

Certifikovaná metodika ozdravování rostlin ovocných druhů od fytoplazem pomocí biotechnologických metod chemoterapie a *in vitro* kultur



Jiří Sedlák
Matěj Semerák
Martina Rejlová

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOČNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

**VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o.**

**Certifikovaná metodika ozdravování rostlin
ovocných druhů od fytoplazem pomocí
biotechnologických metod chemoterapie
a *in vitro* kultur**

Jiří Sedlák, Matěj Semerák a Martina Rejlová



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2023

Autorský kolektiv:

Ing. Jiří Sedlák, Ph.D.; Mgr. Matěj Semerák; Ing. Martina Rejlová

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

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu:

jiri.sedlak@vsuo.cz

Autoři fotografií a obrázkových schémat:

kolektiv autorů

Odborný oponent:

prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

Oponent ze státní správy:

RNDr. Anna Kryštofová, Ph.D.

Název:

Certifikovaná metodika ozdravování rostlin ovocných druhů od fytoplazem pomocí biotechnologických metod chemoterapie a *in vitro* kultur

Dedikace:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) QK21020395: Produkce fytoplazem prostých školkařských výpěstků a jejich ochrana před reinfekcí

© VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

ISBN 978-80-87030-93-6 (online; pdf)

<https://doi.org/10.60615/cez-m-kk60>



OBSAH

1.	Úvod	4
2.	Cíl metodiky	5
3.	Vlastní popis metodiky	5
3.1	Diagnostické postupy	5
3.1.1	Rostlinný materiál a extrakce DNA	5
3.1.2	Diagnostika fytoplazem.....	6
3.2	Ozdravování v kulturách <i>in vitro</i>	6
3.2.1	Příprava živných médií.....	7
3.2.2	Zakládání výchozích <i>in vitro</i> kultur, multiplikace	7
3.2.3	Vlastní ozdravování.....	9
3.2.3.1	<i>Chemoterapie</i>	10
3.2.3.2	<i>Kryoterapie</i>	12
3.3	Zakořenění ozdravených rostlin a převod do nesterilních podmínek.....	14
3.3.1	Indukce kořenění <i>in vitro</i>	14
3.3.2	Převod <i>ex vitro</i>	14
3.4	Interpretace dosažených výsledků ozdravování.....	15
3.4.1	Preparace explantátů a regenerace v <i>in vitro</i> kultuře	15
3.4.2	<i>Chemoterapie</i>	15
3.4.3	<i>Kryoterapie</i>	16
4.	Srovnání novosti postupů	16
5.	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	17
6.	Ekonomické aspekty	18
7.	Seznam použité související literatury	18
8.	Seznam publikací, které předcházely metodice	19

1. ÚVOD

Fytoplazmy patří mezi nejvýznamnější patogeny ovocných druhů. Fytoplazmová onemocnění každoročně způsobují ve školkařském sektoru a u trvalých kultur ovocných dřevin nezanedbatelné hospodářské škody. '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Ca. P. pyri*' a '*Ca. P. prunorum*' jsou původci proliferační choroby jabloně (apple proliferation, AP), chřadnutí hrušně (pear decline, PD) a evropské žloutenky peckovin (European stone fruit yellows, ESFY). Dle prováděcího nařízení Komise (EU) 2019/2072, ve znění pozdějších předpisů, se řadí do skupiny regulovaných nekaranténních škodlivých organismů (RNŠO). Otázka míry škodlivosti těchto patogenních organismů je řešena také v EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). EPPO na seznamu uvedeného v A2 listu doporučuje svým členským zemím organismy '*Candidatus Phytoplasma mali*' a '*Candidatus Phytoplasma pyri*' regulovat jako karanténní škůdce. Patogeny se mohou vyskytovat i ve formě latentních infekcí. Podle standardů EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) mají být pravidelně testovány při certifikaci rozmnožovacích materiálů (Anonym 1999, EPPO 2023). Požadavky na zdravotní stav množitelského materiálu jsou dány v České republice zákonem č. 219/2003 sb. a navazující vyhláškou č. 96/2018 Sb. v aktuálním znění. Vyhláška o množitelských porostech a rozmnožovacím materiálu ovocných rodů a druhů a jeho uvádění do oběhu.

Fytoplazmami infikovaný materiál již nelze v polních podmínkách dodatečně ozdravit. Infekce je systémová a hospodářská škodlivost přetrvává v různé míře po celou dobu životnosti jedince v produkčním sadu nebo samozásobitelské výsadbě. Ovocné plodiny mohou být infikovány fytoplazmami i viry současně. Společné působení těchto patogenů pak snižuje výnos i kvalitu ovoce, vitalitu stromů a životnost výsadby.

Od roku 2021 je v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství ČR řešen tříletý projekt QK21020395 „Produkce fytoplazem prostých školkařských výpěstků a jejich ochrana před reinfekcí“. Projekt je řešen ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském Holovousy s.r.o. (VŠÚO) a na pracovišti Katedry buněčné biologie a genetiky při Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Hlavní cíle projektu jsou zaměřeny na stanovení výskytu latentních infekcí ve školkách, na problematiku hmyzích vektorů a jejich determinaci a na množitelské technologie omezující přenos fytoplazem.

VŠÚO se v minulém období zabýval zejména problematikou ozdravování odrůd ovocných dřevin od virových onemocnění. Metody ozdravení navržené v projektu mají za cíl získat fytoplazem prostý výchozí množitelský materiál pro systém certifikace zavedený v ČR. Moderní biotechnologické postupy ozdravování jsou zaměřeny na ozdravení vypreparováním explantátů a regeneraci v *in vitro* kultuře, *in vitro* chemoterapii a kryoterapii. Při chemoterapii v podmínkách *in vitro* bylo slibných výsledků dosaženo zejména s použitím tetracyklinových antibiotik, nicméně byly zaznamenány případy, kdy se infekce znovu projevila po přesazení explantátů na média bez antibiotik (Bertaccini 2021). Účinnost proti fytoplazmám vykazovaly i některé amfenikoly, fluorochinolony či azitromycin z rodiny makrolidů (Tanno a kol. 2018).

Mikropropagační technologie lze s úspěchem uplatnit u řady druhů rostlin z čeledi růžovitých (Mehri-Kamoun a kol. 2004, Boudabous a kol. 2010). U jaderovin, a to zejména u rodu *Malus*, je však známa značná genetická heterogenita i v rámci jednoho druhu (Naibin a kol. 2017). Různé genotypy tak mohou během množení v *in vitro* kultuře odlišně reagovat na

podmínky kultivace a složení agarových médií. Metodika se proto zaměřuje i na maximalizaci multiplikačního koeficientu, aby bylo získáno dostatečné množství výchozích rostlin s kvalitním olistěním pro ozdravovací procedury.

2. CÍL METODIKY

Certifikovaná metodika má za cíl poskytnout uživatelům *in vitro* postupy, chemoterapeutické techniky s využitím antibiotických látek a metody kryoterapie pro získání fytoplazem prostého výchozího množitelského materiálu jádrovin a peckovin. Je založena i na PCR determinaci fytoplazem. V rámci metodiky jsou popsána i vhodná kultivační média s regulátory růstu pro multiplikaci a indukci kořenů v podmínkách *in vitro* u studovaných ovocných druhů. Popsána je rovněž fytotoxicita studovaných antibiotických látek. Pro testování a ozdravování jsme vybrali tržní odrůdy a krajové odrůdy domácího původu. Předpokládáme, že získané zdravé základní rostliny budou po opakovaném testování moderními molekulárními diagnostickými metodami PCR v budoucnu zahrnuty do systému certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Použití metodiky předpokládá základní znalosti principů *in vitro* kultivace a správné laboratorní praxe v oblasti *in vitro* kultur a diagnostiky systémových rostlinných patogenů. Odborník v dané oblasti bude schopen metodiku verifikovat pro konkrétní vybavení laboratoře rostlinných explantátů a používané laboratorní reagenty.

3.1 Diagnostické postupy

Pro testování přítomnosti fytoplazem, a to jak ve výchozích rostlinách, tak v *in vitro* kulturách a ve výsledném ozdraveném materiálu převedeném *ex vitro*, je třeba zázemí molekulárně biologické laboratoře. Doporučujeme metodu PCR pro její vysokou citlivost.

3.1.1 Rostlinný materiál a extrakce DNA

Při odběru výchozích vzorků ovocných dřevin i vzorků ozdraveného materiálu převedeného *ex vitro* je třeba přihlídnout k nerovnoměrnému rozmístění a koncentraci fytoplazmy v různých částech rostliny. Doporučujeme proto odebírat výhony z různých míst v koruně stromu, a to v počtu 4–8 kusů podle velikosti stromu. Vzhledem k tomu, že se tyto patogenní bakterie vyskytují pouze v sítkovicích, využívá se pro testování přítomnosti fytoplazmy jako vstupního materiálu zpravidla lýka, ale lze použít i žilnatinu a řapík.

Při zpracování jednotlivých vzorků se používají sterilní jednorázové rukavice a sterilní jednorázová čepel skalpelu, kterou se odstraňuje kůra z výhonu a škrábe lýko. K testování přítomnosti fytoplazmy v explantátech *in vitro* slouží jako vstupní materiál část *in vitro* kultury. Homogenizace vstupního materiálu s množstvím navážky 100 mg probíhá v kapalném dusíku v třecí misce ošetřené UV zářením. Izolace DNA z lýka výhonů / z *in vitro* kultury se provádí pomocí komerčně dodávaného izolačního kitu Exgene Plant SV mini od firmy GeneAll na bázi kolon dle návodu výrobce. Pro orientační ověření kvality izolace nukleových kyselin lze čistotu a koncentraci DNA stanovit v eluátu spektrofotometricky (např. pomocí přístroje NanoDrop Lite, Thermo Scientific).

3.1.2 Diagnostika fytoplazem

Vlastní detekce DNA '*Ca. Phytoplasma*' skupiny 16SrX je založena na použití specifických primerů a sond.

'*Ca. Phytoplasma*' skupiny 16SrX (PCR amplikon o délce 158 bp):

Forward primer: GCAGCTGCGGTAATACATGG

Reverse primer: GAATTCCACTTGCCTCTATCCAA

Sonda: AGTTCAACGCTTAACGTTGTGATGCTAT

Sonda označena fluoroforem ROX (rhodamin).

Kvalita izolace DNA je ověřována detekcí přítomnosti chloroplastové 16S rDNA.

Chloroplastová 16S rDNA (PCR amplikon o délce 147 bp):

Forward primer: CGGACGGGAAGTGGTGTTC

Reverse primer: ACGCGAGCCCCTCCTCGG

Sonda: CCGTAGGCTGAGGAGCAAAAGGAGGAATC-BHQ1

Sonda označena fluoroforem FAM (fluorescein).

Výše uvedené primery a sondy jsou součástí akreditované metody multiplexní real time PCR detekce fytoplazem ovocných dřevin zavedené na pracovišti VŠÚO. Pro multiplexní real time PCR detekci se používají následující reagenty: qPCR 2x Blue Master Mix obsahující polymerázu a všechny další nezbytné PCR komponenty (Top-Bio), navržené specifické primery a sondy pro chloroplastovou DNA a fytoplazmy skupiny 16SrX, 2 µl čerstvé DNA bez úpravy koncentrací. Detekce se provádí pomocí termocykleru RotorGene Q (Qiagen). Počáteční denaturace probíhá po dobu 5 minut při teplotě 94 °C. Následuje tříkroková amplifikace s 50 cykly: denaturace při 94 °C po dobu 20 sekund, hybridizace primerů při teplotě 58 °C po dobu 20 sekund, syntéza komplementárních vláken DNA při teplotě 72 °C v délce trvání 20 sekund.

3.2 Ozdravování v kulturách *in vitro*

Nezbytným předpokladem pro provádění terapeutických zásahů je zázemí laboratoře explantátových kultur. K přípravě kultivačních médií je nutné mít k dispozici potřebné chemikálie, analytické váhy, vhodné nádoby, vybavení pro míchání roztoků (např. magnetickou míchačku), pH metr a sterilizační zařízení (např. parní autokláv). Optimální kvalitu laboratorní vody zajistí demineralizační jednotka. Jako nejvhodnější doporučujeme zařízení pracující na principu reverzní osmózy.

Pro počáteční nasazení materiálu do *in vitro* podmínek slouží sterilizační činidla (např. roztoky NaClO či HgCl₂). Kultury se zpravidla pěstují ve skleněných baňkách (např. Erlenmeyerových) v kultivační místnosti. Kultivační místnost by měla disponovat nastavitelnou teplotou a fotoperiodou. Veškerá manipulace s kulturami mimo baňku musí probíhat asepticky, v prostředí flow-boxu s laminárním prouděním přefiltrovaného vzduchu. Během práce by se nástroje měly pravidelně sterilizovat nad kahanem nebo ve speciálních laboratorních elektrických sterilizátorech, aby se minimalizovalo riziko přenosu případných povrchových kontaminací mezi kulturami v jednotlivých baňkách. Používané nástroje (skalpely, nůžky, pinzety) a laboratorní sklo (Petriho misky) by měly být předem

vysterilizovány. V zájmu snížení rizika kontaminace doporučujeme sterilizaci laboratorních potřeb tzv. suchou cestou v horkovzdušné sušárně.

3.2.1 Příprava živných médií

Pro většinu ovocných druhů z čeledi růžovité lze použít modifikované živné médium typu MS (Murashige a Skoog 1962; tabulka 1). Před vlastní terapií je třeba rostlinný materiál namnožit, a získat tak dostatečné množství postranních prýtů pro ozdravovací postupy. V této fázi je tedy nutné přidat výrazně vyšší množství cytokininů (např. 1 až 4 mg/l v případě 6-benzylaminopurinu, BAP) než auxinů (cca 0,1 mg/l v případě kyseliny indol-3-máselné). Různé druhy i odrůdy reagují na přídavek fytohormonů různě, proto je vhodné stanovit optimální poměr individuálně. Vzhledem ke genetické heterogenitě většiny ovocných druhů je potřeba optimalizovat složení médií až na úroveň odrůdy a v případě potřeby aplikovat pro stimulaci multiplikace jiný typ cytokininu (např. thidiazuron). Kromě fytohormonů lze do média nad rámec standardního výživového a fytohormonálního složení rovněž přidávat antioxidant, např. kyselinu askorbovou.

Tabulka 1: Složení výchozího média pro kultivaci *in vitro* kultur

Složka	mg/l	Složka	mg/l
KNO ₃	1900	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
NH ₄ NO ₃	1650	Myo-inositol	100
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	Glycin	2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	Pyridoxin	0,5
KH ₂ PO ₄	170	Kyselina nikotinová	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	Thiamin	0,1
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,3	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
MnSO ₄ · H ₂ O	16,9	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	Sacharóza	30000
H ₃ BO ₃	6,2	Agar *	6000–9000
KI	0,83	Kyselina askorbová	4

* množství upravíme dle doporučení výrobce či vlastních zkušeností s konkrétním typem agaru

Hodnotu pH doporučujeme upravit pomocí roztoku KOH, příp. HCl, na 5,7. Hotové médium rozléváme do baněk a zakryjeme je hliníkovou fólií nebo jiným vhodným uzávěrem, který nedegraduje při autoklavování. Následná sterilizace médií musí zajistit likvidaci všech potenciálních patogenů. Proto by měla probíhat dostatečně dlouho (min. 15 minut) a při vysoké teplotě (zpravidla 120 °C). Teplota nad bodem varu vody s sebou nese nutnost zvýšeného tlaku během sterilizace.

3.2.2 Zakládání výchozích *in vitro* kultur, multiplikace

Ideálním obdobím k odběru materiálu pro založení explantátové kultury ovocných dřevin je konec zimy či předjaří. Odebíráme výhony s dobře vyvinutými vegetativními pupeny a následně je opláchneme pod tekoucí vodou, abychom z jejich povrchu smyli část bakteriální a houbové mikroflóry. Výhony, seříznuté ve spodní části šikmým řezem, necháme

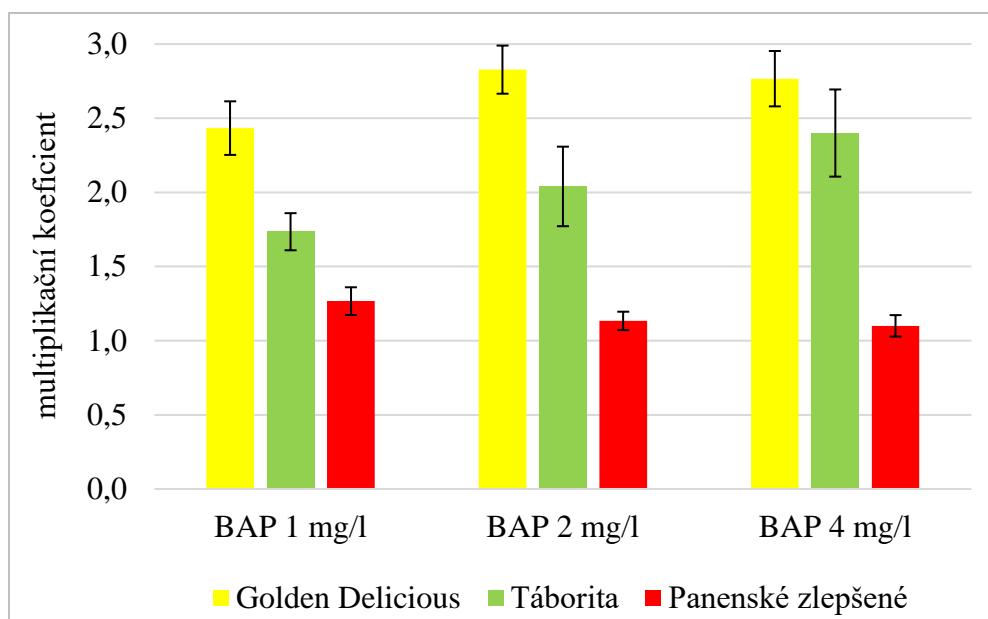
v laboratorních podmínkách 2 až 3 týdny narašit ve vodě. Neprobíhá-li rašení uspokojivě, doporučujeme do vody pro stimulaci prorůstání přidat cca 1 mg/l kyseliny giberelové.

Narašené pupeny vypreparujeme skalpelem, přičemž na jejich bázi ponecháváme několikamilimetrový zbytek dřevní hmoty s vodivými pletivy. Odstraníme případné krycí šupiny, a pupeny ponoříme do sterilizačního roztoku. Doporučujeme 0,15% HgCl₂ po dobu 1 minuty, případně lze předradit též krátké omytí ethanolem. Lze přidat též několik kapek smáčedla pro snadnější průnik sterilizačního činidla k celému povrchu. Následně se materiál dvakrát propláchne ve sterilní vodě, osušené pupeny se pak nasazují na živná média. Chlorid rtuťnatý likvidujeme jako nebezpečný odpad.

Materiál uchováváme v kultivační místnosti s teplotou nastavenou na cca 22 °C a fotoperiodou 12–16 hodin. Pokud se během prvních dní po nasazení médium zabarví výtokem fenolických látek, přesadíme explantát na čerstvé médium. V případě opakovaného výtoku fenolických látek doporučujeme tento postup zpočátku provádět i každý den. Po úspěšném založení výchozí *in vitro* kultury se pravidelný subkultivační interval přesazení na nově připravená agarová média prodlužuje na standardní délku přibližně jednoho měsíce. Obzvláště v prvních týdnech po iniciaci *in vitro* kultury je nutné věnovat zvýšenou pozornost možnému výskytu mikrobiálních kontaminací. Příčinou může být vnitřní kontaminace pletiv nebo nedostatečné proniknutí sterilizačního činidla do všech částí výchozího explantátu. Kontaminované explantáty vyřadíme z další *in vitro* kultivace a sterilně zlikvidujeme.

V našich experimentech jsme při zakládání explantátových kultur pracovali s jádrovinami i peckovinami, které byly v předešlém období pozitivně testované na fytoplazmu AP, PD či ESFY. Jednalo se o jabloně Golden Delicious (dva klony), Panenské zlepšené, Táborita, Red Gravenstein a Virginia Crab, hrušně Williamsova, Konference, Bohemica a Manon, slivoň Tophit a višně plstnatou (podnož). Kromě odrůd Táborita a Tophit, které pocházely z *in vitro* banky mikroorganismů, uchovávané ve VŠÚO, byl materiál získán z polních podmínek od množitelů nebo z banky mikroorganismů, kde jsou kontejnerované rostliny uchovány v technické izolaci.

Pro ověření možnosti dostatečně rychlého množení materiálu jsme u vybraných modelových kultur provedli zkoušku multiplikace na médiích s různým složením. U jabloní, jako zástupců podčeledi *Maloideae*, se projevila výrazná heterogenita v rámci rodu (graf 1), z peckovin jsme vysoký multiplikační koeficient ($2,94 \pm 0,48$) zaznamenali u višně plstnaté na médiu s 1,5 mg/l BAP, které standardně používáme pro většinu genotypů.



Graf 1: Multiplikace jabloní na živných médiích s různou koncentrací cytokininu BAP

3.2.3 Vlastní ozdravování

Rostlinný materiál infikovaný fytoplazmou je možné ozdravit již samotným vypreparováním a sterilizací explantátu a následným zavedením do *in vitro* podmínek. Námi provedeným a v metodice doporučeným postupem takto došlo k eliminaci fytoplazmové infekce u jedenácti genotypů jádrovin a peckovin. Konkrétně fytoplazma AP byla odstraněna u jabloní u jednoho ze dvou klonů odrůdy Golden Delicious, u odrůd Panenské zlepšené, Virginia Crab a Red Gravenstein. Fytoplazma PD byla eliminována u hrušní Williamsova, Konference, Bohemica a Manon. Fytoplazma ESFY byla odstraněna u višně plstnaté a u slivoně Tophit.

Naopak, pokud fytoplazmová infekce v *in vitro* kultivovaném materiálu zůstala přítomná, což se v našich experimentech stalo u jednoho ze dvou klonů jabloně Golden Delicious a Táborita, bylo kvantitativní PCR diagnostikou zjištěno, že opakované *in vitro* subkultivace mohou vést k dalšímu nárůstu koncentrace patogenu. V *in vitro* explantátech odrůdy Golden Delicious se množství fytoplazmy AP více než zdvojnásobilo během 18 měsíců. Kultury zmíněných odrůd sice bez dalších terapeutických zásahů přeživaly, ale jejich zdravotní stav se postupně zhoršoval (obr. 1).



Obrázek 1: Fytoplazmou infikovaná kultura odrůdy Golden Delicious během prvních týdnů po nasazení (vlevo) a po dalších 18 měsících bez ozdravovacích zásahů (vpravo) s dvojnásobnou koncentrací fytoplazmy oproti stavu při nasazení.

3.2.3.1 Chemoterapie

Neozdraví-li se materiál prostým převodem *in vitro*, lze provést terapeutický zásah kultivací na živných médiích s obsahem antibiotik. Zpravidla se jedná o termolabilní látky, které se vyššími teplotami při sterilizaci médií degradují. Agarové médium se proto připraví bez antibiotika a v uzavíratelných skleněných laboratorních lahvích projde sterilizačním cyklem. Paralelně se vybrané antibiotikum ve zvoleném množství rozpustí v příslušném rozpouštědle. Není-li jím voda, je vhodné užít co nejnižší, nezbytný objem, aby se minimalizovalo případné fyto toxické působení rozpouštědla. Během chladnutí lahví ve sterilních podmínkách laminárního flow-boxu se do živného média přidá v požadovaném množství roztok antibiotika, a to injekční stříkačkou přes antimikrobiální filtr o velikosti pórů 0,2 μm . Tento krok se obvykle provádí až poté, co teplota média klesne pod 60 $^{\circ}\text{C}$, a nehrozí tak riziko rozkladu přidávané antimikrobiálně účinné látky. Po promíchání se obsah lahví ve flow-boxu rozlévá do předem vysterilizovaných baněk.

Různé rostlinné druhy i odrůdy se mohou lišit ve snášenlivosti jednotlivých chemoterapeutik. Proto by vlastní chemoterapii měl předcházet test fyto toxicity, během něž se zjistí, v jakých koncentracích lze vybranou látku do živných médií přidávat, aniž by explantáty odumřely. K tomuto účelu se připraví malé množství baněk s médii obsahujícími různé dávky antibiotik např. v geometrické koncentrační řadě – 10, 20, 40, 80 atd. mg/l. Po několika týdnech kultivace lze vyhodnotit, jak vysoké koncentrace již působí letálně, a tyto se v cyklech chemoterapie nebudou užívat.

Vlastní chemoterapie obvykle trvá 1 měsíc při stejných kultivačních podmínkách jako v průběhu zakládání a množení *in vitro* kultur. Probíhá paralelně u několika desítek meriklonů, nasazených na živná média se subletálními dávkami antibiotika. Po skončení terapie se provede testování přítomnosti fytoplazmy u jednotlivých meriklonů. Pokud se výrazně projevuje fyto toxicita a růst kultur je silně zpomalen, nemusí být bezprostředně po chemoterapii k dispozici dostatek materiálu pro provedení testů. V takovém případě lze meriklony přesadit na běžné médium prosté antibiotik, a teprve po jejich regeneraci se u nich stanoví PCR

diagnostikou přítomnost a případně i koncentrace fytoplazmy a účinnost ozdravení. Naopak v případě bezproblémového růstu je možno zvýšit koncentraci antibiotika nebo chemoterapeutický zásah prodloužit.

Při chemoterapii odrůdy Golden Delicious infikovaných fytoplazmou AP jsme testovali dvě antibiotika z různých skupin, ciprofloxacin a klarithromycin, v koncentracích 10, 20 a 40 mg/l. V každé koncentrační variantě obou antibiotik bylo nasazeno 15 explantátů.

Ciprofloxacin

Toto florochinolonové antibiotikum inhibuje enzym gyrázu (LeBel 1988), čímž brání správnému průběhu replikace DNA. V medicíně bývá indikován zejména proti gramnegativním bakteriím. Lze jej rozpouštět ve vodě, přičemž rozpustnost stoupá, upravíme-li její pH mimo neutrální oblast (např. pomocí KOH).

Klarithromycin

Mechanismus účinku tohoto makrolidového antibiotika tkví ve vazbě na podjednotku 50S bakteriálního ribozomu a následné inhibici proteosyntézy (Champney a Burdine 1995). Používá se v humánní medicíně např. proti mykobakteriím. Doporučujeme rozpouštět v dimethylsulfoxidu (DMSO).

Při našem experimentu se projevila vysoká fytotoxicita ciprofloxacinu: Všechny explantáty na živných médiích s tímto antibiotikem vykazovaly už po jednom měsíci vážné deformace, chlorózy a rozpad vzrostného vrcholu i při použití nejnižší koncentrace (obr. 2). Snášenlivost klarithromycinu byla vyšší, vážná poškození se objevila až při 40 mg/l (obr. 3).

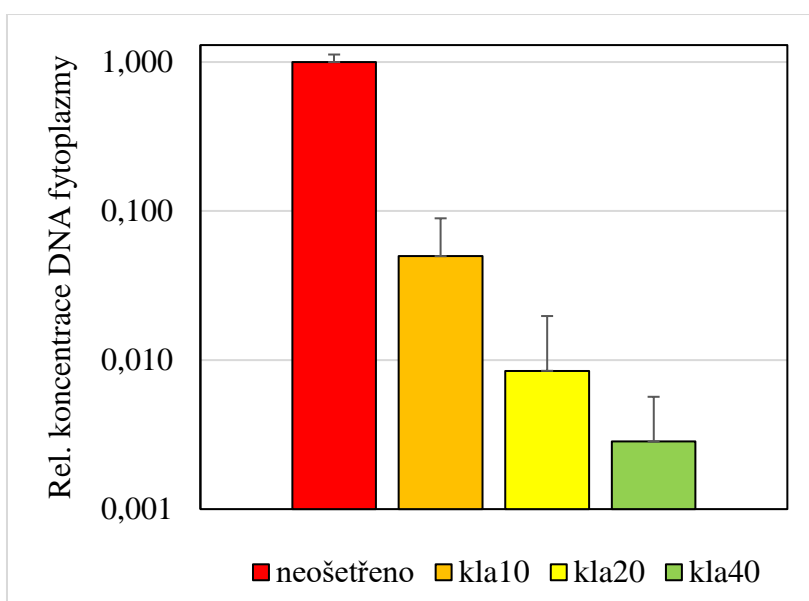
PCR testování meriklonů po chemoterapii klarithromycinem prokázalo, že koncentrace fytoplazmy se po měsíci výrazně snížila, a to tím více, čím vyšší byla koncentrace antibiotika v médiu (graf 2). V jednom případě jsme zaznamenali i úplnou eliminaci fytoplazmy. Po 18 měsících od terapie prokázal PCR test kultury odvozené od tohoto meriklonu, že se fytoplazma v ozdraveném materiálu znovu neobjevila.



Obrázek 2: Projevy vysoké fytotoxicity ciprofloxacinu při koncentraci 10, 20 a 40 mg/l



Obrázek 3: Projevy fytoxicity klarithromycinu při koncentraci 10, 20 a 40 mg/l



Graf 2: Snížení nálože fytoplazmy v explantátech kultivovaných na živných médiích s 10, 20 a 40 mg/l klarithromycinu

3.2.3.2 Kryoterapie

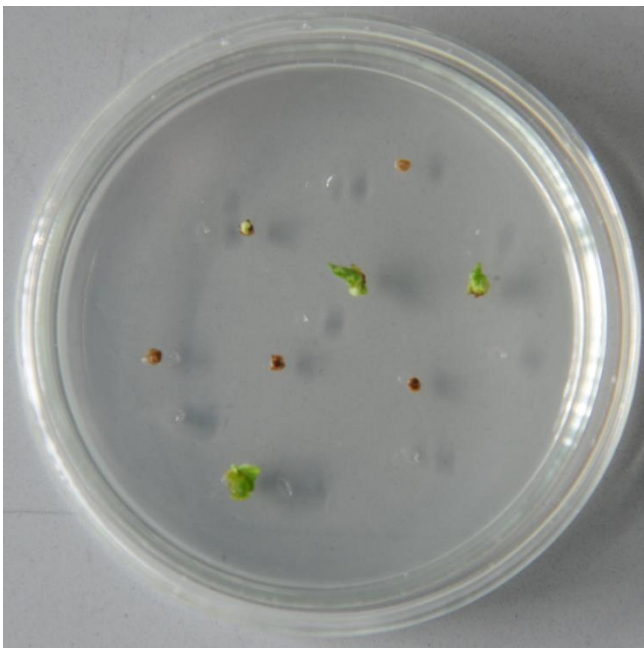
Zamrazení růstových vrcholků *in vitro* pěstovaných výhonů v kapalném dusíku může rovněž vést k vymizení fytoplazem. Tato metoda tzv. kryonože je založena na faktu, že zatímco buňky meristematické oblasti jsou díky své stavbě často schopny po rozmrazení regenerovat, okolní pletiva zpravidla nepřežívají (Benson 2008). Pokud se patogen v meristematických buňkách nevyskytoval, získáme tímto postupem zdravý materiál.

V kryolaboratořích VŠÚO byl proveden pokus se zamrazením explantátových kultur odrůd Golden Delicious a Táboriga, infikovaných fytoplazmou AP. Postupovali jsme dle upraveného vitrifikačního kryoprotokolu, který byl původně vyvinut pro rod *Fragaria* (Majathoub 2005, Höfer 2011). Doporučujeme pracovat s namnoženými *in vitro* výhony subkultivovanými 2 měsíce na multiplikačním médiu. Baňky přesuneme do chlazeného inkubátoru, kde nastavíme krátký den (8 hodin světlo při 22 °C, 16 hodin tma při -1 °C). Po dvoutýdenní aklimatizaci odebereme jednotlivé výhony a pod stereomikroskopem exstirpujeme

skalpelem vzrostné vrcholky o velikosti 1–2 mm. Tyto umístíme na Petriho misky s živným médiem obsahujícím 5 % DMSO. Při přípravě tohoto média postupujeme podobně jako v případě antibiotik, tj. DMSO přidáváme přes antimikrobiální filtr až po částečném zchladnutí. Misky s vrcholky umístíme ještě na dva dny do inkubátoru s nezměněným režimem. Během této doby je vhodné zabránit negativnímu vlivu vytékajících fenolů, přičemž postačí vrcholky ve sterilním prostředí laminárního flow-boxu jednou přesadit v rámci téže misky. Vlastní vitrifikace probíhá v kryovialkách (5–10 vrcholků na vialku) a začíná ponořením do 1 ml roztoku loading solution (LS), který obsahuje 184 g/l glycerolu a 171 g/l sacharózy v tekutém živném médiu. Roztok LS po 30 minutách vyměníme za 0,75 ml roztoku plant vitrification solution 2 (PVS2). Ten připravíme z 368 g/l glycerolu, 156 g/l DMSO, 167 g/l ethylenglykolu a 54,8 g/l sacharózy v tekutém médiu. V PVS2 materiál uchováme 2,5 hod v drceném ledu a následně kryovialky ponoříme do kapalného dusíku.

Před regenerací vrcholků provedeme ultrarychlé odtání vialek jejich ponořením do vodní lázně o teplotě 40 °C na 1 min. Urychleně odsajeme roztok PVS2 a nahradíme jej roztokem unloading solution (ULS). Ten obsahuje pouze sacharózu v tekutém médiu, a to v koncentraci 410 g/l. Necháme působit 20 min, roztok odpipetujeme, vrcholky osušíme na sterilním filtračním papíru a nasadíme je na standardní živné médium v Petriho miskách. Po dobu cca jednoho týdne uchováváme misky v temnu, dále pak při běžných podmínkách v kultivační místnosti. V případě zdařilé regenerace (obr. 4) můžeme po dosažení dostatečného množství materiálu provést testování na přítomnost fytoplazmy.

Výsledky kryoterapie obou odrůd byly různé. Zatímco ve výhonech odrůdy Golden Delicious nebyla po odtání a regeneraci fytoplazma zjištěna a explantáty vykazovaly bujný růst, u odrůdy Táborita k úspěšnému obnovení kultury nedošlo. Materiál sice regeneroval a vytvořil vzrostný vrchol s několika listy, ale viditelně neprosplával a během několika měsíců odumřel, aniž se jej podařilo namnožit nebo provést PCR testování.



Obrázek 4: Regenerující vzrostné vrcholky odrůdy Golden Delicious po rozmrazení

3.3 Zakořenění ozdravených rostlin a převod do nesterilních podmínek

3.3.1 Indukce kořenění *in vitro*

Prokáže-li testování ozdravovaného *in vitro* materiálu, že se v něm fytoplazma již nevyskytuje, provedeme namnožení a následné zakořenění těchto explantátů. Živná média pro tvorbu kořenů by měla obsahovat zvýšené množství auxinů, naopak cytokininy do nich nepřidáváme. V *in vitro* laboratoři VŠÚO se pro hlavní druhy jádovin a peckovin osvědčila kyselina indol-3-máselná nebo 1-naftyloctová v množství 1 mg/l. Oproti standardnímu živnému médiu, používanému pro multiplikaci, též doporučujeme snížit koncentraci makro- a mikroprvků na polovinu. Doba potřebná k dostatečnému zakořenění se pohybuje v řádu týdnů. Různé druhy i odrůdy v rámci jednoho druhu mohou pro úspěšné zakořenění vyžadovat odlišné podmínky, a indukcí kořenů je tak nutné testovat až na úroveň konkrétního genotypu. Termolabilní auxiny, rozpuštěné v příslušné koncentraci, je vhodnější přidávat přes antimikrobiální filtry až během chladnutí média.

3.3.2 Převod *ex vitro*

Po zakořenění sázíme rostliny do rašelinových tablet, perlitu či substrátu v sadbovačích. Rozhodující je dostatečná vlhkost vzduchu, protože rostliny nejsou adaptovány podmínkám běžné vlhkosti. Materiál lze např. umístit do kultivačního fytotronu, na počátku s maximální 100% vlhkostí, a během prvních týdnů vlhkost postupně snižovat. Fotoperiodu nastavíme na 16 hodin, teplotu na cca 22 °C. Pro dosažení vysoké vlhkosti v první fázi po převodu *ex vitro* lze rovněž využít plastové minipařeniště s regulovatelným odvětráváním (obr. 5). Listy rostlin pocházejících z *in vitro* podmínek také nemají dostatečně vytvořené ochranné mechanismy proti prudkému slunečnímu záření. Chceme-li rostliny zasadit do venkovních podmínek, je třeba zařadit několikátýdenní fázi postupné adaptace na sluneční záření.



Obrázek 5: Ilustrační foto minipařeniště v kultivační komoře typu fytotron

V případě úspěšného dopěstování je třeba ověřit, zda materiál zůstal prostý fytoplazmy. Každá metoda má své detekční limity. Koncentrace fytoplazmy po převodu *in vitro* nebo po následné terapii může být dočasně stlačena pod mez citlivosti dané metody. V případě, že se ji

nepodařilo zcela eliminovat, hrozí nebezpečí falešně negativního výsledku. Opakované negativní testování vzorků odebraných z výsledné rostliny *in vivo* potvrdí úplné ozdravení, nebo odhalí opětovné šíření fytoplazmové infekce.

3.4 Interpretace dosažených výsledků ozdravování

3.4.1 Preparace explantátů a regenerace v *in vitro* kultuře

U velké části odrůd byla zaznamenána úspěšná eliminace fytoplazem již po převodu materiálu *in vitro*. Tento fakt může souviset se sezónním pohybem fytoplazem v rámci hostitele. Zatímco na jaře a v létě se fytoplazma floémovým tokem šíří do všech orgánů, v zimě se stahuje do kořenů a její výskyt v periferních částech stromu bývá omezen (Pedrazzoli a kol. 2008). Včasný odběr výhonů a pečlivá izolace pupenu s minimální částí vodivých pletiv tak může zajistit, že se ve výchozím explantátu fytoplazma vůbec nevyskytuje.

Nepodaří-li se fytoplazmu eliminovat již izolací pupenu, jeho sterilizací a nasazením *in vitro*, může se fytoplazma i v úspěšně založených kulturách časem naopak pomnožit natolik, že výrazně zpomalí růst explantátů nebo dokonce způsobí jejich odumření. Proto v případě přetrvávajícího výskytu patogena doporučujeme začít s terapeutickými zásahy co nejdříve po převodu *in vitro*, ideálně ihned po dosažení dostatečného počtu výhonů.

V některých případech (meruňky Darina či Veharda, broskev Červený císař) se v našich předchozích pokusech nepodařilo explantátovou kulturu, získanou z fytoplazmou nakaženého výchozího stromu, vůbec založit. Pouze odrůda Veharda se v podmínkách *in vitro* krátce udržela, což umožnilo odebrat vzorek kultury a podrobit jej PCR testu. Ten potvrdil přítomnost fytoplazmy. Všechny výhony následně postupně odumřely. Vzhledem k tomu, že u nasazených explantátů Dariny ani Červeného císaře se neobjevily téměř žádné viditelné bakteriální ani houbové kontaminace, předpokládáme, že úhyn byl i zde zapříčiněn přetrvávající přítomností fytoplazmy. K této hypotéze nás vede též fakt, že zdravou, fytoplazmy prostou kulturu odrůdy Darina se v *in vitro* bance VŠÚO daří dlouhodobě udržovat. Zdá se tedy, že pokud fytoplazma není odstraněna již při převodu *in vitro*, poškozují výhony těchto peckovin natolik, že znemožňují jejich dlouhodobé udržení a multiplikaci.

Rovněž u některých nakažených odrůd jiných druhů (jabloň Šampion, slivoň Santa Rosa) se po nasazení explantátů projevila nízká vitalita, což by mohlo souviset s poškozením materiálu fytoplazmou, která nebyla převodem *in vitro* eliminována. Kvantifikovat přítomnost fytoplazmy ve slabě rostoucích a odumírajících kulturách, a potvrdit nebo vyvrátit tak hypotézu, že se v materiálu stále vyskytuje, však nebylo možné kvůli nedostatečnému množství materiálu pro provedení PCR testů. Předpokládáme, že úspěšnost získání zdravého materiálu může souviset s termínem odběru výchozích výhonů a přesným postupem izolace pupenů. Případné následné přežití stále infikovaného explantátu může souviset s odolností konkrétního druhu či odrůdy.

3.4.2 Chemoterapie

Ciprofloxacin se pro *in vitro* chemoterapii odrůdy Golden Delicious v našich pokusech neosvědčil z důvodu vysoké fyto toxicity, a to i ve velmi nízkých koncentracích. Vzhledem k charakteru poškození explantátů, zahrnujícímu vážná poškození *in vitro* vzrostných vrcholů,

jej pro vegetativně množené ovocné druhy, i z důvodu rizika mutageneze a vysokých nároků na zachování odrůdové pravosti, nedoporučujeme.

Použití klarithromycinu se jeví perspektivnějším, a to zejména v koncentraci 20 mg/l, kdy fytoxicita ještě nezpůsobila hromadný úhyn explantátů, ale koncentrace fytoplazmy průměrně klesla na méně než 1/100 původní hladiny. Z 15 meriklonů, které byly nasazeny na médium s touto koncentrací, se zcela ozdravil jeden. I z jediného negativně testovaného explantátu lze během několika měsíců multiplikací získat desítky nových výhonů.

3.4.3 Kryoterapie

Podmínkou úspěšného kryoterapeutického zásahu je především nalezení vhodného protokolu pro průběh zamrazení a odtání. Postup popsany v této metodice se nám pro odrůdy, s nimiž jsme pracovali, osvědčil, nicméně pro jiné odrůdy a druhy může být vhodné jej upravit nebo použít zcela jinou metodu. Dosud bylo publikováno velké množství kryoprezervačních protokolů (Jiroutová a Sedlák 2020). Mohou se lišit nejen použitelností pro různý rostlinný materiál, nýbrž i potenciálem pro ozdravování na principu kryonoze.

V našem pokusu se také ukázalo, že i účinek kryoterapie provedené tímž způsobem se u různých genotypů může lišit. Kultury *in vitro* odrůdy jabloně Golden Delicious, které se podařilo ozdravit, vitálně prorůstaly a množily se v dalších fázích regenerace na agarových médiích. Naopak v případě odrůdy Táboriga neozdravené explantáty po rozmrazení a částečné regeneraci nekrotizovaly a postupně odumíraly. Vzhledem k tomu, že se zde nevyskytly viditelné kontaminace, předpokládáme, že důvodem zhoršujícího se stavu byla kombinace stresového působení vitrifikačních roztoků a přetrvávající přítomnosti fytoplazmy. Právě u odrůdy Táboriga mohl k neúčinnosti kryoterapie přispět též fakt, že materiál pocházel z *in vitro* banky mikroorganismů, takže našim experimentům již předcházela dlouhodobá subkultivace pomalu rostoucích, fytoplazmou nakažených explantátů. Právě ta mohla způsobit, že se patogen v kulturách nejen namnožil, nýbrž pronikl i do meristematických oblastí, což narušilo princip kryonoze.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

1. Jednotlivé metodické postupy popisují na základě vlastního výzkumu, provedeného řešitelským týmem, nejdůležitější fáze ozdravovacího cyklu a diagnostiky od testování zdravotního stavu výchozích fytoplazmami a viry infikovaných rostlin až po kořenění a převod ozdravených jedinců do *ex vitro* podmínek. Jsou definovány pracovní postupy tak, aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků v celém na sebe navazujícím cyklu testování a ozdravování.
2. Za nový výzkumný směr, v podmínkách České republiky doposud neaplikovaný, považujeme ozdravování fytoplazmami infikovaného výchozího množitelského materiálu ovocných druhů pomocí chemoterapeutik. Metodika prokázala účinnost antibiotických látek makrolidové řady. Tyto látky byly původně vyvíjeny v oblasti humánní medicíny proti mykoplazmatickým bakteriím. Ty se podobně jako fytoplazmy u rostlin vyznačují absencí buněčné stěny. Byla potvrzena výzkumná hypotéza spočívající v předpokladu analogického působení chemoterapeutik u rostlin. V našich pokusech byla chemoterapeutická ošetření aplikována na explantátové kultury rostoucí na umělých živných médiích v podmínkách *in vitro*.

3. Biotechnologické ozdravovací postupy v kontrolovaných a uzavřených laboratorních podmínkách představují ve srovnání s konvenční termoterapií rostlin pěstovaných v kontejnerech velkou perspektivu pro zefektivnění ozdravování. Ve fázi množení je u *in vitro* kultur na minimum sníženo riziko reinfekce již ozdraveného materiálu. *In vitro* ozdravování je možno provádět celoročně bez ohledu na vegetační období a negativně testované výhony je možno před převodem *ex vitro* velmi rychle namnožit.
4. Inovativní je rovněž výzkum využití ultranízkých teplot kryoterapie v kapalném dusíku proti fytoplazmovým infekcím.

5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Certifikovaná metodika ozdravování rostlin ovocných druhů od fytoplazem pomocí biotechnologických metod chemoterapie a *in vitro* kultur je určena pracovištím technických izolátů, která provádějí ozdravování odrůd ovocných dřevin, MZe, ÚKZÚZ, Ovocnářské unii ČR, školkařům a dalším zájemcům a pěstitelům ovoce. Získané poznatky jsou uplatnitelné i v laboratořích akademické a vzdělávací univerzitní sféry. Dále pro vědecké a výzkumné účely v oblasti ochrany zemědělských plodin vůči systémovým patogenům.

V současnosti v podmínkách měnícího se klimatu je nutné aktivně působit proti výskytu fytoplazmóz ve školkách i výsadbách ovocných dřevin. Vzhledem k neexistenci hraničních fytoosanitárních kontrol a celního řízení mezi státy EU hrozí značné riziko přenosu fytoplazem infikovaným materiálem, a to zejména u materiálu importovaného mimo oficiální certifikační systém. Těmito rizikovými materiály mohou být např. soukromé dovozy atraktivních nových velkoplodých odrůd asijských slivoní nebo hrušní, po kterých vzrůstá poptávka zejména u neprofesionálních pěstitelů. Mohou tak vznikat nová ohniska choroby. Ta představují největší nebezpečí zejména v blízkosti ovocných školek, kde se vyskytuje na jednom místě velká koncentrace tržně vysoce hodnotného množitelského materiálu včetně výchozích certifikovaných matečnic. Zvýšené riziko šíření fytoplazem se dá předpokládat i kvůli šíření jejich vektorů, kterými jsou zástupci bodavě savého hmyzu, mery rodu *Cacopsylla*.

Vyřešení problematiky ozdravení odrůd ovocných dřevin a získání fytoplazem prostých tržních, a především českých odrůd je podmínkou provozu technických izolátů. Na omezení šíření a škodlivosti fytoplazem je závislá ekonomická konkurenceschopnost českého školkařství a následně českého produkčního ovocnářského sektoru. V minulosti byl problém zdravotního stavu výsadbového materiálu výrazně nedoceněn. Česká republika je v této oblasti v nevýhodné pozici, zejména vůči západním zavedeným producentům školkařského materiálu ovocných dřevin, jako je například Nizozemsko nebo Itálie. Funkčnost systému certifikace je závislá na výsledcích výzkumu.

Ve školkařském sektoru v poslední době vzrůstá i podíl využívání *in vitro* technologií, a to nejenom u drobného ovoce, ale i u některých pravokořenných peckovin, například u višně (Buchtová 2022). Množení kulturami *in vitro* je moderní způsob produkce rostlinného materiálu. Za podmínky nalezení účinných postupů pro sterilizaci počátečních explantátů a vhodných typů kultivačních médií lze těmito postupy namnožit velkou část druhů a odrůd ovocných plodin. To zvyšuje i potenciál uplatnění této biotechnologicky orientované metodiky.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Produkce školkařských výpěstků ovocných plodin je v České republice stabilizovaným, ekonomicky významným odvětvím rostlinné výroby s potenciálem růstu. Ovocné školky zaujímají v České republice rozlohu okolo 400 hektarů. V posledním statisticky zpracovaném roce 2021 vyprodukovali školkaři celkem 2 295 816 stromků hlavních druhů jádrovin a peckovin (Němcová a Buchtová 2022). Objem v rámci jednotlivých druhů ale meziročně kolísá podle poptávky tržního ovocnářského sektoru i menších pěstitelů. Vegetativní rozmnožování ve školkařském ovocnářském sektoru přitom závisí na dostupnosti kvalitního výchozího rostlinného materiálu s prověřeným zdravotním stavem. Při průměrné farmářské ceně 100 Kč za jeden stromek jádrovin a peckovin dosahuje celkový obrat této školkařské produkce hodnoty 229 581 600 Kč. Snížení ztráty školkařských výpěstků v důsledku infekce fytoplazmou o 1 % pak přináší v případě použití zdravého rozmnožovacího materiálu přínos 2 295 816 Kč ročně.

Ve školkařském sektoru hrozí největší ekonomická rizika v případě infekce fytoplazmou u výchozích množitelských matečnic. Školkařská výroba ozdraveného výchozího materiálu jádrovin má v ovocnářsky vyspělých zemích ekonomicky prokazatelný přínos v konkurenceschopnosti pěstitelů a ve zvýšené kvalitě plodů a množství plodů. Zahraniční údaje prokazují, že hospodářská ztráta na výnosu u stromů infikovaných fytoplazmami dosahuje 40 až 50 %.

Hlavními příčinami ekonomických ztrát v případě proliferace jabloně je výrazně snížená velikost a chuťová kvalita plodů. Jablka z napadených stromů se dají obtížně tržně realizovat. Ekonomické ztráty u fytoplazmy chřadnutí hrušně jsou způsobeny zejména rychlou ztrátou vitality napadených rostlin v sadech a sníženou produkcí plodů menší velikosti. U evropské žloutenky peckovin jsou plody na infikovaných stromech menší, obvykle dříve dozrávají a opadávají, rovněž dochází k prosychání kosterních větví. K největším ekonomickým škodám dochází v rámci peckovin u meruněk, kde infekce způsobuje často odumírání celých stromů s následnou nutností likvidace výsadby.

Použití zdravého rozmnožovacího materiálu pomůže uživatelům minimalizovat produkční a finanční ztráty v oblasti množení a pěstování ovocných plodin. Získané zdravé základní rostliny budou po opakovaném retestování molekulárními diagnostickými metodami v budoucnu zahrnuty do systému certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu. Zdravý výchozí materiál bude poskytován na komerčním základě školkařským podnikům a pěstitelům ovoce. Pěstování neinfikovaných odrůd ovocných plodin zaručuje do budoucna konkurenceschopnost a efektivitu ovocnářské produkce, založenou na vysoké kvalitě a výnosech.

7. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Anonym (1999): Certification schemes – pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *EPPO Bulletin* 29: 239–252.
- Benson E.E. (2008): Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27(3): 141–219.
- Bertaccini A. (2021): Containment of Phytoplasma-Associated Plant Diseases by Antibiotics and Other Antimicrobial Molecules. *Antibiotics (Basel)* 10(11): 1398.

- Boudabous M., Mars M., Marzougui N., Ferchichi A. (2010): Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through *in vitro* culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica* 157(3): 513–524.
- Champney S., Burdine R. (1995): Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39: 2141–2144.
- EPPO Global Database. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. Version 09/2023. [online]. [cit. 2023- 10-09]. Dostupné z: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list
- Höfer M. (2011): Conservation strategy of genetic resources for strawberry in Germany. *Acta Horticulturae* 908: 421–430.
- Jiroutová P., Sedlák J. (2020): Cryobiotechnology of plants: a hot topic not only for gene banks. *Applied Sciences – Basel* 10(13): 14.
- Komise EU. *Prováděcí nařízení Komise (EU) 2019/2072 ze dne 28. listopadu 2019, kterým se stanoví jednotné podmínky pro provádění nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2016/2031, pokud jde o ochranná opatření proti škodlivým organismům rostlin, a kterým se zrušuje nařízení Komise (ES) č. 690/2008 a mění prováděcí nařízení Komise (EU) 2018/2019*. Online. In: Official website of the European Union. Brusel, (2019). dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32019R2072>. [cit. 2023-10-19].
- LeBel M. (1988): Ciprofloxacin: chemistry, mechanism of action, resistance, antimicrobial spectrum, pharmacokinetics, clinical trials, and adverse reactions. *Pharmacotherapy* 8(1): 3–33.
- Mehri-Kamoun R., Mehri H., Faidi A., Polts V. (2004): Micropropagation of six OHxF (Old Home x Farmingdale) pear rootstocks. *Advances in Horticultural Science* 18(2): 53–59.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Naïbin D. a kol. (2017): Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement. *Nature Communications* 8(249): 1-11.
- Němcová V., Buchtová I. (2022): Situační a výhledová zpráva ovoce. *Ministerstvo zemědělství, Praha*, 90 s.
- Pedrazzoli F., Ciccotti A.M., Bianchedi P.L., Salvadori A., Zorer R. (2008): Seasonal colonisation behaviour of *Candidatus Phytoplasma mali* in apple trees in Trentino. *Acta Horticulturae* 781, 483–489.
- Tanno K. a kol. (2008): Comprehensive screening of antimicrobials to control phytoplasma diseases using an *in vitro* plant–phytoplasma co-culture system. *Microbiology* 164: 1048–1058.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Komplexní metodika vznikla *de novo* na základě výzkumné a vývojové činnosti autorů.

Dílní výsledky byly zatím zveřejněny v následujících publikacích:

- Sedlák J., Semerák M. (2022): *In vitro* množení vybraných druhů jaderovin. *Zahradnictví* 21(9): 8–10.
- Sedlák J., Semerák M. (2023): Množení višně *Prunus tomentosa* v kultuře *in vitro*. *Zahradnictví* 22(2): 46–47.
- Sedlák J., Semerák M. (2023): Založení *in vitro* kultury a multiplikace slivoní. *Zahradnictví* 22(3): 18–19.
- Sedlák J., Semerák, M., Rejlová M. (2023): Sanitation of apple cultivars from AP phytoplasma and ApMV and ACLSV viruses using *in vitro* culture and cryo-knife therapy in liquid nitrogen. *Applied Sciences* 13(13): 7527.
- Semerák M., Sedlák J., Čmejla R. (2023): Clarithromycin suppresses apple proliferation phytoplasma in explant cultures. *Plants* [rukupis v recenzním řízení].



v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 201884/2023

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Certifikovaná metodika ozdravování rostlin ovocných druhů od fytoplazem pomocí biotechnologických metod chemoterapie a *in vitro* kultur**

Autor/autoři: Ing. Jiří Sedlák, Ph.D.; Mgr. Matěj Semerák; Ing. Martina Rejllová

Název organizace/cí: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o.**

Místo vydání: **Holovousy**

Rok vydání: **2023**

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe ČR NAZV č. QK21020395 „Produkce fytoplazem prostých školkařských výpěstků a jejich ochrana před reinfekcí“.

Brno 22. 11. 2023

Ing. Daniel Jurečka

ředitel ústavu

.....
podpis/elektronický podpis
zástupce odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru precizního zemědělství, výzkumu a vzdělávání MZe ČR:

V dne

.....
podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky
Odboru precizního zemědělství,
výzkumu a vzdělávání

Certifikovaná metodika ozdravování rostlin ovocných druhů od fytoplazem pomocí biotechnologických metod chemoterapie a *in vitro* kultur

Vydal:

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

1. vydání, 2023

ISBN 978-80-87030-93-6 (online; pdf)

<https://doi.org/10.60615/cezm-kk60>



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

© 2023