

OZDRAVOVÁNÍ JÁDROVIN S VYUŽITÍM *IN VITRO* KULTUR*IN VITRO* SANITATION OF POME FRUIT CULTIVARS

Jiří Sedlák, František Paprštejn, Radek Čmejl

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

e-mail: jiri.sedlak@vsuo.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to test methods of sanitation of virulent basic plants of apple and pear for the certification system using *in vitro* cultures and chemotherapy with ribavirin. The highest multiplication coefficient in *in vitro* culture (4.7) was noted for apple cultivar 'Bohemia Sl' on MS medium with TDZ 0.5 mg · l⁻¹. Thermolabile ribavirin was added in concentration 20 mg · l⁻¹ after autoclaving to the same MS medium as for multiplication. Two mericlones (No. 1 and 2) sanitized from ACLSV and ApMV were obtained. Concerning pear 'Erika', we obtained inconclusive results in the case of ACLSV in three tested mericlones. Obtained virus-free plants will be included in the established system of certification of initial plant material after repeated testing and long term observation.

Keywords: *in vitro* cultures, medium, elimination of viruses, ribavirin, shoot tip

Cílem této práce bylo testování metod ozdravování a získání viruprostých základních rostlin odrůd jabloně a hrušně pro systém certifikace pomocí *in vitro* kultur a chemoterapie s využitím ribavirinu. Nejvyšší koeficient množení v *in vitro* kultuře (4,7) byl v našich pokusech zaznamenán u odrůdy jabloně 'Bohemia Sl' na MS médiu s koncentrací TDZ 0,5 mg · l⁻¹. Termolabilní antivirotikum ribavirin bylo do MS média přidáno v koncentraci 20 mg · l⁻¹ po autoklávování. U odrůdy jabloně 'Bohemia Sl' se podařilo získat dva meriklony (č. 1 a 2) ozdravené od virů ACLSV a ApMV. U odrůdy hrušně 'Erika' byly u všech třech testovaných meriklonů výsledky u viru ACLSV nekonkluzivní. Získané viruprosté základní rostliny budou po opakovaném testování a dlouhodobém sledování v budoucnu zahrnuty do etablovaného systému certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu.

Klíčová slova: *in vitro* kultura, eliminace virů, médium, ribavirin, vrchol

Virová onemocnění způsobují u trvalých kultur, jako jsou ovocné sady každoročně významné hospodářské škody. Jádroviny přitom představují v podmínkách mírného klimatu ve Střední Evropě ekonomicky důležitou skupinu vegetativně množených ovocných plodin. Jablka mají rozhodující podíl na celkové produkci ovoce v České republice. Jejich sklizeň dosáhla v roce 2018 objemu 127,7 tis. tun a dle odhadu jejich podíl na celkové produkci ovoce v roce 2018 činil 80 %. Na tržbách ovocnářských podniků se z poslední statisticky vyhodnocené sklizně roku 2017 podílela jablka 71 % (Buchtová 2018). Hrušeň je v posledních třech letech ovocná plodina s vysokou dynamikou nárůstu pěstitelských ploch a je považována za perspektivní i do budoucna. V roce 2018, bylo evidováno celkem 749 ha produkčních hrušňových sadů (Buchtová 2018). Tuzemská produkce jablek a hrušek je stále pod velkým konkurenčním tlakem dovozu ovoce z jiných zemí (státy EU, Ukrajina, Nový Zéland, Jižní Afrika, Chile, Čína). Přestože pro produkci jádroviny existují v České republice velmi vhodné klimatické a půdní podmínky, jejich produkce nepokrývá vlastní tuzemskou spotřebu a například u konzumních jablek je dlouhodobě vykazována záporná obchodní bilance.

Konkurenceschopnost českého školkařství a především českého ovocnářství je přitom závislá na zdravém výchozím pěstebním materiálu. Rostliny jádroviny jsou často infikované více viry současně a dochází tak k negativnímu synergickému působení. Grimová *et al.* (2016) uvádí 70% výskyt ACLSV (virus chlorotické skvrnitosti jabloně, *Apple chlorotic leaf spot virus*), 62% ASPV (virus vráscitosti kmene jabloně, *Apple stem pitting virus*), 47% ASGV (virus žlábkovitosti kmene jabloně, *Apple stem grooving virus*) a 13% ApMV (virus mozaiky jabloně, *Apple mosaic virus*) v sadech jabloní. U plodin využívaných v agrárním sektoru dochází v případě virové kontaminace ke snižování plodnosti a negativně je rovněž ovlivněna kvalita produkce.

Cílem této práce proto bylo testování metod ozdravování a získání viruprostých základních rostlin odrůd jabloně a hrušně pro systém certifikace pomocí *in vitro* kultur

a chemoterapie. Z praktického pohledu spočívá výhoda chemoterapie v tom, že na rozdíl od termoterapie nevyžaduje v průběhu ozdravování relativně nákladný kultivační box pro přesnou a dlouhodobou regulaci vysoké teploty (Paprštein *et al.* 2008). Antivirotikum lze přímo přidat do běžně používaných kultivačních *in vitro* médií pomocí antibakteriálních mikrofiltrů po autoklávování a rostliny pěstovat v běžné kultivační místnosti ve stejných světelných a tepelných podmínkách jako pro fázi množení.

Materiál a metody

Pro ozdravování pomocí ribavirinu byly vybrány dvě odrůdy domácího původu, a to jablůň 'Bohemia' (klon Sláma, dále označen Sl.) a hrušeň 'Erika', obě infikované virem chlorotické skvrnitosti jabloně (ACLSV). Odrůda jablůň 'Bohemia Sl' byla navíc infikována virem mozaiky jabloně (ApMV).

Z vybraných výchozích infikovaných rostlin byly po sterilizaci prorůstajících vrcholků (velikost 10 mm) založeny *in vitro* kultury. *In vitro* kultury byly pěstovány ve 100ml Erlenmeyerových baňkách zakrytých hliníkovou fólií s 25 ml MS média. Celkové složení modifikovaného MS média podle Murashige a Skoog (1962) je uvedeno v tabulce 1. V intervalu 25 až 35 dnů probíhalo sterilně kontinuální pasážování. Během kultivace byly explantátové kultury umístěny v kultivační místnosti s kontrolovaným světelným a tepelným režimem – 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 22 ± 1 °C. Pro výzkum indukce multiplikace a napěstování dostatečného množství rostlin pro další metodické postupy byly využity cytokinininy 6-benzylaminopurin (BAP) v koncentracích 1, 2 a 4 mg · l⁻¹ nebo thidiazuron (TDZ) v koncentraci 0,5 a 1 mg · l⁻¹. Teplotně nestabilní fytohormon TDZ byl přidán až po autoklávování a částečném zchladnutí média na 40 °C přes mikrofiltry (Supor Acrodisc 0,2 µm, Pall Corp. USA).

V průběhu jednotlivých subkultivací byly vedeny *in vitro* kultury na pevném agarovém médiu ve formě aktivně rostoucích mnohonásobných prýtů s dobře diferencovaným růstovým vrcholem. Metodickým cílem bylo geneticky uniformní množení výchozích rostlin pro

ozdravování, protože vzrostný vrchol v *in vitro* kultuře má obdobný růst a vývoj, včetně zachovalé strukturální organizace, jako vrchol u ve venkovních podmínkách rostoucí rostliny.

Všechny práce související se založením *in vitro* kultury, a přenosem ustavených explantátů na nová média probíhaly ve sterilním prostředí flow boxu s proudícím filtrovaným vzduchem. Pro zamezení exogenních kontaminací z vnějšího prostředí byly pracovní plochy v tomto boxu pravidelně dezinfikovány etanolem (95%). V průběhu kultivace byl stanoven multiplikační koeficient jednotlivých odrůd. Multiplikační koeficient byl vypočítán jako průměrný počet nových výhonů (delších než 10 mm) na výchozí explantát po 1 měsíci růstu na agarovém médiu v kultivační místnosti. V pokusech byl pro vyhodnocení variability souboru vypočítán SE (Standard Error).

V pokusech s multiplikací bylo pro každou koncentraci příslušného fytohormonu použito 100 výchozích explantátů.

Vlastní chemoterapie probíhala na stejném MS médiu s přídatkem $1,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP, jaké bylo používáno pro indukci množení. Termolabilní antivirotikum ribavirin (Sigma-Aldrich, Inc.) bylo přidáno do tohoto média v koncentraci $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ po autoklávování sterilně přes mikrofiltry (Supor Acrodisc $0,2 \mu\text{m}$, Pall Corp. USA). Chemicky se jedná o 1-beta-D-ribofuranosyl-1-2-4-triazole-carboxamid (Faccioli a Marani 1998). Jako explantáty určené pro chemoterapii byly z ustavených aktivně rostoucích *in vitro* kultur odebrány růstové vrcholy o délce 10 mm. Tyto vrcholy byly ve sterilním prostředí laminárního boxu z poloviny vertikálně ponořeny do média s ribavirinem. Baňky s rostlinami ošetřovanými chemoterapií byly umístěny do kultivační místnosti do stejných světelných a tepelných podmínek jako pro množení.

Z *in vitro* kultur ošetřovaných ribavirinem byly od každé použité odrůdy odebrány 3 vrcholy po jednom měsíci kultivace o délce 2 mm. Růstové vrcholy byly přeneseny na multiplikační MS médium s $1,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ BAP bez ribavirinu a umístěny do kultivační místnosti. *In vitro* vegetativně namnožené potomstvo každého z těchto výchozích vrcholů je nazýváno meriklonem. Toto rozdělení na jednotlivé

meriklony bylo provedeno pouze z hlediska možné virové kontaminace v původním vrcholu po ozdravovacím procesu a nikoliv na základě genotypové nebo fenotypové odlišnosti.

In vitro regenerované a vegetativně namnožené potomstvo každého jednotlivého vrcholu (označeného jako meriklon) odebraného z *in vitro* kultur, které prošly procesem ozdravování, bylo otestováno v souladu s certifikačním schématem metodou ELISA na přítomnost virových kontaminací. Celkem byly testovány čtyři virové patogeny: ACLSV, ApMV, ASGV a ASPV. Testy ELISA byly prováděny s užitím komerčních antisér firmy Bioreba podle návodu výrobce.

VÝSLEDKY A DISKUSE

U použitých odrůd se počet výhonů a jejich morfologie měnil s genotypem a koncentrací růstových regulátorů (Tabulka 2). Nejvyšší multiplikační koeficient 4,7 v pokusech s *in vitro* množením byl obdržen u odrůdy 'Bohemia Sl' na médiu s koncentrací TDZ $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. U téže odrůdy se jevila jako optimální i vyšší koncentrace hormonu BAP $4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, kdy byl dosažen multiplikační koeficient 4,2. V případě vyšší koncentrace fytohormonu TDZ $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ došlo ke snížení multiplikačního koeficientu na 3,5 a byl zaznamenán výskyt explantátů s abnormálně úzkými, čárkovitými listy. Výskyt explantátů s abnormálně úzkými, čárkovitými listy byl při použití obou koncentrací $0,5$ a $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ fytohormonu TDZ zaznamenán rovněž u odrůdy 'Erika'. Nejvyšší multiplikační koeficient 3,9 byl u této odrůdy pozorován na médiu s $0,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ TDZ. Během pokusů s *in vitro* množením se podařilo u obou odlišných genotypů potvrdit, že lze přídatkem růstových regulátorů-cytokininů BAP a TDZ v podmínkách *in vitro* podpořit buněčné dělení a tím vyvolat růst a multiplikaci.

Dosažené multiplikační koeficienty umožňují v průběhu jednoho roku získat z jednoho výchozího vrcholu dostatečné množství nových rostlin pro ozdravovací pokusy. Přestože jsou pro některé genotypy jabloně a hrušně již známy postupy pro *in vitro* namnožení, naše pokusy potvrdily, že z důvodu heterogenity jádrovin i v rámci jednoho druhu je potřeba provádět

další výzkum až na úroveň odrůdy. Dobré olistění a zdravě prorůstající výhony jsou přitom základem pro zvládnutí stresu a přežití *in vitro* pěstovaných rostlin při aplikaci chemoterapie nebo při následném převodu zakořeněných rostlin z *in vitro* do *ex vitro* podmínek. Rychlost množení je důležitá pro naplánování zahájení a průběh chemoterapie. Přítomnost ribavirinu v médiu při chemoterapii je stresovým faktorem, který může vést k významnému odumírání a ztrátám jednotlivých rostlin v *in vitro* kultuře, většinou ještě během terapie. Z tohoto důvodu je nutné mít před zahájením ozdravování desítky *in vitro* rostlin s diferencovaným růstovým vrcholem a kvalitním olistěním.

Po *in vitro* chemoterapii rostly a množily se všechny odebrané vrcholy. Při použité koncentraci antivirotika $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ nebyly pozorovány žádné negativní morfologické změny nebo příznaky toxicity. V tabulce 3 jsou uvedeny výsledky testů ELISA po ukončení chemoterapie a opětovném namnožení jednotlivých klonů. U odrůdy jabloně 'Bohemia Sl' se podařilo získat dva meriklony (č. 1 a 2) ozdravené od virů ACLSV a ApMV, jimiž byly infikovány výchozí mateřské rostliny. Meriklon 'Bohemia Sl 3' vykazoval nekonkluzivní výsledek na přítomnost viru ACLSV. U odrůdy hrušně 'Erika' byly u všech třech testovaných meriklonů zaznamenány u viru ACLSV nekonkluzivní výsledky. Výsledky dosažené zejména u jabloně 'Bohemia Sl' potvrzují účinnost ribavirinu proti běžně se vyskytujícím virům jádrovin ACLSV, a ApMV. Nekonkluzivní výsledek (NK) znamená, že jedinec může být potenciálně pozitivní na výskyt viru a nemůže být zařazen do certifikačního schématu pro množení výchozího rostlinného materiálu.

Práce zabývající se eliminací jednotlivých virů z jádrovin pomocí chemoterapie nejsou příliš četné. Na základě našich i zahraničních výsledků lze konstatovat, že rozdíly v úspěšnosti chemoterapie mohou souviset se specifickou interakcí mezi konkrétní odrůdou jako hostitelem a virovým patogenem. Účinnost chemoterapie může být také ovlivněna koncentrací viru ve výchozím rostlinném materiálu a kmenem viru (Cieslinska 1995, Cieslinska 2007). V případě viru ACLSV byli Hansen a Lane (1985) schopni

inhibovat na médiu s 40 až 80 μM ribavirinu tento virus v vrcholových *in vitro* kultur odrůdy jabloně 'Banánové zimní'. Cieslinska (2002) dosáhla úspěšnosti 62,7 až 100 % ozdravených *in vitro* rostlin hrušně u viru ACLSV při přidávku ribavirinu v koncentraci 25 až $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ do agarového MS média. Vhodnost *in vitro* chemoterapie byla potvrzena v práci Ondrušikové *et. al* (2016), při odstraňování viru ACLSV z broskvoní a meruněk.

Přesný mechanismus protivirového účinku ribavirinu nebyl dosud zcela uspokojivě objasněn. Ribavirin je účinný zejména proti virům, které ve své částici (virionu) obsahují ribonukleovou kyselinu (RNA). RNA viry početně převažují ve skupině rostlinných virů. Jedním z možných vysvětlení je, že po vstupu ribavirinu do metabolismu léčeného organismu dochází k metabolizaci ribavirinu na strukturu velmi podobnou purinovým RNA nukleotidům. V této formě pak může zasahovat (interferovat) do replikace virové RNA jako náhrada za guanin, nebo i adenin. Po spárování s komplementárními nukleotidy uracilem, nebo cytosinem ve fázi replikace dochází k mutaci virové RNA, která je pro virus letální (Crotty *et al.* 2002). Zejména z oblasti humánní medicíny je znám i mutagenní účinek ribavirinu (Husa 2009, Husa 2014). Dá se předpokládat, že antivirotikum ribavirin může podporovat vyšší frekvenci výskytu somatických mutací i u geneticky méně stabilních odrůd ovocných plodin. U materiálu prošlého chemoterapií je proto nutná kontrola genetické stability sledováním morfologických znaků výhonů a listů a po nástupu fáze plodnosti i sledováním plodů. Virus ACLSV se často vyskytuje v jádrovinách v komplexu s dalšími viry ASPV a ASGV.

Vzhledem k možnosti různé koncentrace virů v jednotlivých částech rostlin bude potenciálně ozdravený materiál jádrovin sledován a testován i v následujících letech. Ozdravováním také může dojít k pouze k dočasnému snížení koncentrace virových částic pod hranici detekce použitými diagnostickými metodami.

ZÁVĚR

V průběhu ozdravovacích terapií získané bezvirózní *in vitro* meriklony jsou v současné době kořeněny a převáděny do *ex vitro* podmínek. Předpokládáme, že získané zdravé základní rostliny budou po opakovaném testování různými na sobě nezávislými diagnostickými metodami (např. ELISA, RT -

PCR, bylinné a dřevité indikátory) v budoucnu zahrnuty do systému certifikace zdravotního stavu výsadbového materiálu. Viruprosté rostliny původních českých odrůd nelze získat v zahraničí. Uplatnění českých odrůd v zahraničí závisí často na skutečnosti, zda může být zahraničním odběratelům nabídnout viruprostý základní materiál.

PODĚKOVÁNÍ

Výsledek byl vytvořen za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I, projekt LO1608 „Výzkumné ovocnářské centrum“.

LITERATURA

- BUCHTOVÁ, I. *Situační a výhledová zpráva ovoce*. Ministerstvo zemědělství, Praha, 2018, 89 s.
- CIESLINSKA, M. Elimination of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. *Acta Hort.* 2002, (596): 481–484.
- CIESLINSKA, M. Application of thermo- and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.* 2007, (15): 117–124.
- CIESLINSKA, M., T. MALINOWSKI and B.J. ZAWADZKA. Studies on several strains of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) isolated from different fruit tree species. *Acta Hort.* 1995, (386): 63–71.
- CROTTY, S., C. CAMERON and R. ANDINO. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *Journal of Molecular Medicine.* 2002, **80**(2): 86–95.
- FACCIOLI, G. and F. MARANI. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi A. (ed) *Plant Virus Disease Control*, St. Paul, Minnesota, USA, 1998, p. 346–380.
- GRIMOVÁ, L., L. WINKOWSKA, a P. RYŠÁNEK. *Detekce vybraných virů infikujících jabloně, certifikovaná metodika*. ČZU, Praha, 2016, 36 s.
- HANSEN, A.J. and W.D. LANE. Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Disease.* 1985, **69**(2): 134–135.
- HUSA, P. Léčba chronických virových hepatitid v roce 2009. *Interní medicína pro praxi.* 2009, **11**: 504–506.
- HUSA, P. Nová antivirotika v léčbě hepatitidy C. *Praktické lékařství.* 2014, **10**: 50–51.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962, **15**: 473–497.
- ONDRUŠIKOVÁ, E., M. KUDĚLKOVÁ, R. PAVELKOVÁ, J. MOUDRÁ, B. KŘIŽAN a V. HOLLEINOVÁ. *Metodika eliminace virů vyskytujících se na meruňce a broskvoni s využitím chemoterapie in vitro, certifikovaná metodika*. Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně, Brno, 2016, 30 s.
- PAPRŠTEIN, F., J. SEDLÁK, J. POLÁK, L. SVOBODOVÁ, M. HASSAN, and M. BRYXIOVÁ. Results of *in vitro* thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2008, **94**(3): 347–352.

TABULKY

Tabulka 1. Výchozí modifikované MS médium pro *in vitro* kultivaci a ozdravování

Table 1. Modified MS medium for *in vitro* cultivation and sanitation

Složka ¹⁾	mg · l ⁻¹	Složka ¹⁾	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 ²⁾	0,5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	Glycin	2
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	Sacharóza ³⁾	30 000
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	Myo-inositol	100
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	Agar	7 000
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	Kyselina askorbová ⁴⁾	4
pH média ⁵⁾	5,8	Ribavirin	20

1) Compound, 2) Nicotinic acid, 3) Sucrose, 4) Ascorbic acid, 5) pH of medium

Tabulka 2. *In vitro* multiplikace na MS médiu

Table 2. *In vitro* multiplication on MS medium

Cytokinin ¹⁾ (mg · l ⁻¹)	Bohemia SI	Erika
TDZ		
0,5	4,7 ± 0,4	3,9 ± 0,3 ²⁾
1	3,5 ± 0,3 ²⁾	3,2 ± 0,2 ²⁾
BAP		
1,0	2,7 ± 0,2	1,6 ± 0,1
2,0	3,5 ± 0,3	1,8 ± 0,1
4,0	4,2 ± 0,3	2,8 ± 0,2

1) Cytokinin, 2) Smaller explants with abnormally narrow leaves

Tabulka 3. Výsledky testování ELISA po chemoterapii**Table 3.** Results of ELISA testing after chemotherapy

Odrůda, meriklon ¹⁾	Viry ³⁾			
	ApMV	ACLSV	ASGV	ASPV
Bohemia Sl 1	-	-	-	-
Bohemia Sl 2	-	-	-	-
Bohemia Sl 3	-	NK ²⁾	-	-
Erika 1	-	NK	-	-
Erika 2	-	NK	-	-
Erika 3	-	NK	-	-

1) Cultivar, mericlone, 2) Inconclusive, 3) Viruses