

## KRYOPREZERVACE DORMANTNÍCH VÝHONŮ OVOCNÝCH DŘEVIN

## CRYOPRESERVATION OF DORMANT FRUIT TREE SHOOTS

Matěj Semerák, Alexandra Slámová

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

e-mail: [matej.semerak@vsuo.cz](mailto:matej.semerak@vsuo.cz), ORCID ID: [0000-0003-0666-8143](https://orcid.org/0000-0003-0666-8143)

**ABSTRAKT**

V letech 2021–2024 byly provedeny kryoprezervační experimenty zaměřené na dormantní výhony jádřovin a peckovin. Klasický protokol zamrazení jednonodálních segmentů byl pozměněn směrem k segmentům vícenodálním. U jabloní a hrušní jsme zaznamenali nápadné rozdíly v ujmavosti oček různých (i těchž) odrůd v jednotlivých letech. Pro očka jabloní se v závislosti na odrůdě a sezóně osvědčilo vstupní vysušení na 40 i 30 % relativního obsahu vody, pro hrušně to bylo 40 i 35 % relativního obsahu vody v roce 2023 u odrůdy 'Lucasova'. Z peckovin vykazovala prokazatelnou, byť procentuálně nízkou životaschopnost pouze rozmrazená očka slivoně 'Stanley'. Sezónní výkyvy jsou zřejmě způsobeny extrémními teplotami během posledních zim. V roce 2025 budeme znát výsledky očkování z léta 2024. Průběh tohoto ročníku, kdy jsme se zaměřili na roli termínu odběru výhonů, však opět výrazně ovlivnilo mimořádně teplé počasí.

**Klíčová slova:** zamrazení, dusík, jádřoviny, peckoviny, segmenty, očkování

**ABSTRACT**

In 2021–2024, cryopreservation experiments focused on dormant shoots of pome and stone fruit trees were conducted. The classic freezing protocol, which uses single-nodal segments, was modified towards segments with several nodes. In the case of apple and pear trees, we noticed striking variance in the viability among different (or even the same) varieties in different years. Depending on the variety and season, initial drying to 40 and 30% proved effective for apple buds. For pears, it was 40 and 35% in 2023 for 'Lucasova'. Of the cryopreserved stone fruit trees, only the plum 'Stanley' showed demonstrable, albeit low viability of the buds. Seasonal fluctuations are likely to be caused by extreme temperatures during recent winters. In 2025, the results of the budding from the summer of 2024 will be known. However, the course of the experiment in this season, when we focused on the role of the shoot collection date, was again largely affected by the extraordinarily warm weather.

**Keywords:** freezing, nitrogen, pome fruit, stone fruit, segments, budding

## ÚVOD

Kryoprezervace dormantních výhonů je jedním ze způsobů, jak dlouhodobě uchovat genetický materiál ovocných druhů. Jedná se o uskladnění jedno- či vícenodálních segmentů výhonů dřevin, odebraných v zimním období, v parách nad hladinou kapalného dusíku. Po rozmrazení lze provést očkování na příslušné podnože, a opět tak vypěstovat stromek zájmové odrůdy.

V porovnání s metodou zamrazování vzrostných vrcholků kultur pěstovaných *in vitro* nabízí tento přístup některé výhody. Ty spočívají především v menší časové náročnosti celého postupu, a to jak během přípravy materiálu (není třeba zakládat a množit explantátovou kulturu), tak po jeho odtání. Chceme-li totiž z genofondové položky získat výpěstek, odpadá několikaměsíční regenerace vrcholků, zakořeňovací fáze, převod *ex vitro* a aklimatizace. Naopak nevýhodu lze spatřovat v poněkud vyšších prostorových nárocích během uložení v dusíkových parách.

Z ovocných druhů se kryoprezervace segmentů již uplatnila např. u jabloní (Forsline *et al.*, 1998; Höfer, 2015; Bilavčík *et al.*, 2018; Volk *et al.*, 2020), hrušní (Bilavčík *et al.*, 2021; Höfer a Flachowsky, 2023) nebo mandloní (Choudhary *et al.*, 2014). V rámci daného druhu se projevují meziodrůdové rozdíly v ujímavosti oček, variabilita navíc panuje i mezi jednotlivými sezónami odběrů.

Klasický postup této kryoprezervace zahrnuje několik základních kroků. Začíná odběrem výhonů, následuje jejich otužování při teplotě pod bodem mrazu, nařezání segmentů, jejich řízené vysoušení, jež má zabránit letální tvorbě ledových krystalů, a zamrazení. Chceme-li materiál znovu použít, je třeba jej rozmrazit, rehydratovat a následně naočkovat. Během procesu vstupuje do hry řada proměnných, které mohou dále působit na úspěšnost metody pro různé genotypy, jak naznačuje tabulka 1.

**Tabulka 1.** Faktory vstupující do průběhu kryoprezervace

**Table 1.** Factors entering the course of cryopreservation

Krok <sup>1)</sup>	Vlivy a parametry <sup>2)</sup>
Odběr	kalendářní termín průběh teplot v předchozím období a aktuální teplota při odběru síla a zdravotní stav výhonů, fáze jejich dormance manipulace s výhony po odběru
Otužování	trvání (žádné / dny / týdny / měsíce) nastavení teploty
Nařezání	manipulace s materiálem (při teplotě <0 °C / při teplotě >0 °C) délka (jednonodální / vícenodální) a síla segmentů
Vysoušení	cílový stupeň vysušení volba vzorce pro stanovení relativního obsahu vody
Zamrazení	průběh teploty při zamrazování
Rozmrazení	průběh teploty při rozmrazování
Zavodnění	metoda rehydratace trvání rehydratace
Očkování	termín (na očko bdící / na očko spící)

1) Step, 2) Factors and parameters

Při provádění kryoprezervačních experimentů jsme vycházeli zejména z protokolů vyvíjených v laboratoři pro uchovávání genetických zdrojů Coloradské university ve Fort Collins, ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Praze a v Julius Kühn-Institut v Pillnitz.

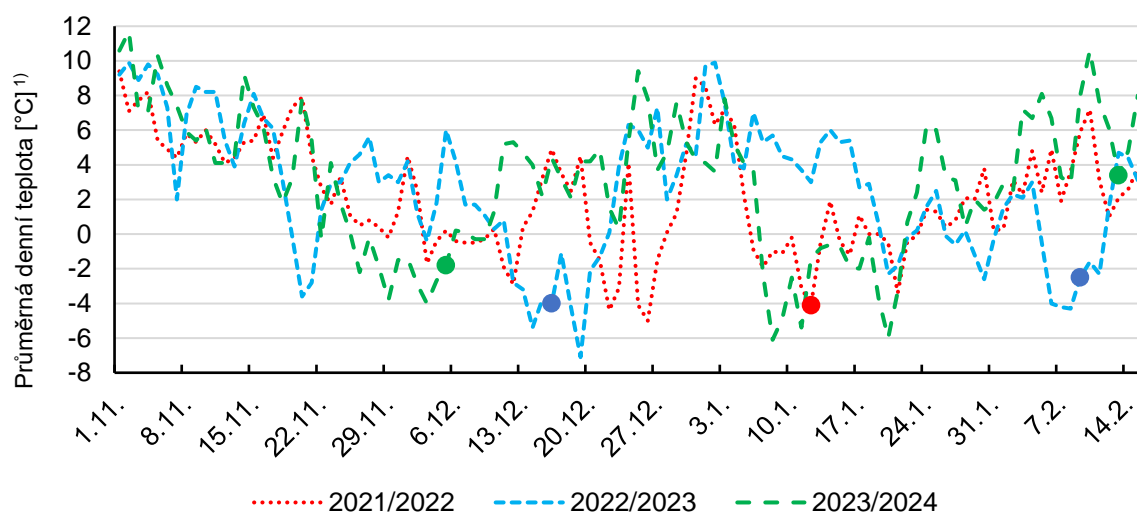
V jednotlivých letech jsme se zaměřili na vybrané aspekty, jež mohou ovlivnit konečnou životaschopnost materiálu. Odebírán byl vždy nadbytek výhonů, aby bylo možno zamrazit velké množství segmentů a při očkování z nich vybírat vzhledově nejživotaschopnější materiál.

## MATERIÁL A METODY

V jednotlivých letech se průběh kryoprezervačních pokusů mírně lišil, a to s ohledem na aktuální průběh počasí (Graf 1) a postupně i na zkušenosti získané v jednotlivých sezónách. Protokol vždy sledoval posloupnost základních kroků dle tabulky 1. Rozmrazený materiál byl dle ovocného druhu očkován na podnože M26, hrušňový semenáč, nebo myrobalán.

**Graf 1.** Průměrné denní teploty v Holovousích s vyznačením odběrů výhonů (ČHMÚ, © 2024)

**Graph 1.** Average daily temperatures in Holovously with shoot collection depicted (ČHMÚ, © 2024)



1) Average daily temperature [°C]

### Sezóna 2021/2022

Po extrémně teplém začátku roku se od 6. ledna průměrné denní teploty pohybovaly lehce pod bodem mrazu (Graf 1, červená řada). Dopoledne 12. ledna byly při teplotě  $-4\text{ °C}$  odebrány jednoleté výhony jabloní 'Lohák', 'Smiřické vzácné', 'Studniční', 'Grávštýnské', 'Gala' a 'Idared', hrušni 'Generál Leclerc', 'Jakubka česká' a 'Konference' a slivoní 'Stanley' a 'Babče'. Bezprostředně byly nařezány na délku 50–60 cm a v uzavřených zvlhčených igelitových pytlích umístěny na 50 dní do chlazeného inkubátoru, nastaveného na  $-5\text{ °C}$ . Po této době, 2. března, byly výhony venku při teplotě  $-4\text{ °C}$  nařezány na jednodální segmenty. Z odrůdy 'Grávštýnské' byly pořízeny segmenty delší (tří- až čtyřnodální).

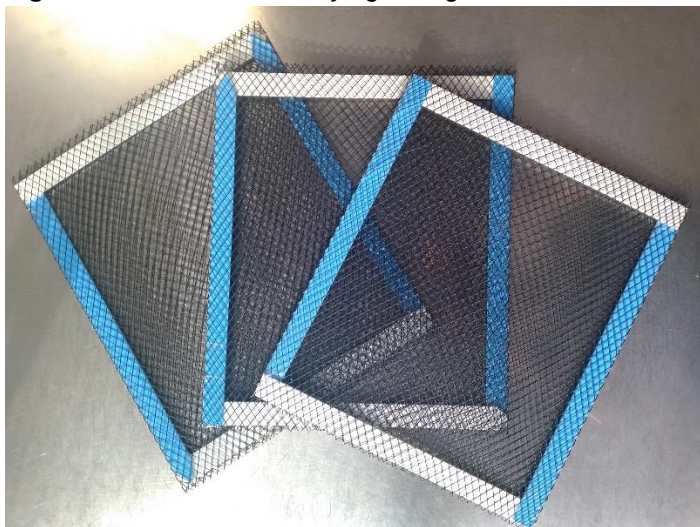
Paralelně jsme vybrali několik výhonů každé odrůdy pro kontrolu životaschopnosti; tyto byly nechány k volnému narašení ve vodě v pokojové teplotě. Rovněž bylo od každé odrůdy náhodně odebráno pět nařezaných segmentů za účelem stanovení relativního obsahu vody ve výchozím materiálu. Ten byl zjištěn po dvoudenním vysoušení těchto vzorků v horkovzdušné sušárně při teplotě  $95\text{ °C}$ , a to jako podíl hmotnosti obsažené vody ku celkové hmotnosti před vysoušením:

$$ROV_{po} = \frac{PH_{vz} - SH_{vz}}{PH_{vz}}$$

$ROV_{po}$  = relativní obsah vody na počátku,  $PH_{vz}$  = počáteční hmotnost vzorku,  $SH_{vz}$  = suchá hmotnost vzorku

Zbylé segmenty jednotlivých odrůd byly zváženy, umístěny do sítěk (Obrázek 1) a vráceny do inkubátoru pro mrazovou dehydrataci. Průběh vysoušení jsme během následujících týdnů sledovali pravidelným převažováním segmentů.

**Obrázek 1.** Sítky k mrazovému vysušování segmentů  
**Figure 1.** Nets for freeze-drying of segments



Dle aktuální hmotnosti segmentů v síťce bylo odhadováno klesání relativního obsahu vody, jehož počáteční hodnota  $ROV_{po}$  byla pro každou odrůdu stanovena výše:

$$ROV_{akt} = \frac{AH_s - PH_s \cdot (1 - ROV_{po})}{AH_s}$$

$ROV_{akt}$  = aktuální relativní obsah vody,  $AH_s$  = aktuální hmotnost segmentů,  $PH_s$  = počáteční hmotnost segmentů

Dle aktuálního relativního obsahu vody jsme v období od konce března do konce dubna postupně ukončovali vysoušení jednotlivých odrůd: při hodnotě 40 % 'Grávštýnské', 'Generál Leclerc', 'Jakubka česká', 'Konference' a 'Babče', při hodnotě 30 % pak 'Lohák', 'Smiřické vzácné', 'Studniční', 'Gala', 'Idared' a 'Stanley'. Segmenty, jež dosáhly požadovaného stupně vysoušení, byly vždy uzavřeny do plastových 50 ml zkumavek, aby vodní obsah v pletivech dále neklesal. Dne 2. května bylo zahájeno hluboké zamrazování všech segmentů.

Pro kontrolu jsme před tímto krokem odebrali vzorek 10–15 segmentů odrůd 'Lohák', 'Gala', 'Jakubka česká' a 'Babče'; tyto byly přemístěny do chladničky s teplotou 4 °C. Druhý den započala tamtéž rehydratace těchto kontrolních vzorků, a to ve vlhkém sterilním písku. Po dvou týdnech byly segmenty na spodní straně čerstvě seříznuty a vsazeny do vlhké rašeliny s pískem.

Ostatní vysušené segmenty, které zůstaly v inkubátoru, jsme ve zkumavkách vložili do programovatelného zamrazovače. Ten je rychlostí 1,4 °C/hod zamrazil z –5 °C na –30 °C; tato teplota byla poté udržována ještě 27 hodin a následně byly zkumavky umístěny do volně generovaných par nad kapalným dusíkem v Dewarově nádobě.

Část segmentů určená pro jarní očkování byla z dusíku vytažena 18. května. Rozmrazení a rehydratace proběhly stejně jako u kontrol (přes noc volně v chladničce, poté dva týdny tamtéž ve vlhkém písku). Dne 1. června byl očištěný materiál naočkován na připravené

podnože ve skleníku nebo ve školce. Segmenty pro letní očkování jsme rozmrazili 27. července. Rehydratovány byly stejným způsobem jako jarní varianta, očkování proběhlo 10. srpna ve školce.

### Sezóna 2022/2023

Po pěti dnech s průměrnými denními teplotami pod bodem mrazu byly 15. až 17. prosince (Graf 1, modrá řada) při cca  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  odebrány 50–60 cm dlouhé jednoleté výhony jabloní 'Lohák', 'Smiřické vzácné', 'Grávštýnské', 'Idared' a 'Boskoopské', hrušně 'Lucasova', slivoní 'Stanley' a 'Althanova renklóda' a meruňky 'Veharda'. Ve zvlhčených pytlích (Obrázek 2) jsme je uložili do inkubátoru nastaveného na  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kde zůstaly až do 8. února. Ten den byly při téže teplotě nařezány na 12cm vícenodální segmenty a vloženy do sítěk, načež započalo mrazové vysoušení. Stejně jako předešlý rok jsme ve vybraných vzorcích každé odrůdy stanovili výchozí relativní vlhkost pomocí horkovzdušné sušárny.

**Obrázek 2.** Odebrané výhony meruňky 'Veharda'

**Figure 2.** Collected shoots of the apricot 'Veharda'



Dne 9. února, po pěti dnech s průměrnou teplotou  $<0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Graf 1, modrá řada), se uskutečnil druhý odběr materiálu, a sice odrůdy 'Grávštýnské', přičemž se vybíraly nejsilnější dostupné jednoleté výhony. Ihned jsme je nařezali na 12cm segmenty a v síťce umístili do inkubátoru.

V období mezi začátkem března a koncem května bylo vysoušení jednotlivých odrůd postupně ukončováno. Relativní obsah vody jsme počítali dle stejného vztahu jako v zimě 2021/2022. Na rozdíl od předchozí sezóny nebyly poté segmenty vloženy do zkumavek, nýbrž jsme je v uzavíratelných igelitových sáčcích umístili do plastových krabiček, určených pro skladování hluboce zmrazeného materiálu. Zahrnuty byly následující varianty: jabloně při obsahu vody 40 a 30 %, hrušeň při 40 a 35 %, slivoně při 40 a 30 %, meruňka při 40, 35 a 30 %.

Varianty, jež cílových stupňů vysoušení dosáhly brzy, prodělaly řízené zamrazení 12. dubna, druhá část pak 31. května. Rychlost poklesu teploty z  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  na  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla opět nastavena na  $1,4\text{ }^{\circ}\text{C/hod}$ , hodnotu  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  pak přístroj držel ještě 10 hodin. Následně byl materiál uskladněn v parách kapalného dusíku.

Rozmrazení segmentů vybraných pro jarní očkování se uskutečnilo 7. června, následovalo zavodnění pletiv výše popsaným postupem. Dne 21. června proběhlo očkování na bdící očko. Stejným způsobem byly rozmrazeny a rehydratovány i segmenty pro očkování letní, a to 26. července. Samotné očkování na spící očko se pak konalo 10. srpna.

### Sezóna 2023/2024

Dne 5. prosince, ke konci 10denního období s průměrnými teplotami pod bodem mrazu (Graf 1, zelená řada), byly odebrány 50–60 cm dlouhé jednoleté výhony jabloní 'Idared' a

'Gala', hrušní 'Lucasova' a 'Clappova' a slivoní 'Stanley' a 'Wangenheimova'. Bezprostředně byly spolu s malým množstvím sněhu uzavřeny do igelitových pytlů a vloženy do inkubátoru s teplotou  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nařezání 12cm segmentů proběhlo 8. ledna dvojím způsobem: Od každé odrůdy jsme polovinu řezali venku při teplotě bod bodem mrazu, druhou polovinu pak v laboratoři. Veškerý materiál byl poté umístěn do nezakrytých plastových krabiček za účelem mrazového vysoušení v inkubátoru. Zároveň se odebraly kontrolní vzorky pro stanovení obsahu vody dle postupu popsáno výše.

Dne 13. února, během extrémně teplého období (Graf 1, zelená řada), se uskutečnil druhý odběr výhonů těchto odrůd. Tyto byly přes noc uloženy v chladničce při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  a potom v laboratoři nařezány na 12cm segmenty. Ihned následovalo umístění do inkubátoru v otevřených krabičkách (Obrázek 3) za účelem vysoušení; pomocí náhodných vzorků byl zjištěn počáteční obsah vody.

**Obrázek 3.** Mrazové vysoušení segmentů v krabičkách

**Figure 3.** Freeze-drying of segments in boxes



Od poloviny února do poloviny května jsme vysoušení segmentů z obou odběrových variant postupně ukončovali, tj. tyto segmenty byly zabaleny do igelitových sáčků a vráceny do krabiček. Cílový relativní obsah vody byl počítán stejným vzorcem jako v minulých letech a činil u jablek 30 %, u hrušní 37,5 % a u slivoní 35 %.

Zamrazení se dle rychlosti dosažení požadovaného stupně vysoušení uskutečnilo ve dvou várkách (10. dubna a 23. května) a proběhlo dle stejného protokolu jako předešlou sezónu. Veškerý materiál následně zůstal zamrazený v dusíkových parách do 18. července; tehdy byly segmenty rozmrazeny a rehydratovány po dva týdny výše popsaným postupem. Očkování se uskutečnilo 1. srpna ve školce.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

### Sezóna 2021/2022

Odrůdy byly pro experiment vybrány s ohledem na zastoupení jak historických a krajových, tak tržních. Výhony všech odrůd, u nichž byla po fázi otužování v inkubátoru zjišťována

životaschopnost, začaly po několika dnech v laboratoři ve vodě rašit. Stejně tak narašily i všechny segmenty, které již prodělaly vysušení a po opětovném zavodnění byly vsazeny do vlhké rašeliny s pískem, což prokázalo, že snížení a opětovné zvýšení vodního obsahu nemělo na pletiva letální dopady.

Při očkování bylo zjevné, že zdravotní stav segmentů se mezidruhově i meziodrůdově liší. Zatímco vzhled pletiv jabloní naznačoval jen lehká mrazová poškození, většina segmentů hrušní do značné míry zčernala v celém průřezu. Ze slivoní vykazovala výraznější barevné změny odrůda 'Babče'. Úspěšnost prorašení oček (u bdících vyhodnocená na podzim, u spících následující jaro) shrnuje tabulka 2.

**Tabulka 2.** Vyhodnocení očkování v roce 2022

**Table 2.** Evaluation of budding in 2022

Odrůda, Stupeň vysušení <sup>1)</sup>	Podíl rašících bdících oček <sup>2)</sup>	Podíl rašících spících oček <sup>3)</sup>
Lohák 30 %	2 z 12 ve skleníku <sup>4)</sup> , 3 ze 3 ve školce <sup>5)</sup>	6 z 11 ve školce
Smiřické vzácné 30 %	1 z 11 ve skleníku, 0 ze 3 ve školce	5 z 12 ve školce
Studniční 30 %	2 z 11 ve skleníku, 0 ze 3 ve školce	4 z 9 ve školce
Grávštýnské 40 %, delší	5 ze 14 ve skleníku, 0 ze 3 ve školce	0 z 12 ve školce
Gala 30 %	0 z 12 ve skleníku, 2 ze 3 ve školce	12 z 19 ve školce
Idared 30 %	1 z 11 ve skleníku, 3 ze 3 ve školce	10 z 15 ve školce
Generál Leclerc 40 %	0 z 8 ve skleníku	1 z 15 ve školce
Jakubka česká 40 %	0 z 8 ve skleníku	2 z 8 ve školce
Konference 40 %	0 z 9 ve skleníku	0 ze 7 ve školce
Stanley 30 %	0 z 24 ve skleníku, 0 ze 3 ve školce	0 ze 17 ve školce
Babče 40 %	0 z 18 ve skleníku	0 ze 7 ve školce

1) Variety and degree of drying out, 2) Proportion of sprouting wakeful buds, 3) Proportion of sprouting sleeping buds, 4) In greenhouse, 5) In fruit nursery

Výsledky očkování odpovídaly předpokladu, který vycházel z vizuálního hodnocení segmentů. Nejvyšší životaschopnost jsme obecně zaznamenali u oček jabloní (zejm. u odrůd 'Lohák', 'Gala' a 'Idared', u nichž celková ujímavost přesáhla 40 %), ovšem projevíly se meziodrůdové rozdíly. Zatímco např. 'Grávštýnské' prorašilo pouze v jarní variantě ve skleníku, očka odrůdy 'Gala' se ve skleníku neujala, zato v podmínkách školky prorůstala velmi úspěšně. Zjevně poškozená očka hrušní vykazovala velmi nízkou vitalitu, slivoně narašily vůbec. Po dvou letech se na očkovaných jabloních objevily první plody (Obrázek 4 a 5).

Očkování z krátkých segmentů se ukázalo jako velmi nepohodlné; s vícenodálním materiálem odrůdy 'Grávštýnské' se pracovalo mnohem snadněji. Navzdory standardním protokolům dostupným v literatuře jsme se tudíž rozhodli, že metodu jednodálních segmentů opustíme a v dalších letech budeme používat pouze delší. Takto obměněný postup rovněž umožňuje vybírat vhodná očka z každého segmentu dle jejich vzezření a vyhnout se rozsáhlejším mrazovým poškozením v blízkosti řezných ploch.

**Obrázky 4 a 5.** Plody odrůdy 'Smiřické vzácné' (vlevo) a 'Idared' (vpravo) v létě 2024  
**Figures 4 and 5.** Fruit of 'Smiřické vzácné' (left) and 'Idared' (right) in the summer 2024



### Sezóna 2022/2023

Při přípravě materiálu jsme se soustředili na výzkum vlivu stupně vysušení na ujmavost oček. Rozšířeno bylo také spektrum pokusných odrůd. Po zkušenostech z předchozího roku, kdy jabloně do různé míry prorašily po zamrazení při 40% i při 30% obsahu vody, jsme obě varianty opět zařadili, a to pro každou odrůdu. U hrušní se 30% vysušení nedoporučuje (Bilavčík *et al.*, 2021), proto jsme se rozhodli pro porovnání 40% a 35% varianty s použitím odrůdy 'Lucasova'. Ze slivoní jsme do experimentu opětovně vybrali odrůdu 'Stanley', a to s ohledem na vzhledové hodnocení oček v předchozí sezóně, a přidali jsme 'Althanovu renklódu'. Nově jsme zahrnuli meruňku, odolnou a bujně rostoucí odrůdu 'Veharda', a vyzkoušeli u ní tři úrovně vysušení.

Vzhled jabloňových segmentů při očkování naznačoval dobrou životaschopnost; jen u odrůdy 'Grávštýnské' se zdálo, že ve variantách vysušení na 40 % došlo k silnějšímu černání pletiv. Hrušňová očka v tomto roce nevykazovala žádná viditelná poškození (Obrázek 6). Ze slivoní vypadala nejhůře (přeschle) 'Althanova renklóda' vysušená na 30 %, pletiva meruňky se ve všech variantách jevila neporušená.

**Obrázek 6.** Segmenty hrušní při očkování v červnu 2023

**Figure 6.** Pear segments during budding in June 2023



(autor fotografie: Boris Krška)

V teplém a vlhkém prostředí skleníku bohužel sehrála devastující roli bakteriální infekce jabloní, která se v týdnech následujících po jarním očkování rozmohla pod štěpařskými páskami a způsobila odumírání podnoží, protože z celkových 67 oček vyrašilo pouze jedno 'Boskoopské'. Ani ve školce při letním očkování jsme tento rok nezaznamenali vysokou



úspěšnost u očkovaných jabloní. Celkově nejlépe dopadla hrušeň 'Lucasova', naočkovaná na jaře, přičemž výborného výsledku bylo dosaženo při obou stupních vysušení. Ze slivoní prorostlo jen několik oček odrůdy 'Stanley'. Překvapivý byl neúspěch v případě meruňky, třebaže její segmenty, přinejmenším soudě dle vizuálního hodnocení, přečkaly zamrazení vcelku nedotčené. Ujímavost oček všech odrůd a variant uvádí tabulka 3.

**Tabulka 3.** Vyhodnocení očkování v roce 2023

**Table 3.** Evaluation of budding in 2023

Odrůda, stupeň vysušení, termín očkování <sup>1)</sup>	Podíl rašících oček <sup>2)</sup>
Lohák 40 %, na očko spící <sup>3)</sup>	2 z 19 ve školce <sup>4)</sup>
Lohák 30 %, na očko spící	0 z 15 ve školce
Smiřické vzácné 40 %, na očko spící	6 z 23 ve školce
Smiřické vzácné 30 %, na očko spící	1 z 21 ve školce
Grávštýnské (odběr XII) 40 %, na očko spící	5 ze 14 ve školce
Grávštýnské (odběr XII) 30 %, na očko spící	1 z 19 ve školce
Grávštýnské (odběr II) 40 %, na očko bdící <sup>5)</sup>	0 ze 13 ve skleníku <sup>6)</sup>
Grávštýnské (odběr II) 30 %, na očko bdící	0 z 18 ve skleníku
Idared 40 %, na očko spící	1 z 18 ve školce
Idared 30 %, na očko spící	0 z 20 ve školce
Boskoopské 40 %, na očko bdící	0 z 18 ve skleníku
Boskoopské 30 %, na očko bdící	1 z 18 ve skleníku
Lucasova 40 %, na očko bdící	18 ze 36 ve skleníku
Lucasova 35 %, na očko bdící	21 ze 34 ve skleníku
Stanley 40 %, na očko spící	3 z 16 ve školce
Stanley 30 %, na očko spící	1 z 11 ve školce
Althanova renklóda 40 %, na očko bdící	0 z 11 ve skleníku
Althanova renklóda 30 %, na očko bdící	0 ze 13 ve skleníku
Veharda 40 %, na očko bdící	0 z 15 ve skleníku
Veharda 35 %, na očko bdící	0 z 15 ve skleníku
Veharda 30 %, na očko bdící	0 z 11 ve skleníku

1) Variety, degree of drying out, budding period, 2) Proportion of sprouting buds, 3) On sleeping bud, 4) In fruit nursery, 5) On wakeful bud, 6) In greenhouse

### Sezóna 2023/2024

Zaměřili jsme se na další parametry kryoprezervace, a sice termín odběru výhonů (začátek nebo konec zimy) a následné podmínky zacházení s nimi, s cílem určit optimální fázi v rámci období vegetačního klidu a také zjistit, do jaké míry je během veškeré manipulace nezbytné držet materiál v mrazu. Do experimentu jsme zahrnuli jabloně 'Idared' a 'Gala', které vykazovaly nejlepší výsledky při letním očkování v roce 2022, hrušeň 'Lucasova', jejíž očka úspěšně rašila v roce 2023, hrušeň 'Clappova', u níž byla popsána vysoká ujímavost (Bilavčík

et al., 2021), pro porovnání s minulými lety slivoň 'Stanley' a nově odrůdu 'Wangenheimova', známou svou mrazuodolností.

Oba provedené odběry nicméně ovlivnil mimořádný průběh počasí. Extrémně teplý konec léta a začátek podzimu způsobily, že stromy během listopadu nestihly shodit listy, takže výhony jsme v prosinci odebírali ještě zeleně olistěné. Ani další průběh zimy nepřinesl klasický přirozený průběh otužování během vynucené dormance; mimořádně vysoké teploty v únoru neumožnily nařezat pozdně zimní materiál při teplotě  $<0$  °C, tudíž pro další fázi ztratilo smysl zařazovat verzi s přísným dodržováním mrazových podmínek během řezání segmentů.

Vzhledem k množství různých variant a také po zkušenostech s infekcí podnoží ve skleníku v předešlém roce bylo provedeno jen letní očkování ve školce. Vzezření segmentů jabloní se mezi variantami nelišilo a nenaznačovalo žádné mrazové škody. Naopak veškerý materiál hrušní do značné míry zčernal (Obrázek 7), takže v některých variantách ani nebylo očkování možné. Vyskytly se však meziodrůdové rozdíly: Poněkud životaschopnější vzhled jsme zaznamenali u odrůdy 'Clappova' odebrané v prosinci s dodržováním následné mrazové manipulace a u odrůdy 'Lucasova' odebrané v únoru. Ze slivoňových oček se méně poškozenou jevila odrůda 'Wangenheimova', zejména v prosincové variantě držené při dalším postupu stále v mrazu, a rozsáhlejší černání pletiv nevykazovaly ani segmenty z únorového odběru obou odrůd.

**Obrázek 7.** Zčernalý segment hrušně při očkování v srpnu 2024

**Figure 7.** A blackened pear segment during budding in August 2024



Přehled naočkovaného materiálu uvádí tabulka 4. Definitivní výsledky z této sezóny budou známy až na jaře 2025, ovšem černání segmentů už napovědělo, že ujmavost hrušní bude mnohem horší než v roce 2023, ne-li nulová. Naopak jedno jabloňové očko ('Idared' z únorového odběru) navzdory letnímu termínu nezvykle vyrašilo již v prvních týdnech (Obrázek 8).

**Obrázek 8.** Očko odrůdy 'Idared' šest týdnů po srpnovém očkování

**Figure 8.** A bud of the variety 'Idared' six weeks after budding in August



(autor fotografií: Matěj Semerák)

**Tabulka 4.** Očkování na spící očko 2024**Table 4.** Grafting on sleeping bud 2024

Odrůda a příznak <sup>1)</sup>	Počet naočkovaných <sup>2)</sup>
Idared odběr 5.12., nařezaný při T <0 °C <sup>3)</sup>	10 ve školce <sup>4)</sup>
Gala odběr 5.12., nařezaná při T <0 °C	10 ve školce
Lucasova odběr 5.12., nařezaná při T <0 °C	0
Clappova odběr 5.12., nařezaná při T <0 °C	5 ve školce
Stanley odběr 5.12., nařezaná při T <0 °C	10 ve školce
Wangenheimova odběr 5.12., nařezaná při T <0 °C	10 ve školce
Idared odběr 5.12., nařezaný při T >0 °C	10 ve školce
Gala odběr 5.12., nařezaná při T >0 °C	10 ve školce
Lucasova odběr 5.12., nařezaná při T >0 °C	0
Clappova odběr 5.12., nařezaná při T >0 °C	3 ve školce
Stanley odběr 5.12., nařezaná při T >0 °C	9 ve školce
Wangenheimova odběr 5.12., nařezaná při T >0 °C	10 ve školce
Idared odběr 13. 2.	10 ve školce
Gala odběr 13. 2.	10 ve školce
Lucasova odběr 13. 2.	10 ve školce
Clappova odběr 13. 2.	4 ve školce
Stanley odběr 13. 2.	10 ve školce
Wangenheimova odběr 13. 2.	10 ve školce

1) Variety and parameter, 2) Number of grafted buds, 3) Idared sampled 5. 12., cut in T <0 °C, 4) In fruit nursery

### Celkové zhodnocení 2021–2024

U jabloní byla vysoká úspěšnost rašení oček (průměrně 47 %) zaznamenána při očkování v roce 2022. Meziodrůdové rozdíly však byly značné: od 0 % ('Grávštýnské') až po více než 60 % ('Gala' a 'Idared'). Konkrétně pro 'Grávštýnské', u něž byla poprvé vyzkoušena práce s vícenodálními segmenty (vysušenými jen do 40 % obsahu vody, na rozdíl od ostatních odrůd), se nabízel vysvětlení, že právě tato obměna postupu zapříčinila neúspěch, avšak při předchozím jarním očkování ve stejném roce dopadl tentýž materiál naopak nejlépe. Jarní termín roku 2023 sice u jabloní znehodnotila bakteriální infekce, ale letní očkování přineslo nečekaný výsledek: Nejlépe (třebaže pouze z 18 %) prorůstala očka odrůdy 'Grávštýnské', kdežto 'Idared' rašil minimálně (2,5 %), přičemž ve variantě vysušení na 40 % se životaschopnost jevila vyšší, což kontrastuje s předchozím rokem. Vyhodnocení další sezóny pak bude možné až v roce 2025, ale dle vzhledu oček lze očekávat, že ujmavost bude poměrně dobrá.

I u hrušní jsme zaznamenali výrazné výkyvy ve výsledcích: Zatímco první rok celkově prorostlo jen 5 % oček odrůd 'Generál Leclerc', 'Jakubka česká' a 'Konference', ujmavost oček hrušně 'Lucasova' v roce následujícím dosáhla průměrně 55 %. Tento propastný rozdíl však nelze jednoduše zdůvodnit odrůdovou závislostí, poněvadž ve třetím roce téměř všechny pokusné segmenty téže odrůdy zčernaly.

Úspěšnost rašení slivoní prozatím zůstává obecně nízká, u meruněk nulová. Je možné, že slibně vyhlížející očka odrůdy 'Wangenheimova' naznačí v příštím roce souvislost mezi mrazuodolností a schopností přestát kryoprezervaci.

Výsledky kryoprezervace se mohou výrazně (od 0 až do 80 %) lišit mezi sekcemi rodu *Malus* (Höfer, 2015). Zřetelné rozdíly se projeví i mezi jednotlivými odrůdami druhu *Malus domestica* při našich experimentech.

Podobně může úspěšnost značně kolísat u odrůd hrušní v jednotlivých letech. Příkladem je odrůda 'Lucasova' s ujímavostí 76 a 11 % ve dvou po sobě následujících sezónách (Bilavčík *et al.*, 2021). Takové výkyvy se nám rovněž potvrdily.

Bezpochyby zásadní roli bude při kryoprezervaci hrát průběh teplot v období před odběrem, ovšem ani volba mrazivého týdne nemusí zaručit zdárný průběh. Klíč k úspěchu patrně tkví v kombinaci příznivého průběhu počasí a optimálního termínu odběru; v posledních letech nastává takový souběh vhodných podmínek stále vzácněji.

## ZÁVĚR

Kryoprezervaci nařezaných dormantních výhonů lze použít pro uchování genetických zdrojů jabloní a hrušní, ovšem je nutno počítat s výrazně proměnlivou ujímavostí oček, a to jak mezi různými odrůdami, tak v závislosti na jednotlivých letech. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u odrůd 'Gala' a 'Idared' při očkování na spící očko v roce 2022 (přes 60 % rašících oček) a u odrůdy 'Lucasova' při očkování na očko bdící v roce 2023 (55 % rašících oček). Pro peckoviny se tento přístup dosud příliš neosvědčil: Zatím jediným genotypem s několika prorašenými očky je odrůda slivoně 'Stanley'.

Klasický protokol, dle něž do kryoprezervace vstupují jednonodální segmenty, jsme pozměnili směrem k segmentům tří- až čtyřnodálním, aby se snížilo nebezpečí zranění při očkování. Takto modifikovaný způsob se ukázal jako funkční. Při experimentech se dále snažíme zjistit, nakolik úspěch metody ovlivňují proměnné, které v různých fázích působí; do dalších let přichází v úvahu otestovat např. postupné snižování teploty během otužování a/nebo mrazového vysoušení. Rovněž se nabízí vyzkoušet postup na dalších ovocných druzích, např. třešních či višních.

## PODĚKOVÁNÍ

Výsledek byl vytvořen za podpory projektu institucionální podpory RO1524 (Ministerstvo zemědělství). Výzkum navazuje na spolupráci s Petrou Jiroutovou (t.č. na rodičovské dovolené) a první kryoprezervační experimenty v sezóně 2020/2021. Děkujeme prof. Borisi Krškovi za konzultace postupu, rady a náměty pro průběh experimentů a také za provedení očkování v roce 2023. Rizovi a Lejle Feizullaievovým děkujeme za očkování v letech 2022 a 2024.

## LITERATURA

BILAVČÍK, A., FALTUS, M. a ZÁMEČNÍK, J. *Kryoprezervace dormantních pupenů jabloně. Certifikovaná metodika*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2018. ISBN: 978-80-7427-295-0.

- BILAVČÍK, A., FALTUS, M. a ZÁMEČNÍK, J. The Survival of Pear Dormant Buds at Ultra-Low Temperatures. Online. *Plants*, 2021, vol. 10, no.11, p. 2502. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants10112502>. [cit. 2024-09-13]
- ČESKÝ HYDROMETEOROLOGICKÝ ÚSTAV [ČHMÚ]. Denní data ze stanic ČHMÚ [2024]. Dostupné z: <https://www.chmi.cz/historicka-data/pocasi/denni-data/Denni-data-dle-z.-123-1998-Sb>. [pozn.: Údaje za leden a únor 2024 prozatím nejsou veřejně k dispozici.]
- FORSLINE, P. L.; TOWILL, L. E.; WADDELL, J. W.; STUSHNOFF, C.; LAMBOY, W. F. a MCFERSON, J. R. Recovery and Longevity of Cryopreserved Dormant Apple Buds. Online. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1998, vol. 123, no. 3, p. 365–370. Dostupné z: <https://doi.org/10.21273/JASHS.123.3.365>. [cit. 2024-09-23]
- HÖFER, M. Cryopreservation of winter-dormant apple buds: Establishment of a duplicate collection of *Malus* germplasm. Online. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, vol. 121, p. 647–656. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0735-1>. [cit. 2024-09-20]
- HÖFER, M. a FLACHOWSKY, H. Cryopreservation of *Malus* and *Pyrus* Wild Species in the 'Fruit Genebank' in Dresden-Pillnitz, Germany. Online. *Biology*. 2023, vol. 12, no. 2, p. 200. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biology12020200>. [cit. 2024-09-20]
- CHOUDHARY, R.; MALIK, S.K.; CHAUDHURY, R. a SHARMA, K. C. Long-term conservation of dormant buds of *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb. using three different new cryotechniques. *Romanian Biotechnological Letters*. 2014, vol. 19, p. 9583–9592.
- VOLK, G. M.; JENDEREK, M. a CHEN, K. Cryopreservation of Dormant Apple Buds. *Training in Plant Genetic Resources: Cryopreservation of Clonal Propagules*. Online. In: Colorado State University, 2020. Dostupné z: <https://colostate.pressbooks.pub/clonalcryopreservation/chapter/apple-dormant-bud-cryopreservation/>. [cit. 2024-09-23].