

**Mendelova univerzita v Brně**

**Agronomická fakulta**

**Ústav biologie rostlin**

---



**Agronomická  
fakulta**

**Mendelova  
univerzita  
v Brně**



**Studium možnosti eliminace spály růžovitých růžovitých u  
kdouloně pomocí antibiotik a meristémové kultury in vitro**

Bakalářská práce

*Vedoucí práce:*  
Ing. Helena Vlašínová, Ph.D.

*Vypracovala:*  
Hana Šafaříková

---

Brno 2015

## **Zadání bakalářské práce**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Studium možnosti eliminace spály růžovitých u kdouloně pomocí antibiotik a meristémové kultury in vitro vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne: 29.4.2015

.....  
podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych tímto vyjádřit poděkování paní Ing. Heleně Vlašínové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a čas při zpracování mé bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala Martině Jůzové za cenné rady a pomoc v laboratoři. Zároveň také děkuji své rodině za pochopení, trpělivost, toleranci a velkou podporu svých spolužáků po celou dobu studia.

## **ABSTRAKT**

Autorka: Hana Šafaříková

Název práce: Studium možnosti eliminace spály růžovitých u kdouloně pomocí antibiotik a meristémové kultury in vitro

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala méně známému druhu jádrového ovoce, kterým je kdouloň (*Cydonia oblonga* Mill.). V práci je uvedena charakteristika tohoto stromu, seznámení s jeho pěstováním, množením, využitím a také jsem se zaměřila na chorobu způsobenou patogenem *Erwinia amylovora*, nazývanou spála růžovitých ovocných dřevin. Tu jsem se snažila eliminovat léčbou za použití antibiotik na meristémových kulturách v *in vitro* podmínkách. Celkem bylo zpracováno 22 odrůd kdouloní a byly provedeny 2 odběry letorostů na Školním zemědělském podniku Žabčice. Jeden odběr proběhl v zimě a druhý v létě, následně pak bylo v laboratoři provedeno jejich ošetření pomocí tří druhů antibiotik v různých koncentracích. U všech odrůd se po jejich léčení nemoc již neprokázala, ale jednotlivé segmenty nebyly schopny přežít delší dobu. Příčinou byla pravděpodobně přítomnost jiných patogenů, které se v segmentech vyskytovaly, a na které ozdravovací zásah neměl žádný vliv, případně snížení vitality pupenů, způsobené ošetřením antibiotiky.

Klíčová slova: Kdouloň obecná, *Erwinia amylovora*, antibiotika

## **ABSTRAKT**

Author: Hana Šafaříková

Thesis title: Study of the possibility of eliminating a fire blight in quince with antibiotics and meristem culture in vitro

I have focused, in my thesis, on lesser-known species of pome fruit, which is the quince (*Cydonia oblonga* Mill.). My dissertation presents a characteristic of this tree, introduction

to its growing, propagation, it is using and I have also focused on the disease caused by the pathogen *Erwinia amylovora*, called the fire blight of fruit trees. I have tried to eliminate the disease by using a treatment of antibiotics in meristem cultures under in vitro conditions. It has been processed in total on 22 varieties of quince and 2 samples of annual shoot have been taken at the School of herbaceous farm Žabčice. The first sampling took a place in winter and the second one in summer, subsequently it has been applied a treatment of three kinds of antibiotics diluted in various concentrations all happened under a specific conditions in the laboratory. The illness, for all varieties, has not shown any further presence after the treatment, but the individual segments were not able to survive longer period of time. The reason was probably a presence of other pathogens occurring in the segments and the curative intervention had no effect on them or a decrease in vitality of buds could have been caused by the antibiotic treatment.

Keywords: Quince, *Erwinia amylovora*, antibiotics

## **OBSAH**

1. ÚVOD .....	9
2. CÍL PRÁCE .....	10
3. LITERÁRNÍ PŘELEH .....	11
3.1 Zařazení kdouloně.....	11
3.2 Historie kdouloně.....	11
3.3 Charakteristika kdouloně .....	12
3.4 Pěstování kdouloní.....	13
3.4.1 Historie pěstování .....	13
3.4.2 Nároky na prostředí.....	13
3.4.3 Množení .....	14
3.4.4 Využití plodů kdouloní .....	15
3.5 Nejčastější choroby a škůdci kdouloní.....	16
3.5.1 Hlavní škůdci .....	16
3.5.2 Hlavní choroby.....	17
3.6 Bakteriální spála růžovitých.....	17
3.6.1 Charakteristika a příznaky.....	17
3.5.2 Ochrana .....	18
3.7 Antibiotika .....	19
3.7.1 Historie antibiotik .....	19
3.7.2 Základní vlastnosti antibiotik.....	20
3.7.3 Třídění antibiotik.....	22
3.7.4 Mechanismus účinku antibiotik .....	23
3.7.5 Toxicita a vedlejší účinky antibiotik.....	24
3.8 Explantátové kultury rostlin.....	24

3.9 Test patogenity .....	25
4. MATERIÁL A METODIKA .....	27
4.1 Lokalita .....	27
4.2 Sledované odrůdy a jejich charakteristika.....	27
4.2.1 Specifikace některých odrůd .....	28
4.3 Výzkum.....	30
4.3.1 Odběr.....	30
4.3.2 Povrchová sterilizace .....	30
4.3.3 Preparace.....	31
4.3.4 Kultivace .....	32
4.3.4 Média .....	32
4.3.6 Použitá antibiotika.....	38
4.3.5 Test patogenity .....	40
5. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	40
5.1 Pokus č. 1 .....	41
5.2 Pokus č. 2 .....	44
5.3 Pokus č. 3 .....	46
5.4 Pokus č. 4 .....	47
5.5 Pokus č. 5 .....	48
5.6 Pokus č. 6 .....	49
5.7 Pokus č. 7 .....	53
6. ZÁVĚR .....	57
7. POUŽITÁ LITERATURA .....	59
8. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ .....	61



## 1. ÚVOD

Kdouloň je méně známý druh ovocného stromu, která se stejně jako hrušeň a jabloň přiřazuje k jádrovému ovoci. Může připomínat hrušeň i jabloň dohromady, ale její vzrůst je spíše keřovitý. Je považována za okrasnou dřevinu, jelikož ji zdobí velké narůžovělé květy. Je méně známá i proto, že se její plody neřadí ve velkém množství do jídelníčku. Její plody jsou hodnoceny spíše pro příjemnou vůni a lidé je dříve vkládali do prádla, aby na několik měsíců prádlo provoněly. Její plody svým tvarem připomínají jablka i hrušky. Zpracovávají se také do různých marmelád a džemů, ale i s tímto způsobem zpracování se skoro nesetkáme.

Pěstování kdouloní je ovšem ohroženo bakteriální spálou rostlin z čeledi růžovitých, způsobené patogenem *Erwinia amylovorou*. Jde o velmi závažné onemocnění řadících se do karanténních chorob, které způsobuje velká poškození stromů, jak mladých letorostů, tak květů, starších větví, kmenů, kořenů a velmi rychle hynou i celé stromy. Hlavním cílem všech agrotechnických opatření je šíření tohoto onemocnění zpomalit a zabránit zamoření nových lokalit.

Ve své bakalářské práci se nezabývám tím, jak toto onemocnění zpomalit či mu zabránit, ale jak jej přímo vyléčit. Léčení rostlinného materiálu pomocí antibiotik dnes ještě není povoleno, ovšem pokud se jedná o výsadbu genofondového materiálu, jakož je tomu právě u těchto stromů kdouloní, které byly sázeny pro uchování genetických zdrojů a k těmto účelům také nadále slouží a to nejenom pro vědecké účely, ale také pro pedagogické, šlechtitelské a školkařské činnosti, může být léčba antibiotik považována za vědeckou činnost, neboť byla použita v in vitro kultuře.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je provést rešerši na téma spála růžovitých ovocných dřevin s ohledem na citlivost vůči antibiotikům a popsat problematiku pěstování kdouloní. Zároveň se seznámit s problematikou explantátových kultur, problematikou možnosti ozdravení rostlin v *in vitro* kultuře a s problematikou aplikace antibiotik. Budou odebrány zimní a letní vegetativní pupeny ve dvou termínech. Vyzkouší se různé druhy povrchové sterilizace a následně budou otestovány různé koncentrace vybraných antibiotik a antimykotik v *in vitro* kultuře. Po té budou získané kultury podrobeny testu na přítomnost *Erwinia amylovora* a výsledky pak budou shrnuty, zda je možno touto metodou kultury jádrovin napadených spálou růžovitých ozdravovat.

### 3. LITERÁRNÍ PŘELED

#### 3.1 Zařazení kdouloně

U nás méně známý pěstovaný druh kdouloň obecná (*Cydonia oblonga* Mill.) se řadí do rodu kdouloň (*Cydonia* Mill.) (TETERA a kol., 2006). Podle Richtera (2004) je druhové jméno kdouloně podlouhlá (*Cydonia oblonga* Mill.) a patří do čeledi růžovité (Rosaceae). Ve starší literatuře se značí jako *Cydonia vulgaris* Pers. a také jako *Pirus cydonia* L. Tetera (2006) představuje její dvě kulturní plemena, a to *Cydonia oblonga* subsp. *pyriformis* (Medic.) Thell. – hruškovitá forma a *Cydonia oblonga* subsp. *maliformis* (Miller) Thell. – jablková forma.

#### 3.2 Historie kdouloně

Kdouloň pochází z Předoašijského genového centra (Malá Asie, Zakavkazí, Irán, vysočiny Turkménie) (TETERA a kol., 2006). Jedná se o ovocný druh známý již 4000 let a dle Richtera (2004) je jeho kolébkou Řecko. Její botanický název *Cydonia* se nejspíš vztahuje k městu na Krétě, které se nazývá Kydon, kde na plantážích byly kdouloně pěstovány již v období před Kristem (JANTRA, 1996). Nicméně původní mytologický název je odvozen od objevitele města Kydonase, syna boha Hermese nebo Apollona (teorie se různí) (NEČAS, 2010). Její rozšíření do Evropy však není známo. Předpokládá se, že ji z Přední Asie do oblasti Středozevní a severní Afriky donesli Fénicičané, kteří byli zdatní obchodníci a mořeplavci. V Antice, vedle tamní pěstované révy vinné, jabloně a hrušně, patřila k nejstarším ovocným druhům (TETERA a kol., 2006). To dokazuje i Homérova *Odyssea* (8. - 9. stol. př. n. l.) a Hippokrates ji ve starověku používal (460 – 377 př. n. l.) k různým lékařským účelům. Řecký filosof Theofrastos (371 – 286 př. n. l.) rozeznával kdouloň pěstovanou a planou (NEČAS, 2010).

### 3.3 Charakteristika kdouloně

Kdouloně obecná je opadavý 2 – 7 m vysoký a asi stejně tak široký keř se stromkovým vzrůstem (NEČAS, 2010). Bollinger a spol. (1998) uvádí, že se jedná o strom nebo keř vysoký asi 1 – 8 metrů a má strnule odstávající větve (BOLLINGER a spol., 1998). U koruny je přirozeným znakem její nepravidelnost a rozložitelnost (NEČAS, 2010). Mladé větve jsou hustě plstnatě chloupkaté se žlutozeleným zbarvením, časem se zbarvují hnědozeleně s obsahem malých, tmných lenticel v kůře (BOLLINGER a spol., 1998). Její letorosty jsou ve srovnání s hrušní tenké, s přisedlými šupinatými pupeny. Listy jsou střídavé a tmavě zelené a dosahují délky až 10 cm a šířky 7,5 cm. Tvar mají podlouhle vejcovitý až široce eliptický s okrouhle srdcovitou bází a jsou celokrajné. Palisty na listech se nejčastěji vyskytují na jejich bázích a jsou dlouhé přibližně 1 cm a široké 0,5 cm. Co se týče květů, tak ty jsou nejčastěji jednotlivé. Vonný květ kdouloně je hmyzosnubný, oboupohlavný, samosprašný i cizosprašný a je tvořen pěti bílými nebo narůžovělými korunními lístky s tmavou žilnatinou. Obvyklá doba kvetení je od května do června (NEČAS, 2010). Jablkovitého nebo hruškovitého tvaru je její malvice, která je žlutě zbarvena občas s výrazným žebrováním a plstnatou slupkou, která po ořezu zůstane lesklá, někdy mastná s pronikavou vůní (RICHTER, 2004). Květy pak střídají nádherně vonící žluté plody, které dozrávají jen na chráněných a teplých místech (VERMEULEN, 1998). Po opylení se vytvoří plody, které mají tuhou, aromatickou natrpklou dužninu bohatou na slizy (zejména pektin). Pokud z jakýchkoliv příčin dojde k zamezení nebo znemožnění opylení má kdouloně mimořádně výraznou schopnost tvořit partenokarpické plody obdobně jako je tomu u hrušně (NEČAS, 2010).

## 3.4 Pěstování kdouloní

### 3.4.1 Historie pěstování

První písemné zmínky o pěstování kdouloní na našem území pocházejí od mistra Bartoloměje Klareta (1320 – 1378) ve slovníku *Glossarium maior* (1355 – 1374). Stejně jako naprostá většina ovocných druhů se kdouloně na našem území pěstovaly zpočátku zejména v klášterních zahradách. Na jižní Moravě, a to zejména na Znojemsku, se kdouloně začaly nejvíce pěstovat v 19. století (NEČAS, 2010).

### 3.4.2 Nároky na prostředí

Odrůdy, které jsou pěstované u nás, jsou náročné na teplá a zároveň vlhká stanoviště (ČERVENKA a kol., 1964). Pozdnější doba kvetení nastupující až po odkvětu ostatních ovocných dřevin, prakticky vylučuje nebezpečí poškození pozdními jarními mrazíky, proto i v ne příliš příznivých polohách můžeme počítat se slušnou úrodou. Ovšem oblast pro její úspěšné pěstování vymezuje hranice s průměrnou roční teplotou 9°C a více. V ČR jde v podstatě o oblast, která je vhodná pro pěstování teplomilných peckovin, kam se řadí broskvoně a meruňky. Na rozdíl od nich jsou však kdouloně více odolnější vůči mrazu, a to až do -30°C. Pokud ke zmrznutí nadzemních částí přece jen dojde, kdouloně mají schopnost podobně jako hrušně rychle regenerovat. V oblastech s chladnějším klimatem její plody špatně vyzrávají, nemají tak výrazné aroma a stromy méně plodí. Na takovýchto chladných lokalitách, nebo i ve vyšších polohách, je zapotřebí zvolit příznivější mikropodmínky, jako jsou například jižní strany, svahy a podobně (NEČAS, 2010).

Pokud se jedná o půdu, kdouloně ani nejsou náročné na kvalitu půdy a agrotechniku (JANTRA, 1996). Vyžadují půdu s dostatečným obsahem živin a neměla by být příliš těžká (HRIČOVSKÝ a kol., 2003). Vyhovují jí půdy záhřevnější, bohaté na humus a na výživné látky. Zároveň by měly být dostatečně provzdušněné s pH 6 – 7 (NEČAS, 2010). Vysoký obsah vápníku v půdě je naopak nevhodný a mohou se projevit žloutenky (chlorózy), které jsou způsobené tím, že je vápníkem zablokován přísun železa, které je nezbytné pro řádný

průběh fotosyntézy (HRIČOVSKÝ a kol., 2003). Nečas (2010) uvádí, že již 4% rostlinou přijatelného vápníku v půdě jsou kritické a dostavuje se již výše zmíněná chloróza. Co vysloveně stromy kdouloní nesnášejí je vysoká hladina podzemní (stagnující) vody (HRIČOVSKÝ a kol., 2003). Na těchto půdách, které jsou přemokřené, dochází ke zpomalení nástupu do plodnosti a také ke snížení intenzity růstu a výnosu. Její nároky na vláhu v půdě nejsou nijak vysoké, vystačí si se srážkami okolo 500 mm. Ovšem příliš zasolené půdy v suchých oblastech také nesnáší moc dobře a trpí kaménčitostí. Její tolerance vůči sodíku v půdním sorpčním komplexu je 15 – 20% a tolerance chlóru je 0,05% (NEČAS, 2010).

### 3.4.3 Množení

Množení kdouloní se provádí výsevem na podzim nebo výsevem stratifikovaného osiva na jaře, ovšem podobně jako hrušňové podnože se kdouloně mohou množit oddělky nebo metodou *in-vitro*. Množení dřevitých nebo bylinných řízků má ale také úspěch. Očkováním nebo roubováním na podnožovou kdouloň se množí odrůdy, které jsou vhodné pro konzum, případně může jako podnož posloužit hloh, což se provádí stejným způsobem jako u hrušně (NEČAS, 2010). Přirozený růst kdouloní je jako keře, proto pro dosažení růstu jako stromek, se musí štěpovat a zapěstovat do jeho tvaru (JANTRA, 1996). V ČR se využívají vegetativně množené kdouloňové podnože u kdouloní, které se pěstují jako volně rostoucí zákrsky. Jako podnož v minulosti sloužil bílý a červený hloh, později jeřáb, ovšem kvůli silné náchylnosti na onemocnění bakteriální spálou se přestali používat (JANTRA, 1996). Aby měla kdouloň stromový růst, používají se dnes podnože kdouloň typu A (MA, kdouloň 'Angerská') (HRIČOVSKÝ a kol., 2003). Nečas (2010) udává, že podnože běžně používané jsou kdouloň 'MA' a také 'BA - 29'. Hričovský a kol. (2003) uvádí, že pokud jsou kdouloně čerstvě vysazeny, nejsou ještě pevně v půdě ukotvené a to vzhledem k jejich mělké kořenové soustavě, a proto potřebují oporu, která je nutná po několik let jejich růstu, pak ji lze odstranit. Podnož MA má středně bujný vzrůst, a proto potřebuje na začátku svého růstu oporu (JANTRA, 1996). Hodí se pro nízké tvary a odrůdy, které se na ni štěpí, dříve plodí (VILKUS a kol., 2000).

Spon závisí na mechanizaci a způsobu, jakým bude proveden řez a proto může být různý. Ovšem nejčastěji se uvádí spon 3,5–5,5 x 2,5–4,5 m nebo 5-6 x 4-5 m. Vyhovující je nastylání organickou hmotou, jelikož chrání před poškozením mrazy (NEČAS, 2010).

Po výsadbě by mělo být jako základní první ošetření výchovný řez, který je důležitý pro zapěstování koruny a větví. Později v době, kdy strom plně plodí, se provádí už pouze prosvětlovací průklest v intervalu 4-8 let a to tím způsobem, že se odstraňují nemocné a poškozené větve (NEČAS, 2010). Jednou za pět let se provádí řez zmlazovací, který probudí rostlinu k intenzivnějšímu růstu letorostů (HRIČOVSKÝ a kol., 2003).

Jednotlivé odrůdy se sklízí dle jejich dozrání, nejdříve ale od začátku října. Pro stanovení optimální sklizňové zralosti plodů kdouloní se jako pomůcka používá změna barvy stopky plodů, která žloutne a v blízkosti s větví intenzivně zesílí (NEČAS, 2010).

#### **3.4.4 Využití plodů kdouloní**

Plody kdouloní se nazývají kdoule a v syrovém stavu jsou nepoživatelné (výjimkou jsou odrůdy Cydora a Tekec) (NEČAS, 2010). Velmi aromatickou, ale tvrdou a suchou dužninu mívají kdoule, které jsou svým tvarem podobné jablkům. Kdoule, které svým tvarem připomínají hrušky, jsou poněkud měkčí a je možné je zpracovávat, ovšem chuťově nedosahují takové kvality, jako plody tvaru jablka (HRIČOVSKÝ a kol., 2003). Po tepelném zpracování jsou plody kdouloně vhodné na výrobu kompotů, marmelád ve formě rosolů, ovšem nehodí se pro přímý konzum (RICHTER, 2004). Jantra (1996) uvádí, že se její plody dají zpracovat také v želé nebo likérech pro jejich jedinečné aroma, které můžeme obdivovat i při jejich kuchyňském zpracování. Krájí se na lupínky a suší při teplotě do 50 °C. Lze z nich vyrobit také kdoulovou pastu, kdoulový sýr, čaj, kdoulové víno, pálenku i mošt. Dříve se z nich vyrábělo trvanlivé cukrové pečivo a nakrájené kousky kdoulí byly přidávány do různých zavařenin. Lze je takto vložit do skříní, kde jsou uloženy textilie, jelikož je příjemně provoní (NEČAS, 2010). Jejich uplatnění se nachází i ve farmaceutickém průmyslu (NERUDA, 2009).



Obr. 1 *Plody kdouloní* (<http://www.ireceptar.cz>)



Obr. 2 *Plod kdouloně* (<http://www.uspza.cz>)

### 3.5 Nejčastější choroby a škůdci kdouloní

Vzhledem k tomu, že kdouloň se řadí k jádrovému ovoci, jsou její choroby podobné, jako je tomu u tohoto ovoce z čeledi růžovitých.

#### 3.5.1 Hlavní škůdci

- Mera skvrnitá (*Cacopsylla pyri*)
- Obaleč jablečný (*Cydia pomonella*)
- Mšice jabloňová (*Aphis pomi*)
- Bejlmorka hrušňová (*Dasyneura pyri*)
- Vlnovník hrušňový (*Epitrimerus pyri*)

(NEČAS, 2010)



### 3.5.2 Hlavní choroby

- Strupovitost hrušně (*Venturia pirina*)
- Moniliová hniloba jádrovin (*Monilinia fructigena*)
- Evropská rez hrušňová (*Gymnosporangium fuscum*)
- Chřadnutí hrušně (*Pear decline*)
- Virová kaménkovitost hrušek (*Lithiasis*)
- Bakteriální spála růžovitých (*Erwinia amylovora*)

(NEČAS, 2010)

## 3.6 Bakteriální spála růžovitých

### 3.6.1 Charakteristika a příznaky

Jedná se o karanténní onemocnění, které je způsobené bakterií *Erwinia amylovora*. Svým napadením ohrožuje produkci jabloní, hrušní a kdouloní (PAPERŠTEIN, PATZAK, 2007). Pokud jsou napadeny květy a plody, značně redukuje výnos těchto ovocných stromů (NEČAS, 2010).

V květních poupatech a květech obecně infekce začíná (PAPENSTEIN, PATZAK, 2007). Květy jsou proto orgánem nejnáchylnějším k této infekci. K jejich napadení dochází přes brachyblasty a květní stopky či bliznou a nektářiemi. Příznaky napadení květů je vodnanost, hnědnutí a následné zasychání. V takovém případě už nedochází k tvorbě plodů. Plůdky, které jsou infikované mají světle hnědou až černou barvu, scvrkávají se, usychají a zůstávají viset na stromě (NEČAS, 2010).

Infekce se postupně rozšiřuje do dalších částí stromu. U větví dochází k jejich vadnutí a černání a konce větví se často kroutí. Větve se pak zdají jako spálené (PAPERŠTEIN, PATZAK, 2007). Dochází k nekrotizaci pletiv kůry větví, výhonů a kmene, kde patogen přežívá a přezimuje. V předjaří se ve formě bělavého slizu šíří do okolního pletiva a na povrchu orgánů, které jsou napadeny, se objevuje v kapkách, které jsou pak deštěm,

větre, hmyzem (zejména včelami) a ptáky rozšiřovány na další květy a letorosty (NEČAS, 2010).



Obr. 3 Příznaky spály růžovitých (<http://cs.wikipedia.org/>)

K infekci listů pak dochází přes řapík z letorostu nebo přímo přes průduchy, trichomy a hydatomy, ovšem často k infekci dochází k mechanickým poškozením čepale listů či řapíků. Napadené listy a letorosty se pak zbarvují do hněda až černa (NEČAS, 2010).

Nejvhodnějším prostředím pro epidemii touto bakterií jsou časté deště a následné teplé počasí v době kvetení a prodlužovacího růstu. Minimální teplota pro šíření tohoto patogena je obvykle 18,5 °C (NEČAS, 2010).

### 3.5.2 Ochrana

Provádí se opatření, jejichž hlavním cílem je zpomalit šíření patogena a oddálit zamoření dalších lokalit pomocí nějakých dostupných prostředků. Nejdůležitější je prevence, která spočívá v zabránění kontaktu patogena s hostitelským stromem a v pěstování odrůd, které mají vyšší stupeň rezistence. Pokud se onemocnění projeví a jedná se o stromy umístěné v sadech, spočívá ochrana v použití chemické ochrany, kdy se většinou aplikuje oxychlorid měďnatý (Kuprikol 50) na počátku a konci květu a na počátku růstu plodů. Stejně se ošetřují i stromy ve školkách určené k expedici akorát v době před odlistěním (NEČAS, 2010).

### 3.7 Antibiotika

Jedná se o velkou skupinu látek s antimikrobním účinkem. Působí na životní pochody mikroorganismů, jejíž činnost tlumí nebo úplně zastavují. Dříve patřily mezi antibiotika pouze produkty živých mikroorganismů, později se mnoho antibiotik sestrojilo polysyntetickou nebo jen syntetickou cestou a dnes už antibiotika řadíme jako podskupinu do větší třídy chemoterapeutik, což jsou látky, které působí na životní projevy mikroorganismů či na metabolismus nádorových buněk (HEJZLAR, 1980).

#### 3.7.1 Historie antibiotik

Historie antibiotik začíná v jejich prvním objevení, které je přiřazováno jednomu velmi významnému muži Alexandru Flemingovi. V roce 1928 objevil penicilin, čímž odstartoval éru vývoje antibiotik a již v tomto roce ho také po této látce produkující plísni *Penicillium notatum* (Westling) pojmenoval (HEJZLAR, 1980).

V roce 1940 byl proveden pokus skupinou vynikajících pracovníků, který jmenovitě prováděli patofyziolog Howard Florey, biochemik E. B. Chain a Angličan Heatley. Šlo o pokus se značně čištěným penicilinem na uměle infikovaných myškách, díky němuž dosáhli výborných výsledků a v roce 1943 začala jeho tovární výroba (HEJZLAR, 1980).

Ovšem objev látek antibioticky působících je mnohem staršího data. Už v roce 1871 si Lister všiml, že vedle bakterií se v moči vyskytují i plísně, které nějakým způsobem nepříznivě ovlivňují růst bakterií. Po té Pasteur s Joubertem v roce 1877 pozorovali antagonismus některých bakterií při pokusech na zvířatech. V roce 1890 byla podána první zpráva o aktinomycetách vytvářejících produkty, které jsou schopné ničit bakterie. Toto správu podal Gasperini. V roce 1899 byl již léčen bérkový vřed pomocí extraktu kultury *Pseudomonas substanci* českými lékaři Honlem a Bukovským. Roku 1925 Pringsheim prokázal, že v kultuře *Bacillus mycoides* je antibakteriálně působící látka. Pět let po Flemingovi (1934) popsal Weindling produkt některých hub – gliotoxin, který má taktéž antibakteriální účinky (HEJZLAR, 1980)

Poprvé však byl pojem *antibiotikum* zaveden v roce 1942 a navrhl jej S. A. Waksman (HEJZLAR, 1980).

Zájem se brzy přenesl na hledání mikrobiálních metabolitů, které působí proti virovým chorobám a nádorovému bujení z původního zaměření na antibakteriální látky. Mnoho látek vykazuje značnou toxicitu, takže protivirová a zvláště protinádorová antibiotika, na které bychom se mohli spolehnout, dosud nemáme (HEJZLAR, 1980).

Výzkum je v této oblasti ovšem stále velmi intenzivní. Nejprve byla antibiotika známá především v léčbě lidských onemocnění, pak se rozšířila i do veterinární praxe a potravinářského průmyslu. Jsou uplatňována i při ochraně dalších biologických produktů, jejich využívání se uplatňuje také i k ochraně rostlin, konzervaci virů i tkáňových kultur a dokonce i v průmyslu, kde se aplikují k ochraně materiálu proti bakteriální korozi. Mají význam i v řešení některých obecně biologických problémů a neustále se studují po jejich teoretické stránce, například v mikrobiální genetice a své prameny zde má i molekulární biologie. Nové poznatky přinesly antibiotika i do odvětví chemie, jelikož všechna významná antibiotika v podstatě představují nové chemické struktury, což potvrzuje fakt, že před rokem 1950 byly známy jen tři polyacetyleny, které se přirozeně vyskytovaly, zatímco studium polyenových antibiotik jejich počet podstatně zvýšil. Dnes se antibiotika vyrábějí ve velkých množstvích v průmyslové výrobě (HEJZLAR, 1980).

### **3.7.2 Základní vlastnosti antibiotik**

Antibiotika zařazujeme do skupiny chemoterapeutik a řadí se do nich pouze ty látky, které škodlivě působí na parazita a zároveň nekonají žádné škody hostitelskému organismu, v čemž je základní rozdíl mezi antibiotiky a desinfekčními prostředky. Desinfekční prostředky totiž sice působí na parazita, ale nepůsobí příliš pozitivně na makroorganismy, které je špatně snášejí. V širším slova smyslu označujeme jako chemoterapeutika ty chemické látky, které umí zastavit růst různých druhů mikroorganismů při čemž neškodí hostiteli a všechna chemoterapeutika jsou vyráběna uměle, synteticky a nejsou přímo

produktem metabolismu některých mikroorganismů jako je tomu u antibiotik, které v podstatě tvoří jejich výjimku (HEJZLAR, 1980).

Většina antibiotik působí při zásahu do metabolismu při nízkých koncentracích bakteriostaticky, jelikož mikroorganismus, který je tímto zásahem postižen, se dokáže, při přenesení na vhodnou živnou půdu, dále rozmnožovat a růst. Jedná se o děj vratný. Naopak antibiotika působící ve větších koncentracích působí na organismus baktericidně. Dochází k poškození mikrobiální buňky postižením životně důležitých funkcí a k úhynu. Jedná se proto o děj nevratný. Množství antibiotika tedy rozhoduje o kvalitě jeho účinku, a proto se antibiotika dělí do dvou velkých skupin.

1. Antibiotika primárně baktericidní postihující stavbu buněčné stěny bakterií. Řadí se mezi ně peniciliny, cefalosporiny, vankomycin, bacitracin, polymyxiny. Dále sem patří skupina antibiotik komplexně zasahujících do metabolismu bakterií – aminoglykosidů (streptomycin, neomycin, kanamycin, gentamicin, sisomicin, tobramycin)
2. Antibiotika primárně bakteriostatická zasahující do proteosyntézy na úrovni ribosomálních podjednotek: tetracykliny, makrolidy, chloramfenikol, linkomycin, novobiocin, spektinomycin (HEJZLAR, 1980).

### 3.7.3 Třídění antibiotik

Antibiotika můžeme rozřadit dle různých kritérií, svou logiku si zachovává třídění antibiotik dle spektra účinku do těchto velkých skupin:

1. Antibakteriální antibiotika
2. Antifungální antibiotika
3. Antiparazitární antibiotika
4. Antibiotika proti rickettsiím a mykoplazmatům
5. Antivirová antibiotika
6. Antineoplazmatická (protinádorová) antibiotika

(HEJZLAR, 1980)

Ovšem jedním z nejdůležitějších třídících kritérií je chemická struktura a chemická příbuznost antibiotik. Antibiotika se tedy dle těchto kritériích dále rozdělují na:

- a. Peniciliny
- b. Cefalosporiny
- c. Aminoglykosidy
- d. Peptidová antibiotika
- e. Chloramfenikol
- f. Tetracykliny
- g. Makrolidová antibiotika
- h. Polyenová antibiotika

### i. Antibiotika různé chemické struktury a spektra

(HEJZLAR, 1980)

#### **3.7.4 Mechanismus účinku antibiotik**

Působení antibiotika na mikrobiální buňku se děje na molekulární úrovni. Činitelé, kteří rozhodují o účinku antibiotika jsou následující:

- Molekulová integrita antibiotika, buď její celé, nebo alespoň její nezbytné funkční části
- Volnost ve funkci determinantní skupiny molekuly antibiotika
- Možnost vazby determinantní skupiny antibiotika na volné receptorové místo bakteriální buňky

(HEJZLAR, 1980)

Každé antibiotikum vykazuje specifický účinek. Na různých úrovních zasahuje do metabolismu bakteriální buňky. Podle místa zásahu do mikrobiálního metabolismu se antibiotika třídí do čtyř nejdůležitějších skupin.

1. Antibiotika, která narušují syntézu buněčné stěny bakterií
2. Antibiotika, která poškozují funkci plazmatické membrány
3. Antibiotika, která narušují bakteriální proteinosyntézu
4. Antibiotika, která působí na úrovni RNA a DNA

(HEJZLAR, 1980)

### 3.7.5 Toxicita a vedlejší účinky antibiotik

Nejčastější vedlejší účinky antibiotik můžeme roztrdit do několika skupin:

- Toxické projevy – antibiotika mohou způsobovat poškození určitých tkání makroorganismu
- Alergické projevy – vzhledem k jejich nejrůznější stupnici intenzity
- Projevy hypovitaminózy a nedostatku enzymových systémů – příznaky se objevují především v průběhu aplikace antibiotik se širokým spektrem účinku
- Projevy ovlivněné syntézou proteinů
- Superinfekce a rezistence – jedná se o dost závažné nebezpečí

(HEJZLAR, 1980)

### 3.8 Explantátové kultury rostlin

Znamenají sterilní kultivaci izolovaných částí rostlin v umělých podmínkách. V praxi se jedná o oddělení sterilně napěstované nějaké části rostliny a její umístění do sterilního prostředí a kultivace za určitých podmínek (KOVÁČ, 1998).

Využívá se při tomto procesu možnost vegetativního množení rostliny, které touto diferenciací rostlinu nijak nedegenerují a rostlina má schopnost opětného dělení. Buňky, které mají diferenciovaná pletiva se totiž neliší ve své genetické výbavě od buněk meristemických. Proces dělení se zakládá na tzv. diferenciační genové aktivitě, kdy se buňka specializuje na základě aktivace či inaktivace jednotlivých genů, které přísluší určitému rostlinnému druhu. V mnohých případech lze vyvolat diferenciaci a neorganizovaný růst změnou podmínek, kde se určitá buňka právě nachází. Dalo by se říci, že vhodné pro odvození explantátové kultury je teoreticky jakékoliv pletivo, které obsahuje buňky s funkčním jádrem (KOVÁČ, 1992).

Ve své podstatě se jedná o proces izolace buněk, pletiv a orgánů buněk a jejich kultivaci v podmínkách, kde je řízené prostředí a sterilní podmínky, do kterých se zahrnuje teplota, vlhkost, kvalita a kvantita světla. Veškeré části rostlin tedy mohou sloužit k založení



kultivace in vitro a za určitých podmínek mohou být dopěstovány v nové rostliny. Cyklus rostlina – explantát – kultura in vitro – organogeneze nebo embryogeneze – intaktní rostlina je uskutečnitelný a zcela možný. Využití explantátových kultur můžeme sledat ve vědeckém studiu, ale i při praktickém účelu v klonovém množení a šlechtění rostlin (SMITH, 2013).

### 3.9 Test patogenity

Testy se provádí na kulturách, které jsou náchylné k původci spály růžovitých. Prostředí, určené k provádění testů, musí být naprosto sterilní. K pěstování rostlinek se používají sterilní skleničky se speciálním kultivačním médiem. Používají se skleničky o výšce 7,0 cm a průměru 5,5 cm s uzavíratelným umělohmotným víčkem (KOKOŠKOVÁ a kol., 2009).

Na pasážování je vhodné použít jak vrcholové části rostlin, tak i jednonodální segmenty. Nevětvené rostliny se nastříhají na malé části, přitom každá z nich má minimálně jeden list s jedním axiálním pupenem. Jakmile se vloží části rostlinky dovnitř, sklenička se uzavře víčkem a ováže parafinem (KOKOŠKOVÁ a kol., 2009).

Skleničky s testovanými kulturami jsou kultivovány v termostatu při teplotě 25-26°C a při světelném režimu 16/8 (den/noc). Kultivace trvá čtyři týdny, kdy rostlinky mají požadovanou délku (nejmenší rostlinka může mít maximálně 4 cm). Větší rostlinky se zkracují na požadovanou velikost, aby se hodnotily pouze stejné části rostlinek (KOKOŠKOVÁ a kol., 2009).

Pro testy se používá metoda odstřížení vzrostlého vrcholu a nanesení inokula pipetou do odstříženého místa. Inokulace se provádí u rostlinek v délce 5 cm. Nejprve se odstříhne 1 cm vzrostlého vrcholu, odstřížené části je nutné odstranit ze skleničky. Následně se nanese pomocí pipety kapička inokula na místo stříhu a sklenička se uzavře. Musí se dávat pozor, aby inokulum neskápl na médium (KOKOŠKOVÁ a kol., 2009).

Maximální koncentrace bakteriální suspenze (ca 10<sup>8</sup> cfu/ml), která se rovná naměřené optické hustotě (OD) ~ 0,1 při 620 nm, se měří na spektrofotometru, zbylé koncentrace se

připraví desetinným ředěním. Každému testovanému izolátu v odpovídající koncentraci připadá 6 skleniček, z toho 2 jsou použity jako kontrolní (místo bakteriální suspenze se pipetou nanese sterilní voda). Skleničky s testovanými kulturami se kultivují při 26°C. Hodnocení se provádí od třetího do sedmého dne po inokulaci (KOKOŠKOVÁ a kol., 2009).

V případě, že se testují neznámé kmeny, použije se koncentrace 10<sup>5</sup> buněk/ml, při ověřování virulence testovaných kmenů, se použije koncentrace 10<sup>6</sup> buněk/ml (KOKOŠKOVÁ a kol., 2009).

Pomocí šestibodové stupnice se provádí hodnocení testů patogenity. Při zjištění příznaků napadení se provádí hodnocení podle počtu bakteriálních kapek na stonku a typického zbarvení na listu a dále podle velikosti nekrotické plochy na povrchu listu. První příznaky napadení se většinou objeví již 3. den po inokulaci. Hodnocení probíhá 5 následujících dnů, vždy ve stejný čas (KOKOŠKOVÁ a kol., 2009).

## **4. MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1 Lokalita**

V roce 2014 byly prováděny pokusy na letorostech kdouloní, které byly odebírány v sadě zemědělského družstva v Žabčicích. Je zde výsadba kdouloní. Ta byla založena v roce 2000. Materiál pro výsadbu byl získán z ústavu ovocnictví v Lednici z řady institucí i malopěstitelů a později byla výsadba doplňována o další odrůdy a genotypy z domácích i zahraničních zdrojů. Výsadba kdouloní je založena pásovým způsobem volně rostoucích zákrsků se sponem 0,4 x 2,5m. Udržování meziřadí se provádí černým úhorem. Během každého roku vegetačního období jsou hodnoceny fenologické, růstové, morfologické a sklizňové údaje. Ochrana je zde zaměřena pouze na předjarní ošetření. Ve výsadbě se nacházejí tyto odrůdy:

- Asenica, Bereckého, Blanar, BO-3, Brna, Buchlovice 1, Doubravnická, Hemus, Hruškovitá, Champion, Ironda, Izobilnaja, Jurák, Juranská, Kocúrova, Leskovačka, Mir, Morava, Muškátová, Otličnica, pinter, Selena, Šuranská, Triumph, Úspěch, Vranja, Portugalská, Ukrajinská

(NERUDA a kol., 2009)

### **4.2 Sledované odrůdy a jejich charakteristika**

K pokusům k vzhledem ke kvalitě letorostů a kvalitě pupenů byly vybrány tyto odrůdy:

Buchlovice 1, Hemus 2, BO 3, Otličnica, Leskovačka, Juranská, Jurák, Triumph, Šuranská, Ironda, Vranja, Úspěch, Bereckého, Mir, Doubravnická, Isobilnaja

Jedná se celkem o 16 odrůd.

#### 4.2.1 Specifikace některých odrůd

##### Bereckého

Jedná se o odrůdu známou již od roku 1898 pocházející z Maďarska a svoje jméno si zasloužila právě po významném maďarském pomologovi prof. Bereczkim (NEČAS, 2010). Plody jsou těžké a dosahují až 500 g. Mají hruškovitý tvar, jsou krásně žlutě zbarvené. Může se objevit slabé rýhování a také jsou lehce ochmýřené (BOČEK, 1957). Jejich dužnina je žlutavá a na některých místech masově zbarvená. Má velmi pevnou a suchou strukturu (NEČAS, 2010). Tyto plody jsou velmi aromatické a mají sladkou chuť (JANTRA, 1996). Nečas (2010) udává, že dužnina plodů obsahuje 13,5 % cukru při obsahu 0,4 % kyselin. Ovoce je vhodné ke konzervaci a pozdě se sklízí (KAMENICKÝ, KOHOUT, 1957). K dozrání plodů totiž dochází v druhé polovině října a při dobrém skladování vydrží až do ledna (NEČAS, 2010). Dle Jantry (1996) můžeme v teplých a chráněných oblastech počítat se sklizní pravidelnou a vysokou. Má vzpřímený a bujný růst a vytváří velké keře (ČERVENKA a kol., 1964). Pěstování této kdouloně se doporučuje jen v teplých polohách (KAMENICKÝ, KOHOUT, 1957). Nečas (2010) dodává, že jí svědčí provzdušněná půda. Boček (1957) ji doporučuje pěstovat ve větším měřítku a jedná se o odrůdu velmi rozšířenou na jižním Slovensku. Odrůda je velmi vitální a v Maďarsku ji považují za jednu z nejlepších (NEČAS, 2010).

##### Leskovačka

Její původ lze přiřazovat Srbsku, zemi bývalé Jugoslávie a její popis lze najít z roku 1898 (NEČAS, 2010). Má žluté plody, které jsou zeleně pruhované (BOČEK, 1957). Na rozdíl od jiných jsou tyto plody jablkovitého tvaru (JANTRA, 1996). Dosahují mimořádných velikostí (KAMENICKÝ, KOHOUT, 1957). Ve své domovině, tzn. na původním stanovišti dosahují váhy 1 – 1,5 kg (BOČEK, 1957). Plody mají velmi aromatickou a šťavnatou dužninu jasně žluté barvy, které dozrávají v průběhu října a jsou vhodné k výrobě hlavně džemů a marmelád (NEČAS, 2010). Boček (1957) naopak tvrdí, že dužnina je barvy bělavé a slouží jako výborná surovina ke různorodému zpracování. Pokud se plody uvaří, nakysle chutnají a mají kořenitou vůni (JANTRA, 1996). Tento strom či keř

je bujného vzrůstu, korunu má rozložitou s menšími drobnými listy (KAMENICKÝ, KOHOUT, 1957). Tyto listy jsou temně leskle zelené. Keř hojně rodí (BOČEK, 1957). Nečas (2010) pro změnu udává, že strom je středního růstu a také střední plodnosti. Je ceněna pro její odolnost vůči mrazu a lze ji proto pěstovat i v okrajových polohách.

### Vranja

Popsána byla také v roce 1898 a její původ je řazen jižnímu Srbsku. Tvar plodů je kuželovitý až hruškovitý a jejich váha činí 160 – 370 g (NEČAS, 2010). Kdoule mají sladkokyselou chuť a lehké kdoulové aroma. U této odrůdy můžeme očekávat velmi vysoké a pravidelné výnosy a to i na zahrádce (JANTRA, 1996). Keře jsou vzpřímeného a vzrůstného růstu. Poměrně brzy vykvétá a její plody dozrávají v polovině října. Má samosprašné květy (NEČAS, 2010). Dle Jantry (1996) není samosprašnost, podle posledních švýcarských výzkumů, plně potvrzena.

### Hemus

Tato odrůda pochází z Bulharska. Plody mají hruškovitý tvar s průměrnou hmotností 220 – 280 g. Plodnost této odrůdy kdouloně je velká a pravidelná. Plody dozrávají již v září, jelikož kvete raně až středně raně. Strom roste bujně a má vzpřímený růst (NEČAS, 2010).

### Nepopsané hruškovité odrůdy jsou:

Brna, Hruškovitá, Isobilnaja, Triumph,

### Nepopsané jablkovité odrůdy jsou:

Ironda, Selena, Morava, Doubravnická

## 4.3 Výzkum

### 4.3.1 Odběr

Odběry vegetativních částí jednotlivých odrůd kdouloní byly provedeny ve dvou termínech. V únoru pro zimní pupeny a v srpnu pro letní pupeny. Větve kdouloní s pupeny byly odebrány přímo v sadu školního družstva v Žabčicích a následně zpracovány v laboratoři a to tak, že větvičky byly nastříhány na segmenty se třemi až čtyřmi nody, které byly následně uchovány v ledničce pro další použití.

### 4.3.2 Povrchová sterilizace

Byla prováděna vždy před samotným ozdravovacím procesem antibiotiky. Účelem této sterilizace bylo odstranit veškeré nečistoty, které jsou na větvičkách obsaženy.

Samotná sterilizace byla tedy provedena tak, že do reagenční lahve (NTS lahve) byl vložen několik počet segmentů, aby počet pupenů na těchto segmentech dosahoval čísla deset. Láhev byla poté uzavřena gázou proti vyplavení a segmenty pak byly proplachovány po dobu pěti minut pod teplou tekoucí vodou a zároveň byl na gázu nalit saponát. Další část této sterilizace už probíhala ve sterilním prostředí flow boxu a byl vyzkoušen ve třech způsobech:

1. 0,2% roztok  $\text{HgCl}_2$

Segmenty byly propláchnuty 70% etanolem a následně byl tento roztok chloridu měďnatého vléván do lahve až do jejich úplného ponoření. Roztok byl zde ponechán osm minut a následně slit a obsah lahve se segmenty byl pak ještě třikrát propláchnut sterilní destilovanou vodou.

## 2. 0,1% roztok HgCl<sub>2</sub>

Do láhve se segmenty byl vléván stejný roztok jako v předchozím způsobu, liší se pouze jeho koncentrací, která je tentokrát nižší a doba ponechání segmentů v tomto roztoku se zvýšila na deset minut. Následovalo opět propláchnutí sterilní destilovanou vodou třikrát opakované.

## 3. 0,2% roztok HgCl<sub>2</sub> + 20% roztok Sava

Po stejné operaci jako u předchozích způsobů, kdy byly segmenty prolity roztokem chloridu rtuťnatého se segmenty ponořily do 20%ho roztoku Sava, kde se nechaly po dobu dvaceti minut a teprve pak následovalo opakované přelití sterilní destilovanou vodou.

Sterilizovány musely být také veškeré nástroje, které jsem k laboratorním pokusům potřebovala. Mezi ně náležela pinzeta a skalpel. Ty se nejdříve zabalily do alobalu a po té nechaly v horkovzdušném sterilizátoru po dobu 2-4 hodin. Pak ještě probíhala sterilizace během celého pokusu, kdy se jednotlivé použité pomůcky sterilizovaly nad plamenem plynového kahanu nebo v elektrické pícce.

Flowbox, ve kterém vždy probíhaly veškeré pokusy musel být taktéž sterilizován, aby se vytvořilo dokonalé sterilní prostředí. Ten se vždy nastavil tak, aby jím určitou dobu proudil vzduch a došlo k vyfoukání spór z filtru. Před započítím každého pokusu musel být celý jeho vnitřek vytřen 70% etylénem.

### 4.3.3 Preparace

Preparace pupenů probíhala vždy buď po povrchové sterilizaci segmentů, nebo při přepasážování jednotlivých explantátů na jiné médium. Postup preparace byl následující. Pupy byly pomocí sterilních nástrojů (pinzety a skalpelu) odříznuty od sterilní větvičky. Proběhlo odstranění vnějších obalů pupene tj. jeho šupin a to tak, aby zůstaly jen samotné zelené pupeny. Ty byly ihned po preparaci přeneseny na určené druhy médií do laboratorních nádob a dále kultivovány.

Nádoby sloužící k těmto účelům byly:

- Nádoby typu Magenta (Sigma-Aldrich), dále jen magenta
- Multiwel plate destičky 24 dílné
- Centrifugační zkumavky
- Plastové Petriho misky (6 cm)

#### **4.3.4 Kultivace**

Během kultivace docházelo k pravidelným kontrolám jednotlivých explantátů. Při zjištění jakékoliv kontaminace musely být explantáty náležitě zneškodněny. V případě, že pupeny byly zdravé, provádělo se přepasážování explantátů, které probíhalo většinou po 2 až 3 dnech.

#### **4.3.4 Média**

Základní složku médií tvoří mikroprvky, makroprvky, řada vitamínů, železo, rosolotvorné látky (agar, Phytigel, Gerlite), dále sacharóza a růstové regulátory (BAP – benzylaminopurin, NAA – kyselina naftyloctová).

Při pokusech byla do médií přidávána antimykotická směs (roztok směsi Antibiotik–antimykotik – Sigma Aldrich) a jako rosolotvorná látka byl zvolen agar. Důležité je také pH media, které by mělo dosahovat hodnot 5,5 – 5,8.

Pro kultivaci byly používány 3 druhy médií – WPM, MS a MP médium.



## Média a jejich složení

### 1. MP médium

Tab. 1 *Mikroelementy*

Prvky	mg/l	μM
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	0,25	1,00
<b>FeNaEDTA</b>	36,70	100,00
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6,20	100,27
<b>MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	22,30	131,94
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	0,25	1,03
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	8,60	29,91

Tab. 2 *Makroelementy*

Prvky	mg/l	mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	72,50	0,65
<b>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	471,26	2,35
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170,00	1,25
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	990,00	5,68
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	180,54	1,50
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	440	5,00

Tab. 3 *Vitamíny*

Prvky	mg/l	μM
<b>glycin</b>	2,00	26,64
<b>myo-inozitol</b>	100,00	554,94
<b>kyselina nikotinová</b>	0,50	4,06
<b>pyridoxin HCl</b>	0,50	2,43
<b>thiamin HCl</b>	1,00	2,96

Navíc ještě obsahuje:

- 1 g/l aktivního uhlí
- 20 g sacharózy
- 8 g agaru
- 0,6  $\mu\text{M}$  meta – topolinu
- 0,1  $\mu\text{M}$  IAA (kyselina indolyloctová)

## 2. McCOWN WOODY PLANT MEDIUM (WPM)

Tab. 4 *Mikroelementy*

<b>Prvky</b>	<b>mg/l</b>	<b><math>\mu\text{M}</math></b>
<b><math>\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}</math></b>	0,25	1,00
<b>FeNaEDTA</b>	36,70	100,00
<b><math>\text{H}_3\text{BO}_3</math></b>	6,20	100,27
<b><math>\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}</math></b>	22,30	131,94
<b><math>\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math></b>	0,25	1,03
<b><math>\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math></b>	8,60	29,91

Tab. 5 *Makroelementy*

<b>Prvky</b>	<b>mg/l</b>	<b>mM</b>
<b><math>\text{CaCl}_2</math></b>	72,50	0,65
<b><math>\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}</math></b>	471,26	2,35
<b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></b>	170,00	1,25
<b><math>\text{K}_2\text{SO}_4</math></b>	990,00	5,68

<b>MgSO<sub>4</sub></b>	180,54	1,50
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	440	5,00

Tab. 6 *Vitamíny*

<b>Prvky</b>	<b>mg/l</b>	<b>μM</b>
<b>glycin</b>	2,00	26,64
<b>myo-inozitol</b>	100,00	554,94
<b>kyselina nikotinová</b>	0,50	4,06
<b>pyridoxin HCl</b>	0,50	2,43
<b>thiamin HCl</b>	1,00	2,96

Dále ještě obsahuje:

- Roztok BAP – benzylaminopurin
- Roztok NAA – kyselina naftyloctová
- Antimykotickou směs
- Sacharózu

### 3. MURASHIGE & SKOOG MEDIUM (MS – médium M1)

Tab. 7 *Mikroelementy*

<b>Prvky</b>	<b>mg/l</b>	<b>μM</b>
<b>CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	0,025	0,11
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	0,025	0,10
<b>FeNaEDTA</b>	36,70	100,00
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6,20	100,27
<b>KI</b>	0,83	5,00

<b>MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	16,90	100,00
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	0,25	1,03
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	8,60	29,91

Tab. 8 Makroelementy

<b>Prvky</b>	<b>mg/l</b>	<b>mM</b>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	332,02	2,99
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170,00	1,25
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900,00	18,79
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	180,54	1,50
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1650,00	20,61

Tab. 9 Vitamíny

<b>Prvky</b>	<b>mg/l</b>	<b>μM</b>
<b>glycin</b>	2,00	26,64
<b>myo-inozitol</b>	100,00	554,94
<b>kyselina nikotinová</b>	0,50	4,06
<b>pyridoxin HCl</b>	0,50	2,43
<b>thiamin HCl</b>	0,10	0,30

Navíc je zde ještě:

- Aktivní uhlí
- Sacharóza a agar

## Příprava médií

Všechna výše uvedená média byla zhotovena na objem 1 l. Základem média je suchá směs mikroelementů, mikroelementů a vitamínů (2,5 g) (Duchefa), která ve svém složení obsahuje výše zmíněné elementy a při přípravě se rozpouští v destilované vodě a přidávají se do ní ještě další přídatné látky a látky ztužující.

### 1. MP médium

2,5 g suché směsi MP média bylo přidáváno do 900 ml sterilní destilované vody, dále 1 g aktivního uhlí, 8 g agaru, 20 g sacharózy, 0,6  $\mu\text{mol}$  roztoku meta – topolinu, 0,1  $\mu\text{mol}$  roztoku IAA a následně provedeno změření pH pomocí pH metru. Po změření pH se do roztoku přidávala směs antibiotic – antimykotik a roztok IAA, který se přidává pouze filtrací za studena. Po vpravení všech důležitých částí byla celková směs dolita sterilní destilovanou vodou na objem 1 l. Po sterilizaci se toto médium již nevkládá do autoklávu, jelikož obsažené IAA se v autoklávu degraduje.

### 2. WMP médium

Jedná se o tekuté médium, do kterého nebyla přidána žádná ztužující složka. Suchá směs (2,46 g) WMP média byla rozmíchána v 900 ml sterilní destilované vody a byl přidán 1 mg BAP (benzylaminopurin) a 0,1 mg NAA (kyselina naftyloctová). Následně bylo změřeno pH celé směsi, které by se mělo pohybovat v rozmezí 5,5 – 5,8. Po tomto měření byla přidána ještě sacharóza (20 g) a pak byl celý roztok vložen do autoklávu Tuttnauer na 90 minut, z čehož 15 minut uvedené doby trvala samotná sterilizace při teplotě 121 °C a tlaku 125 kPa. Po uplynutí 90ti minut byl celý roztok přenesen do sterilního flowboxu, kde byly již nachystané sterilní nádoby, do kterých měl být roztok nalit. Do roztoku se ještě přidíví antimykotická směs a to již výše zmíněnou filtrací za studena. K této filtraci se používá stříkačka, která je vybavena jednorázovým sterilním filtrem (Whatmanpuradiscs) s póry o průměru 0,25  $\mu\text{m}$  (Jde o tak malou velikost, aby byl zamezen průnik plísní, bakterií a kvasinek). Nakonec je celý roztok doplněn na 1 l destilovanou vodou a řádně zamíchán a následně byla směs nalita do jednotlivých připravených sterilních nádob, které byly pečlivě uzavřeny a připraveny k použití.

### 3. MS médium M1 s agarem

Do jednoho litru vysterilizované destilované vody bylo přidáno 2,2 g suché směsi MS média a 1 g aktivního uhlí. Roztok byl po té změřen pH metrem, jehož hodnota pH se musí pohybovat ve stejných odnosech jako u předchozích médií 5,5 – 5,8. Následovalo přidání 15ti gramů sacharózy a roztok byl rozdělen na dvě poloviny do kádinek. Do každé poloviny byly přidány 4 g agarů, což je při přepočtu 8g agarů na 1l média. Následně byla každá směs rozvařena v mikrovlnné troubě a po té oba roztoky zase smíchány dohromady. Vzniklá směs byla po 50ti mililitrech nalita do připravených laboratorních nádobek, které se pak vložily do autoklávu k jejich vysterilizování při stejné teplotě a tlaku jako u předchozího média.

### 4. MS médium M1 bez agarů

Průběh přípravy tohoto média je stejný jako je tomu u MS média M1 s agarem jen s tím rozdílem, že neobsahuje agar, tudíž se do ní žádný agar nepřidává a nemusí se proto vařit v mikrovlnné troubě a dělit na dvě poloviny.

#### **4.3.6 Použitá antibiotika**

Problémy s kontaminací v explantátové kultuře mělo mnoho výzkumných středisek, a proto se mnoho pracovníků rozhodlo začlenit do kultivačního média fungicidy a baktericidy. Antibiotika tedy byla zkoumána, jejich původ, činnost a odolnost explantátových kultur vůči nim. Běžně používaná antibiotika jsou Timentin, Karbenicilin, Cefotaxim a Augmentin a Streptomycin (SMITH, 2013)

Antibiotika jsou rozpustná ve vodě, měla by být používána čerstvá a do média by měla být přidávána po autoklávování (Smith, 2013).

V bakalářské práci jsem z nich k použití vybrala tyto:

### **CEFOTAXIM SODNÝ**

Patří do skupiny cefalosporinů, které svou strukturou i antibakteriálním účinkem se podobají širokospektrým penicilinům (HEJZLAR, 1980). Inhibují syntézu bakteriální buněčné stěny. Jeho účinnost je vysoká vůči gram-negativním bakteriím (HOFMANWEG - Duchefa). Účinkuje většinou baktericidně a to i na gram-pozitivní bakterie s výjimkou *pseudomonas* a indolpozitivních proteových kmenů. Má nízkou toxicitu (HEJZLAR, 1980).

### **STREPTOMYCIN SULFÁT**

Patří do skupiny Aminoglykosidů. Převládá u něj přítomnost bazických oligosacharidů. Patří do skupiny antibiotik, které obsahují cyklohexanový kruh (HEJZLAR, 1980). Jeho účinek je baktericidní proti mnoha gram-negativním bakteriím (HOFMANWEG – Duchefa). Všechna antibiotika řadící se do této skupiny obsahují v molekule speciální aminocukry (např. streptobiosamin v molekule streptomycinu). Pro jejich antibakteriální účinek jsou rozhodující v první řadě hydroxylové skupiny, zatímco jejich aminoskupiny jsou důležité pro vazbu antibiotika na bakteriální ribosomy. Streptomycin je relativně značně toxický. Mechanismus účinku spočívá v zásahu do proteosyntézy na úrovni 30S ribosomálních podjednotek.

### **AUGMENTIN**

Toto antibiotikum se řadí do skupiny Penicilinů, které jsou produktem plísní *Penicilium notatum* a *Penicilium chrysogenum*. Základ molekuly tvoří 6-aminopenicilanová kyselina. Pro antibakteriální účinek je rozhodující neporušená laktamová vazba jádra molekuly a pak funkčně volná karboxylová skupina. Účinek antibiotika spočívá v zásahu do buněčné stěny bakterií. Má převážně baktericidní účinek.

#### 4.3.5 Test patogenity

Jako médium pro test patogenity byl zvolen masopeptonový agar (MPA) v množství 1 l, na který bylo použito 12 g Nutrient agaru – 2, 2 g glukózy a 10 g agaru. Po té muselo být upraveno pH na 7,0 – 7,2 a proběhla sterilizace v autoklávu Tuttnauer po dobu 15 minut při 125°C. Takto nachystané médium bylo následně rozlito do sterilních Petriho misek a médium se nechalo vychladnout. Po té bylo připraveno k použití a byly na něj naneseny explantáty, které přežily z prováděných pokusů. Dále probíhala jejich kultivace po dobu 14ti dnů. Po této době byly explantáty umístěné v Petriho miskách předány pracovišti Fytopatologie rostlin, aby bylo provedeno zhodnocení, zda je *Erwinia amylovora* přítomná.

### 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Základ použitých odrůd tvořily vždy tyto odrůdy:

1. Buchlovice 1
2. Hemus 2
3. BO – 3
4. Otličnica
5. Leskovačka
6. Juranská

Základ používaných antibiotik tvoří tyto antibiotika o koncentraci:

1. Augumentin – 0,05g/100 ml
2. Cefotaxim – 0,05g/100 ml
3. Streptomycin – 0,05g/100 ml

Pokusů bylo celkem založeno 7.



Postup jednotlivých pokusů:

1. Nastříhání letorostů na segmenty se třemi až čtyřmi nody
2. Sterilizace nastříhaných segmentů
3. (Preparace pupenů) – nebyla u všech pokusů ve stejném pořadí
4. Napíchání nebo vložení segmentů nebo pupenů do živného média
5. Navážení a namíchání antibiotik
6. Přidání antibiotik k explantátům
7. Uchování explantátů v kultivační místnosti

## 5.1 Pokus č. 1

Tab. 10 *Vyhodnocení pokusu č. 1*

Odrůda	Segment počet	Sterilizace	Antibiotikum	Koncen - trace antibiotika (g/ml)	Médium	Výsledek
Buchlovice 1	Větvička s pupeny 3 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Augmentin	0,05	MS médium M1 agar	kontaminace
			Cefotaxim	0,05	MS médium M1 agar	kontaminace
			Streptomycin	0,05	MS médium M1 agar	kontaminace
Hemus 2	Větvička s pupeny	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Augmentin	0,05	MS médium M1 agar	kontaminace

	3 ks		Cefotaxim	0,05	MS médium M1 agar	kontaminace
			Streptomycin	0,05	MS médium M1 agar	kontaminace
BO - 3	Větvička s pupeny 3 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Augmentin	0,05	MS médium M1 agar	hnědé
			Cefotaxim	0,05	MS médium M1 agar	kontaminace
			Streptomycin	0,05	MS médium M1 agar	hnědé
Otlíčnica	Větvička s pupeny 3 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Augmentin	0,05	MS médium M1 agar	kontaminace
			Cefotaxim	0,05	MS médium M1 agar	kontaminace
			Streptomycin	0,05	MS médium M1 agar	kontaminace
Leskovačka	Větvička s pupeny 3 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Augmentin	0,05	MS médium M1 agar	hnědé
			Cefotaxim	0,05	MS médium M1 agar	Živé
			Streptomycin	0,05	MS médium	Živé

Juranská	Větvička s pupeny 3 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Augmentin	0,05	M1 agar	Hnědé
			Cefotaxim	0,05	MS médium M1 agar	Hnědé
			Streptomycin	0,05	MS médium M1 agar	Hnědé

Pokus byl vyhodnocen po týdnu kultivace explantátů. Jednotlivé segmenty se kultivovaly po třech kusech v dobře uzavřených magentách. Po této době byla většina pupenů kontaminována nebo zhnědla, což je důkaz uhynutí segmentu. Ty segmenty, které po této době jevíly známky života po další krátké době kultivace uhynuly.

Tento negativní výsledek může mít několik příčin:

#### 1. Příčiny kontaminace

- Větvičky s pupeny byly v živném médiu s antibiotiky příliš dlouhou dobu
- Nebyl správně dodržen postup sterility
- Byl velmi silný projev endogenních chorob, které se nacházely přímo v pupenech, jelikož povrch pupenů byl sterilizován

#### 2. Příčiny zhnědnutí

- Byla zvolena příliš vysoká koncentrace antibiotik
- Špatná doba odběru letorostů, byly vystaveny příliš dlouhou dobu působení vlivů z vnějšího prostředí a tím došlo zřejmě k napadení i jinými patogeny, čímž byly letorosty oslabeny a nebyly proto zcela životaschopné

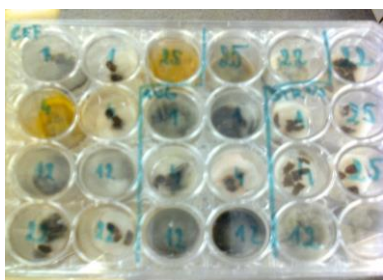
## 5.2 Pokus č. 2

Tab. 11 *Vyhodnocení pokusu č. 2*

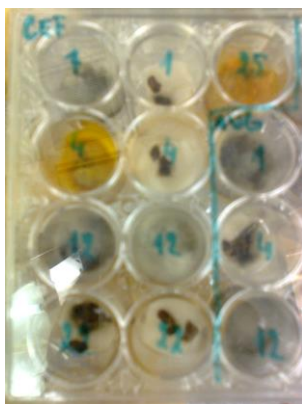
Odrůda	Segment počet	Sterilizace	Antibioti- kum	Koncent race antibioti- ka(g/ml)	Médium	Výsledek
Buchlovice 1	Pupeny 10 ks	0,2%	Augmentin	0,05		Kontami nace
		HgCl <sub>2</sub>				
		+20% roztok Sava	Cefotaxim	0,05		Hnědé
			Streptomycin	0,05		Hnědé
Hemus 2	Pupeny 10 ks	0,2%	Augmentin	0,05		Hnědé
		HgCl <sub>2</sub>				
		+20%rozt ok Sava	Cefotaxim	0,05		Kontami nace
			Streptomycin	0,05		Hnědé
BO - 3	Pupeny 10 ks	0,2%	Augmentin	0,05		Kontami nace
		HgCl <sub>2</sub>				
		+20% roztok Sava	Cefotaxim	0,05		Kontami nace
			Streptomycin	0,05		Kontami nace
Otlíčnica	Pupeny 10 ks	0,2%	Augmentin	0,05		Hnědé
		HgCl <sub>2</sub>				
		+20% roztok Sava	Cefotaxim	0,05		Kontami nace
			Streptomycin	0,05		Hnědé
Leskovačka	Pupeny	0,2%	Augmentin	0,05		Kontami

10 ks	HgCl <sub>2</sub>		nace
	+20%	Cefotaxim	0,05
	roztok		Kontami nace
	Sava	Streptomycin	0,05
			Hnědé

Kultivace pupenů v tomto pokusu byla prováděna na multiwelplate destičkách s 24mi jamkami a trvala opět 7 dnů. Výsledek byl opět negativní. Ve všech jamkách byly projevy kontaminace nebo zhnědnutí až zčernání, tudíž nepřežil ani jeden pupen. Pupy, u kterých nebyla shledána žádná kontaminace, mohly být antibiotikem pozitivně ovlivněny, ale nebyly dostatečně životaschopné.



Obr. 4 Kultivace na multiwelplate destičkách (autor)



Obr. 5 Detailní snímek výsledku kultivace na multiwelplate destičkách (autor)

### 5.3 Pokus č. 3

Vzhledem k výsledkům z předchozích pokusů č. 1 a č. 2 byly zvolené trochu odlišné parametry pro kultivaci a také jiné laboratorní pomůcky. Po oddělení pupenů od větviček byly tyto pupeny vloženy do centrifugačních zkumavek, zality 5 ml určitého antibiotika a ponechány kultivaci 4 dny ve tmě. Po čtyřech dnech došlo k jejich přenesení na tuhé medium MP, kde byly nadále kultivovány po dobu sedmi dnů.

Tab. 12 *Vyhodnocení pokusu č. 3*

Antibiotikum→ Odrůda ↓	Augmentin		Cefotaxim		Streptomycin	
	ZKUM	MÉD	ZKUM	MÉD	ZKUM	MÉD
	5 ml		5 ml		5 ml	
<b>Buchlovice 1</b>	Živé	Živé	Živé	Živé	Živé	Kontaminace
<b>Hemus 2</b>	Živé	Kontaminace	Živé	Živé	Živé	Živé
<b>BO – 3</b>	Živé	Kontaminace	Živé	Živé	Živé	Kontaminace
<b>Otličnica</b>	Živé	Živé	Živé	Živé	Živé	Kontaminace
<b>Leskovačka</b>	Živé	Kontaminace	Živé	Živé	Živé	Kontaminace
<b>Juranská</b>	Kont.	-	Živé	Živé	Kont.	-

ZKUM – zkumavka s tekutým médiem WPM

MÉD – tuhé médium MP

Z tabulky plyne, že pupeny po ponoření v jakémkoli antibiotiku v naprosté většině přežily, výjimku tvoří odrůda Juranská, která zplesnivěla už v této fázi u antibiotik cefotaxim a augmentin, proto předělávána na živné médium ani nebyla. Z tabulky dále vyplývá, že antibiotikum streptomycin se jeví jako velice působivé, jelikož nedošlo ke zplesnivění ani jedné odrůdy, což ho činí stoprocentně úspěšným. U antibiotik cefotaxim a

augmentin ke zplsnivění pupenů došlo vždy pouze při přenosu na živné médium (výjimku tvoří odrůda Juranská). Na živném médiu pak došlo ke zplsnivění vždy třech odrůd z pěti (vyjímaje odrůdu Juranská), z čehož můžeme usuzovat, že účinnost pak těchto dvou antibiotik je 60%.

Z výsledků jednotlivých odrůd vyplývá toto:

- Pupeny odrůd, které zkontaminovaly pouze v jednom druhu antibiotik, mohly být při předělávání na médium kontaminovány nedodržením sterility nebo na odrůdu nemělo určité antibiotikum pozitivní účinek
- Odrůdy, které zkontaminovaly při procesu předělávání na médium ve více druzích antibiotik, nebyly nejspíš antibiotiky vůbec ovlivněny a pupeny nebyly schopné roztok antibiotika do sebe absorbovat, nebo se jedná o odrůdy příliš promořené organizmy, na které použitá antibiotika neúčinkovala

#### 5.4 Pokus č. 4

Tento pokus byl založen pouze u dvou odrůd a vzhledem k pozitivním výsledkům předchozího pokusu antibiotika streptomycin, bylo pro tento pokus zvoleno jako jediné.

Tab. 13 *Vyhodnocení pokusu č. 4*

Odrůda	koncentrace antibiotika (g/ml)	Antibiotikum		Výsledek
Jurák	0,05	Streptomycin	MS m.M1 agar	Kontaminace
			WPM médium	Kontaminace

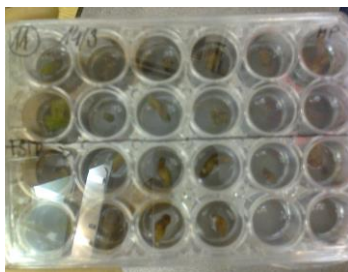
Leskovačka	0,05	Streptomycin	MS m.M1 agar	Kontaminace
			WPM médium	Hnědé

V pokusu byly pupeny zároveň zalaty antibiotikem do zkumavek s WPM médium a zároveň kultivovány na MS médium M1 agaru po stejnou dobu deseti dnů. Zplesnivěly obě odrůdy v obou případech kromě odrůdy Leskovačka, ta v kultivaci ve zkumavce kontaminována nebyla, ale zhnědla, což je následek nepřežití pupenu, jeho úhyn.

## 5.5 Pokus č. 5

Tab. 14 *Vyhodnocení pokusu č. 5*

Odrůda	Sterilizace	Antibiotikum	Médium	Počet kusů
Doubřavnická	0,1% HgCl <sub>2</sub>	Streptomycin	MS médium	10
			M1 bez agaru + antibiotikum	
			MS médium	10
			M1 bez agaru	
			MP médium	10



Obr. 6 *Založení pokusu č. 5, jednotlivé pupeny (autor)*





Obr. 7 Detailní snímek jednotlivých pupenů při založení (autor)

Pokus se zakládal pouze na jedné odrůdě Doubravnická, která byla sterilizována slabším roztokem chloridu rtuťnatého. Ke kultivaci byly použity tři média a kultivace trvala 5 dní v polosvětle a po té byla odrůda takto vyhodnocena:

- **MS medium M1 bez agaru + streptomycin - 7 pupenů uhynulo, 3 přežily**
- **MS medium M1 bez agaru – 2 pupeny kontaminovány, 6 pupenů uhynulých, 2 přežily**
- **MP medium – 1 pupen kontaminace, 6 pupenů uhynulých, 3 přežily**

Vysoký úhyn můžeme přisuzovat malé odolnosti odrůdy nebo i jejímu stáří, jelikož po celou dobu byly letorosty uchovávány v ledničce, tudíž ztrácejí svou čerstvost, odolnost a kvalitu. Kontaminace mohla být způsobená nedodržením sterility, jelikož ke kontaminaci došlo pouze u tří pupenů.

Celkově se odrůda jeví jako méně odolná, nebo na ni zvolené antibiotikum nemělo dostatečný vliv.

## 5.6 Pokus č. 6

K tomuto pokusu byly vybrány odrůdy, které se v předchozích pokusech jeví nejlépe a odrůdy, které dosud testovány nebyly, jejich počet je 12.

Tab. 15 *Vyhodnocení pokusu č. 6*

Odrůda	Explan- tát  počet	Sterilizace	Antibioti- kum	Koncen - trace antibioti- ka (g/ml)	Médium	Výsledek
Izobilnaja	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Kontami- nace
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Kontami- nace
			Streptomycin	0,05	MP médium	Hnědé
Mir	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Kontami- nace
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Položivé
			Streptomycin	0,05	MP médium	Položivé
Vranja	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Položivé
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Živé
			Streptomycin	0,05	MP médium	Kontami- nace
Otličnica	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Kontami- nace
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Hnědé
			Streptomycin	0,05	MP médium	Hnědé

Leskovačka	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Živé
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Hnědé
			Streptomycin	0,05	MP médium	Položivé
Juranská	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Kontami- nace
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Hnědé
			Streptomycin	0,05	MP médium	Hnědé
Hemus 2	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Hnědé
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Položivé
			Streptomycin	0,05	MP médium	Hnědé
Šuranská	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Hnědé
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Živé
			Streptomycin	0,05	MP médium	Hnědé
Ironda	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Kontami- nace
			Cefotaxim	0,05		Kontami- nace
			Streptomycin	0,05		Kontami-

					nace	
Úspěch	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Kontami- nace
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Kontami- nace
			Streptomycin	0,05	MP médium	Kontami- nace
Bereckého	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Kontami- nace
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Kontami- nace
			Streptomycin	0,05	MP médium	Kontami- nace
Triumph	Větvička s pupeny 6 ks	0,2% HgCl <sub>2</sub>	Kontrola		MP médium	Kontami- nace
			Cefotaxim	0,05	MP médium	Kontami- nace
			Streptomycin	0,05	MP médium	Kontami- nace

Větvičky s pupeny, které byly v médiu s antibiotiky, byly přepasážovány po třech dnech na tekuté médium WPM. Celkově kultivace explantátů trvala 14 dní v polosvětle.

Živé zůstaly pouze tři odrůdy:

- Leskovačka – kontrola
- Vranja – cefotaxime
- Šuranská – cefotaxime

Nejlépe se tedy prokázalo antibiotikum cefotaxim.

Položivých zůstalo více odrůd:

- Mir – cefotaxim, streptomycin
- Vranja – kontrola
- Leskovačka – streptomycin
- Hemus 2 – cefotaxim

Ovšem v tomto případě je malá pravděpodobnost, že větvičky s pupeny přežijí, protože se na nich jevíly známky hnědnutí a tvorby hnědého kalusu.

Ostatní odrůdy buď zhnědly nebo došlo ke kontaminaci. Příčiny kontaminace a zhnědnutí pupenů mohou mít stejné důvody, jako je tomu v pokusu č. 1.

## 5.7 Pokus č. 7

K tomuto pokusu byly použity již odrůdy z letního odběru nových letorostů. Koncentrace antibiotik je stejná jako u předchozích pokusů.

Tab. 16 *Vyhodnocení pokusu č. 7*

Odrůda	Explantát	Sterilizace	Médium	Ošetření	Výsledek
<b>Buchlovice 1</b>	Větvičky s pupeny 10	0,2% HgCl <sub>2</sub>	WPM médium	Kontrola	Kontaminace
				Cefotaxim	Kontaminace
				Streptomycin	Kontaminace
<b>Hemus 2</b>	Větvičky	0,2%	WPM	Kontrola	Kontaminace

<b>BO – 3</b>	s pupeny	HgCl <sub>2</sub>	médium	Cefotaxim	Kontaminace
	10			Streptomycin	Kontaminace
	Větvičky s pupeny	0,2% HgCl <sub>2</sub>	WPM médium	Kontrola	Kontaminace
<b>Otličnica</b>	10			Cefotaxim	Kontaminace
				Streptomycin	Kontaminace
	Větvičky s pupeny	0,2% HgCl <sub>2</sub>	WPM médium	Kontrola	Kontaminace
<b>Leskovačka</b>	10			Cefotaxim	Kontaminace
				Streptomycin	Kontaminace
	Větvičky s pupeny	0,2% HgCl <sub>2</sub>	WPM médium	Kontrola	Kontaminace
<b>Juranská</b>	10			Cefotaxim	Kontaminace
				Streptomycin	Kontaminace
	Větvičky s pupeny	0,2% HgCl <sub>2</sub>	WPM médium	Kontrola	Kontaminace
<b>Triumph</b>	10			Cefotaxim	Kontaminace
				Streptomycin	Kontaminace
	Větvičky s pupeny	0,2% HgCl <sub>2</sub>	WPM médium	Kontrola	Kontaminace
<b>Šuranská</b>	10			Cefotaxim	Kontaminace
				Streptomycin	Kontaminace
	Větvičky s pupeny	0,2% HgCl <sub>2</sub>	WPM médium	Kontrola	Kontaminace

Ke kultivaci byly použity větvičky se třemi až čtyřmi nody. Kultivovány byly ve tmě, aby nedošlo k degradaci antibiotik. Po jednom dni byly explantáty kontrolovány a náznaky kontaminace ani hnědnutí nebyly žádné. Po týdnů již byla jasně viditelná kontaminace skoro u všech odrůd a u všech ošetření. Důvodem kontaminace všech explantátů mohl

být pozdě provedený odběr letorostů, jelikož ten se prováděl v srpnu, kdy pupeny už byly infikovány mnoha patogeny a letorosty s pupeny na infekci měly dostatečně dlouhou dobu. Pokud by byly pupeny odebrány dříve, například v červnu, nemuselo by k takovému výsledku dojít, ale to je pouze odhad situace. Je také jasné, že ani sterilizace neměla na explantáty žádný vliv, nebo byl projev endogenních patogenů příliš silný.



Obr. 8 Zkumavky při založení letního pokusu (autor)



Obr. 9 Detailní snímek explantátu ve zkumavce s živným médiem (autor)

Vyhodnocení výsledků není v kapitole prodiskutováno. Je to proto, že ještě nikdo se nezabýval problematikou testování antibiotik na meristémových kulturách u kdouloně. Výsledky proto nebylo možné s nikým porovnat.



## 6. ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo ozdravit nemocné letorosty méně známého druhu ovocného keře kdouloně obecné (*Cydonia oblonga* Mill.), která trpí spálou růžovitých způsobenou patogenem *Erwinia amylovora* pomocí různých druhů antibiotik v *in vitro* kultuře a seznámit se s problematikou tohoto ovocného druhu, jeho pěstování a problematikou ozdravování pomocí antibiotik.

Práce byla proto rozdělena na dvě části. První část se zabývá charakteristikou kdouloně obecné (*Cydonia oblonga* Mill.), její historií, způsobem pěstování a množení, nároky na prostředí, využitím plodů a zmínka je také o nejčastějších škůdcích a chorobách, kde je více přiblížena bakteriální spála růžovitých, která je hlavním důvodem celého výzkumu. Další kapitola se zabývá vlastnostmi antibiotik, jejich účinku a toxicitě. V následné metodice byl prováděn test patogenity, který byl v této první části obecně popsán spolu s vlastnostmi explantátových kultur.

Druhá část je věnována jednotlivým odrudám kdouloně, které byly k pokusům nezbytné, jejich zpracováním, přípravě ke kultivaci a ošetření antibiotikem. Jsou zde zahrnuty také pokusy, které na jednotlivých letorostech probíhaly. Výsledky pokusů se nejevily jednoznačně, pouze v pokusu č. 3 mělo stoprocentní úspěšnost antibiotikum Streptomycin, kdy nedošlo k jediné kontaminaci vybraných pupenů. U ostatních antibiotik se jejich úspěšnost velice střídá, což může být také způsobeno různou citlivostí vybraných odrůd, jejich vitalitou a množstvím napadení jinými endogenními patogeny.

I testované pupeny jednotlivých odrůd sejevily velice variabilně. Nejlépe ze všech odrůd se ovšemjevila odrůda Leskovačka, jejíž explantáty dokázaly přežít ve vícero pokusech. Naprostá většina byla z různých příčin kontaminována. Takto silnou kontaminaci lze přisoudit mnoha příčinám a důvodům, ovšem jako prvotní příčinu lze brát v potaz už samotné doby odběru letorostů, které probíhaly v příliš pozdním období a byly tedy vystaveny dlouhou dobu působení mnoha vnějším činitelům a endogenním

patogenům. Materiál tudíž již na počátku všech pokusů nemusel být v dobrém zdravotním stavu.

Na konci práce byl proveden test patogenity, který výskyt testovaného patogena neprokázal, z čehož plyne, že léčba tohoto patogena mohla být účinná, ovšem jeho přežití znemožňoval výskyt jiných závažných onemocnění, kterými explantáty trpěly, či jejich celková špatná vitalita. V experimentech by se mělo dále pokračovat, především otestovat účinnou koncentraci Streptomycinu na červnových odběrech letorostů.

..

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

BOČEK, O. 1957: *Pomology*. Vyd. 3. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 212 s.

BOLLINGER, M., HELD, H. 1998: *Keře*. Vyd. 1. Nakladatelství IKAR, Praha, 287 s. ISBN 80-7202-302-0.

ČERVENKA, K. a kol. 1964: *Ovocnictví*. Vyd. 1. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 324 s.

HEJZLAR, M., TEPLÝ, M., HYLMAR, B. 1980: *Antibiotika a jejich použití v potravinářství a zemědělství*. 1. vyd. SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha, 282 s. ISBN 07-806-80.

HOFMANWEG, A. : *Antibiotika duchefa- biochemie. com*. Databáze online [cit.2015-04-28]. Dostupné z: <https://www.duchefa-biochemie.com>

HRIČOVSKÝ, I., SUS, J., ŘEZNÍČEK, V. 2003: *Jabloně a hrušně, kdouloně, mišpule*. 1. vyd. Příroda, Bratislava, 104 s. ISBN 80-07-11223-5.

KAMENICKÝ, K., KOHOUTEK. 1957: *Atlas tržních odrůd ovoce*. 3., opr. a rozš. vyd., (v SZN 1. vyd.). Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 345 s.

KOVÁČ, J. 1992: *Explantátové kultury rostlin*. Pedagogická fakulta Ústí nad Labem, Ústí nad Labem, 148 s. ISBN 80-7044-036-8.

NEČAS, T. 2010: *Pěstujeme hrušně a kdouloně*. 1. Vyd. , Grada, Praha, 102 s., [8] s. barev. obr. příl. ISBN 978-80-247-2500-0.

NERUDA, J. 2009: *Vysokoškolské statky Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, 313 s. ISBN 978-80-7375-306-1.

PAPRŠTEIN, F., PATZAK, J. 2007: *Spála růžovitých u jádrovin a molekulární genetika: metodika : výstup z projektu QF 4041 Studium rezistence ke spále růžovitých u jabloní a hrušní pomocí molekulární genetiky*. Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy, Holovousy, 53 s. ISBN 978-80-87030-05-9.

RICHTER, M. 2004: *Malý obrazový atlas odrůd ovoce* 3.vydání. 1. TG Tisk, Lanškroun, 120 s. ISBN 80-903487-2-6.

SMITH, H., R. 2013: *Plant tissue culture. Techniques and experimes*. Third edition. Amsterdam: Academic Press , USA, 188 s. ISBN 978-0-12-415920-4.

TETERA, V. a kol. 2006: *Ovoce bílých Karpat*. Vyd. 1. Základní organizace ČSOP Bílé Karpaty, Veselí nad Moravou, 309 s. ISBN 80-903444-5-3.

TRAHELMUT, J. 1994: *Ovocná zahrada*. Vydavatelství a nakladatelství Blesk, Ostrava, 157 s. ISBN 80-85606-74-7.

VERMEULEN, N. 1998: *Encyklopedie stromů a keřů*. Vyd. 1. REBO production, Praha ISBN 80-7234-007-7.

VILKUS E., a kol. 2000: *Rozmnožování ovocných a okrasných dřevin: základy školkařství*. 2. vyd. Květ, Praha, 103 s. ISBN 80-85362-32-5

## **8. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ**

Tabulky:

Tab. 1 *Mikroelementy*

Tab. 2 *Makroelementy*

Tab. 3 *Vitamíny*

Tab. 4 *Mikroelementy*

Tab. 5 *Makroelementy*

Tab. 6 *Vitamíny*

Tab. 7 *Mikroelementy*

Tab. 8 *Makroelementy*

Tab. 9 *Vitamíny*

Tab. 10 *Vyhodnocení pokusu č. 1*

Tab. 11 *Vyhodnocení pokusu č. 2*

Tab. 12 *Vyhodnocení pokusu č. 3*

Tab. 13 *Vyhodnocení pokusu č. 4*

Tab. 14 *Vyhodnocení pokusu č. 5*

Tab. 15 *Vyhodnocení pokusu č. 6*

Tab. 16 *Vyhodnocení pokusu č. 7*

Obrázky:

Obr. 1 *Plody kdouloní*

Obr. 2 *Plod kdouloně*

Obr. 3 *Příznaky spály růžovitých*

Obr. 4 *Kultivace na multiwelplate destičkách*

Obr. 5 *Detailní snímek výsledku kultivace na multiwelplate destičkách*

Obr. 6 *Založení pokusu č. 5, jednotlivé pupeny*

Obr. 7 *Detailní snímek jednotlivých pupenů při založení*

Obr. 8 *Zkumavky při založení letního pokusu*