

MIKROPROPAGACE ODRŮD TŘEŠNĚ PTAČÍ PRO ÚČELY GENETICKÝCH MODIFIKACÍ

MICROPROPAGATION OF SWEET CHERRY CULTIVARS FOR GENETIC MODIFICATION PURPOSES

Michaela Burešová, Radek Čmejla

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

e-mail: michaela.buresova@vsuo.cz, ORCID: [0009-0009-2992-565X](https://orcid.org/0009-0009-2992-565X)

ABSTRAKT

Techniky mikropropagace rostlin v *in vitro* podmínkách se používají po desetiletí jak pro komerční množení rostlin, tak pro výzkumné účely. Pro některé rostlinné druhy však stále chybí efektivní mikropropagační protokoly, protože se v *in vitro* podmínkách obtížně množí. S rozvojem genetických modifikací, pro které jsou *in vitro* kultury klíčové, roste potřeba najít funkční mikropropagační protokoly pro rekalcitrantní, avšak hospodářsky významné druhy rostlin. Do této skupiny patří také třešeň ptačí (*Prunus avium* L.), která při mikropropagaci na kultivačních médiích vykazuje značnou genotypovou variabilitu. Příčiny této rekalcitrance mohou souviset s fyziologickým stavem rostliny, složením kultivačního média nebo obrannými reakcemi rostliny. Studie srovnává vliv dvou kultivačních médií (BAP 200 a QL-1) na přežití explantátů šesti šlechtitelsky významných odrůd třešně ptačí v *in vitro* podmínkách. Získané výsledky ukazují značnou odrůdovou specifičnost při mikropropagaci (např. u genotypu HL 10072) na kultivačních médiích a potvrzují přetrvávající rekalcitranci některých perspektivních odrůd (např. 'Kordia'), která je překážkou pro jejich využití pro genetické modifikace.

Klíčová slova: *in vitro* kultury, třešeň ptačí, rekalcitrance, genetické modifikace

ABSTRACT

Plant tissue techniques have been used for decades for commercial plant multiplication and research purposes. For some species not easily propagated under *in vitro* conditions, efficient micropropagation protocols are still missing. With the rapid development of genetic modification techniques, a need for functional micropropagation protocols for recalcitrant, but also agriculturally important plants are rising. Sweet cherry (*Prunus avium* L.) belongs to this group by exhibiting distinctive genotypic variability when micropropagated on culture media. The causes of this recalcitrance may be related to physiological state of the plant, the composition of the culture media or defensive reactions of the plant. The present study compares the influence of two culture media (BAP 200 and QL-1) on the survival rates of explants of six genetically valuable sweet cherry cultivars under *in vitro* culture conditions. Results show clear cultivar specificity for micropropagation on culture media (e.g. genotype HL 10072) and persistent recalcitrance of certain perspective varieties (e.g. 'Kordia'), which hinders their use for genetic modifications.

Keywords: *in vitro* cultures, sweet cherry, recalcitrance, genetic modifications

ÚVOD

Třešeň ptačí (*Prunus avium* L.) představuje hospodářsky významnou ovocnou plodinu ceněnou pro své nutričně bohaté a chuťově atraktivní plody. Existují stovky odrůd třešně a šlechtitelé neustále pracují na tvorbě nových kultivarů, které odpovídají aktuálním trendům v ovocnářství (Quero-García *et al.* 2017). Proces šlechtění je však časově i technicky náročný. Při křížení jsou pečlivě vybíráni rodiče s perspektivními vlastnostmi, přičemž se předpokládá, že tyto znaky budou přeneseny na potomstvo. Teprve po několika letech, kdy rostliny začnou plodit, lze selektovat perspektivní jedince (Dondini *et al.* 2018).

Cílená genetická modifikace genů odpovědných za důležité šlechtitelské vlastnosti může proces šlechtění třešně výrazně urychlit a zefektivnit. K tomuto účelu se využívají moderní genetické nástroje, jako je systém CRISPR/Cas nebo RNA interference, které obvykle vyžadují vektory pro přenos genetické informace do rostlinných buněk. Nejčastěji používaným systémem je transformace pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Smith a Townsend 1907). Transformace vyžadují kontrolované a sterilní prostředí, které poskytují *in vitro* podmínky. Třešeň se běžně množí vegetativně pomocí klonů, aby byly zachovány vlastnosti odrůdy. *In vitro* kultivace umožňuje nejen regeneraci rostlin po transformaci, ale i jejich klonální množení (Song *et al.* 2019). Mikropropagací explantátů pod vlivem různých fytohormonů lze dosáhnout organogeneze a vytvoření celé rostliny nebo buněčné kultury. Pro účely transformace se využívá totipotence rostlinných buněk, tedy schopnosti každé somatické buňky za vhodných podmínek regenerovat v celou rostlinu (Fehér 2019). Teoreticky by tak mohla mutace jedné somatické buňky, následně selektované na vhodném selekčním médiu, vést ke vzniku modifikovaného jedince.

Počátečním krokem mikropropagace je sterilizace a nasazení rostlinného materiálu na kultivační médium za sterilních podmínek. U třešně se pro založení *in vitro* kultury nejčastěji používají listové pupeny, které obsahují apikální meristém s vysokou regenerační schopností a zároveň umožňují zachování genotypu původní odrůdy (Bhagwat a Lane 2004, Matt a Jehle 2005, Druart 2012). U dřevin, zejména ovocných, se však často lze setkat s jevem zvaným rekalcitrance – vrozenou či podmíněnou neschopností rostliny množit se či regenerovat v *in vitro* podmínkách. Tento problém je u třešně poměrně častý, výrazně závisí na genotypu a může být způsoben celou řadou faktorů (Benson 2000). Rekalcitranci ovlivňuje fyziologický stav a vývojová fáze rostliny. Třešeň, dřevina mírného pásma, je fyziologicky přizpůsobena periodickému střídání růstu a dormance, které zásadně ovlivňuje její regenerační schopnost (Costa a Ramina 2014). Významným faktorem je rovněž stáří a zdravotní stav rostliny, z níž jsou explantáty odebírány – juvenilní jedinci v *in vitro* regenerují snáze než dospělé rostliny (Benson 2000).

Na rozdíl od fyziologického stavu rostliny je složení kultivačního média faktorem, který lze experimentálně ovlivnit a tím částečně překonat rekalcitranci. Základní složky média tvoří makroprvky, mikroprvky, vitamíny, aminokyseliny, růstové regulátory a zdroj uhlíku (obvykle sacharóza). Roztok těchto složek je zpevněn pomocí želírovací látky (např. agar), která fixuje explantát v kultivační nádobě (Benson 2000). Mezi nejčastěji používaná bazální média pro mikropropagaci třešně patří MS médium (Murashige a Skoog 1962), WPM médium (Lloyd a McCown 1981), QL médium (Quoirin a Lepoivre 1977) a DKW médium (Driver a Kuniyuki 1984) (Matt a Jehle 2005). Rozdílné jsou média především obsahem makroprvků (N, P, K, S, Mg a Ca). Klíčová pro indukci organogeneze je rovnováha růstových regulátorů, zejména cytokininů a auxinů. Nejčastěji se používá kombinace syntetických auxinů (např. kyselina indol-3-máselná – IBA nebo kyselina 1-naftyloctová – NAA) a cytokininů (např. 6-benzylaminopurin – BAP nebo thidiazuron – TDZ), které jsou stabilnější a účinnější

než přírodní fytohormony. Exogenní aplikace auxinů a cytokininů může také stimulovat produkci dalšího fytohormonu – etylénu (Benson 2000). Akumulace etylénu v uzavřených kultivačních nádobách omezuje výměnu plynů, je úzce spojena se vznikem hyperhydricity a zpomaleným růstem explantátů. Pravidelné pasážování (subkultivace) přispívá ke snížení výskytu hyperhydricity, mimo jiné i díky zlepšení plyné výměny v kultivačních nádobách (Polivanova a Bedarev 2022). Akumulaci etylénu lze předcházet např. používáním uzávěrů s mikroventilací nebo aplikací inhibitorů etylénu (např. dusičnan stříbrný) (Sgamma *et al.* 2014).

In vitro kultivace představuje pro rostliny výrazný stres, který se projevuje zmíněnou akumulací etylénu nebo oxidací fenolických látek. Tento problém je zejména markantní u dřevin, jež mají vysoký obsah fenolických sloučenin (např. ligninu) v buněčných stěnách, což zvyšuje jejich náchylnost k rekalcitranci (Benson 2000). Proces oxidace fenolických látek je spuštěn mechanickým poškozením pletiv rostliny, k němuž ve zvýšené míře dochází během přípravy a sterilizace explantátů. Sterilizační činidlo musí být dostatečně účinné vůči mikroorganismům, které kolonizují povrch rostlinného materiálu a zároveň nesmí způsobit nadměrnou oxidaci fenolických látek ani poškodit meristematická pletiva. Projevy oxidace, jako je hnědnutí nebo černání pletiv, mohou vést až k nekrotám a odumření explantátu. Přidání aktivního uhlí do média může tyto negativní efekty zmírnit, neboť adsorbuje oxidované fenolické látky (Liu *et al.* 2024). Také bakterie používané jako vektory při transformacích představují pro rostlinu stresor, jelikož aktivují jejich imunitní odpovědi. Rekalcitrantní rostlinné druhy mívají obecně robustnější imunitní systém, což dále komplikuje úspěšnost transformace (Luo *et al.* 2025). Z těchto důvodů je pro úspěšné genetické modifikace zásadní optimalizovat podmínky pro kultivaci explantátu, minimalizovat stresové faktory a zmírnit projevy rekalcitrance, aby byla zvýšena efektivita regenerace transformovaných jedinců.

Cílem této práce bylo porovnat vliv dvou vybraných kultivačních médií na přežití a vitalitu šlechtitelsky významných odrůd třešně ptačí v *in vitro* podmínkách, a tím přispět k optimalizaci mikropropagačního protokolu využitelného při genetických modifikacích.

MATERIÁL A METODY

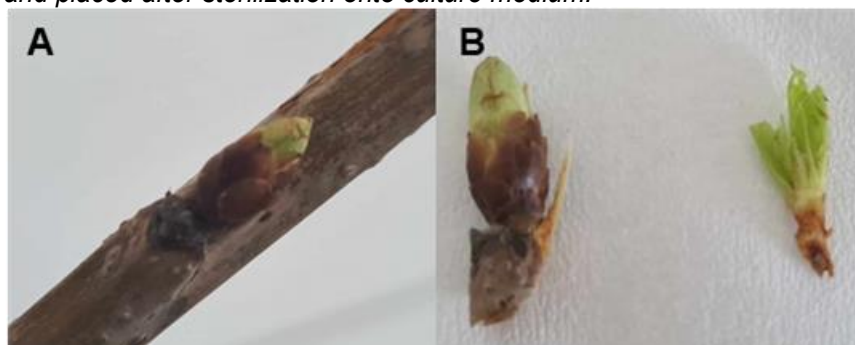
Zdrojovým rostlinným materiálem byly pupeny výhonů třešně ptačí (*Prunus avium* L.) perspektivních odrůd 'Emily', 'Kordia', 'Tamara', a genotypů HL 10072 a HL 16821. Jako kontrolní byla zařazena odrůda 'Bing', pro niž jsou k dispozici ověřené protokoly jak pro genetickou modifikaci (Vergara *et al.* 2021), tak pro efektivní mikropropagaci v *in vitro* podmínkách (Druart 2012). Výhony byly odebrány během ledna a února 2025 v období exogenní dormance z výsadeb VÝZKUMNÉHO A ŠLECHTITELSKÉHO ÚSTAVU OVOCNÁŘSKÉHO HOLOVOUSY s.r.o. (VŠÚO).

Sterilizace rostlinného materiálu

Listové pupeny třešně byly po narašení při 23 °C odebrány včetně části dřevního lůžka a zbaveny vnějších i vnitřních šupin (Obrázek 1). Následně byly omyty sterilní destilovanou vodou a sterilizovány v roztoku přípravku Medicarine (Ecolab s.r.o., Česká republika) obsahujícím 99 % dichloroisokyanurátu sodného (NaDCC) v koncentraci 9,07 g/L. Doba sterilizace byla 15 minut, dle zkušeností laboratoře pro dosažení sterilizačních účinků. Po sterilizaci byly pupeny opakovaně promyty ve sterilní destilované vodě a osušeny na sterilní buničité vatě. Listy pupenů byly zakráčeny a bazální konec pupenů seříznut pro odhalení čerstvého pletiva. Sterilizované pupeny byly poté jednotlivě umístěny na média BAP 200 a QL-1 a kultivovány v Erlenmeyerových baňkách.

Obrázek 1. Proces sterilizace rostlinného materiálu. Narašený listový pupen (A) byl očištěn (B) a po sterilizaci nasazen na kultivační médium.

Figure 1. Process of plant material sterilization. Sprouting leaf bud (A) was cleaned from scales (B) and placed after sterilization onto culture medium.



Kultivace rostlinného materiálu

Média BAP 200 a QL-1 obsahovala 8 g/L agaru, 30 g/L sacharózy, MS vitamíny (0,1 mg/L thiaminu, 0,5 mg/L niacinu, 0,5 mg/L pyridoxinu), 4 mg/L kyseliny askorbové, 100 mg/L myo-inositolu a 2 mg/L glycinu. Médium BAP 200 bylo připraveno podle Murashige a Skoog (1962), doplněno o 4 mg/L BAP, přičemž hodnota pH byla upravena na 5,7. Médium QL-1 obsahovalo QL makroprvky a MS mikroprvky, doplněno o 1 mg/L BAP, 0,1 mg/L IBA s hodnotou pH upravenou na 5,6. Koncentrace prvků kultivačních médií zobrazuje tabulka 1.

Tabulka 1. Prvkové složení testovaných kultivačních médií. V médiu BAP 200 pocházely vápenaté ionty (Ca^{2+}) z chloridu vápenatého (CaCl_2 , *), zatímco v médiu QL-1 z dusičnanu vápenatého ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, **). Hvězdičky označují jejich koncentraci.

Table 1. Elemental composition of the tested culture media. In BAP 200 medium, calcium ions (Ca^{2+}) originated from calcium chloride (CaCl_2 , *), whereas in QL-1 medium they were supplied as calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, **). The asterisks indicate their concentrations.

Složení ¹⁾	Koncentrace látek (mg/L) ²⁾	
	Médium BAP 200 ³⁾	Médium QL-1 ⁴⁾
$\text{CaCl}_2 / \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	332,02*	578,92**
KH_2PO_4	170,00	270,00
KNO_3	1900,00	1800,00
MgSO_4	180,54	175,79
NH_4NO_3	1650,00	400,00
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
FeNaEDTA	36,70	36,70
H_3BO_3	6,20	6,20
KI	0,83	0,83
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,90	16,90
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,60	8,60

1) Composition, 2) Concentration, 3) BAP 200 medium, 4) QL-1 medium

Hodnocení a zpracování výsledků

Počet nasazených pupenů je uveden v tabulce 2. Pozorování probíhalo po dobu tří měsíců od zavedení explantátů do *in vitro* podmínek. Během této doby byly zaznamenávány údaje o výskytu kontaminací, odumírání a vitality explantátů. Po třech měsících byly shromážděné údaje vyhodnoceny a vypočítána míra přežití nasazených explantátů, frekvence kontaminací kultivačních médií a podíl odumřelých explantátů. Popisné statistiky byly vypočítány v programu MS Excel, zatímco pro testování významnosti vlivu kultivačního média na přežití a odumírání explantátů byl v programu R proveden Fisherův exaktní test.

Tabulka 2. Nasazení pupenů odrůd třešně na kultivační média.

Table 2. Inoculation of sweet cherry buds onto culture media.

Testovaná odrůda ¹⁾	Počet nasazených pupenů ²⁾	
	Médium BAP 200 ³⁾	Médium QL-1 ⁴⁾
Bing	30	28
Emily	30	30
HL 10072	30	30
HL 16821	30	30
Kordia	21	30
Tamara	30	29

1) Tested variety, 2) Number of cultivated buds, 3) BAP 200 medium, 4) QL-1 medium

VÝSLEDKY A DISKUZE

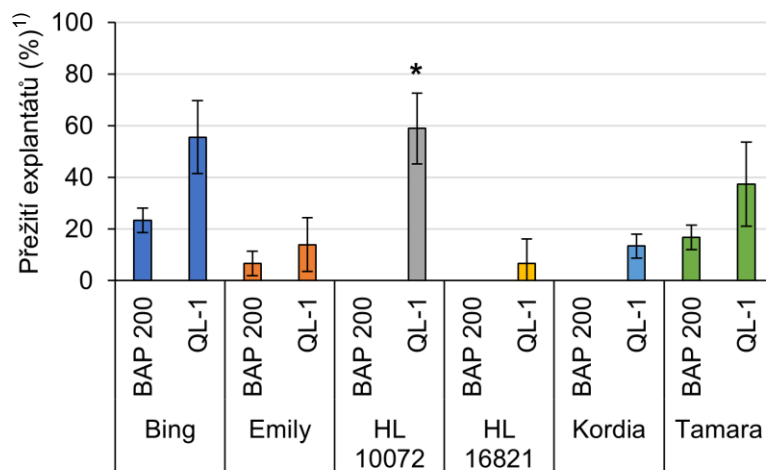
Přežití nasazených explantátů

Pojem přežití označuje stav, kdy primární explantát po zavedení do *in vitro* podmínek po třech měsících kultivace nevykázal známky odumírání, jako je černání, hnědnutí či hyperhydricita. Míra přežití udává procentuální zastoupení takto životaschopných explantátů. U všech sledovaných genotypů byla zaznamenána vyšší míra přežití při kultivaci na médiu QL-1 než na médiu BAP 200 (Graf 1). Nejvyšší vitalitu prokázaly explantáty genotypu HL 10072, u nichž bylo dosaženo signifikantně vyšší míry přežití (58,9 %) na médiu QL-1, zatímco na médiu BAP 200 přežití nebylo pozorováno (0 %). Tento genotyp tak vykázal celkově nejlepší výsledky ze všech testovaných genotypů. Vyšší míra přežití byla pozorována u odrůd 'Bing' (55,6 %) a 'Tamara' (37,4 %) kultivovaných na médiu QL-1 ve srovnání s výsledky dosaženými na médiu BAP 200 (23,3 % a 16,7 %). Naopak explantáty 'Emily', HL 16821 a 'Kordia' vykazovaly pouze nízkou míru přežití na obou testovaných médiích – BAP 200 (6,7 %, 0 % a 0 %) i QL-1 (13,9 %, 6,7 % a 13,3 %).

Matt a Jehle (2005) testovali schopnost různých kultivačních médií indukovat organogenezi explantátů odrůdy 'Kordia'. Nejvyšší regenerační účinnost (25,0 %) zaznamenali u internodiálních segmentů kultivovaných na $\frac{1}{2}$ DKW + $\frac{1}{2}$ WPM médiu s 2 mg/L TDZ a 0,5 mg/L IBA. Srovnatelných výsledků (22,2 %) dosáhli na QL médium s obdobnou kombinací růstových regulátorů. Tyto hodnoty sice převyšují míru přežití explantátů 'Kordia' v tomto experimentu na médiu QL-1, avšak stále poukazují na nízký regenerační potenciál tohoto genotypu v *in vitro* podmínkách.

Graf 1. Míra přežití explantátů třešně ptačí (*Prunus avium* L.) na médiu BAP 200 a QL-1 po třech měsících kultivace. Hvězdička (*) označuje statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi dvěma typy médií u konkrétní odrůdy.

Graph 1. Survival rate of sweet cherry explants (*Prunus avium* L.) after three months of cultivation on BAP 200 and QL-1 medium. Asterisk (*) marks statistically significant differences ($p < 0.05$) between two types of media for specific cultivar.



1) Survival of explants (%)

Druart (2012) detailně popsal mikropropagace explantátů odrůdy 'Bing', přičemž pro množení apikálních meristémů použil modifikované $\frac{1}{2}$ MS médium s komplexní směsí vitamínů, 1 mg/L BAP, 0,1 mg/L kyseliny giberelové (GA_3) a 0,001 mg/L kyseliny 2,4-dichlorofenoxyoctové. Pro prýtové vrcholky a segmenty s úžlabními pupeny aplikoval modifikované QL médium doplněné o thiamin, myo-inositol, aminokyseliny methionin a tyrosin, regulátory 1 mg/L BAP a 0,1 mg/L IBA, a aktivní uhlí. Ačkoliv autor neuvádí přesnou regenerační účinnost, protokoly vychází z dlouhodobě ověřených postupů využívaných pro velkokapacitní rostlinnou produkci. Zmíněné médium lze proto považovat za účinné pro mikropropagaci třešně, což dokládá úspěšnost zakořenění explantátů 'Bing' (43,0 %) na kořenícím médiu s QL prvky.

V publikaci Paprstein a Sedlak (2017) byly pupeny odrůdy 'Tamara' kultivovány na MS médiu s 1,5 mg/L BAP, přičemž autoři zaznamenali 21,2 % přeživších explantátů. Tato hodnota je výrazně nižší ve srovnání s výsledky dosaženými na médiu QL-1 (37,4 %), které tak prokazuje vyšší vhodnost pro kultivaci této odrůdy.

U genotypů 'Emily', HL 16821 a HL 10072 jsou získané výsledky pravděpodobně prvními publikovanými daty o jejich mikropropagaci, jelikož se jedná o nově vyšlechtěné genotypy.

Výsledky této studie potvrzují výraznou genotypovou variabilitu v reakci jednotlivých odrůd třešně na složení kultivačního média, stejně jako rekalitranci některých genotypů, která omezuje jejich využití při potencionálních genetických transformacích. Na základě literárních údajů i získaných výsledků lze konstatovat, že média QL, WPM a DKW jsou pro mikropropagaci třešně obecně vhodnější než univerzálně používané MS médium. Perspektivní genotyp HL 10072 spolu s odrůdami 'Bing' a 'Tamara' vykazovaly při kultivaci na médiu QL-1 vysokou míru přežití, což naznačuje jejich potenciál pro využití v genetických modifikacích. U odrůd 'Emily', HL 16821 a 'Kordia' sice bylo přežití na médiu QL-1 vyšší než na médiu BAP 200, avšak celková míra přežití zůstává nízká, což představuje zásadní limitující faktor pro jejich využití v transformačních protokolech, kde jsou rostliny vystaveny dalším stresům.

Pro tyto genotypy bude nezbytné optimalizovat kultivační podmínky či nalézt vhodnější médium pro úspěšné zavedení do *in vitro* podmínek.

Výskyt kontaminací u nasazených explantátů

Celková úmrtnost explantátů (80,6 %) byla způsobena výskytem kontaminací, případně k odumření došlo pravděpodobně vlivem rekalcitrace explantátu nebo citlivosti ke sterilizaci. Kultivační média byla nejčastěji kontaminována kvasinkami a houbami. Nejnižší frekvence kontaminací (6,7 %) byla zaznamenána u explantátů odrůdy 'Kordia' kultivovaných na médiu BAP 200. Naopak nejvyšší frekvence kontaminací (32,2 %) byla pozorována u explantátů genotypu HL 16821 kultivovaných na stejném médiu (Tabulka 3). Kontaminace média se obvykle začaly projevovat 2. až 3. týden po nasazení explantátu do *in vitro* podmínek. Podle dosažených výsledků se frekvence kontaminací mezi médii u jednotlivých odrůd statisticky významně nelišila. U testovaných odrůd se frekvence kontaminací lišila, avšak zjištěné rozdíly mohou být spíše důsledkem různých fyto-sanitárních podmínek matečních rostlin. Výhony 'Bing', 'Kordia' a 'Tamara' pochází z kontrolovaných výsadeb, zatímco výhony 'Emily', HL 10072 a HL16821 byly vzaty z výsadeb bez speciálních ochranných opatření.

Tabulka 3. Vyhodnocení výskytu kontaminace explantátů třešně ptačí po třech měsících kultivace.

Table 3. Evaluation of contamination incidence in sweet cherry explants after three months of cultivation.

Testovaná odrůda ¹⁾	Podíl kontaminovaných explantátů ²⁾	
	Médium BAP 200 ³⁾	Médium QL-1 ⁴⁾
Bing	6,7 ± 4,7	8,3 ± 6,8
Emily	30,0 ± 8,2	22,2 ± 15,7
HL 10072	13,3 ± 4,7	13,1 ± 2,7
HL 16821	32,2 ± 13,7	20,0 ± 21,6
Kordia	5,6 ± 7,9	13,3 ± 12,5
Tamara	20,0 ± 8,2	21,1 ± 9,6

1) Tested variety, 2) Proportion of contaminated explants, 3) BAP 200 medium, 4) QL-1 medium

Volba vhodného sterilizačního činidla představuje klíčový krok při zakládání *in vitro* kultur, neboť zásadně ovlivňuje vitalitu explantátů. Mezi nejčastěji používaná činidla patří 70% etanol, chlornan sodný, chlornan vápenatý a chlorid rtuťnatý, přičemž řada protokolů tyto látky navzájem kombinuje. Pro zvýšení účinnosti sterilizace se často používají také fungicidy a smáčedla (Babu *et al.* 2022).

Matt a Jehle (2005) i Druart (2012) aplikovali pro sterilizaci explantátů třešně odrůd 'Kordia' a 'Bing' roztok chlornanu vápenatého v kombinaci s fungicidem. Paprstein a Sedlak (2017) dosáhli při sterilizaci pupenů odrůdy 'Tamara' pomocí chloridu rtuťnatého velmi nízkého výskytu kontaminací (3,0 %), což je výrazně méně než 20,0 % kontaminovaných explantátů pozorovaných v této studii při použití média BAP 200. Avšak vzhledem k vysoké toxicitě chloridu rtuťnatého a v minulosti pozorovaným negativní účinkům na přežití pupenů třešně (Sedlak a Paprstein 2017), bylo v této práci zvoleno alternativní činidlo – dichloroisokyanurát sodný (NaDCC).

Sterilizační účinek NaDCC obdobně jako u chlornanu sodného spočívá v působení aktivního chlóru (ve formě kyseliny chlorné) proti mikroorganismům. Avšak NaDCC je považován za účinnější díky stabilnějším formám chlóru (Clasen a Edmondson 2006). Mihaljević *et al.* (2013) testovali účinnost různých sterilizačních činidel na pupenech višňi

a zjistili nízkou účinnost sterilizace při použití roztoku 10 g/L NaDCC po dobu 10 minut (83,3 % kontaminací). Oproti tomu činidla jako dusičnan stříbrný nebo chlorid rtuťnatý vykazovaly vyšší sterilizační efekt (10,0 % a 16,7 % kontaminací), srovnatelný s výsledky dosaženými v této práci (viz Tabulka 3). Naopak ve studii Niedz a Bausher (2002), použití NaDCC zvýšilo účinnost sterilizace explantátů citrusů, přičemž nebyly pozorovány žádné projevy fytoxicity. Výhodami NaDCC je v případě přípravku Medicarine nízká cena a jednoduché použití bez toxických účinků. NaDCC v této práci prokázal uspokojivou sterilizační účinnost pupenů třešně, což potvrzuje jeho potenciál jako méně toxické alternativy k běžně používaným činidlům. K ověření těchto výsledků a potvrzení jeho spolehlivosti je však zapotřebí provést další experimentální testy na širším spektru genotypů a za různých podmínek.

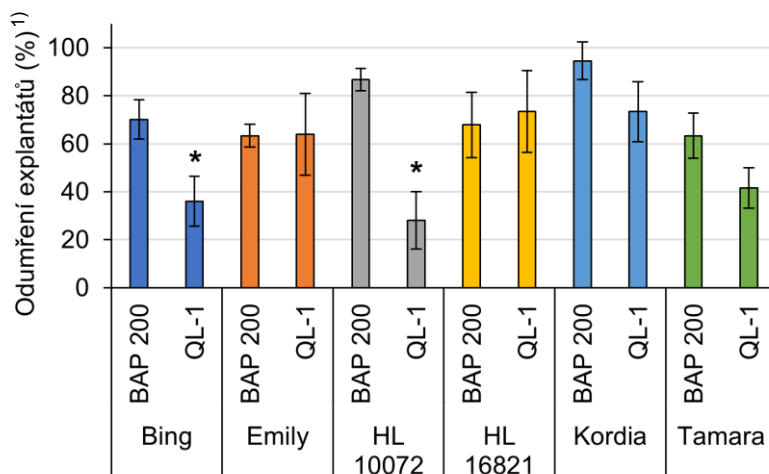
Odumření nasazených explantátů

Za odumření je považován stav, kdy primární explantát na kultivačním médiu nekontaminuje, avšak neprojevuje růst, případně dochází k jeho hnědnutí, černání nebo k rozvoji hyperhydricity. Odumírání primárních explantátů, způsobené rekalitrancí, případně sterilizací, významně přispělo k celkové mortalitě testovaných odrůd třešně kultivovaných v *in vitro* podmínkách. Nejvyšší podíl odumřelých explantátů (94,4 %) byl zaznamenán u odrůdy 'Kordia' kultivované na médiu BAP 200, přičemž o něco nižší míra odumření (73,3 %) byla pozorována při kultivaci na médiu QL-1 (Graf 2). Na rozdíl od ostatních testovaných odrůd vykazovaly genotyp HL 10072 (28,1 %) a odrůda 'Bing' (36,1 %) při kultivaci na médiu QL-1 signifikantně nižší podíl odumřelých explantátů oproti kultivaci na médiu BAP 200 (86,7 % a 70,0 %). Výrazně nižší odumírání explantátů bylo rovněž pozorováno při kultivaci odrůdy 'Tamara' na médiu QL-1 (41,5 %) ve srovnání s kultivací na médiu BAP 200 (63,3 %). Vysoký podíl odumřelých explantátů odrůd 'Emily' a HL 16821 byl zaznamenán na obou testovaných médiích – BAP 200 (63,3 %, 67,8 %) i QL-1 (63,89 % a 73,3 %).

Matt a Jehle (2005) ve své studii rovněž zaznamenali nízký množitelý potenciál explantátů 'Kordia', přičemž indukce prýtu byla pozorována pouze na jednom z 27 testovaných kultivačních médií. Paprstein a Sedlak (2017) zaznamenali vysoký podíl explantátů odrůdy 'Tamara' (75,8 %), u nichž nedošlo k indukci prýtu při kultivaci na MS médiu s různými koncentracemi cytokininů. V této práci kultivace na médiu QL-1 vedla ke snížení podílu odumřelých explantátů u čtyř z šesti testovaných odrůd ve srovnání s médiem BAP 200. Médium QL, vyvinuté speciálně pro zástupce rodu *Prunus*, se od často používaného MS média odlišuje nízkou koncentrací amonných iontů (NH_4^+), které mohou působit toxicky na rostlinné explantáty. Současně obsahuje vyšší koncentraci vápenatých iontů (Ca^{2+}), nezbytných pro správnou tvorbu rostlinných buněčných stěn (Matt a Jehle 2005). Úhyn explantátů mohl souviset jak s jejich rekalitrantní povahou, tak s jejich citlivostí na použité sterilizační postupy. Odlíšení vlivu sterilizačního činidla od účinku kultivačního média na vitalitu explantátů představuje metodickou výzvu, neboť bez provedení sterilizace by většina explantátů byla znehodnocena kontaminací. Tento problém lze částečně řešit optimalizací sterilizačního protokolu, například testováním různých koncentrací a expozičních časů na menším počtu explantátů. Doplnkové informace lze získat i z hodnocení vzhledu explantátů bezprostředně po sterilizaci, který může indikovat poškození pletiv způsobené činidlem.

Graf 2. Podíl odumřelých explantátů testovaných odrůd třešně ptačí kultivovaných tři měsíce na BAP 200 a QL-1 médiu. Hvězdička (*) označuje statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi oběma typy médií v rámci jednotlivých odrůd.

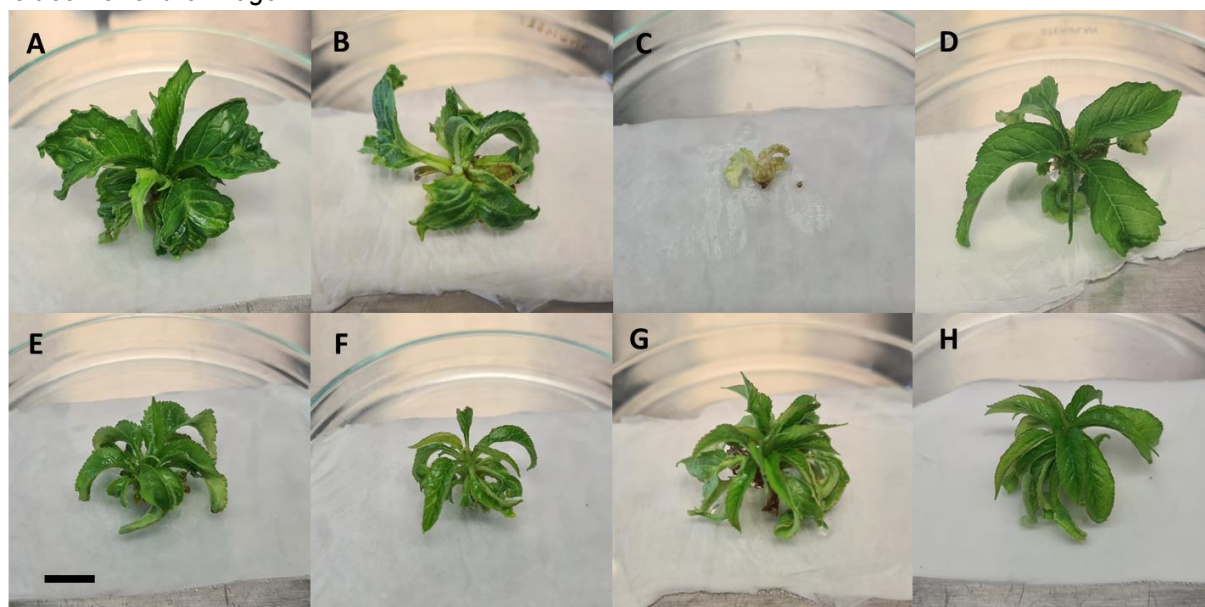
Graph 2. Proportion of dead explants of the tested sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars after three months of cultivation on BAP 200 and QL-1 media. The asterisk (*) indicates statistically significant differences ($p < 0.05$) between the two media types within a given cultivar.



1) Death of explants (%)

Obrázek 2. Vitalita explantátů 'Bing' (A, E), 'Emily' (B, F), HL 10072 (C, G) a 'Tamara' (D, H) kultivovaných tři měsíce na médiu BAP 200 (A-D) a QL-1 (E-H). Měřítka (1 cm) je umístěno v levém dolním rohu snímku.

Figure 2. 'Bing' (A, E), 'Emily' (B, F), HL 10072 (C, G) and 'Tamara' (D, H) explant vitality after three months of cultivation on BAP 200 (A-D) and QL-1 medium (E-H). The scale (1 cm) is shown in the lower left corner of the image.



Vitalita nasazených explantátů

Explantáty odrůd 'Bing', 'Emily', HL10072 a 'Tamara' kultivované na médiu QL-1 vykazovaly celkově lepší vitalitu než explantáty pěstované na médiu BAP 200 (Obrázek 2). Ačkoliv explantáty kultivované na médiu BAP 200 často vytvářely větší listovou plochu, jedinci pěstovaní na médiu QL-1 se vyznačovali vyšším počtem listů a lépe vyvinutým prýtem. Naproti tomu explantáty 'Kordia' a genotyp HL 16821 prospívaly hůře na obou médiích, kdy většina explantátů odumřela (obrázky nejsou uvedeny). Odumírání se projevovalo hnědnutím, zčernáním nebo hyperhydricitou pletiv. Časté byly také chlorózy (Obrázek 4C). U některých explantátů byl patrný počáteční růst v *in vitro* podmínkách, nicméně po prvním přenesení na čerstvé kultivační médium došlo k opadu listů a zůstaly pouze středové části, které dále neregenerovaly (Obrázek 4B).

Hnědnutí a černání pletiv třešně v *in vitro* podmínkách je důsledkem oxidace fenolických látek, jichž třešeň obsahuje značné množství. Vysoký obsah polyfenolů sice přispívá k nutriční hodnotě plodů, avšak současně představuje významnou překážku při mikropropagaci. Ve vegetativních částech rostliny je navíc koncentrace polyfenolů obvykle několikanásobně vyšší než v plodech (Dziadek *et al.* 2018). Hyperhydricita, charakterizovaná průhledností, atrofií a morfologickými deformacemi explantátů, bývá často důsledkem nadměrných koncentrací syntetických cytokininů, jako jsou BAP nebo TDZ. Tyto regulátory růstu mohou indukovat zvýšenou syntézu etylénu, který ovlivňuje signalizační dráhy spojené s funkcí akvaporinů a regulací průduchů. Na vzniku hyperhydricity se mohou podílet i vyšší koncentrace amonných iontů (NH_4^+) (Polivanova a Bedarev 2022). Tyto skutečnosti mohou objasňovat vyšší vitalitu explantátů kultivovaných na médiu QL-1, které obsahuje nižší koncentrace jak BAP, tak i amonných iontů.

ZÁVĚR

Tato studie se zaměřila na problematiku mikropropagace třešně ptačí v *in vitro* podmínkách s cílem optimalizovat kultivační protokol pro šlechtitelsky perspektivní odrůdy a genotypy určené pro potencionální genetické modifikace. Pět perspektivních genotypů třešně ('Emily', 'Kordia', 'Tamara', HL 10072 a HL 16821) spolu s kontrolní odrůdou 'Bing' bylo testováno na dvou kultivačních médiích (BAP 200 a QL-1). Vyšší míra přežití po zavedení do *in vitro* byla u všech genotypů zaznamenána při kultivaci na médiu QL-1. Nejvyšší míru přežití (58,9 %) vykázal genotyp HL 10072 na médiu QL-1, zatímco při kultivaci na médiu BAP 200 přežití nebylo zaznamenáno. Vyšší přežívání explantátů na médiu QL-1 bylo rovněž pozorováno u odrůd 'Bing' a 'Tamara'. Naopak nízká míra přežití explantátů 'Emily', HL 16821 a 'Kordia' na obou testovaných médiích naznačuje, že složení použitých médií není pro mikropropagaci těchto genotypů optimální a bude nutné případně využít alternativních médií, například WPM nebo DKW. Ve srovnání s výskytem kontaminací se na celkové úmrtnosti explantátů ve větší míře podílelo jejich odumírání způsobené rekalcitrancí nebo citlivostí k sterilizačnímu činidlu. Nejvyšší podíl odumřelých explantátů (94,4 %) byl zaznamenán u odrůdy 'Kordia' kultivované na médiu BAP 200, což podtrhuje významný vliv rekalcitrance na úspěšnost zavedení odrůdy do *in vitro* podmínek. Naopak genotyp HL 10072 (28,1 %) a 'Bing' (36,1 %) vykazovaly signifikantně nižší míru odumírání při kultivaci na médiu QL-1, což potvrzuje jeho příznivější účinek na regeneraci explantátů. Explantáty 'Bing', 'Emily', HL 10072 a 'Tamara' kultivované na médiu QL-1 vykazovaly vyšší vitalitu ve srovnání s kultivací na médiu BAP 200, zatímco explantáty 'Kordia' a genotypu HL 16821 prospívaly hůře na obou médiích.

Získané poznatky mají přímý praktický význam pro výběr odrůd a optimalizaci kultivačních podmínek pro potencionální genetické modifikace třešně. Správnou volbou kultivačního média

Ize korigovat genotypovou variabilitu a zvýšit regenerační potenciál explantátů. Výsledky této studie naznačují, že odrůdy 'Bing', 'Tamara' a genotyp HL 10072 představují vhodné kandidáty pro genetické modifikace, zatímco 'Emily' a HL 16821 vykazují nižší regenerační potenciál. Naopak odrůda 'Kordia', ačkoliv má vysoký šlechtitelský i komerční význam, se vyznačuje výraznou recalcitrancí napříč různými médii a její využití v transformačních experimentech je zatím velmi omezené, dokud nebude vyvinut optimalizovaný protokol pro její *in vitro* regeneraci.

PODĚKOVÁNÍ

Při zpracování tohoto článku bylo využito institucionální podpory DKRVO Ministerstva zemědělství České republiky č. RO1525. Autoři rovněž děkují Ing. Alexandře Slámové, DiS. za přípravu kultivačních médií.

LITERATURA

- BABU, G. A.; MOSA CHRISTAS, K.; KOWSALYA, E.; RAMESH, M.; SOHN, S. I. a PANDIAN, S. *Commercial scale tissue culture for horticulture and plantation crops*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 1–21. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-19-0055-6_1 [cit. 14. 9. 2025].
- BENSON, E. E. Sepcial symposium: *In vitro* plant recalcitrance in vitro plant recalcitrance: An introduction. Online. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2000, vol.36, no. 3, p. 141–148. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0029-z> [cit. 14. 9. 2025].
- BHAGWAT, B. a LANE, D. W. *In vitro* shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) 'Lapins' and 'Sweetheart'. Online. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2004, vol. 78, no. 2, p. 173–181. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000022552.12449.71> [cit. 14. 9. 2025].
- CLASEN, T. a EDMONDSON, P. Sodium dichloroisocyanurate (NaDCC) tablets as an alternative to sodium hypochlorite for the routine treatment of drinking water at the household level. Online. *International journal of hygiene and environmental health*. 2006, vol. 209, no. 2, p. 173–181. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2005.11.004> [cit. 14. 9. 2025].
- COSTA, G. a RAMINA, A. Temperate fruit species. In: *Horticulture: Plants for People and Places, Volume 1: Production Horticulture*. Online. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 97–121. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8578-5_4 [cit. 14. 9. 2025].
- DONDINI, L.; LUGLI, S. a SANSAVINI, S. Cherry breeding: sweet cherry (*Prunus avium* L.) and sour cherry (*Prunus cerasus* L.). Online. In: *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits: Volume 3*. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 31–88. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7_2 [cit. 14. 9. 2025].
- DRIVER, J. A. a KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. Online. *HortScience*. 1984, vol. 19, no. 4, p. 507–509. Dostupné z: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.4.507> [cit. 14. 9. 2025].
- DRUART, P. Micropropagation of *Prunus* species relevant to cherry fruit production. Online. *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants*. Totowa, NJ: Humana Press. 2012. p. 119–136. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_9 [cit. 14. 9. 2025].
- DZIADEK, K.; KOPEĆ, A. a CZAPLICKI, S. The petioles and leaves of sweet cherry (*Prunus avium* L.) as a potential source of natural bioactive compounds. Online. *European Food Research and Technology*. 2018, vol. 244, no. 8, p. 1415–1426. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3055-y> [cit. 11. 9. 2025].
- FEHÉR, A. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology? Online. *Frontiers in plant science*. 2019, vol. 10, no. 536. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00536> [cit. 14. 9. 2025].

- LIU, C.; FAN, H.; ZHANG, J.; WU, J.; ZHOU, M.; CAO, F.; TAO, G a ZHOU, X. Combating browning: mechanisms and management strategies in *in vitro* culture of economic woody plants. Online. *Forestry Research*. 2024, vol. 4, p. e032. Dostupné z: <https://doi.org/10.48130/forres-0024-0026> [cit. 14. 9. 2025].
- LLOYD, G. a MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Online. Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society. 1981, vol. 30, p. 421–427. Dostupné z: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19830315515>. [cit. 14. 9. 2025].
- LUO, G.; TRINH, M. D. L.; FALKENBERG, M. K. D.; CHIURAZZI, M. J.; NAJAFI, J.; NØRREVANG, A. F.; CORREIA, P. M. P. a PALMGREN, M. Unlocking *in vitro* transformation of recalcitrant plants. Online. *Trends in Plant Science*. 2025. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2025.07.001>. [cit. 14. 9. 2025].
- MATT, A. a JEHL, J. A. *In vitro* plant regeneration from leaves and internode sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.). Online. *Plant Cell Reports*. 2005, vol. 24, no. 8, p. 468–476. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0964-6> [cit. 14. 9. 2025].
- MIHALJEVIĆ, I.; DUGALIĆ, K.; TOMAŠ, V.; VILJEVAC, M.; PRANJIĆ, A.; ČMELIK, Z.; PUŠKAR, B. a JURKOVIĆ, Z. *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of 'Oblačinska'sour cherry. Online. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*. 2013, vol. 58, no. 2, p. 117-126. Dostupné z: <https://doiserbia.nb.rs/Article.aspx?id=1450-81091302117M> [cit. 11. 9. 2025].
- MURASHIGE, T. a SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Online. *Physiologia plantarum*. 1962, vol. 15, no. 3. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x> [cit. 14. 9. 2025].
- NIEDZ, R. P. a BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. Online. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2002, vol. 38, no. 5, p. 468–471. Dostupné z: <https://doi.org/10.1079/IVP2002316>. [cit. 14. 9. 2025].
- PAPRSTEIN, F. a SEDLAK, J. Identification of a cytokinin treatment for *in vitro* propagation of two sweet cherry cultivars in preparation of a sanitation protocol. Online. *Acta Horticulturae*. 2015, vol. 1155, p. 161–164. Dostupné z: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1155.22> [cit. 14. 9. 2025].
- POLIVANOVA, O. B. a BEDAREV, V. A. Hyperhydricity in plant tissue culture. Online. *Plants*. 2022, vol. 11, no. 23, p. 3313. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants11233313>. [cit. 14. 9. 2025].
- QUERO-GARCÍA, J.; SCHUSTER, M.; LÓPEZ-ORTEGA, G. a CHARLOT, G. Sweet cherry varieties and improvement. Online. In: *Cherries: botany, production and uses*. Wallingford UK: CABI, 2017. p. 60–94. Dostupné z: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/abs/10.1079/9781780648378.0060> [cit. 14. 9. 2025].
- QUOIRIN, M. a LEPOIVRE, P. H. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Online. *Acta Horticulturae*. 1977, vol. 78, p. 437–442. Dostupné z: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1977.78.54> [cit. 2025-9-14].
- SEDLAK, J. a PAPRSTEIN, F. *In vitro* multiplication and rooting of two Czech sweet cherry cultivars. Online. *Acta Horticulturae*, 2017, vol. 1161. p. 303–308. Dostupné z: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20173296197> [cit. 3. 11. 2025].
- SGAMMA, T.; THOMAS, B. a MULEO, R. Ethylene inhibitor silver nitrate enhances regeneration and genetic transformation of *Prunus avium* (L.) cv. Stella. Online. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2014, vol. 120, no. 1, p. 79–88. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-014-0581-6> [cit. 3. 11. 2025].
- SONG, G. Q.; PRIETO, H. a ORBOVIC, V. *Agrobacterium*-mediated transformation of tree fruit crops: methods, progress, and challenges. Online. *Frontiers in plant science*. 2019, vol. 10, p. 226. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00226> [cit. 14. 9. 2025].
- VERGARA, R.; OLIVARES, F.; OLMEDO, B.; TORO, C.; MUÑOZ, M.; ZÚÑIGA, C.; MORA R.; PLANTAT P.; MICCONO M.; LOYOLA R.; AGUIRRE C. a PRIETO, H. Gene editing in *Prunus* Spp.: The challenge of adapting regular gene transfer procedures for precision breeding. Online. In: *Prunus-Recent Advances*. IntechOpen, 2021. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/77518> [cit. 11. 10. 2025].