránková a kol., 2013; Smolák, 1954). Mezi další způsob přenosu virů je možno zařadit přenos půdou (Smolák, 1954).

V České republice byly vytvořeny metodické postupy ozdravení meruněk a broskvoní pro následující hospodářsky významné druhy: virus chlorotické skvrnitosti jabloně – *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), virus nekrotické kroužkovitosti třešně – *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), virus zakrslosti slivoně – *Prune dwarf virus* (PDV) a virus šarky švestky – *Plum pox virus* (PPV).

Mezi další, avšak méně významné viry, které mohou infikovat broskvoně, patří *Peach rosette mosaic virus*, *Strawberry latent ringspot virus* a *Tomato black ringspot virus* (TmBRV) (Layne, Bassi, 2008). Dalšími viry jsou *Peach enation virus* (PhEnV), *Peach line pattern and leaf curl virus* (PhLnPtLCIV) (Šutič a kol., 1999). Mezi viry infikující meruňky patří *Apricot latent ringspot virus*, *Apricot pseudo-chlorotic leafspot virus* (King, 2012). K virovým onemocněním je řazena také evropská žloutenka peckovin (*European stone fruit yellows*) (Hričovský a kol., 2004).

### **3.2.3 Virus chlorotické skvrnitosti jabloně – *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV)**

Virus chlorotické skvrnitosti jabloně je řazen do rodu *Trichovirus*. Velikost částice viru je 720 x 12 nm. Tepelná inaktivace viru probíhá při teplotě 55°C. Životnost viru bez hostitele v podmínkách *in vitro* při teplotě 24°C je 7 hodin. Schopnost infikovat rostlinný materiál ztrácí virus při pH nižším než 5,5 a vyšším než 9,9 (Verma, Sharma, 1999). Virus je tvořen jednořetězcovou RNA (Diekmann, Putter, 1996).

Přírozně napadá virus zástupce čeledi *Rosaceae* (Diekmann, Putter, 1996). Mezi napadané rostliny patří jabloně, hrušně, kdouloně, slivoně, meruňky i broskvoně, třešně, višně, jeřáby (Klušák, 2013). Dále pak mandloně a další dřeviny čeledi *Rosaceae* (Loebestein, Katis, 2015).

Symptomy se projevují na listech, plodech a kmeni stromu (Diekmann, Putter, 1996). Na ovocných dřevinách se projevuje chlorotickými až průhlednými skvrnami na listech a asymetrickou deformací listů. Listy jsou menší a dochází k předčasnému opadu. Terminální pupeny odumírají. U většiny odrůd jabloní je virus v latentní podobě. Poškození listů se projevuje především u hrušní, broskvoní, meruňek a kdouloní (Verma, Sharma, 1999). Na plodech třešně způsobuje společně s *Prunus necrotic ringspot virus* nekrotické propadlé kroužky. U některých odrůd broskvoní způsobuje tmavě zelené propadlé skvrny nebo světlé kroužky podobné viru šarky švestky (Diekmann, Putter, 1996).

Virus je nejvíce rozšiřován lidskou činností. Používání infikovaného materiálu jako zdroj pro množení a využívání napadených podnoží je hlavní příčinou rozšíření tohoto viru po světě (Verma, Sharma, 1999). Nejsou známy žádné přirozené přenašeči viru. Je známo, že virus se nešíří semeny ani pylem (Loebestein, Katis, 2015).

### **3.2.4 Virus nekrotické kroužkovitosti třešně – *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)**

Původní pojmenování tohoto viru pocházející z roku 1941 bylo *Peach ringspot virus*. Na základě Fultonova popisu viru z roku 1970 je dnes používán název *Prunus necrotic ringspot virus* (Ogawa, English, 1991).

Virus nekrotické kroužkovitosti třešně spadá do rodu *Iarvirus*. Virová částice je velká 23 nm a je složena z jednořetězcové RNA (Diekmann, Putter , 1996).

Mezi hostitelské rostliny spadají zástupci z rodu *Prunus* (Ogawa, English, 1991). Jmenovitě *Prunus domestica*, *Prunus persica*, *Prunus cerasus*, *Prunus avium*, *Prunus cerasifera*, *Prunus mahaleb* a *Prunus armeniaca* (Smith, 1972).

Celosvětový výskyt viru je přičítán k jeho relativně jednoduchému přirozenému šíření. Rozšiřuje se semeny i pylem (Ogawa, English, 1991). Je proto nutné dodržet izolační vzdálenost od zdrojů onemocnění. Izolační vzdálenost je v tomto případě uváděna 1000 m (Kolektiv autorů, 1986). Virus obsažený v pylu může infikovat jen nové semeno. Dalším přenašečem je třásněnka, která sáním přenesení virus z infikovaného jedince na zdravou rostlinu (Strand, 1999). Je přenosný i vegetativním množním (Nečas, Krška, 2006c).

Projevuje se chlorotickými a nekrotickými skvrnami na listech broskvoní, deformací a krabacením jejich okrajů (Ogawa, English, 1991). V okolí žilek na spodní straně listu se vytvoří výrůstky. Napadené pletivo nekrotizuje a drolí se. První nekrotické skvrny se na listech objevují již v květnu. Příznaky napadení virem nekrotické kroužkovitosti třešně se projevují jen na části koruny, nejčastěji na spodní straně severní části koruny. Projevy jsou spojeny s průběhem počasí. V teplejších dnech jsou symptomy na hostiteli silnější (Nečas, Krška, 2006c). Symptomy napadení rostliny virem se projeví v roce následujícím na jaře. Na nových letorostech jsou projevy viru zřetelné až po oteplení (Strand, 1999). Často jsou projevy napadení vázány pouze na první dva roky po napadení virem. (Nečas, Krška, 2006c)



### **3.2.5 Virus zakrslosti slivoně – *Prune dwarf virus* (PDV)**

Virus zakrslosti slivoně patří do rodu *Illavirus* (Diekmann, Putter, 1996).

Mezi hostitelské rostliny patří *Prunus amygdalus*, *Prunus avium*, *Prunus persica*, *Prunus armeniaca* a další zástupci čeledi *Rosaceae* (Diekmann, Putter, 1996).

Virus je rozšiřován roubováním, semeny nebo pylem (Diekmann, Putter, 1996). Základem ochrany rostlin před napadením tímto virem je vzdálenostní izolace od zdrojů infekce (Nečas, Krška, 2006b). Dále je nutné zajistit zdravý výsadbový materiál použitím bezvirózních certifikovaných matečních rostlin.

Projevy viru jsou na různých typech dřevin odlišné. U broskvoní se objevuje zakrslý růst (Diekmann, Putter, 1996). Na listech se objevují různě velké skvrny, proužky a kresby. Skvrny nekrotizují a listy se deformují. U broskvoní a třešní dochází k zúžení listové čepele. Projevy napadení se více projevují při nižších teplotách. V horkém letním počasí jsou příznaky onemocnění maskovány. Virus způsobuje odumírání pupenů a snížení sklizně (Nečas, Krška, 2006b).

### **3.2.6 Virus šarky švestky – *Plum pox virus* (PPV)**

Virus šarky švestky patří do čeledi *Potyviriidae*, rodu *Potyvirus* (Schlesingerová, 2011). Jedná se o nejpočetnější čeleď, kam spadá sem přes 400 druhů všech známých rostlinných virů (Polák, 2010).

Virus šarky švestky je nejrozšířenější virus působící škody na slivoních, meruňkách a broskvoních v Evropě (Diekmann, Putter, 1996; Schlesingerová, 2011). Virus je velmi variabilní. Bylo popsáno 7 kmenů viru (PPV-D, PPV-M, PPV-Rec, PPV-C, PPV-W, PPV-T a PPV-EA), které se liší svými biologickými, sérologickými a molekulárními vlastnostmi. V České republice se vyskytují 3 kmeny viru šarky švestky (PPV-D, PPV-M a PPV-Rec). Celosvětově, i u nás, je nejvíce rozšířen je kmen PPV-D. (Schlesingerová, 2011).

Je tvořen jednořetězcovou RNA (Diekmann, Putter, 1996). Částice viru jsou 750 nm dlouhé a 13 nm široké. Vnější část je složena z obalového proteinu. Vnitřní část je tvořena bílkovinou a nukleovou kyselinou, která zaujímá 7% viru. Inaktivace virových částic probíhá při teplotě 52 – 58°C trvajících 10 minut. Mimo rostlinu přežívají viry v *in vitro* podmínkách při pokojové teplotě 3 až 4 dny (Polák, 2010).

Virus šarky švestky byl poprvé popsán v Bulharsku roku 1917 na švestce. V Československu byl výskyt viru prokázán roku 1952 (Polák, 2010). Dnes je virus rozšířen po celém území České republiky. Nejvíce postiženy jsou švestky a myrobalány (Schlesingerová, 2011).

Mezi hostitelské okruhy viru spadají ovocné, většina okrasných i planě rostoucích rostlin rodu *Prunus*. Mezi přirozeně infikované rostliny patří švestky, slívy, renklódy, broskvomandloně, meruňky, broskvoně, třešně, višně nebo trnky (Polák, 2010). U nás vyskytující se kmeny viru šarky švestky nenapadají třešně a višně. Kmen PPV-D (Dideron) napadá broskvoně méně. Kmen PPV-M (Marcus) napadá spíše broskvoně než švestky a kmen PPV-Rec (Recombinant) se vyskytuje převážně na švestkách (Schlesingerová, 2011).

Mezi významné přenašeče viru patří mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), mšice slívová (*Brachycaudus helichrysi*) a mšice chmelová (*Phrodon humuli*). Zdrojem infekce jsou infikované stromy v sadech, ale také planě rostoucí rostliny. Významným zdrojem viru šarky švestky jsou staré výsadby švestky domácí podél cest. Dalším způsobem přenosu viru je roubování a osečkování (Polák, 2010).

Příznaky napadení virem šarky švestky se liší v závislosti na hostitelské rostlině (Nečas, Krška, 2006a). Symptomy se mohou objevit na listech, květech i plodech. Na listech se na jaře objevují chlorotické, někdy nekrotické, kroužky. Plody mohou být deformované, též s chlorotickými kroužky (Diekmann, Putter, 1996). Napadená dužnina se projevuje červeným zbarvením. U meruněk se napadení dužniny projevuje mramorovaným zbarvením. Virus způsobuje pokles cukrů a kyselin v plodech. U broskvoní jsou znaky napadení na listech viditelné jen u citlivých odrůd. Projevem je světle zelené lemování žilnatiny (Nečas, Krška, 2006a). Projevy infekce jsou ovlivňovány teplotami. Za vyšších teplot mohou charakteristické projevy napadení zmizet (Schlesingerová, 2011).

### **3.3 Metody eliminace virů**

Eliminace virů, viroidů a fytoplasem z infikovaných matečných rostlin je podmínkou k produkci zdravých, vegetativně množených rostlin. K ozdravení infikovaných rostlin se používají následující metody: termoterapie, izolace vrcholového meristému, chemoterapie a kryoterapie aplikovaná na vegetační vrcholy rostlin. Dále se používají různé kombinace těchto metod, které vedou k většímu počtu ozdravených rostlin (Loebestein, Katis, 2015). V současné době jde o jediný způsob produkce bezvirózních rostlin, jelikož tradiční křížení rostlin je časově náročné a v otázce produkce rostlin odolných k napadení viry zatím neúspěšné (Ravelonandro a kol., 2004).

V České republice byl zaveden systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu ovocných dřevin a révy vinné (Křížan a kol., 2009). Certifikační systém je v souladu s doporučenými certifikačními schématy EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) a též předpisy Evropské unie (Polák, Hauptmanová, 2008). V roce 2001 vznikly tři nové technické izoláty – Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha-Ruzyně a technický izolát na Zahradnické fakultě Mendelovy univerzity v Lednici (Křížan a kol., 2009).

V letech 2001 – 2004 byl řešen projekt Národní agentury pro zemědělský výzkum „Výzkum a vývoj komplexních postupů diagnostiky hospodářsky významných a karanténních fytopatogenních organismů pro systém certifikace ovocných dřevin“ (Polák, Hauptmanová, 2008). Projekt ukázal, že některé druhy ovocných dřevin jsou infikovány i několika patogeny současně. Význam projektu spočíval také v situaci, kdy zahraniční trh nenabízel viruprostý materiál českých odrůd ovocných stromů (Křížan a kol., 2009).

#### **3.3.1 Vybavení a materiál potřebný k ozdravení**

##### ***3.3.1.1 Vybavení potřebné k realizaci metod ozdravení***

Pro realizaci procesu ozdravení rostlin je nutné vlastnit chemickou laboratoř a přípravnu chemikálií, laboratoř vybavenou pro testování rostlin metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), PCR (polymerase chain reaction) a RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), laboratoř vybavenou pro práci s *in*

*in vitro* kulturami, chladničku s chladicí teplotou 4°C, mrazničku s chladicí teplotou -20°C, sterilizační zařízení autokláv, sušičku (160°C), pH-metr, laboratorní váhy, mikrovlnou troubu pro přípravu kultivačního média, horizontální elektroforézu (+ zdroj), výrobce ledové tříště, PC včetně softwaru, homogénizér na vzorky, fotometr, termostat, destilační přístroj, studený skleník a technické izoláty. Z materiálu a chemikálií jsou potřeba chemikálie pro imunochemii a pro přípravu kultivačních médií, filtrační papíry a papírové ručníky, laboratorní sklo (autoklávované), permanentní popisovače na sklo a plast, skalpel, sterilizovaný nůž a sterilizované nůžky, pinzety, pipety, váženky, vyšetřovací rukavice, mikroténové sáčky pro uchování vzorků, pěstební kontejnery, pěstební rašelinový substrát, hnojiva, roubovací páska a roubovací nůž (Křížan a kol., 2009).

Pro metodu kryoterapie jsou dále zapotřebí nádoby na tekutý dusík (Dewarova nádoba pro uchování tekutého dusíku, polystyrénová nádoba na tekutý dusík a polystyrenová nádoba na kryozkumavky v lázni tekutého dusíku), chladící médium tekutý dusík, nástroje potřebné k dehydrataci růstových vrcholů (nádobky na silikagel), stojánek na kryozkumavky, kryozkumavky a polystyrénový držák o objemu 1 l (Faltus a kol., 2012).

### **3.3.1.2 Rostlinný materiál meruněk a broskvoní určený k ozdravení**

Pro úspěšný průběh ozdravení rostlin je důležité zajistit vhodný rostlinný materiál, který musíme upravit podle požadavků jednotlivých metod.

#### **Pro metody v podmínkách *in vitro*:**

Metody ozdravování rostlin od virů prováděné v podmínkách *in vitro* (termoterapie *in vitro*, izolace vrcholového meristému a chemoterapie) vyžadují předem připravený rostlinný materiál převedený do sterilních podmínek.

V případě ozdravování meruněk a broskvoní v podmínkách *in vitro* se jedná o pupeny ze stromů infikovaných virem (Polák, Hauptmanová, 2008). Odebírají se bylinné letorosty desinfikovanými nůžkami v 70% ethanolu, které jsou následně rozděleny na jedno nodální segmenty (Křížan a kol., 2013; Polák, Hauptmanová, 2008). Odebrané letorosty je nutné zbavit listů, aby nedocházelo k zavadání. Je vhodné ponechat cca 10 mm dlouhé řapíky (Křížan a kol., 2013).

Dalším krokem je povrchová sterilizace odebraného materiálu, která je prováděna ve flow-boxu v Erlenmayerových baňkách (Polák, Hauptmanová, 2008). Povrchovou desinfekci je možno provést roztokem Sava nebo roztokem chloridu rtuťnatého. Křižan a kol. (2012a) uvádí povrchovou sterilizaci řízků meruněk a broskvoní v 0,2% roztoku chloridu rtuťnatého ( $HgCl_2$ ) s kapkou smáčedla po dobu 5 – 7 minut. Polák, Hauptmanová (2008) popisuje postup sterilizace rostlinného materiálu odebraného z meruňky a slivoně v 20% roztoku Sava. Doba sterilizace je 15 minut. Zbytky sterilizačního činidla z rostlinného materiálu po uplynutí určené doby jeho působení odstraníme sterilovanou vodou (Polák, Hauptmanová, 2008; Křižan a kol., 2012a; Křižan a kol., 2013). Řezné plochy segmentů je třeba odříznout z důvodu poškození sterilizačním činidlem (Křižan, 2013).

Velikost segmentů i jejich počet v kultivační baňce se liší v závislosti na použité metodě i podle použitého kultivaru. Po uzavření baňek s novým materiálem odebraným z meruněk a broskvoní probíhá kultivace v prostředí se stálou teplotou 22°C, světelným režimem 14 h světlo a 10 h tma (Polák, Hauptmanová, 2008). Křižan a kol. (2013) uvádí kultivační teplotu 24°C a fotoperiodu 16 h světlo a 8 hodin tma se světelnou intenzitou 22 – 25  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ . Po 4 týdnech rostliny přeneseme na nové médium. Po 2 – 3 měsících jsou rostliny připraveny na proces ozdravení (Křižan a kol., 2013).

Pro úspěšný proces kultivace meruněk a broskvoní v podmínkách *in vitro* je důležitý odběr letorostů v období vegetačního růstu. Z důvodu přechodu dřevin do dormantního stavu je nejúspěšnějším termínem pro odběr letorostů červen. Červencové a srpnové odběry nejsou již tak efektivní (Křižan a kol., 2013).

Termoterapie si klade vyšší požadavky na rostlinný materiál vhodný k ozdravení. Aby byl proces termoterapie úspěšný, musí rostlinný materiál snést vyšší teploty. Vhodným materiálem pro ozdravení jsou proto hlízy a dřevnatějící části rostlin (Matthews a kol., 2002).

Přítomnost viru v rostlině je nutno před samotným procesem ozdravování prokázat pomocí sérologického ELISA testu (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), pomocí indikátorových rostlin nebo použitím molekulárních metod, např. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase chain reaction) (Polák, Hauptmanová, 2008).

### **Pro metody v podmínkách *in vivo*:**

Příprava rostlinného materiálu odebraného z meruněk a broskvoní u metod prováděných v podmínkách *in vivo* je časově náročná. V porovnání s přípravou rostlinného materiálu pro metody eliminace virů v podmínkách *in vitro* je tento způsob náročnější na prostor, jelikož procesu ozdravení je vystavena celá rostlina.

Aby bylo technicky možné provést ozdravení rostlin, je nutné zajistit jejich snadnou přemístitelnost. Využívá se toho zejména tehdy, pokud máme k dispozici starší infikovaný strom nebo odrůdu ze zahraničí. Pro ozdravení postačí 5 – 10 ks od požadované odrůdy (Polák, Hauptmanová, 2008). Z infikované matečné rostliny odebereme rouby a naštěpujeme je na bezvirózní podnože. Jednoletí štěpovanci jsou následně na jaře přesazeni do kontejnerů. Objem kontejneru se volí podle velikosti šlechtěnce (Křížan a kol., 2009, Polák, Hauptmanová, 2009).

#### **3.3.1.3 Kultivační médium**

Pro kulturu meruněk a broskvoní v podmínkách *in vitro* je nutné zajistit kvalitní kultivační médium.

Nejčastěji používaným kultivačním médiem pro kulturu meruněk je médium Murashige-Skoog (1962). K ozdravení meruněk jej použili Knapp a kol. (1995), Laimer a kol. (2006), Polák a Hauptmanová (2008) a Gella a Errea (1998). Gella a Errea také uvádějí médium Marino (1983).

Křížan a kol. (2009) srovnává použití médií Marino *et al.* (1991), Balla a Vértesy (2001) a universální médium MS (Murashige-Skoog, 1962). Za nejvhodnější kultivační médium pro kulturu meruněk označil médium Marino *et al.* (1991).

Nejčastěji používaným kultivačním médiem pro kulturu broskvoní je médium Murashige-Skoog (1962). K ozdravení broskvoní jej použili Laimer a kol. (2006), Barba a kol. (1995) a Navarro a kol. (1982). Za nejvhodnější ho označil také Křížan a kol. (2009), který srovnal média Murashige-Skoog (1962), Quoirin a Lepoivre (1977), Lloyd a McCown (1981) a Miller (1965), ačkoliv rozdíly mezi ostatními zmiňovanými médii nebyly příliš velké.

### 3.3.1.4 *Testování rostlin*

Před samotným procesem ozdravení meruněk a broskvoní je nutné ověřit přítomnost virů v připraveném rostlinném materiálu. Přítomnost virů v rostlinném pletivu před započnutím eliminační metody je prováděno testovacími metodami, které jsou použity i pro zjištění výskytu virů po procesu ozdravení.

Následné testování rostlin po procesu ozdravení probíhá minimálně po dobu tří let, přičemž jsou rostliny drženy v technické izolaci. Dlouhá doba určená k detekci virů je zvolena z důvodu možného poklesu koncentrace virů po procesu ozdravení. Při testování přítomnosti virů u meruněk a broskvoní je doporučováno použití kombinace alespoň dvou metod detekce. Rostliny v *in vitro* podmínkách je doporučováno testovat metodou RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction). Ozdravený materiál převedený do nesterilních podmínek je vhodné testovat metodou DAS-ELISA – double-antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay. Další metoda využívaná pro testování rostlin je pomocí rostlinných indikátorů (Křižan a kol., 2013).

Kombinaci dvou metod detekce také využili po ozdravení rostlin rodu *Prunus* od virů Rizqui a Zamzami (2001), Brison a kol. (1997), Mangamaria a kol. (2003) a např. Laimer a kol. (2006). Nejčastěji je přítomnost virů u rostlin rodu *Prunus* testována pouze jednou metodou detekce virů – ELISA. Použili ji např. Knapp a kol. (1995), Gella a Errea (1997), Saponari a kol. (1999), Howell a kol. (2001), Cieslinska (2007) a Stein a kol. (1991). Nejméně využívanou samotnou metodou detekce virů je PCR, kterou využil pro detekci fytoplasmy Chalak a kol. (2005).

### 3.3.2 Izolace vrcholového meristému

Meristémová kultura *in vitro* je hlavní metodou určenou k eliminaci virů a dalších patogenů z velkého množství vegetativně množených rostlin (Loebestein, Katis, 2015).

Apikální vrchol rostliny je složen z listových primordií, které se přemění v listy, a vegetativního meristému, kde dochází k prodlužovacímu růstu stonku. Vegetativní meristém obvykle není napaden virem (Loebestein, Katis, 2015). Je dobře známo, že distribuce viru v rostlině je nerovnoměrná. Koncentrace virů v rostlinném pletivu stoupá společně se vzdáleností od apikálního meristému. Důvod, proč viry nejsou v meristému obsaženy, souvisí s pohybem viru po rostlině. Virus se po rostlině pohybuje skrz vaskulární systém, který není v meristému vyvinut. Dalším důvodem je vysoká

metabolická aktivita v aktivně se dělících buňkách meristému, která neumožňuje replikaci viru. Rostlina má též vybudovaný systém inaktivující viry, jehož aktivita je v meristému vyšší, proto je meristém chráněn před infekcí. Neméně důležitým důvodem je i vyšší hladina endogenního auxinu obsažená v meristému, díky níž nedochází k replikaci viru (Bhojwani, Razdan, 1996).

Meristém se skládá z aktivně dělících se buněk. Buňky v meristému jsou malé, bez buněčných prostor. Vakuoly jsou malé a rozptýlené v buňce, protoplasma obsahuje velké množství buněčných organel – protoplastidy, mitochondrie, Golgiho aparát, ribosomy spojené s endoplasmatickým retikulem. Meristematické buňky jsou schopny samoobnovení, produkují dceřiné buňky, které následně diferencují a vytváří rostlinné orgány. Proto buněčné dělení a diferenciaci jsou dva základní procesy potřebné k úspěšné regeneraci celé rostliny z meristému. Velikost meristému závisí na druhu rostliny, obecně se však uvádí šířka 0,1 mm a délka 0,25 mm. Preparace takto malých částí je časově náročná a jejich regenerace je problematická (Wang a kol., 2009).

Proces ozdravení rostlin pomocí izolace vrcholového meristému sestává z izolace apikálního meristému z infikované rostliny, kultivaci v podmínkách *in vitro* a následné převedení mladé rostliny do nesterilních podmínek (Loebestein, Katis, 2015).

Isac (1986) potvrdil, že metodou izolace vrcholového meristému lze eliminovat virus *Plum pox virus* z rostlin rodu *Prunus*, konkrétně *Prunus domestica*. U apikálních segmentů odebraných z infikovaných stromů provedl desinfekci a následně umístil na kultivační médium Murashige-Skoog (1962). Pro multiplikaci přidal do média 0,1 – 2,0 mg/l BAP (6-benzylaminopurin) a pro zakořeňování 0,1 – 0,5 mg/l GA a 2,0 mg/l IBA (kyselina indolylmásečná). Z dopěstovaných rostlin byly nadále odebrány rouby a naroubovány na bezvirózní podnože, které byly následně testovány na přítomnost viru *Plum pox virus*. Testy neprokázaly infekci virem.

Ve většině případů je metoda izolace meristému použita v kombinaci s jinou ozdravnou metodou, čím se zvyšuje úspěšnost eliminace virů (Loebestein, Katis, 2015).

Metodou využívající viruprostých vrcholových meristémů je také mikroroubování (micrografting). Jedná se o metodu, kdy jsou na semenáče rostlin kultivovaných v podmínkách *in vitro* naroubovány viruprosté vrcholové meristémy požadované odrůdy. Toho se využívá především u dřevnatých rostlin. Proces se sestává z několika následujících kroků: příprava podnože, příprava rouby, roubování, péče o naroubované



rostliny a úspěšné převedení nové rostliny do nesterilního substrátu. Rouby broskvoní se odebírají z vegetativních částí rostliny a následně jsou vysterilizovány. Na 10 dní starých semenáčích se nechá 1 cm dlouhý epikotyl. Na něj je následně umístěn apikální meristém s několika listovými primordií. Následuje růst a umístění rostlin do nesterilních podmínek. Navarro a kol. (1982) použil tuto metodu pro ozdravení broskvoní od *Prunus necrotic ringspot virus* a *Prune dwarf virus*. Ozdravení však neproběhlo úspěšně, nebyla ozdravena ani jedna z dopěstovaných rostlin. Výsledky uvedené v publikaci od Barba a kol. (1995) ukazují, že je možné ozdravit rostliny broskvoní od viroidu *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd). Celkem bylo ozdraveno až 66,6% rostlin.

### **3.3.3 Termoterapie**

Metoda, která využívá efektu snižující se koncentrace virů směrem k apikálnímu vrcholu. Dále využívá situace, kdy v důsledku zvýšené teploty dochází k inhibici šíření viru (Křížan a kol., 2005a; Křížan a kol., 2005c). Vysoká teplota snižuje replikaci virů, může významně inhibovat syntézu obalového proteinu viru a snižuje pohyb viru z buňky do buňky (Bhojwani, Razdan, 2013). Úspěšnost ozdravení závisí na teplotě potřebné k inaktivaci viru, proto se délka (minuty, hodiny až týdny) i výška teploty (35 – 54°C) u jednotlivých druhů rostlin i virů liší (Matthews, 2002).

Termoterapie (thermotherapy, heat therapy) je nejstarší metodou používanou k eliminaci virů, viroidů a fytoplasem u vegetativně množených rostlin. První zmínka o použití metody je datována do roku 1869, kdy skotští zahradníci ponořovali cibule do horké vody před jejich zasazením. V roce 1936 Kunkel podal zprávu o léčbě žloutenky u broskvoní za použité suchého tepla a horké vody. Také sledoval vliv teploty na odstranění viru, stejně jako v roce 1975 Walkey a Cooper (Loebestein, Katis, 2015).

Termoterapie byla použita k eliminaci virů u révy vinné, peckovin, citrusů, jádrovin, brambor, jahod a dalších kulturně užitečných rostlin (Loebestein, Katis, 2015).

Tato metoda byla v České republice podrobněji studována v letech 2004 – 2008, kdy byl prováděn výzkumný projekt Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) – „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“ (Křížan a kol., 2009).

Eliminace virů z celé rostliny je obvykle nemožná. Dochází k závažnému poškození nebo dokonce úhynu (Loebestein, Katis, 2015). Proto je často kombinována s izolací vrcholového meristému.

Rozlišujeme termoterapii *in vitro* a *in vivo*. Termoterapie *in vivo* se dále dělí na termoterapii *in vivo* horkým vzduchem a termoterapie *in vivo* horkou vodou.

### **3.3.3.1 Termoterapie *in vivo* horkým vzduchem + izolace vrcholového meristému**

Termoterapie *in vivo* probíhá v nesterilních podmínkách. Celé infikované rostliny jsou umístěny do termokomory, kde na ně působí teploty okolo 30 – 40°C po určenou dobu. Následně jsou rostliny přesunuty do skleníku s běžnými teplotami (Koubouris a kol., 2007).

Teplota vzduchu je postupně během několika prvních dní zvyšována, dokud není dosažena požadovaná teplota (Bhojwani, Dantu, 2013).

Po skončení působení vysokých teplot na rostliny jsou odebrány apikální segmenty sterilním skalpelem a převedeny do kultury *in vitro* (Křížan a kol., 2009).

Při ozdravování **meruněk** metodou termoterapie *in vivo* horkým vzduchem je vhodné použití fotoperiody 16 h (světlo)/8 h (tma). Ideální vzdušná vlhkost se osvědčila 90%. Nižší vzdušná vlhkost způsobuje osychání listů. Při relativní vzdušné vlhkosti vyšší než 90% dochází ke zvýšenému výskytu plísní. Vhodná intenzita osvětlení je na úrovni 22  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Po celou dobu je vhodné rostliny zalévat roztokem Kristalonu Speciál (18-18-18-3) v koncentraci 0,5 g/l. Osvědčeným způsobem závlahy meruněk v kontejnerech je kapková závlaha na povrch půdy (Křížan a kol., 2009).

Délka procesu termoterapie u meruněk se liší v závislosti na autorovi. Křížan a kol. (2009) a Křížan a Ondrušiková (2009) pro proces termoterapie použili dobu 45 dní. Polák a Hauptmanová (2008) ve své publikaci uvádí dobu trvání termoterapie celkově 59 dní, z toho 21 dní trvá termoterapie při teplotě 37°C.

U některých odrůd **broskvoní** bylo zjištěno, že nejsou schopny snášet dlouhodobě teplotu 37°C. Při použití teplot 37°C ve dne a 35°C v noci (světelná perioda 12/12) nepřežívá žádná rostlina proces termoterapie trvající 45 dní. U teplot 35/32°C přežívá pouze 9% rostlin. Nejvhodnější pro proces ozdravování broskvoní se zdá být teplota 32/30°C. Při těchto teplotách je možno odebrat z celkem 87% rostlin apikální segmenty

přírůstků. Vysoká vzdušná vlhkost 90% je pro broskvoně vyhovující, stejně jako způsob zálivky v kontejnerech a intenzita hnojení (Křižan a kol., 2009).

### **3.3.3.2 Termoterapie in vivo horkou vodou**

Méně častým způsobem je termoterapie prováděná horkou vodou (hot water treatment). Použití horké vody je účinné v případě eliminace bakteriálních a houbových chorob, zřídka virů. Pro ozdravování od virů je efektivnější metoda za použití horkého vzduchu (Bhojwani, Dantu, 2013).

V roce 2008 byla testována metoda použití horké vody k eliminaci fytoplasmy *Candidatus phytoplasma prunorum* z meruňky odrůdy 'Hargrand'. Pokus byl proveden na roubech infikovaných evropskou žloutenkou peckovin. Jako nejvhodnější se jevila délka působení 45°C vody 60 nebo 75 minut. 7 měsíců po provedení terapie nebyla fytoplasma detekována v žádné ozdravované rostlině. Před samotnou léčbou doporučuje testování každého roubu meruňky, neboť fytoplasma v některých roubech nemusí být detekována vůbec (Křižan a kol., 2008).

Tato metoda byla také použita k ozdravení nektarinek od *Monilinia fruticola* (Karabulut a kol., 2010). K eliminaci virů (*Alfafa mosaic virus*, *Potato leaf roll virus* a *Tomato black ring virus*) byla použita tato metoda v případě brambor (*Solanum tuberosum*), avšak byla ozdravena pouze jedna rostlina (Kaiser, 1980).

### **3.3.3.3 Termoterapie in vitro + izolace vrcholového meristému**

Termoterapie *in vitro* spočívá v působení vysokých teplot na části infikovaných rostlin, které byly převedeny do sterilních podmínek (Loebestein, Katis, 2015). Během působení vysokých teplot rostliny přirůstají. Přirostlé části je možné odebrat a dopěstovat z nich viruprosté rostliny (Křižan a kol., 2005a).

Jedná se o metodu využívanou méně často než termoterapii v substrátu za nesterilních podmínek. Mezi výhody, které tato metoda nabízí, patří úspora místa v termoboxu a snadnější odběr již sterilních částí. Vysoká teplota klade zvýšené nároky na výběr kultivačního média (Křižan a kol., 2005a).

Termoterapie *in vitro* v kombinaci s izolací apikálního meristému byla úspěšně aplikována na eliminaci virů u mnoha zástupců rodu *Prunus*. Např. Saponari a kol. (1999) aplikoval tuto metodu na *Prunus mahaleb* pro ozdravení od viru *Prune dwarf virus*, Laimer a kol. (2006) na *Prunus domestica* od *Plum pox virus*, *Prunus dwarf virus*

a *Prunus necrotic ringspot virus* a Dziedzic (2008) na *Prunus domestica* od *Prunus necrotic ringspot virus*. Dále byla úspěšně použita i na révu vinnou od virů *Arabis mosaic nepovirus* a *Grapevine fanleaf virus* (Křížan a kol., 2005b).

Metodu termoterapie *in vitro* v kombinaci s izolací meristému lze aplikovat i při ozdravování rostlinného materiálu od fytoplasem. Chalak a kol. (2005) touto metodou úspěšně ozdravil mandloň od fytoplasmy *Candidatus*.

Knapp a kol. (1995) uvádí postup ozdravení **meruňek** od *Plum pox virus*. Meruňky umístěné v médium Murashige-Skoog (1962) byly ozdravovány v podmínkách *in vitro* při teplotě 38°C (16 hodin) a 36°C (8 hodin) po dobu 15 dní. Následně byl odebrán apikální dóm společně s jedním nebo dvěma listovými primordií a umístěn na nové médium MS. Při kombinaci obou metod dosáhl Knapp a kol. (1995) 100% ozdravení rostlinného materiálu meruňky. Druh kmenu viru šarky švestky nemá vliv na průběh či výsledek procesu ozdravování. (Polák, Hauptmanová, 2008).

Gella a Errea (1998) popisují proces ozdravení meruňek od viru *Apple chlorotic leaf spot virus*. Jako kultivační médium bylo použito médium Murashige-Skoog (1962) a následně Marino (1983), na kterém byl proveden proces termoterapie. Na meruňky bylo působeno teplotou 37°C po dobu 21 dní. Tuto dobu přežilo 100% rostlin, které byly viruprosté.

Gella a Errea (1998) uvádí postup ozdravení **broskvoní** od viru *Prunus necrotic ringspot virus*. Kultivační médium bylo zvoleno Murashige-Skoog (1962) a následně Marino (1983), na kterém probíhal proces termoterapie. Na broskvoně umístěné na kultivačním médiu působila teplota 37°C po dobu 21 dní. Dobu 21 dní přežilo pouhých 42% rostlin. Z rostlin, které přežily vysoké teploty, bylo 55% ozdraveno od viru *Prunus necrotic ringspot virus*.

Stein a kol. (1991) ozdravoval pomocí termoterapie *in vitro* broskvoně od *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV). Po dobu 22 dní byly aplikovány na odrůdu 'Summerset' teploty 38°C pro den a 28°C pro noc. Použitá fotoperioda byla 16 h světlo/8 h tma. Poté byly z rostlin, na které působily vysoké teploty, odebrány apikální segmenty. Celkem bylo ozdraveno 40% broskvoní od viru *Prunus necrotic ringspot virus*.

Mangamaris a kol. (2003) použil pro proces termoterapie u nektarinek odlišné kultivační médium než ostatní autoři. Použil médium pro dřevnaté rostliny (the woody

plant medium – WPM) typu Lloya and McCown (1981). Nektarinky byly ozdravovány od virů *Plum pox virus* a *Prunus necrotic ringspot virus*. Použitá denní teplota byla 35°C, noční pak 28°C. Délka působení vysokých teplot byla 3 týdny. Výsledky ukazují, že touto metodou je možné eliminovat oba typy virů z rostlinného materiálu nektarinek. Úspěšnost ozdravených rostlin se pohybuje okolo 85%.

### **3.3.4 Chemoterapie**

Chemoterapie (chemotherapy) je metoda využívající chemické látky, tzv. antivirotika, k zastavení množení virů v rostlině. Chemická látka je přidána do kultivačního média, ve kterém jsou rostliny v podmínkách *in vitro* kultivovány. Z rostliny, na kterou byla uplatněna léčba chemickými látkami, jsou odebrány apikální segmenty, ze kterých je zregenerována nová rostlina. Nově regenerovaná rostlina je dále testována na přítomnost virů (Křížan a kol., 2012a).

Mezi používané chemické látky zabraňující replikaci virů patří acykloguanosin, azidothymidin, acyklovir, ribavirin nebo 2-thiouracil (Loebestein, Katis, 2015). Mnoho z chemických látek používaných pro ozdravení rostlin od virů prokázalo účinky při léčbě virových onemocnění u živočichů (Yadav, Tyagi, 2006).

Nejčastěji používanou chemickou látkou v chemoterapii je ribavirin (1- $\beta$ -ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamin) (Křížan a kol., 2012a). Ribavirin je analog guanosinu, kterému byly prokázány vlastnosti inhibovat syntézu DNA či RNA viru (Rakel, 2007). Byl vyvinut počátkem 80. let. V medicíně je využíván k léčbě hepatitidy typu C jako perorální virostatikum. Dříve byly účinky samostatného ribavirinu na léčbu hepatitidy zpochybňovány, ale Pawlotsky (2004) tento názor vyvrátil (Špičák, 2008). Ribavirin je do kultivačního sterilního média přidáván filtrací (Křížan a kol., 2013).

Pomocí chemoterapie byly ozdraveny např. orchideje (*Cymbidium*), brambory (*Solanum*), jahody (*Fragaria*) a buráky (*Arachis*) (Yadav, Tyagi, 2006).

Pro proces ozdravení metodou chemoterapie je zapotřebí vlastnit předem připravené rostliny meruněk a broskvoní. Rostliny jsou převedeny do aseptické kultury a kultivovány na kultivačním médiu.

Ozdravení rostlin meruněk a broskvoní od virů a fytoplasem probíhá nejčastěji za použití média Murashige-Skoog (1962) s přidavkem ribavirinu (Polák, Hauptmanová,

2008). Z kultivovaných rostlin jsou odebrány apikální segmenty velké 3 – 5 mm (Křižan a kol., 2012b). Po přenesení rostlin na toto médium zastavují rostliny svůj růst. Po jednom týdnu se růst obnoví. Některé rostliny v této fázi mohou odumřít. Po čtyřech týdnech je vhodné rostliny přenést na nové médium se stejnou koncentrací ribavirinu (Polák, Hauptmanová, 2008).

Úspěšnost ozdravení rostlin ribavirinem závisí na koncentraci, ve které byl ribavirin do média přidán, na hostitelské rostlině a na typu viru. V roce 2007 byla publikována studie na téma „*In vitro* production of *Plum pox virus* – free plums by chemotherapy with ribavirin“ vydaná Paunovicem a kol. (2007). K ozdravení *Prunus domestica* byly použity koncentrace ribavirinu 10, 20, 40, 60, 80 a 100 mg/l média v délce působení 6 týdnů. Po dvou letech byly rostliny testovány metodou IC-RT-PCR (immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction) na přítomnost virů. K ozdravení rostlin došlo při použití koncentrací 40 a 60 mg/l. V případě koncentrace 60 mg/l bylo ozdraveno 16,66% slivoní. Koncentrace 80 a 100 mg/l způsobila zvýšenou fytotoxicitu. Koncentrace 10 a 20 mg/l byla označena za neúčinnou (Paunovic a kol., 2007).

Polák a Hauptmanová (2008) uvádí, že při ozdravování meruněk a slivoní byla použita koncentrace ribavirinu 5 mg/l s dobou působení 12 – 20 týdnů. Za uvedený časový úsek proběhla eliminace viru úspěšně. Přesto je doporučována koncentrace ribavirinu 10 mg/l z důvodu rychlejšího ozdravení některých odrůd.

Křižan a kol. (2013) uvedl použití koncentrace ribavirinu 0 mg/l, 10 mg/l, 20 mg/l a 40 mg/l po dobu působení 4 týdny. Při koncentraci 10 mg/l ribavirinu bylo ozdraveno z 60 meruněk odrůdy 'Marlen' 59 rostlin. Při žádné z použitých koncentrací se neprojevila toxicita. Pro ozdravování meruněk doporučuje použití koncentrace ribavirinu 20 mg/l.

Během kultivace je možné, že se na některých rostlinách projeví vodnatění (tzv. hyperhydratace). Vodnatěním se rozumí děj, při kterém dochází k převodnění pletiv v kultivační nádobě. Příčinami vodnatění mohou být vysoká vzdušná vlhkost, koncentrace agarů a cytokininy. Na rostlinách se vodnatění projeví sklovitým vzhledem a disfunkcemi průduchů. U lehce poškozených rostlin odstraníme zvodnatělou část. Častější přenášení rostlin na nové médium omezuje proces vodnatění (Křižan a kol., 2013).

Po ukončení vhodné doby působení ribavirinu se z rostliny odeberou vrcholové segmenty o velikosti 3 mm. Kultivace rostlin na médiu bez ribavirinu trvá 2 měsíce (Křížan a kol., 2013).

### **3.3.5 Kryoterapie**

Kryoterapie (cryotherapy) je poměrně nová metoda eliminace patogenů u rostlin založená na kryoprezervaci. Kryoprezervace je způsob uložení a uchování rostlinného materiálu při velmi nízkých teplotách (-196°C), obvykle za pomoci tekutého dusíku (Wang a kol., 2009).

Principem kryoterapie je eliminace výskytu virů, fytoplasem a bakterií v rostlinném materiálu pomocí krátkého působení tekutého dusíku. Rozložení virů v rostlinném pletivu je nerovnoměrné. Nejmladší meristémové pletivo viry neobsahuje nebo obsahuje pouze jejich malé množství. S rostoucí vzdáleností od nejmladšího meristému se výskyt virů v rostlině zvyšuje. Proto je důležité, aby byly zachovány pokud možno co nejmenší a nejmladší části meristému (Wang a kol., 2009).

Je založena na faktu, že meristematické buňky obsahují v porovnání s diferencovanými buňkami méně vody. Ve výsledku jsou nenávratně poškozeny pouze diferencované buňky v důsledku tvorby ledových krystalů během působení tekutého dusíku na pletiva. Tímto způsobem je možné produkovat bezvirózní materiál *in vitro* (Loebestein, Katis, 2015).

V podstatě lze říci, že kryoprezervace je proces, ve kterém jsou vegetační vrcholy rostlin vystaveny velmi nízkým teplotám, skladovány a následně regenerovány v podmínkách *in vitro*. Kritickým nežádoucím krokem v procesu kryoprezervace je dehydratace buněk před ponořením rostlinného materiálu do tekutého dusíku a v opačném případě krystalizace mezibuněčné vody. Vytvoření krystalů uvnitř buňky vede k jejímu poškození, jelikož krystaly pronikají do membránových struktur a poškozují je (Wang a kol., 2009). Moderní dehydratační metody jsou založeny na zesklnění – tuhnutí kapalin bez krystalizace (Loebestein, Katis, 2015). V metodách založených na vitrifikaci jsou prýty rostlin před ponořením do tekutého dusíku ošetřeny koncentrovaným roztokem vitrifikačního činidla (PVS2 – plant vitrification solution no. 2 – Sakai a kol., 1990).

V kryoterapii jsou naopak smrtelná zranění buňky využívána k odstranění infikované rostlinné tkáně viry. Buňky, které jsou umístěny ve větší vzdálenosti od apikálního meristému, jsou s větší pravděpodobností infikované viry nebo fytoplasmy. Také jsou mnohem citlivější na poškození než buňky umístěné v meristemické zóně. Proto buňky, které přežívají proces kryoterapie, tedy buňky meristémové a buňky v prvním listovém primordiu, jsou schopny zregenerovat v bezviroznou rostlinu (Wang a kol., 2009).

Realizace kryoterapie není komplikovaná. To umožňuje léčbu velkého počtu vzorků. Následné použití termoterapie zvyšuje účinek eliminace virových patogenů. Uspodnění celého procesu je dáno vynecháním kroku mechanické izolace meristému od napadeného pletiva (Wang a kol., 2009). Použití kryoterapie na růstové vrcholy závisí na dostupnosti tkáňové kultury a kryoprezervačních protokolů vhodných pro konkrétní druh rostliny. Hlavním omezením aplikace kryoterapie je nedostatek těchto kryoprezervačních protokolů (Loebestein, Katis, 2015).

Jako první použili metodu kryoterapie Brison, de Boucaud, Pierronnet a Dosba roku 1997 pro eliminaci viru šarky švestky z podnože slivoně (Loebestein, Katis, 2015; Wang a kol., 2009).

Kryoterapie je dnes běžně využívána k eliminaci virů u banánu, malin, brambor a některých zástupců rodu *Prunus*. Běžně léčené viry touto metodou jsou *banana streak virus*, *cucumber mosaic virus*, *grapevine virus*, *plum pox virus*, *potato leaf roll virus*, *potato virus Y*, *raspberry bushy dwarf virus*, *sweet potato feathery mottle virus* a *sweet potato chlorotic stunt virus* (Wang a kol., 2009).

Jak již bylo zmíněno, jako první použil metodu kryoterapie Brison a kol. (1997). Byla provedena na podnoži rodu *Prunus* infikované virem šarky švestky (*Plum pox virus*). Podnože byly kultivovány na základním médiu Murashige-Skoog (1962). 24 hodin před samotnou kryoterapií byly vystaveny teplotě 4°C. Kultivační médium bylo po dobu 24 hodin obohaceno o 2% prolin. Následně byly prýty umístěny do kryoprotekční směsi PVS2 na dobu 20 – 40 minut. Rostliny byly mrazeny ve speciálních tubách rychlostí 1°C za minutu až na výslednou teplotu -40°C. Následně byly ponořeny do tekutého dusíku. Následující den byly vzorky rozmrazeny na 40°C za 1 minutu a kultivovány na médiu. Celkem se touto metodou podařilo ozdravit přibližně 50% rostlin (Brison a kol., 1997).



V České republice byla metoda kryoterapie podrobně popsána autory Faltus a kol. (2012). Metodika je určena k ozdravení chmele od virových patogenů, a to od viru mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus*), viru nekrotické kroužkovitosti jabloně (*Prunus necrotic ringspot virus*), viru mozaiky chmele (*Hop mosaic virus*) a latentního viru chmele (*Hop latent virus*). Oproti autoru Brison a kol. (1997) uvádí dobu působení tekutého dusíku na rostlinu 60 minut. Poté jsou rostliny vyjmuty z tekutého dusíku a umístěny do vodní lázně o běžné laboratorní teplotě a následně umístěny na kultivační médium s fytohormony.

Hlavní výhodou kryoterapie je zkrácení doby potřebné k ozdravení rostlin v důsledku použití jednoho cyklu působení nízkých teplot, který postačuje k ozdravení rostlin.

K eliminaci viru lze použít i kalusové kultury, kultury protoplastů a kultury neprodukční tkáň (Loebestein, Katis, 2015).

### **3.3.6 Zakořeňování a převedení rostlin do nesterilních podmínek**

Po procesu ozdravení meruněk a broskvoní od virů pomocí eliminačních metod v podmínkách *in vitro* je nutné zajistit dobré zakořeňování rostlin a následný převod rostlin do nesterilních podmínek.

Po skončení procesu ozdravení, ať už vysokými teplotami, antivirotiky nebo odebráním apikálního meristému, se části rostlin meruněk a broskvoní kultivují v celou rostlinu. Dopěstované rostliny jsou po 2 měsících přeneseny na zakořeňovací médium s odpovídajícím množstvím kyseliny idolylmáselné (IBA). Doba zakořeňování je asi 2 týdny.

Zakořeňelé rostliny převedeme do multiplat s velikostí jamek 3,5 x 4,0 cm vyplněných rašelinovým substrátem s přídavkem perlitu v poměru 5:1. Před přesazením je nutné z rostlin pečlivě omýt zbytky média, aby se zabránilo případným infekcím (Křížan a kol., 2013).

Pěstební podmínky by měly ze začátku napodobovat podmínky v kultivační nádobě. Volíme proto teploty kolem 25°C a vysokou vzdušnou vlhkost zajištěnou krycí fólií. Po 7 dnech je možno fólií odkrývat, čímž docílíme postupného snižování vzdušné

vlhkosti a postupné aklimatizace rostlin na venkovní podmínky. Po měsíci je možno přemístit rostliny z množárny do skleníku (Křížan a kol., 2013).

## 4 DISKUSE

Pěstování meruněk a broskvoní v České republice zaznamenává sestupnou tendenci. Ozdravení některých českých tradičních odrůd meruněk a broskvoní od virových onemocnění a následná možnost jejich převedení do sadů by mohla alespoň do jisté míry zmírnit propad pěstování těchto ovocných druhů v našich podmínkách.

Mezi nejvýznamnější viry, které infikují kultury broskvoní a meruněk na území České republiky, patří virus šarky švestky (*Plum pox virus*), virus chlorotické skvrnitosti jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus*), virus nekrotické kroužkovitosti třešně (*Prunus necrotic ringspot virus*) a virus zakrslosti slivoně (*Prune dwarf virus*).

Jak ukazují výsledky jednotlivých studií zmiňovaných v této práci, pomocí různých metod ozdravování rostlin je možná eliminace všech čtyř významných virových onemocnění z meruněk i broskvoní.

Využití metody izolace vrcholového meristému jako samostatné metody se ukázalo jako méně časté. Nejčastěji je využívána v kombinaci s chemoterapií, termoterapií *in vivo* a termoterapií *in vitro*. Izolace vrcholového meristému je však časově i manuálně náročná, jelikož jde o manipulaci s velmi malými částmi rostlinného pletiva.

Termoterapie *in vivo* horkou vodou se ukázala být účinnou v případě eliminace fytoplasem z rostlinného materiálu meruněk a broskvoní. Jak však uvádí někteří autoři (Bhojwani, Dantu, 2013), pro eliminaci virů z rostlinného pletiva je tato metoda zřídka kdy účinná.

Termoterapie *in vivo* v kombinaci s izolací meristému se ukázala je metoda vhodná k ozdravení meruněk i broskvoní od virů. Je třeba brát v potaz, že některé odrůdy broskvoní snesou v porovnání s některými odrůdami meruněk podstatně nižší teploty v průběhu termoterapie, což může mít za následek nedostatečné ozdravení rostlinného materiálu. Jistou komplikací může přinést také potřeba termokomory vhodné k umístění celých rostlin.

Nejčastěji používanou antivirotickou látkou v procesu chemoterapie je ribavirin. Pro eliminaci virů z rostlinného pletiva se ukázal jako účinný. Je třeba dbát zvýšené opatrnosti při výběru koncentrace ribavirinu v kultivačním médiu. Nízká koncentrace ribavirinu v médiu je pro ozdravení rostlin od virů neúčinná, zatímco vysoká

koncentrace způsobuje u rostlin fytoxicitu. Oproti procesu termoterapie však poskytuje výhodu ve stálosti kultivačních podmínek, kdy není potřeba měnit teplotu či fotoperiodu v kultivační místnosti. Další výhodou je absence použití termokomory.

Metoda kryoterapie je metoda poměrně nová a v českých podmínkách ne příliš prozkoumaná. Její výhodou je zajisté rychlý proces ozdravení, kdy postačí několik desítek minut působení nízkých teplot na rostlinu k obdržení bezvirózního materiálu. Také šetří čas vynecháním kroku izolace vrcholového meristému. Kromě běžného vybavení laboratoře uzpůsobené pro kultivaci rostlin v podmínkách *in vitro* nevyžaduje žádné další speciální a finančně nákladné zařízení.

## 5 ZÁVĚR

V této práci je popsána botanická charakteristika meruněk a broskvoní a význam jejich pěstování na našem území. Dále je v práci podána stručná charakteristika virů se zaměřením na rostlinné viry, konkrétně na viry napadající broskvoně a meruňky. V poslední části práce jsou nejprve obecně popsány metody eliminace virů a následně byla popsána jejich aplikace na rod *Prunus*, broskvoně a meruňky.

Botanická charakteristika byla rozdělena do několika podkapitol: botanické zařazení určeného ovocného druhu, botanická charakteristika, původ a rozšíření ovocného druhu se zaměřením na rozšíření na území České republiky, nároky na pěstování, choroby a škůdci napadající vybranou ovocnou dřevinu s výjimkou virových chorob, které byly popsány níže, a význam pěstování ovocné dřeviny opět na území České republiky.

Při porovnání dat z oblasti pěstování jak už meruněk, tak i broskvoní, bylo zjištěno, že pěstování těchto dvou ovocných druhů na našem území postupně klesá. Z uvedených příčin poklesu produkce byly vybrány virové choroby, které byly popsány v samostatné kapitole. Byly vybrány čtyři nejvýznamnější viry u broskvoní a meruněk a následně popsány. Byla popsána jejich charakteristika, hostitelský okruh, symptomy způsobující na broskvoních a meruňkách a způsob jejich šíření.

V poslední části práce byly popsány tyto metody eliminace virů: izolace vrcholového meristému, termoterapie, chemoterapie a kryoterapie.

Z výsledků práce je zřejmé, že metoda izolace vrcholového meristému je používána ve většině případů jako podpůrná metoda pro zvýšení efektivity obdržení bezvirózního materiálu.

Hlavní rozdělení metody termoterapie je provedeno v souvislosti, v jakém prostředí se děj odehrává. Pokud jsou rostliny ozdravovány v nesterilních podmínkách, kdy vysoké teploty působí na celou rostlinu, jedná se o termoterapii *in vivo*. V opačném případě, kdy je působeno na části rostlin kultivovaných ve sterilních podmínkách, se jedná o termoterapii *in vitro*. Nejčastěji jsou oba způsoby provedení termoterapie spojeny s následnou izolací vrcholového meristému. Dalším dělením je způsob, jakým se na rostliny vysokými teplotami působí. Jedná se o termoterapii horkou vodou, kdy

vysoká teplota je rostlině dodávána skrze ohřátou vodu na požadovanou teplotu, nebo o termoterapii horkým vzduchem, kdy je teplota rostlině předávána skrze ohřátý vzduch.

U metody chemoterapie byla popsána nejčastěji používaná látka znemožňující další šíření viru po rostlině, ribavirin. Množství ribavirinu v kultivačním médiu bylo popsáno více autory a v mnoha případech jsou výsledky rozdílné. Stále však platí, že jistá koncentrace ribavirinu v kultivačním médiu je schopna inaktivace virů v rostlině.

Poslední popisovanou metodou eliminace virů v rostlině byla kryoterapie. Byl popsán její princip i konkrétní příklad na rostlině rodu *Prunus*. Za použití vhodných kryoprezervačních protokolů má tato metoda potenciál k ekonomicky zajímavému způsobu ozdravení rostlinného materiálu.

## 6 SOUHRN A RESUME, KLÍČOVÁ SLOVA

Práce popisuje metody eliminace virů využívané k získávání bezvirózního materiálu meruněk a broskvoní. Byly popsány čtyři eliminační metody, izolace vrcholového meristému, termoterapie, chemoterapie a kryoterapie. V práci jsou dále popsány čtyři ekonomicky významné viry vyskytující se na broskvoních a meruňkách. V této práci je také popsána botanická charakteristika výše uvedených ovocných druhů a význam jejich pěstování na území České republiky.

**Klíčová slova:** *Plum pox virus*, *Apple chlorotic leafspot virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, *Prune dwarf virus*, termoterapie, izolace vrcholového meristému, kryoterapie, chemoterapie

### RESUME

This work describes methods of virus elimination for obtaining virus-free plant material of peaches and apricots. Four methods of elimination were chosen, apical meristem isolation, thermotherapy, chemotherapy and cryotherapy. In this work, four economical significant viruses are described, which can infect peaches and apricots. This work describes botanical characteristic above-mentioned fruit species and importance of their planting in the area of the Czech Republic.

**Keywords:** *Plum pox virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, *Prune dwarf virus*, thermotherapy, apical meristem isolation, cryotherapy, chemotherapy

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

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

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

BHOJWANI, S., DANTU, P.K. *Plant tissue culture: an introductory text*. New Delhi: Springer, 2013. 1 online resource (xvii, 309 p.). ISBN 978-81-322-1026-9.

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

BLAHA, J., LUŽA, J., KALÁŠEK, J. *Broskvoně, meruňky, mandloně*. 1. Vyd. Praha: Academia, 1966, 443 s.

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. MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ. *Situační a výhledová zpráva: ovoce* [online]. Těšnov 65/17, 110 00 Praha I: Ústav zemědělské ekonomiky a informací, 2014 [cit. 2015-03-01]. ISBN 978-80-7434175-5. Dostupné z:[http://eagri.cz/public/web/file/355340/SVZ\\_Ovoce\\_2014.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/355340/SVZ_Ovoce_2014.pdf)

CIESLINSKA, M. *Application of thermo- and chemotherapy in vitro for eliminating some viruses infecting Prunus sp. fruit trees*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 2007, č. 15:117-124.

DIEKMANN, M., PUTTER, C. *Stone fruits*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, c1996, 109 s. FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm. ISBN 92-904-3160-1.

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



FALTUS, M., ZÁMEČNÍK J., SVOBODA, P. *Využití metody kryoterapie pro ozdravení chmele od virových patogenů: certifikovaná metodika*. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2012 dotisk, 18 s. ISBN 978-80-7427-109-0.

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

HANSEN, A.J. *Effect of ribavirin on green ring mottle causal agent and necrotic ringspot virus in Prunus species*. Plant Disease 1984, 68:216-218.

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

HOWELL, W. E., EASTWELL, K. C., LI, T. S. C. *Heat treatment, chemotherapy and hydroponic culture for obtaining virus-free trees of sweet cherry*. Acta Hort. 2001, 550:455-458

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

CHALAK, L., ELBITAR, A., RIZK, R., CHOUEIRI, E., SALAR, P., BOVÉ, J.M. *Attempts to eliminate Candidatus phytoplasma phoenicium from infected Lebanese almond varieties by tissue culture techniques combined or not with thermotherapy*. European Journal of Plant Pathology. 2005, vol. 112, issue 1, s. 85-89.

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

KAISER, W. J. *Use of thermotherapy of free potato alfalfa mosaic, potato leaf roll, and tomato black ring viruses*. Phytopathology 1980, 70:1119-1122.

KARABULUT, O.A., SMILANICK, J.L., CRISOSTO, C.H., PALOU, L. *Control of brown rot of stone fruits by brief heated water immersion treatments*. Crop Protection. 2010, 29.

KING, A.M. . *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Waltham, MA: Academic Press, c2012, x, 1327 p. ISBN 01-238-4684-6.

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>.

KNAPP, E., HANZER, V., WEISS, H., A CAMARA MACHADO, WEISS, B., WANG, Q., KATINGER, H., LAIMER DA CAMARA MACHADO, M.. *New aspects of virus elimination in fruit trees*. Acta Hort. 1995, 386:409-418.

KOLEKTIV AUTORŮ. *Nové směry v pěstování třešní a višní* : sborník přednášek ze symposia Hradec Králové, 10.-12. června. Praha: Sempra, 1986.

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. 2007-9-21, vol. 73, issue 5, s. 370-373.

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, č. 5:370-373.

KŘÍŽAN B., ONDRUŠIKOVÁ E., HOLLEINOVÁ V., KUDĚLKOVA M., HERRMANNOVÁ E., MATEJKOVÁ D., POLÁK J. *Metodika ozdravování rostlin odrůd meruňky, broskvoně a slivoně pomocí chemoterapie v podmínkách in vitro*. V Brně: Mendelova univerzita, 2013, 26 s. ISBN 978-80-7375-837-0.

KŘÍŽAN, B., BARÁNKOVÁ, K., ONDRUŠIKOVÁ, E., ADAM, M., HOLLEINOVÁ, V., PIDRA, M. 2008. *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. 781:93-98. ISBN 978-90-6605-080-8.

KŘÍŽAN, B., ČECHOVÁ, J., ONDRUŠIKOVÁ, E. *Ozdravování odrůd meruňek 'Lescora' a 'Bergeron' od virů PPV a PNRSV pomocí chemoterapie*. Úroda. 2012b. Sv. 60, č. 9, s. 64-67. ISSN 0139-6013.

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

KŘÍŽAN, B., ONDRUŠIKOVÁ, E., HOLLEINOVÁ, V., LABOŇOVÁ, K., PIDRA, M. *Eliminace virů ArMV a GFLV u zástupců rodu Vitis L. pomocí termoterapie*. Genetická konference Virus a buňka, 1.2-2.2. Praha. Sborník abstraktů, 2005b str. 12, ISSN 1210-6267.

KŘÍŽAN, B., ONDRUŠÍKOVÁ, E., MOUDRÁ, J., EICHMEIER, A., HOLLEINOVÁ, V. *Ozdravování rostlin odrůd meruňky a broskvoně od virů pomocí chemoterapie*. Zahradnictví. 2012a, 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*. Konference Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin, Praha, Sborník abstraktů, 2005a str. 163, ISBN: 80-86555-63-1.

KŘÍŽAN, B., ONDRUŠIKOVÁ, E., TRČKOVÁ, K., *Produkce bervirózních rostlin révy v České republice*. In UŽÍK, M. *Nové poznatky z genetiky a šlechtění pol'nohospodářských rostlin*. 1. Vyd. Piešťany: VÚRV Piešťany, 2005b, s. 131-132. ISBN 80-88790-43-3.

KŘÍŽAN, B., SEDLÁK, J., PAPRŠTEIN, F. *Ozdravování odrůd ovocných stromů a révy vinné od virů pomocí termoterapie a in vitro kultur*. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy, 2009, 68 s. ISBN 978-80-87030-15-8.

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

LAYNE, D. R., BASSI, D. *The peach: botany, production and uses*. Cambridge, MA: CABI, c2008, xvi, 615 p. ISBN 978-184-5933-869.

LITSCHMANN, T., OUKROPEC, I. *Metodika pěstování nektarinek a broskvoní v podmínkách ČR*. Lednice: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. ISBN 978-807-3752-408.

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

MANGANARIS, G. A., A. S. ECONOMOU, I. N. BOUBOURAKAS a N. I. KATIS. *Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine*. Plant Cell Reports. 2003-10-1, vol. 22, issue 3, s. 195-200.

MATTHEWS, R., HULL, R., MATTHEWS, R.. *Matthews' plant virology*. 4th ed. / . San Diego: Academic Press, c2002, xx, 1001 p. ISBN 01-236-1160-1.

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

NEČAS, T. *Multimediální učební skriptum ovocnictví: broskvoň* [online]. 2004 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: [http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav\\_551/eltronic\\_ovoc/\\_private/ovoc\\_1/data/broskvon.pdf](http://tilia.zf.mendelu.cz/ustavy/551/ustav_551/eltronic_ovoc/_private/ovoc_1/data/broskvon.pdf)

NEČAS, T., KRŠKA, B. *Plum pox virus (PPV) šarka švestek*. 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/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]. 2006c [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)

OBERBEIL, K., LENTZOVÁ, Ch. *Ovoce a zelenina jako lék: strava, která léčí*. 1. vyd. Praha: Fortuna Print, 2001, 294 s. ISBN 80-861-4490-9.

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 p. ISBN 0-931876-97-4.

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

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 Eq. 21:417-421.

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.

RAKEL, D. *Integrative medicine*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, c2007, xxiv, 1238 p. ISBN 978-141-6029-540.

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

RIZQI, A. a M. ZEMZAMI. *Recovery of virus-free almond plants by improved in vitro shoot-top grafting*. Acta Hort. č. 2001, 550:447-453.

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

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

SCHINDLER, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014, 215 s., xxiv s. obr. příl. Sestra (Grada). ISBN 9788024747712.

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>.

SMITH, K. M. *A textbook of plant virus disease*. United States of America: Academic press, 1972. ISBN 0-12-651350-3.

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

SPIEGEL, S., STEIN, A., TAM, Y. *In vitro thermotherapy of rosaceous fruit trees*. Acta Hort. 1995, č. 386:419-420.

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.

ŠPIČÁK, J. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008, 421, [11] s. ISBN 978-802-4717-838.

ŠUTIĆ, D.D., FORD, R.E., TOŠIĆ, M.T. *Handbook of plant virus diseases*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c1999, xxiii, 553 p. ISBN 08-493-2302-9.

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.

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. 2009, vol. 154, issue 3, s. 351-363.

YADAV, P., TYAGI, R. *Plant product biotechnology*. New Delhi: Discovery Publishing House, 2006. ISBN 81-835-6083-0.