

Metodika eliminace virů vyskytujících se na meruňce a broskvoni s využitím chemoterapie *in vitro*

Eva Ondrušiková, Martina Kudělková, Radka Pavelková, Jana Moudrá,
Břetislav Křížan, Věra Holleinová



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta

2016

Název: Metodika eliminace virů vyskytujících se na meruňce a broskvoni s využitím chemoterapie *in vitro*

Autoři: Ing. Evy Ondrušikové, CSc. a kolektiv

Rok vydání: 2016

Vydavatel: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Název: Metodika eliminace virů vyskytujících se na meruňce a broskvoni s využitím
chemoterapie *in vitro*

Autoři: Vypracoval kolektiv autorů pod vedením Ing. Evy Ondrušikové, CSc.

Ing. Eva Ondrušiková, CSc., 20 %,

Ing. Martina Kudělková, 30 %,

Ing. Radka Pavelková, 20 %,

Ing. Jana Moudrá, 10 %,

Ing. Břetislav Křížan, Ph.D., 10 %,

Ing. Věra Holleinová, Ph.D., 10 %

Vydala: Mendelova univerzita v Brně

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Vyšlo v roce: 2016

Vydáno bez jazykové úpravy.

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu: martina.kudelkova@mendelu.cz;
eva.ondrusikova@mendelu.cz

Oponenti:

Ing. Jitka Drozdová, Oddělení polních plodin, MZe, Těšnov 65/17, 11000 Praha 1

Ing. Petr Svoboda, CSc., Chmelařský institut s.r.o. Kadaňská 2525, 438 46 Žatec

Autoři fotografií: Martina Kudělková, Jana Moudrá

Dedikace: Metodika vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství a je výstupem
řešení projektu NAZV QJ1210175 Výzkum a vývoj standardních metodických postupů
ozdravování ovocných dřevin a révy vinné pomocí chemoterapie *in vitro* kultur pro systém
certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu. Doba řešení 1. 4. 2012 – 31. 12. 2016

© Mendelova univerzita v Brně, 2016

ISBN: 978-80-7509-439-1

Obsah

1. ÚVOD	5
2. CÍL METODIKY.....	7
3. METODICKÝ POSTUP ELIMINACE VIRŮ METODOU CHEMOTERAPIE	8
Vybavení laboratoře a reagentie potřebné pro <i>in vitro</i> kultivaci rostlin a chemoterapii	8
Příprava zásobních roztoků	9
Příprava kultivačních médií.....	9
Založení primárních kultur	11
Kultivační podmínky	12
Proces chemoterapie	12
Zakořeňování a převod rostlin do nesterilních podmínek	13
Testování zdravotního stavu.....	14
4. ZÁVĚR	16
5. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ A EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	17
6. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	19
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	20
8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ METODICE PŘEDCHÁZELY	23
9. PŘÍLOHY	24

Seznam zkratk

DAS-ELISA – Double antibody sandwich Enzyme – Linked Immunosorbent Assay

DKW – Driver-Kuniyuki Walnut medium (1984)

GMO – geneticky modifikované organismy

IAA – kyselina indolyl-3-octová

IBA – kyselina indolyl-3-máselná

BA (BAP) – benzylaminopurin

MS – Murashige a Skoog medium (1962)

NAA – kyselina alfa-naftyloctová

QL – Quoirin a Lepoivre médium (1977)

RT-PCR – reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce

ZF MENDELU – Zahradnická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

1. ÚVOD

Broskvoně a meruňky patří již několik desítek let k tradičně pěstovaným ovocným druhům v České republice. 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 na českém i zahraničním trhu, nepravidelné výnosy v jednotlivých letech a přestárlost meruňkových a broskvoňových stromů v sadech a rozšíření virových patogenů jsou důvody, proč velkopěstování obou plodin mizí z našich oblastí (Fronková, 2015; Polák, 2010).

Významným činitelem snižujícím výnos jsou právě virové patogeny. K nejzávažnějším původcům virových chorob jsou řazeny virus šarky švestky, virus chlorotické skvrnitosti jabloně, virus nekrotické kroužkovitosti třešně a virus zakrslosti slivoně (Layne, Bassi, 2008). Tato virová onemocnění jsou z větší části přenášena lidskou činností, použitím infikovaných rostlin jako zdroje množitelského materiálu, využíváním infikovaných podnoží nebo neopatrnou manipulací s infikovanými nástroji (Fronková, 2015).

Jako prevenci zavedla Česká republika systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu ovocných dřevin a révy vinné, který je v souladu s doporučeným systémem EPPO a závaznými předpisy Evropské Unie. V roce 2001 byly vybudovány technické izoláty jako první a základní předpoklad pro zavedení tohoto systému. Současný, v Evropské unii a Evropě platný systém certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu ovocných dřevin a révy vinné (dále jen „systém certifikace“) je založen na principu, že každá certifikovaná rostlina ovocné dřeviny, či révy vinné, prodávaná k výsadbě, je viruprostá, a je přímo odvozena z konkrétní základní nebo předzákladní patogenů prosté rostliny pěstované v technickém izolátu. Po rozmnožení této viruprosté rostliny v prostorovém izolátu jsou zdravé rostliny produkovány v ovocných školkách.

Ozdravení primárních zdrojů ovocných dřevin pro systém certifikace je nutné pro produkci viruprostého školkařského materiálu. Vyřešení problematiky ozdravení a získání patogenů prostých tržních, zejména českých odrůd je podmínkou provozu technických izolátů, konkurenceschopnosti českého školkařství a především českého ovocnářství.

Eliminace virů, viroidů a fytoplasem z infikovaných matečných rostlin je podmínkou k produkci zdravých, vegetativně množených rostlin. K ozdravení infikovaných rostlin jsou používány metody: termoterapie, izolace vrcholového meristému, chemoterapie a kryoterapie aplikovaná na vegetační vrcholy rostlin. Běžně jsou používány 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 se v posledních letech eliminaci virů u meruněk a broskvoní věnovali např. autoři Křížan a kol., 2013 nebo Polák, Hauptmanová, 2008.

V dalších zemích byla publikována řada dílčích poznatků k problematice ozdravování ovocných dřevin a révy vinné pomocí termoterapie a kultur růstových vrcholů. Poznatky získané do 80. let minulého století byly shrnuty v knižní publikaci Németh (1986). V posledních letech vzrůstá zájem výzkumu o ozdravování ovocných kultur i v rozvojových zemích, např. v Indii (Singh, 2006; Elibuyuk, 2006). V roce 2013 byla vytvořena Metodika ozdravování rostlin odrůd meruňky, broskvoně a slivoně pomocí chemoterapie v podmínkách in vitro pomocí ribavirinu a termoterapie kolektivem autorů ZF MENDELU a VÚRV v.v.i. Praha-Ruzyně.

Protože bylo v předešlé metodice prokázáno ekonomicky výhodnější použití chemoterapie, byl v práci, které předcházela vzniku této metodiky, zkoumán vliv různých látek antivirotické povahy na eliminaci virů u meruněk a broskvoní. Kromě ribavirinu, který je pro eliminaci rostlinných virů poměrně běžně využíván, patří k antivirotikům, která byla v rostlinolékařství zkoumána, např. DHT (Sanjeev a kol., 2007), acyclovir (Weiland a kol., 2004; Navacchi, 2005), amantadin (Horst and Cohen, 1980; Phillips, 1990), zidovudin (Sanjeev a kol., 2007).

2. CÍL METODIKY

Cílem předkládané „Metodiky eliminace virů vyskytujících se na meruňce a broskvoni s využitím chemoterapie *in vitro*“ je zveřejnit metodický postup, podle kterého je možno odrůdy meruňky a broskvoně ozdravit od virových patogenů s využitím v rostlinolékařství dosud méně běžných antivirotik a namnožit v laboratorních podmínkách. Dalším cílem je shromáždění dostupné informace týkajících se eliminace virových patogenů u rostlin s důrazem na aktuální výzkum a doporučení postupu, který je při ozdravování odrůd pěstovaných v České republice účinný.

3. METODICKÝ POSTUP ELIMINACE VIRŮ METODOU CHEMOTERAPIE

Vybavení laboratoře a reagentie potřebné pro *in vitro* kultivaci rostlin a chemoterapii

Vybavení

Autokláv, aseptické boxy, horkovzdušný sterilizátor, automatický dávkovač médií, sterilizátory nástrojů do boxů, myčka laboratorního skla, demineralizační soustava na úpravu vody, binokulární zoom-mikroskopy Krüss, elektromagnetická míchadla se záhřevem, pH-metr, kultivační místnost s řízenou klimatizací.

ELISA laboratoř (poloautomatický homogenizér Homex, promývačka mikrotitračních destiček s 16-ti kanálovou hlavou, inkubátor, horkovzdušný sterilizátor, absorbanční reader, inkubátor, chladnička a vodní lázeň.

Biotechnologická laboratoř (termocyklery, elektroforézy, sterilní box- BIO –II A Telstar, centrifuga, hlubokomrazicí box (-80°C), vodní lázně, třepací vodní lázeň, mrazicí box (-20 °C), fluorometr atd.).

Množárenské „garden“ stoly se spodním vytápěním určenými pro převody rostlin do nesterilních podmínek, skleníková plocha pro dopěstování rostlin.

Materiál

Laboratorní sklo, pěstební kontejnery, pěstební rašelinové substráty, hnojiva (makro a mikroprvky), skalpely, pinzety, očkovací jehly

Chemikálie pro *in vitro* kultivaci

NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5$

H_2O , H_3BO_3 , KI, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, sacharóza, agar (B&V agar S 1000, Itálie),

karagenan, BAP, GA_3 , NAA, thiamin, kyselina nikotinová, glycin, pyridoxin, myo-inositol,

HgCl_2 , NaClO, etanol, denaturovaný etanol, NaOH, KOH, širokospektrální antibiotikum ProClin

200 (Sigma-Aldrich, USA), komerčně připravená média Murashige a Skoog (1962) a DKW/Juglans médium (Duchefa, Biochemie, Nizozemsko), ribavirin, acyclovir

Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky jsou připravovány pro usnadnění postupu přípravy média. Přípravou jednotlivých roztoků je zároveň předcházeno vzájemnému vysrážení některých solí, což by mohlo blokovat příjem živin rostlinami. Jednotlivé chemikálie jsou rozpouštěny samostatně v destilované vodě (případně jiném médiu) a po jejich úplném rozpuštění jsou dílčí roztoky smíchány a do požadovaného objemu doplněny destilovanou vodou.

K přípravě kultivačního média použijeme následující zásobní roztoky:

Vitamíny pro MS médium

Roztok je připraven 25krát koncentrovaný (tj. na 25 l média). K přípravě je použita 250 ml odměrná baňka. Je naváženo: 10 mg thiaminu, 50 mg pyridoxinu; 50 mg kyseliny nikotinové a 200 mg glycinu. Pro přípravu 1 l média je dávkováno 10 ml roztoku vitamínů.

Vitamíny pro QL médium

Roztok je připraven 50krát koncentrovaný (tj. na 50 l média). K přípravě je použita 250 ml odměrná baňka. Je naváženo: 50 mg thiaminu, 25 mg pyridoxinu, 500 mg kyseliny askorbové, 25 mg kyseliny nikotinové, 100 mg glycinu, 500 mg kyseliny citronové.

Roztoky růstových regulátorů

Roztoky jsou připravovány do 50 ml odměrných baněk. Koncentrace roztoků BA a IBA je $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. V případě kyseliny NAA připravíme roztok o koncentraci $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Růstové regulátory jsou napřed rozpuštěny v malém množství 5% NaOH a doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem.

Všechny zásobní roztoky jsou skladovány v temnu v chladničce při teplotě $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Roztoky vitamínů a roztoky regulátorů růstu je možno skladovat maximálně 2 měsíce. Potom je nutno připravit roztoky čerstvé.

Příprava kultivačních médií

Médium pro založení primárních kultur

V destilované vodě je nejprve rozvařen agar (Plantagar S 1000, B&V srl, Parma, Itálie) v množství 6000 mg na litr média. Pro přípravu MS média je použito směsi Murashige&Skoog medium (Duchefa Biochemie, Nizozemsko) v množství 4405,19 mg.l⁻¹, dále přidána sacharóza (30000 mg na litr média), myo-inozitol (100 mg), růstové regulátory: 0,5 mg.l⁻¹ BA, 0,01 mg.l⁻¹ NAA a 0,5 mg.l⁻¹ GA3, a dále 1 ml širokospektrálního antibiotika (ProClin 200, Sigma Aldrich, USA). Nakonec je médium doplněno do jednoho litru destilovanou vodou a upraveno na pH 5,7. Takto připravené médium je dávkováno do širokhrdlých zkumavek, uzavřeno víčkem a autoklávováno.

Médium pro multiplikaci

Pro multiplikace broskvoní a meruněk byla vybrána následující média:

a) MS (1962) medium + 6000 mg.l⁻¹ agar + 13000 mg.l⁻¹ sacharóza + 11000 mg.l⁻¹ sorbitol + 4000 mg.l⁻¹ K₂SO₄ + 500 mg.l⁻¹ myo-inozitol + Jacquiot (1950) vitamíny + 0,75 mg.l⁻¹ BA ribozid; pH 5,7

b) DKW/Juglans medium + 6000 mg.l⁻¹ agar + 30000 mg.l⁻¹ sacharóza + 500 mg.l⁻¹ myo-inozitol + 0,6 mg.l⁻¹ BA + 0,01 mg.l⁻¹ IBA; pH 5,7

c) Quoirin a Lepoivre (1977) medium + 5500 mg.l⁻¹ agar + 30000 mg.l⁻¹ sacharóza + 100 mg.l⁻¹ myoinositol + MS (1962) mikroelementy + 0,4 mg.l⁻¹ BA + 0,01 mg.l⁻¹ NAA; pH 6,3.

d) Marino a kol. (1991) medium + 5500 mg.l⁻¹ agar + 40000 mg.l⁻¹ sorbitol + 100 mg.l⁻¹ myoinositol + 1 mg.l⁻¹ BA; pH 5,7

Pro kultivaci a multiplikaci rostlin bylo nejvhodnější použití média Quoirin, Lepoivre (1977), které je dále použito jako základní médium pro aplikaci chemoterapie.

Příprava média Quoirin a Lepoivre (1977)

V destilované vodě je nejprve rozvařen agar (Plantagar S 1000, B&V srl, Parma, Itálie) v množství 6000 mg na litr média. V destilované vodě je rozpuštěna sacharóza, vitamíny, myo-inozitol a růstové regulátory a komerční základní směs média Quoirin, Lepoivre (1977) (Duchefa, Biochemie, Nizozemsko). Nakonec je médium doplněno do jednoho litru destilovanou vodou a upraveno na pH 6,3. Takto připravené médium je dávkováno do kultivačních nádob, uzavřeno víčkem a autoklávováno.

Médium pro chemoterapii

Médium je připraveno stejným způsobem jako Quoirin a Lepoivre (1977), ale není dávkováno do kultivačních nádob, sterilizace probíhá v Erlenmeyerově nádobě. Po autoklávování je médium ve flowboxu schlazeno na teplotu nižší než 60 °C a pomocí sterilních filtrů s velikostí póru 0,2 µm je do média přidáno antivirotikum pro chemoterapii. Po smíchání směsi je médium dávkováno do širokohrdlých zkumavek, které byly (víčkem uzavřeny) sterilizovány v autoklávu.

Médium pro kořenění rostlin *in vitro*

Meruňky (Z1)

V destilované vodě je nejprve rozvařen agar (Plantagar S 1000, B&V srl, Parma, Itálie) v množství 5000 mg na litr média. V destilované vodě je rozpuštěno 20000 mg sacharózy, 100 mg.l⁻¹ myo-inozitolu a růstové regulátory (IBA 0,75 mg.l⁻¹), a poloviční dávka komerční základní směs média MS (1962) (Duchefa, Biochemie, Nizozemsko). Nakonec je médium doplněno do jednoho litru destilovanou vodou a upraveno na pH 5,7. Takto připravené médium je dávkováno do kultivačních nádob, uzavřeno víčkem a autoklávováno.

Broskvoně (Z2)

V destilované vodě je nejprve rozvařen agar (Plantagar S 1000, B&V srl, Parma, Itálie) v množství 5500 mg na litr média. V destilované vodě je rozpuštěno 20000 mg sacharózy, vitamíny, 500 mg.l⁻¹ myo-inozitolu a růstové regulátory (IBA 1,2 mg.l⁻¹), dále 80 mg.l⁻¹ phloroglucinolu, 50 mg.l⁻¹ aktivního uhlí a komerční základní směs média MS (1962) (Duchefa, Biochemie, Nizozemsko). Nakonec je médium doplněno do jednoho litru destilovanou vodou a upraveno na pH 6,0. Takto připravené médium je dávkováno do kultivačních nádob, uzavřeno víčkem a autoklávováno.

Založení primárních kultur

K založení kultury je nejvhodnější odběr letorostů v poslední květnové až první červencové dekádě. Pro úspěšné založení kultury je důležitý odběr výhonů v období vegetativního růstu. V pozdějších termínech je založení kultury méně úspěšné z důvodu poklesu růstové aktivity a

nástupu dřevin do dormantního stavu, ale také díky většímu výskytu mikrobiálních infekcí. Z hlediska udržení turgoru je nejvhodnější doba k odběru brzy ráno.

Pro založení primární kultury jsou odebírány bylinné, aktivně rostoucí letorosty, dlouhé 80 – 300 mm. Při sběru materiálu musí být zahradnické nůžky před odběrem letorostů z nové rostliny vždy dezinfikovány, aby se zabránilo případnému přenosu endogenních infekcí. Výhony musí být řádně označeny čísly jednotlivých rostlin, aby nebyly zaměněny jednotlivé odrůdy a rostliny.

Výhony je nutno zbavit listů kvůli zavadání (ponecháváme pouze cca. 10 mm dlouhé řapíky). Před vlastní dezinfekcí jsou letorosty nastříhány na jedno- až dvou-nodální segmenty. Segmenty jsou nejprve ošetřeny v teplé vodě se smáčedlem (např. běžný detergent používaný v domácnosti) a následně jsou povrchově dezinfikovány 0,2% vodným roztokem chloridu rtuťnatého (HgCl_2) po dobu 5 minut. Není-li možné desinfekci provádět ihned, skladujeme odebrané výhony krátkodobě při teplotě 4 °C.

Následná manipulace probíhá ve sterilních podmínkách flowboxu. Segmenty jsou po vystavení desinfekčního činidla 3 krát (po deseti minutách za neustálého pohybu) oplachovány sterilní destilovanou vodou z důvodu odstranění zbytků činidla. Řezné plochy segmentů jsou následně upraveny odstraněním přibližně 2 mm koncových částí řezných ploch. Řapík je rovněž zakrácen. Takto ošetřené segmenty jsou umístěny do zkumavek s připraveným kultivačním médiem. Nodální explantáty do živného média zapichujeme, avšak úžlabní meristém krytý řapíkem zůstane nad povrchem média. Pro primární kultury je použito modifikované MS médium.

Kultivační podmínky

Celá kultivace rostlin probíhá při teplotě $21 \pm 1^\circ \text{C}$ a fotoperiodě 16 hodin světlo/8 hodin tma. K osvětlení jsou použity zářivkové trubice s intenzitou $20,25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Proces chemoterapie

Mladé rostliny vzniklé multiplikací v podmínkách *in vitro* jsou vystaveny procesu chemoterapie. Médium s antivirotiky je připravováno do širokohrdlých zkumavek, kde jsou jednotlivé rostliny pasážovány. Z látek antivirotické povahy je opakovaně ověřen účinek nejčastěji používaného

antivirotika ribavirin, zejména je ovšem potvrzen, a pro eliminaci virů u odrůd meruňky a broskovně doporučen, acyclovir.

Acyclovir je na světě nejrozšířenější předepisovaný antivirotický lék patřící do skupiny syntetických nukleosidových analogů (Larsen, 2015). Jedná se o inhibitor virové DNA polymerázy (Gnann a kol., 1983). Byl objeven v sedmdesátých letech 20. století a poprvé byl předepsán v roce 1983. Základem pro syntézu acycloviru byla mořská houba *Cryptotethya crypta* (Laport a kol., 2009). Acyclovir je primárně používán pro léčbu herpes simplex. Je prodáván pod obchodními názvy např. Zovirax, Zoral, Acivir (Larsen, 2015). Inhibiční efekt acycloviru na rostlinné viry byl potvrzen např. autory Caner a kol. (1985), Ram (2005), Sanjeev a kol. (2007).

Antivirotika jsou aplikována do média po procesu autoklávování ve sterilním prostředí flowboxu. Rostliny doporučujeme na tomto médiu kultivovat tři týdny při koncentraci acycloviru 25 mg.l^{-1} nebo případně kultivaci dvakrát tři týdny při koncentraci 15 mg.l^{-1} . Delší doba působení není z důvodu možného poškození rostlin antivirotikem doporučována. Ověřeno bylo také snížení koncentrace ribavirinu na 10 mg.l^{-1} při době působení 2 krát tři týdny (působení po dobu dvou pasážování). Použití vyšších koncentrací antivirotik je neekonomické a je zde vyšší pravděpodobnost poškození rostlinných pletiv, stejně jako u jejich dlouhodobého působení.

Zakořeňování a převod rostlin do nesterilních podmínek

Rostliny určené pro převod do nesterilních podmínek jsou nejprve dva týdny kultivovány na médiu Z1 (meruňky) nebo Z2 (broskvoně). Následuje převod rostlin do rašelinového substrátu s přídavkem agriperlitu (v poměru 5:1). Je důležité, aby byly mladé rostliny z *in vitro* podmínek důkladně zbaveny zbytků kultivačního média v nádobě s vodou. Zároveň nedochází k zasychání mladých rostlin. Rostliny jsou vysazovány do multiplat s velikostí buněk 3,5 x 4,0 cm. Multiplata jsou umístěna na množárenské stoly se spodním vytápěním ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), rostliny jsou nakryty fólií a je udržována vysoká vzdušná vlhkost. Po jednom týdnu je nutné větrat a to odkrytím fólie několikrát denně. Po třech týdnech je provedeno první hnojení, které dále následuje v intervalech jednou týdně. Pro hnojení je doporučeno univerzální hnojivo s mikroprvky vhodné pro přihnojování na začátku vegetace a v období intenzivního růstu. Po měsíci jsou rostliny umístěny

z množárny do skleníku a poté do síťovníku. Při velikosti převedených a aklimatizovaných rostlin 20 cm jsou rostliny hrnkovány do kontejnerů s použitím substrátu KTS 2 a neustále udržovány v technické izolaci. Rostliny jsou další tři roky testovány na přítomnost virových patogenů.

Pro ošetření rostlin proti škůdcům a houbovým patogenům je doporučeno použít komerčně dostupné přípravky.

Testování zdravotního stavu

Testování zdravotního stavu rostlin meruňky a broskvoně je doporučeno provádět dvěma metodami. Rostliny kultivované v podmínkách *in vitro* jsou testovány molekulární metodou RT-PCR, převedené rostliny v technické izolaci potom metodou DAS-ELISA.

Detekce metodou DAS-ELISA je provedeno podle metodiky firmy Bioreba (Švýcarsko). Mladé listové čepele meruněk a broskvoní (navážka min. 0,25 g) jsou homogenizovány poloautomatickým homogenizérem a k testování jsou použity sady testovacích sér (IgG + konjugát) pro jednotlivé viry a lyofilizované pozitivní a negativní kontroly od firmy Bioreba. Absorbance je měřena při 405 nm.

První krok detekce virových patogenů metodou RT-PCR byla izolace celkové RNA z rostlinného materiálu pomocí kitu Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich®). RNA je následně přepsána do cDNA případně skladována při teplotě - 80 °C. K základnímu mixu 12,5 µl DEPC vody a 0,25 g náhodného primeru jsou přidány 2 µl RNA, tento mix je denaturován při 95 °C po dobu pěti minut. Následně je přidán 1x RT pufr (Fermentas), 10mM dNTP (Invitek) a 200U M-MLV-RT (Fermentas). Vzorky jsou inkubovány při teplotě 42 °C po dobu šedesáti minut.

Detekce virů ACLSV, ApMV, PPV, PDV, PNRSV a vnitřní pozitivní kontroly MDH (detekce tzv. housekeeping genu pro malát dehydrogenázu) pomocí PCR: Reakční PCR mix je připraven z 10,5 µl vody (HPLC čistota), 4 µl 5× Colorless GoTaq® Flexi pufru pro polymerázu (Promega, USA), 1,2 µl 25mM MgCl₂ (Promega, USA), 0,2 µl 10µM dNTP (Invitek, Germany), 0,2 µl GoTaq® G2 Flexi DNA polymerázy (5u/µl) (Promega, USA), 1 µl každého primeru (10µM), 0,7 µl Flexi 5× Green GoTaq® Flexi pufr (Promega, USA) a 2 µl DNA templátu.

Celkový objem reakční směsi činí 20,8 μ l. Teplotní režim PCR je následující: denaturace 3 min při 94 °C, následuje 40 cyklů 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72°C 45 s a na závěr 72°C 7 min. PCR produkty jsou následně elektroforeticky separovány na 1,2% agarózovém gelu a vizualizovány na UV transiluminátou.

4. ZÁVĚR

Výsledky našeho výzkumu prokázaly, že chemoterapie je úspěšná metoda ozdravování rostlin od virových patogenů. Při použitých koncentracích ribavirinu ani acycloviru nebyly na rostlinách pozorovány příznaky poškození nebo toxicity. Jak vyplývá z výsledků, pro ozdravení odrůd meruňky a broskvoně od ACLSV, PPV, PDV a PNRSV lze doporučit koncentraci acycloviru 25 mg.l⁻¹ po dobu tří týdnů nebo případně kultivaci dvakrát tři týdny při koncentraci 15 mg.l⁻¹.

Z malého počtu prací, které se týkají chemoterapie zástupců rodu *Prunus* L. potvrzují naše výsledky tvrzení autorů Jakab-Ilyefalvi a Pamfil (2011), kteří doporučují koncentraci ribavirinu 30 mg.l⁻¹ k eliminaci PPV u slivoní.

Toxicitu a špatnou regeneraci explantátů různých druhů rostlin po aplikaci vyšších koncentrací antivirotik v kultivačních médiích sledovali také např. Vescan a kol. (2011) u švestky po aplikaci ribavirinu (50 nebo 100 mg.l⁻¹), Stevenson a Monette (1983) při koncentraci ribavirinu 40-50 mg.l⁻¹ u révy, Danci a kol. (2012) u bramboru při koncentracích nad 40 mg.l⁻¹. Toxicitu ribavirinu u révy v koncentraci 120 μmol.l⁻¹ (přibližně 30 mg.l⁻¹) potvrzuje také Guta a kol. (2011). Naopak při koncentraci do 30 mg.l⁻¹ nebylo poškození pozorováno. Úspěšná eliminace virových patogenů česneku bez známek poškození byla sledována při použití acycloviru v koncentraci 25 mg.l⁻¹ (Kudělková, nepublikováno). Při použití acycloviru v koncentraci nad 30 mg.l⁻¹ byl sledován inhibiční efekt a odumírání také u rostlin chryzantém (Ram a kol., 2005).

5. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ A EKONOMICKÉ ASPEKTY

Originalita metodiky dále spočívá v zaměření na moderní biotechnologické postupy ozdravování využívající jako výchozí materiál in vitro kultury. In vitro kultury je možno množit v průběhu celého roku bez ohledu na vegetační období. Takto namnožený materiál lze podrobit chemoterapii v kterémkoliv ročním období. Množení rostlin v in vitro podmínkách (mikropropagace) je vhodné k množení právě ozdraveného materiálu, protože při dodržení správného postupu nemůže během množení dojít k opětovnému nakažení patogeny. Originální je potvrzení možnosti ozdravení domácích odrůd meruňky a broskvoně pomocí chemoterapie samotné, tedy bez kombinace s termoterapií. Při konvenční metodě termoterapie in vivo lze ozdravování rostlin odrůd meruňky v kontejnerech provádět pouze na začátku vegetace (leden až květen). Ozdravování rostlin odrůd broskvoně bylo dosud problematické a termoterapie nepřinášela výsledky. Při použití postupu doporučeného v této metodice, lze ozdravit s úspěchem oba tyto druhy teplomilných peckovin pomocí použití jedné koncentrace ribavirinu nebo acycloviru, za současného použití kultivačních médií specifických pro jednotlivé druhy rostlin.

Popsaná metoda ozdravování pomocí ribavirinu nebo acycloviru má vysokou ekonomickou efektivitu a přínos pro české ovocnářství. Chemoterapie pomocí těchto látek zpřístupňuje ozdravování pracovištím, kde dříve ozdravování rostlin nebylo možné. Tuto metodu lze používat všude tam, kde je pracováno s in vitro kulturami, a to bez požadavků na nákladná zařízení jako je termobox s postupným snižováním/zvyšováním teploty a chlazením kontejnerů s kořeny rostlin. Rovněž vysoké náklady na energii během termoterapie jsou ušetřeny. Ribavirin nebo acyclovir jsou běžně dostupné chemikálie a 1g této látky lze pořídit v současné době za 2 800 Kč včetně DPH, což při dávkování 20 mg.l⁻¹ a méně metodu výrazně neprodražuje. Chemoterapie je rovněž metodou šetrnější k ozdravovaným rostlinám. Při ozdravování rostlin broskvoně metodou chemoterapie přežívá proces ozdravování průměrně 84 % rostlin. Při použití termoterapie bylo procento přežití u broskvoní menší než 16 %. Rostliny po chemoterapii mají prokazatelně větší multiplikační koeficient, než po absolvování termoterapie nebo kombinace chemoterapie s termoterapií. Všude tam, kde je termoterapie používána, je provázena problémy s následným množением ozdravovaných rostlin. Ve sterilním prostředí kultivačních nádob je minimalizováno riziko infekce houbovými nebo bakteriálními chorobami a je vyloučeno napadení živočišnými škůdci. Ve fázi množení je téměř vyloučeno riziko reinfekce již ozdraveného materiálu.

Ekonomický přínos je spatřován i v menším množství pracovních operací, čímž se snižuje riziko záměny kultur a v důležitosti množení ozdraveného materiálu bez rizika reinfekce. Při použití chemoterapie lze při ozdravování jednoho klonu ušetřit 9 000 Kč ročně, při srovnání s klasickou termoterapií.

6. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika eliminace virů vyskytujících se na meruňce a broskvoni s využitím chemoterapie *in vitro*, je určena zejména pracovištím, kde probíhá udržování genových zdrojů, MZe, ÚKZÚZ, dále pěstitelům a šlechtitelům odrůd a dalším zájemcům o zdravé rostliny. Metodika bude využívána k ozdravení materiálu od virových patogenů zejména českých genotypů, a to jak pro jejich další bezpečné uchovávání (v technických izolacích), tak pro rychlé namnožení zdravého množitelského materiálu, či materiálu ve fázi šlechtění. Postupy popsané v metodice mohou být rovněž při dalším výzkumu experimentálně aplikovány na další peckoviny případně jiné rostlinné druhy.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- CANER, J., DE FAZIO, G., ALEXANDRE, M., A., V., KUDAMATSU, M., AVICENTE, M. 1985. Acao dos quimicoterapicos antivirais no control do virus do mosaico dourado do feijoeiro, em Phaseolus lunatus. Arg. Inst. Biol. 52, 1 – 4, 39-43.
- DANCI, M., DANCI, O., MIKE, L., BACIU, A., OLARU, D., PETOLESCU, C., BERBENTEA F., DAVID I. 2012. Production of virus free potato plantlets. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 16(1): 232 – 238.
- DRIVER, J. A., KUNIYUKI, A., H. 1984. In vitro propagation of Paradox walnut Juglans hindsii X Juglans regia rootstock. HortScience. 19: 507-509.
- ELIBUYUK, I., O. 2006. Investigation of Plum pox virus in different tissues of Apricot and plum trees. Plant Pathol.J. 5: 208-211.
- EL-DOUGDOUG, K., A., OSMAN, M., E., ABDELKADER, H., S., DAWOUD, R., A. A ELBAZ, R., M. 2010. Elimination of hop stunt viroid (HSVd) from infected peach and pear plants using cold therapy and chemotherapy. Australian Journal of Basic and Applied science. (4) 54-60. ISSN 19918178.
- FRONKOVÁ H. 2015. Metody eliminace virů u meruněk a broskvoní. Diplomová práce. Mendelova univerzita. Zahradnická fakulta, Mendeleum - ústav genetiky.
- GNANN, J., W., BARTON, N., H. A WHITLEY, R., J. 1983. Acyclovir: mechanism of action, pharmacokinetics, safety and clinical applications. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. 3(5), 275 – 283. ISSN: 1875-9114
- GUTA, I., C., A BUCIUMEANU, E., C. 2011. Grapevine chemotherapy for elimination of multiple virus infection. Romanian Biotechnological Letters. 16(5): 6535 – 3539. ISSN 1224 - 5984
- HORST R. K., COHEN D. 1980. Amantadine supplemented tissue culture medium: A method for obtaining chrysanthemums free of Chrysanthemum stunt viroid. Acta Hort. 110: 315-319.
- JAKAB-ILYEFALVI, Z. A PAMFILL, D. 2011. Results regarding the classical and modern pathogen elimination techniques of plum pox virus at plum (Prunus Domestica, L.). Annals of the Romanian Society for Cell Biology. 16, 292-305. ISSN 15836258.
- KŘIŽAN B., ONDRUŠIKOVÁ E., HOLLEINOVÁ V., KUDĚLKOVÁ M., HERRMANNOVÁ E., MATEJKOVÁ D., POLÁK J. 2013. Metodika ozdravování rostlin odrůd meruňky,

- broskvoně a slivoně pomocí chemoterapie v podmínkách in vitro. V Brně: Mendelova univerzita. ISBN 978-80-7375-837-0.
- LAPORT, M., S., SANTOS, O., C., MURICY, G. 2009. Marine sponges: Potential sources of new antimicrobial drugs. *Current pharmaceutical biotechnology* 10(1), 86 – 105. ISSN 1389-2010.
- LARSEN, F. 2015. Acyclovir. *DermNet NZ*. [online]. © 2015 [cit. 2015-06-24]. Dostupné z: <https://translate.google.com/#en/cs/bind>.
- LAYNE, D. R., BASSI, D. 2008. *The peach: botany, production and uses*. Cambridge, MA: CABI. ISBN 978-184-5933-869.
- LOEBENSTEIN, KATIS. 2015. *Advance in VIRUS RESEARCH: Control of Plant Virus Diseases: Vegetatively-Propagated Crops*. London: Academic Press. ISBN 978-0-12-802762-2.
- MARINO, G., MAGNANINI, E., BATTISTINI, S. AND RIGHETTI, B. 1991. Effect of hormones and main carbon energy sources on in vitro propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cvs. 'San Castrese' and 'Portici'. *Acta Hort.* 293, 355-362
- MATTHEWS, R., E., F. 1953. Chemotherapy and plant viruses. *J. gen. Microbiol.* 8,277-288. ISSN 1017-7825.
- MURASHIGE, T. A SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- NAVACCHI O., ZUCCHERELLI G., ZUCCHERELLI S. 2005. In Vitro multiplication of Artichoke and virus elimination by thermotherapy and chemotherapy. *Acta Hort.* 681: 397-402.
- NÉMETH, M. 1986 *Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees*. Akadémiai Kiadó, Budapest.135-139.
- PHILLIPS S. 1990. The efficacy of four antiviral compounds in the elimination of narcissus viruses during meristem tip culture. *Acta Hort.* 266: 531-538.
- POLÁK, J. 2010. *Šarka peckovin - současný stav problematiky v České republice a v Evropě*: Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 978-80-7427-039-0.
- POLÁK, J., HAUPTMANOVÁ, A. (2008). *Metodika ozdravování odrůd slivoně a meruňky infikovaných virem šarky švestky metodou termoterapie in vivo a chemoterapie in vitro*

kultur. Uplatněná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. ISBN: 978-80-87011-81-2: 1-15.

PUPOLA, N., LEPSE, L., KALE, A. A MOROČKO-BIČEVSKA, I. 2009. Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture. Sodininkystėir Daržininkystė. 2009. 28(3):165-172.

QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P., H. 1977. Improved media for in vitro culture of Prunus sp. In: Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes 78: 437-442.

RAM, R., VERMA, N., SINGH, A., K., SINGH, L., HALLAN, V. A ZAIDI, A., A. 2005. Indexing and production of virus-free Chrysanthemums. Biol. Pl. 49, 49-152. ISSN: 1573-8264.

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

SANJEEV S., BALWINDER S., GITA R., AIJAZ ASGHAR Z., VIPIN H., AVINASH N., GURDEEP SINGH V. 2007. Production of Indian citrus ringspot virus free plants of Kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. J. Cent. Eur. Agric. 8: 1-8.

SINGH, B. 2006. Raising of virus free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* x *C. deliciosa*) employing tissue culture techniques. Department of botanical and environmental sciences, Guru Nanak dev university. Amritsar, India.

STEVENSON, J., H. A MONETTE, P., L. 1983. Delay of onset of leafroll symptom expression in *Vitis vinifera* "Liemberger" from ribavirin-treated in vitro cultures. Canadian Journal of Plant Science. 63: 557-560.

VESCAN, L. A., PAMFIL, D., ZAGRAI, I., BERINDEAN, I. V., CLAPA, D., A CIUZAN, O. 2011. In vitro techniques for Plum pox virus elimination from two infected Romanian plum cultivars. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies, 68: 1-2.

WEILAND, C., M., CANTOS, M., TRONCOSO, A. A PEREZ-CAMACHO, F. 2004. Regeneration of Virus-Free Plants by In Vitro Chemotherapy of Gflv (Grapevine Fanleaf Virus) Infected Explants of *Vitis vinifera* L. Cv'Zalema'. In: I. International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research 652: 463 – 466.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ METODICE PŘEDCHÁZELY

PAVELKOVÁ, R., KUDĚLKOVÁ, M., ONDRUŠIKOVÁ, E., EICHMEIER, A. 2015. Virus Elimination in Peach cv. 'Red Haven' by Chemotherapy. *Agricultural Communications*. 2015. 3(2): 16 – 20.

KUDĚLKOVÁ, M., PAVELKOVÁ, R., ONDRUŠIKOVÁ, E. 2015. Virus elimination in peach using chemotherapy. In 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants. 19. - 24. 5. 2016, Sanremo, Italy.

EICHMEIER, A., KISS, T., PEŇÁZOVÁ, E., SALAVA, J., NEČAS, T. 2016. Comparison of four techniques for Plum Pox Virus detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 123(6): 311 – 315.

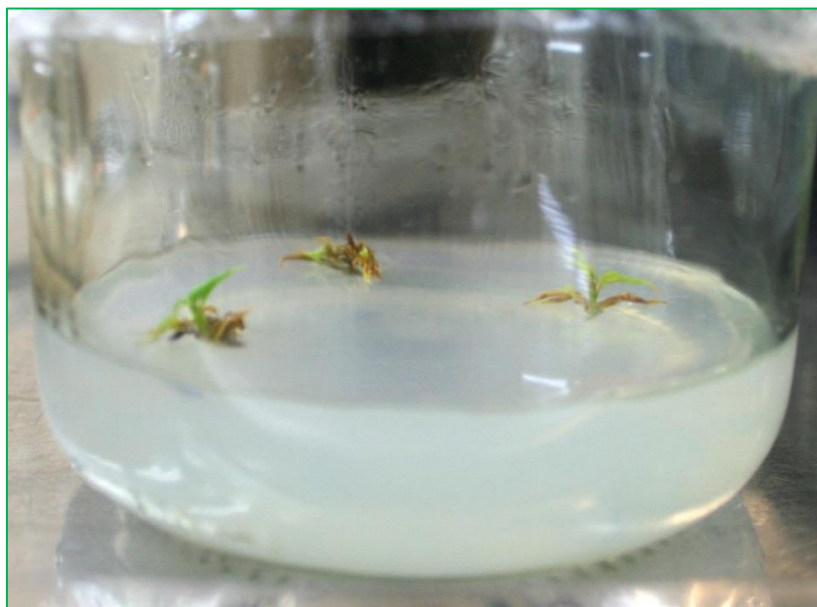
KUDĚLKOVÁ, M., ONDRUŠIKOVÁ, E., PAVELKOVÁ R., VACHŮN, M. 2016. The issues of apricot (*Prunus armeniaca* L.) micropropagation – v době tisku metodiky manuskript po „minor revision“ odeslán do *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*

9. PŘÍLOHY

Kultivace meruněk v podmínkách *in vitro* (Obr. 1 – 2)

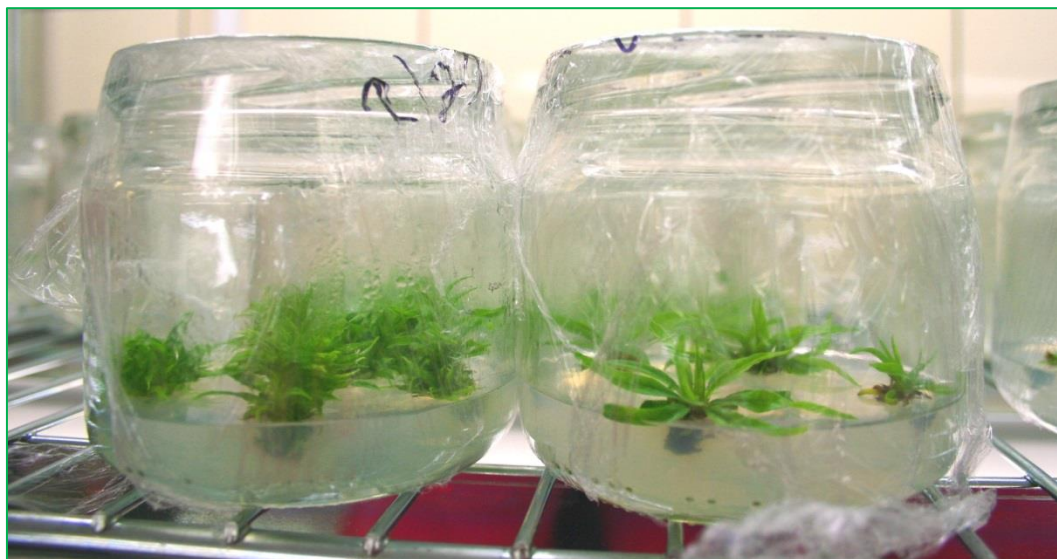


Obr. 1 Kultivace rostlin meruňky genotypu 'LE 1120'



Obr. 2 Kultivace rostlin meruňky genotypu 'LE 2927'

Kultivace broskvoní v podmínkách *in vitro* (Obr. 3 – 4)



Obr. 3 Kultivace rostlin broskvoně odrůdy 'Royal Jim'



Obr. 4 Kultivace rostlin broskvoně odrůdy 'Ufo3'

Laboratoř pro kultivaci rostlin *in vitro*



Obr. 5 Kultivační místnost

Poznámky

Název: Metodika eliminace virů vyskytujících se na meruňce a broskvoni s využitím chemoterapie in vitro

Autoři: Eva Ondrušiková, Martina Kudělková, Radka Pavelková, Jana Moudrá,
Břetislav Křížan, Věra Holleinová

Vydala: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

První vydání, 2016

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Počet stran: 28

Náklad: 200 ks

ISBN: 978-80-7509-439-1