



Alois Bilavčík, Olena Bobrova, Miloš Faltus, Jana Fránová,
Stacy Hammond, Igor Koloniuk, Jiří Zámečník

Metodika terapie virových patogenů pomocí kryoprezervace

METODIKA



 BIOLOGICKÉ
CENTRUM
AV ČR, v. v. i.

Metodika je výstupem řešení projektu „Zdravé ovoce v měnících se klimatických podmínkách: vývoj nových biotechnologických postupů diagnostiky virů, studium vektorů, ozdravování a bezpečného uchovávání jahodníku a maliníku“ (TO01000295) financovaného částkou 1 477 000 Euro z fondů EHP a Technologické Agentury České republiky v rámci programu KAPPA a Institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. RO0423. Metodika proběhla oponentním řízením. O uplatnění metodiky byla dne 19. 12. 2023 uzavřena smlouva č. 14/2023 podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku. MZe, jako certifikační orgán, vydal Osvědčení č. j. MZE-73885/2023-13113 o uznání metodiky dne 22. 12. 2023.

Autoři:

RNDr. Alois Bilavčík Ph.D., VÚRV, v.v.i., Praha
Dr. Olena Bobrova, Ph.D., VÚRV, v.v.i., Praha
Ing. Miloš Faltus, Ph.D., VÚRV, v.v.i., Praha
Ing. Jana Fránová, Ph.D., BC AV ČR, v.v.i., České Budějovice
Ing. Stacy Denise Hammond Hammond, Ph.D., VÚRV, v.v.i., Praha
Mgr. Igor Koloniuk, Ph.D., BC AV ČR, v.v.i., České Budějovice
Ing. Jiří Zámečník, CSc., VÚRV, v.v.i., Praha

Oponenti:

Mgr. Petr Maršík, Ph.D., Ústav experimentální botaniky AV ČR, Praha
Ing. Adéla Kubásková, Odd. OZE a environmentálních strategií, Ministerstvo zemědělství ČR

Metodika terapie virových patogenů pomocí kryoprezervace

METODIKA

Metodika terapie virových patogenů pomocí kryoprezervace

V současné době je ve školkařské produkci rostlinného materiálu kladen důraz na množení zdravého materiálu. Z tohoto důvodu je nutné věnovat tématu zdravé bezvirózní sadby pozornost při uchování kolekcí genových zdrojů vegetativně množených rostlin. Některé viry maliníku je obtížné stávajícími metodami termoterapie či chemoterapie odstranit z rostlinného hostitele. Proto byla, na příkladu viru černé nekrózy maliníku (black raspberry necrosis virus, BRNV), vyvinuta komplexní metodika testování zdravotního stavu a kryoterapie u maliníku. Výsledný metodický postup umožňuje ozdravit maliník od BRNV pomocí kryoterapie *in vitro* kultur. Uživatelem metodiky je MZe, které ji uplatní v rámci „Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství“.

Klíčová slova: maliník; BRNV; kryoterapie; *in vitro*.

Virus eradication method by cryopreservation tool - a cryoknife

Currently, in the nursery production of plant material, emphasis is placed on the propagation of healthy material. For this reason, it is necessary to pay attention to the topic of healthy virus-free nuclear stock when preserving collections of genetic resources of vegetatively propagated plants. Some raspberry viruses are difficult to remove from the plant host by existing methods of thermotherapy or chemotherapy. That is why, using the example of black raspberry necrosis virus (BRNV), a comprehensive methodology for testing health status and cryotherapy in raspberry was developed. The resulting methodical procedure makes it possible to eradicate BRNV from raspberry using cryotherapy of *in vitro* cultures. The user of the methodology is the Ministry of Agriculture, which applies it as part of the "National Program for the Conservation and Use of Genetic Resources of Plants, Animals and Microorganisms Important for Nutrition and Agriculture".

Key words: raspberry; BRNV; cryotherapy; *in vitro*.

Vydal Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
2023

Obsah:

I.	Cíl metodiky.....	7
II.	Úvod	7
III.	Vlastní popis metodiky.....	9
a)	Materiál	9
b)	Kryoprezervace	12
c)	Analýza virového patogenu	15
d)	Shrnutí kryoterapie.....	17
IV.	Srovnání novosti postupů	18
V.	Popis uplatnění metodiky	18
VI.	Ekonomické aspekty.....	18
VII.	Seznam použité související literatury.....	20
VIII.	Seznam publikací, které předcházely metodice.....	22
IX.	Dedikace	22
X.	Jména oponentů	22

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je vyvinout a otestovat postup ozdravení maliníku (*Rubus idaeus* L.) od vybraného virového patogenu pomocí kryoterapie *in vitro* kultur umožňující získání a uchování zdravého genofondu maliníku.

II. Úvod

Maliník (*Rubus idaeus* L.) je pěstován pro vynikající plody jak v České republice, tak v jiných zemích mírného pásma. Vzhledem k tomu, že maliník je víceletá plodina, kultivary a elitní šlechtitelské linie musí být udržovány jako kolekce rostlin na poli nebo jako kultury *in vitro*. Oba způsoby údržby kolekce nejsou optimální hlavně kvůli mnoha virovým a jiným chorobám přenášným do kolekcí rostlin z planých malin na poli (Tapio a kol., 1997) a pracnosti, dalším nákladům nebo možným somaklonálním variacím spojeným s kultivací *in vitro*. Z tohoto důvodu je v současnosti kryoprezervace považována za perspektivní metodu dlouhodobého uchování genotypu beze změn u skladovaného materiálu. Sakai a Nishiyama (1978) jako první úspěšně kryoprezervovali dormantní pupeny maliníku metodou pomalého mrznutí z -5 °C do -45 °C před samotným ponořením do kapalného dusíku. Reed a Lagerstedt (1987) použili pro kryoprezervaci vzrostných vrcholů *in vitro* kultury maliníku kryoprotektivní roztok složený z polyetylglykolu, močoviny a dimethylsulfoxidu (DMSO). Po pomalém přemražení do -40 °C a následném ponoření do kapalného dusíku dosáhly regenerace pod 10 %. Reed (1988) zjistila, že chladové otužování *in vitro* kultur maliníku zvýšilo jejich přežití na 67 %. V současné době se vzhledem k usnadnění a urychlení postupů kryoprezervace začíná využívat vitrifikačních metod, kdy se za pomoci sklotvorných látek dosáhne v kryoprezervovaných pletivech vitrifikace neboli skla (Volk a Walters 2006; Zamecnik a kol., 2021). U mnoha rostlin se k uchování jejich genetických zdrojů používá především vitrifikační postup založený na roztoku PVS2 (Sakai a kol., 1990). Ačkoliv jsou u tohoto postupu u maliníku dosahovány vysoké hodnoty regenerace, okolo 75 % (Wang a kol., 2005), tak vzhledem k relativně vysoké toxicitě tohoto roztoku (Kim a kol., 2009) a především s ohledem na potenciální mutagenní účinky jedné ze složek PVS2 roztoku, a to DMSO (Valencia-Quintana a kol., 2012), se v poslední době objevují snahy DMSO z vitrifikačních roztoků vynechat a použít jiné složení roztoků. Jedním z dalších používaných kryoprotektivních roztoků je např. PVS3 (Nishizawa a kol., 1993; Wang a kol., 2020), který DMSO neobsahuje.

Dostupnost zdravých rostlinných materiálů je pro zabránění šíření virových patogenů, které snižují nebo ničí produktivitu rostlin, zásadní. Mnoho druhů rodu *Rubus* se množí vegetativně a je vystaveno infekčnímu tlaku více než 30 známým virům během vývoje, množení a produkce ovoce (Martin a kol., 2013; Koloniuk a kol., 2023). Existuje několik metod k odstranění rostlinných patogenů ze genofondů rostlinného materiálu, včetně meristémové kultury, termoterapie, chemoterapie a kryoterapie (Grout 1999; Cheong a kol., 2014; Wang a kol., 2018; Zhang a kol., 2019; Bhat a kol., 2020). Principem výše uvedených metod je regenerace zdravé meristemické části rostliny. U meristémové kultury se meristémová část z rostliny vypreparuje a přenesení na regenerační médium. Termoterapie nebo chemoterapie je založena na snížení distribuce virových částic v rostlině tak, aby se mohly regenerovat zdravé rostliny z extirpovaných meristémů. Kryoterapie neboli „cryoknife“ je metoda založená na regeneraci meristémů po vystavení vzrostných vrcholů kapalnému dusíku (liquid nitrogen, LN), metoda kryoprezervace. Starší diferencované tkáně jsou „vyříznuty“ z vzrostného vrcholu, protože

nepřežijí působení teplot kapalného dusíku a regenerují tak pouze zdravé tkáně. K získání viru prostých rostlin lze použít kombinaci technik eliminace patogenů (Kushnarenko a kol., 2017). Cílem této metodiky je otestovat postup založený na ošetření *in vitro* kultur PVS3 jako nástroje kryoterapie pro získání a uchování zdravého genofondu maliníku.

III. Vlastní popis metodiky

a) Materiál

1. Přístrojové vybavení

Pro využití metody kryoterapie *in vitro* kultur maliníku a analýzy efektivity virové eradikace je třeba disponovat následujícím přístrojovým vybavením:

Vybavení pro uskladnění dormantních pupenů maliníku po jejich odběru ze sadu a před zavedením do in vitro:

- mrazicí box nastavitelný na -4 °C

Vybavení pro pěstování in vitro kultur:

- kultivační box nastavitelný na 23 °C, 16/8 světelné periodě a 100 - 150 $\mu\text{E s}^{-2} \text{m}^{-2}$
- parní sterilizátor (autokláv)
- horkovzdušný sterilizátor
- pH-metr
- laboratorní míchačka
- mikrovlnná trouba

Vybavení pro extirpaci vzrostných vrcholů z in vitro kultur:

- binokulární mikroskop

Přístroje pro odtátí vzorků z teplot kapalného dusíku:

- temperovaná deska pro ohřev destilované vody

Uchování kapalného dusíku a kryoprezervovaných vzorků:

- Dewarova nádoba na kapalný dusík
- Dewarova nádoba pro uložení vzorků v kapalném dusíku

Záznamy, výpočty a tisk čárového kódu:

- PC, tiskárna čárového kódu, tiskárna, statistický SW

Vybavení pro molekulární analýzy

- Dewarova nádoba na kapalný dusík pro homogenizaci vzorků
- pipety pro objemy od 0,1 μl do 1000 μl
- centrifuga s rotorem pro mikrozkušky 2 ml
- vortex
- suchá lázeň
- nanodrop nebo jiný spektrofotometr
- DNA/RNA UV dekontaminační box
- PCR termocykler
- elektroforéza a zdroj napětí
- UV iluminátor
- lednička
- mrazák (-20°C pro uchování cDNA; -80°C pro uchování RNA)

- tiskárna pro tisk štítků pro označení RNA
- horkovzdušný sterilizátor

2. Chemikálie a kultivační prostředky

V následujícím seznamu jsou uvedeny všechny chemikálie potřebné pro kryoterapii *in vitro* kultur maliníku a pro analýzu efektivity virové.

Kultivační média a doplňky:

- MS typ média (Murashige a Skoog, 1962) modifikovaný dle Dziedzic a Jagla (2013)
- fytohormony (BAP, IBA)
- agar
- sacharóza
- glycerol
- destilovaná voda

Chladicí a skladovací médium:

- kapalný dusík

Kit

- Ribospin Plant kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)
- Expin Combo GP mini (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)

3. Drobné pomůcky

Následující pomůcky jsou potřebné pro metodu kryoterapie *in vitro* kultur maliníku a analýzy efektivity virové eradikace:

Práce s in vitro kulturami:

- pinzety
- nůžky
- 100 ml Erlenmayerovy baňky, plastové kultivační nádobky
- popisovače
- Petriho misky různých velikostí (průměr cca 15 cm)

Předkultivace:

- Petriho misky (10 – 12 cm průměr)
- PE-fólie

Kryoprezervace:

- plastové pipety (2 ml)
- 2 ml kryoprezervační ampule (Nalgene)
- hliníkové plíšky o rozměrech přibližně 20 x 6 mm a tloušťce přibližně 0,2 mm
- polystyrénová nádoba
- skladovací krabičky do Dewarovy nádoby
- laboratorní sklo (kádinky)

Regenerace:

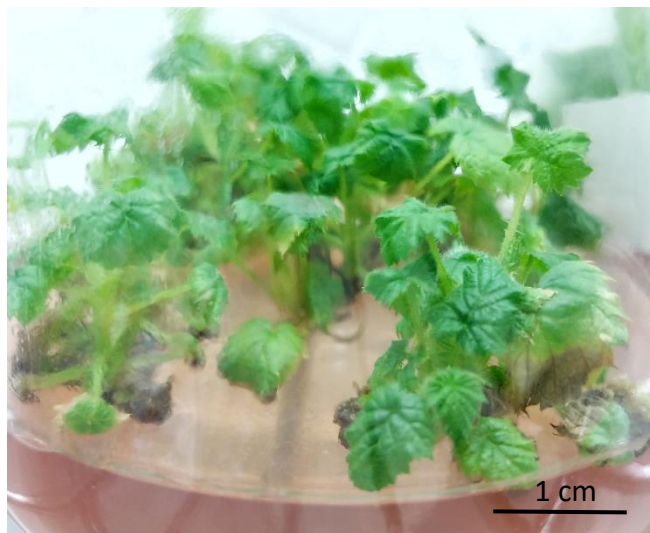
- Petriho misky
- 100 ml Erlenmayerovy baňky

Molekulární analýzy

- pinzety
- nůžky
- popisovače
- Petriho misky
- tloučky
- pipetovací špičky
- zkumavky, mikrozukmavky
- chladicí stojánek
- laboratorní sklo
- stojánky a skladovací krabičky

4. Rostlinný materiál

Výchozím materiálem pro testování kryoterapie maliníku byly *in vitro* kultury maliníku (*Rubus idaeus* L.) od spolupracující firmy Jan Holub, s.r.o., odrůdy 'Tulameen', *Obrázek 1*, a 'Autumn First'. Pro multiplikační médium bylo použito MS medium modifikované podle Dziedzic a Jagla (2013), 30 g l⁻¹ sacharózy, 1 mg l⁻¹ BAP, 0,1 mg l⁻¹ IBA a 7 g l⁻¹ agaru. Kultury maliníku byly multiplikovány v intervalu 4-6 týdnů ve standardních kultivačních podmínkách v kultivačním boxu (24 °C, 16/8 fotoperioda).

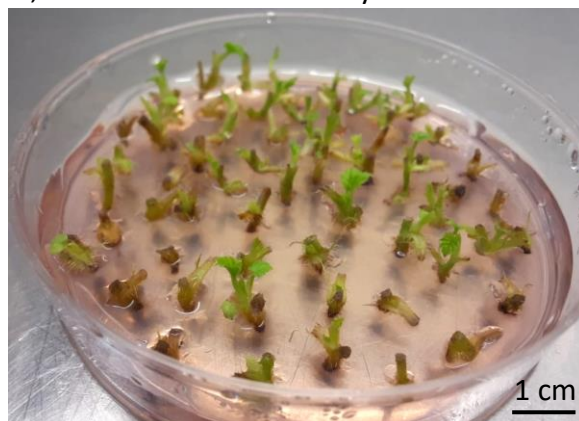


Obrázek 1 In vitro kultura maliníku odrůdy 'Tulameen'. (Bilavčík)

b) Kryoprezervace

1. Předkultivace

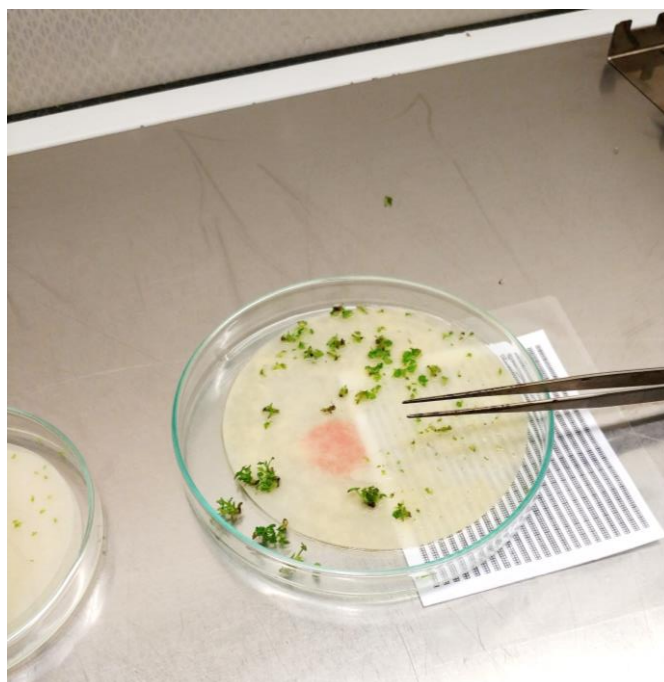
Ze 4 – 6 týdnů staré *in vitro* kultury maliníku, odrůd 'Tulameen' a 'Autumn First', byly odebrány tři nodální segmenty, *Obrázek 2*, a nasazeny na čerstvé kultivační médium. Po 14 dnech bylo z těchto segmentů extirpováno přibližně 200 vzrostných vrcholů o velikosti přibližně 1 x 2 mm, *Obrázek 3*, a ty byly vystaveny postupně se zvyšující sacharózové předkultivaci. První den, po extirpaci, byly vzrostné vrcholy umístěny na Petriho misku s 0,25 M vodným roztokem sacharózy. Následující den byl původní roztok nahrazen 0,5 M roztokem sacharózy a další den 0,75 M roztokem sacharózy.



Obrázek 2 Tři nodální segmenty *in vitro* kultury maliníku odrůdy 'Tulameen'. (Hammond)

2. PVS3 protokol

Po dalších 24 hodinách byly vzrostné vrcholy přemístěny na 20 minut do kádinky s LS roztokem (2 M glycerol a 0,4 M sacharóza ve vodě). Poté byl LS roztok nahrazen roztokem PVS3 (50 g glycerolu a 50 g sacharózy do 100 ml doplněné vodou). Následně byly vzrostné



Obrázek 3 Extirpace vzrostných vrcholů *in vitro* kultury maliníku odrůdy 'Autumn first'. (Bilavčík)

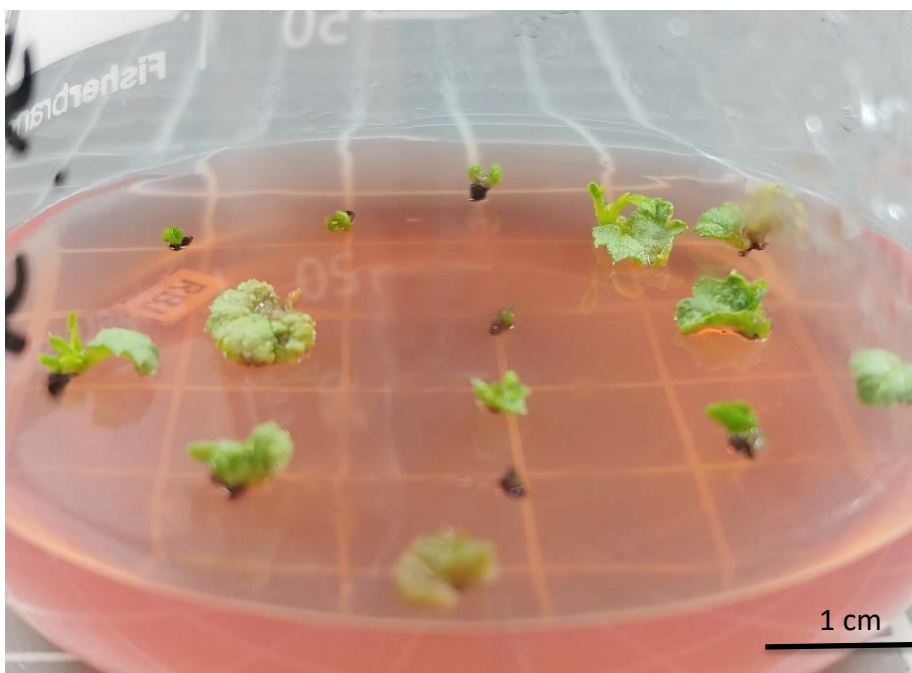
vrcholy po třech sadách po 10 ks na variantu odebírány z PVS3 roztoku, umístěny na hliníkový plíšek o rozměrech přibližně 20 x 6 mm, *Obrázek 4*, a ponořeny do kapalného dusíku.

3. Ohřev a regenerace

Po minimálně 1 hodině byly plíšky se vzrostnými vrcholy z kapalného dusíku vyndány a okamžitě ponořeny do odtávacího 1,2 M roztoku sacharózy ve vodě o teplotě 38 °C. Aplikované expoziční časy PVS3 roztoku se pohybovaly od 90 do 150 minut. Poté byly vzrostné vrcholy nasazeny na multiplikační médium s 0,75 M sacharózou a umístěny do kultivačního boxu do 24 °C a tmy na 3 dny. Po třech dnech byly vyndány ze tmy a ponechány ve standardních kultivačních podmínkách. Kontrolní varianty, předkultivace a LS kontrola, byly ošetřeny stejným postupem odtávacího 1,2 M roztoku sacharózy, ale nebyly vystaveny teplotě kapalného dusíku. Přežití (podíl zelených rostlin) a regenerace (podíl prorostlých rostlin) byly hodnoceny po 14 a 28 dnech. Ukázka regenerace vzrostných vrcholů odrůdy 'Tulameen' po aplikaci kryoprezervačního protokolu PVS3, viz *Obrázek 5*. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí SW Statistica (Anova, LSD-test), k prokázání statistické významnosti rozdílů mezi průměry ($P < 0,05$).



Obrázek 4 Vzrostné vrcholy v kapkách PVS3 roztoku umístěné na hliníkovém plíšku. (Bilavčík)

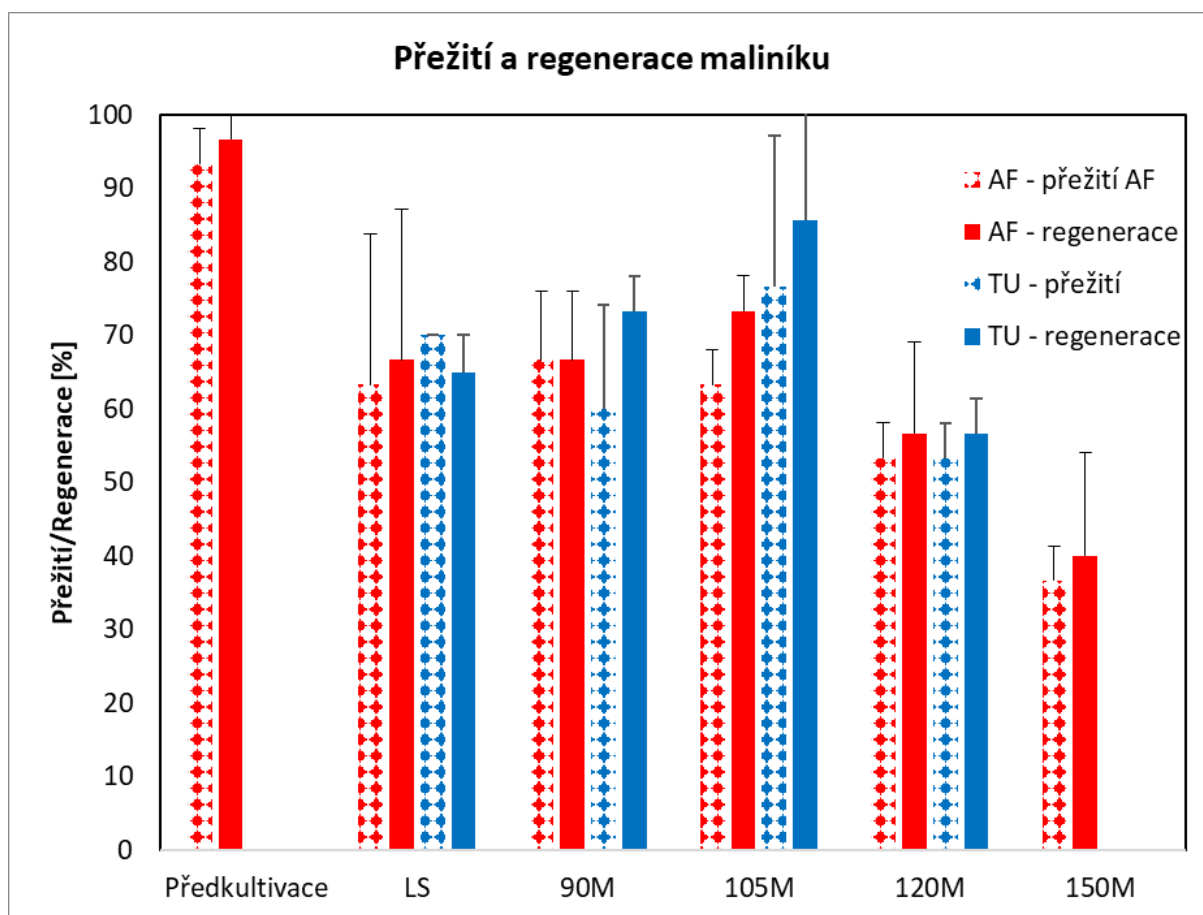


Obrázek 5 Regenerace vzrostných vrcholů maliníku 'Tulameen' po kryoprezervaci PVS3 (105 min) ošetřením kapalným dusíkem. Délka úsečky je 1 cm. (Bilavčík)

4. Hodnocení regenerace

U odrůdy 'Tulameen' bylo přežití a regenerace po aplikaci roztoku LS 70 % a 65 %. Expozice roztoku PVS3 po dobu 90 minut, 105 minut a 120 minut, po nichž následovalo ponoření do kapalného dusíku, vedly k přežití 60,0 %, 76,7 % a 53,3 %, v daném pořadí a úrovni regenerace 73,3 %, 85,7 % a 56,7 %, v tomto pořadí. Maliník 'Autumn First' vykazoval přežití a regeneraci po předkultivaci 93,3 %, resp. 96,7 %, a po aplikaci roztoku LS 63,3 %, resp. 66,7 %. Expozice PVS3 po dobu 90 minut, 105 minut, 120 minut a 150 minut s následným ponořením do kapalného dusíku vedla k přežití 66,7 %, 63,3 %, 53,3 % a 36,7 % a regeneraci 66,7 %, 73,3 %, 56,0 % a 56,0 % %. Výsledky přežití a regenerace obou genotypů jsou uvedeny, viz *Obrázek 6*.

Pro hodnocení účinnosti virové kryoterapie byla vybrána odrůda maliníku 'Tulameen', protože u ní byla v *in vitro* kultuře detekována přítomnost viru BRNV. Regenerované rostliny odrůdy 'Tulameen' po kryoprezervačních testech byly jednotlivě subkultivovány alespoň dva měsíce a poté byly nejstarší listy (stáří 2 až 3 měsíce) testovány na přítomnost viru BRNV.



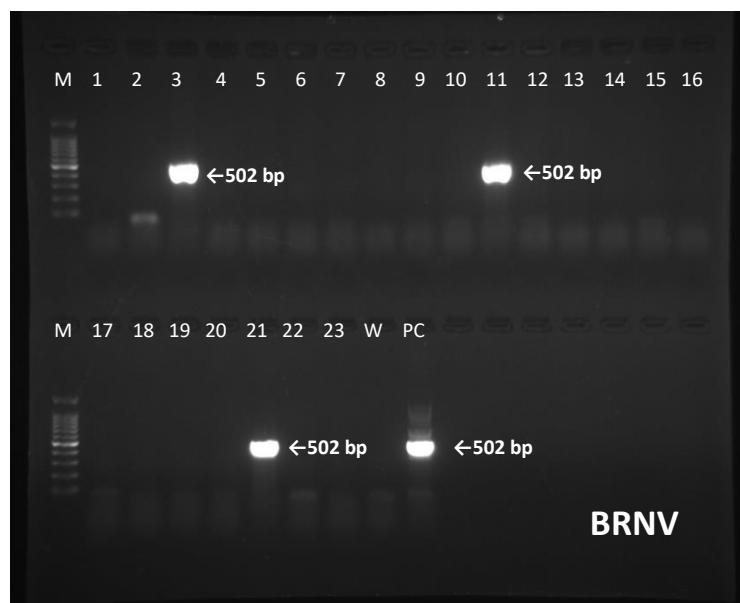
Obrázek 6 Přežití a regenerace odrůd maliníku 'Tulameen' a 'Autumn First' po uvedených krocích kryoprezervace PVS3. Varianty předkultivačního a nakládacího roztoku byly bez expozice kapalného dusíku. Časové varianty od 90 do 150 min byly vystaveny kapalnému dusíku. Tři sady po 10 vzrostných vrcholech pro každou variantu, svislé pruhy představují SD. Písmena představují významné rozdíly, jak bylo identifikováno pomocí ANOVA a ve srovnání s Fisherovým LSD testem ($P < 0,05$).

c) Analýza virového patogenu

Virus černé nekrózy maliníku (black raspberry necrosis, BRNV) patří do rodu *Sadwavirus* (čeleď *Secoviridae*) a nedávno byl přejmenován na *Sadwavirus rubi* (Thompson et al., 2017, <https://gd.eppo.int/taxon/BRNV00>). Virus má neobalené sférické částice o průměru 35 nm (Halgren a kol. 2007) a má segmentovaný, bipartitní lineární ssRNA(+) genom. Poprvé byl popsán Stace-Smithem (1955) v Britské Kolumbii. Byly získány celogenomové sekvence severoamerického a evropského izolátu BRNV (Halgren a kol. 2007, McGavin a kol. 2010). Hostitelský okruh viru je omezen na druhy rodu *Rubus*. Samotný BRNV nevyvolával žádné nebo pouze mírné příznaky u odrůd malin a červenými plody (*Rubus idaeus*), zatímco u černých malin (*R. occidentalis*) způsoboval silné příznaky. Dosud byl popsán jeho výskyt v Evropě, Severní Americe a Oceánii (<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/DMPD/20103096740>). BRNV je přenášen semi-perzistentním způsobem mšicemi *Amphorophora rubi idaei* a *A. aganthonica* (Stace-Smith 1955, McMenemy, 2009).

Rostliny maliníku odrůdy 'Tulameen' a 'Autumn First' kultivované v kultuře *in vitro* byly zkoumány pomocí vysoko kapacitního sekvenování. Celková RNA byla izolována ze 100 mg rostlinných listů pomocí Ribospin Plant kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea) podle pokynů výrobce. RNA byla poté ošetřena sadou Zymo-Seq RiboFree Total RNA Library Kit (Zymo, Irvine, CA, USA) a použita pro přípravu sekvenační knihovny pomocí NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit pro Illumina (NEB, Ipswich, MA, USA). Knihovny byly zpracovány pomocí sekvenátoru NovaSeq - S4 v režimu PE 150 bp. U odrůdy 'Tulameen' pěstované *in vitro* (5 rostlin) bylo zjištěno, že je infikována virem černé nekrózy maliníku [BRNV, (čeleď *Secoviridae*) (Thompson a kol., 2017)]. Sekvence RNA1 a RNA2 izolátu BRNV získány pomocí HTS byly uloženy do genové banky GenBank pod přírůstkovými čísly OR888445 a OR888446. Infikované rostliny byly dále množeny *in vitro* a použity k experimentům pro eliminaci viru.

Z rostlin odrůdy 'Tulameen' po ošetření kryoterapií (103 jedinců) a také z kontrol, které nebyly vystaveny LN (12 rostlin), bylo odebráno ca 100 mg listů pro extrakci RNA. Vyizolované RNA (cca 500 ng na každých 10 µl reakčního objemu) byly transkribovány do cDNA pomocí M-MLV reverzní transkriptázy (Invitrogen, CA, USA) a náhodných hexamerových primerů a poté testovány pomocí PCR na přítomnost BRNV. Primery 1153/1154 byly použity pro amplifikaci 502 bp dlouhého úseku genomového segmentu RNA1 (Stuart MacFarlane, osobní sdělení). Jeden µl každého preparátu cDNA byl přidán k 10 µl PPP Master Mixu (150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02 % Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 µM každého dNTP, 100 U/ml Taq-Purple DNA polymerázy, Top-Bio Ltd., Praha, Česká republika), 7 µl PCR H₂O a 0,5 µM každého primeru. Pro amplifikaci byly použity následující podmínky: po počáteční denaturaci 1 min při 94 °C následovalo 35 cyklů skládajících se z 15 s při 94 °C, 15 s při 60 °C a 1 min při 72 °C, poté konečný prodlužovací krok 7 minut při 72 °C. RNA izolovaná z čepele listu maliníku, kde byl BRNV dříve identifikován (izolát A702) a kontrola bez RNA templátu, byly použity jako pozitivní a negativní kontroly při každém PCR testu. Čtyři mikrolitry každého PCR amplikonu byly analyzovány elektroforézou v 1% agarózovém gelu, obarveným pomocí GelRed (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) a produkty byly vizualizovány pod UV transiluminátorem.



Obrázek 7 Výsledky testu detekce black raspberry necrosis virus (BRNV) pomocí RT-PCR ve vzorcích maliníku 'Tulameen' ošetřeného kryoterapií. W – voda jako negativní kontrola (beztemplátová kontrola), PC – pozitivní kontrola (BRNV izolát A702), M – DNA marker 100 bp, shora dolů: 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp. Šipky označují pozitivní vzorky. (Fránová)

d) Shrnutí kryoterapie

Prodloužením doby ošetření roztokem PVS3 za 105 minut mělo za důsledek snížení přežití a regenerace vzrostných vrcholů, *Obrázek 6*. Podobný pokles regenerace s prodlouženou dobou působení kryoprotektantu, PVS2, popsali Wang a kol. (2005). Naše studie ukázala, že pro optimální regeneraci rostlin maliníku, odrůd 'Tulameen' a 'Autumn First', po kryoprezervaci bylo vystavení jejich vzrostných vrcholů působení kryoprotektivnímu roztoku PVS3 po dobu 90 až 120 minut.

Tabulka 1 Účinnost eradikace BRNV u maliníku 'Tulameen' po kryoterapii. U varianty vystavené působení kapalného dusíku (LN) byla aplikována kryoprezervace pomocí PVS3. Kontrolní rostliny (kontrola) byly vystaveny celému postupu kryoprezervace, kromě ponoření do kapalného dusíku.

	Testováno rostlin	Bezvirózní rostliny	Účinnost terapie
	(n)	(n)	(%)
Kontrola	12	11	91,7
LN	103	97	94,2

Výsledky kryoterapie u BRNV pozitivního maliníku 'Tulameen' jsou uvedeny v Tabulce 1. Po provedení kryoprezervace bylo 94,2 % (n=97) jednotlivých regenerovaných rostlin z celkových 103 na přítomnost viru negativních. Kontroly ošetřené PVS3 bez expozice kapalným dusíkem, měly také vysokou míru eradikace viru, 91,7 % kontrolních rostlin bylo BRNV negativních. V případě viru BRNV výsledky naznačují, že postup kryoprezervace, i bez vystavení kapalnému dusíku, byl při eradikaci viru vysoce účinný. Je známo, že systémové patogeny, jako jsou viry, se často nevyskytují v meristematických částech kvůli meristematickým a mezigeneračním systémům antivirové ochrany (Bradamante a kol., 2021). Je zajímavé, že předchozí studie o eliminaci BRNV z *in vitro* kultur pomocí tepelné terapie prokázaly úplnou eliminaci (Cheong a kol., 2014). Tento efekt lze vysvětlit tím, že virové částice pravděpodobně nejsou přítomny přímo v meristematických částech vzrostného vrcholu a i při pouhém vystavení roztoku PVS3, bez působení kapalného dusíku, jsou okolní tkáně poškozeny a neregenerují se spolu se zdravými meristémy. Tento účinek by nebyl možný, pokud by se virus vyskytoval uvnitř samotného meristému. To podporují práce Jones a Murant (1972), Jones a Roberts (1977), Jones a Jennings (1980), kteří zjistili, že BRNV je obtížné mechanicky přenést z maliníku na bylinné rostliny. Ačkoli Cheong a kol. (2014) uvedli eliminaci BRNV *in vitro* kultivací a termoterapií axilárních pupenů ostružiníku ojíňeného černého (*Rubus occidentalis* L.), stejného rodu jako v naší práci, pokud je nám známo, naše metodická studie je první, která uvádí eliminaci BRNV kryoterapií u maliníku (*Rubus idaeus* L.).

IV. Srovnání novosti postupů

Navržená metodika přináší nový postup, který umožňuje ozdravení maliníku pomocí *in vitro* kultur a jejich kryoprezervace od virového patogenu, BRNV. Doposud nebyl podobný komplexní metodický postup terapie maliníku založený na kryoprezervaci *in vitro* kultur v České republice publikován. Aplikací uvedeného postupu je možné ozdravit a bezpečně uchovat sbírkový materiál v ultranízké teplotě v kapalném dusíku v kryobance vegetativně množených plodin ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby, v.v.i. v Praze Ruzyni.

V. Popis uplatnění metodiky

Uživatelem této metodiky bude Ministerstvo zemědělství České republiky a to prostřednictvím „Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů rostlin, zvířat a mikroorganismů významných pro výživu a zemědělství“. Tato metodika umožní ozdravit od BRNV a bezpečně uchovat vybrané genotypy maliníku.

VI. Ekonomické aspekty

Kalkulace nákladů na zavedení kryoprezervačního postupu uvedeného v metodice závisí na tom, zda se zavádí nově celý provoz pro kryoprezervaci nebo se pouze implementuje tato metodika kryoterapie do stávajícího provozu kryoprezervační laboratoře. V případě, že laboratoř již postup kryoprezervace používá, jsou náklady na zavedení nové metodiky především v části analýz virových patogenů. Genetické kolekce ovocných dřevin jsou doposud uchovávány především ve venkovních kolekcích. Tyto kolekce jsou vystaveny, mimo jiné, především nepříznivým patogenům, které mohou sbírky degradovat. V současnosti je tendence tyto sbírky hodnotit z hlediska zdravotního stavu a alespoň sbírkově významné genotypy ozdravit a uchovat. V případě klasického způsobu uchování ozdravených materiálů ve speciálních sklenících, či síťovnicích, které chrání před průnikem patogenů, či jejich vektorů se náklady na provoz těchto zařízení v posledních letech výrazně zvyšují. Jen v případě nákladů na údržbu a provoz se v posledních letech ceny zvýšily několikanásobně a to není bráno v potaz výstavba nových zařízení - pro nově ozdravované položky. V té souvislosti nabývá na významu využití nových biotechnologických metod s využitím *in vitro* kultur, především kryoprezervace. Uchování pomocí samotných *in vitro* kultur je možné, ale z dlouhodobého hlediska je však finančně i z hlediska stability genotypů výhodnější metodou kryoprezervace. V případě kryoprezervace pomocí *in vitro* kultur jsou významné náklady na práci s tkáňovými kulturami v aseptických podmínkách; vybavení pro sterilizaci (autoklávy, horkovzdušné sterilizátory), kultivační boxy, laminární boxy, laboratorní přístroje pro přípravu kryoprotektivních roztoků. Dále je potřeba pořídit skladovací Dewarovy nádoby. Do jedné Dewarovy nádoby Worthington LS 4800 v ceně přibližně 150 tis. Kč, lze uskladnit 4800 2 ml kryoprezervačních ampulí. Při počtu přibližně 6 kryoprezervačních ampulí pro jeden ozdravený genotyp můžeme skladovat v jedné nádobě přibližně 800 genotypů. Roční náklady na provoz (doplňování dusíku – přibližně 310 l) jedné Dewarovy nádoby činí podle dodavatele od 4000 do 15400 Kč. V případě plně naplněné Dewarovy nádoby vychází roční náklady na kapalný dusík na jednu

položku v řádu desítek korun. Je nutné počítat s tím, že ve fázi počátku plnění prázdné Dewarovy nádoby vzorky se cena rozpočítává na výrazně menší počet vzorků a dále, že je vyšší spotřeba kapalného dusíku v průběhu ukládání vzorů do Dewarovy nádoby. Také je potřeba počítat s náklady na samotnou kryoprezervaci/kryoterapii a především na virovou analýzu vzorku. Virová terapie a analýza se však musí provádět i u genotypů, které jsou ozdravovány pomocí *in vitro* technologií a umísťovány pro uchování do standardních zařízení jako je skleník či síťovník, takže není potřeba tyto položky kalkulovat. Maliník jakožto vytrvalá plodina může být ve výsadbách pěstována i po několik desetiletí. Z tohoto důvodu je vysoká pravděpodobnost, že rostliny v sobě akumulují viry a tím slouží jako rezervoáry pro další rostliny či přenašeče virů. Ztráty na výnosech a kvalitě ovoce jsou pak dvojí, a to na původně infikované i nově infikovaných rostlinách. Ztráty na výnosech se mohou pohybovat v řádech desítek procent, například při napadení kombinované infekce různými viry způsobujícími virovou mozaiku až 78 % (Freeman a Stace-Smith, 1970). V ČR je produkce malin přibližně 60 tun a při ceně přibližně 400 Kč/kg se hodnota trhu pohybuje kolem 24 mil. Kč ročně. Při reálně odhadovaném 10 až 20 % snížení sklizně díky zavirované plantáži se roční ztráty pohybují v řádu nižších jednotek milionů korun. Pro dosažení uspokojivých výnosů maliníku je nezbytné používat zdravou sadbu. Toho lze dosáhnout pouze při garantovaných zdrojích ozdravených genotypů. Vzhledem k tomu, že rostliny napadené viry nelze ve výsadbě proti těmto patogenům již ochránit (chemickými či jinými postřiky), důležitá jsou právě preventivní opatření. Tím nejdůležitějším je zajištění zdravé sadby. V případě produkce testované sadby je možné počítat s možností realizovat až o 20 % vyšší cenu certifikované sadby, což například v případě firmy Jan Holub s.r.o., hlavního producenta sadby maliníku v ČR, činí další nižší jednotky milionů Kč ročně. Na závěr lze shrnout, že samotné ozdravení požadovaného spektra genotypů maliníku může mít výrazný pozitivní vliv na prestiž kurátora sbírky maliníku v ČR s přesahem do mezinárodní spolupráce.

VII. Seznam použité související literatury

- Bhat, A.I., Rao, G.P. (2020). Virus Elimination by Meristem-Tip Culture. In: Characterization of Plant Viruses. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0334-5_47
- Bradamante, G., Mittelsten Scheid, O., Incarbone, M. (2021). Under siege: virus control in plant meristems and progeny. *The Plant Cell*, 33(8), 2523-2537.
- Cheong, E.J., Jeon, A.R., Kang, J.W., Mock, R., Kinard, G., Li, R. (2014). *In vitro* elimination of Black raspberry necrosis virus from black raspberry (*Rubus occidentalis*). *Horticultural Science*, 41(2), 95-99.
- Dziedzic, E., Jagla, J., (2013). Micropropagation of *Rubus* and *Ribes* spp. *Methods Mol Biol* 11013, 149-160.
- Freeman, J.A., Stace-Smith, R. (1970). Effects of raspberry mosaic viruses on yield and growth of red raspberries. *Canadian Journal of Plant Science*, 50(5), 521-527.
- Grout, B.W. (1999). Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. *Plant cell culture protocols*, 115-125.
- Halgren, A., Tzanetakis, I.E., Martin, R.R. (2007). Identification, characterization, and detection of Black raspberry necrosis virus. *Phytopathology*, 97:44-50.
- Jones, A.T., Jennings, D.L. (1980). Genetics control of the reactions of raspberry to black raspberry necrosis, raspberry leaf mottle, and raspberry leaf spot viruses. *Annals of Applied Biology* 96, 59-65.
- Jones, A.T., Murrant, A.F. (1972). Some properties of mechanically transmissible virus widespread in raspberry (*Rubus idaeus*) in Scotland. *Plant Pathology* 21, 166-170.
- Jones, A.T., Roberts, I.M. (1977). *Rubus* host range, symptomatology and ultrastructural effects of a British isolate of black raspberry necrosis virus. *Annals of Applied Biology* 86, 381-387.
- Kim, H.H., Lee, Y.G., Shin, D.J., Ko, H.C., Gwag, J.G., Cho, E.G., Engelmann, F. (2009). Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*, 30(5), 320-334.
- Koloniuk, I., Fránová J., Příbylová J., Sarkisova T., Špak J., Tan J.L., Zemek R., Čmejla R., Rejlová M., Valentová L., Sedlák J., Holub J., Skalík J., Blystad D.-R., Sapkota B., Hamborg Z. (2023) Molecular characterization of a novel enamovirus infecting raspberry. *Viruses* 15, 2281.
- Kushnarenko, S., Romadanova, N., Aralbayeva, M., Zholamanova, S., Alexandrova, A., Karpova, O. (2017). Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* shoots. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53(4), 425-432.
- Martin, R.R., MacFarlane, S., Sabanadzovic, S., Quito, D., Poudel, B., Tzanetakis, I.E. (2013). Viruses and virus diseases of *Rubus*. *Plant Disease*, 97(2), 168-182.
- McGavin, W.J., McMenemy, L.S., MacFarlane, S.A. (2010) The complete nucleotide sequence of a UK strain of black raspberry necrosis virus. *Archives of Virology* 155:1897-1899.

- McMenemy, L.S., Mitchell, C., Johnson, S.N. (2009). Biology of the European large raspberry aphid (*Amphorophora idaei*): its role in virus transmission and resistance breakdown in red raspberry. *Agricultural and Forest Entomology*, 11 (1), 61-71.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y., Matsuzawa, T. (1993). Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science*, 91(1), 67-73.
- Reed, B.M. (1988). Cold acclimation as a method to improve survival of cryopreserved *Rubus* meristems. *Cryoletters*, 9, 166– 171.
- Reed, B.M., Lagerstedt, H.B. (1987). Freeze preservation of apical meristems of *Rubus* in liquid nitrogen. *Hortic Sci*, 22, 302–303.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep*, 9, 30–33.
- Sakai, A., Nishiyama, Y. (1978). Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. *Hortic Sci*, 13, 225– 227.
- Stace-Smith, R. (1955) Studies on *Rubus* virus diseases in British Columbia. II. Black raspberry necrosis. *Canadian Journal of Botany* 33:314-322.
- Tapio, E., Bremer, K., Valkonen, J.P.T. (1997). Viruses and their significance in agricultural and horticultural crops in Finland. *Agric Food Sci Finl*, 6, 323–336.
- Thompson, J.R., Dasgupta, I., Fuchs, M., Iwanami, T., Karasev, A.V., Petrzik, K., Sanfaçon, H., Tzanetakis, I., van Der Vlugt, R., Wetzel, T. and Yoshikawa, N. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Secoviridae. *Journal of General Virology*, 98(4), 529 -531.
- Valencia-Quintana, R., Gómez-Arroyo, S., Waliszewski, S.M., Sánchez-Alarcón, J., Gómez-Olivares, J.L., Flores-Márquez, A.R., Villalobos-Pietrini, R. (2012). Evaluation of the genotoxic potential of dimethyl sulfoxide (DMSO) in meristematic cells of the root of *Vicia faba*. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 4(3), 154-160.
- Volk, G.M., Walters, C., (2006). Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*, 52(1), 48-61.
- Wang, M.R., Cui, Z.H., Li, J.W., Hao X.Y., Zhao L., Wang Q.C. (2018). *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods*, 14, p87. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>
- Wang, Q., Laamanen, J., Uosukainen, M., Valkonen, J.P.T. (2005). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of raspberry (*Rubus idaeus* L.) by encapsulation–vitrification and encapsulation–dehydration. *Plant Cell Reports*, 24(5), 280-288.
- Wang, M.R., Zhang, Z., Zámečník, J., Bilavčík, A., Blystad, D.R., Haugslie, S., Wang, Q.C. (2020). Droplet-vitrification for shoot tip cryopreservation of shallot (*Allium cepa* var. *aggregatum*): Effects of PVS3 and PVS2 on shoot regrowth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140, 185-195.
- Zamecnik, J., Faltus, M., Bilavcik, A. (2021). Vitrification solutions for plant cryopreservation: Modification and properties. *Plants*, 10(12), 2623.
- Zhang, Z., Wang, Q.C., Spetz, C., Blystad, D.R. (2019). *In vitro* therapies for virus elimination of potato-valuable germplasm in Norway. *Scientia Horticulturae*, 249, 7-14.

VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Zamecnik, J., Faltus, M., Bilavcik, A. (2021). Vitrification solutions for plant cryopreservation: Modification and properties. *Plants*, 10(12), 2623.
- Bilavcik, A., Zamecnik, J., Faltus, M. (2015) Cryotolerance of apple tree bud is independent of endodormancy. *Frontiers in plant science*, 6, 13.
- Bilavčík, A., Zámečník, J., Grospietsch, M., Faltus, M., Jadrná, P. (2012) Dormancy development during cold hardening of *in vitro* cultured *Malus domestica* Borkh. plants in relation to their frost resistance and cryotolerance. *Trees*, 26(4), 1181-1192.
- Koloniuk, I., Fránová J., Příbylová J., Sarkisova T., Špak J., Tan J.L., Zemek R., Čmejla R., Rejlová M., Valentová L., Sedlák J., Holub J., Skalík J., Blystad D.-R., Sapkota B., Hamborg Z. (2023) Molecular characterization of a novel enamovirus infecting raspberry. *Viruses* 15, 2281.
- Zámečník, J., Faltus, M., Bilavčík, A., Kotková, R. (2012) Comparison of Cryopreservation Methods of Vegetatively Propagated Crops Based on Thermal Analysis. In: Katkov, I. (ed.). *Current Frontiers in Cryopreservation*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 333-357.

IX. Dedikace

Metodika je výstupem řešení projektu "Zdravé ovoce v měnících se klimatických podmínkách: vývoj nových biotechnologických postupů diagnostiky virů, studium vektorů, ozdravování a bezpečného uchovávání jahodníku a maliníku" (TO01000295) financovaného částkou 1 477 000 Euro z fondů EHP a Technologické Agentury České republiky v rámci programu KAPPA a Institucionálního projektu VÚRV, v.v.i. č. RO0423.

X. Jména oponentů

Odborný oponent:

Mgr. Petr Maršík, Ph.D.

ÚEB AV ČR, Rozvojová 263, 165 02 Praha 6 - Lysolaje

Oponent ze státní správy:

Ing. Adéla Kubásková

Oddělení OZE a environmentálních strategií, MZe, Těšnov 65/17, 117 05 Praha 1

Název: Metodika terapie virových patogenů pomocí kryoprezervace
METODIKA

Autoři (podíl na práci): RNDr. Alois Bilavčík Ph.D. (30 %)
Dr. Olena Bobrova, Ph.D. (5 %)
Ing. Miloš Faltus, Ph.D. (5 %)
Ing. Jana Fránová, Ph.D. (20 %)
Ing. Stacy Denise Hammond Hammond, Ph.D. (15 %)
Mgr. Igor Koloniuk, Ph.D. (20 %)
Ing. Jiří Zámečník, CSc. (5 %)

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.
Drnovská 507, 161 06, Praha 6 – Ruzyně

Metodika je veřejně přístupná na adrese www.vurv.cz

Náklad: 40 výtisků

Vyšlo v roce 2023, první vydání

Vydáno bez jazykové úpravy

Kontakt na autory: bilavcik@vurv.cz
olena.bobrova@vurv.cz
faltus@vurv.cz
jana@umbr.cas.cz
hammond@vurv.cz
koloniuk@umbr.cas.cz
zamecnik@vurv.cz

Autoři fotografií:

Titulní fotografie: Alois Bilavčík

Fotografie v textu: Autoři jsou uvedeni pod fotografiemi

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 2023

ISBN: 978-80-7427-418-3

