

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav biologie rostlin



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



**Studium možnosti využití termoterapie při eliminaci
spály růžovitých u kdouloně**

Bakalářská práce

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

Vypracovala:
Aneta Nečasová

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Studium možnosti využití termoterapie při eliminaci spály růžovitých u kdouloně vypracovala 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 vědoma, 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

Ráda bych poděkovala především vedoucí bakalářské práce, Ing. Heleně Vlašínové, PhD., za její ochotu, trpělivost, pevné nervy a cenné rady a připomínky při zpracování bakalářské práce.

Také bych chtěla poděkovat Martině Jůzové za veškerou pomoc v laboratoři v průběhu experimentu a Ing. Janě Víchové, PhD. za vyhodnocení testu patogenity. Dále děkuji všem, kteří mě v průběhu studia a zpracování bakalářské práce podporovali, zejména své rodině a spolužákům.

ABSTRAKT

Studium možnosti využití termoterapie při eliminaci spály růžovitých u kdouloně

V jarním a letním období 2014 byly odebrány letorosty kdouloní s vegetativními pupeny. Na jaře to byly pupeny zimní a v létě pak pupeny založené na následující sezónu. Zdrojem letorostů byly kdouloně pěstované ve Školním zemědělském podniku Žabčice. K pokusům bylo postupně vybráno celkem 14 odrůd kdouloní. Na těchto odrůdách byl sledován výskyt původce choroby bakteriální spály růžovitých *Erwinia amylovora*. Byly testovány různé intervaly teplot kultivace, při kterých by mohla být přítomnost patogena eliminována. Dále byl ve spolupráci s pracovištěm Fytopatologie rostlin proveden test patogenity, který výskyt tohoto patogena neprokázal, avšak genový sad v Žabčicích touto chorobou napaden je. Nelze tedy s jistotou říci, zda se metoda termoterapie jeví jako účinný způsob pro léčbu této choroby.

Klíčová slova: kdouloň obecná, *Erwinia amylovora*, termoterapie, *in vitro*

ABSTRACT

Study of the possibility of using thermotherapy for elimination of Fire blight on quince

The annual shoots of quinces were taken in the spring and summer of 2014 with vegetative sprouts. In the spring they were winter sprouts and in the summer the sprouts were ready for another season. The sources of the annual shoots were quinces grown in Školní zemědělský podnik Žabčice. 14 other varieties of quinces were chosen for testing. The originator of fire blight the *Erwinia amylovora* was located on these varieties. Different temperature intervals of cultivation were tested where the presence of the pathogen could have been eliminated. Moreover the test of pathogenicity in cooperation with Fytopatologie rostlin, which have not proved the presence of that pathogen, while orchard in Žabčice is attacked by it. So there is no certainty in saying that thermotherapy is presenting itself as efficient way to treat this sickness.

Key words: quince, *Erwinia amylovora*, thermotherapy, *in vitro*

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL PRÁCE.....	11
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1	Botanické zařazení kdouloně obecné (<i>Cydonia oblonga</i> Mill.).....	12
3.2	Botanická charakteristika.....	12
3.3	Choroby a škůdci	13
3.3.1	Vybraní nejčastější škůdci	13
3.3.2	Vybrané nejčastější choroby	13
3.4	<i>Erwinia amylovora</i>	13
3.4.1	Hostitelské rostliny	14
3.4.2	Symptomy	14
3.4.3	Infekční cyklus patogena	17
3.4.4	Způsoby přenosu	18
3.4.5	Podmínky šíření infekce	18
3.4.6	Ochranná opatření zabraňující šíření choroby	18
3.5	Pěstování kdouloní ve školním podniku Žabčice.....	19
3.5.1	Popis lokality Žabčice.....	21
3.6	Explantátové kultury rostlin.....	22
3.6.1	Vlastnosti explantátů.....	22
3.6.2	Explantátové kultury v zemědělství.....	23
3.6.3	Mikropropagace	24
3.7	Možnost ozdravení.....	27
3.7.1	Využití explantátových kultur při eliminaci patogenů.....	27
3.7.2	Antibiotika	28
3.7.3	Chemoterapie	29

3.7.4	Termoterapie <i>in vitro</i>	29
3.8	Test patogenity za použití explantátových kultur	31
4	MATERIÁL A METODIKA	33
4.1	Seznam testovaných odrůd.....	33
4.2	Média používaná při kultivaci.....	33
4.2.1	Složení médií	34
4.2.2	Příprava médií	36
4.3	Zpracování materiálu	38
4.3.1	Odběr a zpracování letorostů	38
4.3.2	Povrchová sterilizace materiálu	38
4.3.3	Sterilizace nástrojů.....	39
4.3.4	Sterilizace prostředí – laminární box	39
4.4	Proces termoterapie.....	40
4.4.1	Výběr teplot pro termoterapii.....	40
4.5	Preparace pupenů	40
4.5.1	Potřeby pro vypreparované pupeny ke kultivaci	40
4.6	Průběh kultivace.....	41
4.7	Test patogenity	41
4.7.1	Médium pro test patogenity	41
4.7.2	Další postup	41
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	42
5.1	Zimní pupeny odebrané v únoru	42
5.1.1	Pokus č. 1	42
5.1.2	Pokus č. 2	43
5.1.3	Pokus č. 3	44
5.1.4	Pokus č. 4	45

5.1.5	Pokus č. 5	46
5.1.6	Pokus č. 6	47
5.1.7	Celkové vyhodnocení pokusů č. 1 – 6	49
5.1.8	Pokus č. 7	50
5.2	Letní pupeny odebrané v srpnu	51
5.2.1	Pokus č. 8	51
5.3	Test patogenity	52
6	ZÁVĚR	53
7	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	54
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	57
9	SEZNAM TABULEK	58

1 ÚVOD

Kdouloně jsou ovocné stromy, které byly již dříve využívány k mnoha účelům. Pěstovaly se zejména pro jejich plody, které pak byly buď konzumovány přímo, nebo různým způsobem zpracovávány. Plody našly využití i v domácnostech, protože jsou velmi aromatické. Obsahují velké množství léčivých látek, díky čemuž byly hojně používány i ve farmaceutickém průmyslu. Postupem času však jejich využití začalo upadat a tím pádem i množství jejich pěstitelů. Dnes již tyto stromy keřovitého vzrůstu patří spíše k méně rozšířeným ovocným druhům. Proto je snaha o udržení těchto genetických zdrojů. Snaha spočívá v rozšiřování genofondové výsadby, která slouží nejen jako zdroj množitelského materiálu tohoto druhu, ale i pro vědeckou, výzkumnou či šlechtitelskou činnost.

V posledních letech se stále více objevuje onemocnění bakteriální spálou růžovitých rostlin, ke kterým je kdouloň řazena. Je považováno za jedno z nejničivějších bakteriálních onemocnění rostlin této čeledi a je to choroba karanténní, což znamená, že jakýkoliv její výskyt je nutno okamžitě hlásit. Patogenem, který tuto chorobu způsobuje, je *Erwinia amylovora*. Z čeledi růžovitých napadá zejména jádroviny, kam patří i tento méně známý druh.

Existují různé způsoby eliminace tohoto patogena, ať už je to ochrana chemická použitím měďnatých přípravků, či ochrana mechanická vhodnou úpravou a zpracováním půdy. Další možností je i ochrana biologická pomocí mikroorganismů, které jsou neustále ověřovány, ale v České Republice zatím nejsou registrovány.

Tato práce se zabývá jednou z možností eliminace této závažné choroby, kterou je metoda termoterapie. Tato metoda je zatím používána spíše k eliminaci patogenů virového původu, u patogenů bakteriálních příliš častá není. Protože se eliminace virů za použití této metody často setkává s úspěchem, objevila se zde možnost vyzkoušet účinnost této metody k eliminaci choroby původu bakteriálního.

K testování je v bakalářské práci použita metoda *in vitro* meristémových kultur. V těchto metodách se využívají vrcholové části meristémů, které zpravidla obsahují nejméně patogenů. Jsou založeny na izolaci malých částí rostlin, které jsou poté kultivovány na umělých médiích a vše probíhá ve sterilních podmínkách – *in vitro*.

Je možné z nich dokonce vypěstovat nové zdravé rostliny, a proto tyto metody nachází stále větší uplatnění, zejména pro vědeckou činnost.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této práce je zpracovat literární přehled na téma bakteriální spála růžovitých ovocných dřevin a seznámit se se způsobem pěstování kdouloní ve Školním podniku Žabčice. Součástí je i seznámení s problematikou ozdravování rostlin pomocí termoterapie. Ve dvou termínech odebrané vegetativní pupeny kdouloní budou ošetřeny různými způsoby povrchové sterilizace. Následně budou testovány různé způsoby termoterapie a kultivace *in vitro* a úspěšnost eliminace patogena bude prověřena pomocí testu na přítomnost *Erwinia amylovora*.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Botanické zařazení kdouloně obecné (*Cydonia oblonga* Mill.)

Třída: Rosopsida

Řád: Rosales

Čeleď: Rosaceae

Rod: *Cydonia*

(RICHTER, 2004, 3. + 5. díl)

3.2 Botanická charakteristika

Kdouloně je opadavý keř se stromkovým vzrůstem. Dorůstá výšky i šířky asi 2 – 7 metrů. Může se dožít několika desítek let (NEČAS, 2010).

Tento keř má přirozeně nepravidelnou a rozložitou korunu. Má střídavě postavené letorosty, které jsou porostlé jemnými chloupky, a také na nich vyrůstají přisedlé pupeny. Výhony jsou bez chloupků a poseté červenohnědými lenticelami. Střídavé listy tmavě zelené barvy mohou být až 10 cm dlouhé a jsou celokrajné. Stejně jako letorosty, jsou i mladé listy porostlé šedivými chloupky, a to z obou stran. Starší listy jsou ochlupené jen ze spodní strany. Květy vyrůstají jednotlivě ze smíšených pupenů a jsou tvořené pěti bílými nebo narůžovělými korunními lístky. Mohou být samosprašné i cizosprašné a jsou oboupohlavní a hmyzosnubné. Kdouloně kvetou od května do června. Plodem je aromatická malvice žluté barvy, která může mít různý tvar (nejčastěji je to tvar hruškovitý nebo kulovitý). I plody jsou zpočátku plstnaté, ale plst postupně zmizí (NEČAS, 2010).

Kdouloně se u nás nejspíš vždy budou pěstovat jen v omezeném rozsahu. I přes to, že se plody nesklízí, ale nechávají se na stromech dlouho do podzimu, nikdy v našich podmínkách nedozrají tak, aby mohly být konzumovány za syrova. Pro pěstování kdouloní jsou tedy vybírány hlavně ty oblasti, kde je zajištěn odbyt plodů do konzerváren (KAMENICKÝ, KOHOUT, 1957). Neroste planě, vyskytuje se pouze jako dřevina pěstovaná (PODLECH, 2007). Jsou to zároveň i dřeviny okrasné. Starší stromy lze snadno zmlazovat řezem (KAMENICKÝ, KOHOUT, 1957). Používají se i jako podnožový materiál pro hrušně.

3.3 Choroby a škůdci

Protože je kdouloň méně náročným druhem, netrpí chorobami a škůdci v takové míře, jako jiné ovocné druhy (ŘEZNÍČEK, 2008). Škůdci, vyskytující se na kdouloni, jsou spíše nespecifičtí (KOTALOVÁ, 2010).

3.3.1 Vybraní nejčastější škůdci

Obaleč jablečný (*Cydia pomonella*)

Vlnovník hrušňový (*Eriophyes pyri*)

(ROSTLINOLÉKAŘ, 3/2010, str. 61, 69)

Mera skvrnitá (*Cacopsylla pyri*)

(NEČAS, 2010)

3.3.2 Vybrané nejčastější choroby

Strupovitost hrušně (*Venturia pirina*)

Chřadnutí hrušně (*Pear decline phytoplasma*)

Moniliová hniloba jádrovin (*Monilinia fructigena*)

Bakteriální spála růžovitých (*Erwinia amylovora*)

(NEČAS, 2010)

3.4 *Erwinia amylovora*

Původce bakteriální spály růžovitých *Erwinia amylovora* se na naše území dostal v polovině 80. let (KŮDELA *a kol.*, 2002). Je to choroba karanténní a jakýkoliv výskyt je nutné okamžitě hlásit (ERBENOVÁ *a kol.*, 1992). Tato choroba je po celém světě považována za nejničivější bakteriální onemocnění rostlin čeledi Rosaceae. Zejména pro pěstitele znamená nemalé ekonomické ztráty, a to především v těch oblastech, kde jsou vhodné podmínky pro šíření patogena. Také na tom má podíl pěstování náchylných odrůd jádrovin (KORBA, ŠILLEROVÁ, 2008).

3.4.1 Hostitelské rostliny

Hostitelskými rostlinami, které jsou bakteriální spálou růžovitých napadány, je mnoho druhů z čeledi růžovitých a podčeledi jabloňovitých (KŮDELA *a kol.*, 2002). Za druhy, které jsou napadány nejčastěji, jsou považovány jabloně (*Malus*), hrušně (*Pyrus*) a kdouloně (*Cydonia*) (ROSTLINOLÉKAŘ, 4/2013, str. 21). Mohou být napadány i další druhy, jako je např. hloh (*Crataegus*), jeřáb (*Sorbus*), dále to mohou být i méně obvyklé druhy, např. mišpule (*Mespilus*), kdoulovec (*Chaenomeles*) nebo muchovník (*Amelanchier*) (KŮDELA *a kol.*, 2002). Částmi rostlin, na kterých se tato choroba projevuje, jsou zejména listy, květy a výhony (ROSTLINOLÉKAŘ, 4/2013, str. 21).

3.4.2 Symptomy

Bakterie jsou typické tím, že do rostlin pronikají především přirozenými otvory, jako jsou např. lenticely, průduchy, hydratody, atd. Místem průniku bakterie může být i trhlinka vzniklá při poranění rostliny. Příčinou poranění může být řez, hmyz, kroupy a jiné. Patogen nejčastěji proniká květy, listy a nezdřevnatělými letorosty (KŮDELA *a kol.*, 2002). KORBA *a kol.* (2014) uvádí, že symptomy tohoto onemocnění se většinou projeví po 5–30 dnech, v závislosti na podmínkách prostředí (teplota, srážky atd.). Mladé plody, které jsou ve fázi vývinu, bývají relativně rezistentní.

Zvláštním příznakem této choroby je tvorba bakteriálního slizu. Ten se vytváří na povrchu napadených orgánů a přispívá tomu vlhké a teplé počasí. Bakteriální sliz je ve formě lepkavých, tuhoucích kapek nebo povlaků, které jsou nejdříve bělavé a později hnědnou (KŮDELA *a kol.*, 2002).



Obr. č. 1: Kapky bakteriálního slizu na výhonu

(zdroj: <http://www.jikl.cz/jadroviny/2073-bakteriozy-bakterialni-spala-ruzovitych-rostlin.html>)



Obr. č. 2: Kapky bakteriálního slizu na plodu

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

Poškozené listy a květy neopadávají, ale zůstanou připojené na stromě (KŮDELA *a kol.*, 2002). Listy se zbarvují hnědočerně a jsou suché, jejich vzhled připomíná popálení (ROSTLINOLÉKAŘ, 4/2013, str. 21-22). Dochází i ke svinování. Květy po napadení vadnou, vodnatí, a stejně jako listy usychají. Také dochází ke změně zbarvení do hněda až černa (KŮDELA *a kol.*, 2002).



Obr. č. 3,4: Symptomy na listech (3) a květech (4)

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

Také u letorostů se mění barva na hnědočernou. Nejprve vodnatí a následně začnou usychat a dochází ke svrašštění. Postupně uvadají i jejich vrcholy, které se pak hákovitě ohýbají (KŮDELA *a kol.*, 2002).



Obr. č. 5: Symptomy na letorostu

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

Z výše popsaných napadených částí přechází bakterie i do starších výhonů. U jejich pletiv pak dochází k vodnatění a následné postupné nekrotizaci. I tyto napadené části se opět zbarvují do červenohněda (KÚDELA *a kol.*, 2002).

Plody mohou být napadány od jejich nasazení až než jsou krátce před zralostí (ROSTLINOLÉKAŘ, 4/2013, str. 22). Patogen do nich pronikne přes stopky z napadených plodonožů, nebo prostřednictvím poranění či lenticelami. Na místech, která byla infikována, se objeví vodnaté skvrny. Ty postupně hnědnou až černají (KÚDELA *a kol.*, 2002).

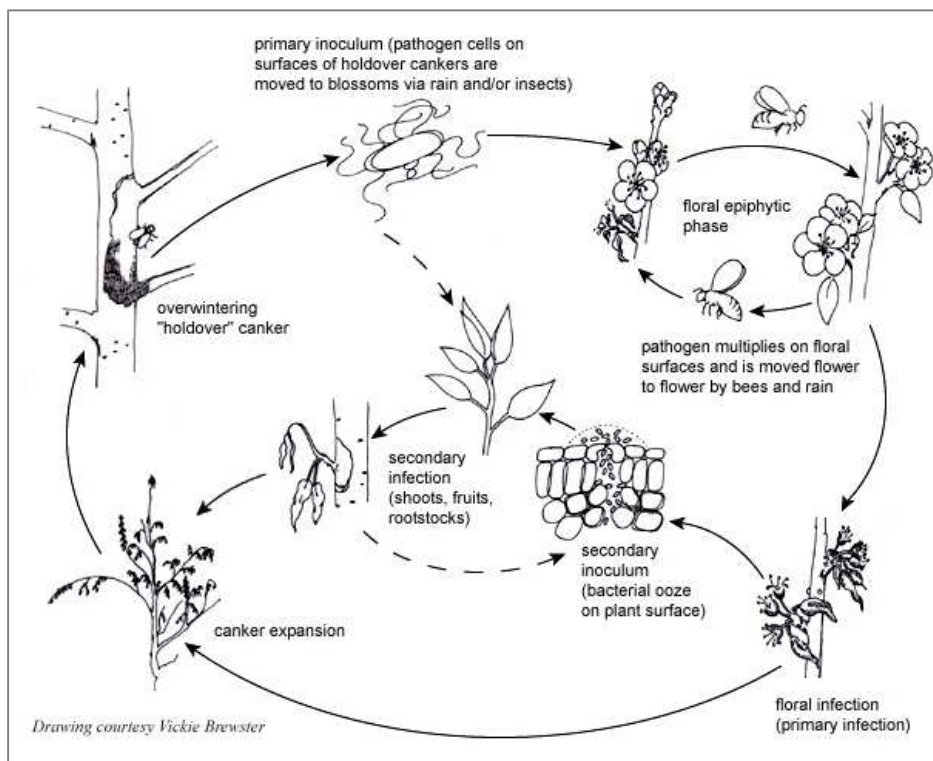


Obr. č. 6: Symptomy na plodech

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

3.4.3 Infekční cyklus patogena

Jak již bylo zmíněno, původcem bakteriální spály růžovitých je bakterie *Erwinia amylovora*. Je to fakultativně aerobní mikroorganismus (KORBA, ŠILLEROVÁ, 2008). Patogen je schopný přezimovat v nekrotizovaných korových pletivech větví či kmenů (KÚDELA a kol., 2002). Samotný infekční cyklus začíná brzy na jaře, když stromy a keře začínají kvést. Bakterie se množí a prostřednictvím rostoucích pletiv se dostávají do zdravých částí rostlin. Odtud se v podobě bíložlutého lepkavého slizu protlačují na povrch. Z povrchu se pak šíří do květů, které jsou nejnáchylnější k napadení. Je v nich totiž nejvhodnější prostředí pro růst a množení těchto bakterií. Kromě květů jsou pak velmi náchylné i mladé nezdřevnatělé letorosty (KORBA, ŠILLEROVÁ, 2008). Asi nejrizikovějším obdobím pro přenos infekce je období květu. Je tomu tak díky přenosu infekce prostřednictvím opylujícího hmyzu, který ji po opylení přenáší na další květy (ZELINKOVÁ, 2014).



Obr. č. 7: Infekční cyklus patogena

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

3.4.4 Způsoby přenosu

Původem nákazy mohou být kontaminace uvnitř sadu i mimo něj. Přenos může být zprostředkován jak přirozenou cestou, tak i činností člověka. Může to být infikovaný školkařský materiál (KORBA, ŠILLEROVÁ, 2008) nebo i reprodukční materiál (řízky, rouby, plody či celé rostliny). Bakterie mohou být přemísťovány na různé vzdálenosti. Kratší vzdálenosti (do 100 m) překonávají prostřednictvím deště nebo hmyzu, střední vzdálenosti (100-5000 m) pomocí opylovačů a delší vzdálenosti (více než 5000 m) buď vzdušnými proudy, ptactvem či již zmiňovanou činností člověka (KÚDELA *a kol.*, 2002).

3.4.5 Podmínky šíření infekce

Faktory rozhodující o šíření bakterií jsou zejména vlhkost, teplota a průběh počasí během vegetace (KORBA, ŠILLEROVÁ, 2008). Obecně platným pravidlem pro rozvoj choroby je to, že příliš suché počasí rozvoj úplně zastaví. Chladné, ale slunečné počasí vývoj choroby zpomalí, a podmínkami podporujícími rozvoj choroby jsou četné srážky při teplém a vlhkém počasí (KÚDELA *a kol.*, 2002).

Erwinia amylovora je schopna vývoje v poměrně širokém rozmezí teplot 4–32 °C. Nejvhodnější teplotou pro množení této bakterie je 24–29 °C. Ideální teplota je okolo 25 °C, protože při těchto teplotách se nejrychleji dělí pletiva hostitelských rostlin. Obsahují velké množství vody, a jsou proto pro rozvoj onemocnění nejvíce náchylné (KORBA, ŠILLEROVÁ, 2008). Při těchto teplotách, kdy jsou dny zároveň slunné a teplé, je i největší riziko infekce květů. Je to proto, že vzrůstá i aktivita hmyzu, který se jeví jako potenciální vektor pro spálové bakterie (KÚDELA *a kol.*, 2002).

3.4.6 Ochranná opatření zabraňující šíření choroby

Zejména je uplatňováno karanténní opatření, aby bylo omezeno vniknutí patogena na území, kde ještě jeho škodlivost nebyla zjištěna (KÚDELA *a kol.*, 2002).

Pěstitelská opatření

Jako pěstitelské opatření je uplatňován především vhodný výběr pozemku. Měla by být i jistota naprosto zdravého sadbového materiálu. Při výběru odrůd by měl být brán ohled na stupeň rezistence vybraných odrůd k této chorobě. Je doporučováno

odstranění náchylných hostitelských rostlin, které by mohly být zdrojem nákazy, ve vzdálenosti 500–800 m od vybraného pozemku (KORBA, ŠILLEROVÁ, 2008).

Mechanická opatření

Důležité je zbavit se zdroje nákazy přímo uvnitř sadu. Měla by se zavčas odstranit infekce květů a výhonů a tím zabránit sekundární infekci. Ta se pak šíří nejen vnitřními pletivy, ale i deštěm, větrem či hmyzem. Likvidace se provádí buď koncem zimního období, nebo v období vegetace ihned po nález (KORBA, ŠILLEROVÁ, 2008).

Chemická ochrana

V případě chemické ochrany je nutné splnění požadavků nejen vysoké spolehlivosti, ale důležitá je i zdravotní a ekologická nezávadnost. Látky, které jsou používány proti bakteriím, mají účinek buď bakteriostatický – pozastaví množení bakteriálních buněk, nebo baktericidní – bakteriální buňky rovnou usmrtí (KORBA, ŠILLEROVÁ, 2008). Proti bakteriím je prováděna chemická ochrana použitím měďnatých přípravků nebo i pomocí antibiotik, která často bývají účinnější (KŮDELA a kol., 2002).

Biologická ochrana

Jako alternativní ochrana proti této chorobě už jsou mnoho let ověřovány mikroorganismy s antagonistickými vlastnostmi vůči *Erwinia amylovora*. V současné době už jsou vyvinuty preparáty na bázi antagonistických bakterií, např. *Pseudomonas fluorescens* nebo *Bacillus subtilis*, a také kvasinek. Tyto preparáty ale bohužel zatím nejsou v České Republice registrovány (KORBA, ŠILLEROVÁ, 2008).

3.5 Pěstování kdouloní ve školním podniku Žabčice

Kdouloně se zde začaly pěstovat z důvodu uchování genetických zdrojů méně rozšířených ovocných druhů, ke kterým kdouloně v dnešní době patří. První genofondová výsadba kdouloní byla v Žabčicích založena v roce 1994. Byl k tomu použit materiál kdouloní z ústavu ovocnictví a vinohradnictví v Lednici. Ten byl postupně získán z řady institucí, ale i od samotných malopěstitelů. Postupně byly doplňovány další odrůdy i genotypy, které byly získávány z domácích i zahraničních

zdrojů. Tyto genetické zdroje mají jak ekonomickou, tak i kulturní hodnotu (NERUDA *a kol.*, 2009).

Výsadba kdouloní ve Školním podniku Žabčice, která je v nynější době využívána k hodnocení různých parametrů, jako jsou např. pomologické vnější i vnitřní znaky, růstové, morfologické a sklizňové údaje apod., byla založena v roce 2000 (NERUDA *a kol.*, 2009).

Pro výsadbu byl zvolen pásový způsob výsadby volně rostoucích zákrsků, a to ve sponu $4,0 \times 2,5$ m. V meziřadí je udržován černý úhor, který je pravidelně kultivován, a příkmenné pásy jsou pravidelně nastýlány (NERUDA *a kol.*, 2009).



Obr. č. 8: Výsadba kdouloní ve Školním podniku Žabčice

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1970)

Koruny kdouloní byly po výsadbě tvarovány do dutého tvaru se čtyřmi kosterními větvemi, polokosterních větví byl ponechán dvojnásobný počet. Dále je prováděn řez udržovací, který zde slouží k likvidaci polámaných, zakrslých a nevhodně rostoucích větví, a také k odstranění zahušťujících částí (NERUDA *a kol.*, 2009).

Důležitá je samozřejmě i výživa a ochrana. Výživa je zde prováděna v podzimním a jarním období a spočívá v přihnojování přípravkem *Cererit Z*. Co se týče ochrany, zaměřují se zde na ochranu proti chorobám, a je prováděno pouze předjarní ošetření (NERUDA *a kol.*, 2009).

Při výsadbě kdouloní byla použita celá řada odrůd (NERUDA *a kol.*, 2009), zde jsou však vyjmenovány pouze odrůdy námi testované:

‘Buchlovice 1’, ‘Hemus 2’, ‘Jurák’, ‘Bereckého’, ‘Doubravická’, ‘BO–3’, ‘Pražská’, ‘Šuranská’, ‘Morava’, ‘Triumph’, ‘Serena’, ‘Otlíčnica’, ‘Leskovačka’, ‘Juranská’

3.5.1 Popis lokality Žabčice

V současné době je Školní zemědělský podnik tvořen dvěma oddělenými pracovišti. Je to pracoviště Lednice a pracoviště Žabčice (NERUDA *a kol.*, 2009), ze kterého pochází testovaný materiál.

Pracoviště Žabčice se nachází ve stejnojmenné obci, která leží několik kilometrů na jih od Brna. Pozemky tohoto pracoviště patří do katastru několika obcí. Území, které je zde obhospodařované, se nachází v okrajové části kukuřičné oblasti. Leží v Dyjsko–svrateckém úvalu a půdy, které se zde nachází, jsou neutrální až slabě kyselé, s nedostatkem humusu. Mají také velmi rozdílné složení, podle toho, ve které části území se nachází, od půd písčitých až po půdy jílovité. Na pozemky s lehčí půdou působí velmi negativně období bez srážek. Z půdních typů zde převažují černozemě a drnové půdy. Jejich nevýhodou však je, že mají velmi propustný substrát, ze kterého jsou vyplavovány živiny, a také mají nízkou vodní kapacitu. Pozemky jsou zde navíc od nedávna pod vlivem spodní vody, jejíž hladina neustále kolísá. Na části území je poměrně vysoká, což může působit problémy zejména po vlhké zimě. Na větší části území půd je ale stále ještě deset až dvacet metrů hluboko, takže není hospodářsky využitelná (NERUDA *a kol.*, 2009).

Školní podnik se nachází v jihomoravské suché oblasti, pro kterou je typické vnitrozemské klima nížiny, otevřené k jihu. Výsledek hospodaření je pak ovlivňován celoročním úhrnem srážek, především jejich rozložením během vegetačního období. Výhodou je v této oblasti dlouhé vegetační období, které zde trvá průměrně dvě sta čtyřicet dní. Jarní práce začínají v počátku března a konec vegetačního období bývá asi v polovině listopadu. Dříve zde bylo pravidelné vysoké zornění půdy, protože zdejší klima nebylo příliš vhodné pro zakládání trvalých travních porostů. V průběhu let ale trvalé travní kultury přibývaly, a to zejména v podobě vinogradů nebo sadů (NERUDA *a kol.*, 2009).

3.6 Explantátové kultury rostlin

Pletivové kultury rostlin, také označované jako *in vitro* nebo sterilní kultury, jsou důležitým nástrojem jak pro vědecké studie, tak pro komerční i praktické využití. I přes to, že bylo dříve doporučeno omezené užívání tohoto označení, jsou dnes obvykle označovány sterilní kultury buněk, tkání, orgánů a jejich součástí na základě definovaných fyzikálních a chemických podmínek, jako *in vitro* (SMITH, 2013). Tyto definované podmínky zahrnují zejména teplotu, vlhkost, vhodná kultivační média a světlo (KOVÁČ, 1992). Získávání tkáňových kultur rostlin je technologie založená na izolaci malých částí rostlin a jejich následném růstu na umělých médiích (PANATTONI *a kol.*, 2013). Znamená to, že se z rostliny, která byla povrchově sterilizovaná či sterilně pěstovaná, oddělí určitá část. Ta je pak uchovávána ve sterilním prostředí a kultivována za adekvátních podmínek. Zmiňovanou částí rostliny může být např. část stonku, postranní pupen, vegetační vrchol, list, nebo i semena či jednotlivé buňky. U těchto částí je možnost krátkodobé kultivace v *in vitro* podmínkách a mohou z nich být dokonce vypěstovány nové rostliny (KOVÁČ, 1992). LIZARRAGA *a kol.* (1986) uvádí, že tuto techniku, nazývanou jako meristémové kultury, poprvé aplikovali za účelem odstranění viru přibližně v roce 1952 Morel a Martin na jirčině.

3.6.1 Vlastnosti explantátů

Velmi důležité je zejména stáří explantátů, protože fyziologicky mladší tkáň je obecně mnohem citlivější, a to nejen v prostředí *in vitro*. V mnoha případech totiž starší tkáň nevytváří kalus, který je schopný regenerace. Kromě toho je obvykle mladší tkáň nově vytvořená, tudíž je jednodušší její povrchová dezinfekce či sterilizace, a tím i vytvoření čisté kultury (SMITH, 2013).

Také roční období může mít vliv na kontaminaci explantátů a následné reakce v kultuře. Tomuto jevu se říká cyklofýza. Příkladem mohou být pupeny nebo výhonky odebrané v průběhu jara, kdy mladé výhonky jsou mnohem citlivější než spící pupeny. Tkáně, které jsou fyziologicky spící, většinou nereagují až do doby, kdy z dormance vystoupí. Dále se stupeň kontaminace zvyšuje v průběhu léta a podzimní či zimní kontaminace pak většinou bývají nejhorší (SMITH, 2013).

Na reakci tkáně má také vliv velikost explantátu. Obvykle platí, že čím menší explantát je, tím je těžší jeho kultivace (SMITH, 2013). Velikost tkáně (například

vegetační vrchol by měl mít velikost 5–10 mm nebo část meristému o velikosti maximálně 0,7 mm) je kritickým bodem pro dosažení bezvirózní kultury s ohledem na skutečnost, že menší část tkáně může být charakterizována jako část s nižší koncentrací viru. Velikost části meristému určuje schopnost explantátu přežít na specifickém živném médiu a čas potřebný k vytvoření nové rostliny. Navíc, s ohledem na to, že je tato technologie časově náročná, je běžné používání různých typů médií doplněných několika hormony (PANATTONI *a kol.*, 2013). Větší explantáty obsahují více rezervních živin a růstových regulátorů k udržení kultury. Rostliny mají různé hladiny hormonů v rámci celé rostliny, záleží na umístění explantátu, tzv. topofýze. Právě i odlišné hladiny těchto látek mohou být důvodem různých reakcí pletiv v *in vitro* prostředí (SMITH, 2013).

Vhodné je i odebírat explantáty z rostlin, které jsou zdravé, ve srovnání s rostlinami, které jsou buď pod vlivem stresu z nedostatku živin či vody, nebo u kterých se projevují symptomy onemocnění. V některých případech, jako třeba při dokazování viruprostých rostlin, mohou být rostliny, z nichž je explantát odebírán, nakažené jedním nebo i více viry (SMITH, 2013).

3.6.2 Explantátové kultury v zemědělství

Explantátové kultury jsou stále více uplatňované i přímo v zemědělské praxi. Postupem času se stávají důležitou součástí pro moderní zemědělské technologie. Existuje několik hlavních oblastí pro jejich využití. Je to především při ozdravování rostlin a tím pádem je i produkován bezvirózní rostlinný materiál. Dále také produkce geneticky shodného materiálu prostřednictvím mikropropagace. Dají se tak rychle množit nové vyšlechtěné odrůdy, atd. (KOVÁČ, 1992).

Jako komerční využití tkáňových kultur v zemědělství se uplatňuje především mikropropagace. Ta je používána hlavně při množení zeleniny a ovocnářsky významných druhů rostlin a také na produkci okrasných druhů rostlin. Nejvýznamnějšími kategoriemi rostlin, které jsou množeny mikropropagací, patří ovocné dřeviny, cibuloviny, hrnkové květiny či květiny k řezu. Hlavní ovocné druhy, u kterých se nejvíce používá množení mikropropagací, jsou např. jahodník, jabloň, třešeň, broskvoň, meruňka, vinná réva, atd. (KOVÁČ, 1992).

3.6.3 Mikropropagace

Mikropropagace je metoda pletivových kultur, která je v dnešní době tradičním způsobem vegetativního množení rostlin (KOVÁČ, 1992). Nejdůležitější technikou této metody je rychlé množení meristémů (MILOŠEVIĆ *a kol.*, 2012). Meristém je aktivně rostoucí část rostlinného výhonu. Je to malá oblast složená z rychle se dělících (meristemických) buněk (LIZARRAGA *a kol.*, 1986). Apikální pupeny nebo nodální segmenty nesoucí úžlabní pupen jsou kultivovány k obnově a regeneraci. Postupy explantátových kultur nejsou odlišné od obecných postupů pro množení a regeneraci výhonů *in vitro*. Důležitou podmínkou je však to, že výchozí explantát musí mít co nejmenší možnou velikost, aby bylo možné izolovat pouze apikální meristém (MILOŠEVIĆ *a kol.*, 2012). Jako každá metoda má řadu výhod i nevýhod (KOVÁČ, 1992).

Výhody mikropropagace

Kultury jsou odvozovány z velmi malých segmentů rostlin, na kterých dochází k regeneraci malé rostliny. Nezáleží na tom, z jaké části matečné rostliny jsou segmenty získány, protože mikropropagace *in vitro* vždy vede k vytvoření nové rostliny (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). K získání velkého počtu rostlin není u této metody potřeba příliš mnoho prostoru. Rozmnožování rostlin probíhá za sterilních podmínek. Pokud je tedy kultura odvozena *in vitro*, je zde při množení téměř nulové riziko úhynu rostliny z důvodu onemocnění. Odvozené rostliny pak ani zpravidla neobsahují žádné bakteriální či houbové patogeny (KOVÁČ, 1992).

Tato metoda je také vhodná pro produkci viruprostých rostlin. Platí zde, že pokud k založení kultury použijeme bezvirózní materiál, budou bezvirózní i regenerované rostliny. V *in vitro* kultuře je také možnost eliminace virových částic nacházejících se v explantátu, a to vhodnou úpravou kultivačních podmínek (více v kapitole 3.7). Díky produkci rostlin prostých virů i jiných patogenů je usnadněna mezinárodní spolupráce při výměně rostlin s ohledem na sanitární opatření jednotlivých států. Jsou přesně definované podmínky při množení a je také možná regulace jednotlivých faktorů, které rozmnožování ovlivňují. Z této skutečnosti vyplývá, že je rychlost mikropropagace o mnoho vyšší, než u tradičně používaných metod (KOVÁČ, 1992).

Velkou výhodou je minimální poškození mateřské rostliny vedoucí k získání velkého počtu nových rostlin. Je zde i možnost produkce některých klonů či druhů rostlin, které se při použití tradičních metod vegetativního rozmnožování nemnoží vůbec nebo jen velmi pomalu, nebo kterých je k dispozici jen omezené množství (KNITL, 2011).

Další nemalou výhodou je samozřejmě i cena. Ta u této metody bývá většinou srovnatelná s cenou rostlin, které jsou množeny tradičními postupy. Velmi výhodné je i to, že množení *in vitro* lze provádět v průběhu celého roku a není nutné ohlížet se na meteorologické podmínky, což u klasických metod není možné (KOVÁČ, 1992).

Protože je výchozí materiál velmi malý, není potřeba příliš velká skleníková plocha pro uchování matečných rostlin. V období mezi pasážemi navíc rostliny *in vitro* nevyžadují téměř žádnou péči, jako je např. chemická ochrana, pletí nebo třeba zavlaha. Je také možnost jejich uchování po delší dobu v prostředí bez výskytu patogenů a při nízkých teplotách. Proto je zde možnost uchování výchozího materiálu bez větších nároků na pracnost či prostor. Jsou tedy celkově mnohem méně náročné (KOVÁČ, 1992).

U mikropropagace je také díky vysokému koeficientu množení umožněno zkrácení šlechtitelského cyklu a tedy i rychlejší namnožení a zavedení nově vyšlechtěných odrůd (KNITL, 2011).

Nevýhody mikropropagace

Hlavními nevýhodami je především vyšší cena laboratorního vybavení a také pracnost. Zatím totiž nebylo umožněno využití mechanizace pro jednotlivé fáze kultivace. Drahý je i provoz samotné laboratoře, který je dosti náročný na chemikálie, energii, atd. (KOVÁČ, 1992).

Mikropropagaci je možné použít zejména u bylin. U dřevin je to o něco komplikovanější - širšímu použití metody brání buď nižší schopnost regenerace, nebo naopak – nadměrná tvorba regeneračního kalusového pletiva. K redukci jeho tvorby je pak nutná úprava množství růstových regulátorů v médiu (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). V odborných pracích jsou zpravidla testovány systémy pro jeden kultivar (genotyp, odrůdu). Neplatí však, že ten samý postup bude fungovat

i pro jiný . Je to z toho důvodu, že každý explantát, který je odebraný z jiného kultivaru, má jiné požadavky na kultivační podmínky (KOVÁČ, 1992).

U většiny systémů mikropropagace je k zakořenění rostlin využíváno podmínek *in vitro* (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). Tím dochází ke zvýšení nákladů produkce (KOVÁČ, 1992) a také ty kořeny, které byly vytvořené v *in vitro* prostředí, nemusí být zcela funkční. Navíc tvorba adventivních kořenů přímo z primárního explantátu není příliš častá (ĎURKOVIČ, KRAJŇÁKOVÁ, 2010). Po jejich přenosu do půdy pak dochází k úhynům rostlin, a nebo je nutné je nejdříve zakořenit v *in vivo* podmínkách. Proto je nezbytné odvození efektivnějších a levnějších systémů, které k zakořenění využívají nesterilní podmínky. Čím kvalitnější zakořenění rostlin je, tím je i lepší jejich aklimatizace na *in vivo* podmínky. Je také důležité omezit ztráty rostlin při jejich aklimatizaci. Toho je možné docílit odvozením vhodných kultivačních systémů. Ty by mohly vést ke snížení přílišné transpirace rostlin na počátku aklimatizace. Nutné je i zajištění vhodných postupů pro ochranu rostlin před možným napadením různými mikroorganismy. K tomu může lehce dojít po převodu rostlin ze sterilních podmínek do nesterilních. Počet aklimatizovaných rostlin tedy může být zvýšen sterilizací půdy a aplikací fungicidních či baktericidních látek (KOVÁČ, 1992).

Vše se ale netýká pouze samotných rostlin. Nákladné a náročné je také zařízení a vybavení laboratoře pro explantátové kultury. Jsou zde i vyšší nároky na kvalifikaci pracovníků než u klasických metod množení rostlin. Nutná je i optimalizace celého systému mikropropagace. Je to důležité hlavně proto, aby nedocházelo v určitém období roku k přetížení laboratoře. Zařízení pro mikropropagaci by mělo být využíváno plynule po celý rok. Proto je nutné uchovávání a kultivace explantátových kultur při nižších teplotách. Vyšší je i výrobní cena rostlin, které jsou produkované explantátovými kulturami, oproti ceně rostlin produkovaných běžnými postupy množení rostlin (KOVÁČ, 1992).

3.7 Možnost ozdravení

Jako rostlinné patogeny jsou označovány hlístice, houby, bakterie, mykoplazmy, viry a viroidy. Jsou to organismy přenosné a mohou být tedy přenášeny z napadených rostlin na rostliny zdravé. Ovšem ne všechny buňky se stávají infikovanými. Pletivové tkáně někdy mohou zůstat zdravé (LIZARRAGA *a kol.* 1986).

Velikost těchto patogenů se značně liší. Mezi rostlinnými patogeny patří k největším hlístice. Ty mohou být lehce pozorovány pouze světelným mikroskopem. Naopak nejmenšími patogeny jsou viry a viroidy a k jejich pozorování je nutný elektronový mikroskop (LIZARRAGA *a kol.*, 1986).

Výskyt choroby nezávisí výhradně jen na přítomnosti hostitele a patogena. Také podmínky prostředí, především vlhkost a teplota, hrají důležitou roli v rozvoji choroby. Tudíž může být choroba definována jako produkt interakce mezi hostitelem, patogenem a podmínkami prostředí. Tato představa o nemoci je známá jako „disease triangle“ (LIZARRAGA *a kol.*, 1986).

Existují tři přístupy k eliminaci patogenů z rostlin. Jsou to explantátové kultury, chemoterapie a termoterapie. Explantátové kultury mohou být použity i v kombinaci s chemoterapií nebo termoterapií. Termoterapie a meristémové kultury se ve velké míře používají zejména k odstranění virů a jiných endofytů, jakou jsou bakterie, houby nebo sinice (TRIGIANO, GRAY, 2011).

3.7.1 Využití explantátových kultur při eliminaci patogenů

Za účelem ozdravování rostlin, což tedy znamená k produkci viruprostých rostlin nebo rostlin bez houbových či bakteriálních nákaz, mohou být využity i explantátové kultury (KOVÁČ, 1992). Meristémové kultury jsou široce používány k eliminaci rostlinných patogenů a nepatogenních endofytů, ale pouze pod podmínkou, že bude apex prostý všech mikroorganismů (TRIGIANO, GRAY, 2011). K eliminaci některých houbových či bakteriálních infekcí může dojít již při zakládání sterilních kultur. K eliminaci bakteriální infekce dochází i v průběhu kultivace izolovaných meristémů, ve kterých se nenachází cévní svazky. Ty totiž slouží k šíření řady rostlinných patogenů. Eliminace bakteriálních kontaminací je také možná po přidání antibiotik

do kultivačního média. Tento postup se ovšem téměř nepoužívá, protože antibiotika působí na buňky explantátu toxicky (více v kapitole 3.7.2) (KOVÁČ, 1992).

Stále větší uplatnění mají explantátové kultury při produkci bezvirózních rostlin. Tato metoda se osvědčila v mnoha zemích a to zejména u rostlin, které jsou množeny vegetativně. Každý rok jsou šlechtiteli produkovány odrůdy užitkových rostlin, které jsou buď výnosnější, nebo i chuťově kvalitnější. Problém je ale v tom, že některé odrůdy, zvláště ty s většími výnosy, nevydrží být výnosné a zdravé delší dobu. Výnosy začnou opět klesat, dojde k napadání virovými chorobami a tím pádem musí být po nějaké době vyškrtnuty ze seznamu povolených odrůd. K vyřešení těchto problémů jsou právě rostlinné explantáty uplatňovány stále více (KOVÁČ, 1992).

Virová onemocnění nejsou většinou přenášena v průběhu generativního množení prostřednictvím semen. Kdežto používáním tradičních postupů vegetativního množení, které jsou u významných druhů rostlin využívány hojně, může k virovým nákazám dojít velmi lehce. Aplikací meristémového množení dojde v buňkách explantátu během krátké doby kultivace k eliminaci virových částic. V mnoha případech se ale v buňkách meristému virové částice nenachází, protože zde chybí cévní spojení s ostatními částmi rostlin. Jako výchozí explantáty se k ozdravení rostlin používají vlastní meristemické vrcholy bez přilehlých listových základů. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,2–1,0 mm, z čehož je zřejmé, že explantáty jsou mnohem menší, než v případě pouhého meristémového množení (KOVÁČ, 1992).

Jak již bylo zmíněno, meristémové kultury se využívají i v kombinaci s termoterapií. Je to metoda dnes již běžně používaná k produkci bezvirózních rostlin u různých rostlinných druhů, jako je např. jahodník, jablono, brambor, česnek a další (KOVÁČ, 1992).

3.7.2 Antibiotika

I když jsou antibiotika běžně používaná v kulturách živočišných buněk k zabránění bakteriální kontaminace, v rostlinných pletivových kulturách tak široce používaná dosud nejsou. Tyto přírodní produkty mohou měnit růst a vývoj explantátových kultur *in vitro*. Ve skutečnosti jsou pletivové tkáně k antibiotikům velmi citlivé a vykazují odlišné reakce v závislosti na jejich genotypu (LIZARRAGA *a kol.*, 1986). Pokusy použít antibiotika k ovládní bakteriálních infekcí v rostlinách mají obecně za následek

pouze odstranění příznaků, nikoliv však eliminaci patogena (TRIGIANO, GRAY, 2011). Mnoho specialistů na explantátové kultury se nespolehá na antibiotika jakožto na možnost odstranění povrchových kontaminací. Nejen, že jsou drahá, ale také není žádné z nich účinné proti všem možným typům organismů způsobujících kontaminace. Antibiotika se tedy používají pouze tehdy, když je odstranění mikroorganismů jiným způsobem obtížné (LIZARRAGA *a kol.*, 1986). To ovšem platí pouze v zemích, kde je používání antibiotik pro tyto účely povoleno (TRIGIANO, GRAY, 2011). V České Republice zatím stále povolená nejsou.

3.7.3 Chemoterapie

Rozvoj výzkumu v oblasti chemoterapie nebyl doposud tak intenzivní, jako práce provedeny na termoterapii. Byly ovšem poskytnuty užitečné příspěvky z nejrozsáhlejších vyšetřování protivirové chemoterapie v klinické medicíně. V tomto ohledu byl rozhodujícím momentem v oblasti výzkumu objev ribavirinu (PANATTONI *a kol.*, 2013). Ribavirin patří mezi virostatika. Jsou to látky, které jsou často používané pro léčbu virových onemocnění v humánní medicíně. Dnes už jsou však s úspěchem používány i k eliminaci virů u rostlin (KŘÍŽAN *a kol.*, 2013). Metoda chemoterapie založená na použití antivirových a antibakteriálních látek není stále k ozdravování rostlin používána tak široce. Z velké části je to hlavně kvůli nákladům a také z důvodu obtížného udržení jejich stálé koncentrace v rostlinách. (TRIGIANO, GRAY, 2011). Nicméně skutečnost, že je k dispozici nedostatečné množství zdrojů a znalosti v oblasti molekulárních vlastností mnoha fytovirů jsou stále také nedostatečné, znamená, že je v této oblasti i mnohem méně výsledků, než v samotné medicíně (PANATTONI *a kol.*, 2013).

3.7.4 Termoterapie *in vitro*

Termoterapie patří mezi metody fyzikální. Tyto metody se v ochraně rostlin proti patogenům způsobujícím bakteriózy příliš nevyužívají, výjimkou je jejich využití při sterilizaci, dezinfekci či terapii. Infikované rostliny nebo vegetativní orgány je možné pomocí termoterapie patogenů zbavit. Ošetřují se vegetativní orgány v době vegetačního klidu tím způsobem, že se po určitou dobu ponořují do teplé až horké vody (KÚDELA *a kol.*, 2008).

Protože metoda termoterapie *in vitro* k ozdravování rostlin od bakteriálních patogenů dosud nejspíš nebyla použita, je zde popsáno ozdravování rostlin od patogenů virových.

In vitro termoterapie je metoda používaná zejména k ozdravování rostlin od virů. Princip této metody je založen na pěstování *in vitro* rostlin při vysokých teplotách (udává se rozmezí teplot 34–40 °C), a to po dobu až několika týdnů (POLÁK, 2009). PANATTONI *a kol.* (2013) uvádí, že rostliny, nebo častěji jejich části, mají být kultivovány v rozmezí teplot 35–54 °C po přiměřenou dobu. To všechno v rámci hranic tolerance jednotlivých rostlin. V praxi pak zvolená teplota představuje nejlepší možný kompromis mezi eliminací viru a přežitím rostliny. Je nutné brát ohled na to, že prahová hodnota tepelné citlivosti některých virů je nižší, než u rostlinných buněk, a že poškození rostlinných tkání způsobená tepelným stresem mohou být napravena snadněji, než virové poškození.

Při vyšších teplotách totiž dochází k buď dočasnému pozastavení, nebo až k trvalému zastavení syntézy nukleových kyselin rostlinných virů. Při zastavení syntézy nukleových kyselin se přeruší i tvorba specifických virových proteinů. Kromě toho, že tedy dojde ke zpomalení nebo úplnému zastavení virové replikace, vysoká teplota také omezuje pohyb již přítomných virových částic mezi buňkami hostitele (POLÁK, 2009).

Při postupu ozdravování rostlin pomocí termoterapie *in vitro* kultur se vychází z toho, že viry většinou nejsou schopné infikovat meristematičká pletiva. Je zde tedy velká pravděpodobnost, že izolované vrcholy, které budou použity pro novou kultivaci, nebudou obsahovat žádné viry. Výhodou metod ozdravování, které využívají *in vitro* kultury, je současně i malé riziko, že opětovně namnožené vybrané zdravé rostliny budou znovu infikovány (POLÁK, 2009).

Pro ozdravování rostlin je vhodná *in vitro* kultura, která je založená z vegetačních vrcholů, jejichž velikost by měla být zpravidla větší, než 0,2 mm. Kultura by pak měla být vedena ve formě aktivně rostoucích vrcholů na pevném agarovém médiu. Je to doporučováno zejména z důvodu uchování odrůdové stability (POLÁK, 2009).

U praktického ozdravování je platné obecné pravidlo, které říká, že čím je výchozí odebraný explantát menší, tím je vyšší pravděpodobnost toho, že bude odvozen viruprostý jedinec. Zároveň ale také platí, že se zmenšující se velikostí explantátu klesá i pravděpodobnost toho, že izolovaný vrchol přežije. Pro ozdravované rostliny je dalším stresovým faktorem vysoká teplota, která přesahuje 30 °C. Tento faktor bohužel vede k tomu, že rostliny většinou začnou odumírat ještě v průběhu terapie. Na začátku ozdravování při použití explantátových kultur je vhodné, aby byla stanovena teplotní odolnost *in vitro* rostlin ošetřovaných druhů. Současně je hodnocena a v dané teplotě vzájemně porovnávána rychlost odumírání růstových vrcholů u jednotlivých odrůd. Zároveň je cílem, aby byla v průběhu přebývání rostlin ve vysokých teplotách nalezena nejpozdější možná doba pro odběr vrcholových meristémů. Ta by přitom i umožnila přežití a regeneraci aspoň části odebraného rostlinného materiálu (POLÁK, 2009).

3.8 Test patogenity za použití explantátových kultur

Poprvé byla technika explantátových kultur použita v 80. letech 20. století ke zjišťování virulence kmenů *Erwinia amylovora*. Testovanou rostlinou byla jabloň napěstovaná v laboratorních podmínkách. Namnožené vegetativní vrcholky byly inokulovány *in vitro* prostřednictvím nůžek ponořených v suspenzi spálové bakterie tak, že jimi byly odštíženy jeden nebo více vrcholových lístků. Po 14 dnech se na rostlinkách objevily příznaky (nekrózy, vodnatění pletiv) (KOKOŠKOVÁ a kol., 2009).

Je to inovovaný biologický test určen speciálně pro *Erwinia amylovora*, původce bakteriální spály růžovitých. Obvykle se test pro potvrzení přítomnosti patogena provádí na nezralých plůdcích náchylné odrůdy hrušně (případně jabloně). Na pletivech nezralých plodů jsou totiž dobře pozorovatelné projevy napadení v podobě slizových kapek. Nevýhodou však je, že je možné ho provádět pouze v určitém období roku. Právě v tomto ohledu je výhoda testu technikou explantátových kultur, protože tento test je možné provést kdykoliv bez ohledu na roční období, a navíc je srovnatelný s testem na nezralých plůdcích. Je proto doporučován pro každodenní využití v diagnostických laboratořích (KOKOŠKOVÁ a kol., 2009).

Pro tyto testy je potřeba vybrat odrůdu, která je náchylná k původci spály růžovitých. Prostředí pro práci musí být naprosto sterilní. Rostlinné explantáty jsou pěstovány ve sterilních skleničkách se speciálním kultivačním médiem (na 0,5 l média

→ 3 g agaru, 15 g sacharózy, 2,2026 g Murashige skoog média (Duchefa), 5 ml BAP (benzylaminopurin), pH 5,5 – 5,8, sterilizace v autoklávu – 15 min, 120 °C). K pasážování jsou používány jednonodální segmenty i vrcholové části rostlin. Nevětvěné rostliny se stříhají na malé části tak, aby každá z nich nesla alespoň jeden list s jedním axiálním pupenem. Skleničky s kulturami jsou kultivovány 4 týdny v termostatu a po této době jsou dorostlé pro inokulaci. Nejmenší explantáty použitelné pro inokulaci bývají dlouhé cca 4 cm. Je vhodné mít rostlinky alespoň této velikosti, aby zůstala dostatečně velká část pro hodnocení. Větší rostlinky jsou pak zkracovány, aby měly všechny jednotnou velikost. Kontaminované nebo nedorostlé rostlinky bývají z pokusů vyřazovány. Je tedy vhodné při pasážování počítat s určitým množstvím neúspěšně napěstovaných kultur.

Při inokulaci se odstříhuje vzrostný vrchol a do místa stříhu se pipetou nanáší inokulum. Všechny odstřižené části jsou pak ze skleničky odstraňovány, aby nedošlo ke kontaminaci prostředí. Na vzrostný vrchol je aplikováno tolik bakteriální suspenze, aby se na něm při inokulaci udržela a nestékala dolů po rostlině. Rostlinky pak bývají hodnoceny od 3. do 7. dne po inokulaci. Příznaky napadení jsou pak hodnoceny podle zbarvení na listech, nekrotických skvrn na listech a také počtu bakteriálních kapek na stonku. Hodnocení probíhá 5 po sobě jdoucích dnů a vždy ve stejnou denní dobu.

4 MATERIÁL A METODIKA

Na lokalitě Školního zemědělského podniku Žabčice bylo v roce 2014 sledováno onemocnění bakteriální spálou růžovitých. Patogenem způsobujícím tuto chorobu je druh *Erwinia amylovora*, který napadá i kdouloně. Výskyt tohoto patogena byl sledován přímo ve výsadbách kdouloní, ve sbírce pana prof. Řezníčka z Mendelovy univerzity v Brně. Bylo tak provedeno v sadu, který zahrnuje cca 100 kusů tohoto keře.

Byla vyhodnocována intenzita napadení a hodnocení bylo prováděno ve dvou temínech.

4.1 Seznam testovaných odrůd

Celkem bylo odebráno a testováno 14 odrůd:

‘Buchlovice 1’, ‘Hemus 2’, ‘Jurák’, ‘Bereckého’, ‘Doubravická’, ‘BO–3’, ‘Pražská’, ‘Šuranská’, ‘Morava’, ‘Triumph’, ‘Serena’, ‘Otlíčnica’, ‘Leskovačka’, ‘Juranská’

4.2 Média používaná při kultivaci

Základními složkami médií jsou mikroprvky, makroprvky, vitamíny, Fe, gelující (tuhnoucí) látka (agar, Gerlite nebo Phytigel), sacharid (sacharóza), růstové regulátory (BAP – benzylaminopurin, NAA – kyselina naftyloctová). Je také nutné upravení pH na hodnotu 5,5–5,8.

Jako gelující složka byl používán agar. Navíc byla do médií přidávána antimykotická směs (roztok směsi antibiotik–antimykotik – Sigma Aldrich).

Pro kultivaci byly používány 3 druhy médií – McCown Woody Plant medium (WPM), Murashige & Skoog medium (MS) a MP médium.

4.2.1 Složení médií

McCOWN WOODY PLANT MEDIUM (WPM)

Tab. č. 1: Mikroelementy

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

Tab. č. 2: Makroelementy

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

Tab. č. 3: Vitamíny

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

Dále toto médium ještě obsahuje 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l NAA, antimykotickou směs a 20 g sacharózy.

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM (MS – médium M1)

Tab. č. 4: Mikroelementy

Látka	mg/l	μM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,11
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,10
FeNaEDTA	36,70	100,00
H ₃ BO ₃	6,20	100,27
KI	0,83	5,00
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,90	100,00
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	1,03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60	29,91

Tab. č. 5: Makroelementy

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

Tab. č. 6: Vitamíny

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

Dalšími složkami tohoto média je 15 g sacharózy, 1 g aktivního uhlí a 8 g agaru (v závislosti na použití média – jako tekuté nebo tuhé).

MP médium

Toto médium má stejné složení i množství mikroelementů, makroelementů a vitamínů, jako médium WPM. Dále ještě obsahuje 20 g sacharózy, 1 g aktivního uhlí, 8 g agaru a růstové regulátory meta-topolin 0,6 μmol a IAA 0,1 μmol (kyselina indolyloctová).

4.2.2 Příprava médií

Média obsahující základní složky, kterými jsou mikroelementy, makroelementy a vitamíny, jsou k dispozici v podobě suché látky (Duchefa, Holandsko). Ostatní složky jsou do nich přidávány v průběhu přípravy. Každé médium bylo připravováno v množství 1000 ml, uvedené množství jednotlivých složek je tedy určeno pro tento objem.

WPM médium

Toto médium bylo používáno pouze jako tekuté, takže do něj nebyla přidávána gelující složka agar.

Do 900 ml sterilní destilované vody v lahvi bylo přidáno 2,46 g suché směsi WPM média, 1 mg BAP a 0,1 mg NAA. Poté bylo změřeno pH celé směsi na pH metru, jeho hodnota musí být 5,5–5,8. Po změření bylo do lahve přidáno ještě 20 g sacharózy. To celé bylo vloženo do autoklávu Tuttnauer na 90 minut, přičemž 15 minut z uvedené doby probíhala sterilizace při teplotě 121 °C a tlaku 125 kPa. Po uplynutí požadované doby byla směs přenesena do vyčištěného a sterilního flowboxu, kde byly předem nachystány v autoklávu sterilizované kultivační nádoby typu Magenta (Sigma Aldrich) (dále jen magenta). Zde byla do lahve přidána antimykotická směs, která se uchovává v mrazáku. Ta byla do média přidávána filtrací za studena pomocí stříkačky, na kterou byl nasazen jednorázový sterilní filtr Whatman puradisc s póry o průměru 0,25 μm (touto velikostí pórů neprochází spóry hub, kvasinky ani bakterie). Následně byla celá tato směs doplněna sterilní destilovanou vodou na 1000 ml a protřepána. Do každé z magent bylo nalito 50 ml připraveného média, magenty byly uzavřeny a připraveny k použití.

MS médium M1 s agarem

Do 1000 ml sterilní destilované vody bylo přidáno 2,2 g suché směsi MS média a 1 g aktivního uhlí. Následně bylo změřeno pH, opět na hodnotu 5,5–5,8. pH musí být měřeno až po přidání aktivního uhlí, protože ovlivňuje jeho hodnotu. Dále bylo do směsi přidáno 15 g sacharózy a celý roztok byl rozdělen na poloviny do kádinek. Do každé bylo přidáno 4 g agarů (tzn. 8 g agarů/1 l směsi) a směs byla vložena do mikrovlnné trouby, kde se nechala rozvařit. Následně byly obě poloviny směsi smíchány dohromady. Opět bylo do každé z předem nachystaných magent přelito 50 ml připravené směsi, byly uzavřeny a vloženy do autoklávu, kde proběhla jejich sterilizace za stejných podmínek, jako v předchozím případě.

MS médium M1 bez agarů

Příprava tohoto média proběhla stejně, s tím rozdílem, že bylo použito jako tekuté, takže při jeho přípravě nebyl do směsi přidán Agar, tudíž nebylo potřeba vkládat do mikrovlnné trouby na rozvaření.

MP médium

Do 900 ml sterilní destilované vody bylo přidáno 2,5 g suché směsi MP média, 1 g aktivního uhlí, 20 g sacharózy, 8 g agarů, roztok meta-topolinu 0,6 μmol a roztok IAA 0,1 μmol a bylo změřeno pH. Poté byla do roztoku přidána směs antimykotik již zmiňovanou filtrací za studena. Následně byla směs dolita sterilní destilovanou vodou na objem 1000 ml a promíchána. Pro přípravu tohoto média jsou nutné sterilní podmínky, protože se pro sterilizaci nekládá do autoklávu. Důvodem je obsahující IAA, u kterého dochází v autoklávu k degradaci.

4.3 Zpracování materiálu

4.3.1 Odběr a zpracování letorostů

Ve dvou termínech byly odebrány letorosty s vegetativními pupeny kdouloní. V únoru to byl odběr zimních pupenů a v srpnu pak pupeny založené na následující sezónu. Odběr letních pupenů byl původně plánován na červen, ale z technických důvodů se podařil až v srpnu, kdy bylo větší riziko kontaminace. Letorosty kdouloní s vegetativními pupeny byly odebrány přímo ze sadu ve Školním podniku Žabčice. Následně byly převezeny do laboratoře, kde byly zpracovány. Jednotlivé větvičky byly nastříhány na segmenty dlouhé 10–15 cm se třemi až čtyřmi nody a do doby pokusu uchovány v chladničce.

Bylo založeno celkem 8 pokusů. 7 pokusů bylo provedeno z pupenů zimních a 1 pokus byl pak z pupenů letních.

4.3.2 Povrchová sterilizace materiálu

Po zpracování materiálu byla ještě před založením pokusu provedena sterilizace větviček z důvodu odstranění povrchových nečistot.

Určitý počet segmentů byl vložen do reagenční lahve (NTS lahve) tak, aby v každé bylo cca 10 pupenů od jedné odrůdy. Hrdlo lahve bylo překryto gázou, aby v průběhu sterilizace nedošlo k vyplavení segmentů ven. Následně byl obsah nádoby proplachován po dobu 5 minut pod tekoucí vodou se saponátem. Další postup sterilizace už probíhal ve sterilním prostředí laminárního boxu a byl proveden třemi způsoby:

0,2% roztok HgCl₂

Po propláchnutí 70% etanolem byl do lahve se segmenty nalit 0,2% roztok chloridu rtuťnatého tak, aby byly všechny ponořené. Následovala sterilizace v tomto roztoku po dobu 8 minut s občasným protřepáním. Po uplynutí této doby byl roztok vylit a následně byl obsah 3x propláchnut sterilní destilovanou vodou. Lahve byly uzavřeny sterilní zátkou a tím připraveny na termoterapii.

0,1% roztok HgCl₂

Postup byl stejný, jako u předchozího způsobu. Lišilo se jen to, že na segmenty byl nalit 0,1% roztok stejné látky a sterilizace probíhala po dobu 10 minut. Následovalo opět 3x promytí sterilní destilovanou vodou.

0,2% roztok HgCl₂ + Savo

Nejdříve proběhla sterilizace 0,2% roztokem chloridu rtuťnatého po dobu 8 minut. Po uplynutí požadované doby byl roztok vylit a do lahve byl nalit další roztok, tentokrát to byl 20% roztok Sava. Opět proběhla sterilizace, zde byla požadovaná doba 20 minut. Po této době následovalo stejně jako v předchozích případech 3x promytí sterilní destilovanou vodou.

4.3.3 Sterilizace nástrojů

Veškeré nástroje (v našem případě to byla pinzeta a skalpel), které byly pro práci v laminárním boxu použity, musely být také sterilní. Jejich sterilizace se nejčastěji provádí v horkovzdušném sterilizátoru při teplotách 130–170 °C po dobu 2–4 hodin. Všechny sterilizované předměty musí být zabalené nebo uzavřené, nejlepší je použít alobal. Při práci se pak tyto nástroje vždy opakovaně sterilizují. To bylo prováděno opálením nad plamenem plynového kahanu nebo elektrické pícky.

4.3.4 Sterilizace prostředí – laminární box

Laminární box, nebo také Flowbox je zařízení pro zajištění práce ve sterilním prostředí. V mé práci jsem ho využívala k přenosu *in vitro* materiálu na nově připravená média.

I pro prostředí samotného laminárního boxu je nutná sterilizace. Tu je nejlepší provést pomocí ultrafialového záření, které už v dnešní době bývá součástí boxu. Doba sterilizace se u každého flowboxu liší, je dána jeho velikostí. Může být provedena pouze tehdy, když se uvnitř nenachází žádné kultury. Nejlépe je provést sterilizaci v noci před dnem, kdy bude box využíván. Flowbox, který jsem měla ke své práci k dispozici, byl typ boxu s horizontálním prouděním vzduchu. Proudící vzduch je také sterilní a umožňuje dodržení zásad pro aseptické práce. Při sterilizaci se nejprve spustí proudění

vzduchu a vždy 15 minut před zahájením práce se očistí veškerý povrch uvnitř boxu 70% ethanolem.

4.4 Proces termoterapie

Po sterilizaci byly lahve s materiálem přeneseny do laboratoře s vodní lázní, ve které bylo provedeno ozdravení při vybraných teplotách.

Každá lahev obsahovala větvičky s počtem přibližně 10 pupenů jedné odrůdy. Lahve byly označeny datem, číslem odrůdy a příslušnou teplotou. Následně byly vkládány do předehřáté vodní lázně na požadovanou teplotu. Ozdravovací proces probíhal vždy po dobu 20 minut při jednotlivých teplotách. Po uplynutí požadované doby byly lahve s materiálem z vodní lázně vyjmuty a přeneseny přímo do flowboxu pro další zpracování.

4.4.1 Výběr teplot pro termoterapii

Protože je pro bakterii *Erwinia amylovora* teplotní optimum do 32 °C, byly nejprve vybrány teplotní intervaly:

35 °C; 40 °C; 45 °C; 50 °C; 55 °C

Ty pak byly v průběhu testování dle potřeby přehodnocovány a některé vyřazeny.

4.5 Preparace pupenů

Po ozdravovacím procesu termoterapie ve vodní lázni byly dále větvičky zpracovány ve flowboxu. Z každé byly postupně odpreparovány pupeny za použití pinzety a skalpelu. Nejprve byly pupeny odříznuty od větvičky a poté následovalo odstranění povrchových šupin tak, aby zůstaly jen zelené pupeny. Ty pak byly přeneseny na různé druhy médií a kultivovány v kultivační místnosti s řízenými pěstebními podmínkami (teplo, světlo) pro růst *in vitro* kultur.

4.5.1 Potřeby pro vypreparované pupeny ke kultivaci

Pupeny byly po preparaci přenášeny na laboratorní misky, destičky nebo do skleněných zkumavek či magent s médiem, ve kterých pak byly kultivovány.

Ke kultivaci byly používány destičky typu Multiwell plate s 24 otvory. Do každého byla vložena buničitá vata, která byla předtím nastříhána a sterilizována

v horkovzdušné sušárně. Kromě sterilizované buničité vaty bylo na destičky aplikováno tekuté médium – WPM nebo MS médium M1 bez agaru. Do takto připravených destiček byly vkládány pupeny. Dále byly ke kultivaci používány skleněné zkumavky s uzávěrem či magenty, které také obsahovaly sterilizovanou buničitou vatu s tekutým médiem. Pupeny se vkládaly i na Petriho misky, které však obsahovaly média tuhá – MP médium nebo MS médium M1 s agarem.

4.6 Průběh kultivace

Pupeny byly během kultivace pravidelně kontrolovány. Pokud byla zjištěna jakákoliv kontaminace, byly kontaminované pupeny odstraněny a zlikvidovány. Zdravé pupeny byly přepasážovány do nové destičky, zkumavky či misky. Pasážování většinou probíhalo po 2 – 3 dnech kultivace z důvodu omezení hnědnutí pupenů vlivem oxidace fenolických látek.

4.7 Test patogenity

4.7.1 Médium pro test patogenity

Jako médium pro provedení testu patogenity byl použit masopeptonový agar (MPA). Byl připraven v množství 1000 ml. Na tento objem bylo použito 12 g Nutrient agaru-2, 2 g glukózy a 10 g agaru. Následně bylo upraveno pH na 7,0 – 7,2 a proběhla sterilizace v autoklávu Tuttnauer po dobu 15 minut při 120 °C.

4.7.2 Další postup

Připravené médium bylo rozlito do sterilních umělohmotných Petriho misek a po vychladnutí na něj byly přeneseny explantáty. Následovala kultivace po dobu 14 dní. Po této době byly Petriho misky s kulturami předány na pracoviště Fytopatologie rostlin k určení.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve všech pokusech bylo zakládáno vždy 10 pupenů od každé odrůdy pro každou teplotu.

5.1 Zimní pupeny odebrané v únoru

5.1.1 Pokus č. 1

Tab. č. 7 – 9: Podmínky pokusu č. 1

Odrůda	Buchlovice1	Hemus2	BO-3	Otličnica	Leskovačka	Juranská
Teplota (°C)	35	35	35	35	35	35
Sterilizace	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Odrůda	Buchlovice1	Hemus2	BO-3	Otličnica	Leskovačka	Juranská
Teplota (°C)	40	40	40	40	40	40
Sterilizace	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Odrůda	Buchlovice1	Hemus2	BO-3	Otličnica	Leskovačka	Juranská
Teplota (°C)	45	45	45	45	45	45
Sterilizace	ne	ne	ne	ne	ne	ne

Vyhodnocení mělo proběhnout po 3 dnech od založení pokusu, ale všechny větvičky zplesnivěly. Stalo se tak nejspíš proto, že se po termoterapii nechaly v lahvi moc dlouho, měly by tedy být zpracovány co nejdříve po procesu ozdravení. Také by měla být ještě před vodní lázní provedena povrchová sterilizace materiálu, protože její absence mohla být též důvodem vysoké kontaminace.

5.1.2 Pokus č. 2

Tab. č. 10: Podmínky pokusu č. 2

Odrůda	Teplota (°C)			Sterilizace	Kultivace
	35	40	45		
Buchlovice 1	35	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Hemus 2	35	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
BO-3	35	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Otličnica	35	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Leskovačka	35	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Juranská	35	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium

Tab. č. 11: Vyhodnocení pokusu č. 2

Odrůda	Teplota								
	35 °C			40 °C			45 °C		
	Ž	M	K	Ž	M	K	Ž	M	K
Buchlovice 1	0	0	10	0	0	10	8	0	2
Hemus 2	0	0	10	0	0	10	10	0	0
BO-3	0	0	10	0	0	10	8	0	2
Otličnica	0	0	10	0	0	10	10	0	0
Leskovačka	0	0	10	0	0	10	10	0	0
Juranská	0	0	10	0	0	10	6	0	4

Ž – živé

M – mrtvé

K – kontaminované

Materiál již byl povrchově sterilizován a preparace pupenů proběhla ihned po ozdravovacím procesu ve vodní lázni. Vyhodnocení bylo provedeno po 4 dnech kultivace. Na všech pupenech po termoterapii při 35 a 40 °C se objevila kontaminace, tzn., že při těchto teplotách došlo ke kontaminaci 100 % založených pupenů. Z toho lze usoudit, že termoterapie ve vodní lázni při těchto teplotách nejspíš nebude účinná a nemá tedy smysl ji provádět. POLÁK (2009) ve své práci uvádí, že po termoterapii při 39 °C bylo získáno až 80 % ozdravených rostlin. Jak již bylo uvedeno, ozdravení rostlin

od bakteriálních chorob dosud nebylo provedeno. V práci POLÁKA (2009) bylo provedeno ozdravení od virů a navíc, na rozdíl od metody použité v mé práci, provedl termoterapii dlouhodobou, kdy proces ozdravení probíhal po dobu několika týdnů. Dalším rozdílem byl i způsob termoterapie. V mé práci byla použita termoterapie ve vodní lázni, zatímco POLÁK (2009) provedl termoterapii při dlouhodobě zvýšené teplotě vzduchu.

Po termoterapii při 45 °C se kontaminace projevila na 4 pupenech (40 %) u odrůdy 'Juranská', na 2 pupenech (20 %) u odrůdy 'Buchlovice 1' a na 2 pupenech (20 %) u odrůdy 'BO-3'. Ty byly zlikvidovány a ostatní pupeny dále kultivovány na stejném médiu.

5.1.3 Pokus č. 3

Tab. č. 12: Podmínky pokusu č. 3

Odrůda	Teplota (°C)		Sterilizace	Kultivace
Buchlovice 1	50	55	0,2% HgCl ₂ + Savo	WPM médium
Hemus 2	50	55	0,2% HgCl ₂ + Savo	WPM médium
BO-3	50	55	0,2% HgCl ₂ + Savo	WPM médium
Otličnica	50	55	0,2% HgCl ₂ + Savo	WPM médium
Leskovačka	50	55	0,2% HgCl ₂ + Savo	WPM médium
Juranská	50	55	0,2% HgCl ₂ + Savo	WPM médium

Tab. č. 13: Vyhodnocení pokusu č. 3

Odrůda	Teplota					
	50 °C			55 °C		
	Ž	M	K	Ž	M	K
Buchlovice 1	10	0	0	7	3	0
Hemus 2	10	0	0	6	4	0
BO-3	10	0	0	8	2	0
Otličnica	10	0	0	7	3	0
Leskovačka	10	0	0	8	2	0
Juranská	10	0	0	5	5	0

Materiál byl povrchově sterilizován typem sterilizace s přidáním Sava. Po procesu ozdravení byl ihned zpracován a odpreparované pupeny byly přeneseny na kultivační médium. Vyhodnocení proběhlo po 3 dnech kultivace. Žádná kontaminace nebyla zaznamenána. Ani po dalších 3 dnech kultivace kontaminace zjištěna nebyla, ale došlo k odumření 5 (50 %) pupenů u odrůdy 'Juranská', dále 4 (40 %) pupenů odrůdy 'Hemus 2', 3 (30 %) pupenů odrůdy 'Buchlovice 1', 3 (30 %) pupenů odrůdy 'Otličnica', 2 (20 %) pupenů odrůdy 'BO-3' a 2 (20 %) pupenů odrůdy 'Leskovačka'. To vše při teplotě 55 °C. Důvodem odumření tolika pupenů mohla být teplota termoterapie, kdy samotné pupeny nebyly schopné tak vysokou teplotu přežít. Dalším možným vysvětlením by mohl být i typ sterilizace. Zvolený typ s přidáním Sava mohl být příliš agresivní, a tudíž mohlo dojít k poškození meristému už při samotné sterilizaci. Samozřejmě je zde i možnost, že mohlo být odumření zapříčiněno až kombinací zvoleného typu sterilizace a vysoké teploty.

5.1.4 Pokus č. 4

Tab. č. 14: Podmínky pokusu č. 4

Odrůda	Teplota (°C)	Sterilizace	Kultivace
Buchlovice 1	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Hemus 2	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
BO-3	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Otličnica	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Leskovačka	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Juranská	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium

Tab. č. 15: Vyhodnocení pokusu č. 4

Odrůda	Teplota		
	45 °C		
	Ž	M	K
Buchlovice 1	8	0	2
Hemus 2	10	0	0
BO-3	10	0	0
Otličnica	10	0	0
Leskovačka	10	0	0
Juranská	6	0	4

Protože byla zatím neúspěšnější metoda termoterapie při teplotě 45 °C (co se týče přežití explantátů), byl proveden ještě jeden pokus při této teplotě a stejném způsobu sterilizace. Pupy byly odpreparovány ihned po procesu ozdravení a uloženy na destičky s tekutým WPM médiem. Vyhodnocení proběhlo po 5 dnech kultivace. Objevila se kontaminace u 4 (40 %) pupenů odrůdy 'Juranská' a u 2 (20 %) pupenů odrůdy 'Buchlovice 1'.

Odrůda 'Juranská' byla z důvodu vysokého počtu kontaminací a odumřelých pupenů z pokusů vyřazena.

5.1.5 Pokus č. 5

Tab. č. 16: Podmínky pokusu č. 5

Odrůda	Teplota (°C)	Sterilizace	Kultivace
Buchlovice 1	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Jurák	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
BO-3	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Morava	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Otličnica	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Leskovačka	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium

Tab. č. 17: Vyhodnocení pokusu č. 5

Odrůda	Teplota		
	45 °C		
	Ž	M	K
Buchlovice 1	8	0	2
Jurák	7	0	3
BO-3	10	0	0
Morava	10	0	0
Otličnica	8	0	2
Leskovačka	10	0	0

V tomto pokusu byly větvičky s pupeny ihned po ozdravovacím procesu přemístěny do lahví s tekutým WPM médiem a zde byly kultivovány 3 dny. Po kultivační době byly všechny zdravé, tudíž mohla být provedena preparace pupenů na destičky s WPM médiem. Po dalších 4 dnech kultivace byla zaznamenána kontaminace na 3 (30 %) pupenech odrůdy 'Jurák', na 2 (20 %) pupenech odrůdy 'Buchlovice 1' a na 2 (20 %) pupenech odrůdy 'Otličnica'.

U všech doposud provedených pokusů byly kontaminace s největší pravděpodobností způsobeny patogeny, které byly přítomné uvnitř uzavřených pupenů, a na něž povrchová sterilizace nejspíš neměla vliv.

5.1.6 Pokus č. 6

Tab. č. 18: Podmínky pokusu č. 6

Odrůda	Doubravická
Teplota (°C)	45
Sterilizace	0,1% HgCl ₂
Kultivace	WPM médium MS médium M1 bez agaru

Tab. č. 19: Vyhodnocení pokusu č. 6 na WPM médiu

Odrůda	Teplota		
	45 °C		
	Ž	M	K
Doubravická	3	7	0

Tab. č. 20: Vyhodnocení pokusu č. 6 na MS médiu M1 bez agaru

Odrůda	Teplota		
	45 °C		
	Ž	M	K
Doubravická	3	6	1

V tomto pokusu byla založena pouze jedna odrůda. Byla zvolena sterilizace slabším roztokem HgCl_2 po delší dobu. Pupy byly kultivovány na 2 různých médiích. Po 3 dnech kultivace nebyla zaznamenána kontaminace ani mrtvé pupy. Za další 4 dny kultivace byla situace následující:

WPM médium – 3 (30 %) pupy živé, 7 (70 %) pupů mrtvých

MS médium – 3 (30 %) pupy živé, 1 (10 %) pupen kontaminován a 6 (60 %) pupů mrtvých

Důvodem tohoto výsledku mohla být delší doba kultivace na stejném médiu bez pasážování. Také lze diskutovat o tom, že jiný druh média nejspíš nemá v tomto případě na přežití pupů vliv. Mohla zde hrát roli i nižší odolnost této odrůdy. Další možností odumření pupů však už mohlo být i stáří letorostů. Po celou dobu experimentu byly všechny nastříhané větvičky uchovávány v chladničce, a tak je možné, že už byly pupy méně vitální, a proto většina z nich tento zásah nevydržela.

5.1.7 Celkové vyhodnocení pokusů č. 1 – 6

Tab. č. 21: Vyhodnocení pokusů č. 1 – 6

Odrůda	Teplota								
	45°C			50°C			55°C		
	Ž	M	K	Ž	M	K	Ž	M	K
Buchlovice 1	0	20	1	0	9	7	0	17	5
Hemus 2	0	13	2	2	7	5	0	16	1
Jurák	0	26	4	-	-	-	-	-	-
Doubravická	0	10	2	-	-	-	-	-	-
BO-3	0	17	2	2	9	1	0	11	1
Morava	5	9	0	-	-	-	-	-	-
Otličnica	1	16	0	0	10	3	0	15	2
Leskovačka	10	51	6	0	12	0	0	14	1
Juranská	0	13	3	2	7	0	0	11	0

Po několika týdnech kultivace a celkovém vyhodnocení pokusů č. 1 – 6 lze tvrdit, že termoterapie při teplotě 55 °C nejspíš nebude pro ozdravování vhodná. Některé pupeny byly kontaminovány, ale v 90 % případů došlo k úplnému odumření pupenů, takže musely být následně všechny pupeny zlikvidovány. S největší pravděpodobností bude tato teplota příliš vysoká na to, aby byly získány životaschopné pupeny.

Po ozdravení při 50 °C sice byly získány živé pupeny, ale bylo tomu tak ve 3 případech z 6 s tím, že mnohonásobně převažoval počet pupenů mrtvých. Nelze tedy s jistotou potvrdit úspěšnost termoterapie při této teplotě. I zde lze hovořit o možnosti, že je tato teplota stále ještě příliš vysoká, a proto došlo k odumření tak velkého množství pupenů. Nabízí se zde i možnost vysvětlení přeživších pupenů, a to ta, že tyto odrůdy mohou být o něco odolnější, než jsou ostatní. Pravděpodobně to ale bude pouze odolnost k vyšším teplotám, ne však vůči patogenům.

Dá se říct, že nejlépe dopadly pupeny po ozdravení při teplotě 45 °C, avšak také nebylo mnoho těch, které přežily – po přepočtu to bylo cca 8 % z celkového počtu pupenů ozdravených při této teplotě. Nejvíce zdravých pupenů bylo získáno z odrůdy 'Leskovačka', a tak můžeme hovořit o možnosti, že je to odrůda s největším

potenciálem pro získání životaschopných pupenů. Další odrůdou, ze které bylo získáno více živých pupenů, je odrůda 'Morava'. Stále ale převažuje počet mrtvých pupenů nad počtem živých. Živých pupenů byly cca 4 %, což je ještě poloviční počet než u odrůdy 'Leskovačka'. Navíc u odrůdy 'Morava' nebyla provedena termoterapie při vyšší teplotě, takže nad její odolností nelze diskutovat.

Celkově bylo vyhodnoceno 381 pupenů. Z toho bylo pouze 22 pupenů živých, což je cca 6 %. Kontaminovaných pupenů bylo celkem 46, tj. cca 12 %. Největší počet byl pupenů mrtvých, celkově 313, což odpovídá 82 % z celkového počtu. Všechny živé pupeny byly po vyhodnocení přepasážovány na MP médium do Petriho misek. Byly pravidelně kontrolovány, při zjištění kontaminace jednotlivců zlikvidovány a ostatní přeneseny na nové médium. Postupně však jejich další kultivace vedla k odumření všech zbylých pupenů.

5.1.8 Pokus č. 7

Tab. č. 22: Podmínky pokusu č. 7

Odrůda	Teplota (°C)	Sterilizace	Kultivace
Bereckého	45	0,1% HgCl ₂	MS médium M1 bez agaru MS médium M1 s agarem
Doubravická	45	0,1% HgCl ₂	MS médium M1 bez agaru MS médium M1 s agarem
Pražská	45	0,1% HgCl ₂	MS médium M1 bez agaru MS médium M1 s agarem
Serena	45	0,1% HgCl ₂	MS médium M1 bez agaru MS médium M1 s agarem

V posledním pokusu byly založeny 4 nové odrůdy. Po sterilizaci slabším roztokem HgCl₂ byla provedena termoterapie při 45 °C. Ihned po procesu ozdravení byly pupeny odpreparovány a přeneseny na 2 různá média. Po 3 dnech kultivace se na žádném z nich neobjevila kontaminace. Další vyhodnocení bohužel z technických důvodů proběhlo až po dalších 5 dnech kultivace. U všech pupenů byla zaznamenána rozsáhlá kontaminace. Zde lze téměř s jistotou říci, že pupeny byly kultivovány příliš dlouho na stejném médiu. Je pravděpodobné, že se kontaminace nejdříve objevila pouze na 1 pupenu,

a kdyby byl včas odstraněn a ostatní pupeny přepasážovány, mohlo se kontaminaci předejít. V tomto případě však nejspíš došlo k jejímu rozšíření na ostatní pupeny. I zde však lze samozřejmě diskutovat o odolnosti odrůd, stáří letorostů, od kterých byly pupeny preparovány, a také stáří a vitalitě samotných pupenů.

5.2 Letní pupeny odebrané v srpnu

5.2.1 Pokus č. 8

Tab. č. 23: Podmínky pokusu č. 8

Odrůda	Teplota (°C)		Sterilizace	Kultivace
Buchlovice 1	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Hemus 2	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
BO-3	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Šuranská	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Triumph	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Otličnica	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Leskovačka	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium
Juranská	40	45	0,2% HgCl ₂	WPM médium

V tomto pokusu bylo založeno 8 odrůd. Po termoterapii při 40 a 45 °C neproběhla preparace pupenů, ale celé segmenty se 2 – 3 nody byly přeneseny do magent s tekutým WPM médiem a uloženy v kultivační místnosti. Po 3 dnech kultivace proběhla kontrola a vše bylo bez známek kontaminace. Následovalo vyhodnocení po dalších 4 dnech kultivace a u všeho byla zaznamenána rozsáhlá kontaminace. Zde mohla být důvodem tak rozsáhlé kontaminace doba odběru letorostů s pupeny. Pupeny totiž byly dost velké a některé už začaly rašit, takže se v nich mohlo vyskytovat větší množství patogenů, které nejspíš nebyly odstraněny ani při sterilizaci. Lze diskutovat o tom, že pokud by pupeny byly odebrané již v červnu, jak bylo původně plánováno, byl by výskyt patogenů mnohem nižší a k takové kontaminaci by nemuselo dojít.

Z důvodu omezeného množství materiálu nebylo možno provést další pokusy.

5.3 Test patogenity

V rámci pokusů byl ve spolupráci s pracovištěm Fytopatologie rostlin proveden test patogenity. Ten sice přítomnost patogena neprokázal, nedá se ovšem s jistotou tvrdit, že se ve sledovaném materiálu nevyskytoval. V sadu, ze kterého materiál pochází, výskyt tohoto patogena sledovaný je, takže by pro přesné stanovisko byly nutné další dílčí testy.

6 ZÁVĚR

Kdouloně u nás patří spíše k méně známým druhům ovocných stromů. Nejsou pěstované tak často, jako jiné druhy jaderovin, např. jabloň domácí (*Malus domestica*), protože ve zdejších klimatických podmínkách nestihnou dozrát do plné zralosti plodů. Proto se sklízí ještě před dosažením této zralosti na podzim a jsou využívány zejména v konzervářenském průmyslu. Dříve však byly používány mnohem více, a to nejen v potravinářství, ale i v léčitelství a farmaceutickém průmyslu z důvodu vysokého obsahu vitamínů, antioxidantů a léčivých látek. Proto je v dnešní době snaha o udržení tohoto ovoce prostřednictvím genofondových výsadeb. Jednou z nich je právě výsadba v Žabčicích, která byla zdrojem pokusného materiálu pro tuto práci.

Cílem této bakalářské práce bylo sledovat výskyt původce bakteriální spály růžovitých *Erwinia amylovora* na vybraných odrůdách kdouloní a otestovat různé způsoby termoterapie a kultivace v *in vitro* prostředí. Při pokusech bylo zjištěno, že teploty 35 °C, 40 °C a 55 °C jsou pro ozdravování tímto způsobem nevhodné. V prvních dvou případech jsou teploty na eliminaci nízké, ve třetím případě je tomu naopak. Tato teplota je příliš vysoká i pro přežití samotné rostliny.

Nejvíce živých pupenů bylo v průběhu kultivací získáváno z odrůdy 'Leskovačka'. Byla tedy vyhodnocena jako odrůda relativně nejodolnější s největším potenciálem pro získání životaschopných rostlin. V opačném případě to byla odrůda 'Juranská', která byla již v průběhu pokusů z testování vyřazena.

Současně byl ve spolupráci s pracovištěm Fytopatologie rostlin proveden test patogenity pro ověření přítomnosti sledovaného patogena. Po termoterapii sice výskyt tohoto patogena prokázán nebyl, ale nebyly ani získány životaschopné rostliny. Nelze tedy s jistotou tvrdit, že se ve sledované lokalitě patogen nenachází, a proto je nutné metodu termoterapie dále optimalizovat.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

BAUMJOHANN, Dorothea a Peter BAUMJOHANN. *Rostlinolékař: jak ochránit rostliny před nemocemi a škůdci a jak řešit další problémy v okrasné a užitkové zahradě*. 3. vyd. Překlad Helena Dupařová. Čestlice: Rebo, 2010, 143 s. Rádce zahrádkáře. ISBN 978-80-255-0319-5.

ĎURKOVIČ, Jaroslav a Jana KRAJŇÁKOVÁ. *Mikropropagácia drevín v podmienkach in vitro*. 1. vyd. Zvolen: Vydavateľstvo TU, 2010, 88 s. ISBN 978-80-228-2118-6.

ERBENOVÁ, Marie. *Pěstujeme zdravé ovoce*. 1. vyd. Praha: Květ, 1992, 141 s., [8] s. obr. příl. ISBN 80-85362-09-0.

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

KNITL, Michal, 2011: *Využití mikropropagace u vybraných druhů ohrožených dřevin*. Olomouc. Bakalářská práce (nepubl.). Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky. Vedoucí práce RNDr. Božena Navrátilová, Ph.D.

KOKOŠKOVÁ, Blanka, Gabriela MARHULOVÁ a Miloslav ZOUHAR. *Test patogenity pro spálu růžovitých rostlin technikou explantátových kultur: certifikovaná metodika pro praxi*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2009, 28 s. ISBN 978-80-7427-016-1.

KORBA, Josef a Jana ŠILLEROVÁ. *Soubor ochranných opatření ke snížení škodlivosti původce spály růžovitých rostlin bakterie Erwinia amylovora*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008, [24] l. ISBN 978-80-7427-002-4.

KORBA, Josef, Jana ŠILLEROVÁ, František PAPRŠTEIN a Jiří SEDLÁK. *Metodika testování odolnosti lokálních odrůd jádřovin k patogenu bakteriální spály růžovitých (Erwinia amylovora): certifikovaná metodika*. Holovusy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský, 2014, 1 CD-ROM. ISBN 978-80-87030-29-5.

KOTALOVÁ, Jana, 2010: *Způsoby ochrany vůči obaleči jablečnému ve výsadbě kdouloní*. Brno. Diplomová práce (nepubl.). Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav šlechtění a množení zahradnických rostlin. Vedoucí práce prof. Ing. Vojtěch Řezníček, CSc.

KOVÁČ, Jaroslav. *Explantátové kultury rostlin*. 1. vyd. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, fakulta pedagogická, 1992, 146 s. ISBN 8070440368.

KŘÍŽAN, Břetislav, Eva ONDRUŠÍKOVÁ, Věra HOLLEINOVÁ, Martina KUDĚLKOVÁ, Eva HERMANNOVÁ, Diana MATEJKOVÁ a Jaroslav POLÁK. *Metodika ozdravování rostlin odrůd meruňky, broskvoně a slivoně pomocí chemoterapie v podmínkách in vitro*. V Brně: Mendelova univerzita, 2013, 26 s. ISBN 978-80-7375-837-0.

KŮDELA, Václav, Anton NOVACKY a Leopold FUCIKOVSKY. *Rostlinolékařská bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Academia, 2002, 347 s. ISBN 80-200-0899-3.

LIZARRAGA, Rolando, Pilar TOVAR, Upali JAYASINGHE a John DODDS. *Tissue culture for elimination of pathogens*. Specialized Technology Document 3. International Potato Center, Lima, Peru, 1986, 22 s.

MILOŠEVIĆ, Snežana, Aleksandar CINGEL, Sladana JEVREMOVIĆ, Ivana STANKOVIĆ, Aleksandra BULAJIĆ, Branka KRSTIĆ a Angelina SUBOTIĆ. *Review. Virus Elimination from Ornamental Plants using in vitro Culture Techniques*. University of Belgrade, 2012, 27 (3), s. 203–211.

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

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

PANATTONI, A., A. LUVISI a E. TRIOLO. *Review. Elimination of viruses in plants: Twenty years of progress*. Spanish Journal of Agricultural Research, 2013, 11 (1), s. 173-188. ISSN 2171-9292.

PODLECH, Dieter. *Léčivé rostliny: kapesní atlas : praktická příručka k určování léčivých rostlin s návody na přírodní léčení*. 3. české vyd. Překlad Věra Strádalová. Praha: Slovart, c2007, 254 s. Kapesní atlas. ISBN 978-80-7209-917-7.

POLÁK, Jaroslav. *Ozdravování odrůd ovocných stromů a révy vinné od virů pomocí termoterapie a in vitro kultur: certifikovaná metodika*. Holovousy: Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský, 2009, 68 s. ISBN 978-80-87030-15-8.

PROF. ING. ŘEZNÍČEK CSC., Vojtěch. Kdoule – méně rozšířený druh ovoce. Zahradaweb.cz [online]. 23.7.2008 [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: <http://zahradaweb.cz/kdoule-mene-rozsireny-druh-ovoce/>

RICHTER, Miloslav. *Malý obrazový atlas odrůd ovoce 3*. Vyd. 1. Lanškroun: TG Tisk, c2004, 120 s. ISBN 80-903487-2-6.

RICHTER, Miloslav. *Malý obrazový atlas odrůd ovoce 5*. Vyd. 1. Lanškroun: TG Tisk, c2004, 89 s. ISBN 80-903487-4-2.

Rostlinolékař: časopis pro pracovníky v ochraně rostlin. Praha: Česká společnost rostlinolékařská, 1990, roč. 2013, č. 4. ISSN 1211-3565.

SMITH, Roberta H. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Third edition. Amsterdam: Academic Press, [2013], xvi, 188 s. ISBN 9780124159204.

TRIGIANO, R a Dennis J GRAY. *Plant tissue culture, development and biotechnology*. 1st ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011, xviii, 583 s. ISBN 9781420083262.

ZELINKOVÁ, Hana, 2014: *Hodnocení výskytu patogenů kdouloně (Cydonia Mill.) na lokalitě Žabčice*. Brno. Bakalářská práce (nepubl.). Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství. Vedoucí práce doc. Ing. Ivana Šafránková, Ph.D.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1: Kapky bakteriálního slizu na výhonu

(zdroj: <http://www.jikl.cz/jadroviny/2073-bakteriozy-bakterialni-spala-ruzovitych-rostlin.html>)

Obr. č. 2: Kapky bakteriálního slizu na plodu

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

Obr. č. 3: Symptomy na listech

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

Obr. č. 4: Symptomy na květech

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

Obr. č. 5: Symptomy na letorostu

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

Obr. č. 6: Symptomy na plodech

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

Obr. č. 7: Infekční cyklus patogena

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=4405)

Obr. č. 8: Výsadba kdouloní ve Školním podniku Žabčice

(zdroj: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1970)

9 SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1: Mikroelementy

Tab. č. 2: Makroelementy

Tab. č. 3: Vitamíny

Tab. č. 4: Mikroelementy

Tab. č. 5: Makroelementy

Tab. č. 6: Vitamíny

Tab. č. 7 – 9: Podmínky pokusu č. 1

Tab. č. 10: Podmínky pokusu č. 2

Tab. č. 11: Vyhodnocení pokusu č. 2

Tab. č. 12: Podmínky pokusu č. 3

Tab. č. 13: Vyhodnocení pokusu č. 3

Tab. č. 14: Podmínky pokusu č. 4

Tab. č. 15: Vyhodnocení pokusu č. 4

Tab. č. 16: Podmínky pokusu č. 5

Tab. č. 17: Vyhodnocení pokusu č. 5

Tab. č. 18: Podmínky pokusu č. 6

Tab. č. 19: Vyhodnocení pokusu č. 6 na WPM médiu

Tab. č. 20: Vyhodnocení pokusu č. 6 na MS médiu M1 bez agaru

Tab. č. 21: Vyhodnocení pokusů č. 1 – 6

Tab. č. 22: Podmínky pokusu č. 7

Tab. č. 23: Podmínky pokusu č. 8