

Certifikovaná metodika produkce ozdravených odrůd jabloně s využitím NGS



Jiří Sedlák a kol.

**VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.**

**VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o.
Biologické centrum AV ČR, v. v. i.**

**Certifikovaná metodika produkce ozdravených
odrůd jableň s využitím NGS**

Jiří Sedlák a kol.



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

2023

Autorský kolektiv:

Ing. Jiří Sedlák, Ph.D.¹; prof. Ing. Josef Špak, DrSc.²; Mgr. Matěj Semerák¹;
Ing. Jaroslava Příbylová, Ph.D.²; Mgr. Igor Koloňuk, Ph.D.²

¹ VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,
Holovousy 129, 508 01 Hořice

² Biologické centrum AV ČR, v. v. i., Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

Kontakt na vedoucího autorského kolektivu:

jiri.sedlak@vsuo.cz

Autoři fotografií a obrázkových schémat:

kolektiv autorů

Odborný oponent:

prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.

Oponent ze státní správy:

RNDr. Kateřina Tománková, Ph.D.

Název: Certifikovaná metodika produkce ozdravených odrůd jabloně s využitím NGS

Dedikace:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) QK1910065: Nové přístupy k produkci ozdravených odrůd jabloní s využitím diagnostiky NGS patogenů.

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

ISBN 978-80-87030-92-9 (online; pdf)

<https://doi.org/10.60615/ygwf-vc33>



OBSAH

1.	Úvod	4
2.	Cíl metodiky	5
3.	Vlastní popis metodiky	5
3.1	Popis detekčního systému NGS a jeho využití u jabloně	5
3.1.1	Diagnostika NGS.....	6
3.1.1.1	Rostlinný materiál a extrakce RNA	6
3.1.1.2	Příprava knihoven pro sekvenování RNA	6
3.1.1.3	Bioinformatické hodnocení HTS dat	6
3.1.1.4	Diagnostické postupy	6
3.1.2	Popis nových virů a viroidů zjištěných pomocí NGS	8
3.2	Postupy ozdravování pomocí biotechnologických <i>in vitro</i> metod	9
3.2.1	Zakládání výchozích <i>in vitro</i> kultur jabloně a multiplikace.....	9
3.2.2	Ozdravovací proces	13
3.2.2.1	Exstirpace meristematické oblasti.....	13
3.2.2.2	Chemoterapie	15
3.2.2.3	Kryoterapie	17
3.2.3	Zakořenění ozdravených rostlin a převod do nesterilních podmínek.....	18
3.2.3.1	Indukce kořenění.....	18
3.2.3.2	Interpretace dosažených výsledků ozdravování.....	18
4.	Srovnání novosti postupů	20
5.	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	20
6.	Ekonomické aspekty	21
7.	Seznam použité související literatury	21
8.	Seznam publikací, které předcházely metodice	25

1. ÚVOD

Jádroviny jsou dlouhodobě hospodářsky nejvýznamnější skupinou ovocných plodin v ČR. U jabloní bylo v roce 2022 na území České republiky evidováno 5 864 hektarů produkčních výsadeb, což představuje téměř polovinu z celkové plochy komerčních ovocných sadů. Význam tohoto druhu dokládá i fakt, že školkařský sektor vyprodukoval celkem 1 288 554 stromků jabloně. To je v souhrnu více než produkce všech hlavních tržních druhů peckovin (1 090 970 stromků) v posledním statisticky zpracovaném roce 2021 (Buchtová 2022). Produkce školkařských výpěstků ovocných plodin je stabilizovaným, ekonomicky významným odvětvím rostlinné výroby s mírně rostoucím potenciálem. Objem ale meziročně kolísá v rámci jednotlivých druhů podle poptávky tržního ovocnářského sektoru i menších pěstitelů.

Jabloně mohou být infikovány více viry současně. Společné působení těchto patogenů pak snižuje výnos i kvalitu ovoce, vitalitu stromů a životnost výsadby. Školkařská výroba ozdraveného výchozího materiálu jádrovin má v ovocnářsky vyspělých zemích prokazatelný přínos v konkurenceschopnosti pěstitelů a ve zvýšené kvalitě plodů a výnosu. Česká republika je v této oblasti stále v nevýhodné pozici, zejména vůči zavedeným západním producentům školkařského materiálu ovocných dřevin, jako je například Nizozemsko, Německo nebo Itálie. Podle standardů EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) mají být jabloně pravidelně testovány při certifikaci rozmnožovacích materiálů na přítomnost hlavních patogenů, a to viru chlorotické skvrnitosti listů jabloně (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), viru mozaiky jabloně (*Apple mosaic virus*, ApMV), viru žlábkovitosti kmene jabloně (*Apple stem grooving virus*, ASGV) a viru vrásčitosti kmene jabloně (*Apple stem pitting virus*, ASPV) (Anonym 1999). Jabloně ale mohou být infikovány i dalšími viry a viroidy, které nebyly dosud v České republice zjištěny. Hadidi *et al.* (2011) zmiňuje celkem v této souvislosti 25 chorob s neznámým původcem, z nichž se významná část vyskytuje i v Evropě. Vzhledem k neexistenci hraničních fytoosanitárních kontrol a celního řízení mezi státy EU existuje riziko přenosu virů infikovaným materiálem, a to včetně materiálu importovaného mimo oficiální certifikační systém. Těmito rizikovými materiály mohou být např. soukromé dovozy nových atraktivních sloupcových jabloní, po kterých vzrůstá poptávka zejména u neprofesionálních pěstitelů.

Viry a virům podobnými patogeny infikované dřeviny není možné na trvalém stanovišti ve výsadbě léčit. Infekce je systémová a hospodářská škodlivost přetrvává v různé míře po celou dobu životnosti jedince v produkčním sadu nebo samozásobitelské výsadbě jabloní. Včasná a spolehlivá diagnostika těchto systémových patogenů je proto klíčová pro zamezení hospodářské škodlivosti. Detekce je v současnosti založena převážně na metodách ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay), RT-PCR (reverse transcription PCR) a real time RT-PCR (Winkowska *et al.* 2016).

Od roku 2018 je v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství ČR řešen projekt QK1910065 „Nové přístupy k produkci ozdravených odrůd jabloní s využitím diagnostiky NGS patogenů“ s dobou řešení 2019–2023. Projekt je řešen na pracovišti Ústavu molekulární biologie rostlin Biologického centra Akademie věd (ÚMBR BC) a ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském Holovousy s.r.o. (VŠÚO Holovousy s.r.o.). Výchozí

hypotéza projektu byla založena na předpokladu, že postupy sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS) přispějí k odhalení nových neznámých patogenů ve výchozím množitelském materiálu a ve výsadbách. V této metodice představujeme nové přístupy a dosažené poznatky o produkci ozdravených odrůd jabloní s využitím nových metod molekulární diagnostiky NGS, které umožňují sekvenování celých genomů nebo vybraných genomických oblastí s vysokým pokrytím. Ozdravovací metody byly založeny na *in vitro* kultivaci, extirpaci růstového vrcholu, chemoterapeutických postupech a kryoterapii. VŠÚO Holovousy s.r.o. se v minulém období zabýval zejména problematikou ozdravování odrůd ovocných dřevin pomocí termoterapie zakořenělých rostlin v kontejnerech, *in vitro* termoterapií a chemoterapií s využitím konvenčního antivirotika ribavirin. Detekce virů před zahájením ozdravování a v ozdraveném materiálu byla v minulosti prováděna zejména konvenční serologickou metodou ELISA. Identifikace původce choroby ELISA nebo PCR vyžaduje velké množství specifických testů. Naproti tomu z jediné NGS analýzy můžeme získat komplexní informaci o sekvencích všech virů, viroidů a dalších mikroorganismů přítomných ve vzorku. Od prvních popisů diagnostiky patogenů pomocí NGS (Kreuze 2009) dochází v současnosti k optimalizaci a standardizaci NGS metod v rámci izolace, amplifikace, výběru sekvenční platformy a bioinformatické analýzy dat pro širěji použitelnou diagnostiku. V ČR nebyl dosud zdravotní stav jabloní v technických izolátech a rozmnožovacích materiálech pomocí technik NGS zkoumán.

2. CÍL METODIKY

Certifikovaná metodika produkce ozdravených odrůd jabloně s využitím NGS má za cíl poskytnout uživatelům *in vitro* chemoterapeutické techniky s aplikací perspektivních antivirotických látek a postupy ozdravování pomocí kryonože. Využívá NGS determinaci virů a viroidů. Jsou popsány a optimalizovány jednotlivé diagnostické kroky v souladu s rychlým vývojem kitů a sekvenční platformy Illumina pro NGS. V rámci metodiky jsou u jabloně popsána i vhodná kultivační média s regulátory růstu pro multiplikaci a indukci kořenů v podmínkách *in vitro*. Pro testování a ozdravování jsme vybrali odrůdy domácího původu perspektivní pro pěstování v České republice a podnož M9, která je v tuzemsku nejpoužívanější podnoží pro jabloně. Předpokládáme, že získané zdravé základní rostliny budou v budoucnu po opakovaném testování diagnostickými NGS metodami využity jako výchozí množitelský materiál certifikované sadby jabloní.

3. VLASTNÍ POPIS METODIKY

Použití metodiky předpokládá základní znalosti principů *in vitro* kultivace a správné laboratorní praxe v laboratoři detekce virových patogenů rostlin. Odborník v dané oblasti však bude schopen metodiku verifikovat pro konkrétní vybavení laboratoře rostlinných explantátů a používané laboratorní reagentie.

3.1 Popis detekčního systému NGS a jeho využití u jabloně

Na počátku, před zahájením ozdravovacích terapií, je nutno zjistit u počátečního rostlinného materiálu jeho zdravotního stav. Výchozí zdravotní stav byl hodnocen u 6 tržních odrůd jabloní Idared, Boskoopské červené, Golden Delicious, Jonagored, Selen a Šampion, každé

zastoupené 2 stromy (označenými A, B), a u 12 podnoží M9 vybraných z výchozích materiálů v technickém izolátu VŠÚO Holovousy z hlediska virů uvedených v certifikačním schématu EPPO: ApMV, ACLSV, ASGV, ASPV. Rovněž byla provedena detekce v ČR nových virů a viroidu metodou NGS. Na pracovišti ÚMBR BC byla z části listů izolována nukleová kyselina pro NGS diagnostiku, část byla uchována pro zpětnou kontrolu přítomnosti patogenů RT-PCR. Kromě vzorků odrůd a podnoží byly rovněž odebrány vzorky ze dvou kontrol – jabloně PK 13 infikované apple scar skin viroidem a jabloně J1-JIH, v níž byla dříve zjištěna přítomnost ACLSV a ASPV.

3.1.1 Diagnostika NGS

3.1.1.1 Rostlinný materiál a extrakce RNA

Vzorky listů byly zpracovány pomocí GeneJET Plant RNA Purification Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) a extrahovaná RNA byla kvantifikována pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher).

3.1.1.2 Příprava knihoven pro sekvenování RNA

Vyizolovaná RNA byla použita pro přípravu sekvenačních knihoven (NEBNext Ultra II RNA Library Prep kit, NEB, USA, postup podle návodu dodavatele) po předchozím odstranění hostitelské ribozomální RNA (např. Ribo Zero Plant Kit (Illumina, USA) nebo RiboMinus Plant Kit for RNA-Seq (Thermo Fisher Scientific, USA), podle návodu dodavatele). Sekvenační knihovny byly připravené s použitím duálních indexů pro zamezení jevu přeskokování indexu („index-hopping“), kdy může docházet k chybné identifikaci jednotlivých čtení během procesu sekvenování. RNA knihovny byly připraveny a sekvenovány na přístrojích NovaSeq 6000 nebo HiSeq 4000 (Illumina, USA) (150-bp, obousměrné sekvenování).

3.1.1.3 Bioinformatické hodnocení HTS dat

K bioinformatickému zpracování jsme použili program CLC Genomics Workbench (Qiagen, Hilden, Německo) a Geneious (Biomatters, Nový Zéland). Po ořezání a kontrole kvality byla čtení použita pro *de novo* sestavení delších kontigů z neredundantních čtení pomocí CLC assembleru (*de novo* assembly) s výchozími možnostmi: word size 20, bubble size 50, simple contig sequences minimum length 200 nt. Anotace těchto kontigů byla provedena pomocí algoritmu BLASTX s výchozími možnostmi thread 1, word size 11, match 2, mismatch 3, gap cost existence 5, extension 2) a lokální databáze obsahující všechny proteiny virového původu (jako základ lze použít filtraci a stažení sekvencí pomocí nástroje: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/virus?SeqType_s=Protein&SourceDB_s=RefSeq).

3.1.1.4 Diagnostické postupy

a. Rostlinný materiál a extrakce RNA

Vzorky vrcholů výhonů byly zpracovány pomocí GeneJET Plant RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), koncentrace a kvalita extrahované RNA byla stanovena pomocí NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Extrakt RNA byly přepsány do cDNA pomocí sady RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) s použitím náhodných primerů podle pokynů výrobce. Následná analýza RT-PCR a RT-qPCR (tabulka 1) byla provedena buď pomocí Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), nebo PPP Master Mix (Top-Bio, Vestec, Česká republika). Jako vnitřní kontrola extrakce a amplifikace RNA byla použita mRNA NADH (*Malus domestica*). Produkty PCR byly vyhodnoceny elektroforézou v 1,5% agarózovém gelu. Vybrané produkty byly přímo sekvenovány podle Sangera. Vybrané produkty byly klonovány do klonovacího vektoru pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific, USA) a vzniklé pDNA konstrukty byly následně sekvenovány. Všechny získané sekvence byly uloženy do databáze NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Tabulka 1. Použité primery

Cílová sekvence	Název primeru	Sekvence primeru (5'-3')	Použití	Citace
<i>Malus domestica</i> NADH mRNA	2277	TGCTCCATGGATCTCATCGG	RT-qPCR, RT-PCR; kontrola amplifikace RT-qPCR, RT-PCR	Várallyay <i>et al.</i> 2022
	2278	AATCGAGGGCTATGCGGATC		
AHVd	2115	CTGCCGAAACAGAGGTTGGA		
	2116	GAGAAGTCGCTCTCTCTCGC		
ALV-1	3290	GAAGAAGGCGAGCGACCTTGA		
	2528	GATACCGTGCCTTGACGCCGAG		
CCGaV	2526	AGAGATTGATCTGATGGATGTTACT		
	2564	GGATCCCTTAATGATTGAAATAGCACA		
ARWV1	3505	AGCTTTTCTACTGTGGTCACT		Tato metodika
	3506	TGGCATTAAATCCATCGTATGC		
SnIV-1	2696	TTTGGGTTTGTAGCCGAATC		
	2697	TTACCTCCGAGATCAACGTC		
ACLSV	2486	CCTTCATGGAAAGACAGGGG	RT-PCR	Petrzik K. nepublikováno
	2487	GCAAATTCAGTCTGTAAAAG		
ApMV	2488	TTGAGCAGTCGAGAAGTGAC		
	2489	CTCGTTATCACGTACAAATCC		
ASGV	2401	CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTC		
	2402	GGAATTTACACGACTCCTAACCTCC		
ASPV	2404	TGGAACCTCATGCTGCA	He <i>et al.</i> 2015	
	2405	TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA		
				Ji <i>et al.</i> 2013

b. Diagnostika virů pomocí RT-qPCR

Testy RT-qPCR byly provedeny na detekčním systému CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Reakce o objemu 10 µl byly připraveny z 5 µl desetkrát zředěné cDNA, 0,25 µl primerů (konečná koncentrace 250 nM, tabulka 1), 2,75 µl vody bez nukleázy a 2 µl směsi 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estonsko).

Reakční podmínky byly následující: 95 °C po dobu 12 min a 40 cyklů 95 °C po dobu 10 s, 60 °C po dobu 20 s a 72 °C po dobu 20 s. Analýza disociační křivky teploty tání byla provedena nárůstem z 65 °C na 95 °C (0,5 °C/ 5 s), aby se ověřila specifičnost amplifikace primerů a přítomnost jejich potenciálních dimerů. Pro ověření možné křížové kontaminace a přítomnosti genomové DNA byly zahrnuty negativní a NTC (no template control) kontroly. Jako vnitřní endogenní kontrola pro rostlinný materiál byla použita NADH mRNA (tabulka 1).

Data byla analyzována pomocí softwaru Bio-Rad CFX Maestro 1.1 (Bio-Rad) a softwaru R verze 4.1.0 pod programem RStudio verze 2021.09.1+372.

3.1.2 Popis nových virů a viroidů zjištěných pomocí NGS

U odrůd Selenia a Jonagored Supra jsme zjistili apple hammerhead viroid (AHVd; Serra *et al.* 2018) ve smíšené infekci se solanum nigrum ilarvirus 1 (SnIV-1; Ma *et al.* 2020). AHVd a SnIV-1 pozitivní kultivary nevykazovaly žádné specifické příznaky na listech a výhonech, a to ani při samostatné, ani při smíšené infekci. Některé vzorky podnoží M9 byly pozitivní na citrus concave gum-associated virus (CCGaV, čeleď *Phenuiviridae*), apple luteovirus 1 (ALV-1, čeleď *Luteoviridae*) a obsahovaly sekvence apple rubbery wood virus 1 (ARWV1, čeleď *Phenuiviridae*). Výskyt AHVd, ALV-1, ARWV1, CCGaV a SnIV-1 nebyl v ČR před zahájením prací na projektu zaznamenán. Námi testované odrůdy jabloně byly bez virů povinně testovaných v certifikačním schématu EPPO (Anonym 1999).

AHVd, ARWV1, CCGaV, SnIV-1 a ALV-1 jsou pro ČR nové patogeny v jabloni. Po jejich prvním popisu v zahraničí byly díky používání metody NGS zaznamenány velmi rychle v řadě dalších zemí. Apple hammerhead viroid (AHVd, *Pelamoviroid*; čeleď *Avsunviroidae* (Serra *et al.* 2018)) byl identifikován na jabloních v Číně (Zhang *et al.* 2014). Jeho výskyt byl spojený se symptomy zahrnujícími rozštěpení kmene, mozaiku, nekrózu, pokles výhonů a odumírání. Byl též zaznamenán u různých odrůd jabloní v Kanadě (Messmer *et al.* 2017), USA, Japonsku, Itálii, Španělsku a na Novém Zélandu (Szostek *et al.* 2018; Wright *et al.* 2020), Jižní Koreji (Lim 2019), Indii (Nabi 2020), Tunisku (Hamdi 2022), České republice a Maďarsku (Varallyay *et al.* 2022). Tyto údaje naznačují, že AHVd je v současné době celosvětově rozšířen a je zapotřebí dalšího výzkumu pro stanovení potenciální škodlivosti u odrůd jabloní a možných způsobů jeho eliminace z rozmnožovacího materiálu jabloní.

ARWV1 byl poprvé popsán v USA (Rott *et al.* 2018), následně v Evropě (Fontdevila Pareta *et al.* 2022, Minutolo *et al.* 2023) a Číně (Hu *et al.* 2021).

CCGaV byl poprvé v genofondu jabloní zaznamenán v USA (Wright *et al.* 2018), následně v Brazílii (Nickel *et al.* 2021, 2023), Číně (Liu *et al.* 2021), Itálii (Minutolo *et al.* 2021), Kalifornii (Diaz-Lara *et al.* 2022), v České republice a v Maďarsku (Varallyay *et al.* 2022) a v Kanadě (Xiao *et al.* 2022).

SnIV-1 byl poprvé popsán ve Francii v planě rostoucích rostlinách *Solanum nigrum* (Ma *et al.* 2020). O jeho první detekci v jabloni informovali Xiao *et al.* (2022) na základě průzkumu v kanadské Britské Kolumbii, kteří v údolí Okanagan identifikovali několik sekvencí SnIV-1 během testování chřadnoucích stromů metodou NGS. Jejich sekvence MN216370.1, MN216373.1 a MN216376.1 vykazují 97–98% identitu s českými izoláty. Náš nález SnIV-1 u jabloně je první v Evropě. Přirozený okruh hostitelských rostlin SnIV-1 může být široký, protože v databázi GenBank je izolát SnIV-1, který hostí *Physalis* sp. (přístupová čísla OL472060-OL472062).

ALV-1 (čeleď *Tombusviridae*, rod *Luteovirus*) byl objeven pomocí HTS na jabloních postižených rychlým šířením choroby rychlého odumírání jabloní (Liu *et al.* 2018). Onemocnění se rozvíjí postupně a začíná odbarvením listů a praskáním kmene. Růst stromů je silně ovlivněn a nakonec dochází k jejich rychlému úhynu. Kromě Severní Ameriky byl ALV-1 zaznamenán v Koreji (Liu *et al.* 2021), Řecku (Malandraki *et al.* 2020) a v Belgii (Fontdevila Pareta *et al.* 2022).

3.2 Postupy ozdravování pomocí biotechnologických *in vitro* metod

Pro systém ozdravování sloužící k produkci výchozích *in vitro* rostlin je třeba mít k dispozici vhodně vybavenou *in vitro* laboratoř. Pro sterilizaci roztoků a agarových pěstebních médií je nutné sterilizační zařízení, např. parní tlakový autokláv. Obvykle se sterilizuje 20–25 min při 121 °C a tlaku 100 kPa. Pro sterilizaci pracovních nástrojů (skalpely, pinzety) je vhodná horkovzdušná sušárna, která využívá působení suchého horkého vzduchu. Při naší práci nastavujeme teplotu na 160 °C a dobu sušení na 2 hod. Dále doporučujeme zařízení pro přípravu demineralizované vody reverzní osmózou. Tato voda slouží pro přípravu zásobních roztoků pro výrobu agarem zpevněných kultivačních médií.

Pro růst *in vitro* kultur je nutná kultivační místnost s řízenou teplotou a osvětlením. Pasážování a následný přenos *in vitro* rostlin na čerstvá média je nutno provádět v aseptickém prostředí „flow boxu“ s proudícím filtrovaným vzduchem. Flow box umožňuje zachovat materiál sterilní při manipulaci (pasážování) mimo kultivační nádobu. Kryoterapie je prováděna ve specializované laboratoři, která je certifikována pro práci s kapalným dusíkem. Tato laboratoř by měla být vybavena bezpečnou ventilací, zásobníkem na kapalným dusík typu Dewarovy nádoby s vakuovou izolací, programovatelným zamrazovačem a případně i diferenčním skenovacím kalorimetrem (DSC) pro sledování fázových přechodů v průběhu zamrazování a odtávání.

Na pracovišti VŠÚO Holovousy bylo v laboratorním úseku provedeno ozdravování pomocí *in vitro* chemoterapie u odrůd jabloně Jonagored, Selena a Šampion a pomocí *in vitro* kultur u podnože M9. Kryoterapie s použitím *in vitro* explantátů byla uplatněna u odrůdy Golden Delicious, přičemž výchozí *in vitro* kultury byly před vlastním zamrazením kultivovány v úseku *in vitro* laboratoře.

3.2.1 Zakládání výchozích *in vitro* kultur jabloně a multiplikace

Pro založení výchozích *in vitro* kultur jabloně je možno využít dormantní výhony odebrané v době vegetačního klidu po skončení fyziologické dormance, ideálně v lednu až březnu, přímo z rostlin ověřených v polních podmínkách z hlediska odrůdové pravosti. Pro usnadnění založení *in vitro* kultury lze také použít matečnici z odrůd vybraných pro ozdravování, které naroubujeme v technicky izolovaném skleníku na bezvirozní podnože jako takzvaný depozitář primárních zdrojů (foto 1). Tento depozitář je chráněn před další virovou infekcí, ke které by jinak mohlo dojít u rostlin v polních podmínkách. Dále pak nejsou rostliny v technické izolaci vystaveny v takové míře působení mikroorganismů rozšířených v polních výsadbách, což usnadňuje sterilizaci a snižuje riziko kontaminací nasazených explantátů.

Kromě období vegetačního klidu lze odebírat a vypreparovat aktivně rostoucí růstové vrcholy v případě potřeby i v období intenzivního prodlužovacího růstu na počátku vegetace, nejlépe od poloviny dubna do poloviny června, a to přímo ze stromů v polních podmínkách.

Pro uchování odrůdové stability doporučujeme zakládat *in vitro* kultury z vegetačních vrcholů. Tyto kultury pak pěstujeme na pevném agarovém médiu ve formě aktivně rostoucích mnohonásobných prýtů s diferencovaným růstovým vrcholem. Vzrostlý vrchol v *in vitro* kultuře má obdobný růst a vývoj, včetně zachovalé strukturální organizace, jako vrchol u rostliny rostoucí ve venkovních podmínkách. Je tak umožněno geneticky uniformní množení výchozích rostlin pro ozdravování. K účelům praktického ozdravování nedoporučujeme méně

organizované kalusové nebo buněčné kultury vzhledem k riziku chromozomální a genetické nestability.



Foto 1. Depozitář primárních zdrojů jabloně

Pro uchování odrůdové stability doporučujeme zakládat *in vitro* kultury z vegetačních vrcholů. Tyto kultury pak pěstujeme na pevném agarovém médiu ve formě aktivně rostoucích mnohonásobných prýtů s diferencovaným růstovým vrcholem. Vzrostlý vrchol v *in vitro* kultuře má obdobný růst a vývoj jako vrchol u rostliny rostoucí ve venkovních podmínkách, včetně zachovalé strukturální organizace. Tímto způsobem je umožněno ozdravování geneticky uniformních výchozích rostlin. K účelům praktického ozdravování nedoporučujeme méně organizované kalusové nebo buněčné kultury vzhledem k riziku chromozomální a genetické nestability.

Při zakládání *in vitro* kultury výhony promyjeme pod čistou tekoucí vodou. Tím dojde k odstranění části mikrobiální flóry, která přežívá na povrchu výhonů ve venkovních podmínkách a způsobuje následně kontaminace po založení *in vitro* kultury. Po provedení šikmého řezu na spodní straně ponoříme výhony do vody a necháme je rašit 2 až 3 týdny při pokojové teplotě. Z rašících vegetačních pupenů s diferencovaným růstovým vrcholem vypreparujeme ve sterilním prostředí flow boxu vrcholy o velikosti 5–10 mm. Tím dojde k odstranění šupin pupenů, částí listů a jiných povrchových struktur bránících sterilizaci.

Pro založení *in vitro* kultury růstových vrcholů nejsou vhodné květní pupeny, protože obsahují převážně základ květu s několika listy, nikoliv základ letorostu s diferencovaným růstovým vrcholem. Jako sterilizační činidlo pro sterilizaci primárního rostlinného explantátu lze využít různé chemické prostředky (chlorid rtuťnatý, chlornan sodný) s přídavkem smáčedla. Na základě našich výsledků doporučujeme jako sterilizační činidlo chlorid rtuťnatý

v koncentraci 0,15 % se sterilizační dobou jedna minuta. Jako smáčedlo lze použít i přídavek několika kapek běžně užívaných komerčně vyráběných prostředků na mytí nádobí (Jar). Smáčedlo je důležité, protože umožňuje snazší proniknutí sterilizačního činidla do potenciálně kontaminované oblasti, například mezi jen částečně rozvinuté listy výchozího explantátu. Zbytky sterilizačního činidla po skončení sterilizace z explantátů opláchneme sterilní destilovanou vodou. Po ukončení sterilizační procedury nasadíme počáteční explantáty na pevné agarové médium. Pro odhalení případných kontaminací nežádoucími mikroorganismy je *in vitro* kultury nutné vizuálně sledovat nejméně po dobu jednoho měsíce. V *in vitro* kultuře se mohou během následného pasážování objevit zpočátku skryté mikrobiální kontaminace.

Sterilizace počátečního explantátu pro založení *in vitro* kultur jabloně v našich pokusech proběhla úspěšně. Uvedeným postupem se podařilo odstranit vnější bakteriální nebo houbové kontaminace z počátečních explantátů s 93,5% úspěšností. Všechny kontaminované kultury byly vyřazeny a zlikvidovány. Nekontaminované explantáty byly přeneseny na médium pro prorůstání a množení (foto 2).

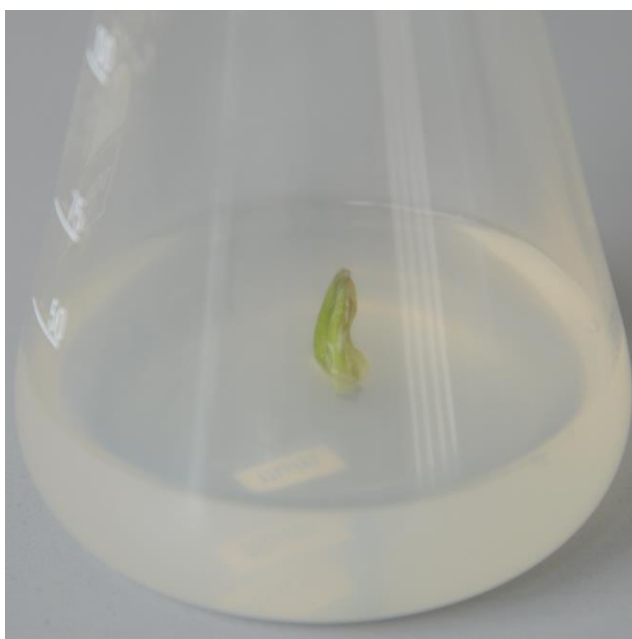


Foto 2. Nově nasazená explantátová kultura jabloně

Pro většinu rostlin z čeledi růžovitých včetně jabloně lze použít jako výchozí pro *in vitro* kultivaci médium typu MS podle Murashige a Skoog (1962) s modifikovaným přídavkem fytohormonů jako regulátorů růstu, vitamínů a cukrů. Celkové složení modifikovaného média typu MS je uvedeno v tabulce 2. Do média doporučujeme přidávat též antioxidant: např. kyselinu askorbovou v množství $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$.

Po sterilizaci a získání nekontaminovaných výchozích explantátů probíhá fáze multiplikace na médiu s převahou fytohormonů cytokininů stimulujících dělení buněk a tvorbu nových prýtů cílového genotypu. V multiplikačním médiu by měla být vyšší koncentrace cytokininů než auxinů. Cytokininy (např. benzylaminopurin (BAP) či thidiazuron (TDZ)) podporují regeneraci rostlin. Vhodně nastavená koncentrace pomáhá kontrolovat morfogenezi a vývoj rostlin s kvalitním olistěním a diferencovaným vrcholem.

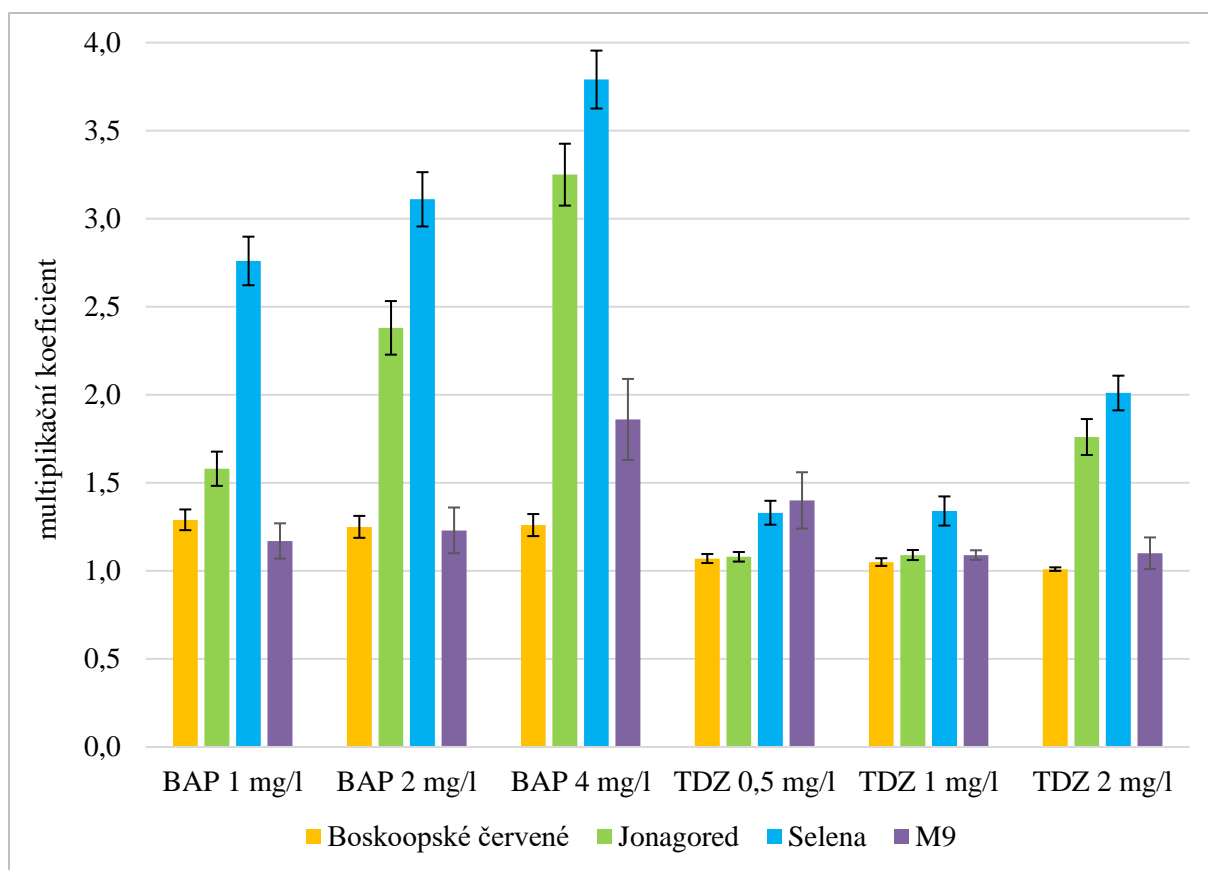
Tabulka 2. Výchozí médium typu MS pro kultivaci *in vitro* kultur

Složka	mg·l ⁻¹	Složka	mg·l ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
KNO ₃	1900	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,3
H ₃ BO ₃	6,2	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8
KH ₂ PO ₄	170	Thiamin	0,1
KI	0,83	Pyridoxin	0,5
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	Kyselina nikotinová	0,5
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	Glycin	2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	Sacharóza	30000
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	Myo-inositol	100
MnSO ₄ · H ₂ O	16,9	Agar	8500
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	pH	5,7

V průběhu kultivace je vhodné zjistit koeficient multiplikace pro zjištění a porovnání schopnosti množení. Koeficient vypočítáme jako průměrný počet nových výhonů (délky nejméně 10 mm) na výchozí explantát po 1 měsíci růstu v kultivační místnosti. Rychlost množení je důležitá pro termín zahájení a pro naplánování průběhu ozdravovacích terapií. Přítomnost vyšší koncentrace antivirotika v médiu během chemoterapie nebo průběh kryoterapie jsou silné stresové vlivy, které mohou v *in vitro* kultuře vést k významnému odumírání a ztrátám jednotlivých rostlin. Proto doporučujeme mít před zahájením vlastního ozdravování k dispozici stovky *in vitro* rostlin. Nalezení vhodné koncentrace regulátorů růstu, která stimuluje buněčné dělení a tvorbu axilárních meristémů, je základem pro úspěšnou ozdravovací *in vitro* terapii. Výsledky množení dosažené u tří odrůd jabloně a podnože M9, vybraných pro ozdravování v našich pokusech, jsou uvedeny grafu. V pokusech byl pro vyhodnocení přesnosti odhadu průměru základního souboru vypočítán SE (Standard Error, Standardní chyba) jako míra variance.

U odrůd Jonagored a Seleny se podařilo získat dostatečné množství nekontaminovaného výchozího rostlinného materiálu pro navazující chemoterapeutické experimenty. U podnože M9 a u odrůdy Boskoopské červené byly pozorovány nízké multiplikační koeficienty, tudíž doba potřebná pro dostatečné namnožení kultur byla výrazně delší než u odrůd Jonagored a Seleny.

Na základě námi dosažených výsledků doporučujeme pro indukci multiplikace u testovaných odrůd jabloně samostatně BAP v nejvyšší testované koncentraci 4 mg·l⁻¹. Dá se předpokládat, že ještě vyšší koncentrace BAP by vyvolala i zvýšení multiplikačního koeficientu. Z důvodu nižšího multiplikačního koeficientu se pro iniciaci multiplikace neosvědčil fytohormon TDZ. Odborníkovi v oboru jsou známy i další postupy zakládání výchozích *in vitro* kultur jabloně a multiplikace, které mohou vést k obdobnému výsledku.



Graf. Multiplikace *in vitro* kultur jabloní na médiích s přidavkem cytokininů

3.2.2 Ozdravovací proces

Ozdravování pomocí biotechnologických *in vitro* metod bylo v našich pokusech u jabloně provedeno ve třech modifikacích. Jednotlivé metodické kroky jsou definovány níže v kapitolách popisujících exstirpaci meristemické oblasti u *in vitro* explantátu a metody chemoterapie a kryoterapie.

3.2.2.1 Exstirpace meristemické oblasti

Pro produkci bezvirózního množitelského materiálu podnože M9 infikované virem z rodu *Blunervirus* (Várallyay *et al.* 2022) byla z důvodu nižší *in vitro* multiplikace, znemožňující rychlé získání dostatečného počtu explantátů pro chemoterapeutické zásahy, využita tzv. exstirpace formou aseptického oddělení a následné regenerace meristemické oblasti rostliny. Metoda je založena na principu, že se virové částice z vaskulárního systému rostliny do intenzivně se dělicího vrcholového meristému dostávají velmi pomalu. Tato oblast růstových buněk nebývá přímo napojena na cévní svazky, které představují hlavní cesty šíření patogenů. Meristémových buněk je však málo (řádově nižší desítky), jsou těžko oddělitelné od viry infikovaných buněk a i při dosažené regeneraci hrozí riziko somaklonální genetické nestability, pokud se na regeneraci podílel i nediferencovaný kalus. Přitom platí obecné pravidlo, že se zmenšující se velikostí výchozího explantátu stoupá pravděpodobnost získání viruprostého jedince. Na druhou stranu však, se zmenšující se velikostí, klesá pravděpodobnost přežití a úspěšné regenerace izolovaného vegetačního vrcholu (Novák 1990).

Výchozí materiál slabě rostoucí podnože pro jabloně M9 byl pro účely pokusů v našem projektu importován jako certifikovaný materiál z Nizozemska bez virů uvedených v certifikačním schématu EPPO (Anonym 1999). Certifikace proběhla dle nizozemského certifikačního schématu produkce rozmnožovacího materiálu jabloně ve vyšším stupni kvality Elite, která má zajistit lepší zpětnou sledovatelnost celého řetězce produkce až k výchozí matečné rostlině. Metodika testování NGS použitá v našem projektu prokázala ve výchozím množitelském materiálu přítomnost AHVd, ALV-1, ARWV1, CCGaV a SnIV-1. Materiál nicméně splňuje podmínky certifikačního schématu EPPO pro jabloně (Anonym 1999).

Intenzivně rostoucí vrcholky o velikosti 5–10 mm byly z výchozích podnoží, umístěných pro narašení v karanténní části skleníku ve VŠÚO Holovousy v depozitáři primárních zdrojů pod protihmyzovou sítí (foto 1), odebrány v průběhu června a sterilizovány postupem popsáním v podkapitole 3.2.1. Pod binokulárním mikroskopem pak byla provedena vlastní exstirpace vzrůstného vrcholu o velikosti 1–2 mm, obsahujícího meristematickou oblast (foto 3 a 4).

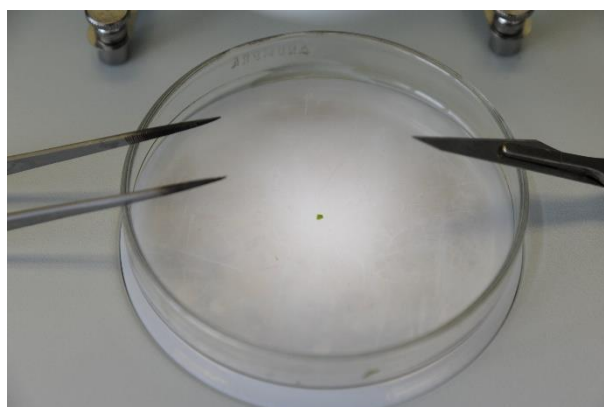


Foto 3 a 4. Preparace vzrůstného vrcholu podnože M9 pod binokulárním mikroskopem

Pro nasazení izolovaných vrcholků a jejich regeneraci bylo stejně jako v případě multiplikace výchozích explantů používáno MS médium (Murashige a Skoog 1962). Z celkových 88 vrcholků se 4 podařilo regenerovat. Tyto byly namnoženy postupem popsáním v kapitole 3.2.1 v části multiplikace, a následně byl zjištěn zdravotní stav jednotlivých meriklonů. Negativně testované byly poté zakořeněny *in vitro* podle technik popsanych v této metodice. Metodu exstirpace meristematické oblasti doporučujeme zejména u genotypů s nižším multiplikačním koeficientem, který neumožňuje získat dostatečné množství rostlin pro ozdravovací procedury formou chemoterapie.

3.2.2.2 Chemoterapie

Chemoterapie probíhá při obvyklé pěstební teplotě 21 až 24 °C v běžné kultivační místnosti v množství desítek opakování na několika metrech čtverečních laboratoře v kultivační místnosti, což zefektivňuje celý proces. Použití chemoterapie proti virovým infekcím není doporučováno u experimentů prováděných u zakořeněných rostlin ve volné půdě. Běžný cyklus *in vitro* chemoterapie trvá 7 až 30 dní. Při ozdravování pomocí chemoterapie *in vitro* kultur se po fázi kultivace na médiu s antivirotikem odebírá část *in vitro* vrcholu s meristematickou oblastí. Toto je založeno na předpokladu, že většina virů není schopna infikovat nově se tvořící primární dělivé pletivo v oblasti vegetačního vzrostného vrcholu. Apikální meristém je tvořen vnitřním korpusem a vnější tunikou. Nediferencované pletivo vzrostného vrcholu není protkáno vodivými svazky, čímž je částečně chráněno před systémově se šířící virovou infekcí. Z výše uvedeného lze odvodit, že kromě antivirotického působení chemoterapeutika a zpomalení replikace viru vede i aseptická izolace meristematického pletiva z růstového vrcholu rostliny a jeho další kultivace k zisku viruprostých explantátů (Kúdela *et al.* 1989, Polák *et al.* 2009).

Během chemoterapie rostliny trpí stresy, které mohou mít za následek nízkou míru přežití nebo abnormální morfologii. I když *in vitro* kultury přežijí chemoterapeutické ošetření, další vývoj a regenerační schopnost mohou být inhibovány. Citlivost druhů a genotypů na chemoterapii je velmi odlišná a intenzita poškození do značné míry závisí i na fyziologickém stavu rostlin (Sedlák a Paprštejn 2017, Magyar-Tábori *et al.* 2021). Zejména u antivirotických látek cílících na nukleovou kyselinu viru může dojít i k nespecifickému účinku na DNA ozdravované hostitelské rostliny.

V našich pokusech byly při chemoterapii zkoumány a testovány tři chemické látky s potenciálně antivirovými vlastnostmi v *in vitro* kultuře rostlin. Jednalo se o antivirotika rimantadin, zidovudin a ribavirin, použité v rozsahu koncentrací 20 až 1 280 mg·l⁻¹.

Ribavirin

Svým antivirovým účinkem širokospektrální syntetický analog guanosinu, někdy též uváděný pod starším názvem virazol (Sidwell *et al.* 1972, Huffman *et al.* 1973). Chemicky se jedná o 1-beta-D-ribofuranosyl-1-2-4-triazole-carboxamid (Faccioli a Marani 1998).

Rimantadin

Chemicky je to cyklický amin 1-(adamantan-1-yl)ethan-1-amin. Na trhu je rovněž pod obchodním názvem Flumadine (Hannoun 1988). Přesný mechanismus účinku rimantadinu není plně objasněn. Jeho účinek je předpokládán v inhibici replikačního cyklu viru nebo případně v inhibici tvorby obalového proteinu viru. Předpokládá se ale i možnost inhibice RNA syntézy jako takové.

Zidovudin (azidothymidin, AZT)

Patří do třídy antiretrovirálních inhibitorů reverzní transkriptázy. Chemicky se jedná o syntetický nukleosidový analog 3'-azido-3'-deoxythymidin (Wright 1986, Tochikura *et al.* 1989). V oblasti ovocných druhů byl podle Pavelkové (2015) úspěšný proti třem RNA virům peckovin, *Prune dwarf virus* (PDV), *Plum pox virus* (PPV) a *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), s vyšší účinností než referenční ribavirin.

Kultivační podmínky při chemoterapii byly stejné jako při multiplikačním procesu. Rostliny byly po ukončení jednoměsíčního ozdravovacího procesu a dvouměsíční regeneraci

testovány na přítomnost virů a viroidu v projektu použitými diagnostickými metodami RT-PCR a NGS. V našich pokusech se úspěšnost ozdravování chemoterapií významně lišila od 0 do 100 % v závislosti na genotypu, koncentraci antivirotika a infekci konkrétním virem a viroidem.

Na základě našich výsledků můžeme pro ozdravování od viru SnIV-1 doporučit všechna zmíněná antivirotika, čili ribavirin, rimantadin i zidovudin, a to již v nejnižších zkoumaných koncentracích ($20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), protože terapie všemi třemi látkami vedly k vymizení patogenu z rostlinného materiálu. Kromě toho však bylo zjištěno, že k postupné eliminaci tohoto viru vede i dlouhodobé pasážování explantátů v *in vitro* podmínkách bez chemoterapie. Proti viroidu AHVd se rimantadin ani zidovudin neosvědčil. Účinnost ribavirinu vzrůstala s rostoucí koncentrací (tabulka 3), ovšem jeho fytotoxicita způsobila, že dávku vyšší než $160 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ už nepřežívaly explantáty žádného ze zkoumaných genotypů (foto 5).

Tabulka 3. Příklad chemoterapeutického zásahu proti viroidu AHVd u odrůdy Šampion

Koncentrace ribavirinu	$20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$			$40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$			$80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$			$160 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$			$320 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$			$640 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$			$1280 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$		
Průběh a výsledek *	V	P	Z	V	P	Z	V	P	Z	V	P	Z	V	P	Z	V	P	Z	V	P	Z
	10	10	1	10	8	4	10	3	2	10	3	0	10	0	-	10	0	-	10	0	-

* V = počet výchozích klonů, P = počet přeživších po měsíční terapii, Z = počet ozdravených

S ohledem na optimální poměr mezi terapeutickým účinkem a přežitím kultur lze doporučit množství $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a vyšší, pokud bude použitelnost takových koncentrací potvrzena zkouškami fytotoxicity u konkrétního ozdravovaného druhu a genotypu.



Foto 5. Příznaky vysoké fytotoxicity při koncentraci $160 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ribavirinu

3.2.2.3 Kryoterapie

Aplikaci kryoterapie na růstové vrcholy obvykle přežívají buňky meristemické zóny s malými vakuolami a vyšším nukleo-cytoplazmatickým poměrem (Wang *et al.* 2008). Tyto buňky jsou odolnější vůči dehydrataci, která brání tvorbě ledových krystalů v buňkách během zmrazování (Benson 2008). Kryoterapie kapalným dusíkem nevratně poškozuje diferencované buňky, zatímco meristemické buňky přežívají a jsou schopny dělení a regenerace na nové rostliny s vysokou pravděpodobností dosažení bezvirového stavu.

Na základě našich pokusů doporučujeme modifikovaný postup kryoprezervace, který se používá u ovocných rostlin z čeledi růžovité zejména pro jahody (Majathoub 2005, Höfer 2011). Vzhledem k rozmanitosti potenciálně ozdravovaných genotypů však lze předpokládat, že pro různý biologický materiál bude vhodné postup mírně upravit.

Explantátové kultury rostoucí cca 2 měsíce v kultivační místnosti se přesunou do chlazené komory či inkubátoru se simulací krátkého dne s výrazně sníženou noční teplotou: 8 hodin světlo při 22 °C, 16 hodin tma při -1 °C. Po 2 týdnech této aklimatizace se z výhonů za pomoci stereoskopického mikroskopu sterilně vypreparují vzrostné vrcholky o velikosti 1–2 mm, a tyto se umístí na Petriho misky se standardním živným médiem obohaceným o 5% obsah dimethylsulfoxidu (DMSO). Po dobu dalších 2 dnů jsou misky drženy v aklimatizační komoře; uprostřed této periody je vhodné vrcholky v rámci misky přesadit, protože z narušených pletiv často vytékají roztoky obsahující fenolické látky. Následně se vrcholky na 30 min ponoří do kryovialky s roztokem loading solution (LS), který obsahuje 184 g·l⁻¹ glycerolu a 171 g·l⁻¹ sacharózy v tekutém živném médiu MS (tj. bez agaru). Roztok LS je poté vyměněn za 0,75 ml roztoku plant vitrification solution 2 (PVS2), který sestává z 368 g·l⁻¹ glycerolu, 167 g·l⁻¹ ethylenglykolu, 156 g·l⁻¹ dimethylsulfoxidu a 54,8 g·l⁻¹ sacharózy v tekutém médiu. V tomto roztoku lze materiál nechat buď 30 min při pokojové teplotě, nebo cca 2,5 hod na ledu. Následně se kryovialky zamrazují ponořením do kapalného dusíku.

Doba uchování v kapalném dusíku teoreticky není shora nijak omezena. Po vytažení kryovialek se provede jejich skokové rozmrazení ponořením do vodní lázně o teplotě 40 °C na 1 min. Roztok PVS2 se následně nahradí roztokem unloading solution (ULS), což je sacharóza rozpuštěná v tekutém médiu v koncentraci 410 g·l⁻¹. Po 20 min se roztok odsaje, vrcholky se vysuší na sterilním filtračním papíru a vysazují se na obvyklé živné médium. Během prvního týdne po rozmrazení je třeba materiál udržovat ve tmě, dále jej lze kultivovat při standardních podmínkách. Regenerace plnohodnotných výhonů z rozmrazených vrcholků trvá několik měsíců (foto 6 a 7).

Naše výsledky naznačují, že úspěšnost kryoterapie se může mezi různými odrůdami lišit. U Golden Delicious jsme zaznamenali vymizení infekce ApMV a ACLSV a viditelné zlepšení celkového zdravotního stavu příslušných kultur, zatímco paralelní pokus o ozdravení odrůdy Tábora od týchž virů pomocí téhož kryoprezervačního protokolu k eliminaci infekcí nevedl.

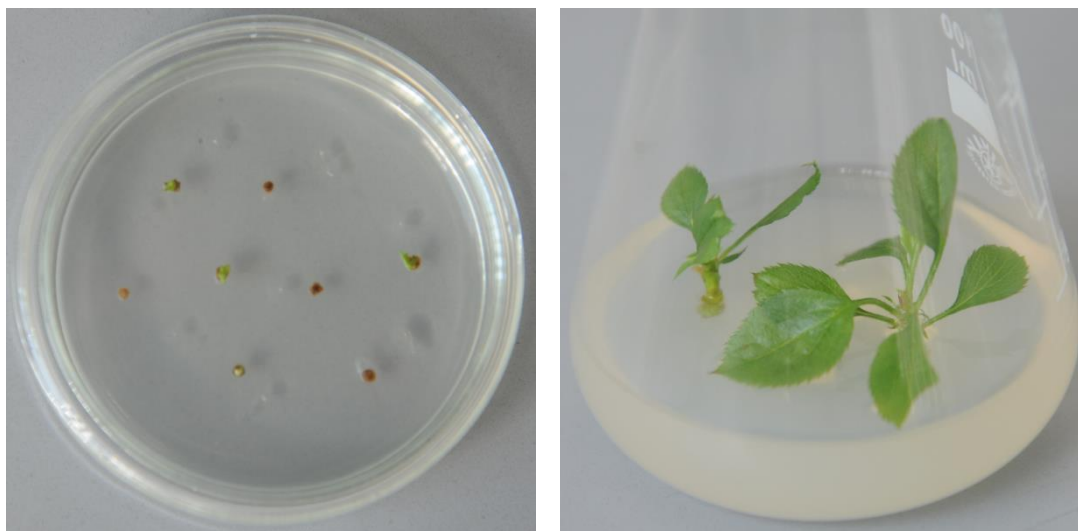


Foto 6 a 7. Regenerující vzrostné vrcholky 2 týdny a 5 měsíců po rozmrazení

3.2.3 Zakořenění ozdravených rostlin a převod do nesterilních podmínek

Zdravé rostliny získané v procesu ozdravování převádíme po namnožení v podmínkách *in vitro* kultur na kořenící média typu MS s obsahem fytohormonů auxinů pro indukci kořenění. Cytokininy z kořenících médií zcela vyloučíme.

3.2.3.1 Indukce kořenění

V *in vitro* podmínkách se podařilo navodit kořenění explantátů jabloní Selená, Jonagored a Šampion na polovičním MS médiu. Ze tří studovaných auxinů IAA, NAA a IBA v koncentracích 1 mg/l se auxin NAA ukázal být pro navození tvorby kořenů neúčinnějším, ale indukoval i nadměrný vývoj kalusů. Zejména u odrůdy Jonagored by mohlo být vhodné přidávat do zakořeňovacích médií látky, které tvorbě kalusu brání, např. aktivní uhlí nebo floroglucinol. Termolabilní auxiny (NAA) přidáváme dodatečně v koncentraci 1 mg·l⁻¹ po sterilizaci v parním tlakovém sterilizátoru přes mikrobiální mikrofiltry.

Při postupném převodu *in vitro* rostlin do běžných kultivačních podmínek se pro aklimatizaci osvědčil kultivační box s řízenou teplotou (22 °C ve dne a 18 °C v noci, světelný režim 16 hodin světlo, 8 hodin tma) a standardizované rašelinové tablety typu Jiffypot. V první fázi aklimatizace doporučujeme umístit rostliny do miniskleníku s regulovatelným odvětráváním, které slouží k postupnému snižování vlhkosti ze 100 % na hodnoty běžné vzdušné vlhkosti 45 až 50 %.

3.2.3.2 Interpretace dosažených výsledků ozdravování

a. *Eliminace solanum nigrum ilarvirus 1*

Ribavirin, rimantadin i zidovudin eliminovaly SnIV-1 u všech odrůd jabloní. Všechna antivirotika byla účinná již při koncentraci 20 mg·l⁻¹.

c. *Eliminace apple hammerhead viroid*

Eliminace AHVd ze všech odrůd jableň byla možná, i když obtížnější než eliminace SnIV-1. Ribavirin byl účinný v koncentracích 20, 40 a 80 mg·l⁻¹ u odrůdy Šampion a v koncentraci 160 mg·l⁻¹ u odrůd Selena a Jonagored Supra, zatímco rimantadin a zidovudin nebyly účinné vůbec. Po sanitaci chemoterapií bylo možné získat rostliny, které byly negativní na SnIV-1 a AHVd zjištěné v původních rostlinách.

Eliminace viroidů z infikovaných rostlin je v posledních desetiletích výzvou, a ve snaze vyléčit rostlinná pletiva z viroidové infekce byly testovány různé přístupy jako termoterapie, chladová terapie, tkáňové kultury, mikroroubování *in vitro* a kryoterapie (Barba *et al.* 2017). Zatímco u apple scar skin viroid (ASSVd) byla úspěšně použita kultivace růstových vrcholů výhonů v kombinaci s chladovou nebo tepelnou terapií (Desvignes *et al.* 1999, Hu *et al.* 2015), literatury o použití chemoterapie k eliminaci viroidů je velmi málo (Wang *et al.* 2022).

Rozsah koncentrací antivirotik v našich pokusech byl stanoven od 20 mg·l⁻¹ do 1280 mg·l⁻¹, aby se řešila potenciální fytotoxicita rimantadinu a zidovudinu, která dosud nebyla u odrůd jableň testována. Počet přežívajících meriklonů se snižoval se zvyšující se koncentrací ribavirinu a rimantadinu, avšak v případě ribavirinu byla zjištěná fytotoxicita 160 mg·l⁻¹ nečekaně nízká ve srovnání s 80 mg·l⁻¹ ribavirinu. Na základě výsledků eradikace předpokládáme, že při dávce 160 mg·l⁻¹ dosáhla eliminace viroidu AHVd nejvyšší účinnosti, proto mohl být fytotoxický účinek pro vyšší počet klonů převážen přínosem potlačení replikace viroidu a poklesem koncentrace viroidové RNA. Opakované testy na AHVd byly provedeny po 7–11 měsících. V literatuře doporučený interval pro ověření eliminace virům podobných patogenů je minimálně 4–6 měsíců (Bettoni *et al.* 2022).

Z nedávného přehledu Wang *et al.* (2022) je zřejmé, že viroidy infikující jableň je obtížné eliminovat pomocí terapie výhonů (Hu *et al.* 2015b) nebo samotné chemoterapie (Hu *et al.* 2022). Kombinace termoterapie (Hu *et al.* 2017) nebo chemoterapie (Hu *et al.* 2015a) s následnou kultivací výhonů se ukázaly jako mnohem účinnější pro eradikaci rostlinných patogenů než samotná kultura výhonů. Bettoni *et al.* (2022) úspěšně eliminovali 25–75 % AHVd z podnoží jableň *in vitro* pomocí termoterapie v kombinaci s kryoterapií. Naše výsledky však ukazují použití samostatné chemoterapie s 48% eliminací AHVd ribavirinem jako použitelné v laboratořích, kterým chybí nákladné vybavení pro kryoterapii. Na rozdíl od Hu *et al.* (2022), kteří shledali ribavirin neúčinným pro eliminaci apple scar skin viroidu, přinesly naše výsledky důkaz, že ribavirin lze účinně použít u jableň pro odstranění infekce AHVd.

Úspěšná eliminace ilarviru SnIV-1 z odrůd jableň pomocí zidovudinu a rimantadinu v našich pokusech dobře koresponduje s výsledky Pavelkové *et al.* (2015) a Kudělkové *et al.* (2015, 2017). Pavelková *et al.* (2015) úspěšně aplikovali zidovudin pro 100% eliminaci PDV, PNRSV (ilarviru podobného SnIV-1) a PPV z broskvoní cv. 'Red Haven' v koncentracích 25 mg·l⁻¹ a 50 mg·l⁻¹, a zaznamenali tak vyšší účinnost ozdravení než při použití referenčního ribavirinu v koncentraci 20 mg·l⁻¹. Kudělková *et al.* (2017) zjistili, že rimantadin v koncentracích 25 a 50 mg·l⁻¹ je podobně účinný jako ribavirin ve stejných koncentracích pro 80–90% eliminaci PDV, PNRSV a PPV z infikovaných odrůd broskvoní. Vzhledem k tomu, že SnIV-1 je nový virus, který byl teprve nedávno zjištěn v infikovaných jableňích (Xiao *et al.* 2022), nejsou k dispozici údaje o pokusech o jeho odstranění z jableň nebo jiných kulturních plodin.

4. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

1. V České republice nebyla zatím publikována rychlá, přesná a komplexně využitelná metodika produkce ozdravených odrůd jabloně s využitím moderních diagnostických postupů NGS.
2. Jednotlivé metodické postupy popisují na základě vlastního, řešitelským týmem provedeného výzkumu, nejdůležitější fáze NGS diagnostiky a ozdravovacího cyklu od testování zdravotního stavu výchozích rostlin infikovaných viry až po kořenění a převod ozdravených jedinců do *ex vitro* podmínek a jejich retesty. Jsou definovány pracovní postupy tak, aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků v celém na sebe navazujícím cyklu testování a ozdravování.
3. Využití diagnostiky NGS pro získání vysoce kvalitního zdravého rozmnožovacího materiálu odrůd jabloní pro agrární sektor je zcela nový postup. Jedinečnost metodiky spočívá v tom, že zdravotní stav jabloní v technických izolátech a rozmnožovacích materiálech nebyl v ČR dosud pomocí NGS zkoumán. Výsledky uplatnění NGS jednoznačně ukazují zcela novou kvalitu při odhalování nových, dosud nezjištěných patogenů, jako předpokladu získání zdravějšího a kvalitnějšího rozmnožovacího materiálu odrůd i podnoží jabloní, v souladu se světovým trendem.
4. Zcela novým poznatkem je zjištění AHVd, ALV-1, ARWV1, CCGaV a SnIV-1, patogenů, které nebyly v ČR dosud zaznamenány, a ověření či návrh nových kombinací primerů pro jejich PCR detekci.
5. Nová je i úspěšná chemoterapie AHVd ribavirinem, při které není ve srovnání s termoterapií potřeba technicky náročné a drahé zařízení pro přesnou a dlouhodobou regulaci vysoké teploty na 34 °C nebo vyšší.
6. Kryoterapie představuje novou metodu eliminace virových patogenů pomocí působení ultra nízkých teplot dosahovaných v kapalném dusíku. 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 sníženo riziko reinfekce již ozdraveného materiálu na minimum. *In vitro* ozdravování je možno provádět bez ohledu na vegetační období celoročně.

5. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Certifikovaná metodika produkce ozdravených odrůd jabloně s využitím NGS 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.

Využití nového detekčního systému NGS se předpokládá zejména v rostlinolékařství, v odborech diagnostiky a eliminace škodlivých organismů rostlin. Přesná identifikace virových a subvirových patogenů může pomoci množitelům a následně i sadařům snížit ekonomické ztráty. Dále pro vědecké a výzkumné účely v oblasti ochrany ovocných druhů vůči virovým a subvirovým patogenům.

Pro testování diagnostickým systémem NGS a následné ozdravování jsme vybrali odrůdy perspektivní pro pěstování v České republice a odrůdy domácího původu. Viruprosté

rostliny původních českých odrůd nelze získat v zahraničí. Získané zdravé základní rostliny budou po opakovaném retestování moderními diagnostickými metodami v budoucnu zahrnuty do systému certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu. V projektu dosažené poznatky napomůžou snížit ztráty na výnosech ve výsadbách ovocných dřevin. Tím dojde k zefektivnění ovocnářské produkce. Zdravý výchozí materiál bude poskytován na komerčním základě školkařským podnikům a pěstitelům ovoce. Pěstování bezvirózních odrůd jabloně zaručuje do budoucna konkurenceschopnost, založenou na vysoké kvalitě a výnosech.

6. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Díky včasné a správné identifikaci virových a subvirových patogenů a použití zdravého rozmnožovacího materiálu mohou být uživatelé schopni minimalizovat produkční a finanční ztráty v oblasti množení a pěstování našeho ekonomicky nejvýznamnějšího ovocného druhu jabloně.

Z hlediska ekonomických přínosů u budoucích uživatelů výsledků předpokládáme nárůst tržeb v odvětví školkařské a ovocnářské produkce. V letech 2012 až 2015 byly průměrné tržby z produkčních sadů jabloně 813 mil. Kč. Tento druh byl v roce 2015 pěstován na 7 975 ha. Průměrné tržby na 1 ha 101 943 Kč. Očekáváme rozšíření ozdravených odrůd v nových intenzivních výsadbách na ploše alespoň na 2,0 % tj. 159 ha. Tržby budou cca 16,2 mil. za rok, za 5 let 81,0 mil. Kč. Tržby za výrobu výsadbového materiálu. Průměrný počet stromků na 1 ha intenzivní výsadby navrhujeme 1000 ks. Cena za 1 stromek je cca 100 Kč. Na 1 ha jsou tržby za výsadbový materiál 100 000 tis. Kč, respektive na 159 ha 15,9 mil. Kč. Celkové tržby za ozdravené jabloně pak budou 96,9 mil. Kč. Použité zdroje: Podklady pro výpočet byly čerpány ze Situační a výhledové zprávy – Ovoce 2017 (Buchtová I. 2017, MZe, Praha).

Předpokládáme i zvýšení exportu v návaznosti na pěstování ozdravených odrůd s vyššími výnosy a vyšší kvalitou. Dále počítáme s exportem výpěstků jabloně na zahraniční trhy.

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.
- Barba M., Hosakawa M., Wang Q.-C., Taglienti A., Zhang Z. (2017): Viroid elimination by thermotherapy, cold therapy, tissue culture, *in vitro* micrografting, or cryotherapy. In: Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Palukaitis P. (Eds.): *Viroids and satellites*. *Academic Press*, Oxford: 425–436. ISBN: 9780128014981.
- Benson E.E. (2008): Cryopreservation of phytodiversity: A Critical appraisal of theory & practice. *Critical Reviews in Plant Sciences* 27: 141–219.
- Bettoni J.C., Fazio G., Carvalho Costa L., Hurtado-Gonzales O.P., Rwahni M.A., Nedrow A., Volk G.M. (2022): Thermotherapy followed by shoot tip cryotherapy eradicates latent viruses and apple hammerhead viroid from *in vitro* apple rootstocks. *Plants* 11: 582.
- Buchtová I. (2017): Situační a výhledová zpráva ovoce. *Ministerstvo zemědělství*, Praha, 88 s. ISBN: 978-80-7434-676-7.
- Buchtová I. (2022): Situační a výhledová zpráva ovoce. *Ministerstvo zemědělství*, Praha, 90 s. ISBN: 978-80-7434-676-7.

- Desvignes J.C., Grasseau N., Boyé R., Cornaggia D., Aparicio F., Di Serio F., Flores R. (1999): Biological properties of apple scar skin viroid: isolates, host range, different sensitivity of apple cultivars, elimination, and natural transmission. *Plant Disease* 83(8): 768–772.
- Diaz-Lara A., Wunderlich L., Nouri M., Golino D., Al Rwahnih M. (2021): Incidence and detection of negative-stranded RNA viruses infecting apple and pear trees in California. *Journal of Phytopathology* 169.
- Faccioli G. a Marani F. (1998): Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi A. *et al.* (ed): *Plant Virus Disease Control. APS Press, St. Paul*: 346–381. ISBN: 978-0890541913.
- Fontdevila Pareta N., Lateur M., Steyer S., Blouin A.G., Massart S. (2022): First reports of apple luteovirus 1, apple rubodvirus 1 and apple hammerhead viroid infecting apples in Belgium. *New Disease Reports* 45: e12076.
- Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W. (2011): Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. *The American Phytopathological Society Press, St Paul*, 429 s. ISBN: 978-0-89054-501-0.
- Hamdi I., Soltani R., Baraket G.; Varsani, A.; Najar, A. (2022): First report of apple hammerhead viroid infecting ‘Richared Delicious’ apple (*Malus domestica*) in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* 104: 811–812.
- Hannoun C. (1988): Rimantadine in the prevention and treatment of influenza A. *Revue de Médecine Interne* 9(5): 554–558.
- He Y., Yang Z., Hong N., Wang G., Ning G., Xu W. (2015): Deep sequencing reveals a novel closterovirus associated with wild rose leaf rosette disease: a novel virus associated with rose disease. *Molecular Plant Pathology* 16: 449–458.
- Höfer M. (2011): Conservation strategy of genetic resources in Germany. *Acta Horticulturae* 908: 421–430.
- Hu G.-J., Dong Y.-F., Zhang Z.-P., Fan X.-D., Ren F., Zhou J. (2015a): Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 121: 435–443.
- Hu G.-J., Zhang Z.-P., Dong Y.-F., Fan X.-D., Ren F., Zhu H.-J. (2015b): Efficiency of virus elimination from potted apple plants by thermotherapy coupled with shoot-tip grafting *Australasian Plant Pathology* 44: 167–173.
- Hu G.-J., Dong Y.-F., Zhang Z.-P., Fan X.-D., Ren F., Li Z.-N. (2017): Efficacy of virus elimination from apple by thermotherapy coupled with *in vivo* shoot-tip grafting and *in vitro* meristem culture. *Journal of Phytopathology* 165: 701–706.
- Hu G.-J., Dong Y.-F., Zhang Z.-P., Fan X.-D., Ren F., Lu X. (2021): First report of apple rubbery wood virus 1 in apple in China. *Plant Disease* 105(11): 3770.
- Hu G.-J., Dong Y.-F., Zhang Z.-P., Fan X.-D., Ren F. (2022): Inefficiency of ribavirin to eliminate apple scar skin viroid from apple plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 151: 189–197.
- Huffman J.H., Sidweell R.W., Khare G.P., Witkowski J.T., Allen L.B., Robins R.K. (1973): *In vitro* effect of 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 3: 235–241.

- Ji Z., Zhao X., Duan H., Hu T., Wang S., Wang Y., Cao K. (2013): Multiplex RT-PCR detection and distribution of four apple viruses in China. *Acta Virologica* 57: 435–441.
- Kreuze J.F., Perez A., Untiveros M., Quispe D., Fuentes S., Barker I., Simon R. (2009): Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388(1): 1–7.
- Kudělková M., Čechová J., Ondrušiková E., Baránek M. (2015): Use of antivirals for carlavirus elimination in *Allium sativum* L. *Acta Horticulturae* 1083: 589–594.
- Kudělková M., Pavelková R., Ondrušiková E. (2017): Virus elimination in peach using chemotherapy. *Acta Horticulturae* 1155: 431–438.
- Kúdela V. *et al.* (1989): Obecná fytopatologie. *Academia Praha*, 387 s. ISBN: 80-200-0156-5.
- Lim S., Moon J.S., Cho I.S., Kim H.R., Lee S.H. (2019): First report of apple hammerhead viroid infecting apple trees in South Korea. *Plant Disease* 103: 2700.
- Liu H., Wu L., Nikolaeva E., Peter K., Liu Z., Mollov D., Cao M., Li R. (2018): Characterization of a new apple luteovirus identified by high-throughput sequencing. *Virology Journal* 15: 85.
- Liu Z., Dong Z., Zhan B., Li S. (2021): Characterization of an isolate of citrus concave gum-associated virus from apples in China and development of an RT-RPA assay for the rapid detection of the virus. *Plants* 10: 2239.
- Ma Y., Marais A., Lefebvre M., Faure C., Candresse T. (2020): Metagenomic analysis of virome cross-talk between cultivated *Solanum lycopersicum* and wild *Solanum nigrum*. *Virology* 540: 38–44.
- Magyar-Tábori K., Mandler-Drienyovszki N., Hanász A, Zsombik L., Dobránszki J. (2021): Phytotoxicity and other adverse effects on the *in vitro* shoot cultures caused by virus elimination treatments: reasons and solutions. *Plants* 10: 670
- Majathoub M.A. (2005): Development of cryopreservation techniques for strawberry *Fragaria x ananassa* Duchesne. Ph. Thesis. *University of Derby*, Great Britain.
- Malandraki I.; Beris D.; Vassilakos N.; Varveri C. (2020): First report of apple luteovirus 1 in apple trees in Greece. *Plant Disease* 104, 2530.
- Messmer A., Sanderson D., Braun G., Serra P., Flores R., James D. (2017): Molecular and phylogenetic identification of unique isolates of hammerhead viroid-like RNA from ‘Pacific Gala’ apple (*Malus domestica*) in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 39: 342–353.
- Minutolo M., Cinque M., Chiumenti M., Di Serio F., Alioto D., Navarro B. (2021): Identification and characterization of citrus concave gum-associated virus infecting citrus and apple trees by serological, molecular and high-throughput sequencing approaches. *Plants* 10: 2390.
- Minutolo M., Cinque M., Di Serio F., Navarro B., Alioto D. (2023): Occurrence of apple rubbery wood virus 1 and apple rubbery wood virus 2 in pear and apple in Campania (southern Italy) and development of degenerate primers for the rapid detection of rubodviruses. *Journal of Plant Pathology* 105.
- Murashige T. a Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.

- Nabi S.U. a Baranwal V.K. (2020): First report of apple hammerhead viroid infecting apple cultivars in India. *Plant Disease* 104: 3086.
- Nickel O., Fajardo T.V.M., Candresse T. (2021): First report on occurrence of apple hammerhead viroid in apples in Brazil. In *Proceedings of the XXXII Congresso Brasileiro de Virologia: Virologia em Casa 32*. Belo Horizonte, Brazil, 19–23 October 2021.
- Nickel O., Grynberg P., Fajardo, T.V.M. (2023): Detection of multiple viruses and viroid in apple trees in Brazil and their possible association with decline. *Australasian Plant Disease Notes* 18: 10.
- Novák F. (1990): Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. *Academia ČAV*, Praha: 208 s. ISBN: 80-200-0344-4.
- Pavelková R., Kudělková M., Ondrušiková E., Eichmeier A. (2015): Virus elimination in peach cv. 'Red Haven' by chemotherapy. *Agricultural Communications* 3(2): 16–20.
- Polák J., Paprštejn F., Křížan B. *et al.* (2009): Metodika ozdravování odrůd ovocných stromů a révy vinné od virů pomocí termoterapie a *in vitro* kultur. *VŠÚO Holovousy*, 68 s.
- Rott M.E., Kesanakurti P., Berwarth C., Rast H., Boyes I., Phelan J., Jelkmann W. (2018): Discovery of negative-sense RNA viruses in trees infected with apple rubbery wood disease by next-generation sequencing. *Plant Disease* 102(7): 1254–1263.
- Sedlák J. a Paprštejn F. (2017): Fytotoxicita antivirotika ribavirin u *in vitro* kultur třešně. *Vědecké práce ovocnářské* 25: 123–127.
- Serra P., Messmer A., Sanderson D., James D., Flores R. (2018): Apple hammerhead viroid-like RNA is a bona fide viroid: Autonomous replication and structural features support its inclusion as a new member in the genus *Pelamoviroid*. *Virus Research* 249: 8–15.
- Sidwell R.W., Huffman J.H., Share G.P., Allen L.B., Witkowski J.T., Robins P.K. (1972): Broad spectrum antiviral activity of virazole 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177: 705–706.
- Szostek S.A., Wright A.A., Harper S.J. (2018): First report of apple hammerhead viroid in the United States, Japan, Italy, Spain, and New Zealand. *Plant Disease* 102: 2670.
- Tochikura T.S., Nakashima H., Yamamoto N. (1989): Antiviral agents with activity against human retroviruses. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2(5): 441–447.
- Wang M.-R., Bi W.-L., Bettoni J.C., Zhang D., Volk G.M., Wang, Q.-C. (2022): Shoot tip cryotherapy for plant pathogen eradication. *Plant Pathology* 71: 1241–1254.
- Wang Q., Cuellar W.J., Rajamäki M.-L., Hirata Y., Valkonen J.P.T. (2008): Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: Relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology* 9: 237–250.
- Winkowska L., Grimová L., Ryšánek P. (2016): Quantitative detection of four pome fruit viruses in apple trees throughout the year. *Phytopathologia Mediterranea* 55: 207–224.
- Wright A.A., Szostek S.A., Beaver-Kanuya E., Harper S.J. (2018): Diversity of three bunya-like viruses infecting apple. *Archives of Virology* 163: 3339–3343.
- Wright A.A.; Cross A.R., Harper, S.J. (2020): A bushel of viruses: Identification of seventeen novel putative viruses by RNA-seq in six apple trees. *PLoS ONE* 15: e0227669.
- Wright K. (1986): AIDS therapy. First tentative signs of therapeutic promise. *Nature* 323(6086): 283.

- Xiao H., Hao W., Storoschuk G., MacDonald J.L., Sanfaçon H. (2022): Characterizing the virome of apple orchards affected by rapid decline in the Okanagan and Similkameen valleys of British Columbia (Canada). *Pathogens* 11(11): 1231.
- Zhang Z., Qi S., Tang N., Zhang X., Chen S., Zhu P. *et al.* (2014): Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms. *PLoS Pathogens* 10: e1004553.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

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

Výsledky byly zatím zveřejněny v následujících publikacích:

- Koloňuk I., Příbylová J., Fránová J., Špak J. (2020): Genomic characterization of *Malus domestica* virus A (MdoVA), a novel velarivirus infecting apple. *Archives of Virology* 165(2): 479–482.
- Špak J., Příbylová J., Koloňuk I., Lenz O., Sedlák J., Paprštejn F., Jiroutová P. (2020): Testování jabloní na přítomnost virů metodou nové generace sekvenování. *Zahradnictví* 19(8): 35–37.
- Sedlák J. a Příbylová J. (2021): Založení a možnosti využití *in vitro* kultur jabloňové podnože M9. *Vinař–sadař* 2: 60–62.
- Sedlák J. a Semerák M. (2021): Multiplikace odrůd jabloně v kultuře *in vitro*. *Zahradnictví* 20(7): 36–38.
- Sedlák J. (2022): Využití chemoterapie proti virovým chorobám ovocných druhů. *Vědecké práce ovocnářské* 28(1): 38–46.
- Sedlák J. a Semerák M. (2022): Kořenění odrůd jabloně v kultuře *in vitro*. *Zahradnictví* 21(6): 15–17.
- Várallyay E., Příbylová J., Galbacs Z.N., Jahan A., Varga T., Špak J., Lenz O., Fránová J., Sedlák J., Koloniuk I. (2022): Detection of apple hammerhead viroid, apple luteovirus 1 and citrus concave gum-associated virus in apple propagation materials and orchards in the Czech Republic and Hungary. *Viruses* 14(11): 2347.
- Sedlák J., Semerák, M., Rejllová 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. ISSN: 2076-3417, DOI:10.3390/app13137527.
- Sedlák J., Příbylová J., Koloňuk I., Špak J., Lenz O., Semerák M. (2023): Elimination of solanum nigrum ilarvirus 1 and apple hammerhead viroid from apple cultivars using antivirals ribavirin, rimantadine, and zidovudine. *Viruses* 15(8): 1684.



v y d á v á

OSVĚDČENÍ

UKZUZ 203081/2023

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 produkce ozdravených odrůd jabloně s využitím NGS**

Autor/autoři: Ing. Jiří Sedlák, Ph.D.; prof. Ing. Josef Špak, DrSc.; Mgr. Matěj Semerák;
Ing. Jaroslava Příbylová, Ph.D.; Mgr. Igor Koloňuk, Ph.D.

Název organizace/cí: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ
HOLOVOUSY s.r.o.
Biologické centrum AVČR, v.v.i.**

Místo vydání: **Holovousy**
Rok vydání: **2023**

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe ČR NAZV č. QK1910065 „Nové přístupy k produkci ozdravených odrůd jabloní s využitím diagnostiky NGS patogenů“.

Brno 23. 11. 2023

Osvědčení ze dne 22. 11. 2023, pod čj.: UKZUZ 202163/2023 se **ruší**.

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 produkce ozdravených odrůd jabloně
s využitím NGS**

Vydal:

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

1. vydání, 2023

ISBN 978-80-87030-92-9 (online; pdf)

<https://doi.org/10.60615/ygwf-vc33>



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

© 2023