

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

---

Studijní program: N4101 – Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Využití meristémových kultur ve šlechtění česneku**

**kuchyňského (*Allium sativum*)**

Autor diplomové práce: Bc. Eva Švehlová

Vedoucí diplomové práce: Ing. Pavel Beran, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

České Budějovice 2017

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva ŠVEHLOVÁ**  
Osobní číslo: **Z15400**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**  
Název tématu: **Využití meristémových kultur ve šlechtění česneku  
kuchyňského (*Allium sativum*)**  
Zadávací katedra: **Katedra speciální produkce rostlinné**

**Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :**

Obsah: Desetinné členění s uvedením stran jednotlivých kapitol diplomové práce.  
Úvod: Stručný nástin problému a aktuální situace v oblasti *in vitro* pěstování česneku kuchyňského.  
Literární přehled: Charakteristika a význam *in vitro* metod pro pěstování česneku kuchyňského a jejich principy.  
Cíl práce: Jednotlivé cíle diplomové práce shrnuté v bodech.  
Materiál a metody: Detailní popis použitých genotypů, detailní postup jednotlivých použitých metod, přesné parametry kultivace, způsob vyhodnocení získaných dat.  
Výsledky a diskuse: Vyhodnocení spolehlivosti, přesnosti a náročnosti použitých metod, popis nově vytvořeného materiálu, porovnání vlastních výsledků s literárními údaji, posouzení možností praktického uplatnění dosažených výsledků, poznatků a doporučení.  
Závěr: Přehledné shrnutí nejdůležitějších poznatků, závěrů a doporučení, vyplývajících z řešené problematiky.  
Seznam použité literatury: V abecedním řazení podle ČSN 01 01 97 "Bibliografická citace".

Rozsah grafických prací: 10-15 stran

Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

Konvička O. Česnek (*Allium sativum* L.). 1 vyd. Olomouc (vlastní náklad), 1998. 167 s. Křížan B., Ondrušíková E., Kudělková M., Krajíčková J. Metodika kultivace a multiplikace česneku v podmínkách in vitro. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2010 Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V., Koptíková J. Metody molekulární biologie. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 194 s. Literární rešerše z databází: AGRIS, Web of Science, Biological Abstracts a další

Vedoucí diplomové práce: Ing. Pavel BERAN

Katedra speciální produkce rostlinné

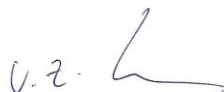
Konzultant diplomové práce:

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Katedra speciální produkce rostlinné

Datum zadání diplomové práce: 6. ledna 2016

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2017

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentická 1898, 379 05 České Budějovice

L.S.

  
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 6. ledna 2016

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

.....  
Datum

.....  
Podpis studenta

### **Poděkování**

Děkuji panu Ing. Pavlovi Beranovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky a odbornou pomoc v laboratoři při zpracování mé diplomové práce, firmě Tagro Červený Dvůr s.r.o. za poskytnutí rostlinného materiálu, paní Ing. Aleně Krpálkové za odbornou pomoc při zpracování metodické části, mé kamarádce Lucii Homolkové, DiS. za fotografie a v neposlední řadě také děkuji mojí rodině za trpělivost a podporu během celého studia.

## **Abstrakt**

Diplomová práce se zabývá využitím meristémových kultur ve šlechtění česneku kuchyňského (*Allium sativum*). Jako výchozí materiál byl použit česnek kuchyňský, odrůda Tantal. Zdravotní stav česneku, před izolací meristémů, byl testován pomocí imunologické metody ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) známé také jako EIA (Enzyme Immunoassay). Jedná se o metodu sloužící k detekci protilátek a antigenu. Zdravotní stav byl testován na přítomnost virů žluté zakrslosti cibule (OYDV – Onion Yellow Dwarf Virus) a na virus rodu *Carlavirus* (GCLV – Garlic Common Latent Virus). Viruprostý materiál byl dále vysterilizován, kultivován a následně z něj byl odebrán meristém. Kultivace vyizolovaného meristému probíhala podle dostupných metodik na kultivačním médiu MS s vitamíny obohacené o fytohormony IAA, NAA a BAP.

**Klíčová slova:** česnek, meristém, ELISA, kultivační médium

**Abstract**

The diploma thesis deals with the use of meristem cultures in garlic (*Allium sativum*) breeding. Variety Tantal was used as a source material. Before the isolation of meristem, the material was tested for the occurrence of viral diseases by immunological tests - ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay), also known as EIA (Enzyme Immunoassay). The method is used to detect antibodies and antigens. The material was tested for Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV) and Common Garlic Latent Virus (GCLV) from *Carlavirus* genus. The material was subsequently sterilized, cultured and then meristem was obtained. Cultivation of the meristem was performed according to available methodologies. After preparation, meristem was put on MS medium with vitamins and growth regulators IAA, NAA and BAP.

**Key words:** garlic, meristem, ELISA, culture medium

## Obsah

1	Úvod.....	10
2	Literární část.....	11
2.1	Česnek kuchyňský ( <i>Allium sativum</i> ).....	11
2.1.1	Historie.....	11
2.1.2	Taxonomické zařazení Česneku kuchyňského.....	11
2.2	Botanická charakteristika česneku.....	12
2.3	Pěstování.....	15
2.3.1	Nároky na půdu.....	15
2.3.2	Sadbový materiál.....	15
2.3.3	Sadba.....	16
2.3.4	Sklizeň.....	16
2.3.5	Skladování.....	17
2.4	Obsahové látky česneku.....	17
2.4.1	Sírné látky.....	17
2.4.2	Látky bez síry.....	18
2.4.3	Ostatní látky.....	20
2.5	Léčivé vlastnosti česneku.....	21
2.6	Choroby.....	21
2.6.1	Virózy.....	21
2.6.2	Bakteriózy.....	23
2.6.3	Mykózy.....	24
2.7	Škůdci.....	24
2.7.1	Háďátko zhoubné ( <i>Ditylenchus dipsaci</i> ).....	24
2.7.2	Houbomilka česneková ( <i>Suillia lurida</i> ).....	25
2.7.3	Molík česnekový ( <i>Acrolepiopsis assectella</i> ).....	26
2.7.4	Roztoč ( <i>Rhizoglyphus echinopus</i> ).....	26
2.7.5	Květilka cibulová ( <i>Delia antiqua</i> ).....	26
2.7.6	Třásněnky ( <i>Thrips tabaci</i> ).....	26
2.8	Klonové množení <i>in vitro</i> .....	27
2.8.1	Meristémy rostliny.....	28



2.8.2	Meristémové kultury .....	30
2.9	ELISA .....	31
2.9.1	DAS-ELISA.....	32
3	Cíle práce.....	34
4	Materiál a metodika .....	35
4.1	Materiál.....	35
4.1.1	Česnek kuchyňský – odrůda Tantal.....	35
4.2	Metodika .....	35
4.2.1	Příprava rostlinného materiálu – sterilizace.....	35
4.2.2	Příprava kultivačního média .....	36
4.3	Izolace meristémů .....	37
4.4	ELISA .....	40
5	Výsledky a diskuze .....	44
6	Závěr .....	49
7	Použité zdroje informací.....	50

## 1 Úvod

Česnek kuchyňský (*Allium sativum*) patří mezi nejstarší pěstované plodiny. Řadí se do čeledi *Alliaceae* (česnekovité), rod *Allium*. Česnek je využíván především jako zelenina, koření a v medicíně je považován za všestranný lék: má antibiotické, antibakteriální i antioxidační vlastnosti.

Česnek je diploidní rostlina, která je sterilní. Příčinnou sterility je absence semen, proto je množen pouze vegetativně pomocí stroužků nebo pacibulek. Tento způsob rozmnožování bývá problematický z hlediska přenosu chorob, zvláště těch virových. Dalším způsobem rozmnožování jsou meristémové kultury. Ty slouží ke klonovému množení, ozdravování plodin i okrasných rostlin. U česneku se meristémové kultury využívají převážně k ozdravování od virů. To je umožněno tím, že meristémové buňky rostliny jsou zcela, nebo téměř bez virů. Výsledkem meristémových kultur je rychlý nárůst rostlin, které jsou viruprosté a geneticky uniformní. Tato metoda množení a ozdravování je do určité míry velmi pracná a vyžaduje proškolené pracovníky i specializované pracoviště. Důvodem je velikost izolovaného meristému a zajištění sterilních podmínek po celou dobu manipulace. Pro ozdravení se používají meristémy o velikosti 0,3 – 1 mm, pro komerční klonování je velikost izolovaného meristému 1 – 10 mm.

Zpětné testování na přítomnost virů z meristémových kultur se provádí pomocí imunologické metody ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay), která je založená na detekci protilátek a antigenu. ELISA je velmi citlivou, přesnou a specifickou metodou. Testování je levné, nenáročné na vybavení a přípravu vzorku. Hlavní používanou modifikací této metody pro zjištění jednotlivých virů v rostlinném materiálu je přímá metoda DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich, tzv. dvojitá sendvičová ELISA). Výhodou této metody je rychlá a snadná detekce, u které nevádí kmenová specifita a nízká koncentrace virů ve vzorku

## 2 Literární část

### 2.1 Česnek kuchyňský (*Allium sativum*)

#### 2.1.1 Historie

Pravlastí česneku je označována oblast Střední Asie – Džungarsko (severní Čína), hory Pamíru, Altaje, Kirgizká step, ale i některé části Tadžikistanu a Uzbekistanu (Konvička 1998, Radilová 2016). Tuto oblast označil Vavilov (1935) jako prvotní genové centrum česneku, jako druhotné je označováno Středomoří a jako další uvádí kavkazskou oblast (Konvička 1998).

#### 2.1.2 Taxonomické zařazení Česneku kuchyňského

- Říše: *Plantae* - rostliny
- Oddělení: *Magnoliophyta* – krytosemenné
- Třída: *Liliopsida* – jednoděložné
- Řád: *Liliales* - česnekotvaré
- Čeleď: *Alliaceae* - česnekovité
- Rod: *Allium* – česnek
- Druh: *Allium sativum* L. – česnek kuchyňský

(Konvička 1998; Stavělková 2008)

Rod *Allium* se vyznačuje tvorbou cibule na zkrácené ose podpučí s trubkovitými (monofaciálními) nebo plochými (bifaciálními) čárkovitými listy. Květní lodyha je nízká, až 2 metry vysoká, zakončena lichookolíkem. Lodyha bývá dutá nebo plná hranatého, či kruhovitého tvaru. Stavba květu je pro rod *Allium* typická – 6 květních lístků, 6 tyčinek a polodlouhá čnělka. Plod má tvar trojhranné tobolky nesoucí 6 hranatých semen černé barvy. V květenstvích se mohou objevovat i pacibulky – ty mohou být genetického charakteru, vyvolány virózy, ale i projevem fyziologického kompenzačního mechanismu (Konvička 1998; Kodovská 2011).

Rod *Allium* čítá 700 druhů rostlin, avšak jen 5 druhů je světově rozšířeno a pěstováno jako zelenina. Mezi nejvýznamnější zástupce patří cibule kuchyňská se šalotkou (*A. cepa* L.), cibule sečka (*A. fistulosum* L.), pažitka (*A. schoenoprasum* L.), pór (*A. porrum*) a česnek kuchyňský (*A. sativum*). Česnek a cibule jsou řazeny také mezi léčivé rostliny (Konvička 1998).

## 2.2 Botanická charakteristika česneku

Hlavní orgány česneku jsou: kořen, podpučí, ploché listy, kolaterální pupeny, stonek a květenství.

Obr. 1: Rostlina česneku (Anonym 1)



Česnek tvoří svazčitý kořenový systém, jehož vzhled závisí na typu česneku, stádiu a rychlosti růstu, době výsadby, nárocích na vláhu, velikosti stroužku, stáří klonu, ekologických a genetických podmínkách (Konvička 1998).

Vegetační vrchol, též nazývaný jako pupen či puk, je útvar uvnitř stroužku. Je chráněný dužnatým zásobním listem. S pukem je spojeno podpučí – orgán, který je spleť pletiv a cévních svazků s návazností na kořenový systém. Anatomická stavba je složitá. Podpučí spojuje kořeny, listy a květní lodyhu. Tvoří se na něm kolaterální pupeny – ty se vyvíjí ve stroužky a květní lodyhu (Konvička 1998; Meredith 2008). Tvorba těchto dvou orgánů je důležitým znakem třídění do systematických jednotek (forem, variet) druhu *A. sativum*.

Česnek má 8 – 12 listů. Jejich počet závisí na velikosti vysazeného stroužku, velikosti puku, varietě a odrůdě. Délka listů bývá v rozmezí 20 – 50 centimetrů. Z vyvinutých stroužků se skládá dělená cibule, typická pro česnek. Zvláštní formou jsou cibule celistvé, tvořeny jedním stroužkem. Ty vznikají po výsadbě pacibulek nebo neverbalizovaných stroužků (Konvička 1998; Meredith 2008). Stroužky česneku jsou vyvinuté z kolaterálních pupenů na podpučí. Slouží jako zásobní a rozmnožovací orgány. Tvar a barva stroužků závisí na typu česneku a uložení stroužku v česneku. Hmotnost jednotlivých stroužků se pohybuje v rozmezí 0,5 – 30 gramů (Spálovský 2013).

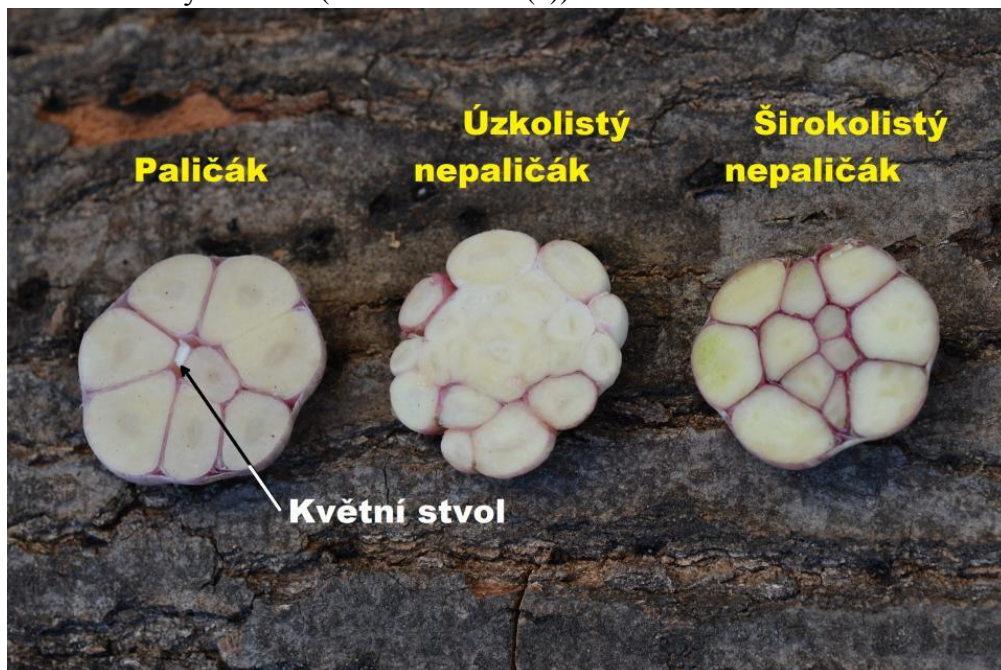
Květonosná lodyha se vyvíjí z terminálního hrbolku podpučí. Nese květenství – lichookolík, ze kterého vyrůstají stopkaté květy a květní pacibulky (Spálovský 2013). Květní pacibulky jsou vegetativní orgány, které ovšem neslouží k sexuálnímu rozmnožování, vznikají při selhání semenné reprodukce. Květy mají 6 tyčinek a 6 okvětních lístků, jsou dlouhé 4 – 6 milimetrů (Konvička 1998; Meredith 2008).

Základní rozdělení odrůd česneku kuchyňského (Malý, Petříková 2000):

- Nepaličáky úzkolisté – typ A. Jarní bílé česneky mají nejlepší skladovatelnost. Vysazují se na jaře, jejich výnos je průměrný. Patří sem odrůdy Dakar, Japo, Prim atd.

- Paličáky – typ H. Zimní modré česneky vytvářející na konci vegetace květní stvol s květenstvím. Paličáky se vysazují na podzim. Odrůdy tohoto typu se hůře skladují. V České republice se jedná např. o odrůdy Blatin, Dukát, Ropal atd.
- Nepaličáky širokolisté – typ U. Zimní bílé česneky nevytvářející květní stvol. Vysazují se na podzim. Mají vysoký výnos a velmi dobrou skladovatelnost. Patří sem odrůdy Alan, Lukan, Vladan atd.

Obr. 2: Odrůdy česneku (Foto: J. Kozák (a))



Dělení česneku podle Radilové (2016):

1. Z botanického hlediska

- Paličák – vytváří květní stvol s pacibulkami.
- Nepaličák – nevytváří pacibulky, protože nevybíhá do květního stvolu. Má větší výnosy a lépe se skladuje.

2. Podle barvy

- Bílé odrůdy – nejvíce pěstovaný typ. Jsou to odolné rostliny s pozdní sklizní. Stroužky mají příjemnou chuť i aroma.

- Růžové až fialové odrůdy – odrůdy s horší kvalitou a ranějším dozráváním. Špatně se skladují, a proto se musí zkonsumovat co nejdříve od doby sklizně.

## **2.3 Pěstování**

### **2.3.1 Nároky na půdu**

Česnek se doporučuje pěstovat na lehkých humózních půdách s dobrým fyziologickým stavem půdy a neutrálním nebo slabě alkalickým pH. Vyžaduje slunečná a teplá stanoviště chráněná před silným větrem (Radilová 2016). V osevním sledu následuje po raných plodinách, které vyžadují organické hnojení, např. okurky, tykve, košťáloviny a rané brambory (Malý, Petříková 2000). Z fytopatologického hlediska by neměl být vysazován na stejném pozemku dříve než za 4 roky. Při sadbě je nutno dbát na to, aby byla půda ulehlá a zároveň prokypřená (Konvička 1998).

### **2.3.2 Sadbový materiál**

K sadbě se používají stroužky uznané sadby, nejlépe kalibrované a roztříděné podle velikosti o hmotnosti 1,3 – 9 gramů. Většinou jsou stroužky mořené proti hád'átku zhoubnému (Konvička 1998; Malý, Petříková 2000).

Česnek typu A je považován za jarní formu. Je odolnější než typ U, při podzimní sadbě se přechodně mění na paličák. Je vhodný do sušších oblastí. Jeho nevýhodou je velká variabilita velikosti stroužků.

Česnek typu H (paličák) je považován za ozimou formu. Je vhodný do drsnějších klimatických podmínek. Nevýhodou je, že tvoří květní stonky a květní cibulky, které snižují výnos.

Česnek typu U je považován za ozimou formu. Je vhodný do oblastí s mírnějším klimatem, humózní půdou a možností zavlažování. Dává velké výnosy, ale v drsnějších podmínkách může vymrzat. Tento typ česneku je při skladování málo trvanlivý (Konvička 1998).

### 2.3.3 Sadba

Doba výsadby česneku se provádí od časného podzimu do jara. Záleží na zkušenostech, klimatických podmínkách a genetickém základu kultivaru.

Česnek se sází do hloubky 4 – 6 cm, ve vzdálenost stroužků v řádku 10 cm, řádky by měly být od sebe vzdálené 30 – 40 cm (Malý 2003). Od toho se odvíjí hustota porostu, která by měla být 20 – 100 rostlin na 1 m<sup>2</sup>, v našich podmínkách to bývá 30 – 40 rostlin na 1 m<sup>2</sup>. Podle hustoty porostu se odvíjí velikost sklizených stroužků (Konvička 1998).

Po výsadbě je potřeba řádky s česnekem uválet (Malý 2003). Během růstu je nutné dbát na bezplevelný stav porostu, udržování kypré půdy, zavlažování a kontrolu zdravotního stavu rostlin (Radilová 2016). Jednou z možností jak pečovat o rostliny během jejich růstu je i mulčování. To se provádí za účelem ochrany rostlin, úpravy mikroklimatu a šetření vláhou. Mulčování se provádí od podzimu do sklizně a používají se netkané textilie, fólie nebo substráty rašeliny a slámy (Konvička 1998).

Česnek je rostlina náročnější na hnojení, zvláště při podzimní výsadbě, kdy jsou minerální látky lépe přijímány a zvyšují ochranu proti mrazuvzdornosti. Hlavní používaná hnojiva jsou dusíkatá, draselná a fosforečná. Množství závisí na druhu půdy – např. v lehkých půdách je přibližná spotřeba čistých živin na 1 ha 100 kg dusíku, 100 kg draslíku a 30 kg fosforu (Konvička 1998).

### 2.3.4 Sklizeň

Sklizeň se má provádět za sucha a rychle. Na malých plochách se provádí ručně. Velké plochy vyžadují použití speciálních sklízecích strojů nebo bramborových vyorávačů. Nejranější česneky uzrávají od konce června do poloviny července (šírokolisté U typy). A typy uzrávají v polovině srpna (Konvička 1998).



U nepaličáků (typ A a U) se úplná zralost určuje poměrně snadno – česneková nať ztrácí podporu stonku a padá k zemi. Signálem pro sklizeň je i žloutnutí listů (Malý, Petříková 2000). U paličáků (typ H) není zrání tak výrazné, protože listy mají podporu květního stonku a nať nepoléhá. Signálem pro sklizeň jsou poslední 3 – 4 zelené horní listy.

Česnek se nechává doschnout ve speciálních větratelných místnostech a dobrou cirkulací vzduchu (Malý, Petříková 2000).

### **2.3.5 Skladování**

Česnek určený pro skladování musí být zralý, zbaven nečistot a kořenů a zdravotně nezávadný (Malý, Petříková 2000). Cibule mají být čisté, stejnoměrné a pevné s hladkým povrchem beze skvrn. Zbavení se kořenů je důležitým krokem, protože kořeny snadno nasávají vzdušnou vlhkost a mohou být úkrytem pro parazity i zdrojem infekce pro choroby (Harris 1997; Konvička 1998). Skladovat by se měl na chladnějším místě, kde může proudit vzduch (Radilová 2016). Jako nejvhodnější podmínky pro skladování je skladování v přepravech v tmavých místnostech s 0°C a 75% vlhkostí (Malý, Petříková 2000). Během skladování je potřeba kontrolovat zdravotní stav rostlin, zda cibule neměknou a netrouchní.

## **2.4 Obsahové látky česneku**

### **2.4.1 Sirné látky**

Sirné látky patří mezi komplex léčebných látek česneku. Jejich charakteristikou je, že jsou nestálé a jsou původci typického pachu (Linditsch 1998).

#### **2.4.1.1 Alliin**

Alliin je výchozí stavební látkou sirných vazeb česneku. Tvoří svazky jemných bílých a nepáchnoucích jehliček. Je dobře rozpustný ve vodě, nikoli v organických rozpouštědlech (Kodovská 2011; Singh, Singh 2008). Bylo dokázáno,

že má dva homology. Jeho frakce cysteinsulfoxid je složena z alliinů +85%, S-methyl-L-cysteinsulfoxidu +13% a S-propyl-L-cysteinsulfoxidu +2%. Všechny tyto látky jsou rozkládány enzymem alliinázou (Konvička 1998).

#### **2.4.1.2 Allicin**

Allicin (allyl-S(O)-S-allyl) se jako takový v česneku nenalézá (Kabelík 1970). Vzniká působením enzymu alliinázy z alliinů (Konvička 1998). Allicin byl označen za hlavní léčebnou látku česneku. Jedná se o velmi nestabilní, slabě nažloutlou olejovitou tekutinu (Kabelík 1970). Má česnekovitý zápach a štiplavou chuť. Opticky je neaktivní, rozpustná v organických rozpouštědlech a slabě rozpustná ve vodě při 10 °C (Kabelík 1970; Singh, Singh 2008). Je nositelem antibiotických a účinných vlastností česneku. Jeho antibiotická účinnost závisí na přítomnosti kyslíku – redukcí se značně inaktivuje (Konvička 1998).

#### **2.4.1.3 Allithiamin**

Allithiamin je zlepšený vitamín B1 – vstřebává se a vylučuje močí rychleji než thiamin. Je to stálá krystalická látka, která je málo rozpustná ve vodě a dobře rozpustná v metanolu a etanolu. Má česnekové aroma a chutná hořce. Tvorba allithiaminu závisí na pH a teplotě. Optimální pH je 8 a optimální teplota je 65 °C (Konvička 1998).

#### **2.4.1.4 Di- a polysulfidy**

Tyto sirné látky vznikají v česneku při přeměně alliinů na allicin. Mají nepříjemné organoleptické vlastnosti a způsobují zápach česneku. V česnekové silici se nacházejí tyto sirné látky: merkaptany, oxid siřičitý, monosulfidy, oligosulfidy, thiosulfináty a jejich deriváty (Konvička 1998).

### **2.4.2 Látky bez síry**

Obsah bezsírnych látek v česneku je často variabilní. Jsou to látky stabilní povahy působící vcelku.

#### 2.4.2.1 Vitamíny

Vitamíny jsou důležité pro správnou funkci lidského těla. Podílejí se na látkové výměně v důležitých lidských orgánech. Jsou nezbytnou součástí lidského jídelníčku, protože některé si nedokážeme sami vytvořit, a proto je musíme přijímat v potravě. Působí proti nechutenství, únavě, špatné viditelnosti, depresím, náchylnostem k infekcím a mnoho dalšího (Linditsch 1998; Butt, Sultan 2009).

Seznam nejvýznamnějších vitamínů s jejich obsahem v česneku je popsán v tabulce 1.

Tab. 1: Obsah vitamínů v čerstvém česneku v mg / 100g (Konvička 1998)

Vitamín	Mg
Vitamín A (retinol)	0,085
Vitamín B1 (thiamin)	0,003 - 0,28
Vitamín B3 (kys. nikotinová - PP faktor)	0,12 – 4
Vitamín B5 (kys. panthotenová)	0,25
Vitamín B6 (pyridoxin)	0,03 - 0,08
Vitamín C (kys. askorbová)	0,03 - 66,5
Vitamín E (tokoferol)	0,1
Vitamín H (biotin)	0,00022

#### 2.4.2.2 Adenosin

V česneku a cibuli kuchyňské se adenosin nachází ve velkém množství. Má příznivý vliv na krevní tlak, na periferní prokrvení a brzdí agregaci trombocytů (Linditsch 1998). Je to také základní látka pro důležité přenašečí substance tzv. „biologic transmitter“ (Konvička 1998).

#### **2.4.2.3 Bezsrná antibiotika garlicin a allistatin**

Garlicin je silně antibiotická látka tuhé povahy. Je dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, ale málo ve vodě (Kabelík 1970). Neobsahuje síru ani kov a tvoří slabě kyselě reagující roztok (Konvička 1998).

Allistatin má silný antibiotický účinek vůči *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Ve vodě je nerozpustný (Konvička 1998).

#### **2.4.2.4 Enzymy**

Mezi enzymy, které obsahuje česnek, patří hlavně alliináza, argináza, myrosináza, peroxidáza, desoxyribonukleáza aj (Konvička 1998).

Alliináza je vysoce specifický enzym. Přeměňuje pouze alliin na allicin. Enzym fenylalanin-ammoniaklyáza se podílí na tvorbě aromatických látek (Feldberg a kol. 1998; Jones 2004). Peroxidáza se podílí na změně barvy a ztrátě účinnosti sušeného česneku.

#### **2.4.3 Ostatní látky**

V česneku jsou obsaženy všechny esenciální aminokyseliny (Kodovská 2011). Největší zastoupení má aminokyselina arginin, jejíž obsah se pohybuje mezi 4,5 – 5,95 mg v 1 gramu sušiny česneku (Konvička 1998).

Minerální látky a stopové prvky jsou v česneku bohatě zastoupeny. Nejvyšší obsah je zaznamenán u draslíku, mědi, molybdenu, germania a selenu (Kodovská 2011). Mezi živinami obsahuje právě česnek nejvíce selenu. Česnek dovede selen hromadit – tím se koncentrace selenu v česneku může zvýšit o více než stonásobek v přirozeném stavu (Konvička 1998).

Česneková silice způsobuje typický pach česneku. Vzniká rozdrčením česnekové tkáně, fermentací prekursoru – allinu (Kabelík 1970). Silice je složena

z diallyldisulfidu, diallyltrisulfidu, allylpropyldisulfidu a diallyltetrasulfidu (Konvička 1998). Silice je toxická, silně dráždí kůži a zanechává nekrózy (Kabelík 1970). Má antibakteriální účinek vůči hnilobným mikrobům. Omezení zápachu lze docílit vysokou teplotou nebo alkoholem, kdy dochází k blokaci allinázy (Konvička 1998).

## **2.5 Léčivé vlastnosti česneku**

Česnek je považován za všestranný lék. Nejvíce účinných látek si zachovává při použití za syrova. Působí především jako antibiotikum zastavující růst a ničící bakterie či jiné druhy mikroorganismů. Antibakteriální účinek u česneku je prokázán v podmínkách *in vitro* i *in vivo*. Nejvýznamnější sloučeninou s antibakteriálními účinky je allicin, sirná sloučenina, která je nestálá. Významné antibiotikum, které neobsahuje síru, a proto je stabilní je garlicin (Egbobor 2007; Konvička 1998).

Významnou vlastností česneku je také antioxidační vlastnost proti látkám, které produkují živé organismy, bakterie a houby (Adeshina 2011; Egbobor 2007). Dále má příznivé účinky na zažívání, kde se využívá jako žaludeční lék povzbuzující chuť k jídlu. Působí proti kornatění tepen, arterioskleróze, revmatickým a nervovým bolestem. Má protirakovinné účinky a využívá se k léčení srdečních onemocnění (Syviam 2001). Snižuje krevní tlak a obsah cholesterolu v krvi. V neposlední řadě také působí jako repelent odpuzující hmyz, vermifugum vypuzující parazity a jako antihelmintikum proti onemocněním vyvolaným cizopasnými červy (Konvička 1998; Linditsch 1998; Radilová 2016).

## **2.6 Choroby**

### **2.6.1 Virózy**

Virózy patří mezi nejobávanější choroby česneku. Přenášejí se sadbou, mšicemi i jiným savým hmyzem. Příznaky viróz, které se vyskytují na území České republiky: žluté pruhované listy, zakrslost rostlin, deformace stonku, prorůstání

stroužků, degenerativní jevy na nati, řada nepopsaných jevů virového původu a menší velikost sklizených cibulí (Konvička 1998).

Obr. 3: Příklad virózy u česneku (Foto: J. Kozák (d))



Nejsledovanějším virovým onemocněním česneku je žlutá zakrslost cibule (Onion Yellow Dwarf Virus – OYDV) patřící do rodu *Potyvirus* (Bereda a kol. 2015). Napadená rostlina má žluté pruhy na listech, které později přecházejí v kompletní žloutnutí. Listy se kudrnatí, dochází k zakrnění celé rostliny a snížení výnosu (Arya a kol. 2006). Virus je přenášen mšicemi (Arya a kol. 2006). Ochranou proti šíření této virózy je likvidace napadených rostlin a nepoužívání napadených rostlin k sadbě (Šedivý 1997).

LYSV – Leek Yellow Stripe Virus patří do rodu *Potyvirus*. Napadá především pórek, ale i jiné druhy rodu *Allium*, jako je například česnek. Způsobuje žluté skvrny až pruhy na listech. Postižené rostliny jsou menší a lehčí než zdravé rostliny (Lot a kol. 1998). U česneku se příznaky liší podle kultivaru infikované

rostliny (Anonym 4). Virus je přenášen mšicemi (Anonym 3; Conci a kol. 2002). Ochrana spočívá především v použití zdravé sadby (Dijk 1994).

Jedním ze zkoumaných virů rodu *Carlavirus* je GCLV (Garlic Common Latent Virus). Tento virus byl poprvé detekován a popsán v roce 1981 ve Francii (Delecolle, Lot 1981). Společně s virem rodu *Potyvirus* (OYDV,LYSV) způsobuje na česneku žloutnutí a mozaiku (Pramesh, Baranwal Virendra 2013). Přenáší se mechanicky, nebo hmyzem. Běžně se vyskytuje i v rostlinách, které na první pohled vypadají zdravě (Šutić a kol. 1999).

Shallot latent virus (SLV) patří společně s OYDV, GCLV a LYSV ke zkoumaným virům v česneku. Virus se přenáší mšicemi a způsobuje chlorotické až bílé pruhy na listech, v některých případech až odumření celé rostliny (Anonym 5; Majumder a kol. 2008).

Virus proužkovitosti (Garlic Mosaic Virus) je časté onemocnění vyskytující se u česneku. Příznaky poškozené rostliny jsou světle zelené až žluté proužky na listech. Způsobuje až poloviční ztráty na výnosu. Virus přežívá ve stroužcích česneku. Ochanou proti proužkovitosti je nepoužívat k sadbě stroužky z napadené rostliny a pravidelná likvidace napadených rostlin během vegetace (Šedivý 1997).

Mezi virové onemocnění se řadí i rickettsie, která se podílí na pylové sterilitě i semenné neplodnosti česneku. Způsobuje poruchy cévního systému v podpučí a květenství. Choroba se rychle šíří, proto je nutné napadené rostliny spálit (Konvička 1998).

### **2.6.2 Bakteriózy**

U česneku se bakteriózy vyskytují zřídka. Jedná se hlavně o měkkou hnilobu, jejímž původcem je *Erwinia carotovora*. Ta vniká do rostliny krčkem nebo poškozenými místy. Choroba se šíří za deštivého a teplého počasí (Konvička 1998).

### 2.6.3 Mykózy

Mezi nejzávadnější houbové původce choroby česneku patří houby rodu *Sclerotium*, *Fusarium*, *Penicilium*, *Botrytis* a řada dalších (Šedivý 1997). Vyskytují se zejména ve vlhkých skládkách, kde se rychle šíří a způsobují ztrouchnivění (Konvička 1998).

*Sclerotium cepivorum* je bílá sklerociová hniloba napadající především cibuli kuchyňskou, ale parazitující i na česneku (Kazda a kol. 2003). Příznaky napadení jsou viditelné až při sklizni a uskladnění. V oblasti podpučí se tvoří bělavé mycelium, které se šíří mezi jednotlivé stroužky (Konvička 1998; Kazda a kol. 2003). Stroužky v důsledku napadení hnijí, hnědou a usychají.

Různé druhy rodu *Fusarium* napadají celou škálu rostlin. Jeho projevem na česneku je povrchové hnědnutí napadených míst s postupným šířením dovnitř stroužků (Konvička 1998). Na povrchu stroužků a v podpučí se vyskytuje světlé až narůžovělé mycelium (Kazda a kol. 2003). Choroba se může projevit už v porostu žloutnutím listů, ztrátou chlorofylu a pozvolným odumírání celé rostliny (Kazda a kol. 2003). Zdrojem nákazy je zamořená půda a nakažená sadba.

*Penicilium* je zelená až modrá plíseň, která sekundárně napadá mechanicky poškozené stroužky (Konvička 1998). *Botrytis allii* je původce šedé krčkové hniloby v oblasti přechodu rostliny z půdy (Kazda a kol. 2003).

## 2.7 Škůdci

### 2.7.1 Hád'átko zhoubné (*Ditylenchus dipsaci*)

Hád'átko zhoubné patří mezi rozšířené a nebezpečné karanténní škůdce česneku. Červ parazitující na česneku je 1,5 – 4 mm dlouhý a 0,04 – 0,8 mm tlustý (Konvička 1998; Sapáková a kol. 2014). Vyskytuje se a rozmnožuje téměř na celé rostlině. Napadení se projevuje na listech světle žlutými pruhy, které postupně žloutnou celé a usychají (Kazda a kol. 2003). Rostliny lze snadno vytáhnout ze země, kvůli porušenému podpučí a kořenovému systému. Mladé napadené rostlinky



zakrňují. Cibule jsou vlhké a silně páchnou po česneku, což se u zdravých rostlin normálně neděje. Slupka je popraskaná, při sklizni dochází k rozpadu cibule na jednotlivé stroužky (Konvička 1998).

Škůdce přezimuje v rozpadlých cibulích i půdě (Kazda a kol. 2003). Po výsadbě proniká do stroužků, kde klade vajíčka a tím se celý cyklus opakuje. Jeho šíření probíhá většinou ve vlhkých a těžších půdách (Konvička 1998). Bojem proti háďátku je moření stroužků před sadbou a dodržování osevného postupu – česnek by v osevním postupu neměl následovat po sobě dříve než za 3 – 4 roky (Konvička 1998; Malý, Petříková 2000). Při sklizni je také nutno odstranit všechny napadené rostliny a spálit zbytky z čištění. Napadené rostliny se hůře skladují.

### 2.7.2 Houbomilka česneková (*Suillia lurida*)

Houbomilka česneková klade perleťově bílá vajíčka. Je to štíhlá, asi 8 mm dlouhá moucha hnědožluté barvy (Kazda a kol. 2003). Její larvy jsou 11 mm dlouhé, bělavé barvy. Přezimuje na povrchu porostu, vajíčka začíná klást v prvních teplejších dnech od února do konce dubna (Konvička 1998). Rostliny jsou ničeny larvami, které vyžírají báze listů. Jako ochrana se používají postřiky, případně přikrytí povrchu porostu netkanou textilií (Malý, Petříková 2000).

Obr. 4: Napadení česneku houbomilkou česnekovou (Foto: J. Kozák (c))



### **2.7.3 Molík česnekový (*Acrolepiopsis assectella*)**

Molík česnekový je motýl s rozpětím křídel 12 – 14 mm, larva je šedo zelená housenka velká 6 – 8 mm (Sapáková a kol. 2014). Samičky kladou vajíčka na spodní stranu listu. Vylíhlá housenka nejprve požívá vnější stranu listu, poté pronikne dovnitř. Tím způsobí lámání a odumírání rostliny. Typickým příznakem napadení je drť v listech. Molík přežívá ve stádiu motýla nebo nevylihnutých kukel. Ochranou je insekticidní postřik (Kazda a kol. 2003).

### **2.7.4 Roztoč (*Rhizoglyphus echinopus*)**

Roztoč je typický skládkový škůdce. Je viditelný pod lupou, velikost samičky je 0,5 – 1,1 mm a samečka 0,45 – 0,72 mm (Sapáková a kol. 2014). Dospělci jsou hnědí „brouci“, kteří se rychle pohybují. Larvy jsou bílé a parazitují v podpučí a na mladých kořenech rostliny (Konvička 1998). Vyžíráním bází rozrušuje mateřské i dceřiné podpučí.

### **2.7.5 Květilka cibulová (*Delia antiqua*)**

Květilka cibulová je malá moucha, která klade vajíčka na stonky rostlin v přechodné části povrchu půdy (Konvička 1998). Po vylíhnutí se larvy zavrtávají do stonku, cibule, stroužků a rozrušují pletiva (Kazda a kol. 2003). Doporučená ochrana je asanace zbytků rostlin a čerstvé mrvy, která láká květilku ke kladení vajíček. Také lze použít i dosti účinné thiofosfátové systemické preparáty v době kladení vajíček (Konvička 1998). Využívá se i moření sadby.

### **2.7.6 Třásněnky (*Thrips tabaci*)**

Třásněnky jsou asi 1 mm dlouhý hmyz s třásněmi na křídlech, jejichž larvy jsou bělavě žluté (Kazda a kol. 2003). Vyskytují se v květenstvích, kde ničí povrchová pletiva květních částí, z nichž vysávají buňky. Napadená místa jsou bělavá až žlutá a vysychají. Při napadení je vývoj květních částí zbrzděn. Prašníky se smršťují a vývoj pylu je blokován (Konvička 1998).

## 2.8 Klonové množení *in vitro*

Využívané techniky množení v *in vitro* podmínkách (Jha online; Čurn 1995):

- Mikropropagace – regenerace rostlin *in vitro* z kultivovaných meristémů
- Somatická embryogeneze
- Organogeneze – adventivní pupenotvorba

Klonové množení *in vitro* slouží k nepohlavnímu rozmnožování rostlin (Raj online). Potomstvo je genotypově i fenotypově uniformní, to však neplatí u organogeneze (Čurn 1995). U druhů, které nevytvářejí generativní orgány, se jedná o jediný způsob množení. Zároveň tento typ rozmnožování slouží k uchování genotypové a fenotypové uniformity pro účely pěstování a šlechtění i u druhů množících se generativně. Množení rostlin touto metodou je rychlejší oproti klasickému způsobu (Arditti 2009; Jha online). Koeficient klonového množení se pohybuje mezi  $10^3$  až  $10^9$  rostlin s možností ozdravení od patogenů (Novák 1990; Čurn 1995). Ozdravení od patogenů je založeno na předpokladu, že viry neinfikují meristemické pletivo, tudíž izolované vrcholy používané ke kultivaci jsou viruprosté (Novák 1990).

Hlavní výhodou klonového množení je použití takových orgánů rostliny k množení, které se v klasickém šlechtění nepoužívají. Další výhody klonového množení oproti klasickým metodám jsou (Novák 1990):

- Menší části rostlin potřebných k množení
- Umělé, axenické a řízené prostředí
- Heterotrofní charakter růstu a vývoje
- Rychlejší rozmnožování rostlin

Rozmnožování v podmínkách *in vitro* probíhá indukcí axilárních meristémů při kultivaci izolovaných vrcholů, tvorbou adventivních meristémů a pupenů při kultivaci orgánů nebo jejich částí a diferenciací rostlin procesem organogeneze nebo somatické embryogeneze v podmínkách kalusových a buněčných kultur (Jha online; Novák 1990).

Murashige (1978a, 1978b) rozdělil množení v podmínkách *in vitro* do čtyř stádií, které bylo Deberghem a Maenem (1981) doplněno o stádium 0, které zahrnuje přípravu výchozích rostlin v „hygienických“ podmínkách před odběrem explantátů (Novák 1990). Čtyři stádia množení v *in vitro* podmínkách podle Murashige jsou:

- Založení aseptické kultury
- Zmnožení propagačních jednotek
- Příprava pro převedení rostlin do půdy
- Dopěstování rostlin v půdě

### 2.8.1 Meristémy rostliny

Meristém rostliny je definován jako struktura tvořená buňkami, které jsou schopné dělení a postupné diferenciaci (Henderson a kol. 1967; Novák 1990). Dělení meristémů probíhá organizovaně, vznikají stejné buňky (Grout 1990). Neorganizovaným dělením buněk se tvoří tzv. kalusy, které vznikají např. při hojení ran.

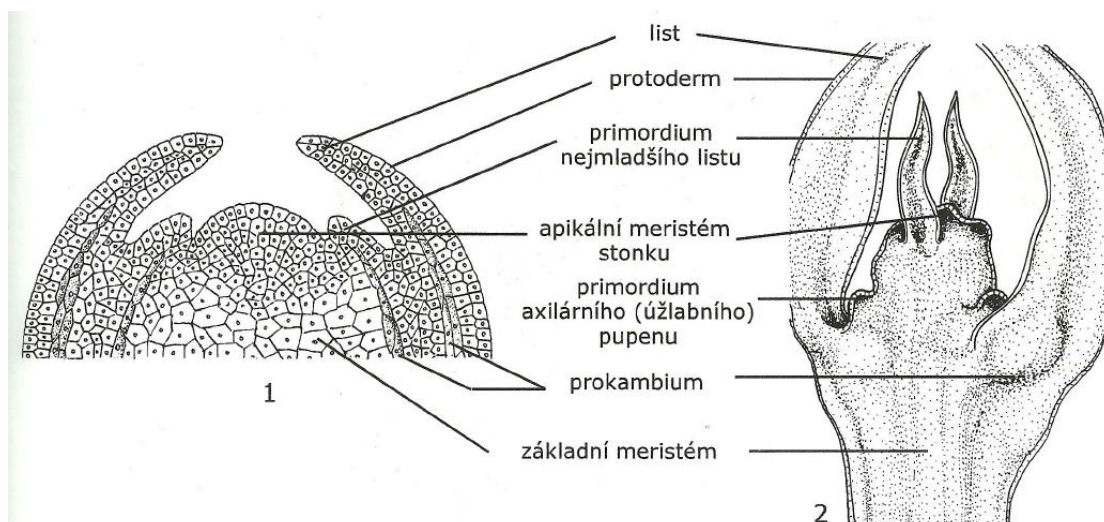
Opakovaně se dělící buňky v meristémech se nazývají iniciály. Iniciály se dělí na dvě dceřiné buňky, z nichž si jedna zachová funkci iniciály a z druhé se stane derivát – odvozená buňka iniciály. Derivát se zpravidla dělí v blízkosti vzrostného vrcholu a kořenové špičky pouze při probíhající diferenciaci. To znamená, že se derivát dělí pouze omezenou dobu a po skončení diferenciaci se přeměňuje na buňky trvalých pletiv (Skalický, Novák 2007).

Buňky meristemických pletiv jsou popsány jako jednoduché tenkostěnné parenchymatické buňky s velkými jádry a hustou cytoplazmou, jejichž jediná funkce je neustálé dělení (Skalický, Novák 2007).

V roce 1990 rozdělil Novák meristémy na dva druhy – apikální a vzrostný (vrcholový). O pár let později byly meristémy rozděleny na tři druhy – apikální, laterální a interkalární (Skalický, Novák 2007).

- a) Apikální meristém se nachází ve špičkách všech kořenů a stonků. Je tvořen skupinou iniciál a nehomogenních derivátů iniciál, které se liší rychlostí dělením, obsahem buněk apod. U cévnatých výtrusů rostlin je na vzrostném vrcholu stonku jedna velká iniciála jehlancovitého tvaru. U semenných rostlin jsou na vzrostném vrcholu stonku skupiny iniciál, z nichž se diferencují primární meristémy: protoderm (produkuje pokožku), základní meristém (produkuje hypodermis a základní pletivo) a prokambium (vodivé pletivo).
- b) Laterální meristémy jsou meristémy sekundárního růstu neboli druhotného tloušťnutí rostlinných orgánů. Vyskytuje se proto jen u rostlin, kde existuje tento typ růstu. Laterální meristémy produkují druhotná (sekundární) pletiva.
- c) Interkalární meristémy (vmezeřené). Existence těchto meristémů je podmíněna nestejným průběhem diferenciací buněk oddělovaných apikálními meristémy. Výsledkem je, že mezi již diferenciovanými oblastmi zůstávají i oblasti, které ještě diferenciací neprošly. Nejznámějším příkladem jsou stébla trav (*Poaceae*), kde se pletiva uzlin diferencují dříve než pletiva článků. Interkalární meristémy jsou derivátem apikálního meristému, od něhož jsou odděleny zónami trvalých buněk.

Obr. 5: Apikální meristémy prýtu: 1 – detail vzrostného vrcholu; 2 – podélný řez vzrostným vrcholem prýtu u šeríku obecného (Skalický, Novák 2007)



## 2.8.2 Meristémové kultury

Kultury meristémů jsou nejvíce používanou praktickou aplikací z explantátových kultur. Využívají se ke klonovému množení, ozdravování plodin i okrasných rostlin (Rakouský 2000; Salomon 2002). Ozdravování je zaměřeno nejčastěji na eliminaci virů, předpokládá se, že viry neinfikují meristemické pletivo (Paz, Soto 2012). U česneku se využívají meristémové kultury pro eliminaci viru mozaiky česneku a k rozšiřování genetické variability (Čurn 1995; Rakouský 2000).

Pro růst izolovaných meristémů se používají kultivační média. Nejčastěji používané je médium Murashige a Skoog (MS) obohacené o vitamíny a fytohormony (Jha online; Novák 1990). Velikost explantátu určeného pro ozdravení je 0,3 – 1 mm, velikost explantátu pro komerční klonování je 1 – 10 mm (Rakouský 2000; Paz, Soto 2012). V praxi se používá zásada „čím menší meristém, tím je větší šance získat viruprostou rostlinu“ (Rakouský 2000). Izolace malých meristémů bývá spojena se složitější izolací i regenerací, většinou vyžaduje práci vyškoleného personálu. Samotná kultivace vyzolovaných meristémů probíhá na agarovém médiu (Novák 1990).

Fytohormony ovlivňující růst meristémových kultur:

- a) Auxiny – fytohormony podporující řadu vlastností během vývoje rostliny, např. dloužení buněk, diferenciaci vodivých pletiv a iniciaci kořene (Rakouský 2000). Spolu s cytokininy se auxiny podílejí na buněčném dělení a růstu některých orgánů. Auxiny se v rostlině transportují z buňky do buňky ve směru ze stonku do kořenů (Buchanan a kol. 2015; Rakouský 2000).

Přirozeným auxinem u rostlin je kyselina  $\beta$ -indolyl-3-octová (IAA). Vyskytuje se v aktivní (volné) formě i konjugovaná s cukry, peptidy a aminokyselinami (Rakouský 2000). Dalšími auxiny, které byly nalezeny v rostlinách jsou: kyselina indolyl-3-máselná (IBA), kyselina fenyloctová a 4chloro IAA (Buchanan a kol. 2015; Rakouský 2000).

- b) Cytokininy – podporují růst laterálních pupenů, morfogenezi *in vitro* i tvorbu chloroplastů (Rakouský 2000). Cytokininy se v rostlině transportují prostřednictvím xylému z kořenů do stonků. Nejčastěji se vyskytujícím přirozeným cytokininem je zeatin (4-hydroxy-3-metyl-trans-butenylaminopurin) (Buchanan a kol. 2015).

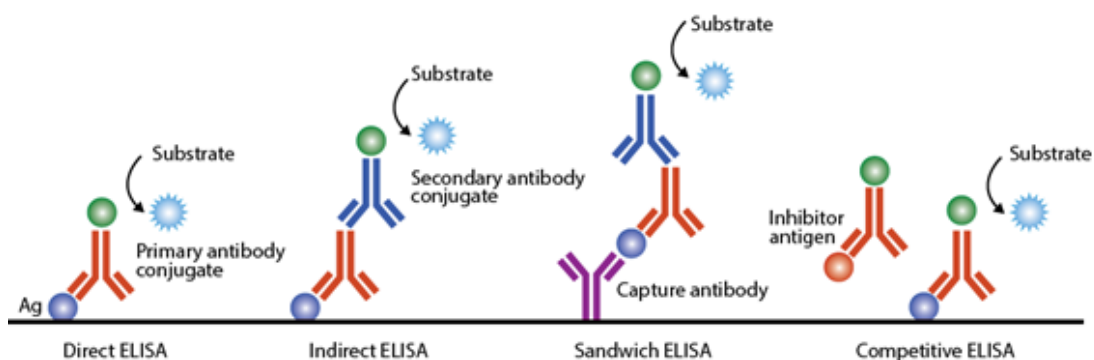
## 2.9 ELISA

ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay), známá také jako EIA (Enzyme Immunoassay) je nejpoužívanější imunologická metoda sloužící k detekci protilátek a antigenu. Tato metoda byla poprvé objevena v roce 1971 (Engvall, Perlmann 1971), avšak v rostlinné virologii byla poprvé použita až v roce 1976 pro detekci virů Arabis Mosaic Virus a Plum Pox Virus (Voller a kol. 1976). Principem této metody je navázání virově specifických protilátek (imunoglobulinů) na kovalentně vázaný enzym, ten degraduje chromogenní substrát za tvorby viditelného zbarvení. Výsledek se stanovuje pomocí spektrofotometru jako absorbance při vlnové délce odpovídající použitému substrátu. ELISA je velmi citlivá metoda, dokáže detekovat viry o koncentraci 1 – 10 ng/ml (Bos 1999).

ELISA má mnoho modifikací, které jsou primárně rozděleny na přímé a nepřímé metody.

- Nepřímé metody slouží pro detekci specifických protilátek. Virus je nejdříve navázán specifickými protilátkami a detekován enzymem navázaným na sekundární protilátky (Anonym 2, 2015). Hlavní výhodou těchto metod je předcházení vzniku nespecifických reakcí.
- Přímé metody slouží pro detekci antigenu. Virus je detekován přímo enzymem navázaným na specifické protilátky viru (Anonym 2, 2015). Mezi přímé metody patří DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich, tzv. dvojitá sendvičová ELISA), která slouží pro zjištění přítomnosti jednotlivých virů v rostlinném materiálu.

Obr. 6: ELISA metody (Anonym 2)



### 2.9.1 DAS-ELISA

DAS-ELISA je metoda využívaná pro rychlou a snadnou detekci virů v rostlinném materiálu, kde nevadí kmenová specifita a nízká koncentrace viru ve vzorku (Koenig, Paul 1982). Využívá se schopnosti proteinů (imunoglobulinů) vázat se na sorbční povrch mikrotitrační polystyrenové či polyvinylové destičky. Tato schopnost umožní zachycení a imobilizaci virů (Pathak, Palan 2005). Tím vznikne komplex vir – protilátka, ke kterému se přidají další specifické protilátky, které mají navázaný enzym (Clark, Adams 1977). Nejčastěji používaným enzymem je alkalická fosfatáza, která hydrolyzuje přidaný 4-nitrofenyl fosfát (bezbarvý substrát) na 4-nitrofenol (žluté zbarvení). Přítomnost viru se poté detekuje pomocí spektrofotometru při 405 nm jako intenzita žlutého zbarvení. Důležitým krokem



před každou částí metody je vymytí volných reaktantů z jamek, aby nedocházelo ke specifickým reakcím (Clark, Adams, 1977).

### **3 Cíle práce**

- 1. Izolace meristému z česneku kuchyňského (*Allium sativum*)**
- 2. Dopěstování rostliny z meristémové kultury**
- 3. Zjištění přítomnosti virů v použitém materiálu pomocí metody ELISA**

## **4 Materiál a metodika**

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Česnek kuchyňský – odrůda Tantal**

Tantal je odrůda modrého paličáku. Je vhodný k pěstování v méně příznivých podmínkách. Byl vyšlechtěn výběrem klonů z krajové odrůdy Rožďalovický paličák s následnou kultivací *in vitro* a selekcí viruprostých regenerantů. Odrůda byla registrována v roce 1998.

Česnek je středně vysoký se vzpřímenými až polovzpřímenými listy. Listy jsou silně ojíněné, modré barvy. Květní stvol má velké pacibulky, jejichž počet je nízký. Velká cibule je smetanové barvy s fialovými skvrnami, obvykle obsahuje šest stroužků. Stroužky jsou veliké, široké a mají fialové suknice.

Tantal je prostý od viru žluté proužkovitosti cibule (není však proti němu odolný), zvýšenou odolnost má proti houbovým chorobám a vymrzání. Má velmi dobrou skladovatelnost. ([www.tagro.cz](http://www.tagro.cz), online 15. 3. 2017)

### **4.2 Metodika**

#### **4.2.1 Příprava rostlinného materiálu – sterilizace**

Cibule česneku byla rozebrána na jednotlivé stroužky. Ty byly následně oloupany a umyty ve sterilní vodě se saponátem (použit byl přípravek značky Jar). Poté byly jednotlivé stroužky umístěny do 0,2% roztoku chloridu rtuťnatého po dobu 18 minut. Konečným krokem sterilizace bylo přenesení stroužků česneku do sterilní vody po dobu 10 minut za občasného míchání. Tento krok byl opakován 3x, pokaždé bylo nutno vyměnit vodu za novou.

#### 4.2.2 Příprava kultivačního média

Pro kultivaci česneku bylo použito MS médium obohacené o vitamíny. Stejně médium, ke kterému byly přidány fytohormony bylo použito i při kultivaci meristémů česneku. Použitými fytohormony byla kyselina  $\beta$ -indolyl-3-octová (IAA), 6benzylaminopurin (BAP) a kyselina 1-naftyloctová (NAA). Fytohormony byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěním v 1 molárním hydroxidu sodném (1M NaOH).

Každému médiu bylo po smíchání příslušných látek upraveno pH na hodnotu 5,8. Při nízké hodnotě pH byl přidán 1M NaOH, při vysoké koncentraci byla přidána 1M HCl. Obě kultivační média byla vysterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C, tlaku 101,5 kPa po dobu 30 minut. Po sterilizaci a vychladnutí byla média skladována v chladničce při 4 °C.

Tab. 2: Chemické složení MS média obohacené o vitamíny (M0222.0010) od firmy Duchefa (Murashige, Skoog 1962)

Složka	mg/l
<b>Mikroelementy</b>	
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,20
KI	0,83
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	16,90
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8,60
<b>Makroelementy</b>	
CaCl <sub>2</sub>	332,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,00
KNO <sub>3</sub>	1900,00
MgSO <sub>4</sub>	180,54
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,00

<b>Vitamíny</b>	
Glycine	2,00
Myo-inositol	100,000
Nicotinic acid	0,50
Pyridoxine HCl	0,50
Thiamine HCl	0,10

Tab. 3: Množství fytohormonů přidaných do kultivačního média

<b>Fytohormon</b>	<b>ml/500ml</b>
IAA	0,25
BAP	0,25
NAA	0,05

Tab. 4: Výsledné složení kultivačního média

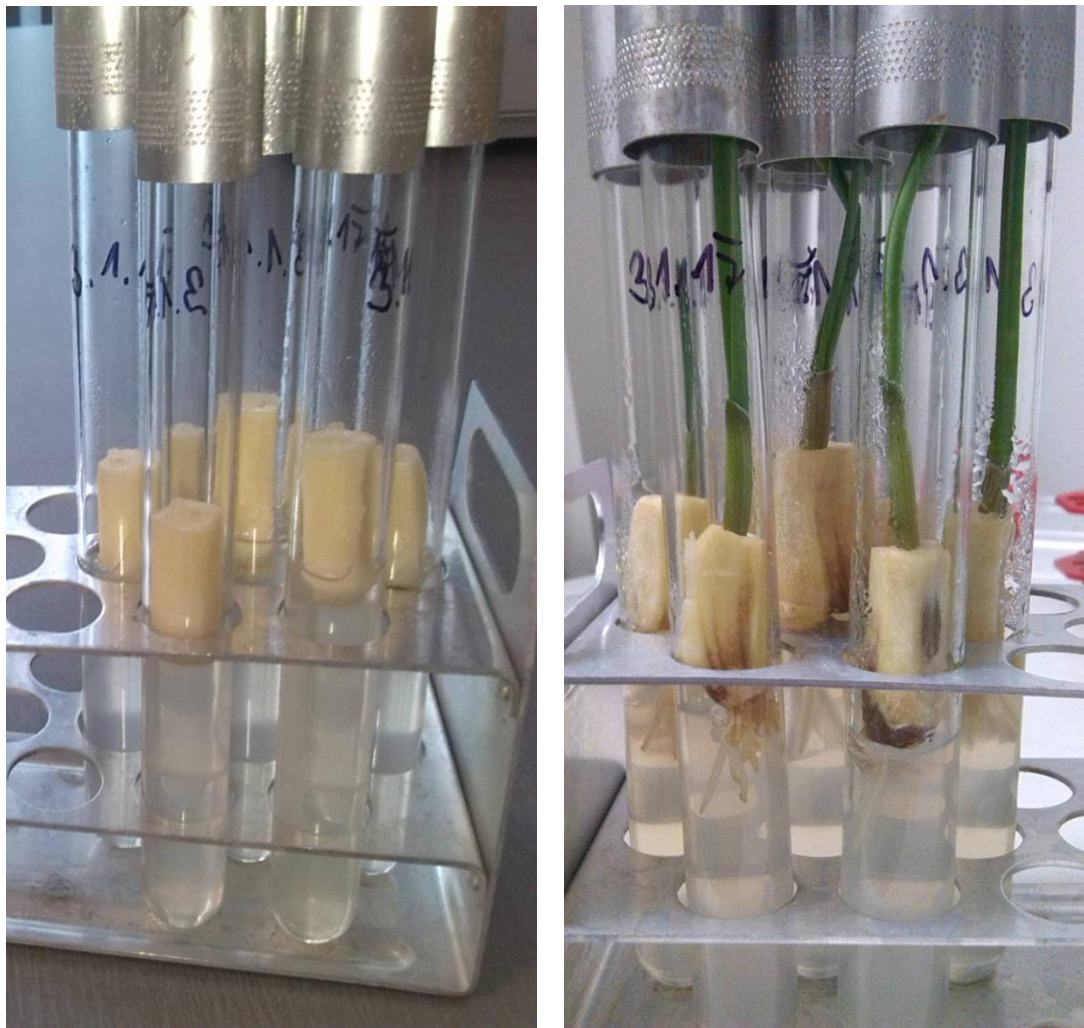
<b>Tekutá složka</b>	<b>ml/500ml</b>
Destilovaná voda	500
IAA	0,25
BAP	0,25
NAA	0,05
<b>Pevná složka</b>	<b>g/500ml</b>
MS médium s vitamíny	2,2
Agar	3,5
Sacharóza	10

### 4.3 Izolace meristémů

Prvním krokem izolace meristémů bylo naklíčení vysterilizovaných stroužků česneku. Stroužky byly ořezány tak, aby je bylo možné umístit do zkumavky na kultivační médium. Kultivace takto připraveného materiálu probíhala přibližně jeden měsíc ve fytotronu při fotoperiodě 16 hodin světlo/8 hodin tma, teplotě 23 °C a 80 % vlhkosti. Během kultivace byl kontrolován zdravotní stav jednotlivých stroužků,

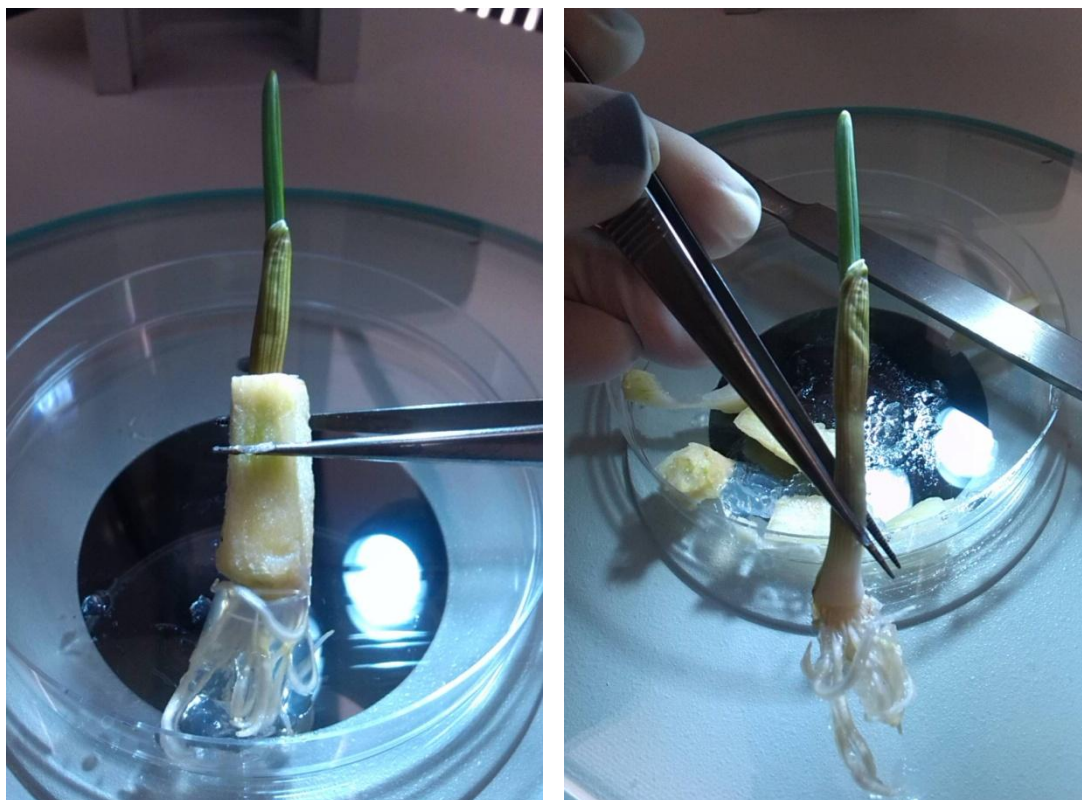
případně byly odstraněny kontaminované vzorky. Tento přípravný krok sloužil k nárůstu stonku, což umožnilo nárůst meristémů a lepší izolaci.

Obr. 7: Stroužky česneku před a po kultivaci (Foto: E. Švehlová)

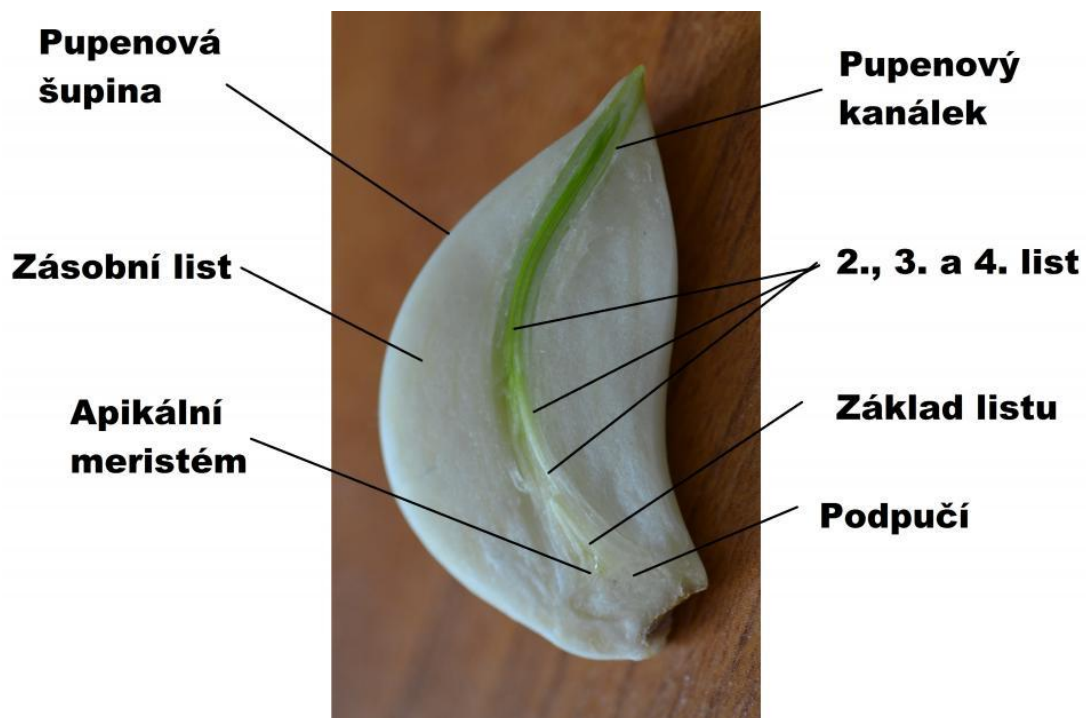


Z narostlých rostlin česneků byly vyizolovány meristémy. Izolace probíhala v laminárním boxu (flow-boxu) za sterilních podmínek. Nejprve byla ze stroužku pomocí skalpelů a pinzet ořezána nepotřebná dužina a vyjmut stoněk. Stoněk byl zbaven listů, tím se odkryl meristém. Meristém byl odříznut a přemístěn do zkumavky s kultivačním médiem, které obsahovalo potřebné fytohormony pro růst.

Obr. 8: Ořezání česneku před izolací meristému (Foto: E. Švehlová)



Obr. 9: Anatomická stavba stroužku česneku (Foto: J. Kozák (b))



Zkumavky byly umístěny do fytotronu při fotoperiodě 16 hodin světlo / 8 hodin tma, teplotě 23 °C a 80 % vlhkosti. Po 7 dnech byly meristémy přemístěny za sterilních podmínek v laminárním boxu (flow-boxu) na nové kultivační médium a umístěny zpět do fytotronu za stejných podmínek. V průběhu následujícího měsíce docházelo k pravidelným kontrolám, případně byly odstraněny kontaminované vzorky. Narostlé meristémy byly vždy po jenom měsíci kultivace přemístěny na nové kultivační médium. Po objevení kořínků byly meristémy přemístěny na kultivační médium bez fytohormonů a umístěny zpět do fytotronu.

#### 4.4 ELISA

Rostlinný materiál byl před použitím testován metodou ELISA pro zjištění přítomnosti virů OYDV a GCLV. V prvním kroku byly připraveny potřebné pufrы. Pufrы byly upraveny na požadované pH pomocí 1 M HCl.

Pufrы:

Tab. 5: Coating pufr (pH 9,6; 1000 ml)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,59 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,93 g
NaN <sub>3</sub>	0,2 g

Tab. 6: Základní PBS pufr (pH 7,4; 1000 ml)

NaCl	8,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O	2,9 g
KCl	0,2 g
NaN <sub>3</sub>	0,2 g



Tab. 7: Extrakční pufr (pH 7,4; 1000 ml)

PBS	1000 ml
PVP K-25	20,0 g
Tween 20	0,5 ml
sušené mléko (serumalbumin)	10,0 g

Tab. 8: Konjugační pufr (pH 7,4; 1000 ml)

PBS	1000 ml
PVP K-25	20,0 g
Tween 20	0,5 ml
sušené mléko (serumalbumin)	2,0 g

Tab. 9: Promývací pufr

1/5 PBS	1000 ml
Tween 20	0,5 ml

Tab. 10: Substrátový pufr (pH 9,8; 1000 ml)

diethanolamin	97 ml
---------------	-------

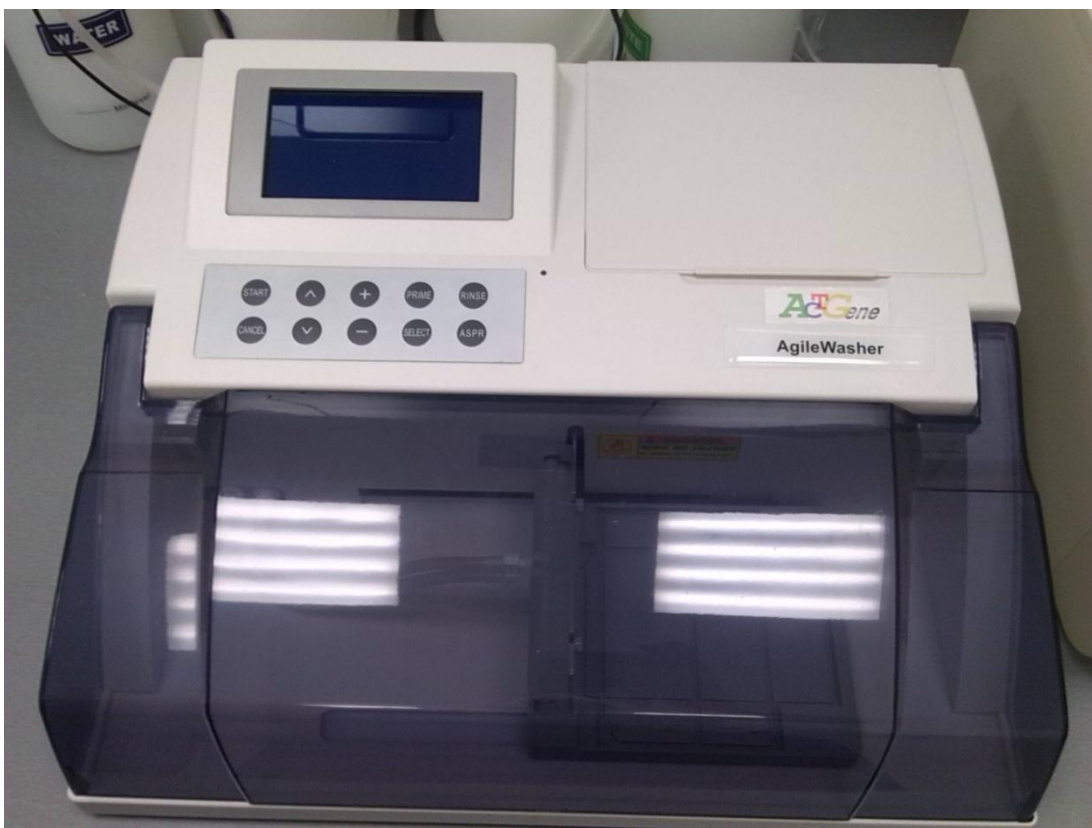
Vzorek pro testování byl odebrán z předem předpěstovaných stroužků. Stroužky byly předpěstovány stejným způsobem jako pro izolaci meristémů. Pomocí skalpelu byl ve sterilních podmínkách odebrán segment velikosti zhruba 3 milimetrů. Ze získaného segmentu byla získána šťáva:

- Část natě byla v laminárním boxu rozmělněna pomocí třecí misky s tloučkem
- Získaná drť byla propláchnuta 600 – 1000  $\mu$ l extrakčního pufru a přenesena do jednorázových označených mikrozkušavek (Eppendorf 1,5 ml)

Prvním krokem bylo potažení (aktivace) povrchu jamek mikrotitrační destičky specifickými protilátkami. Zásobní roztok IgG byl naředěn coating pufrům v poměru 10  $\mu$ l / 10 ml. Z připraveného roztoku bylo odpipetováno 100  $\mu$ l do

jednotlivých jamek destičky. Destička byla přikryta fólií, která zabraňovala odpařování. Takto připravená destička byla inkubována 4 hodiny při 30 °C v termostatu. Po inkubaci byla destička 2x promyta na promývače promývacím pufrem.

Obr. 10: Promývačka mikrotitračních destiček (Foto: E. Švehlová)



Do jednotlivých jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l připravené rostlinné šťávy. Na destičku byla také nanášena pozitivní kontrola (dodána výrobcem), negativní kontrola a slepý vzorek (pouze extrakční pufr). Destička byla přikryta fólií a inkubována při 4 °C přes noc do druhého dne. Druhý den byla destička dvakrát promyta na promývače promývacím pufrem.

Následujícím krokem byla detekce navázaného antigenu konjugátem IgG, tzv. alkalická fosfatáza. Zásobní roztok IgG – alkalická fosfatáza byl naředěn konjugačním pufrem v poměru 10  $\mu$ l / 10 ml. Takto připravený roztok byl pipetován po 100  $\mu$ l do jednotlivých jamek. Destička byla přikryta fólií a inkubována 4 hodiny při 35 °C. Destička byla dvakrát promyta na promývače promývacím pufrem.

Dalším krokem byla příprava roztoku substrátu. Ten byl připraven smícháním p-nitrophenylfosfátu a substrátového pufru v množství 0,75 mg / 1 ml při pokojové teplotě. Takto připravený roztok substrátu byl pipetován po 100  $\mu$ l do jednotlivých jamek.

Posledním krokem byla barevná reakce alkalická fosfatáza – substrát. Ta byla vyhodnocena po 60 minutách inkubace ve tmě pomocí spektrofotometru při 450 nm. Za pozitivní reakci byl považován vzorek, který měl při absorbanci 405 nm hodnotu větší než 0,2.

Obr. 11: Spektrofotometr pro ELISA testy (Foto: E. Švehlová)



## 5 Výsledky a diskuze

Prvotním cílem bylo stanovení vhodných metod pro izolaci a následnou kultivaci meristémů z česneku kuchyňského a ověření na pracovišti Jihočeské univerzity, Zemědělské fakulty v Českých Budějovicích. Jako vhodná metodika byla vybrána a upravena certifikovaná metodika od Křížana a kol. (2010): Metodika kultivace a multiplikace česneku v podmínkách *in vitro*. Vhodnost této metodiky se projevila zejména při sterilizaci rostlinného materiálu, kde byla zaznamenána úspěšnost 90 %. K neúspěšné sterilizaci docházelo především na počátku pokusu, kde docházelo ke kontaminaci česneku kuchyňského při růstu na živném médiu. Důvodem neúspěchu bylo hledání vhodné doby sterilizace v 0,2 % roztoku chloridu rtuťnatého. Jako nejúčinnější pro sterilizaci v tomto roztoku byla stanovena doba 18 minut. I po této optimalizaci se občas stalo, že došlo ke kontaminaci, zvláště na konci pokusu. Důvodem byl dlouhodobě skladovaný rostlinný materiál.

Izolace meristémů z česneku kuchyňského je složitá záležitost, která vyžaduje vyškolený personál. Samotná izolace probíhala z narostlých česneků na kultivačním médiu MS s vitamíny ve fytotronu pomocí skalpelů a pinzet pod binokulárním mikroskopem (binolupou). Vyizolované meristémy byly dále kultivovány na MS médiu s vitamíny obohacené o fytohormony ve fytotronu při fotoperiodě 16 hodin světlo / 8 hodin tma, teplotě 23 °C a 80 % vlhkosti. Izolace meristémů z česneku se podařila u 60 % rostlin. Hlavní komplikací při izolaci byla velikost izolovaného meristému, která je u ozdravování 0,3 – 1 mm. Dalšími důvody neúspěchu byla špatná izolace meristému, odebrání nesprávné části rostliny nebo poškození meristému při izolaci z česneku (Rakouský 2000).

Vyizolované meristémy byly po týdnu kultivace přemístěny na nové kultivační médium a kultivovány za stejných podmínek, výměna média proběhla i po měsíční kultivaci. Po objevení kořínků byly meristémy přemístěny na nové kultivační médium MS s vitamíny, tentokrát bez přidaných fytohormonů. Během této části práce se podařilo dopěstovat rostliny do fáze vývoje, kdy jejich velikost byla asi 4 centimetry. Dopěstování meristémů do této velikosti se podařilo u 20 % rostlin. Nejčastějším důvodem neúspěchu při dopěstování byla kontaminace meristémů,

kteřá se nepodařila přes veškerou snahu eliminovat. Během 14 měsíčního pokusu nebyla možnost používat fytotron výhradně pro kultivaci meristému, často se v něm nacházely i jiné vzorky, od kterých mohlo dojít ke kontaminaci.

Spálovský (2013) se zabýval optimalizací kultivačních podmínek při množení česneku kuchyňského metodou *in vitro*. Porovnával média s různým obsahem fytohormonů a místem kultivace meristémů. Jako nejlepší kombinace fytohormonů s vnějšími podmínkami kultivace byla vyhodnocena kombinace tepla a světla s přídávkem fytohormonů v médiu, které obsahovalo 1 mg / 1 litr NAA (kyselina 1-naftyloctová) a 1 mg / 1 litr BA (6-benzyladenin).

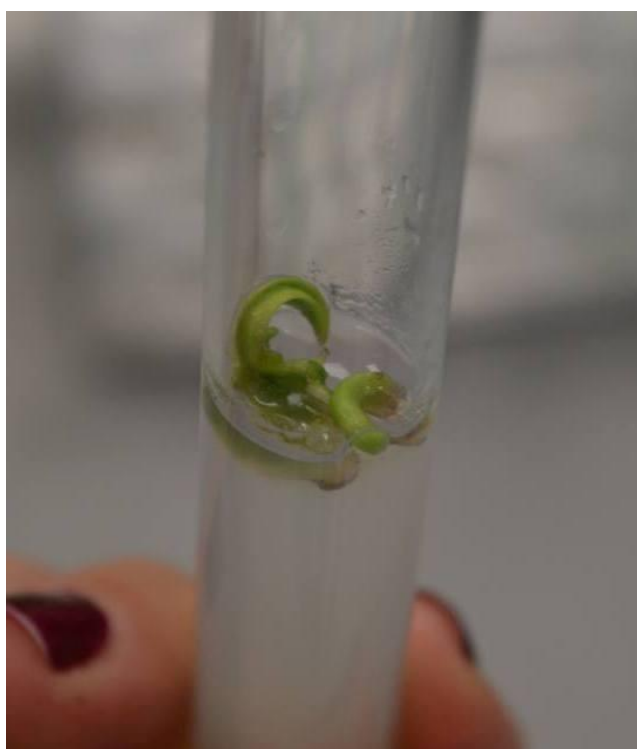
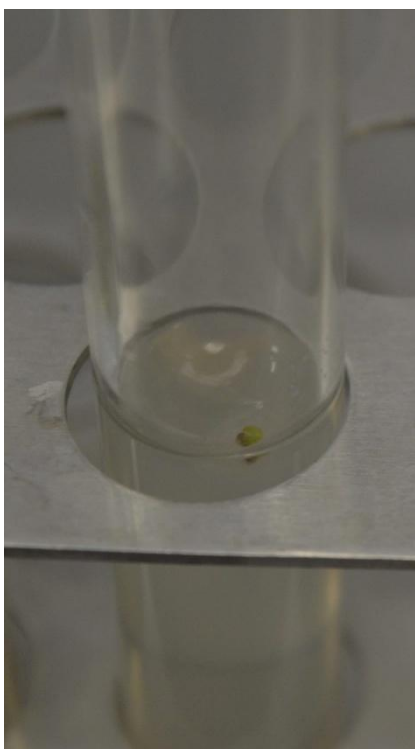
Krajíčková (2012) se zabývala ozdravováním česneku od základních virů metodou izolace apikálního meristému a kombinací chemoterapie a izolace apikálního meristému. Zdravotní stav kontrolovala pomocí ELISA testu. U prosté izolace apikálního meristému došla ke zjištění, že u 14,7 % meristémových rostlin byl detekován virus GCLV, který je neproblematičtěji eliminován. U ostatních virů byla míra výskytu nižší: OYDV 1,9 %, LYSV (Leek Yellow Stripe Virus) 0,3 %, SLV (Shallot Latent Virus) 2,8 %. Lepších výsledků ozdravení od některých virů dosáhla pomocí izolace apikálních meristémů s chemoterapií (do média byl přidán Ribavirin). Zde byl výskyt viru LYSV 8,6 %, OYDV 1 %, GCLV 2,9 %, SLV 0 %. Z dosažených výsledků je patrné, že tyto dvě metody jsou vhodné k ozdravování česneku od virů. Způsob použití dané metody se liší podle jednotlivých virů. Podobných výsledků dosáhl ve své práci i Senula a kol. (2000).

Paz a Soto (2012) ve své studii porovnávají účinnost dvou metod ozdravování česneku od virů. První způsob je využití meristémových kultur a chemoterapie. Druhým způsobem je využití meristémových kultur a termoterapie. Ačkoliv má termoterapie poměrně velký negativní vliv na přežití rostlin, byla účinnější pro eliminaci virů v 60 až 70,9 % případech, zvláště proti potyvírům.

V České republice se ozdravováním česneku od virů zabývá Výzkumný ústav bramborářský v Havlíčkově Brodě a Mendelova Univerzita Brno, Mendeleum – ústav genetiky ZF v Lednici. Ozdravování probíhá proti čtyřem významným virům:

OYDV, GCLV, LYSV a SLV. Využívají meristémové kultury s chemoterapií, v Lednici navíc i s termoterapií. Obě metody vykazují přibližně stejnou úspěšnost ozdravení.

Obr. 12: Vlevo meristém po týdenní izolaci, vpravo meristém po 4 týdenní izolaci  
(Foto: L. Homolková)



Obr. 13: Meristém po 10 týdenní kultivaci (Foto: L. Homolková)



Metodou ELISA byl stanoven zdravotní stav 20 náhodně vybraných cibulí česneku. Stanovení proběhlo před použitím rostlinného materiálu k izolaci meristému. Testování bylo zaměřené na přítomnost virů OYDV a GCLV. Pouze u vzorku číslo 13 byl detekován vir žluté zakrslosti cibule (OYDV). Vir GCLV (Garlic Common Latent Virus) byl přítomen u 16 testovaných cibulí. Důvodem nízkého výskytu viru OYDV je, že odrůda česneku Tantal, která byla pro experiment použita, je od tohoto viru ozdravena.

Vzhledem k finanční náročnosti ELISA testů a malému procentu úspěšnosti dopěstování meristémů, nebyl již materiál zpětně tetován na přítomnost virů. Výsledky úspěšnosti ozdravení kultur založených z apikálních meristémů touto metodou publikoval ve své práci např. Havránek (1972). Tomu se podařilo ozdravit

až 42 % rostlin. O pár let později dosáhli lepších výsledků Křížan a kol. (2010), kteří uvádí až 89 % úspěšnosti ozdravení česneku od virů z apikálních meristémů při kombinaci s chemoterapií.

Tab. 11, 12: Přítomnost virů v jednotlivých cibulích česneku

číslo vzorku	přítomnost viru	
	OYDV	GCLV
1	-	+
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	-	+
8	-	+
9	-	-
10	-	-

číslo vzorku	přítomnost viru	
	OYDV	GCLV
11	-	-
12	-	+
13	+	+
14	-	+
15	-	+
16	-	-
17	-	+
18	-	+
19	-	+
20	-	+



## 6 Závěr

Izolace meristému z česneku kuchyňského byla úspěšná z 60 %. Ve zbylých 40 % docházelo ke kontaminaci rostlinného materiálu, nebo k poškození meristému při izolaci. Kultivace meristému česneku probíhala na MS médiu s vitamíny, do kterého byly přidány fytohormony IAA, NAA a BAP. Vyizolované meristémy byly kultivovány ve fytotronu při fotoperiodě 16 hodin světlo / 8 hodin tma, teplotě 23 °C a 80 % vlhkosti. Dopěstovat rostlinu z meristémové kultury se podařilo z 20 % a to pouze do velikosti přibližně 4 centimetrů. Nejčastějším problémem při dopěstování byla kontaminace vzorku.

Pomocí metody ELISA byla stanovena přítomnost virů OYDV a GCLV v rostlinném materiálu před samotnou izolací meristémů. Testováno bylo 20 cibulí česneku odrůdy Tantal. Metoda prokázala přítomnost viru OYDV pouze u jednoho testovaného vzorku. Nízká kontaminace na vir OYDV této odrůdy spočívá v tom, že je odrůda na tento vir prostá, i když ne zcela odolná. Přítomnost viru GCLV byla podstatně vyšší – 80 % testovaných cibulí obsahovalo tento vir.

## 7 Použité zdroje informací

- ADESHINA O. G. (2011). Antibacterial activity of fresh juices of *allium cepa* and *Zingiber officinale* against multidrug resistant bacteria, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2: 289 – 293.
- ANONYM 1. Dostupné na [http://www.pestovani.in/galerie/max\\_1292703245.jpg](http://www.pestovani.in/galerie/max_1292703245.jpg).  
Online 29. 3. 2017.
- ANONYM 2 (2015). Dostupné na <https://www.linkedin.com/pulse/all-you-need-know-elisa-learn-buy-experiment-innovate-biotech-kart>. Online 5. 4. 2017.
- ANONYM 3 (2011). Dostupné na [http://www.bioreba.ch/files/Product\\_Info/ELISA\\_Reagents/LYSV\\_DAS\\_ELISA.pdf](http://www.bioreba.ch/files/Product_Info/ELISA_Reagents/LYSV_DAS_ELISA.pdf). Online 18. 4. 2017.
- ANONYM 4 (2007). Dostupné z <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsid=31089>. Online 18. 4. 2017.
- ANONYM 5 (2016). Dostupné na [http://www.bioreba.ch/files/Product\\_Info/ELISA\\_Reagents/SLV\\_DAS\\_ELISA.pdf](http://www.bioreba.ch/files/Product_Info/ELISA_Reagents/SLV_DAS_ELISA.pdf). Online 18. 4. 2017.
- ARDITTI J. (2009): Micropropagation of Orchids – second edition/volume I. Irvine, University of California, 1560 s.
- ARYA M., BARANWAL V. K., AHLAWAT Y. S., SINGH L. (2006). RT-PCR detection and molecular characterization of Onion yellow dwarf virus associated with garlic and onion. *Current Science*, 91 (10).
- BEREDA M., PADUCH-CICHAL E., KALINOWSKA E., SZYNDEL M. S. (2015). Genetic diversity and evidence of recombination in the coat protein gene of Onion yellow dwarf virus. *European Journal Of Plant Pathology*, 142:377–387.
- BOS L. (1999): Plant viruses, unique and intriguing pathogens: a textbook of plant virology. Leiden, Backhuys Publishers, 358 s.
- BUCHANAN B. B., GRUISSEM W., JONES R. L. (2015): Biochemistry and molecular biology of plants. John Wiley and Sons Ltd, 1280 s.
- BUTT S. M., SULTAN T. M. (2009). Garlic: Nature's protection against physiological threats. *Food Science and Nutrition*, 49 (10): 538 – 551.
- ČURN V. (1995): Rostlinné biotechnologie – využití kultur rostlinných explantátů v genetice a šlechtění. České Budějovice, Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 90 s.

- CLARK M. F., ADAMS N. A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal Of General Virology*, 34: 475-483.
- CONCI V. C., LUNELLO P., BURASCHI D., ITALIA R. R., NOME S. F. (2002). Variations of Leek yellow stripe virus Concentration in Garlic and Its Incidence in Argentina. *Plant disease*, 86: 1085 – 1088.
- DEBEREGH P. D., MAENE L. J. (1981): A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* 14. 335-345.
- DELECOLLE B., LOT H. (1981). Identification of three viruses infected garlic by immunoelectronmicroscopy. *Agronomie*, 1: 763 – 770.
- DIJK VAN P. (1994). Virus diseases of *Allium* species and prospects for their kontrol. *Acta Horticulturae*, 358: 299 – 306.
- EGBOBOR M. (2007). A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum*) and antibiotik on diarrheagenic organisms. *Southeast asian j trop med public health*. 38 (2): 343 – 347.
- ENGVALL E., PERLMANN P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8: 871 – 874.
- FELDBERG R. S., CHANG S. C., KOTIK A. N., NADLER M., NEUWIRTH Z., SUNDSTROM D. C., THOMPSON N. H. (1998). *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by Allicin, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32 (12): 343 – 347.
- GROUT B. W. (1990). Meristem-tip culture. *Methods In Molecular Biology*, 6: 81 – 91.
- HARRIS L. J. (1997). Garlic: Safe methods to store, preserve, and enjoy. *Food safety / Microbiology specialist, Department of food scienci and technology, Universita of California, Davis*, Publication 7231.
- HAVRÁNEK P. (1972). Viruprosté klony česneku kuchyňského získané z meristematických kultur. *Ochrana rostlin: sborník UVTI* 8, 291-298 s.
- HERDENSON I. F., HENDERSON W. P., KENNETH J. H. (1967): A directionary of biological terms. Edinburgh, 8th Ed., Oliver and Boyd.
- JHA N. Micro propagation: Technique, Factors, Applications and Disadvantages. Dostupné na <http://www.biologydiscussion.com/biotechnology/cl>

- onal-propagation/micro-propagation-technique-factors-applications-and-disadvantages/10732. Online 17. 4. 2017.
- JONES M. G. (2004). Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic, *Journal of Experimental Botany*, 55 (404): 1904 – 1915.
- KABELÍK J. (1970): Česnek (*Allium sativum* L.) známý i neznámý. Olomouc, Výzkumný ústav zelinářský, 83 s.
- KAZDA J., JINDRA Z., KABÍČEK J., PROKINOVÁ E., RYŠÁNEK P., STEJSKAL V. (2003): Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny – třetí doplněné vydání. Praha, 158 s.
- KODOVSKÁ B. (2011): Fytoncidy v česneku. [Bakalářská práce] Zlín, 47s. Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická.
- KOENIG R., PAUL H. L. (1982). Variants of ELISA in plant virus diagnosis. *Journal of Virological Methods*, 5: 113-125.
- KONVIČKA O. (1998): Česnek (*Allium sativum* L.). Olomouc, 167 s.
- KOZÁK J. (a). Dostupné na <https://www.cesnek.cz/popis-cesneku>. Online 18. 2. 2017.
- KOZÁK J. (b). Dostupné na <https://www.cesnek.cz/popis-cesneku>. Online 29. 3. 2017.
- KOZÁK J. (c). Dostupné na <https://www.cesnek.cz/houbomilka-cesnekova>. Online 1. 4. 2017.
- KOZÁK J. (d). Dostupné na <https://www.cesnek.cz/viry>. Online 1. 4. 2017.
- KRAJÍČKOVÁ J. (2012). Ozdravování česneku. In: DUŠEK K., ROD J. (eds.): Česnek ve 21. století. Olomouc, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i Praha, 53 – 57 s.
- KŘÍŽAN B., ONDRUŠIKOVÁ E., KUDĚLKOVÁ M., KRAJÍČKOVÁ J., WASSERBAUEROVÁ L., SMÉKALOVÁ K., DUŠEK K. (2010): Metodika kultivace a multiplikace česneku v podmínkách *in vitro*, certifikovaná metodika. Olomouc, Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 32 s.
- KŘÍŽAN B., ONDRUŠIKOVÁ E., KUDĚLKOVÁ M., WASSERBAUEROVÁ L., KRAJÍČKOVÁ J., SMÉKALOVÁ K., DUŠEK K. (2010): Metodika ozdravování česneku od virů pomocí kultivace meristému a *in vitro* kultur, certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., 28 s.

- LINDITSCH J. (1998): Léčíme se česnekem (přeložil Ivo Železný). Mnichov, Verlag Peter Erd, 112 s.
- LOT H., CHOVELON V., SOUCHE S., DELECOLLE B. (1998). Effects of Onion Yellow Dwarf and Leek Yellow Stripe Viruses on Symptomatology and Yield Loss of Three French Garlic Cultivars. *Plant Disease*. 82: 1381 – 1385.
- LUXOVÁ M. (1974): Zemědělská botanika I. Anatomie a morfologie rostlin. Praha, Státní zemědělské nakladatelství, 293 s.
- MAJUMDER S., BARANWAL V. K., JOSHI S. (2008). Simultaneous detection of Onion Yellow Dwarf Virus and Shallot Latent Virus in infected leaves and cloves of garlic by duplex RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*. 90: 371 – 374.
- MALÝ I. (2003): Pěstujeme cibuli, česnek, hrách a další cibulové a luskové zeleniny. Praha, Grada Publishing a.s., 88 s.
- MALÝ I., PETŘÍKOVÁ K. (2000): Základy pěstování cibulové zeleniny. Praha, Institut výchovy a vzdělání Mze ČR, 28 s.
- MEREDITH T. J. (2008): The complete book of garlic – a guide for gardeners, growers, and serious cooks. Portland: Timber press, Inc., 332 s.
- MURASHIGE T. (1978a). Frontiers of plant tissue culture. In: THORPE T. A. (ed.). Calgary Univ. Press.
- MURASHIGE T. (1978b). Propagation of higher plants through tissue culture. In: HUGHES K. W., HENKE R., CONSTANTIN M. (eds.). Knoxville, Tech. Inf. Center, US Dept. Energy.
- MURASHIGE T., SKOOG F. (1962). Dostupné na <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0222>. Online 3. 1. 2017.
- NOVÁK F. J. (1990): Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. Praha, Academia, 208 s.
- PATHAK S., PALAN U. (2005): Immunology: essential and fundamental. Enfield: Science Publisher, 411 s.
- PAZ A. R., SOTO H. M. T. (2012). Biotechnological tools for garlic propagation and improvement. Dostupné na <http://cdn.intechweb.org/pdfs/28706.pdf>. Online 8. 4. 2017.
- PRAMESH D., BARANWAL VIRENDRA K. (2013): Molecular characterization of coat protein gene of Garlic common latent virus isolates from India: an evidence

- for distinct phylogeny and recombination. *Virus Genes*, 47(1):189-193. Dostupné na <http://link.springer.com/10.1007/s11262-013-0909-z>. Online 1. 4. 2017.
- RADILOVÁ K. (2016): Babiččina přírodní lékárna – Česnek. Říčany, Nakladatelství Sun s.r.o., 79 s.
- RAJ A. Micro-propagation: Methods and Stages/Biotechnology. Dostupné na <http://www.biologydiscussion.com/plant-breeding/micro-propagation/micro-propagation-methods-and-stages-biotechnology/61317>. Online 17. 4. 2017.
- RAKOUSKÝ S. (2000): Rostlinné explantáty – texty přednášek a návody cvičení. České Budějovice, Biologická fakulta Jihočeské univerzity, 98 s.
- SALOMON R. (2002). Virus Diseases in Garlic and Propagation of Virus-Free Plants. In: Rabinowitch H. D., Currah L. (eds.): *Allium Crop Sciences: Recent Advances*. Wallingford, U. K., CAB Internacional, 311 – 328 s.
- SAPÁKOVÁ E., ŠEFROVÁ H., HASÍKOVÁ L., HORKÝ P., HŘIVNA L., HORÁK M. (2014): Garlic pests and their influence on yield in regional agricultural areas. Brno, Mendelova Univerzita v Brně, 70 s.
- SENULA A., KELLER E. R. J., LESEMAN D. E. (2000). Elimination of viruses through meristem culture and thermotherapy for establishment of an *in vitro* collection of garlic (*Allium sativum*). *Acta Horticulturae*, 530: 121-128.
- SINGH K. V., SINGH K. D. (2008). Pharmacological effects of garlic (*Allium sativum* L.). *ARBS Annual Review of Biomedical Sciences*, 10: 6 – 26.
- SKALICKÝ M., NOVÁK J. (2007): Botanika I. Anatomie a morfologie rostlin. Praha, Česká zemědělská univerzita v Praze, 146 s.
- SPÁLOVSKÝ M. (2013): Optimalizace kultivačních podmínek při množení česneku kuchyňského metodou *in vitro*. [Diplomová práce] Brno/Lednice, 47 s. Mendelova univerzita, Zahradnická fakulta.
- STAVĚLÍKOVÁ H. (2008). Morphological characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) genetic resources collection: Information. *Horticultural Science*, 35: 130-135.
- SYVIAM G. P. (2001). Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. *Journal of Nutrition*, 138(1): 106 – 108.
- ŠEDIVÝ J. (1997): Ochrana rostlin na zahradě od jara do zimy. Praha, Grada Publishing, spol. s.r.o., 132 s.
- ŠUTIC' D. D., FORD R. E., TOŠIC' M. T. (1999): Handbook Of Plant Viruses Diseases, CRC Press LLC.

TAGRO. Dostupné na <http://www.tagro.cz/PDF/%C4%8Cesnek%20kuchy%C5%88sk%C3%BD%20TANTAL.pdf>. Online 15. 3. 2017.

VAVILOV N. I. (1935). Theoretical bases of plant breeding. Moskva-Leningrad, State Agricultural Publishing House.

VOLLER A., BARTLETT A., BIDWELL D. E., CLARK M. F., ADAMS A. N. (1976). The detection of viruses by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Journal Of General Virology*, 33: 165-167.