



VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV  
OVOČNÁ SKÝ HOLOVOUSY s.r.o.

ESKÁ ZEM D LSKÁ UNIVERZITA  
V PRAZE

**METODIKA ZVÝŠENÍ VÝT ŽNOSTI  
GENOTYP Z HYBRIDNÍHO OSIVA  
T EŠNÍ**

**Pavol Suran a kol.**



**CERTIFIKOVANÁ  
METODIKA  
2023**

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

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Metodika zvýšení výtěžnosti genotypů z hybridního  
osiva třešní**

**Pavol Suran a kol.**



**CERTIFIKOVANÁ METODIKA**

**2023**

**Autorský kolektiv:**

Pavol Suran<sup>1</sup>, Ivona Žďárská<sup>1</sup>, Kateřina Pazderů<sup>2</sup>, Tereza Bydžovská<sup>1</sup>, Lubor Zelený<sup>1</sup>

<sup>1</sup>VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o.,  
Holovousy 129, 508 01 Holovousy

<sup>2</sup>Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra agroekologie a rostlinné produkce, Kamýcká 129, 165 00 Praha – Suchdol, Česká republika

**Kontakt na vedoucího autorského kolektivu:**

pavol.suran@vsuo.cz

**Autoři fotografií a obrázkových schémat:**

kolektiv autorů

**Odborný oponent:**

Ing. Tomáš Nečas, Ph.D., Mendelova univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici, Ústav ovocnictví

**Oponent ze státní správy:**

Ing. David Beneš, ÚKZÚZ Oddělení trvalých kultur, ZS Přerov nad Labem

**Název: Metodika zvýšení výtěžnosti genotypů z hybridního osiva třešně**

**Dedikace:**

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QK1910290 s názvem „Rozvoj a aplikace molekulárně genetických metod pro racionalizaci šlechtitelských postupů třešně (*Prunus avium* L.)“.

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

**ISBN 978-80-87030-95-0 (online; pdf)**

<https://doi.org/10.60615/j47b-js31>



## **OBSAH**

<b>Cíl metodiky .....</b>	<b>4</b>
<b>Vlastní popis metodiky .....</b>	<b>5</b>
<b>Globální význam třesně ptačí a inovace šlechtitelských postupů.....</b>	<b>5</b>
<b>Materiál a metody .....</b>	<b>7</b>
Rostlinný materiál .....	7
Fenotypové hodnocení .....	7
Příprava substancí .....	8
<b>Předsklizňové ošetření.....</b>	<b>8</b>
Vyhodnocení předsklizňového ošetření .....	8
<b>Posklizňové ošetření.....</b>	<b>11</b>
Ošetření osiva v laboratoři .....	11
Vyhodnocení ošetření.....	11
Metoda embryo rescue .....	12
Vyhodnocení metody .....	13
<b>Závěrečné shrnutí doporučení.....</b>	<b>26</b>
<b>Srovnání novosti postupů.....</b>	<b>27</b>
<b>Popis uplatnění certifikované metodiky .....</b>	<b>28</b>
<b>Ekonomické aspekty.....</b>	<b>29</b>
<b>Seznam použité související literatury .....</b>	<b>30</b>
<b>Seznam publikací, které předcházely metodice.....</b>	<b>32</b>
<b>Dedikace .....</b>	<b>32</b>

## ÚVOD

Metodika poskytuje podrobný pohled na problematiku šlechtění třešní, zaměřující se především na výzvy spojené s klíčivostí embryí, a to jak u raných, tak i pozdních odrůd. Řeší se komplexní problém šlechtění třešní s analýzou environmentálních faktorů ovlivňujících kvalitu a klíčivost embryí. Zvláštní pozornost je věnována metodám šlechtění, které zahrnují předsklizňové ošetření třešní chemickými stimulanty, posklizňové ošetření embryí, a využití techniky embryo rescue. Hlubkově jsou zkoumány faktory jako dormance embryí a jejich reakce na různé šlechtitelské postupy.

Šlechtitelské programy se snaží vyvinout nové odrůdy, které by splňovaly požadavky trhu, zahrnující vysokou a pravidelnou plodnost, odolnost k environmentálním škodám a patogenům, vzhled a kvalitu plodů, a prodloužení sezónnosti. Zvláštní důraz je kladen na rané a pozdní dozrávání, aby se rozšířila dostupnost třešní během celého roku. Výzkum také ukazuje, že vyšlechtění nové odrůdy je zdlouhavý proces, který může trvat více než 30 let, s nízkou úspěšností v počátečních fázích.

Efektivitu procesu šlechtění je možné zvýšit různými metodami, včetně využití opylovacích stanů s hmyzími opylovači, optimalizace podmínek stratifikace embryí, a použití technik *in vitro*. Významnou roli hraje i rovnováha mezi různými typy hormonů v regulaci dormance. Nízká vitalita embryí a jejich klíčivost jsou však stále hlavními problémy.

Zvláštní pozornost je věnována raným odrůdám, které mají často nízkou klíčivost kvůli nedostatečnému vývoji embryí. Zde se ukazuje metoda embryo rescue jako účinná pro získání kvalitního hybridního materiálu. Úspěch v pěstování třešní je komplexní záležitostí, která vyžaduje koordinaci genetického výzkumu, environmentálního managementu a porozumění fyziologickým procesům.

Šlechtění třešní je dlouhodobý a složitý proces, který vyžaduje multidisciplinární přístup, inovativní metody a hluboké porozumění genetickým a environmentálním faktorům ovlivňujícím klíčivost a kvalitu embryí. Cílem je vyvinout odrůdy, které splňují různé požadavky trhu, zároveň respektující biologické a ekologické limity.

## CÍL METODIKY

Šlechtění třešní je zdlouhavý a finančně i prostorově náročný proces vyžadující velký objem lidské práce. Hlavním omezujícím faktorem šlechtění je nízká kvalita embryí a velice nízká klíčivost hybridního třešňového osiva, která je mnohonásobně nižší než např. u jabloní. Schopnost dopěstovat semenáče z hybridního osiva třešní je základní podstatou fungujícího šlechtitelského programu. Z toho důvodu byla zpracována metodika popisující možnosti, jak podpořit vývoj kvalitních embryí během zrání plodů, zvýšit klíčivost a úspěšnost dopěstování nových genotypů třešní. V metodice jsou popsána předsklizňová ošetření třešní s rannou a pozdní dobou zrání chemickými stimulanty přímo na stromech, posklizňové ošetření embryí pomocí podpůrných látek a metoda embryo rescue u raně zrající odrůdy.

## VLASTNÍ POPIS METODIKY

### *Globální význam třešně ptačí a inovace šlechtitelských postupů*

Třešně (*Prunus avium* L.) jsou jedním z nejdůležitějších a nejoblíbenějších ovocných druhů mírného klimatického pásma s rostoucí globální poptávkou a inovativními šlechtitelskými programy, které se snaží odpovědět na různé potřeby pěstitelů i spotřebitelů (Proietti *et al.*, 2019).

Patří mezi plodiny se stále se zvyšující celosvětovou produkcí: 1,9 milionů tun v roce 2000 s nárůstem na 2,77 milionů tun v roce 2021 (FAOSTAT, 2022). Největšími pěstiteli z pohledu sklizně jsou Turecko, Spojené státy americké a Chile, které zajišťují zhruba polovinu celosvětové produkce. V České republice se v letech 2015-2021 sklídilo průměrně téměř 9,2 tis. tun tohoto ovoce za rok (Buchtová and Němcová, 2022).

Třešně se nejčastěji konzumují bez úpravy bezprostředně po sklizni, hojně se však využívají i jako surovina při pečení, kompotují se, či se z nich vyrábí marmeláda. Třešně mají využití i ve výrobě nápojů, a to jak nealkoholických (např. ovocné šťávy), tak i alkoholických (likéry, destiláty).

Na světě existují nižší tisíce odrůd, jen informační systém genetických zdrojů pro USA eviduje 827 různých položek třešně ptačí (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2023). Jsou však stále šlechtěny a registrovány nové odrůdy. Současné šlechtitelské programy třešní se zaměřují na produkci nových genotypů, které vykazují vynikající vlastnosti v širokém rozmezí znaků preferovaných různými prvky produkčního, zpracovatelského a prodejního řetězce, konzumenty nevyjímaje. Mezi tyto vlastnosti patří jak fenologické charakteristiky, jako je doba zrání, tak pomologické znaky, např. velikost, barva či pevnost plodů.

Šlechtitelské programy jsou relativně mladé, datují se od začátku 20. století (Quero-Garcia, 2017). Tyto programy čelí komplexním výzvám: jako je třeba šlechtění odrůd, které zohledňují potřeby různých článků dodavatelského a odbytového řetězce i spotřebitelů. Mezi hlavní cíle šlechtění patří vysoká a pravidelná plodnost, samosprašnost, nižší náchylnost k environmentálním škodám a patogenům, vzhled a kvalita plodů, a také prodloužení sezónnosti s důrazem na rané i pozdní dozrávání. Zejména se klade důraz na prodloužení sklizňového období, což je možnost, jak navýšit dostupnost třešní během celého roku. Třešně zpravidla dozrávají v období 8 týdnů, ale kvalitních odrůd zrajících v prvních a posledních dvou týdnech tohoto období je nedostatek. Proto se věnuje pozornost šlechtění odrůd zrajících v tomto období, nebo dokonce dříve (Quero-Garcia, 2019). V kontextu výše uvedeného se šlechtitelé snaží vyšlechtit odrůdy, které by splňovaly tuto poptávku (Žďárská a Suran, 2021).

Vyšlechtění nové odrůdy je zdlouhavý proces, který může trvat od opylení květu po komerční dostupnost více jak 30 let. Tento proces je náročný zejména ve svých počátečních fázích. Data od Quero-Garcia (2019) například ukazují, že během 11 opylovacích sezón bylo opyleno 266 115 květů, ale z toho bylo získáno pouze 12 488 plodů (4,1 % úspěšnost). Z těchto plodů bylo vyprodukováno pouze 2 625 hybridních semenáčků, což představuje účinnost celého šlechtitelského procesu jen 0,99 %.

Efektivitu procesu šlechtění je možné zvýšit různými metodami. Asanica *et al.* (2016) například uvádí, že lze použít opylovací stany s hmyzími opylovači, plody z volného sprášení

kvalitních odrůd, optimalizaci podmínek stratifikace embryí před výsevem a následným klíčením, či použití technik *in vitro* pro metodu embryo rescue u raně plodících třešní.

Hlavním problémem celého procesu šlechtění třešní je nízká vitalita embryí a jejich nízká klíčivost. Kvalita embryí je ovlivněna podmínkami prostředí během jejich vývoje. Čím je termín kvetení ranější a okolní teplota nižší, tím je kvalita a klíčivost embryí nižší (Braak, 1978). Silným inhibičním faktorem klíčení, zejména u peckového ovoce, je dormance embryí (Stein *et al.*, 2020). Dormance je ovlivňována různými faktory, včetně fyziologických, morfologických a environmentálních (Baskin and Baskin 2004; Şan *et al.*, 2014). Dormanci je možné ovlivnit různými metodami, jako jsou stratifikace nebo působení chemických či tzv. PGRs látek (Stein *et al.*, 2020; Nečas *et al.*, 2019; Řezníček, 2014). Tyto metody jsou však efektivní pouze v případě dobře vyvinutého embrya, kdežto u raných odrůd třešní, u kterých jsou embrya často nedovyvinutá, je jejich použití téměř neúčinné. U pozdně zrajících odrůd lze ke zvýšení klíčivosti použít chemické ošetření embryí, například kyselinou gibberelovou (GA<sub>3</sub>) (Çetinbaş *et al.*, 2006; Esen *et al.*, 2007; Szabo *et al.*, 2012), rovněž delší období stratifikace může významně zvyšovat celkové procento klíčení (Stein *et al.*, 2020; Gniazdowska *et al.*, 2010). Chemické látky, které mohou inhibovat klíčivost, jsou například kyselina abscisová (ABA), kumariny a jasmonáty (Şan *et al.*, 2014; Ishikura *et al.*, 2001). Na druhé straně mohou hormony jako je kinetin, podporovat klíčení, pokud jsou aplikovány ve správném množství (Selim *et al.*, 1981). Rovnováha mezi různými typy hormonů, jako je ABA a kyselina gibberelová (GA<sub>3</sub>), hraje kritickou roli v regulaci dormance (Chen *et al.*, 2007; Finkelstein *et al.*, 2008). Ethylen a jeho prekurzor ACC (kys. 1-aminocyklopropan-1-karboxylová) mohou vyrovnávat inhibiční efekt ABA na klíčení, pokud jsou aplikovány exogeně (Gniazdowska *et al.*, 2010).

Embrya raných odrůd, jako je například 'Burlat', mají často nízkou klíčivost. Problémem u raných odrůd je fakt, že dozrávání plodů předchází dozrávání embryí, které tak nemají dostatečný čas dosáhnout plné velikosti a fyziologické zralosti, což má za následek jejich odumírání. Získání hybridního materiálu výsevem stratifikovaných embryí je proto u raně zrajících odrůd často téměř nemožné. Z nevyzrálých embryí však lze dopěstovat semenáčky pomocí metody embryo rescue (Fathi *et al.*, 2009; Bridgen, 1994). Založení embryokultury závisí na izolaci embrya bez jeho poškození, formulování vhodné živné půdy a navození kontinuálního embryogenního růstu až po tvorbu semenáčků. Úspěšnost kultury založené z nezralých embryí je silně závislá na vývojovém stádiu, ve kterém se embryo nachází při izolaci. Obecně lze říct, čím vyšší vývojové stádium embrya, tím jednodušší je pěstování *in vitro*. Rovněž je důležité zabránit abortu embrya ještě během dozrávání plodů, a proto je potřeba získat embrya z plodů před jejich sklizňovou zralostí (Blažková *et al.*, 2003; Lang, 2019; Stanys, 1997).

V konečném důsledku je úspěch v pěstování třešní komplexní záležitostí, která vyžaduje pečlivou koordinaci genetického výzkumu, environmentálního managementu a pochopení fyziologických procesů (Tosun and Koyuncu, 2007).

## ***Materiál a metody***

### **Rostlinný materiál**

Experiment probíhal v letech 2019-2023 na pracovišti VŠÚO Holovousy. Dvě mateřské odrůdy s raným a pozdním dozráváním byly opyleny v kontrolovaných podmínkách s otcovským materiálem v izolátu. Kombinace křížení s S-alelami byly následující: raně dozrávající odrůda ‘Burlat’ (S3S9) × ‘Tamara’ (S1S9); pozdně dozrávající perspektivní genotyp ‘HL 13577’ (S3S4) × ‘Irena’ (S4S6). Kvetoucí větve otcovské komponenty byly umístěny do izolátu v nádobě naplněnou vodou. Úly s čmeláky byly umístěny do izolátů a následné opylení bylo provedeno čmeláky. Pro každou variantu ošetření stromů (Tabulka 1) byl připraven samostatný izolát pro opylení, pokrytý síťovinou proti hmyzu. Pro každou rodičovskou kombinaci třešní byly použity 4 izoláty, celkem pokus tedy probíhal v 8 izolátech po dvou stromech mateřské odrůdy.



**Obrázek 1:** Izolát s mateřskými stromy třešní potažený síťovinou proti hmyzu

### **Fenotypové hodnocení**

Fenotypové hodnocení proběhlo v letech 2019–2023, kdy byly hodnoceny 2 stromy v plodném věku od každé varianty ošetření. Hodnocení bylo zaměřeno na květní násadu stromů. Pro každou variantu byl spočítán počet květů, jejich redukce a podíl získaných plodů po opylení při aplikaci látek podporujících vývoj embryí. Hodnocení bylo provedeno na 6 větvích pro každou variantu ošetření. Tato data byla použita k porovnání efektu variant ošetření na násadu plodů stanovením procenta vyvinutých plodů z květní násady. Úspěšnost sprášení byla určena podle vzorce:  $(SP/KV) \times 100$ , kde SP je počet sklizených vyvinutých plodů a KV znamená počet květů.



## Příprava substancí

Jednotlivé přípravky byly namíchány v laboratoři vždy v litrovém objemu a pro zjednodušení aplikace v porostu byly rozděleny do 50,0 ml plastových uzavíratelných květ. Při aplikaci v sadu byly v zádovém postřikovači vždy ředěny do 10,0 litrů vody, tak, aby koncentrace látek odpovídaly hodnotám uvedených v tabulce 1. Stromy byly ošetřeny čtyřikrát během vývoje plodů. První aplikace proběhla do plného květu (90,0 % květů otevřených), druhá aplikace po odkvětu (opad korunních plátků), třetí a čtvrtá aplikace ve dvoutýdenních intervalech po druhé aplikaci.

**Tabulka 1:** Schéma substancí použitých na před sklizňové ošetření stromů v 10litrových dávkách

Ošetření	Složky
<b>KONTROLA</b>	Pouze voda + 3,0% roztok sacharózy
<b>ALGA 600</b>	0,1% Alga 600 suspenze, extrakt z hnědých řas (Agrobiosfer, s.r.o.) + 3,0% roztok sacharózy
<b>GA<sub>3</sub></b>	0,01 % roztok kys. giberelové GA <sub>3</sub> , (Carl Roth, GmbH) + 3,0% roztok sacharózy
<b>LEXIN</b>	0,08% roztok Lexin (koncentrát huminových kyselin, fulvokyselin a auxinů) (Lexicon plus, s.r.o.) + 3,0% roztok sacharózy

## Před sklizňové ošetření

### Vyhodnocení před sklizňového ošetření

U odrůdy 'Burlat' byl podíl vyvinutých plodů po ošetření GA<sub>3</sub> nejvyšší (21,2 %), což je mírně více ve srovnání s kontrolní hodnotou (19,9 %). Ostatní varianty postřiků, Alga 600 a Lexin + Agrovital, dosáhly podobných hodnot s průměrem 20,3 %, resp. 19,4 %. Rozdíly v průměrném podílu vyvinutých plodů mezi jednotlivými ošetřeními byly v tomto případě minimální.

V případě genotypu 'HL 13577' byly rozdíly mezi ošetřeními výraznější. Varianta ošetření Alga 600 vykázala nejvyšší průměrný podíl vyvinutých plodů (12,3 %), zatímco kontrolní hodnota byla pouze 8,3 %. Varianta Lexin + Agrovital dosáhla podílu 10,4 % a GA<sub>3</sub> pouze 6,4 %. Tato data ukazují, že reakce různých genotypů na stejné postřiky může být velmi odlišná.

**Tabulka 2:** Podíl vyvinutých plodů (v %) po ošetření stromů v sadu dle mateřského genotypu. Zahrnuty jsou všechny plody ještě před vypeckováním a rozdělením do kategorií dle velikosti embryí

<b>Burlat</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>	<b>2021</b>	<b>2022</b>	<b>průměr</b>
<b>GA<sub>3</sub> (kys. giberelová)</b>	62,7	6,1	6,6	9,2	21,2
<b>Alga 600</b>	44,1	16,9	5,1	15,0	20,3
<b>Kontrola</b>	55,2	7,0	3,7	13,5	19,9
<b>Lexin + Agrovital</b>	32,0	25,9	4,8	14,9	19,4
<b>HL 13577</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>	<b>2021</b>	<b>2022</b>	<b>průměr</b>
<b>GA<sub>3</sub> (kys. giberelová)</b>	14,0	4,7	3,0	4,0	6,4
<b>Alga 600</b>	19,6	14,9	1,3	13,3	12,3
<b>Kontrola</b>	24,7	3,2	2,1	3,0	8,3
<b>Lexin + Agrovital</b>	36,3	2,9	1,7	0,7	10,4

Zralé plody byly vypeckovány, pecky byly vydesinfikovány 10,0 % chlornanem sodným (SAVO) po dobu 2 hodin a následně byla z pecek vytlučena embrya i s osemením. Tato byla pro každou variantu ošetření na stromech rozdělena do 4 kategorií podle velikosti:

Kategorie 1 – dobře vyvinuté embryo, vyplňuje celou nebo větší část jamky, dlouhé 7–9 mm

Kategorie 2 – částečně vyvinuté embryo, vyplňuje polovinu jamky, dlouhé 4–6 mm

Kategorie 3 – špatně vyvinuté embryo, vyplňuje čtvrtinu nebo méně jamky, dlouhé 1–3 mm

Kategorie 4 – chybějící embryo nebo pouze zvrásněný obal embrya



**Obrázek 2:** Kategorie vyvinutých embryí podle velikosti

Embrya byla opět desinfikována fenxamidem (500 g/l).

Pro hodnocení vlivu před sklizňového ošetření byly statisticky zpracovány jen výsledky z let 2019 a 2022, které měly dostatečnou vypovídací schopnost a byly statisticky hodnotitelné. Pro hodnocení byl použit balík statistických programů SAS, metoda ANOVA, s podrobnějším vyhodnocením rozdílů mezi průměry Tukey HSD testem.

**Tabulka 3:** Průměrný podíl embryí kategorie 4 (nevitální) po předsklizňovém ošetření v letech 2019 a 2022 dle mateřského genotypu, jako ukazatel účinnosti ošetření při eliminaci nevitálních embryí v plodech

<b>Burlat</b>					
<b>Varianta</b>	<b>Kontrola</b>	<b>Alga 600</b>	<b>Lexin + Agrovital</b>	<b>GA<sub>3</sub></b>	<b>HSD</b>
Podíl kategorie 4	39,4 %	31,8 %	58,6 %	17,7 %	11,6
Průkaznost	B	B	A	C	
<b>HL 13577</b>					
Podíl kategorie 4	22,5 %	20,1 %	18,2 %	15,0 %	9,0
Průkaznost	A	A	A	A	
<b>Oba genotypy společně</b>					
Podíl kategorie 4	31,5 %	26,6 %	35,1 %	16,4 %	7,0
Průkaznost	AB	B	A	C	

Pozn. Nižší podíl nevitálních embryí je lepší.

Rozdíl mezi ročníky byl průkazný v případě mateřské odrůdy ‘Burlat’, průměrně vyšší podíl nedostatečně vyvinutých embryí kategorie 4 byl zjištěn v roce 2019 (45,1 %), v roce 2022 byl podíl nedostatečně vyvinutých embryí 26,1 %. V případě mateřského genotypu ‘HL 13577’ byl rozdíl mezi ročníky neprůkazný. Jelikož cílem předsklizňového ošetření bylo snížit množství nevitálních embryí v plodech (kategorie 4), tabulka 3 demonstruje průměrnou účinnost ošetření na eliminaci nevitálních embryí, která byla zařazena do kategorie 4.

Pro následné hodnocení kvality embryí po předsklizňovém ošetření byla hodnocena klíčivost ve filtračním papíru (BP metoda – ISTA, 2019) ve 4 opakováních, bez předchozí stratifikace embryí. K testu klíčivosti byla využita všechna embrya kategorií 1 + 2 + 3 společně.

**Tabulka 4:** Klíčivost embryí v kategoriích 1 až 3, po ošetření v porostu v průměru let 2019 a 2022 dle mateřského genotypu

<b>Burlat</b>					
<b>Varianta</b>	<b>Kontrola</b>	<b>Alga 600</b>	<b>Lexin + Agrovital</b>	<b>GA<sub>3</sub></b>	<b>HSD</b>
Klíčivost	6,6 %	12,3 %	2,2 %	21,9 %	8,6
Průkaznost	BC	B	C	A	
<b>HL 13577</b>					
Klíčivost	7,1 %	5,4 %	5,8 %	9,8 %	8,8
Průkaznost	A	A	A	A	
<b>Oba genotypy společně</b>					
Klíčivost	6,8 %	10,0 %	4,3 %	16,2 %	5,8
Průkaznost	B	B	B	A	

Závěr: Na základě zjištěných výsledků je možné doporučit pro zvýšení kvality embryí třešní a jejich klíčivosti předsklizňovou aplikaci 0,01 % roztoku kyseliny gibberelové a přípravku Alga 600 dle použité metodiky.

## Posklizňové ošetření

### Ošetření osiva v laboratoři

Získaná embrya kategorií 1 až 3 všech variant z porostů ošetřených před sklizní byla následně v laboratoři namočena na 24 hod. do roztoků podpůrných látek Alga 600, Lexin + Agrovital a kyselina giberelová. U kyseliny giberelové byla použita pro namáčení 10x vyšší koncentrace (0,1%) než pro aplikaci na stromy dle doporučení ISTA Rules, které zohledňuje stupeň dormance, čím hlubší dormance, tím je koncentrace vyšší (ISTA, 2019). U ostatních dvou variant byly použity identické roztoky jak pro následné namočení v laboratoři, tak pro prvotní aplikaci na stromy.

Po namočení v laboratoři byla u embryí hodnocena klíčivost ve skládaném filtračním papíru (BP metoda – ISTA, 2019). Jednotlivé varianty bylo nutné pro zamezení vlivu plísní překládat v přibližně dvoutýdenních intervalech na nové klíčidlo (filtrační papír) podle případné úrovně kontaminace vzorku na klíčidle.

### Vyhodnocení ošetření

Klíčivost embryí po aplikaci podpůrných přípravků namáčením embryí v laboratoři dosáhla srovnatelných hodnot s kontrolní neošetřenou variantou, zejména na stromech neošetřené kontroly a dále u aplikace Lexin + Agrovital a kyseliny giberelové. U varianty před sklizňového ošetření na stromech přípravkem Alga 600 byla klíčivost při posklizňové aplikaci Lexin + Agrovital a GA<sub>3</sub> v laboratoři výrazně nižší než u neošetřené varianty (Tabulka 5). Rozdíly v klíčivostech mezi variantami v laboratoři byly většinou nepřekážné, zejména u pozdního genotypu 'HL 13577'.

**Tabulka 5:** Klíčivost embryí u kategorií 1 až 3 po ošetření v laboratoři v průměru let 2019 a 2022 dle mateřského genotypu. Nevitální embrya kategorie 4 byla vyloučena z testu klíčení

<b>Burlat</b>				
<b>Varianta strom/laboratoř</b>	<b>Kontrola</b>	<b>Alga 600</b>	<b>Lexin + Agrovital</b>	<b>GA<sub>3</sub></b>
Kontrola	6,6 % ab	12,3 % ab	2,2 % a	21,9 % a
Alga 600	6,9 % a	15,9 % a	1,6 % a	13,3 % a
Lexin + Agrovital	2,1 % b	1,9 % c	0,8 % a	1,0 % b
GA <sub>3</sub>	6,1 % ab	5,0 % bc	3,9 % a	16,6 % a
HSD	4,6	8,9	4,3	8,6
<b>HL 13577</b>				
<b>Varianta strom/laboratoř</b>	<b>Kontrola</b>	<b>Alga 600</b>	<b>Lexin + Agrovital</b>	<b>GA<sub>3</sub></b>
Kontrola	7,1 % a	5,4 % a	5,8 % a	9,7 % a
Alga 600	7,3 % a	9,6 % a	6,6 % a	14,2 % a
Lexin + Agrovital	8,6 % a	6,9 % a	7,9 % a	11,9 % a
GA <sub>3</sub>	3,4 % a	4,5 % a	7,0 % a	8,9 % a
HSD	5,9	6,2	6,2	8,5

Průměrná klíčivost po aplikaci přípravků v laboratoři u všech variant sklizených embryí byla od 5,0 % u Lexin + Agrovital do 9,6 % u kontrolní varianty. Varianta GA<sub>3</sub> v laboratoři nebyla lepší než průměr kontrol (Tabulka 6)

**Tabulka 6:** Klíčivost embryí kategorií 1 až 3 po ošetření na stromech i v laboratoři v průměru let 2019 a 2022

Oba genotypy společně po úpravě v laboratoři					
Varianta	Kontrola	Alga 600	Lexin + Agrovital	GA <sub>3</sub>	HSD
Klíčivost laboratoř	9,6 %	9,5 %	5,0 %	7,3 %	2,3
Průkaznost	A	A	B	AB	

Závěr: Na základě provedených hodnocení v laboratoři nebyla žádná varianta ošetření lepší než kontrola. Ošetření v laboratoři je tudíž nadbytečným opatřením pro zvýšení klíčivosti embryí třešní.

### Metoda embryo rescue

Pokusy o zvýšení klíčivosti osiva získaného z křížení ‘Burlat’ x ‘Tamara’ pomocí metody embryo rescue probíhaly v letech 2019 až 2023. Plody ze stromů ošetřených postřikem Lexin (0,08%) + Agrovital (0,07%) + 3,0% roztok sacharózy, Alga 600 (0,1%) + 3,0% roztok sacharózy, Giberelin GA<sub>3</sub> (0,01%) + 3,0% roztok sacharózy a z kontrolní varianty, byly sklizeny těsně před dosažením plné sklizňové zralosti (obrázek 3).



**Obrázek 3:** Stupeň zralosti plodů před preparací embryí odrůdy ‘Burlat’

Postup přípravy embryokultury:

1. Ze sklizených plodů byly vyluštny pecky, které byly důkladně zbaveny zbytků dužniny.
2. Pecky byly ponořeny do 10,0% roztoku Sava, kde byly dezinfikovány po dobu minimálně 2 hodin, aby se zabránilo kontaminacím embrya z povrchu.
3. Z vydezinfikovaných pecek byla vypreparována embrya a rozdělena do čtyř skupin podle stupně jejich vývinu (Obrázek 2). Z embryí zařazených do skupiny 1 až 3 byl v aseptických podmínkách flow-boxu opatrně odstraněn obal tak, aby nebyly poškozeny dělohy.
4. Tato embrya byla sterilizována po dobu 2 minut v roztoku chloridu rtuťnatého ( $\text{HgCl}_2$ ) s kapkou smáčedla, poté promyta v destilované vodě a osušena.
5. Takto připravená embrya byla vysazována na kultivační médium do Erlenmeyerových baněk.

Jako základní kultivační médium bylo použito plné MS médium (Murashige a Skoog, 1962), do kterého byly přidány fytohormony a vit. C. Byly připraveny 4 varianty médií:

- Čisté MS médium (bez přidání růstových regulátorů) - kontrola
- MS +  $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  6-benzylaminopurin (BAP)
- MS +  $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  BAP +  $8,0 \text{ mg l}^{-1}$  kyselina askorbová (k. a.)
- MS +  $1,0 \text{ mg l}^{-1}$  BAP +  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  kyselina gibberelová ( $\text{GA}_3$ )

U embryí vysazených na kultivační médium nebyla provedena stratifikace vzhledem k tomu, že nízká teplota u raných odrůd klíčení spíše inhibuje (Blažková *et al.*, 2003), což bylo prokázáno i našimi dalšími experimenty (nepublikovaná data). Embrya byla hned po vysazení na médium uchovávána v kultivační místnosti, kde byly nastaveny následující podmínky: 16 hodin světlo, 8 hodin tma, teplota  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Klíčivost embryí byla vyhodnocena po šesti týdnech kultivace. Za klíčící se považovalo embryo s rostoucím prýtem, zelenými lístky a živým vzrůstným vrcholem bez malformací, tak aby bylo možné klíčící rostlinu pasážovat na multiplikační médium.

### Vyhodnocení metody

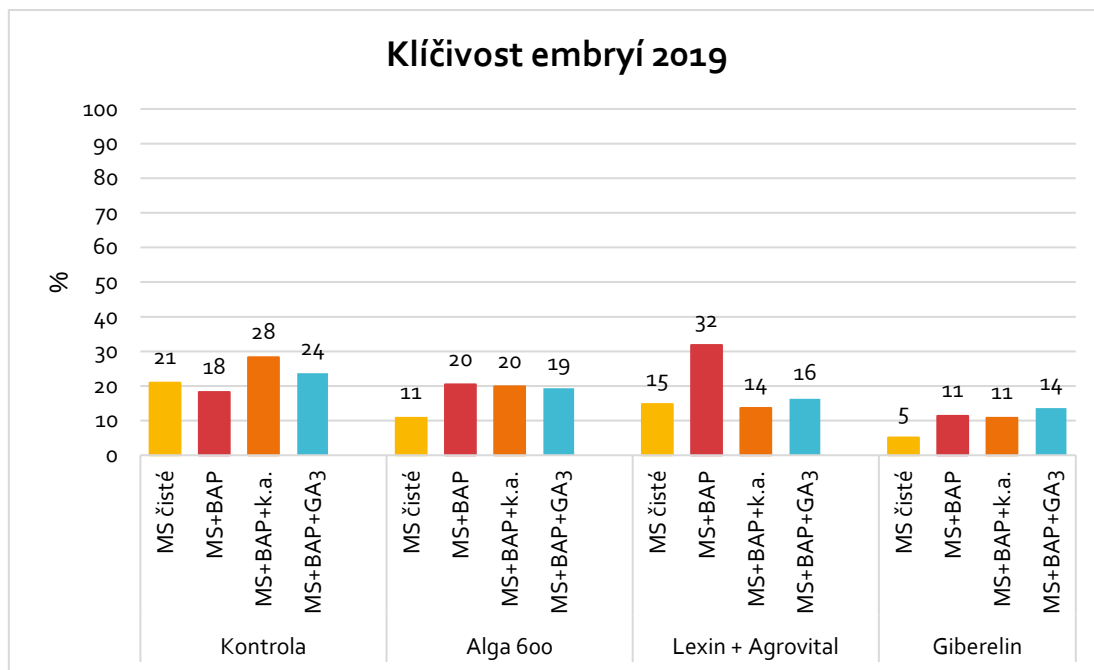
Hodnocení klíčivosti probíhalo v letech 2019 až 2023. Klíčivost v jednotlivých letech byla ovlivněna nejen rozdílnými povětrnostními podmínkami, ale rovněž dalšími faktory nejen v sadu, ale i v laboratoři, které jsou většinou velmi těžko identifikovatelné. Vliv počasí je zřejmý například v roce 2020, kdy došlo ke ztrátám plodů v důsledku silných jarních mrazů. V roce 2021 byly výsledky ovlivněny vysokou mírou kontaminace, proto bylo v roce 2022 do médií přidán PPM<sup>TM</sup> (Plant Preservative Mixture), což je konzervační/biocidní prostředek používaný k prevenci mikrobiální kontaminace v rostlinných *in vitro* kulturách. Avšak právě v roce 2022 byla klíčivost embryí nulová, (embrya byla vyhodnocena jako neživotaschopná), čehož příčinou mohla být citlivost třešňových embryí na tento prostředek. Na následujících tabulkách a grafech, kde jsou uvedeny výsledky hodnocení klíčivosti za jednotlivé roky samostatně, je možné vidět vysokou variabilitu výsledků a složitost práce s tak citlivým materiálem, jako jsou embrya raných třešní.

Rok 2019:

Nejlepší celkovou klíčivost 23,0 % měla kontrolní varianta, následuje varianta s postřikem Lexin + Agrovital (19,0 %) a varianta s postřikem Alga 600 (18,0 %). Nejhorší celkovou klíčivost měla varianta s GA<sub>3</sub> a to 10,0 %. U kontrolní varianty a u varianty s postřikem Lexin + Agrovital byla dosažena výrazně lepší klíčivost na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP a to 35,0 % a 32,0 %. Naopak nejhorší klíčivost měla embrya na čistém MS médiu, a to téměř u všech variant. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7 a grafu 1.

**Tabulka 7:** Klíčivost embryí mateřské odrůdy 'Burlat' (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření, stupni vývinu embrya a složení média

<b>Kontrola</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	24	64	60	24	64	60	24	64	64	24	64	60	<b>596</b>
Klíčící (embrya)	6	15	10	3	9	15	5	22	16	10	19	6	<b>136</b>
<b>% klíčících</b>	<b>25,0</b>	<b>23,0</b>	<b>17,0</b>	<b>13,0</b>	<b>14,0</b>	<b>25,0</b>	<b>21,0</b>	<b>34,0</b>	<b>25,0</b>	<b>42,0</b>	<b>30,0</b>	<b>10,0</b>	<b>23,0</b>
<b>Alga 600</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	72	76	28	72	76	28	72	76	28	72	76	28	<b>704</b>
Klíčící (embrya)	12	4	3	30	6	0	16	19	0	22	12	0	<b>124</b>
<b>% klíčících</b>	<b>17,0</b>	<b>5,0</b>	<b>11,0</b>	<b>42,0</b>	<b>8,0</b>	<b>0,0</b>	<b>22,0</b>	<b>25,0</b>	<b>0,0</b>	<b>31,0</b>	<b>16,0</b>	<b>0,0</b>	<b>18,0</b>
<b>Lexin + Agrovital</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	20	32	36	20	32	36	16	32	40	16	36	40	<b>356</b>
Klíčící (embrya)	9	4	0	14	9	5	3	7	2	5	7	3	<b>68</b>
<b>% klíčících</b>	<b>45,0</b>	<b>13,0</b>	<b>0,0</b>	<b>70,0</b>	<b>28,0</b>	<b>14,0</b>	<b>19,0</b>	<b>22,0</b>	<b>5,0</b>	<b>31,0</b>	<b>19,0</b>	<b>8,0</b>	<b>19,0</b>
<b>GA<sub>3</sub></b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	32	80	64	36	68	72	32	80	64	32	72	72	<b>704</b>
Klíčící (embrya)	1	5	3	4	9	7	4	7	8	1	9	14	<b>72</b>
<b>% klíčících</b>	<b>3,0</b>	<b>6,0</b>	<b>5,0</b>	<b>11,0</b>	<b>13,0</b>	<b>10,0</b>	<b>13,0</b>	<b>9,0</b>	<b>13,0</b>	<b>3,0</b>	<b>13,0</b>	<b>19,0</b>	<b>10,0</b>



**Graf 1:** Klíční embrya mateřské odrůdy ‘Burlat’ (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření a podle složení média

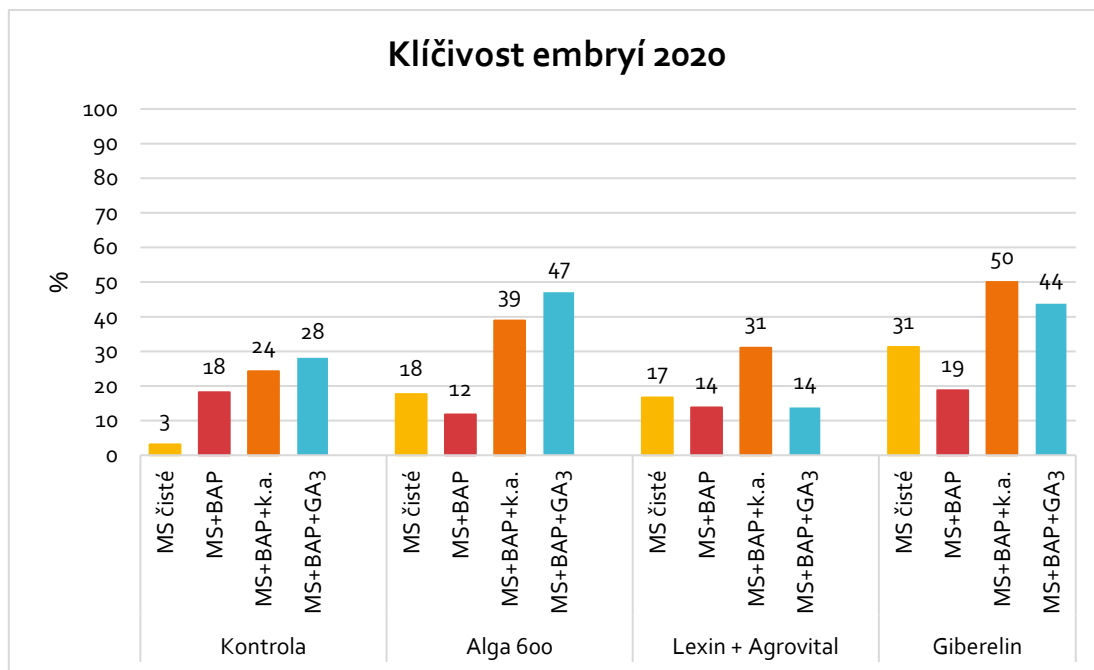
#### Rok 2020:

Výsledky v roce 2020 byly ovlivněny nízkým počtem sklizených plodů. např. u variant s postřikem GA<sub>3</sub> a s postřikem Alga 600 byl v roce 2020 počet vysazených embryí desetinásobně nižší než v roce 2019. Celkové výsledky jsou shrnuty v tabulce 8 a grafu 2. Nejvyšší celkovou klíčovost 36,0 % měla varianta s postřikem GA<sub>3</sub>, následuje varianta s postřikem Alga 600 29,0 %. Nejnižší celkovou klíčovost měla varianta s postřikem Lexin + Agrovital 19,0 % a kontrolní varianta 18,0 %. U varianty s postřikem GA<sub>3</sub> byla dosažena nejvyšší klíčovost na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP + 8,0 mg l<sup>-1</sup> kyseliny askorbové a to až 50,0 %, velmi dobrá klíčovost byla dosažena rovněž na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> a to 44,0 %. U varianty s postřikem Alga 600 byla rovněž dosažena velmi dobrá klíčovost na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> a to 47,0 % a na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP + 8,0 mg l<sup>-1</sup> kyselina askorbová a to 39,0 %. Naopak nejnižší klíčovost měla embrya na čistém MS médiu u kontrolní varianty.



**Tabulka 8:** Klíčivost embryí mateřské odrůdy ‘Burlat’ (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření, stupni vývinu embrya a podle složení média

<b>Kontrola</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	11	17	4	12	18	3	12	17	4	11	17	4	<b>130</b>
Klíčící (embrya)	0	1	0	3	3	0	4	4	0	4	5	0	<b>24</b>
<b>% klíčících</b>	<b>0,0</b>	<b>6,0</b>	<b>0,0</b>	<b>25,0</b>	<b>17,0</b>	<b>0,0</b>	<b>33,0</b>	<b>24,0</b>	<b>0,0</b>	<b>36,0</b>	<b>29,0</b>	<b>0,0</b>	<b>18,0</b>
<b>Alga 600</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	4	9	4	4	10	3	4	10	4	5	9	3	<b>69</b>
Klíčící (embrya)	0	2	1	1	1	0	3	4	0	3	5	0	<b>20</b>
<b>% klíčících</b>	<b>0,0</b>	<b>22,0</b>	<b>25,0</b>	<b>25,0</b>	<b>10,0</b>	<b>0,0</b>	<b>75,0</b>	<b>40,0</b>	<b>0,0</b>	<b>60,0</b>	<b>56,0</b>	<b>0,0</b>	<b>29,0</b>
<b>Lexin + Agrovital</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	4	22	4	4	21	4	4	21	4	3	22	4	<b>117</b>
Klíčící (embrya)	2	3	0	2	2	0	2	6	1	2	1	1	<b>22</b>
<b>% klíčících</b>	<b>50,0</b>	<b>14,0</b>	<b>0,0</b>	<b>50,0</b>	<b>10,0</b>	<b>0,0</b>	<b>50,0</b>	<b>29,0</b>	<b>25,0</b>	<b>67,0</b>	<b>5,0</b>	<b>25,0</b>	<b>19,0</b>
<b>GA<sub>3</sub></b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	9	4	3	10	4	2	9	4	3	9	5	2	<b>64</b>
Klíčící (embrya)	4	1	0	2	1	0	6	2	0	6	1	0	<b>23</b>
<b>% klíčících</b>	<b>44,0</b>	<b>25,0</b>	<b>0,0</b>	<b>20,0</b>	<b>25,0</b>	<b>0,0</b>	<b>67,0</b>	<b>50,0</b>	<b>0,0</b>	<b>67,0</b>	<b>20,0</b>	<b>0,0</b>	<b>36,0</b>



**Graf 2:** Klíčící embrya mateřské odrůdy ‘Burlat’ (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření a podle složení média

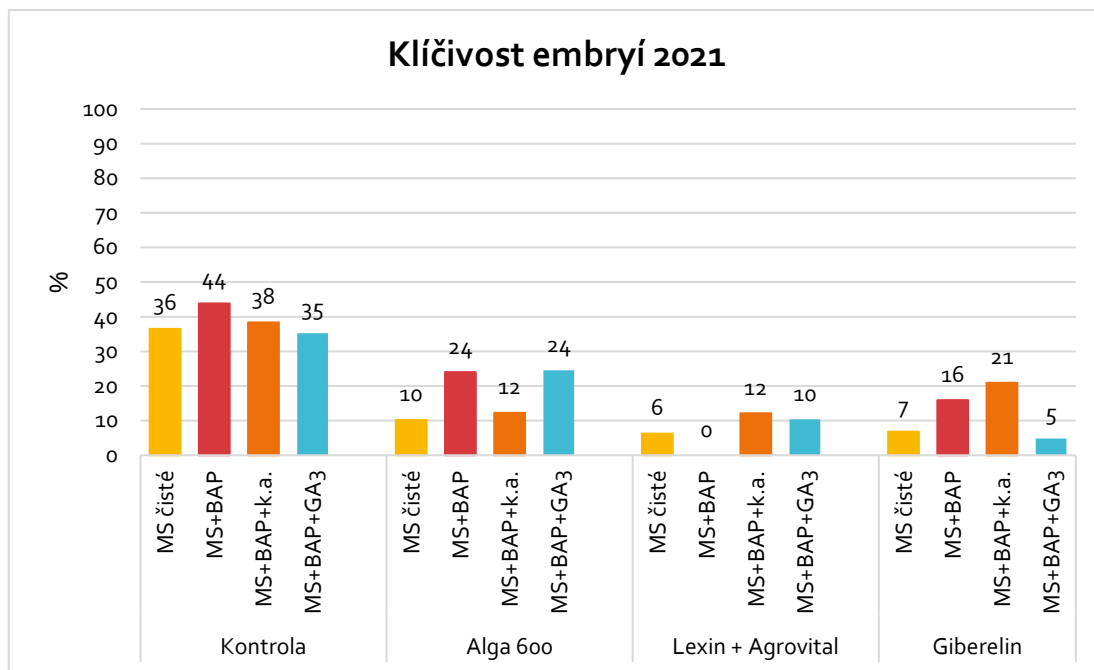
### Rok 2021:

V roce 2021 byla hlavním problémem vysoká míra kontaminace, a to i přesto, že byly získané pecky nejdříve dezinfikovány v 10,0% roztoku Sava, poté byla vyluštěná embrya promyta fungicidem a následně byla embrya před samotným vysazením na médium ošetřena roztokem HgCl<sub>2</sub>. Tento problém byl především u hůře vyvinutých embryí, což je patrné i z výsledků klíčivosti (Tabulka 9), kdy téměř u všech variant byla klíčivost výrazně vyšší u embryí zařazených do vývojového stupně 1.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce 9 a grafu 3. Nejvyšší celkovou klíčivost 38,0 % měla kontrolní varianta, následuje varianta s postříkem Alga 600 (18,0 %) a varianta s postříkem GA<sub>3</sub> (12,0 %). Nejnižší celkovou klíčivost měla varianta s postříkem Lexin + Agrovital (7,0 %). U kontrolní varianty byla dosažena nejvyšší klíčivost na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP, a to 44,0 %, u kontrolní varianty byla dosažena dobrá klíčivost i na dalších variantách médií, a to v rozmezí 35,0 až 38,0 %. Relativně dobré klíčivosti, a to nad 20,0 %, bylo dosaženo u varianty s postříkem Alga 600 na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP a na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> a u varianty s postříkem GA<sub>3</sub> na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP + 8,0 mg l<sup>-1</sup> kyselina askorbová. Naopak nejnižší klíčivost, pod 10,0 %, měla embrya na čistém MS médiu a na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg l<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> u varianty s postříkem GA<sub>3</sub> a na čistém MS médiu u varianty s postříkem Lexin + Agrovital. Embrya vůbec nevyklíčila na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP u varianty s postříkem Lexin + Agrovital.

**Tabulka 9:** Klíčivost embryí mateřské odrůdy ‘Burlat’ (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření, stupni vývinu embrya a podle složení média

<b>Kontrola</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	53	8	13	50	10	13	50	10	13	48	10	13	<b>291</b>
Klíčící (embrya)	26	0	1	32	0	0	28	0	0	23	1	1	<b>112</b>
<b>% klíčících</b>	<b>49,0</b>	<b>0,0</b>	<b>8,0</b>	<b>64,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>56,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>48,0</b>	<b>10,0</b>	<b>8,0</b>	<b>38,0</b>
<b>Alga 600</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	14	12	23	15	12	23	15	12	22	14	12	23	<b>197</b>
Klíčící (embrya)	3	2	0	8	4	0	6	0	0	10	2	0	<b>35</b>
<b>% klíčících</b>	<b>21,0</b>	<b>17,0</b>	<b>0,0</b>	<b>53,0</b>	<b>33,0</b>	<b>0,0</b>	<b>40,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>71,0</b>	<b>17,0</b>	<b>0,0</b>	<b>18,0</b>
<b>Lexin + Agrovital</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	7	10	15	7	10	12	8	10	15	7	10	12	<b>123</b>
Klíčící (embrya)	2	0	0	0	0	0	4	0	0	3	0	0	<b>9</b>
<b>% klíčících</b>	<b>29,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>50,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>43,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>7,0</b>
<b>GA<sub>3</sub></b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	24	12	8	24	12	8	24	11	8	22	11	8	<b>172</b>
Klíčící (embrya)	0	3	0	5	0	2	5	2	2	2	0	0	<b>21</b>
<b>% klíčících</b>	<b>0,0</b>	<b>25,0</b>	<b>0,0</b>	<b>21,0</b>	<b>0,0</b>	<b>25,0</b>	<b>21,0</b>	<b>18,0</b>	<b>25,0</b>	<b>9,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>12,0</b>



**Graf 3:** Klíčoví embrya mateřské odrůdy ‘Burlat’ (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření a podle složení média

#### Rok 2022:

Klíčivost embryí byla vyhodnocena po 6 týdnech kultivace tak, jako i v předchozích letech. Po 6 týdnech kultivace byla embrya na pohled svěží, ale neklíčila (Tabulka 10). Klíčivost byla kontrolována za další dva týdny, avšak opět bez výsledku. Na základě hypotézy, že embrya jsou v tomto roce vysoce dormantní, byla začátkem září část embryí přesunuta do lednice s udržovanou teplotou 5 °C za účelem chladové stratifikace. Tato embrya byla stratifikována po dobu 4 měsíců. Vzhledem k tomu, že ani po 5 měsících kultivace v kultivační místnosti nedošlo u žádné varianty ke klíčení embryí, byla provedena biochemická zkouška životaschopnosti, a sice tzv. topografický tetrazoliový test (TTC test). TTC test, který byl proveden u všech variant včetně stratifikovaných embryí, prokázal, že všechna testovaná embrya byla neživotaschopná.

**Tabulka 10:** Klíčivost embryí mateřské odrůdy ‘Burlat’ (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření, stupni vývinu embrya a podle složení média

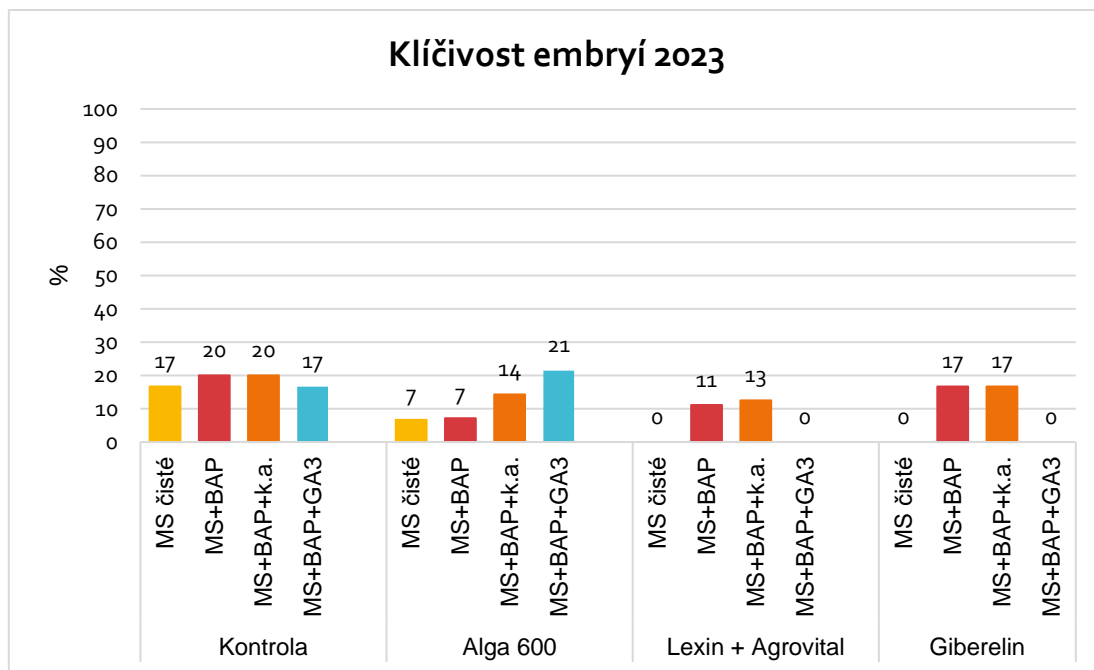
<b>Kontrola</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	44	84	85	44	88	89	48	84	86	44	88	86	<b>870</b>
Klíčící (embrya)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
% klíčících	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>Alga 600</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	79	56	47	80	56	54	80	56	57	80	55	51	<b>751</b>
Klíčící (embrya)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
% klíčících	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>Lexin + Agrovital</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	11	43	83	13	44	81	10	44	82	14	44	83	<b>552</b>
Klíčící (embrya)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
% klíčících	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>GA<sub>3</sub></b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	11	37	48	11	37	48	11	36	48	11	37	48	<b>383</b>
Klíčící (embrya)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<b>0</b>
% klíčících	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>

### Rok 2023:

Výsledky v roce 2023 byly podstatně ovlivněny nízkým počtem vysazených embryí, což bylo způsobeno tím, že u kontrolní varianty a varianty s postřikem Lexin + Agrovital byl získán jen velmi nízký počet plodů a u variant s postřikem GA<sub>3</sub> a s postřikem Alga 600 dosahoval počet embryí zařazených do kategorie 4 přibližně 95,0 %. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 11 a grafu 4. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší celkovou klíčivost 18,0 % měla kontrolní varianta, následuje varianta s postřikem Alga 600 12,0 %. Nejnížší celkovou klíčivost měla varianta s postřikem GA<sub>3</sub> 9,0 % a varianta s postřikem Lexin + Agrovital 6,0 %. V tomto roce bylo nejlepší klíčivosti téměř u všech variant kromě varianty s postřikem Alga 600 dosaženo na médiu MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP + 8,0 mg l<sup>-1</sup> kyseliny askorbové. Naopak nejnížší klíčivost měla u všech variant embrya na čistém MS médiu.

**Tabulka 11:** Klíčivost embryí mateřské odrůdy ‘Burlat’ (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření, stupni vývinu embrya a podle složení média

<b>Kontrola</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	2	1	3	2	1	2	2	1	2	3	1	2	22
Klíčící (embrya)	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	4
<b>% klíčících</b>	<b>50,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>50,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>	<b>33,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>18,0</b>
<b>Alga 600</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	4	4	7	4	3	7	4	3	7	4	3	7	57
Klíčící (embrya)	1	0	0	1	0	0	2	0	0	1	1	1	7
<b>% klíčících</b>	<b>25,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>25,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>50,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>25,0</b>	<b>33,0</b>	<b>14,0</b>	<b>12,0</b>
<b>Lexin + Agrovital</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	2	2	4	3	2	4	2	2	4	2	2	4	33
Klíčící (embrya)	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
<b>% klíčících</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>33,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>25,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>6,0</b>
<b>GA<sub>3</sub></b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	3	1	1	3	1	2	3	2	1	2	2	1	22
Klíčící (embrya)	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
<b>% klíčících</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>33,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>33,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>9,0</b>



**Graf 4:** Klíčivost embryí mateřské odrůdy 'Burlat' (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření a podle složení média

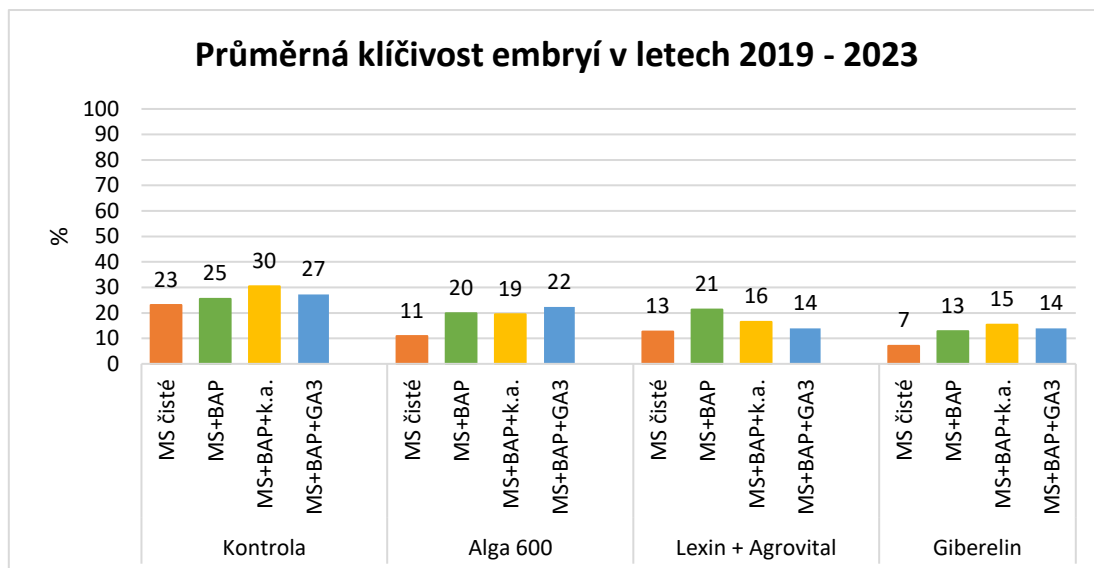
#### Celkové hodnocení:

Celkové hodnocení bylo provedeno za 4 roky trvání experimentu, přičemž rok 2022 byl z hodnocení vynechán z důvodu neživotaschopných embryí. Celkové výsledky jsou shrnuty v tabulce 12 a grafu 5. Z celkového hodnocení vyplývá, že nejlépe klíčila embrya z kontrolní varianty, která se od ostatních variant statisticky významně lišila (Tabulka 13). Z toho lze vyvodit závěr, že v případě použití metody embryo rescue nemá na klíčení embryí předsklizňový postřik pozitivní vliv. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny rovněž při hodnocení vlivu složení média na klíčivost embryí (Tabulka 14). Z hodnocení vyplývá, že celkově nejlépe klíčila embrya na médiích MS + 1,0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP + 8,0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> kyseliny askorbové, MS + 1,0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP + 0,5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> a MS + 1,0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP, na druhou stranu nejnižší klíčivost měla embrya na čistém MS médiu (Graf 6). Statisticky významné rozdíly byly nalezeny i mezi jednotlivými kategoriemi ve stupních vývoje embryí (Tabulka 15), přičemž nejlepší klíčivost měla embrya kategorie 1 a to až 31,6 %, následovala embrya kategorie 2 s klíčivostí 15,7 % a nejhorší klíčivost měla málo vyvinutá embrya kategorie 3, a to 9,0 % (Graf 7).

**Tabulka 12:** Klíčivost embryí mateřské odrůdy ‘Burlat’ (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření, stupni vývinu embrya a podle složení média v letech 2019-2023 mimo roku 2022

<b>Kontrola</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	90	90	80	88	93	78	88	92	83	86	92	79	<b>1039</b>
Klíčící (embrya)	33	16	11	39	12	15	37	27	16	38	25	7	<b>276</b>
<b>% klíčících</b>	<b>37,0</b>	<b>18,0</b>	<b>14,0</b>	<b>44,0</b>	<b>13,0</b>	<b>19,0</b>	<b>42,0</b>	<b>29,0</b>	<b>19,0</b>	<b>44,0</b>	<b>27,0</b>	<b>9,0</b>	<b>27,0</b>
<b>Alga 600</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	94	101	62	95	101	61	95	101	61	95	100	61	<b>1027</b>
Klíčící (embrya)	16	8	4	40	11	0	27	23	0	36	20	1	<b>186</b>
<b>% klíčících</b>	<b>17,0</b>	<b>8,0</b>	<b>6,0</b>	<b>42,0</b>	<b>11,0</b>	<b>0,0</b>	<b>28,0</b>	<b>23,0</b>	<b>0,0</b>	<b>38,0</b>	<b>20,0</b>	<b>2,0</b>	<b>18,0</b>
<b>Lexin + Agrovital</b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	33	66	59	34	65	56	30	65	63	28	70	60	<b>629</b>
Klíčící (embrya)	13	7	0	17	11	5	9	13	4	10	8	4	<b>101</b>
<b>% klíčících</b>	<b>39,0</b>	<b>11,0</b>	<b>0,0</b>	<b>50,0</b>	<b>17,0</b>	<b>9,0</b>	<b>30,0</b>	<b>20,0</b>	<b>6,0</b>	<b>36,0</b>	<b>11,0</b>	<b>7,0</b>	<b>16,0</b>
<b>GA<sub>3</sub></b>													
Médium	MS čisté			MS+BAP			MS+BAP+k.a.			MS+BAP+GA <sub>3</sub>			Celkem
Stupeň vývinu embrya	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Vysazeno embryí	68	97	76	73	85	84	68	97	76	65	90	83	<b>962</b>
Klíčící (embrya)	5	9	3	12	10	9	16	11	10	9	10	14	<b>118</b>
<b>% klíčících</b>	<b>7,0</b>	<b>9,0</b>	<b>4,0</b>	<b>16,0</b>	<b>12,0</b>	<b>11,0</b>	<b>24,0</b>	<b>11,0</b>	<b>13,0</b>	<b>14,0</b>	<b>11,0</b>	<b>17,0</b>	<b>12,0</b>

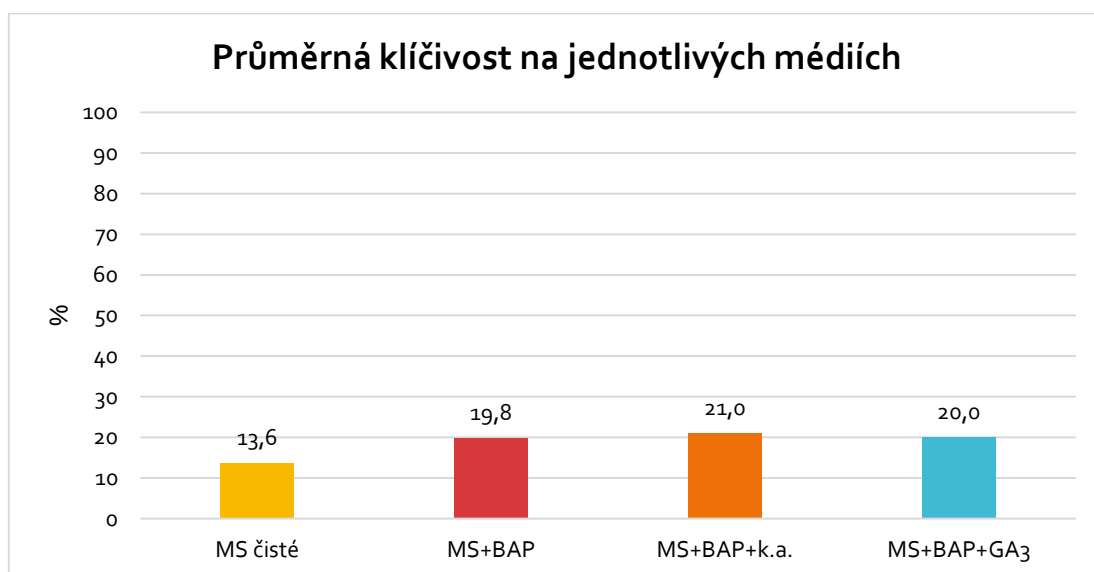




**Graf 5:** Klíčící embrya mateřské odrůdy 'Burlat' (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na variantě předsklizňového ošetření a podle složení média v letech 2019-2023 mimo roku 2022

**Tabulka 13:** Statistické vyhodnocení celkové klíčivosti v závislosti na variantě postřiku. Pro statistickou analýzu byl použit Kruskal-Wallisův neparametrický test. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

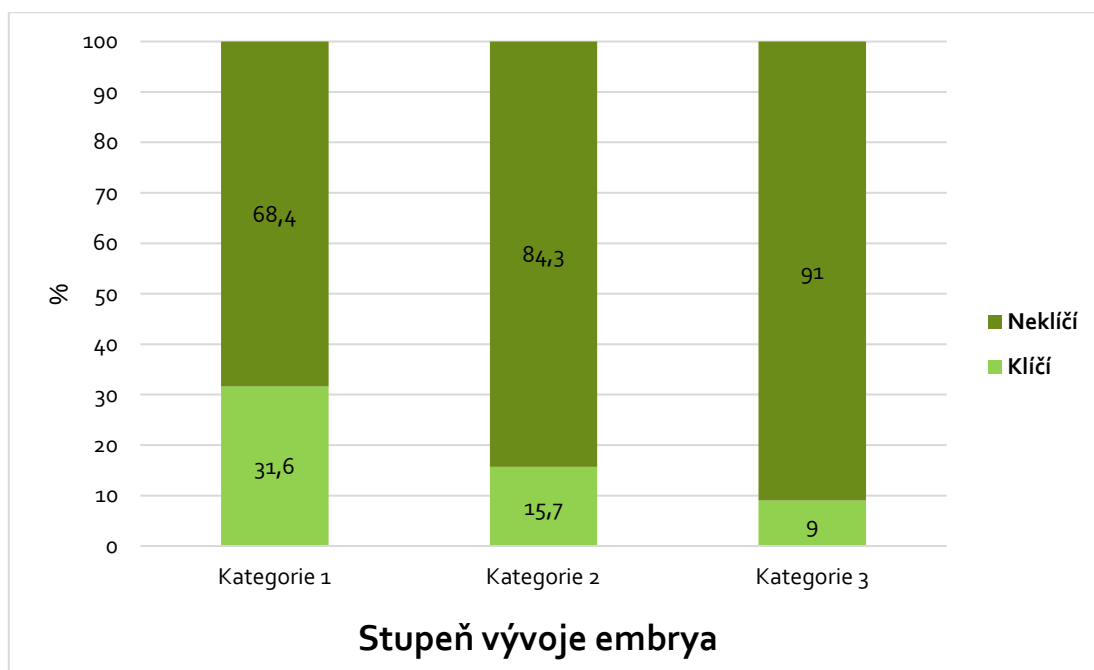
Alga 600	<0,0001		
Lexin + Agrovital	<0,0001	>0,9999	
GA <sub>3</sub>	<0,0001	0,0049	0,3454
	Kontrola	Alga 600	Lexin + Agrovital



**Graf 6:** Klíčící embrya mateřské odrůdy 'Burlat' (%) v *in vitro* podmínkách v závislosti na složení média a bez ohledu na variantu předsklizňového ošetření v letech 2019-2023 mimo roku 2022

**Tabulka 14:** Statistické vyhodnocení celkové klíčivosti v závislosti na složení média. Pro statistickou analýzu byl použit Kruskal-Wallisův neparametrický test. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

MS+BAP	<b>0,0041</b>		
MS+BAP+k.a.	<b>0,0028</b>	>0,9999	
MS+BAP+GA <sub>3</sub>	<b>0,0003</b>	>0,9999	>0,9999
	MS čisté	MS+BAP	MS+BAP+k.a.



**Graf 7:** Zastoupení klíčících a neklíčících embryí v *in vitro* podmínkách v závislosti na stupni vývoje embrya v letech 2019-2023 mimo roku 2022

**Tabulka 15:** Statistické vyhodnocení celkové klíčivosti v závislosti na variantě předsklizňového ošetření. Pro statistickou analýzu byl použit Kruskal-Wallisův neparametrický test. Nulová hypotéza byla testována na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

Kategorie 2	<b>&lt;0,0001</b>	
Kategorie 3	<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	Kategorie 1	Kategorie 2

## ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ DOPORUČENÍ

Předsklizňové ošetření ukázalo různé reakce mezi dvěma mateřskými genotypy třešně. U mateřské odrůdy 'Burlat' byl podíl vyvinutých plodů po ošetření GA<sub>3</sub> nejvyšší, zatímco u mateřského genotypu 'HL 13577' dosáhla nejvyššího podílu varianta Alga 600. Je důležité poznamenat, že průměrný podíl špatných embryí kategorie 4 byl u odrůdy 'Burlat' v roce 2019 významně vyšší v porovnání s rokem 2022. Avšak u genotypu 'HL 13577' nebyl rozdíl mezi ročníky významný. Hodnocení kvality embryí bylo provedeno na základě klíčivosti ve filtračním papíru, kde byla využita všechna embrya kategorií 1,2 a 3 společně, bez předchozí stratifikace.

S ohledem na výše uvedené výsledky lze pro zvýšení kvality embryí třešně a zlepšení jejich klíčivosti doporučit aplikaci roztoku kyseliny gibberelové a přípravku Alga 600 v období před zráním plodů, s vícenásobnou aplikací od doby kvetení po dobu deset dnů před dozráním plodů. Tato kombinace může významně přispět k lepšímu vývoji plodů a kvalitě embryí. Avšak je důležité brát v úvahu specifické reakce různých genotypů na toto ošetření a pravidelně sledovat jejich výsledky, abychom získali neoptimálnější přístup pro konkrétní podmínky pěstování. Kvalita embryí a klíčivost byla výrazně ovlivněna u raně zrající mateřské odrůdy třešně, naopak u pozdně zrajícího mateřského genotypu nebyly rozdíly průkazné. U rané mateřské odrůdy třešně vzrostla klíčivost osiva na dvojnásobek u postřiku Alga 600 a na trojnásobek u GA<sub>3</sub> oproti neošetřené kontrole.

Posklizňové ošetření embryí třešně v laboratoři ukázalo, že aplikace různých podpůrných přípravků prostřednictvím namáčení nemá přidaný významný vliv na další zlepšení klíčivosti. Přestože byly použity různé roztoky podpůrných látek pro namočení embryí, klíčivost byla většinou srovnatelná s kontrolní neošetřenou variantou. Výjimkou bylo osivo z porostů ošetřených přípravkem Alga 600, kde klíčivost po aplikaci Lexin + Agrovital a GA<sub>3</sub> v laboratoři byla nižší. Většina hodnocených variant v laboratoři však nevykázala statisticky významné rozdíly v klíčivosti, což ukazuje, že tato posklizňová ošetření nepřinesla významné výhody.

Vzhledem ke zjištěným výsledkům v laboratoři se nedoporučuje provádět posklizňové ošetření embryí třešně prostřednictvím namáčení v různých roztocích podpůrných látek. Namáčení osiva v těchto roztocích nezlepšilo klíčivost a v některých případech dokonce vedlo k nižší klíčivosti ve srovnání s kontrolní variantou. Pro dosažení optimální klíčivosti embryí je tedy důležitější zaměřit se na správné postupy sklizně, skladování a ošetření v porostu než na posklizňová ošetření v laboratoři.

Pro šlechtění raných třešně za použití mateřské odrůdy 'Burlat' je možné využít metodu embryo rescue. V tomto případě není nutné použít žádné předsklizňové ošetření a jako vhodné složení média se doporučuje MS + 1,0 mg l<sup>-1</sup> BAP + 8,0 mg l<sup>-1</sup> kyseliny askorbové, vzhledem k tomu, že embrya kontrolní varianty dosahovala na tomto médiu celkovou klíčivost 30,0 %. Pro metodu embryo rescue bylo nejméně vhodné použití čistého MS média. Srovnatelných dobrých výsledků s médiem s přídavkem kyseliny askorbové dosáhlo i médium s přídavkem kyseliny gibberelové, případně s 6-benzylaminopurinem.

## SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Výše uvedený postup aplikace podpůrných látek na zvýšení výtěžnosti klíčivých embryí hybridních materiálů přímo do porostu třešní v období od kvetení do zralosti plodů nebyl nikde zkoušen. Podle získaných výsledků lze postřik kyselinou gibberelovou a přípravkem Alga 600 formou předsklizňového ošetření porostů doporučit jako opatření, které snižuje podíl špatných embryí a zároveň zvyšuje klíčivost dobrých embryí. Další zcela nový přístup, který metodika přináší je posklizňové ošetření osiva třešní podpůrnými přípravky. I když podle průběžných dat aplikace GA<sub>3</sub> zvýšila klíčivost osiva, tak konečné srovnání variant bylo neprůkazné.

*In vitro* metoda embryo rescue umožňuje získat vyšší procento nedostatečně vyvinutých embryí schopných vyklíčit. Přesto je úspěšnost kultivace embrya mezi jednotlivými lety a mateřskými genotypy extrémně variabilní (Balla and Brozik, 1996 v Quero-Garcia, 2019). Kultivace embryí a techniky záchrany embryí jsou poměrně nákladné postupy a jsou relevantní pouze ve velmi speciálních případech (Iezzoni *et al.*, 2017). Mezi ně určitě patří podpora klíčení raných třešní v zavedených šlechtitelských programech, vzhledem k tomu, že u raných třešní v běžných podmínkách není klíčení téměř možné (Fathi *et al.*, 2009). Třešně jsou typické heterogenními nároky na složení médií v *in vitro*. Bohužel oblasti embryo rescue a výběru kultivačních médií se věnuje jen málo prací. Novostí metody je výběr vhodného média jak pro osivo bez předešlého ošetření, tak i pro osivo ošetřené podpůrnými přípravky. Nejpoužívanějším klíčícím médiem je MS s přídavkem makro a mikro živin (Iezzoni *et al.*, 2017), fytohormonů BAP (6-benzylaminopurin), IAA (kyselina indolyl octová), IBA (kyselina indolyl máselná) (Wu *et al.*, 2021; Asānicā *et al.*, 2016) a kyseliny askorbové (Kovalenko and Gladikih, 2020; 2019). Je uváděno, že kyselina gibberelová se přidává až v následných typech médií pro podporu růstu výhonů a kořenů (Koukhartchik and Semenas, 2000), zatímco v naší studii se přidávala již do klíčícího média, které dosáhlo, podobně jako médium s přídavkem kyseliny askorbové, velmi dobrých výsledků v podpoře klíčení embryí ve srovnání s čistým médiem MS.

## POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Pěstování třešní je klíčovou součástí ovocnářského průmyslu, avšak s narůstajícími požadavky trhu a měnícím se klimatem se šlechtitelské programy musí neustále vyvíjet. Je zřejmé, že úspěšné šlechtění třešní je dlouhodobý a komplexní proces, jehož cílem je vyvinout nové odrůdy s požadovanými vlastnostmi, aniž by byla narušena kvalita plodů nebo odolnost vůči škůdcům a nemocem.

Šlechtitelské programy v oblasti třešní začaly ve 20. století. Od té doby došlo k významnému pokroku ve výzkumu a vývoji, i přesto se šlechtění neustále potýká s existujícími komplexními výzvami. Snahou těchto programů není jen vyvinout novou odrůdu, ale také zohlednit potřeby různých zúčastněných stran, včetně producentů, distributorů a spotřebitelů, tak, aby měly odrůdy všechny požadované vlastnosti. Hlavním cílem šlechtitelských programů je tedy vyvinout odrůdy s vysokou a pravidelnou plodností, odolností vůči nemocem, estetickým vzhledem a kvalitou plodů a prodlouženou sezónností. Výzvou je, jak zvýšit efektivitu šlechtění. Řada metod může pomoci zvýšit efektivitu tohoto procesu, včetně využití technologií *in vitro*.

Problémy s klíčivostí hybridních embryí jsou běžné při šlechtění raných odrůd třešní a často i dalších ovocných druhů. Postupy, jak zvýšit klíčivost, zahrnují předsklizňové a posklizňové ošetření embryí, chemické nebo fytohormonální ošetření a metodu embryo rescue. I když rané třešně mají největší problém s klíčením, tak i osivo pozdějších třešní vyžaduje postupy vedoucí ke zvýšení klíčivosti, jelikož kulturní odrůdy třešní mají řádově nižší klíčivost v porovnání s jabloněmi nebo meruňkami. Porozumění aspektům, které ovlivňují klíčivost, je důležité pro úspěšné šlechtění nových odrůd.

Certifikovaná metodika je určena jak šlechtitelům, kteří díky uvedeným postupům zvýší množství hybridního osiva, jeho kvalitu a klíčivost, tak i pěstitelům, kteří díky předsklizňovému ošetření zvýší množství plodů pozdních odrůd třešní na stromech. Metodika bude zveřejněna online na webu organizace VŠÚO Holovousy s.r.o.

## EKONOMICKE ASPEKTY

Aplikace podpůrných látek na stromy v květu je nízkonákladová, protože se přípravky používají v malých koncentracích. Pro 1000 ks získaných a z pecek vytlučených embryí se náklady na přípravky pohybují od 100,- Kč u Lexinu a Alga 600 do 1000,- Kč u kyseliny gibberelové. Ve šlechtitelském procesu lze materiálové náklady společně s cenou práce vyčíslit na reálný nízký počet stromů v řádech desítek, které vstupují do šlechtění, nebo na modelový vyšší počet, který je v řádech stovek a tisíců kusů. Takto vysoké počty stromů lze nalézt v semenářských porostech třešně ptačí. Cena práce s materiálovými náklady na aplikaci Alga 600 dle metodiky 4krát za vegetaci na 10 stromů je 500,- Kč a kyseliny gibberelové do 4000,- Kč. Aplikaci lze provést jak zádovým postřikovačem, tak traktorem s postřikovačem. Ošetření 1000 stromů, což zhruba odpovídá ploše 1 hektaru sadu vyžaduje v případě přípravku Alga 600 náklady do 5000,- Kč. Výrazně vyšší náklady jsou potřebné při aplikaci kys. gibberelové, a to cca 300 tis. Kč z důvodu mnohem vyšší pořizovací ceny přípravku.

V případě posklizňového ošetření osiva společně s hodnocením klíčivosti ve filtračním papíru u jednoho vzorku embryí (1000 ks embryí) lze náklady odhadnout do 7000,- Kč, včetně práce odborně způsobilého laboranta.

Náklady na embryo rescue hybridních embryí raných třešní jsou tvořeny cenou práce, materiálových nákladů na kultivaci v *in vitro* a režii. Práce obsahují přípravu osiva a nasazení embryí na klíčící médium, 2krát pasážování na multiplikační médium, 1krát pasážování na růstovém médiu a 1krát pasážování na kořenícím médiu a otužování rostlin z *in vitro*. Proces končí přenosem rostlin do kultivačních podmínek skleníku, které jsou shodné s výsevem osiva pozdních odrůd třešní. Pro kultivaci 1000 ks embryí a dopěstování 1000 ks semenáčů je potřeba vynaložit 200 tis. Kč.

Nejrentabilnější využití předsklizňového ošetření hybridního osiva pozdních genotypů třešně je přípravkem Alga 600, jelikož došlo k nárůstu počtu sklizených pecek a snížení podílu nevyvinutých embryí. Pro rané mateřské genotypy třešní je rentabilní předsklizňová aplikace přípravků Alga 600 a kyseliny gibberelové s ohledem na dvou až tři násobné zvýšení klíčivosti osiva a pokles podílu nevyvinutých embryí. Metoda *in vitro* embryo rescue má opodstatnění u hybridního osiva neošetřeného a s předsklizňovou aplikací přípravku Alga 600. U těchto kategorií hybridního osiva je nárůst klíčivosti až pěti násobný u neošetřeného a v případě osiva s Alga 600 dvou násobný. S ohledem na skutečnost, že klíčivost raných odrůd třešní se blíží nule, tak každé opatření, které výrazněji zvýší pravděpodobnost získání hybridních semenáčů raných třešní, nalezne uplatnění ve šlechtění. Lze předpokládat, že zvýšením množství semenáčů raných genotypů naroste v průběhu času i pravděpodobnost registrace nových raných odrůd třešní s požadovanými kvalitativními vlastnostmi.

Tento přístup k tvorbě raných třešní je ve shodě s poptávkou po tržních raných odrůdách. Příjmy šlechtitelů pak plynou z licenčních poplatků za využívání odrůd s právní ochranou, přičemž tyto poplatky mohou být stanoveny jako fixní suma za každý prodaný stromek, roub či očko dané odrůdy. Výše ekonomického výnosu z komercializace úspěšné odrůdy od VŠÚO Holovousy se odhaduje na zhruba 1 milion EUR za dobu trvání platnosti udělených šlechtitelských práv, což odráží zkušenosti instituce s prodejem licencí vlastních odrůd.

## SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Asănică, A., Tudor, V., Plopa, C., Sumedrea, M., Peticilă, A., Teodorescu, R., and Tudor, V. (2016). In Vitro Embryo Culture of Some Sweet Cherry Genotypes, *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 10, 172-177, <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.09.049>.
- Balla, I., and Brozik, S. (1996). Embryo culture of sweet cherry hybrids. *Acta Horticulturae* 410, 385-386.
- Baskin, J. M., and Baskin, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed science research*, 14(1), 1-16.
- Blažková, J., Erbenová, M., and Susová, V. (2003). Preliminary results using in vitro techniques for obtaining hybrid seedlings of sweet cherries. *Scientific papers of pomology*, pp. 67-76.
- Braak, J.P. (1978). The effect of flowering date and temperature on embryo development in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Neth. J. agric. Sci.*, 26: 13-30.
- Buchtová, I., and Němcová, V. (2022). *Situační a výhledová zpráva ovoce*. Ministerstvo zemědělství, Praha. ISBN 978-80-7434-676-7.
- FAOSTAT. (2022). *Agricultural Production. Crops Primary—Cherries*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (accessed on 20 January 2022).
- Fathi, H., Kazem, A., Ali, E., and Ahmad, K. (2009). Production of sweet cherry hybrids (Silej-Delamarka and Zard-Daneshkadeh) using embryo culture. *Seed and Plant Improvement Journal*, 251, 51-64.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., and Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 387-415.
- Gniazdowska, A., Krasuska, U., and Bogatek, R. (2010). Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. *Planta*, 232, 1397-1407.
- Chen, S.Y., Chien, C.T., Chung, J.D., Yang, Y.S., and Kuo, S.R. (2007). Dormancy-break and germination in seeds of *Prunus campanulata* (Rosaceae): role of covering layers and changes in concentration of abscisic acid and gibberellins. *Seed Science Research*, 17(1), 21-32.
- Iezzoni, A., Wunsch, A., Höfer, M., Giovannini, D., Jensen, M., Quero García, J., Campoy, J.A., Vokurka, and A. Barreneche, T. (2017). Biodiversity, Germplasm Resources and Breeding Methods. In Quero-García, J., Iezzoni, A., Pulawska, J. and Lang, G. (eds.) *Cherries: Botany, Production and Uses*, CABI, pp. 36-59.
- Ishikura, Y., Kojima, Y., and Terazawa, M. (2001). Effects of phenolic compounds on seed germination of shirakamba birch, *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Eurasian Journal of Forest Research*, 2, 17-25.
- ISTA. (2019). *International Rules for Seed Testing*, Ed, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- Koukhartchik, N.V. and Semenas, S. (2000). EMBRYO CULTURE IN PRUNUS L. BREEDING. *Acta Hort.* 538, 663-665 DOI: 10.17660/ActaHortic.2000.538.118
- Kovalenko, N.N., and Gladkih, S.V. (2019). In vitro cultivation of the embryos of hybrid forms of early-ripening sweet cherry (*Prunus avium* L.) varieties. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 23(6), 765-771. <http://doi.org/10.18699/VJ19.550>

- Kovalenko, N.N., and Gladkih, S.V. (2020). Evaluation of seeds quality in the fruits of cherry varieties (*Cerasus vulgaris* L.) in the process of embryos cultivation in vitro. *BIO Web of Conferences*, 25, 04002. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20202504002>
- Lang, G.A. (2019). *Achieving sustainable cultivation of temperate zone tree fruits and berries: Volume 2: Case studies*. Burleigh Dodds Science Publishing Limited.
- Nečas, T., Göttingerová, M., Ondrášek, I. Náměstek, J., Wolf, J., Kiss, T., Mészáros, M., Nečasová, J., and Letocha, T. (2019). *NOVACE OVOCNICKÉHO ŠKOLKAŘSTVÍ moderní postupy rozmnožování a dopěstování*. Mendelova Univerzita v Brně, ISBN: 978-80-7509-636-4.
- Proietti, S., Moscatello, S., Villani, F., Mecucci, F., Walker, R.P., Famiani, F., and Battistelli, A. (2019). Quality and nutritional compounds of *Prunus cerasus* L. var. *austera* fruit grown in central Italy. *HortScience*, 54(6), 1005-1012.
- Quero-Garcia, J. (2019) Cherry breeding in the world: current analysis and future perspectives, *Italus Hortus*, 26(1), pp. 9-20. doi: 10.26353/j.itahort/2019.1.920
- Řezníček, V. (2014). Překonání dlouhé dormance osiva druhu *Cornus mas* L. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 55(4), 43-52.
- Şan, B., Yildirim, A.N., and Yildirim, F. (2014). An in vitro germination technique for some stone fruit species: The embryo isolated from cotyledons successfully germinated without cold pre-treatment of seeds. *HortScience*, 49(3), 294-296.
- Selim, H.H., Ibrahim, F.A., Fayek, M.A., El-Deen, S.S., and Gamal, N.M. (2016). Effect of different treatments on germination of Romi red grape seeds. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 20(2), 115.
- Stanys, V. (1997). In vitro techniques to increase the output of cherry seedlings from early-ripening parents. In *III International Cherry Symposium*, 468, 203-208.
- Stein, M., Serban, C., and McCord, P. (2020). Exogenous ethylene precursors and hydrogen peroxide aid in early seed dormancy release in sweet cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 146(1), 50-55.
- Tosun, F., and Koyuncu, F. (2007). Investigations of suitable pollinator for 0900 Ziraat sweet cherry cv.: pollen performance tests, germination tests, germination procedures, in vitro and in vivo pollinations. *Horticultural Science*, 34(2), 47-53.
- Wu, Y.-J., Song, Q.-Q., Yuan, Y., Guo, F.-Q., Wu, K.-X., and Dong, M.-M. (2021). In vitro efficiency of embryo rescue of intra- and interspecific hybrid crosses of sweet cherry and Chinese cherry cultivars, *Scientia Horticulturae*, 275, 109716, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109716>.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (2023). GRIN-Global U.S. National Plant Germplasm System. [npgsweb.ars-grin.gov](https://npgsweb.ars-grin.gov) [online]. Dostupné z: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=29844>
- Žďárská, I., and Suran, P. (2021). Využití in vitro kultur pro zvýšení klíčivosti embryí raných odrůd třešní. *Osivo a sadba*, pp. 24-30.



## **SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE**

Žďárská, I., and Suran, P. (2021). Využití in vitro kultur pro zvýšení klíčivosti embryí raných odrůd třešní. Osivo a sadba, s. 24-30.

## **DEDIKACE**

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum (NAZV) č. QK1910290 s názvem „Rozvoj a aplikace molekulárně genetických metod pro racionalizaci šlechtitelských postupů třešní (*Prunus avium* L.)“.

v y d á v á

## OSVĚDČENÍ

UKZUZ 217822/2023

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: **METODIKA ZVÝŠENÍ VÝTĚŽNOSTI GENOTYPŮ  
Z HYBRIDNÍHO OSIVA TŘEŠNÍ**

Autor/autoři: **Pavol Suran, Ivona Žďárská, Kateřina Pazderů, Tereza Bydžovská,  
Lubor Zelený**

Název organizace/cí: **VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ  
HOLOVOUSY s.r.o.;**  
**Česká zemědělská univerzita v Praze**

Místo vydání: **Holovousy**  
Rok vydání: **2024**

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu MZe ČR NAZV č. QK1910290 „Rozvoj a aplikace molekulárně genetických metod pro racionalizaci šlechtitelských postupů třešní (*Prunus avium L.*)

Brno 19. 12. 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 .....

**Ing. Jan Adamec**

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

## **Metodika zvýšení výtěžnosti genotypů z hybridního osiva třešní**

**Vydal:**

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

**1. vydání, 2023**

**ISBN 978-80-87030-95-0 (online; pdf)**

<https://doi.org/10.60615/j47b-js31>

