

V. H e r v e r t :

Zjišťování mycelia *Podosphaera leucotricha* (Ellis et Everh.) Salm. v pupenech jabloní

Ú v o d

Padlí jabloňové — *Podosphaera leucotricha* (Ellis et Everh.) Salm. patří v posledních letech zvláště v teplejších oblastech u nás i v některých sousedních státech, na př. v Rakousku a Německu k nebezpečným a vážným chorobám jabloní. Některé fáze ve vývoji této parazitické houby nejsou ještě dokonale prostudovány. Neznáme na př. přesně dobu, kdy dochází k infekcím pupenů, ve kterých padlí přezimuje jako mycelium. Tyto pupeny, a to jak květní, tak listové jsou zdrojem primárních nákaz na jaře příštího roku. Zjištění by mělo význam nejen theoretický, nýbrž i praktický. Zákrokem proti padlí v tuto dobu, t. j. v době prorůstání mycelia do pupenů nebo těsně před touto dobou by se dalo snad zabránit z velké části primárním infekcím pupenů a tím hlavním zdroji nákaz pro příští rok.

Zjišťování mycelia v pupenech naráželo hlavně na technické obtíže. Přezimující mycelium v pupenech bylo zjištěno řadou autorů, (W o o d w a r d 1927, B e r w i t h 1936, S t o l l 1941, H o c h a p f e l 1951, H e r v e r t 1954, S t a l d e r 1955), uváděné metody se však nehodily pro vyšetřování velkého počtu pupenů a nebyly plně spolehlivé. Metoda ke zjištění mycelia musela být rychlá, aby umožnila vyšetření velkého počtu pupenů v krátké době a spolehlivá, aby i malé části podhouby se rychle rozeznaly a pokud možno barevně rozlišily od pletiva rostliny.

K vitálnímu barvení mycelia se používá často methylové modře (syn. bavlníková modř, Cotton bleu). Tuto použil S t a l d e r 1955 též ke zjišťování přezimujícího mycelia padlí jabloňového v pupenech. Metoda spočívá v tom, že na podložním sklíčku zahříváme v laktofenolu rozpuštěnou bavlníkovou modř (1 0/100) s částí pupenu, šupinkou nebo lístkem. Laktofenol projasní buňky listu, mycelium se zbarví modře, modře se však zbarví i části pletiv pupenu, i když ne tak intenzivně.

Použili jsme metody, jejímž podkladem je mikrochemická reakce na chitin (S c h n e i d e r 1922). Tuto metodu zde uvádíme. Vyšší houby obsahují ve svých blanách mykochitin. Chitin sám nedává charakteristické chemické reakce. Poměrně lehce lze však dokázat chitosan, který vzniká zahříváním chitinu s louhem draselným na 180 °C (N ě m e c 1930, L h o t s k ý 1954). Chitosan se barví jodjodkaliem hnědofialově. Toto zbarvení po přidání silně zředěné H₂SO₄ (1%) přechází v červenofialové. Zkoušeli jsme barvení chitosanu kyselinou pikrovou, chlorzinkjodem a 1% mythylovou modří, rozpuštěnou v laktofenolu. Kyselina pikrová, která má zbarvovat mycelium trvale žlutě, nezbarvovala mycelium ani buňky pupenu. Chlorzinkjod barvil mycelium modře, buňky pupenu však byly temné, až černé, neprůhledné, a proto zjišťování bylo obtížné. Bavlníková modř barvila mycelium intenzivně modře, slaběji modře pletivo jabloně.

V l a s t n í p r á c e

Mikrochemickou reakci na mykochitin jsme zkoušeli nejprve u listu jabloně, který byl napaden padlím. Pokusně jsme měnili koncentraci louhu a délku doby vyvařování listu. Pletivo rostliny bylo silně poškozováno, pokud listy byly vařeny v louhu přímo. Umístili jsme proto části listů mezi dvě podložní sklíčka, která jsme spojili svorkami. Louh, který vniká mezi sklíčka stačí k projasnění buněk rostliny a k průběhu reakce. (Změna chitinu v chitosan.)

Zjišťování mycelia v pupenech jsme prováděli zatím jen v době vegetačního klidu, t. j. v době po opadu listů, od listopadu do února. Aby pravděpodobnost nákazy byla větší, volili jsme z počátku pupeny jen z letorostů, které byly v minulé vegetaci napadeny padlím. Barva kůry těchto napadených větvíček je stříbřitě bílá. Mycelium jsme zjišťovali bez předběžné fixace, ihned po uříznutí pupenů.

Na ručním mikrotomu jsme zhotovili vždy několik podélných řezů pupenem, které jsme přenesli na podložní sklíčko, přikryli kouskem silonového pletiva a přikryli druhým podložním sklíčkem. Síla řezů 30—40 μ . Obě sklíčka jsme spojili svorkou a vložili do široké zkumavky s koncentrovaným louhem (180 g KOH na 100 ml H₂O). Zkumavky jsme přenesli do sušárny, vyhřáté na 170—180 °C. Zde byly ponechány 60 minut při této teplotě. Potom jsme lough slili a zkumavky se sklíčky propláchli horkou vodou. Po sejmutí sponky jsme oddělili podložní sklíčka. Silonové pletivo jsme nechali ještě na řezech, které jsme promývali koncentrovaným alkoholem a vodou, abychom se zbavili zbytku louhu, který zůstane mezi sklíčky. Promývání jsme dělali tím způsobem, že jsme na řezy pupenu, chráněné stále silonovým pletivem, aby neodplavaly, kapali alkohol a vodu pipetou.

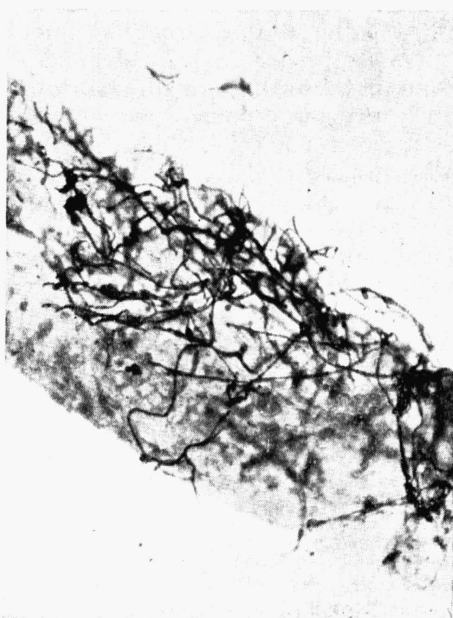
Další postup spočívá v sejmutí silonového pletiva; pomáháme si jehlou. Řezy barvíme nyní jodjodkaliem, které asi po minutě odssajeme. Pokápneme 1% kyselinou sírovou, přikryjeme krycím sklíčkem a ihned prohlížíme. Mycelium je intenzivně červenofialově zbarvené. Buňky rostliny, v našem případě šupiny nebo lístky pupenů, bývají někdy na basální části tmavěmodré až černé, což však při zjišťování mycelia nevadí. Nemůže dojít k záměně s myceliem. Při intenzivním osvětlení a při použití modrého filtru je zbarvení mycelia výraznější.

Způsob přípravy je poměrně jednoduchý. Řezy pupenem se dají zhotovit ručně, poněvadž řezy nemusí být zvlášť tenké. Síla řezů 30—40 μ je dostačující. Pracovali jsme s ručním mikrotomem. Dva pracovníci prohlédli za den 50 pupenů. Je možno postupovat i jiným způsobem. Nezhotovujeme řezy pupenem, nýbrž pupen jehlami rozcupujeme na jednotlivé šupiny a lístky. Další postup je pak stejný jako při řezech.

D i s k u s e

Popsanou metodou lze poměrně rychle a spolehlivě zjistit přítomnost mycelia v pupenech, a tím dokonaleji poznat některé vývojové fáze parazitických hub, v našem případě u *Podosphaera leucotricha*. Hodláme použít této metody předně ke zjištění doby primárních infekcí. Jak jsme se zmínili již na začátku, mělo by toto zjištění velký význam pro praxi. V době infekce nebo těsně před ní by se dalo různými chemickými zákroky možná z velké části zabránit těmto infekcím a tím předejít zdroji nákaz na jaře příštího roku.

Dále používáme této metody k ověření pozorování, že po silných mrazech se padlí vyskytuje slaběji než jiná léta. Dosud tato pozorování byla empirická. Nebylo známo, zda nešlo o vliv podmínek prostředí v předcházejícím roce a zda skutečně k infekcím pupenů padlím došlo.



Mycelium *Podosphaera leucotricha* na listu jabloně (300 \times). — Foto J. Fiala.

Praxe žádá od výzkumu čím dále tím více prognosu jednotlivých chorob. Podle našeho mínění bude možno této metody s úspěchem použít pro předpověď síly primárních infekcí. Poněvadž rozšiřování padlí na jaře se děje téměř výhradně z přezimujícího mycelia v pupenech, byla by tato prognosa poměrně velmi přesná. Její výhodou by byla jednoduchost, která by umožnila výzkumným stanicím v jednotlivých krajích, i méně technicky vybaveným, předpověď intenzity výskytu padlí jabloňového. Metodu bude nutno ještě opakovat a vyzkoušet v praxi. Je známo, že nedochází k růstu mycelia na jaře ze všech pupenů, ve kterých přezimovalo.

Z á v ě r

V práci je popsán využití mikrochemické reakce na chitin ke zjišťování přezimujícího mycelia *Podosphaera leucotricha* v pupenech jabloní v době vegetačního klidu (listopad až únor).

Vyšetřování se provádělo na řezech silných 30—40 μ . Řezy pupenem jsme zhotovovali na ručním mikrotomu, lze však pupeny řezat i ručně v bezové duši, případně pouze „rozcupovat“, to znamená oddělit šupiny a základy listů pupenu od sebe. Zhotovené řezy byly umístěny mezi dvě podložní sklíčka, aby se nerozvařily. Působením koncentrovaného louhu (180 g KOH na 100 ml H₂O) při teplotě 170—180 °C po dobu 1 hodiny došlo ke změně chitinu v chitosan. Tento lze snadno dokázat na př. jodjodkaliem. Chitosan se barví hnědofialově, přikápneme-li však po odssátí jodjodkalia 1% kyselinu sírovou, mění se zbarvení chitosanu v červenofialové, které je intenzivnější a výraznější. Preparáty prohlížíme přímo v této zředěné kyselině. Doporučujeme intenzivní osvětlení a použití modrého filtru.

Tato metoda umožní podle našeho soudu zjištění přesné doby primárních infekcí, ověření pouhého pozorování o vlivu mrazu na přezimující mycelium a prognosu intenzity jarního výskytu padlí jabloňového. Aplikace i pro některé jiné parazitické houby obsahující chitin je možná.

L i t e r a t u r a

- Berwith, C. E. (1936): Apple powdery mildew. *Phytopathology*, 26, 1071—1073.
- Hervert, V. (1954): Nové poznatky v biologii padlí jabloňového (*Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm.) a možnosti jejich praktického využití. *Sborník ČSAZV*, 27A (4) : 305—320.
- Hochapfel, H. (1951): Neues zur Bekämpfung des Apfelmehltaues. *Bad. Obst. — u. Gartenbauer*, 4 (3) : 42.
- Kavina, K. (1932): *Botanická mikrotechnika*, Praha.
- Lhotský, S. (1953): *Cytologie a anatomie rostlin*, Státní pedagog. naklad., Praha.
- Němec, B. (1930): *Nauka o buňce*, Aventinum, Praha.
- Stalder, L. (1955): Beobachtungen über das Verhalten von *Podosphaera leucotricha* (Ellis et Everh.) Salm. in Apfelnkospfen. *Phytopath. Zeitschrift*, 23 (3) : 341—344.
- Stoll, K. (1941): Untersuchungen über den Abfelmehltau *Podosphaera leucotricha* (Ell. u. Ev.) Salm., *Forschungsdienst*, 11 (1) : 59—70.
- Woodward, R. G. (1927): Studies on *Podosphaera leucotricha* (Ell. et Ev.) Salm. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 12 : 173—204.