

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra rostlinné výroby



Ošetření osiva mrkve těkavými látkami z rostlin

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Simona Ličková

Vedoucí práce: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Ošetření osiva mrkve těkavými látkami z rostlin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Jakobovi Šmídovi za odborné vedení, rady a cenné připomínky, kterými přispěli k vypracování této diplomové práce.

Ošetření osiva mrkve těkavými látkami z rostlin

Seed treatment technology of carrot seeds with plant volatile substances

Souhrn

Cílem této práce je zhodnocení vlivu ošetření osiva mrkve obecné (*Daucus carota* L.) pomocí plynné fáze silic, zejména pak nalezení vhodné kombinace koncentrace silic, teploty a doby aplikace snižující přirozený výskyt vláknitých hub, a ověření vlivu působení silic na klíčivost semen. Vzorky osiva byly přirozeně kontaminovány mikroorganismy. Byly testovány silice dobromysli (*Origanum vulgare* L.), hřebíčku (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry) a skořice (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) v koncentracích 16 $\mu\text{l/l}$, 32 $\mu\text{l/l}$, 64 $\mu\text{l/l}$, 128 $\mu\text{l/l}$, a 256 $\mu\text{l/l}$ silice na litr vzduchu při teplotě 50°C po dobu 24 hodin, při 75°C po dobu 1 hodiny, při 100°C po dobu 10 minut, 150°C po dobu 10, 20 a 30 minut kdy docházelo k odpaření silice z filtračního papíru v uzavřené Petriho misce, kam bylo vloženo 100 semen k ošetření. Testování účinnosti ošetřeného osiva na půdní patogeny, bylo prováděno v 96 jamkových mikrotitračních destičkách, které byly uloženy v termostatu při teplotě 25°C, a po dvou dnech bylo provedeno vizuální hodnocení napadených semen. U ošetřených semen silicí bylo také provedeno testování vlivu ošetření na klíčivost. Zkoušky klíčivosti byly provedeny standardním testem podle vyhlášky č. 129/2012 Sb., o podrobnostech uvádění osiva a sadby pěstovaných rostlin do oběhu.

Nejvhodnější silicí pro ošetření osiva mrkve na inhibici mikroorganismů se ukázala skořicová silice v koncentraci 128 $\mu\text{l/l}$ při teplotě 75°C po dobu 1 hodiny, hřebíčková a dobromyslová silice v koncentraci 128 $\mu\text{l/l}$ při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. V této koncentraci silice významně nesnižují klíčivost osiva. K největšímu snížení kontaminace docházelo v koncentraci 256 $\mu\text{l/l}$ při teplotě 75°C po dobu 1 hodiny, ale tento způsob ošetření významně snižoval klíčivost semen a tudíž není vhodný pro ošetření osiva mrkve.

Práce se zaměřuje na možné využití antimikrobiálních účinků silic jako vhodnou alternativu chemických přípravků pro ošetřování osiva a to především v ekologickém zemědělství kde použití chemických přípravků není povoleno.

Klíčová slova: silice, ošetření osiva, houbové patogeny, antimikrobiální účinky, ekologické zemědělství

Summary

The aim of this study is to evaluate the effect of carrot (*Daucus carota* L.) seed treatment using essential oil vapour phase, especially focused on finding appropriate combination of concentration, temperature and application time to decrease number of native fungi and evaluating the effect of essential oil on seed germination. Seed samples were contaminated with natural microorganisms. Essential oils of oregano (*Origanum vulgare* L.), clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) were tested at concentrations of 16 µl/l, 32 µl/l, 64 µl/l, 128 µl/l and 256 µl/l oil per litre of air at 50°C for 24 hours, at 75°C for 1 hour, at 100°C for 10 minutes, 150°C for 10, 20 and 30 minutes, when the oils were evaporating from the filter paper in a closed Petri dishes with 100 carrot seeds. Testing the effectiveness of the treated seeds against soil pathogens were performed in 96 well microtiter plates, which were stored in a thermostat at 25°C and after two days visual evaluation of the infected seeds was carried out. For the essential oil treated seeds the germination tests were also performed. Tests were carried out by germination test according to standard methodology.

The most effective essential oil for carrot seed treatment for inhibition of microorganisms is revealed by cinnamon oil at concentration of 128 µl/l at 75°C for 1 hour and clove and oregano oil at concentration of 128 µl/l at 50°C for 24 hours. At this concentration the oils doesn't significantly reduce the germination. The greatest reduction in contamination occurred at a concentration of 256 µl/l at 75°C for 1 hour, but this method significantly reduced seed germination and thus it is not suitable for seed treatment.

This study focuses on the possible use of antimicrobial effects of essential oils as a suitable alternative for chemical seed treatment, especially in organic farming, where the use of synthetic chemicals is not allowed.

Keywords: essential oils, seed treatment, fungal pathogens, antimicrobial effects, organic farming

Obsah

1	Úvod	7
2	Vědecké hypotézy a cíl práce	8
3	Přehled literatury	9
3.1	Osivo	9
3.2	Přenos chorob osivem	10
3.3	Ošetření osiva	11
3.3.1	Chemické metody	12
3.3.2	Fyzikální metody	13
3.3.3	Biologické metody	14
3.4	Mrkev obecná – <i>Daucus carota</i> L. subsp. <i>sativus</i> Hoffm.	15
3.4.1	Botanická charakteristika	16
3.4.2	Agroekologické požadavky	16
3.4.3	Využití a účinky	17
3.4.4	Choroby a škůdci	17
3.5	Silice	19
3.5.1	Chemické složení	21
3.5.2	Biologická aktivita silic	23
4	Materiál a metody	26
4.1	Silice	26
4.2	Osivo	26
4.3	Klíčivost ošetřeného osiva	28
4.3.1	Statistické vyhodnocení získaných dat	28
5	Výsledky	29
5.1	Ošetření osiva mrkve při 50°C	30
5.1.1	Inhibice plísní na semenech	30
5.1.2	Klíčivost semen	32

5.2	Ošetření osiva mrkve při 75°C	34
5.2.1	Inhibice plísní na semenech	34
5.2.2	Klíčivost semen.....	36
5.3	Ošetření osiva mrkve při 100°C	39
5.3.1	Inhibice plísní na semenech	39
5.3.2	Klíčivost semen.....	41
5.4	Ošetření osiva mrkve při 150°C	43
5.4.1	Inhibice plísní na semenech	43
5.4.2	Klíčivost semen.....	44
6	Diskuze	45
7	Závěr.....	49
8	Seznam literatury	50
8.1	Internetové zdroje.....	54
9	Samostatné přílohy	55

1 Úvod

Zdravotní stav nejen osiva, ale i veškerého množitelského materiálu je jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují polní vzházivost, ale i zdravotní stav a celkovou vitalitu nové generace rostlin, a tím bezprostředně i ekonomiku pěstování. Všeobecně platí, že zdravé osivo je osivo bez přítomnosti škodlivých organismů. Škodlivými organismy rozumíme jakékoli druhy, kmeny nebo biotopy rostlin, živočichů nebo původců chorob (např. virů, bakterií, hub) škodící rostlinám nebo rostlinným produktům. Z tohoto důvodu je problematice zdravotního stavu jako nedílné součásti celkové biologické hodnoty osiva celosvětově věnována mimořádná pozornost, a to nejen v posledních několika letech.

Semeny přenosní škodliví činitelé jsou primárním zdrojem infekce, která se může v porostu rozšířit a zapříčinit vysoké kvantitativní i kvalitativní výnosové ztráty. Příčinou chorob semen jsou podle získaných poznatků nejčastěji mikroskopické houby, popř. i bakterie. Houbové choroby přenosné osivem představují velké nebezpečí. Mikroskopické houby vytváří mykotoxiny, které jsou toxické pro lidi i zvířata. Tyto látky kontaminují potraviny i krmiva zvířat. Škodlivé organismy mohou být příčinou zhoršené klíčivosti, špatné vzházivosti rostlin a špatného vývoje během vegetace.

Ekologické i konvenční zemědělství má shodný záměr, a to udržet pěstované rostliny ve zdravém stavu. Konvenční zemědělství k tomu však používá syntetické látky – pesticidy, které narušují rovnovážné stavy agroekosystému a činí ho na těchto chemických látkách více závislým. Naopak ekologičtí zemědělci se používání syntetických pesticidů zřekli. Mají k dispozici omezený sortiment povolených přípravků k ochraně rostlin vyrobených na rostlinné či minerální bázi nebo lze využít alternativních metod ošetření osiva jako je např. ošetření osiva teplou vodou, ošetření horkou párou, ozařování pomocí proudu elektronů, ošetření biologickými přípravky, organickými kyselinami, rostlinnými extrakty a silicemi.

Biologická ochrana rostlin není v praxi ještě dostatečně rozšířena, je však velmi perspektivní. Silice jsou známé pro své antiseptické, antimikrobiální, baktericidní, virucidní, fungicidní, protizánětlivé, spasmolytické, anestetické, vonné a léčivé vlastnosti. Avšak doposud i přes známé a prokázané účinky silic nebylo jejich používání k ošetřování rostlin rozšířeno.

2 Vědecké hypotézy a cíl práce

Hypotézy:

1. Pomocí ošetření plynnou fází silic lze dosáhnout významného snížení kontaminace osiva mrkve vláknitými houbami
2. Silice v koncentraci, která inhibuje vláknité houby na povrchu semen mrkve, nemá negativní vliv na jejich klíčivost.

Cíl práce:

Cílem této práce je zhodnocení vlivu ošetření osiva mrkve obecné (*Daucus carota* L.) pomocí plynné fáze silic, zejména pak nalezení vhodné kombinace koncentrace silic, teploty a doby aplikace snižující přirozený výskyt vláknitých hub, a ověření vlivu působení silic na klíčivost semen.

3 Přehled literatury

3.1 Osivo

Osivo a sadba bývají rozhodujícími faktory při zakládání výkonných porostů plodin. (Pazderů a Hosnedl, 2008). Jedním z hlavních faktorů nejen osiva, ale i veškerého množitelského materiálu je zdravotní stav, který ovlivňuje polní vzcházivost, ale i celkovou vitalitu nové generace rostlin, a tím bezprostředně i ekonomiku pěstování. Jako nedílná složka se zdravotní stav podílí na celkové biologické hodnotě osiva a v některých případech může docházet k značnému zhoršení. Obecně platí, že zdravé osivo je osivo bez přítomnosti škodlivých organismů. Škodlivými organismy rozumíme jakékoli druhy, kmeny nebo biotopy rostlin, živočichů nebo původců chorob škodící rostlinám nebo rostlinným produktům. Proto je problematika zdravotního stavu jako nedílné součásti celkové biologické hodnoty osiva celosvětově věnována mimořádná pozornost, a to nejen v posledních několika letech, ale už od 19. století – první oficiální stanice pro testování osiva byla založena v roce 1869 v Německu (Samsonová a kol., 2012).

Legislativa osiva

Legislativou rozumíme souhrn právních norem, které se vztahují k semenářství. Výchozím předpisem je zákon č. 219/2003 Sb., o oběhu osiv a sadby, ve znění pozdějších předpisů a na něj navazující vyhláška s přílohami a zákon č. 408/2000 Sb., o ochraně práv k odrudám rostlin ve znění pozdějších předpisů. Platná legislativa v České republice je závazně kompatibilní s obecnými normami platnými v zemích Evropské unie. Společná legislativa i přes rozdílné způsoby hospodaření platí při produkci a uvádění osiv a sadby do oběhu v konvenčním a ekologickém zemědělství. Zákon č. 219/2003 Sb. upravuje v § 13 požadavky na rozmnožovací materiál v ekologickém zemědělství, kterými se liší od požadavků konvenčního semenářství. Tyto rozdíly se netýkají minimálních hodnot jakosti osiv při jejich výrobě a uvádění do oběhu, které jsou publikovány v druhových přílohách vyhlášky výše uvedeného zákona. Problematika ekologického zemědělství je v Evropské unii upravena Nařízením Rady (ES) č. 834/2007 ze dne 28. června 2007 a Nařízením Komise (ES) č. 889/2008 ze dne 5. září 2008, které jsou nejvýznamnějšími závaznými evropskými legislativními pokyny pro všechny členské státy. Podle těchto nařízení může farmář hospodařící v ekologickém režimu použít pouze rozmnožovací materiál vyprodukovaný minimálně v poslední generaci v režimu ekologického zemědělství. Vzhledem k tomu, že není

možné v dostatečném množství vyprodukovat ekologické osivo a sadbu všech druhů plodin, je povolena výjimka na využití konvenčního nemořeného osiva. Tato výjimka je podmíněna povinností u každého členského státu vést elektronickou databázi nabídky ekologického osiva. V České republice je tato povinnost uložena zákonem Ústředního kontrolního zkušebního ústavu zemědělského v Brně. Aktuálně dostupné osivo na území České republiky obsahuje elektronická databáze odrůd. Pro aktualizaci této databáze jsou výrobci ekologického rozmnožovacího materiálu povinni poskytovat informace. Každý výrobce (dodavatel) je povinen vést evidenci o vyrobeném a do oběhu uvedeném rozmnožovacím materiálu pro ekologické zemědělství písemně nebo v elektronické podobě (Šarapatka, 2006; Capouchová et al., 2012).

3.2 Přenos chorob osivem

Houbové choroby přenosné osivem představují velké nebezpečí, mohou být příčinou zhoršené klíčivosti a špatné vzcházivosti rostlin. (Prokinová, 2003). Faktorů, které podmiňují vznik choroby, je celá řada - například teplota, vlhkost, míra osvětlení, fyzikální stav půdy, množství a dostupnost živin, intenzita mikrobiálního života v půdě, citlivost odrůdy, avšak u polních plodin nemůžeme ovlivnit teplotu a většinou ani vlhkost.

Choroby semen nejčastěji bývají patogenního původu. Podle dosud získaných poznatků jsou jejich příčinou nejčastěji mikroskopické houby nebo bakterie (Houba a Hosnedl, 2002). Patogenní houby do semen pronikají prorůstáním z mateřské rostliny nebo prorůstáním vláknem přes bliznu do semeníku, popřípadě přímo přes semenné obaly. Přítomnost patogenního organismu nemusí být vždy v (na) semeni viditelná, jen v některých případech jsou zřejmé příznaky napadení. Řada příznaků napadení je viditelná pouze při zvětšení. Při zvětšení binokulární lupou je dobře viditelné i napadení houbami, které tvoří plodničky (například houby *Septoria*). Početné množství fytopatogenních hub je v (na) osivu zjistitelných pouze mikroskopicky. Například z nejznámějších můžeme uvést druhy rodu *Fusarium*, sněti (Prokinová, 2003). Některé patogenní mikroskopické houby přenosné osivem mohou na semenech vyvolat viditelné příznaky – barevné změny, případně i lehké deformace. Přitom nemusí dojít ke snížení klíčivosti osiva, ale může být poškozena již vzcházející rostlinka např. *Fusarium* (Houba a Hosnedl, 2002). K osivem přenosným počítáme i ty mikroskopické houby, které nepronikají do pletiv, ale kontaminují jejich povrch. K infekci semen fytopatogenními houbami může docházet od doby kvetení až do doby plné zralosti semen. Nevyzrálá pletiva zakládajících se semen jsou nejcitlivější k napadení, z toho

také vycházejí doporučené termíny chemické ochrany Mezi osivem přenosné původce chorob musíme řadit i ty, kteří mohou být v osivu přítomni pouze jako příměs. Může houbových se jednat o sklerocia *Sclerotinia sclerotiorum* – původce tzv. bílé hniloby u řady plodin.

Šíření choroby v porostu z jedné nemocné rostliny, která vyrostla z infikovaného semene, se u hub děje pomocí spor, které houba produkuje na napadených pletivech rostliny. Spory mohou být na zdravé části rostlin a další rostliny rozšiřovány vzduchem, dešťovými kapkami, popřípadě na těličkách hmyzu. Obecně to platí pro všechny houbové choroby, nejen ty přenosné osivem (Prokinová, 2003). Primárním zdrojem infekce, která se může v porostu rozšířit a způsobit vysoké výnosové ztráty kvantitativního i kvalitativního charakteru, jsou semeny přenosní škodliví činitelé. Škodlivý činitel může být také množitelským materiálem zavlečen do nových oblastí, kde se může rozšířit a způsobovat značné hospodářské ztráty (Samsonová a kol., 2012).

3.3 Ošetření osiva

Ochrana proti chorobám, popřípadě proti původcům chorob přenosným osivem, začíná už při setí a vedení množitelského porostu. Kombinace dostupných metod ochrany vychází ze znalostí biologie patogenů a nároků dané plodiny (Samsonová a kol. 2012). Při ochraně rostlin a zemědělských komodit proti houbovým chorobám se obvykle používá přípravků s fungicidní účinností. Většina z těchto přípravků je jedovatá, environmentálně nebezpečná a má negativní vliv na zdraví lidí a necílové organizmy. Obvykle jsou založeny na účinku jedné, případně až tří biologicky aktivních látek, což má v praxi za následek vznik rezistentních populací původců houbových chorob (Pavela, R., Žabka, M., 2011).

Cílem ochrany rostlin v ekologickém zemědělství není vyhubení patogenů, ale jejich regulace. Konvenční i ekologické zemědělství má v podstatě totožný záměr, a to udržet pěstované rostliny ve zdravém stavu. Avšak konvenční zemědělství k tomu potřebuje používat syntetické látky – pesticidy, které narušují rovnovážné stavy agroekosystému a činí je na těchto chemických látkách stále více závislými. Naopak ekologičtí zemědělci se používání chemických syntetických pesticidů zřekli. K dispozici mají omezený sortiment povolených přípravků k ochraně rostlin, které jsou vyrobeny na rostlinné, minerální bázi či na bázi mikroorganismů. Největší význam mají pro ekologické pěstování rostlin nepřímé metody ochrany rostlin a preventivní opatření. Přímé metody ochrany používáme teprve v případě, když se škodlivé organismy přemnoží nad únosnou míru (Šarapatka, 2006).

V ekologickém zemědělství je možno použít alternativních metod ošetření osiv, jako je např. ošetření teplou vodou nebo využití biologických přípravků (Šarapatka, 2006).

3.3.1 Chemické metody

Chemické ošetření osiva je jednou z nejefektivnějších a ekonomicky nejvýhodnějších metod ošetření osiva. Po zasetí se kolem ošetřeného osiva vytvoří v půdě ochranná zóna, která osivo chrání před škůdci a chorobami. Pokud má ochranná látka systémový účinek, může být absorbována kořeny a transportována do nadzemních částí rostliny a poskytuje jim tak ochranu před škůdci a chorobami (Đilvesi et al., 2009).

- **Moření osiva a sadby**

V konvenčním zemědělství má nezastupitelnou roli moření osiv, které může být insekticidní, fungicidní i kombinované (Samsonová a kol., 2012). Chemické moření je všeobecně užívaný postup úpravy osiva většiny zemědělských druhů, včetně osiv některých druhů zelenin. Moření suchými rtuťnatými mořidly a málo účinné moření síranem měďnatým či dokonce louhem používané mnoho let bylo vystřídáno jinými postupy, při kterých se různými typy zařízení vstříkuje řídká kašovitá hmota, respektive suspence do osiva, které však musí být čisté, zbavené prachu i jakéhokoliv balastu, na němž by mořidlo zbytečně ulpívalo. Ideální chemická látka pro moření osiva by měla být vysoce účinná proti patogenním organismům, relativně netoxická pro rostliny, neškodná pro lidi a zvířata, stabilní pro poměrně dlouhé období skladování osiva (Houba a Hosnedl, 2002).

Ošetření osiva zaručuje dobrý zdravotní stav semen během skladování, setí, klíčení a rašení, ale nemůže zlepšit klíčivost v případě mechanického poškození osiva nebo špatných skladovacích podmínek (Vujošević et al., 2010). Moření osiva a sadby je vysoce účinný a efektivní způsob ochrany rostlin, ale především jde o umělý zásah, který je vůči přírodnímu prostředí nepřirozený (Houba a Hosnedl, 2002).

V mnoha zemích nakazují barvení ošetřeného osiva zákony a to z důvodu zabránění náhodné konzumace ošetřených semen. Barvení má také významnou úlohu pro charakteristiku osiva, rovněž může být použito pro zdůraznění určitých vlastností osiva např. odolnost vůči herbicidům (Vujošević et al., 2010).

3.3.2 Fyzikální metody

- **Ošetření osiva horkou vodou**

Moření horkou vodou je úprava osiva sloužící ke zničení patogenů přenosných osivem nechemickou cestou. Jedná se o termofyzikální metodu ochrany rostlin využívanou na široké spektrum bakterií, hub a virů u semen mnoha zemědělských plodin (Houba a Hosnedl, 2002). Již na konci 19. století byla metoda použita na ošetření osiva proti sněti ječmene (*Ustilago nuda*) v obilovinách. V roce 1920 bylo ošetření osiva horkou vodou v USA standardní metodou k ošetření osiva zelí proti fomové hnilobě (*Phoma lingam*). Ve druhé polovině 20. století bylo ošetření osiva horkou vodou odsunuto z popředí zájmu v důsledku uplatňování účinnějších chemických látek. Od této metody se tedy ustoupilo a dále se již nerozšířila.

Při ošetření horkou vodou musí být po celou dobu aplikace udržována přesná teplota. Je třeba se vyhnout poklesu teploty na začátku ošetřování. Efektivní teplota ošetření a doba působení musí být určeny pro každý jednotlivý druh semen a příslušné patogeny. Principem je odstranění patogenů, pokud možno bez snížení klíčivosti semen. Ošetření horkou vodou má větší význam pro ekologické zemědělství. Tato metoda by se mohla stát alternativním způsobem ošetření semen v konvenčním zemědělství, zejména v případě neúčinnosti chemických látek povolených pro ošetření semen (Nega et al., 2003).

- **Ošetření osiva horkým vzduchem**

Léčba horkým vzduchem je stará metoda, která se ukázala být účinná proti různým patogenům. Cílové patogenní organismy jsou houby, viry, bakterie. Tato metoda vyžaduje optimální kombinaci teploty a času ošetření pro nejlepší efektivitu s co nejmenším vlivem na klíčivost osiva (Grondeau et al., 1994)

- **Ošetření horkým vlhkým vzduchem**

Metoda ošetření horkým vlhkým vzduchem je založena na předpokladu, že patogeny mají nižší toleranci vůči vysokým teplotám než semena. Jedná se o metodu snižující důsledky ošetřování horkou vodou a suchým horkým vzduchem jako je namáčení a sušení semen, nebo nadměrné sušení (Forsberg, 2004). Mezní hodnota teploty vzduchu pro ošetření osiva je definována jako nejvyšší teplota, které osivo může být vystaveno po určitou dobu času a vlhkosti vzduchu bez významných škodlivých účinků na klíčení nebo zpoždění klíčení. Mezní hodnota teploty vzduchu závisí na druhu rostliny a odrůdě i povětrnostních podmínkách, kterým byly plodiny vystaveny, a v důsledku toho obsahují různé chemické

sloučeniny a různé množství vody. Vzorčky jsou vystaveny proudu vzduchu o různých teplotách v rozsahu, který je očekáván, že je optimální.

Relativní vlhkost vzduchu by měla být vyšší než 90%. V tomto případě obsah vlhkosti na povrchu osiva stoupá v průběhu ošetřování, což zvyšuje citlivost patogenů vůči vysokým teplotám. Ošetřování by mělo být ukončeno dříve, než se negativní vliv teploty projeví na osivu (Vujošević et al., 2010)..

- **Ozařování pomocí proudu elektronů**

Tato metoda byla vyvinuta v Německu a ukazuje uspokojující výsledky experimentů prováděných v několika zemích. Je založena na destruktivním působení nízkoenergetických elektronů (pod 300 keV) na patogenní buňky bez škodlivého účinku na osivo samotné. Hloubka penetrace elektronového paprsku je závislá na síle elektrického pole, v němž jsou elektrony zrychleny, a nesmí překročit hloubku osetení (0,025 - 0,5 mm). V opačném případě by to mohlo vést k poškození semen a mutacím (Eschrig et al., 2007).

Tato metoda může být také použita pro odstranění vajíček, larev, kukel a dospělých jedinců některých druhů hmyzu uložených v zrnech. Ozařování pomocí proudu elektronů má stejné výhody a nevýhody jako metoda ošetření horkým vlhkým vzduchem (Vujošević et al., 2010).

3.3.3 Biologické metody

- **Biologické ošetření osiva**

Biologické přípravky na ošetření semen vyžadují použití živých organismů v zájmu ochrany semena a vzházející rostliny. Většina z registrovaných přípravků je založena na působení bakterií a hub. Po zasazení ošetřeného osiva se mezi mikroorganismy na povrchu semen a mikroorganismy v půdě vytvoří jeden z následujících vztahů: parazitismus, kompetence nebo antagonismus. Ošetření osiva s dostatečným množstvím mikroorganismů může významně zvýšit počet zdravých rostlin. Vzhledem ke specifickému způsobu působení většiny přípravků jsou účinné na jeden druh patogenu (Vujošević et al., 2010).

Často se stává, že i když přípravek má dobrou účinnost v laboratorních podmínkách, v praxi není příliš účinný. Je to pravděpodobně kvůli nízké kvalitě aplikace mikroorganismů na povrch semen, kompetence s mikroorganismy v půdě nebo kvůli nepříznivým klimatickým a půdním podmínkám (Jensen, et al., 2000). Nejznámějším příkladem biologických úprav je inokulace osiva pomocí bakterie rodu *Rhizobium*. Další bioagens je houba *Trichoderma*

harzianum omezující půdní patogeny *Pythium*, *Rhizoctonia* a *Fusarium* nebo bakterie *Bacillus subtilis* (Houba a Hosnedl, 2002).

- **Rostlinné extrakty**

Rostlinné extrakty se využívají nejen k prevenci před některými škůdci a původci chorob, ale i k podpoře klíčení a vzházení osiv (Pavela, 2011). Přípravky na bázi rostlinných extraktů jsou tvořeny směsí biologicky aktivních látek získaných různým extrakčním způsobem. Jejich biologická účinnost je založena na účinnosti rostlinných biologicky aktivních látek. Tyto přípravky mají oproti syntetickým přípravkům výhodu v tom, že obsahují směs biologicky aktivních látek, která je obvykle v synergickém účinku, a zabraňuje tak vzniku mechanismu rezistence u původců houbových chorob. Rezidua se po vlastní aplikaci relativně rychle rozkládají, a jsou proto environmentálně bezpečná. Obvykle jsou takovéto přípravky vyrobeny z extraktů léčivých rostlin, které svým charakterem eliminují jak zdravotní, tak environmentální rizika spojená s užitím takovýchto přípravků na ochranu rostlin (Pavela, R., Žabka, M., 2011). Základem rostlinných extraktů jsou sušené rostliny, které byly macerovány v rozpouštědle např. ve vodě nebo organickém rozpouštědle (etanolu, metanolu, acetonu, benzenu či chloroformu). Osivo je máčeno v neředěných rostlinných extraktech, nebo v naředěném 0,2 – 20% roztoku v nekovových mickách (nejlépe nasypané v malých látkových pytlíčcích) po dobu 10 – 30 minut. Poté se dosuší na stinném místě a téhož dne se vysévá (Pavela, 2011).

Silice

Osivo zeleniny je možné dezinfikovat rostlinnými silicemi díky jejich antimikrobiálním vlastnostem. V in vitro podmínkách vykazovala nejvyšší aktivitu proti běžným houbovým chorobám osiva (např. *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Xantomonas* spp., *Clavibacter* spp.) silice tymiánu, dobromysli, skořicovníku a hřebíčkovce. Ošetření osiva vybranými silicemi se provádí v koncentraci 0,1 – 1 %, přičemž koncentrace ošetření nemá negativní vliv na následné klíčení osiva (Van Der Wolf et al., 2008).

3.4 Mrkev obecná – *Daucus carota* L. subsp. *sativus* Hoffm.

Mrkev obecná patří do čeledi miříkovité (*Apiaceae*). V čeledi je zařazeno asi 270 rodů s 2850 druhy po celém světě. Čeleď *Apiaceae* se rozděluje do dvou podčeledí: *Saniculoideae* (žindavovité) a *Apioideae* (miříkovité). Do této podčeledí patří kromě mrkve i známé

kořeninové a léčivé rostliny. Jsou to především *Carum carvi* L. (kmín kořený), *Foeniculum vulgare* MILL. (fenykl obecný), *Levisticum officinale* KOCH. (libeček lékařský), *Petroselinum crispum* (MILL). A.W.HILL. (petržel obecná), aj. Jsou to jednoleté, dvouleté i vytrvalé byliny, málokdy keře a polokeře (Růžičková a kol., 2013). Kulturní forma mrkve vznikla křížením planě rostoucích forem původních v oblasti Střední Asie. Odrůdy mrkve moderního oranžového typu byly především vyšlechtěny v Nizozemsku, Anglii a Francii až v 17. století (Petříková, Hlušek a kol., 2012).

Mrkev je nejrozšířenější kořenová zelenina u nás. Osevní plocha mrkve v roce 2013 na území České republiky byla 597 ha a v roce 2012 547 ha, rozloha sklizňové plochy v roce 2012 u mrkve byla 911 ha, ze které se sklídilo 28 378 t mrkve. Průměrný hektarový výnos mrkve je 31,14 t/ha. V roce 2012 bylo ze sklizně vyvezeno mimo Českou republiku 11 947 t čerstvé mrkve (Buchtová, 2013).

3.4.1 Botanická charakteristika

Mrkev je dvouletá rostlina. V prvním roce tvoří dužnatý kořen válcovitého až dlouze kuželovitého tvaru, z hlavy kořene vyrůstají řapíkaté, 2 – 3x zpeřené listy. Ve druhém roce vegetace vyrůstá rýhovaný a rozvětvený květní stonek vysoký 1 – 1,5 m. Květenstvím je složený okolík, květy mají bílou barvu, terminální květ bývá fialový. Mrkev je cizospašná, entomofilní rostlina, její opylení provádí drobný hmyz. Plod tvoří hnědé dvounažky rozpadající se na žebernaté nažky s háčkovitými ostny. Tyto háčkovité útvary musejí být před mechanizovaným výsevem odstraněny skarifikací. V jednom gramu osiva je 700 až 1400 semen (HTS = 7,7 – 1,4 g). Semena si udržují klíčivost 3 až 4 roky (Petříková, Hlušek a kol., 2012).

3.4.2 Agroekologické požadavky

Pro pěstování mrkve u nás jsou obzvláště rozhodující půdní podmínky, neboť mrkev je na klima nenáročná (Růžičková a kol., 2013). Lze ji pěstovat především v kukuřičné či řepařské oblasti. Teplotní optimum pro mrkev je 16-20°C. Semena klíčí již při 5 °C, ovšem při nízkých teplotách proces vzházení trvá až několik týdnů (Petříková, Hlušek a kol., 2012). Nejvhodnější jsou půdy lehčí, záhřevné, propustné a hluboké, pokud možno bez kamenů a bez utuženého podorníčí. Tedy půdy písčitohlinité, hlinitopísčité až jílovitohlinité s dostatečnou

zásobou humusu. Nevhodné půdy pro mrkev jsou těžké, jílovité a štěrkovité. Optimální hodnota pH půdy je od 6,7 do 7,5 (Růžičková a kol., 2013). Nejčastěji na pozemcích s možností závlahy se vysévá pneumatickým secím strojem do jednoho až tří řádků na hrúbku. Na půdách lehkých, vysychavých je vhodné vysévat do vyvýšených záhonů do tří dvouřádků nebo do čtyř jednoduchých řádků (Petříková a kol., 2006).

V osevním postupu mrkev zařazujeme do II. tratě. Optimálními předplodinami jsou obiloviny, luskoviny, okopaniny a zeleniny. Na stejný pozemek zařazujeme mrkev i ostatní miřikovité po 4 až 6 letech (Růžičková a kol., 2013)

3.4.3 Využití a účinky

Mrkev je v dnešní době pěstovaná jako potravina v mnoha varietách. Její použití je od čerstvého konzumu přes sušárenství až po mrazírenství. Kromě toho je významnou léčivou rostlinou. Užívanou drogou je kořen (*Dauci radix*), semeno (*Dauci fructus*) a nať spíše výjimečně. Obsahuje karoteny, které jsou prekursorem vitamínu A, vitaminy skupiny B, vitamin C, cukry, stopy silice, fosfolipidy, steroly a mnoho minerálních látek. V semenech se nachází především silice a oleje. Obsahové látky mrkve jsou schopny zvyšovat odolnost organismu především proti infekcím (Růžičková a kol., 2013).

3.4.4 Choroby a škůdci

- **Virózy**

U kořenové zeleniny je možné se setkat s řadou nejrůznějších viróz. K nejčastějším patří virová tenkolistost mrkve (Carrot thin leaf virus – CTLV), virová červenolistost mrkve (Carrot red leaf virus – CRLV), virová strakatost mrkve (Carrot motley virus – CMoV). K dalším průvodcům viróz patří virus mozaiky vojtešky (AMV), virus kadeřavosti vrcholu řepy (BCTV) (Rod a kol., 2005).

V teplejších letech virózy způsobují ztráty především v semenných porostech, které se projevují jako mozaiky až žloutnutí listů, celková inhibice růstu a sterilita. Také bývají napadené i konzumní porosty, u těch ale zatím nejde o hospodářsky významné onemocnění (Kazda a kol., 2003).

Bakteriózy

- **Měkká hniloba miříkovitých (*Pectobacterium carotovorum*)**

Jedná se především o skládkovou hnilobu vyskytující se na poškozených rostlinách. Příznaky napadení se projevují měknutím, kašováním pletiva od vrcholu kořene. Vyskytuje se na zamokřené půdě.

- **Bakteriální nádorovitost (*Rhizobium radiobacter*, syn. *Agrobacterium tumefaciens*)**

Měkkou skládkovou hnilobu vyvolává u kořenové zeleniny napadení polyfágní bakterií *Erwinia carotovora*, která je obvyklou součástí půdní mikroflóry a rostliny napadá jen za určitých podmínek.

Mykózy

- **Alternariová skvrnitost listů (*Alternaria dauci*)**

První příznaky se projevují na nejstarších listech v podobě drobných žlutých teček, které se rychle zvětšují a hnědnou. V další fázi vývoje onemocnění se projevuje spála, kdy celé listy hnědnou, až černají a konečným příznakem je odumírání listů. Při silnějším napadení odumírá celá rostlina. Větší ztráty jsou způsobeny při napadení mladších rostlin, ale častější napadení bývá až ve druhé polovině vegetace.

Houba se během vegetace šíří konidiiemi roznášenými deštěm a větrem a následně přežívá na semenech nebo posklizňových zbytcích. Výskytu choroby napomáhá deštivé počasí. Může se podílet na umírání klíčících rostlin (Kazda a kol., 2003)

- **Padlí (*Erysiphe heraclei*, syn. *Erysiphe umbelliferarum*)**

Napadení se projevuje ve druhé polovině vegetace, kdy se na svrchní i spodní straně listů objeví nápadný bílý moučnatý povlak houby. Mycelium s konidiofory a konidiiemi porůstá i řapíky. V další vývojové fázi se začnou tvořit plodničky, které jsou viditelné jako černé tečky. Postupně se povlaky barví do šeda. Konečným příznakem napadení padlím je zaschnutí a odumírání listů. Onemocnění způsobuje především ztráty v semenných porostech.

Houba přežívá na planě rostoucích hostitelských rostlinách a také je přenosná i osivem. Její výskyt podporuje velmi teplé a suché počasí v průběhu léta (Kazda a kol., 2003).

- **Černá hniloba mrkve (*Alternaria radicina*, syn. *Stemphylium radicinum*, *Fungi imperfecti*)**

Houba napadá vzcházející rostliny, vyvolává měknutí, černání, hypokotylu a kořínků, následkem toho klíčící rostliny odumírají. Dalším příznakem je napadení kořenů starších v podobě černých, lehce vpadlých, nepravidelných skvrn. Výraznější příznaky se většinou projevují až v průběhu skladování, kdy se černé skvrny šíří a jsou hluboce vpadlé. Konečným příznakem je v závislosti na vzdušné vlhkosti a dalších faktorech buď zasychání a částečná mumifikace, nebo mokrá hniloba, která je při vyšší vlhkosti obvykle vyvolaná druhotným napadením fakultativně patogenními bakteriemi.

Během vegetace se houba šíří konidii roznášenými větrem nebo deštěm, následně přežívá v infikovaných posklizňových zbytcích a semenech (Kazda a kol., 2003) .

- **Sklerotinová hniloba (*Sclerotinia sclerotiorum*)**

V průběhu vegetace dochází k infekci rostlin a nápadné příznaky se často objevují až v průběhu skladování. Pouze ve vlhkých a chladných letech je možné se s příznaky napadení setkat již v porostu. Primárním příznakem bývá měknutí částí pletiva kořene, poté následuje měkká hniloba, kdy na napadeném pletivu vyrůstá bílé, husté, vatovité mycelium houby. V myceliu se po několika dnech tvoří stříbřité, rychle černající tvrdé útvary – sklerocia (Kazda a kol., 2003).

Škůdci

Mezi škůdce mrkve obecné patří Pochmurnatka mrkvová (*Psila rosae*), Dutilka hlohová (*Dysaphis crataegi*), Merule mrkvová (*Trioza apicalis*), Mšice hlohová (*Dysaphis crataegi*), Mšice mrkvová (*Semiaphis dauci*), Hád'átko kořenové (*Meloidogyne hapla*), Osenice (*Agrotis* spp.). Především škodí na nadzemních částech rostliny sáním, ale také se mohou vyskytovat a škodit na kořenech a kořenovém krčku. Při zjištěném napadení se doporučuje aplikace insekticidů. Škůdci mrkve nejsou významnými přenašeči bakterióz (Kazda a kol., 2003; Rod a kol., 2005).

3.5 Silice

Jsou známé pro své antiseptické, antimikrobiální, baktericidní, virucidní, fungicidní, protizánětlivé, spasmolytické, anestetické, vonné a léčivé vlastnosti. Používají

se ke konzervaci potravin a jako antimikrobiální, analgetické, sedativní, protizánětlivé, uklidňující a místně anestetické prostředky. Většinou jsou získávány pomocí parní nebo vodní destilace, kterou poprvé vyvinuli Arabové již ve středověku. Získávají se extrakcí z různých aromatických rostlin obvykle lokalizovaných v mírném až teplém pásmu, jako je Středomoří a oblast tropických zemí (Bakkali et al., 2008).

Jedná se o kapaliny olejovité konzistence, které se za pokojové teploty velmi dobře odpařují, aniž by po sobě zanechávaly charakteristické mastné skvrny (Mitáček a kol., 2010). Franz a Novak (Baser et Buchbauer, 2010) definují silice jako komplexní směsi těkavých sloučenin biologického původu izolovaných pouze fyzikálními metodami (lisování a destilace) ze známých taxonů rostlin nebo jejich částí. Pro svoji značnou aromaticnost, nerozpustnost ve vodě a velmi častou žlutavou barvu se dříve nazývaly éterickými (nebo též vonnými) oleji. Existuje několik metod pro extrakci silic (Baser et Buchbauer, 2010). Ty mohou zahrnovat použití kapalného oxidu uhličitého nebo mikrovln a hlavně nízký nebo vysoký tlak destilace vařící vodou nebo horkou párou. Produkty extrakce se mohou měnit v kvalitě, množství a složení, dle podnebí, složení půdy, rostlinných orgánů, věku a vegetativní fáze cyklu. Proto, abychom získali silice stálého složení, musí být extrahovány za stejných podmínek ze stejné části rostliny, která roste na stejné půdě a byla získána ve stejném období (Bakkali et al., 2008). V listech je obsah silic obecně vyšší než ve stoncích. Obsah silic je také dán geneticky, kde je ovlivněn druhem rostliny, odrůdou, stanovištěm, nadmořskou výškou, půdním typem, vydatností srážek, úhrnem slunečního svitu, denní hodinou, vegetační fází rostliny (maximální obsahy jsou dosahovány těsně před květem, poté jsou silice spotřebovávány na stavbu zásobních látek semen) či teplotou (Mitáček a kol., 2010). Mohou být syntetizovány ve všech rostlinných orgánech, tj. pupenech, květech, listech, stoncích, větvích, semenech, ovoci/plodech, kořenech, ze dřeva nebo kůry. Jsou uloženy v sekrečních buňkách, dutinách, kanálcích, epidermálních buňkách nebo žlázách trichomu (Bakkali et al., 2008). Po chemické stránce tyto látky mají povahu terpenů a jejich derivátů.

V přírodě hrají důležitou roli v ochraně rostlin, mohou také přitahovat určité druhy hmyzu pro rozptýlení pylu a semen, nebo mají odpuzující vlastnosti pro ochranu (Bakkali et al., 2008). Chrání své producenty před žírem hmyzu, plžů, ptáků, savců. Taktéž inhibují klíčení semen a růst rostlin a uplatňují se v nežádoucích konkurenčních vztazích.

Významné uplatnění nacházejí ve farmacii, v kosmetickém průmyslu a v potravinářství (Nováček, 2009).

3.5.1 Chemické složení

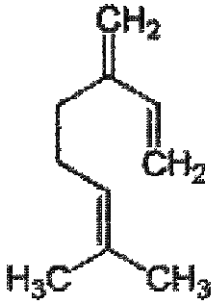
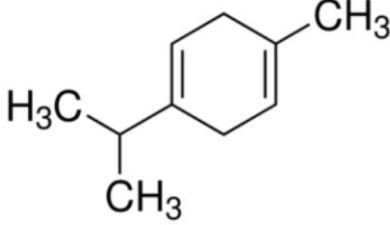
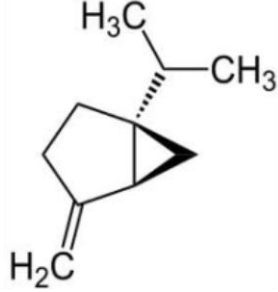
Silice jsou velmi složité přírodní směsi, které mohou obsahovat až 60 složek v různých koncentracích. Vyznačují se dvěma nebo třemi hlavními složkami v poměrně vysoké koncentraci (20 – 70%), ostatní složky jsou ve srovnání s hlavními přítomny ve stopovém množství. Například karvakrol (30 %) a thymol (27 %) jsou hlavními složkami silice z *Origanum compactum* Benth.; linalool (68 %) ze silice *Coriandrum sativum* L.; menthol (59 %) a mentol (19 %) jsou obsaženy v silici z *Mentha piperita* L.. Obecně platí, že tyto hlavní složky určují biologické vlastnosti silic. V jedné silici se mohou vyskytovat látky vznikající odlišnými biosyntetickými drahami. Podle biosyntetického původu lze látky obsažené v silicích rozdělit do tří základních skupin, hlavní skupina se skládá z terpenů a terpenoidů, druhá z aromatických a alifatických složek a třetí vzniká štěpením glukosinuátů (Bakkali et al., 2008).

Terpeny

Představují rozsáhlou skupinu rostlinných látek, jejichž biosyntéza vychází z acetyl - CoA. Syntetizují se acetát mevalonátovou cestou. Z aktivního isoprenu izopentenylpyrofosfátu se vytvářejí monoterpeny až polyterpeny odlišného typu. Terpeny mají alifatickou nebo cyklickou strukturu. Jsou to bezkyslíkaté nebo kyslíkaté látky (Nováček, 2009). Terpen, obsahující kyslík, se nazývá terpenoid (Bakkali et al., 2008). Terpeny je možno pokládat za polymery izoprenů (Nováček, 2009). Tvoří strukturně a funkčně odlišné třídy a jsou vytvořeny z kombinací několika pěti uhlíkatých (C5) molekul izoprenu a odle počtu isoprenových jednotek, kterými jsou tvořeny. Dělí se do 7 skupin, kde hlavní skupinou terpenů jsou monoterpeny (C10), dále seskviterpeny (C15), výjimečně hemiterpeny (C5) a diterpeny (C20). Syntézou izoprenu vznikají i víceuhlíkaté látky, které nejsou těkavé, ale jsou významné triterpeny (C30), tetraterpeny (C40), polyterpeny (C5 x n). Monoterpeny jsou nejvíce zastoupenými molekulami, neboť tvoří 90% silic a umožňují tvorbu velké škály struktur (Bakkali et al., 2008). Monoterpeny (obr. 1.) mohou být acyklické (myrcen, ocimen), monocyklické (γ -terpine, para-cymen), bicyklické (kamfen, sabinen). Silice tvořené převážně acyklickými monoterpeny jsou např. geraniová, růžová, levandulová, koriandrová silice, monocyklickými monoterpeny např. mentolová, eukalyptová, rozmarýnová, vavřínová, kmínová, citrónová silice, bicyklickými monoterpeny např. terpentýnová, kosodřevinová, jalovcová, kafrovníková a valerjánová silice. Do silic složených převážně ze seskviterpenů můžeme zařadit chmelovou silici (Nováček, 2009). Funkčními skupinami terpenů mohou být

alkoholy (geraniol, mentol, borneol), aldehydy (geranial, neral, citronellal), ketony (tegeton, menthone, karvon), estery (linalyl acetat, citronellyl acetat), étery (1,8-cineole), fenoly (thymol, carvacrol) (Bakkali et al., 2008).

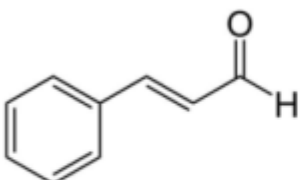
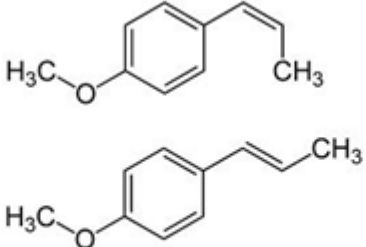
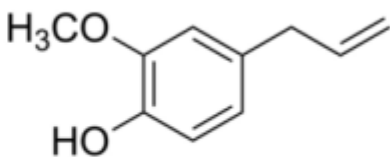
Obr. 1: příklady monoterpenů

acyklický monoterpen	monocyklický monoterpen	bicyklický monoterpen
		
myrcen	γ -terpene	sabinen

Aromatické sloučeniny

Aromatické sloučeniny jsou odvozeny z fenypropanu (obr. 2), vyskytují se méně často než terpeny. Funkčními skupinami aromatických sloučenin jsou aldehydy (cinnamaldehyd), alkoholy (cinnamylalkohol), fenoly (chavicol, eugenol), methoxy deriváty (anetol, elemicin, estragol, metyleugenol) a metylen dioxy sloučeniny (apiol, myristicin, safrol). Zdrojem aromatických sloučenin je např. anýz, skořice (E-cinnamaldehyd), hřebíček (eugenol), fenykl (anetol), muškátový oříšek, petržel (myristicin), šafrán, badyán (anetol), estragon a některé rody z čeledí *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Rutaceae* (Bakkali et al., 2008).

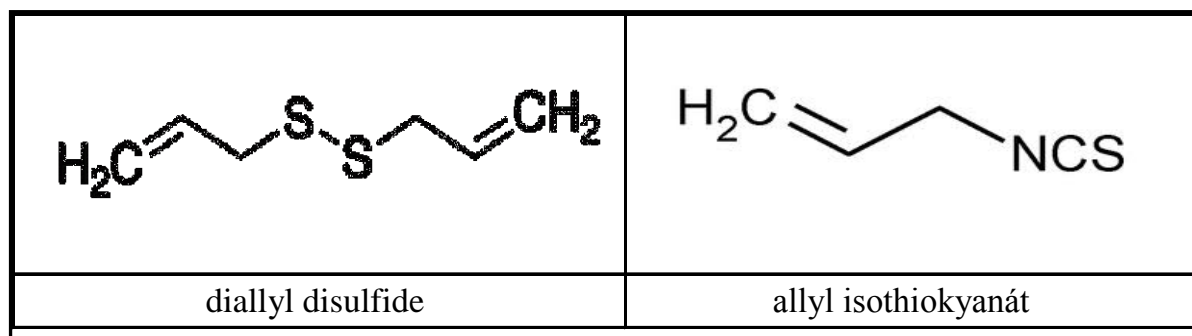
Obr. 2: příklady aromatických sloučenin

		
cinnamaldehyd	cis a trans anetol	eugenol

Silice vznikající štěpením glukosinolátů

Jsou to silice zvláštního charakteru s bakteriocidními a fungicidními účinky. Chemicky to jsou jednotné, alifatické sírné sloučeniny (Nováček, 2009). Dusíkaté nebo sulfurované komponenty jsou glukosinolátové nebo isothiokyanátové deriváty česnekové (diallyl disulfide) a hořčičné (allyl isothiokyanát) silice (obr. 3.), které jsou charakteristické jako sekundární metabolity rostlin (Bakkali et al., 2008).

Obr. 3: deriváty česnekové a hořčičné silice



3.5.2 Biologická aktivita silic

Působení biologické aktivity silic lze pozorovat v celé živé přírodě u všech živých organismů, rostlin, zvířat a zejména u lidí (Baser et Buchbauer, 2010). Silice byly z velké části využívány pro jejich vlastnosti již pozorované v přírodě, tj. pro jejich antibakteriální, antimykotické a insekticidní aktivity. V současné době je známo přibližně 3000 silic, asi 300 z nich je komerčně důležitých zejména pro farmaceutický, zemědělský, potravinářský a kosmetický průmysl. Silice nebo některé z jejich složek (např. linalol, d-limonen, geranylacetát nebo d-karvon) se používají při výrobě parfémů a kosmetických produktů, sanitárních výrobků, ve stomatologii, v zemědělství, jako potravinářské konzervanty a aditiva, přírodní léčiva, v lázeňství, aromaterapii a také se používají při masážích (Bakkali et al., 2008).

Silice mohou být považovány za potenciální přírodní antioxidanty, mohou být snadno připravovány jako součást denní stravy nebo doplňkové látky, aby se zabránilo oxidačnímu stresu, který přispívá k mnoha degenerativním onemocněním (Edris, 2007), např. silice z *Thymus caespitosus* Brot., *Thymus camphoratus* Hoffmanns. & Link a *Thymus mastichina* L. prokázaly antioxidační aktivitu, která byla v některých případech stejná jako α -tekoferol patřící do skupiny vitamínu E (Miguel et al., 2004). Rozmanitý léčivý potenciál silic byl

testován na protinádorovou aktivitu silic, kdy mechanismus účinku není podobný běžným cytotoxickým chemoterapeutikům, které mají závažné vedlejší účinky např. na trávicí trakt (Edris, 2007). Bylo prokázáno, že základní komponenty silic, zejména monoterpeny, mají chemopreventivní a chemoterapeutické účinky na nádorové onemocnění prsního karcinomu (Wattenberg, 1992). Například organosírné sloučeniny mají chemopreventivní účinky (diallyl disulfid, allyl isothiokyanát). Silice také projevily značný potenciál k léčbě kardiovaskulárních onemocnění, např. prokázaly značnou aktivitu proti oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (cholesterol) u aterosklerózy použitím jejich vysokého denního příjmu. Silice a některé z jejich složek (např. eugenol a thymol) mohou snížit celkovou hladinu cholesterolu (Edris, 2007). Levandulová silice byla testována na potenciální antitrombotické účinky a prokázala široké spektrum antiagregačního účinku, kdy byla schopna inhibovat agregaci krevních destiček (Ballabenia et al., 2004). Také silice vznikající štěpením glukosinuátů jako je například allicin, izolovaný z česnekové silice, ukázaly silnou inhibici agregace krevních destiček. Rostlinné výtažky, zejména silice, můžou poskytnout potenciální alternativu k syntetickým antivirotikům při léčbě *infekčního onemocnění Herpes simplex virus*, např. silice z *Artemisia arborescens* L., *Melissa officinalis* L. a *Mentha piperita* L. prokázaly virucidní vlastnosti s nízkou toxicitou ve srovnání se syntetickými antivirotiky (Edris, 2007). Volné radikály a další reaktivní formy kyslíku způsobují oxidaci biomolekul, proteinů, aminokyselin, nenasycených lipidů, DNA a v konečném důsledku mohou způsobovat stárnutí, rakovinu, asteriosklerózu, Alzheimerovo a Parkinsonovo onemocnění, cukrovku, astma (Gardner, 1997).

Klinické použití silic a jejich těkavých sloučenin je rozšířeno po celém světě prostřednictvím inhalace nebo masáže (Edris, 2007). Inhalace vonné látky cis-jasmon a metyl jasmonát má sedativní účinek na nervový systém (Hossain et al., 2004), inhalace levandulové, mátové, rozmarýnové a šalvějové silice může výrazně snížit příznaky spojené s úzkostí a stresem (Haze et al., 2002). Zánětlivá onemocnění jako je alergie, revmatismus a artritida mohou být zmírněny pomocí některých silic masážní terapií (Edris, 2007).

Bezpečnost silic k lidské spotřebě je vědecky testována, některé druhy mohou být prospěšné a některé mohou působit jako přírodní toxické látky. U citlivých jedinců mohou při kontaktu s malými dávkami chemických složek obsažených v silici vyvolávat kožní záněty, bronchospasmus (zúžení průdušek bronchů). Nesprávné použití silic může vyvolávat halucinace (myristicin, eugenol), záchvaty (1,8 - cineol), bolesti svalů a ataxii (mentol, menthon), dermatitidu (skořice) poškození jater (máta polej), záchvaty, demenci (pelyněk,

a b thujon). Například silice z máty polej nebo pelyňku obsahují toxické látky, jejichž rizika převyšují prospěch (Woolf, 1999). Silice jsou komplexní směsi složek a je třeba jednotlivé těkavé sloučeniny hodnotit jako potenciální alergeny. V současné době EFSA uvádí 24 alergenů spojených se silicemi, které jsou založeny na styku s pokožkou (Laird et Phillips, 2011).

Antimikrobiální aktivita silic

Vzhledem k baktericidním a fungicidním vlastnostem silic je farmaceutické a potravinářské použití stále více rozšířeno jako alternativa syntetických přípravků na ochranu před škodlivými mikroorganismy (Deans et Ritchie, 1987). Rostlinné silice zvláště bohaté na fenolové sloučeniny mohou inhibovat růst mnoha druhů hub (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. a *Penicillium* sp aj.); (Christian et Goggi, 2008). Také různé druhy bylin a koření byly po staletí tradičně používány k prodloužení trvanlivosti potravin

Výraznější účinek silic byl prokázán v plynné fázi než kapalně zejména u hub než bakterií, protože houby rostou více na povrchu a jsou tedy více vystaveny vlivu par (Bacalíková a Paulusová, 2012). Studie silic potvrzující, že plynné fáze mají vyšší antimikrobiální účinek, než kapalná fáze byla testována např. u eukalyptové, tymiánové, fenyklové, levandulové silice a silice z citrónové trávy. Také bylo prokázáno, že plynná fáze silic z bergamotu, levandule, tea tree a eukalyptu mají antimikrobiální účinky proti houbám a bakteriím (Laird et Phillips, 2011). Silice a výtažky z rostlin mohou mít využití jako léčivé přípravky nebo konzervační látky (Hammer et al., 1999).

Slice jako antibakteriální látky mohou působit proti širokému spektru patogenních bakteriálních kmenů včetně *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* (Edris, 2007). Mohou být použity jako alternativa antibiotik v krmivech pro zvířata proti enteropatogenním původcům chorob (Wannissorn et al., 2005). Také proti některým patogenům dýchacích cest měly dobré antibakteriální účinky např. silice z *Achillea clavennae* L. ukázala významnou aktivitu proti bakterii *Klebsiella pneumoniae*, která může vyvolávat zápal plic (Skocibusic et al., 2004).

4 Materiál a metody

4.1 Silice

K testování byly použity silice dobromysli (*Origanum vulgare* L.), hřebíčkovce (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LMPerry) a skořicovníku (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), které byly zakoupeny od firmy BIOMEDICA spol. s r.o. Chemické složení zakoupených silic bylo zjištěno pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrofotometrií (GC-MS) na přístroji Varian GC-MS typu iontová past. Chemické složení silic je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1: Chemické složení silic

Silice	Čeleď	Hlavní složky silice
<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	p-cymen 5, 16 % tymol 2, 93 % karvakrol 64, 56 %
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & LMPerry	<i>Myrtaceae</i>	eugenol 82, 32 % beta-karyophylen 14, 44 %
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	<i>Lauraceae</i>	limonen 4, 98 % linalool 4, 97 % cinamaldehyd 73, 06 % eugenol 3, 54 % cinamylacetát 3, 7 %

4.2 Osivo

Osivo mrkve obecné (*Daucus carota* L.) bylo k testování získáno od Centro di Competenza per l'Innovazione in Campo Agro-ambientale – AGROINNOVA Università degli Studi di Torino Via Leonardo da Vinci, 44 10095 Grugliasco (TO). Získané vzorky

osiva byly přirozeně infikovány běžně se vyskytujícími patogeny např. *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp.

Ošetření osiva silicemi

Osivo bylo ošetřeno silicemi ve výsledné koncentraci 16 µl/l, 32 µl/l, 64 µl/l, 128 µl/l, 256 µl/l silice na litr vzduchu. Koncentrace byly získány odměřením vybraných silic do ependorfky v množství 1,7 µl, 3,5 µl, 7,1 µl, 14 µl, 28,4 µl, které bylo doplněno ethylacetátem na 250 µl. Připravený roztok byl pipetován na filtrační papír, kde se nechal ethylacetát po dobu 1 minuty odpařit. Napuštěný filtrační papír byl vložen spolu se 100 semeny mrkve do Petriho misky (110 ml objem), která byla za pomoci parafilmu utěsněna.

Pro každou koncentraci byly testy provedeny ve dvou opakováních po 100 semenech spolu s kontrolou ošetřeného osiva jen ethylacetátem a kontrolou bez ošetření. Osivo ošetřené ethylacetátem (kontrola EAC) bylo vloženo do Petriho misky na filtrační papír napuštěný 250 µl ethylacetátu a tepelně ošetřeno spolu s ošetřovaným osivem v různých časech ošetření. Testování bylo provedeno ve čtyřech opakováních na účinnost ošetření a další čtyři na klíčivost.

Dále bylo osivo ošetřeno v termostatu při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin, při 75 °C po dobu 1 hodiny, při 100 °C po dobu 10 minut, 150 °C po dobu 10, 20, 30 minut, kde docházelo k odpaření silice z filtračního papíru. Po vyjmutí z termostatu bylo osivo ponecháno 15 minut v uzavřené Petriho misce vychladnout z důvodu kondenzace vzdušných par silic v misce vlivem rozdílných teplot prostředí.

Antifungální účinek

Testování účinnosti ošetřeného osiva na půdní patogeny bylo prováděno v 96 jamkové mikrotitrační destičce s kulatým dnem (objem jamky 367 µl). Do mikrotitrační destičky bylo pomocí multipipety napipetováno 20 µl média do každé jamky a vloženo jedno semeno. Hlavními chorobami mrkve přenosnými osivem jsou plísně, proto bylo zvoleno médium a pěstební podmínky jim vyhovující. Médium bylo složeno ze sojového peptonu (10 g/l) a D-glukosa (40 g/l) s přidáním antibiotik (Tetracyklin 20 mg/l) k zabránění nežádoucího růstu bakterií. Mikrotitrační destičky byly uloženy do termostatu při teplotě 25 °C, po dvou dnech bylo provedeno vizuální hodnocení napadených semen.

4.3 Klíčivost ošetřeného osiva

U ošetřených semen silicí bylo provedeno testování vlivu ošetření na klíčivost. Zkouška klíčivosti byla provedena standardním testem podle vyhlášky č. 129/2012 Sb., o podrobnostech uvádění osiva a sadby pěstovaných rostlin do oběhu.

Do plastových misek byl vložen filtrační papír, který se navlhčil 32 ml destilované vody. Nejdříve byla u osiva provedena dynamika klíčení ošetřeného i neošetřeného osiva a na základě vitality bylo vizuální vyhodnocení prováděno 8. den od založení pokusu, kdy byla všechna vitální semena vyklíčena. Testování klíčivosti ošetřeného osiva silicemi v koncentraci 64 $\mu\text{l/l}$, 128 $\mu\text{l/l}$, 256 $\mu\text{l/l}$ silice na litr vzduchu při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin, při 75 °C po dobu 1 hodiny, při 100 °C po dobu 10 minut, 150 °C po dobu 10, 20 a 30 minut bylo provedeno ve čtyřech opakováních. Ke kontrole ošetřeného osiva byla testována kontrola EAC, která byla ošetřena 250 μl ethylacetátu při všech teplotách a době působení a také kontrola bez jakéhokoliv ošetření. Misky s osivem na zkoušku klíčivosti byly uloženy do termostatu při teplotě 25 °C.

4.3.1 Statistické vyhodnocení získaných dat

Zhodnocení získaných výsledků bylo provedeno pomocí programu STATISTICA 12, a to analýzou rozptylu dvojného třídění bez interakce – vícefaktorová ANOVA. Směrodatné odchylky a průměry byly vypracovány v programu Microsoft Office Excel 2007.

5 Výsledky

Tab. 2: Výsledky antifugálního ošetření osiva v %

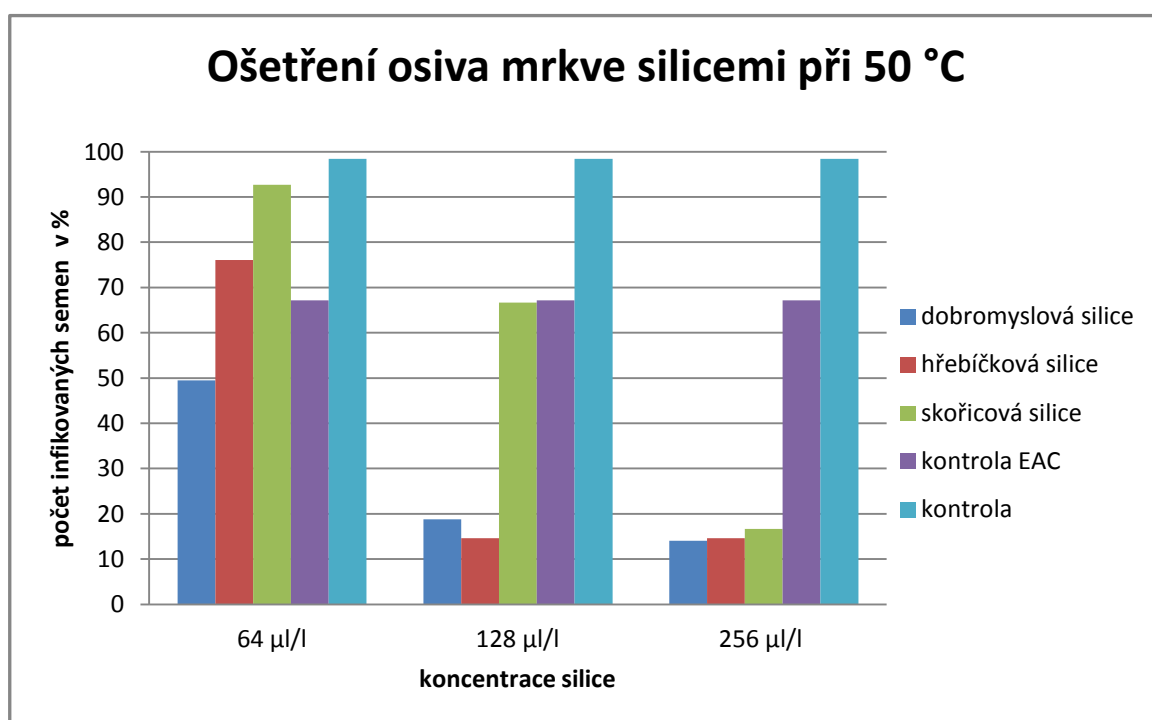
silice	koncentrace $\mu\text{l/l}$	teplota ošetření $^{\circ}\text{C}$	doba ošetření	počet infikovaných semen v %
<i>Origanum vulgare L.</i>				
dobromyslová	64	50	24 h	49,48
	128	50	24 h	18,75
	256	50	24 h	14,06
	16	75	1 h	89,58
	32	75	1 h	93,19
	64	75	1 h	23,44
	128	75	1 h	9,9
	256	75	1 h	1,56
	64	100	10 min.	57,29
	128	100	10 min.	45,31
	64	150	10 min.	2,09
	64	150	20 min.	3,13
	64	150	30 min.	3,65
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>				
skořicová	64	50	24 h	92,71
	128	50	24 h	66,67
	256	50	24 h	16,78
	16	75	1 h	92,19
	32	75	1 h	92,19
	64	75	1 h	17,19
	128	75	1 h	4,17
	256	75	1 h	0,52
	64	100	10 min.	55,73
	128	100	10 min.	45,83
<i>Syzygium aromaticum</i>				
hřebíčková	64	50	24 h	76,24
	128	50	24 h	14,58
	256	50	24 h	14,58
	16	75	1 h	89,58
	32	75	1 h	94,76
	64	75	1 h	15,63
	128	75	1 h	15,63
	256	75	1 h	3,65
	64	100	10 min.	78,13
	128	100	10 min.	77,08
kontrola EAC	-	50	24 h	74,48
kontrola EAC	-	75	1 h	92,19
kontrola EAC	-	100	10 min.	77,08
kontrola EAC	-	150	10 min.	4,69
kontrola EAC	-	150	20 min.	4,17
kontrola EAC	-	150	30 min.	4,69
kontrola	-	-	-	88,54

5.1 Ošetření osiva mrkve při 50 °C

5.1.1 Inhibice plísní na semenech

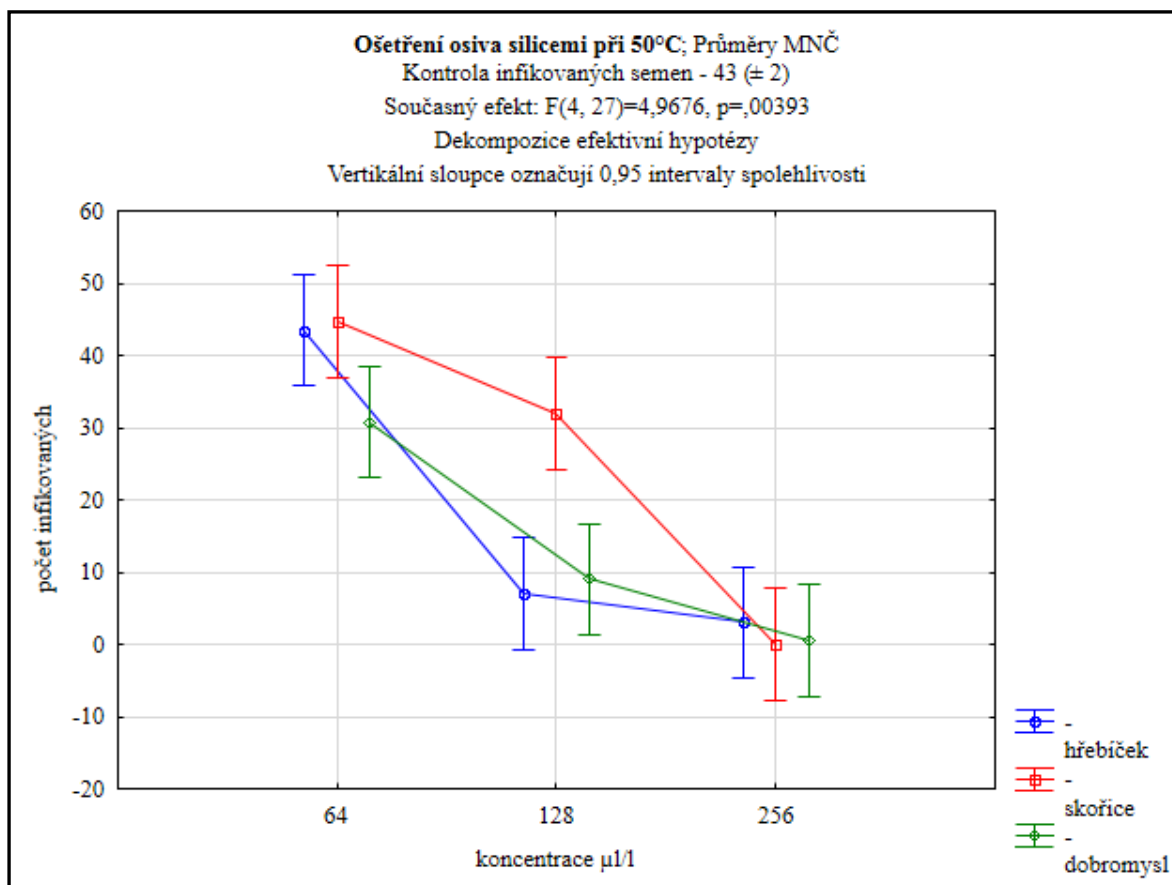
Osivo bylo kultivováno v termostatu při teplotě 50 °C po dobu 24 hodin. Výsledky vlivu silic na houbové patogeny osiva jsou uvedeny v grafu 1 a statistické vyhodnocení počtu infikovaných semen mrkve v grafu 2.

Graf 1: Počet infikovaných semen v % na osivu mrkve ošetřeného silicemi při 50 °C



Z testovaných silic má při teplotě 50 °C nejlepší výsledek ošetření osiva a době působení 24 hodin koncentrace 256 µl/l u všech použitých silic. Hřebíčková a dobromyslová silice také dobře působí i v nižší koncentraci 128 µl/l. Nejmenší účinnost ošetření vykazuje skořicová silice v koncentraci 64 µl/l a 128 µl/l. U ošetření koncentrací 64 µl/l skořicovou a hřebíčkovou silicí je zcela patrné neefektivní působení proti houbovým patogenům osiva.

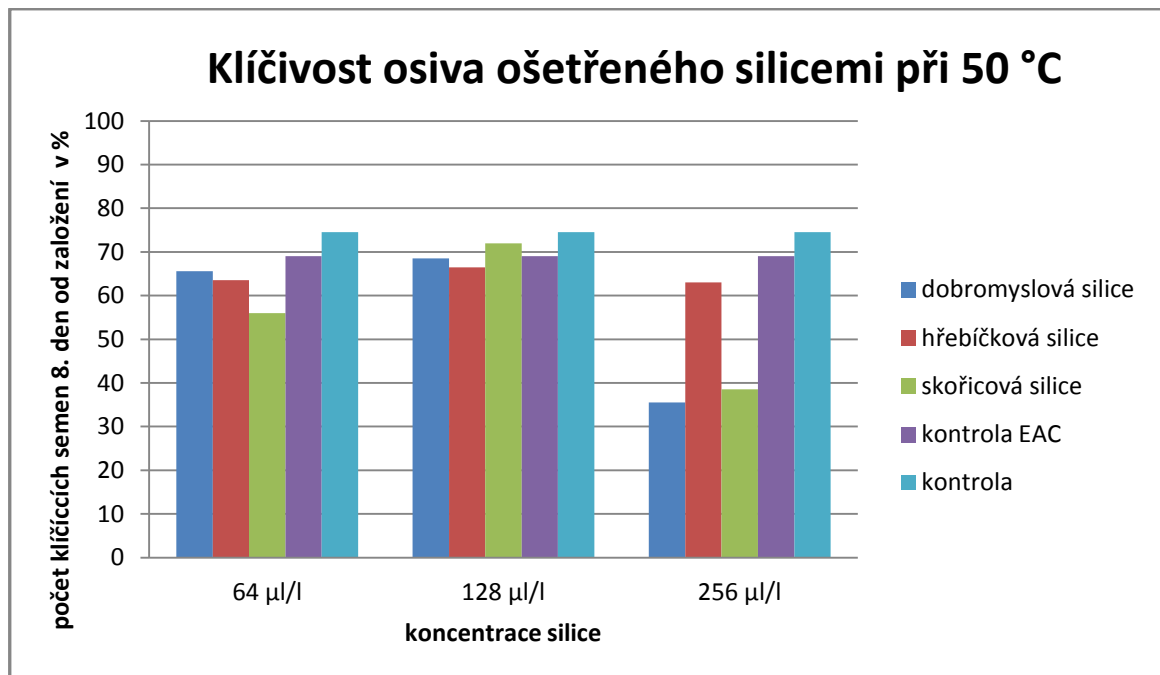
Graf 2: Statistické vyhodnocení počtu infikovaných semen mrkve ze 48 semen ošetřených silicemi při 50 °C



Statisticky průkazný rozdíl oproti kontrole byl zjištěn u ošetření všemi silicemi v koncentraci 256 µl/l, a u dobromysli a hřebíčku při koncentraci 128 µl/l.

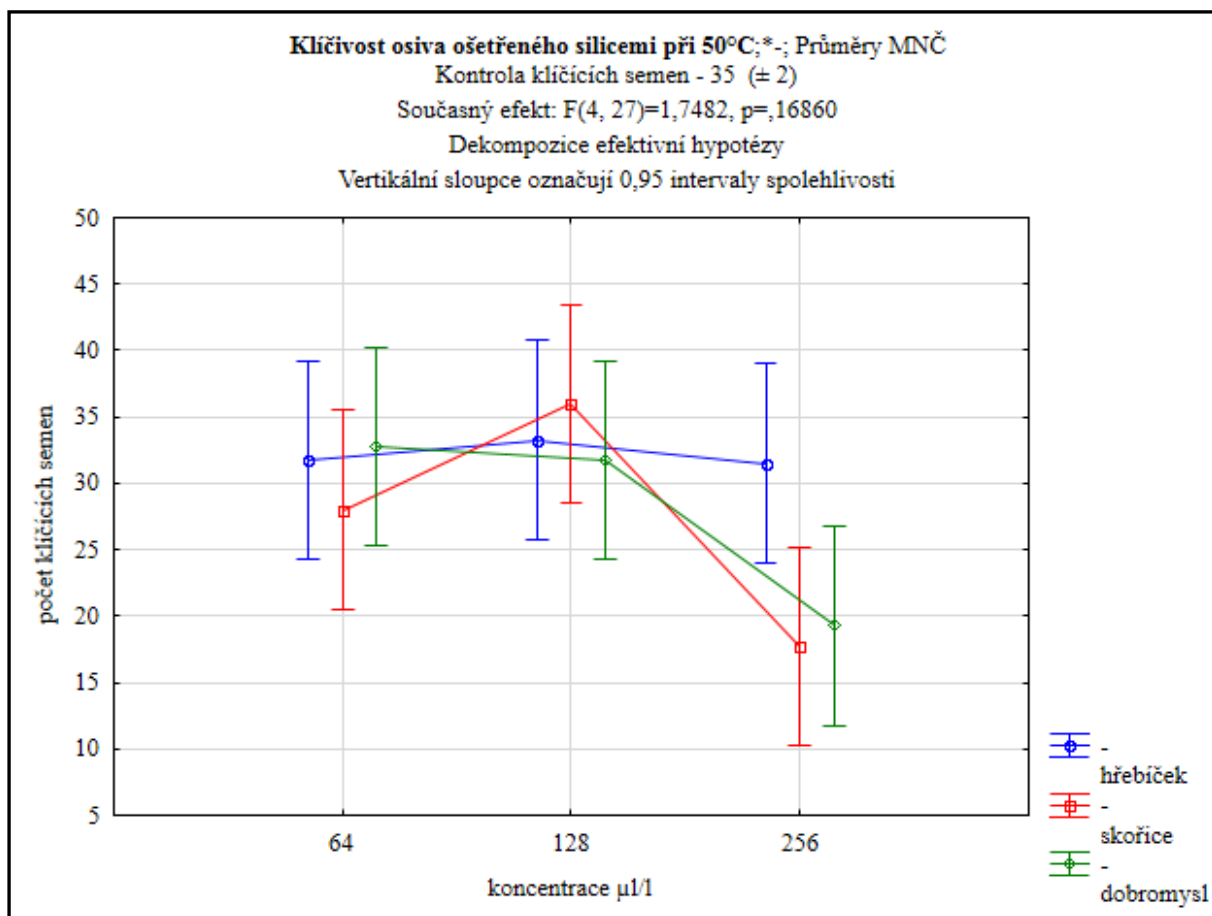
5.1.2 Klíčivost semen

Graf 3: Klíčivost osiva ošetřeného silicemi při 50 °C v %



V grafu 1 je patrné že z testovaných silic má nejlepší antifugální výsledek ošetření osiva při teplotě 50 °C a době působení 24 hodin koncentrace 256 µl/l u všech použitých silic. Graf 3 znázorňuje vliv silic na klíčivost osiva, ve kterém je patrné že většina koncentrací ošetření kromě koncentrace 256 µl/l u dobromyslové a skořicové silice nijak významně neovlivňují klíčivost osiva. Statistické vyhodnocení klíčivosti je uvedeno v grafu 4.

Graf 4: Statistické vyhodnocení počtu klíčících semen mrkve z 50 semen ošetřených silicemi při 50 °C



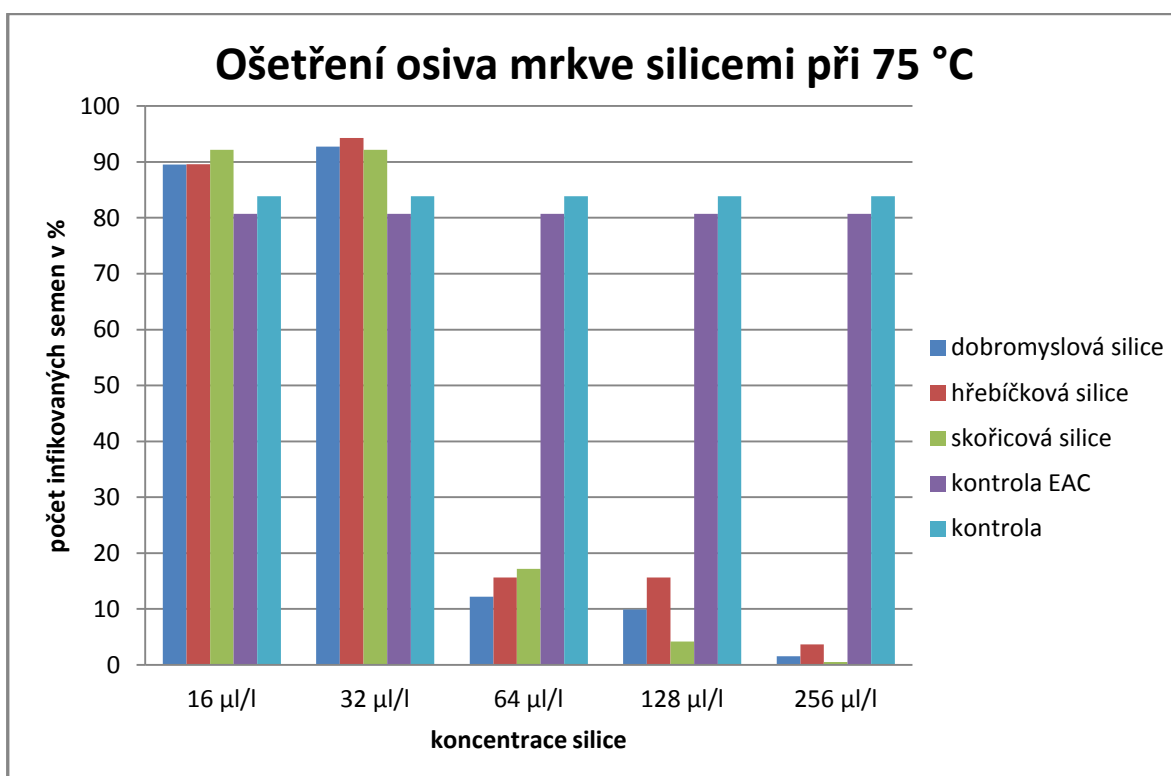
Statisticky průkazný rozdíl vlivu působení silic na inhibici klíčivosti oproti kontrole byl zjištěn u ošetření skořicovou a dobromyslovou silicí v koncentraci 256 µl/l.

5.2 Ošetření osiva mrkve při 75°C

5.2.1 Inhibice plísní na semenech

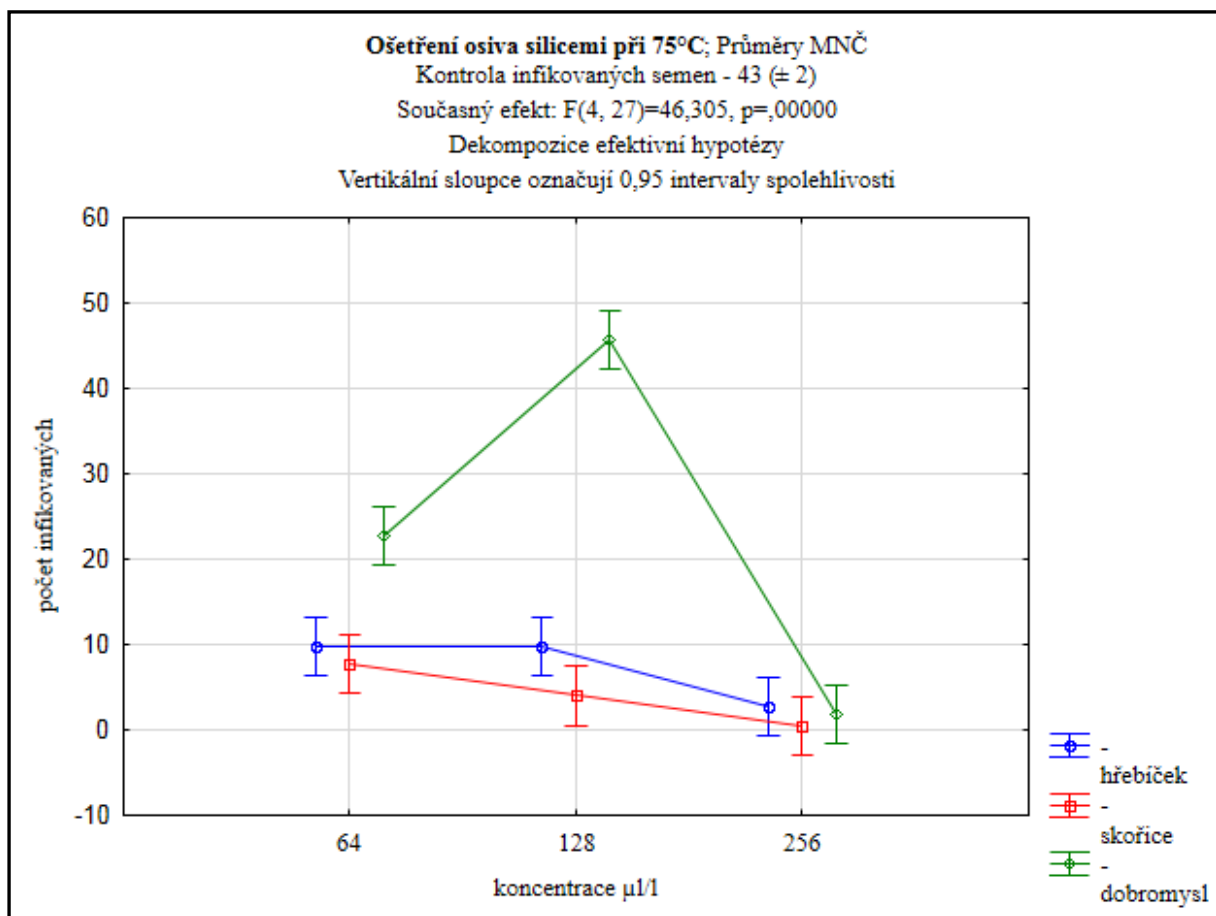
Ošetřené osivo mrkve silicí bylo kultivováno v termostatu při teplotě 75 °C po dobu 1 hodiny na mikrotitračních. Výsledky vlivu silic na houbové patogeny osiva jsou uvedeny v grafu 5 a statistické vyhodnocení počtu infikovaných semen mrkve je uvedeno v grafu 6.

Graf 5: Počet infikovaných semen v % na osivu mrkve ošetřeného silicemi při 75 °C



V grafu 5 je znázorněn vliv silice na houbové patogeny osiva. Průkazný rozdíl je mezi koncentracemi 16 µl/l, 32 µl/l oproti 64 µl/l, 128 µl/l, 256 µl/l, kde je vidět značný rozdíl v inhibici patogenů. Z grafu je patrné, že při teplotě 75 °C je nejúčinnější koncentrace ošetření 256 µl/l u všech použitých silic. V koncentraci 128 µl/ má nejlepší účinnost skořicová silice a u koncentrace 64 µl/l hřebíčková silice (obr. 4) na rozdíl od neošetřené kontroly (obr. 5). Nejnižší koncentrace ošetření 16 µl/l a 32 µl/l nevykazují vliv na houbové patogeny osiva.

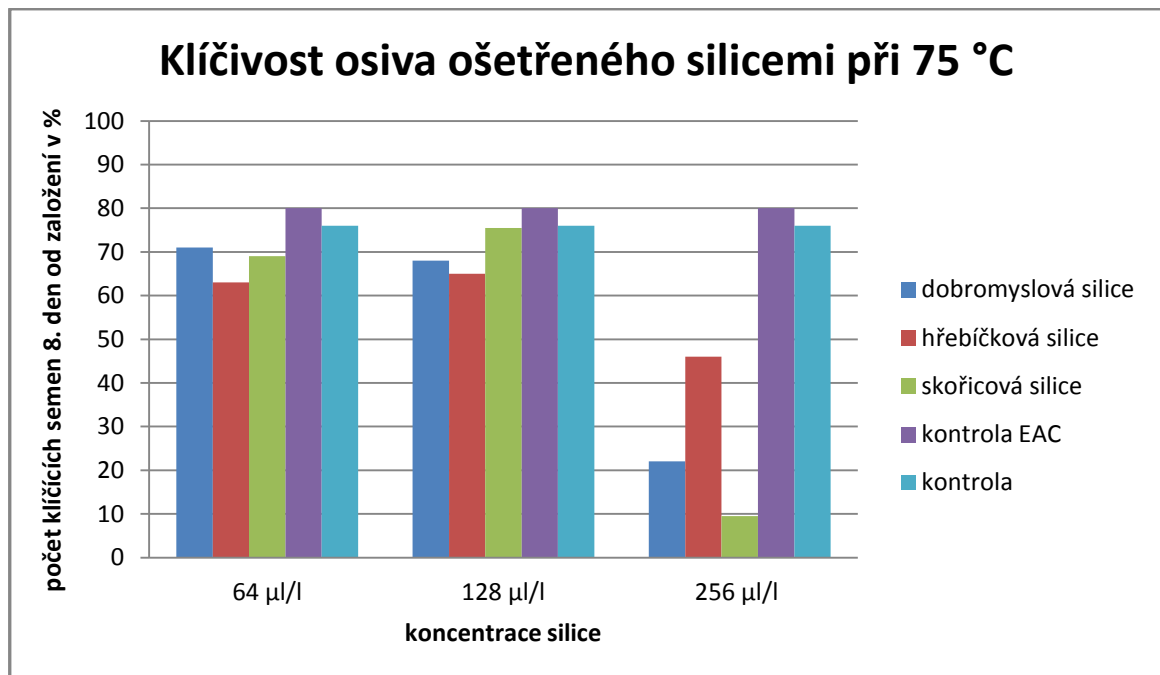
Graf 6: Statistické vyhodnocení počtu infikovaných semen mrkve ze 48 semen ošetřených silicemi při 75 °C



U všech silic v koncentraci 64 a 256 µl/l byl prokázán statisticky významný rozdíl v inhibici houbových patogenů na osivu oproti kontrole. V koncentraci 128 µl/l byl statisticky významný rozdíl jen u hřebíčkové a skořicové silice.

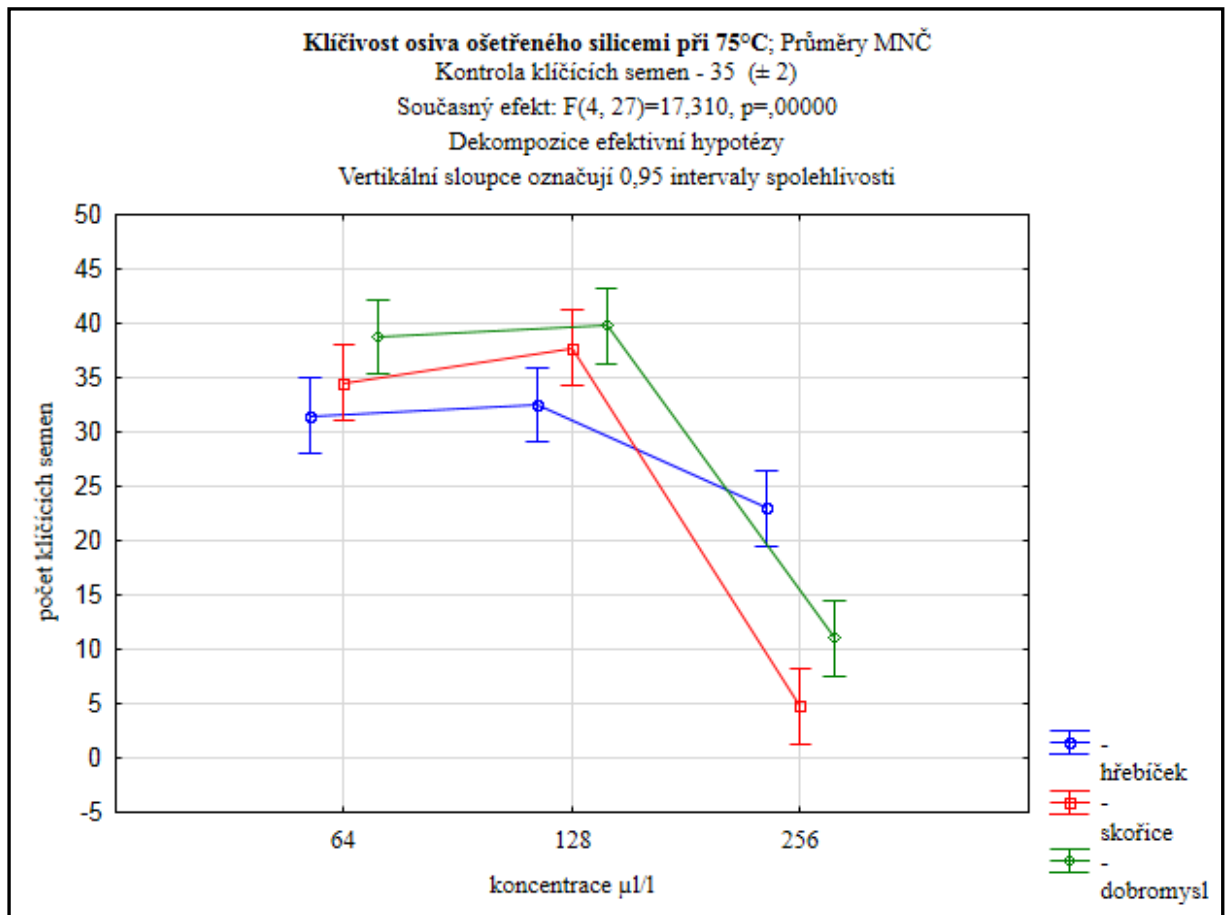
5.2.2 Klíčivost semen

Graf 7: Klíčivost osiva ošetřeného silicemi při 75 °C v %



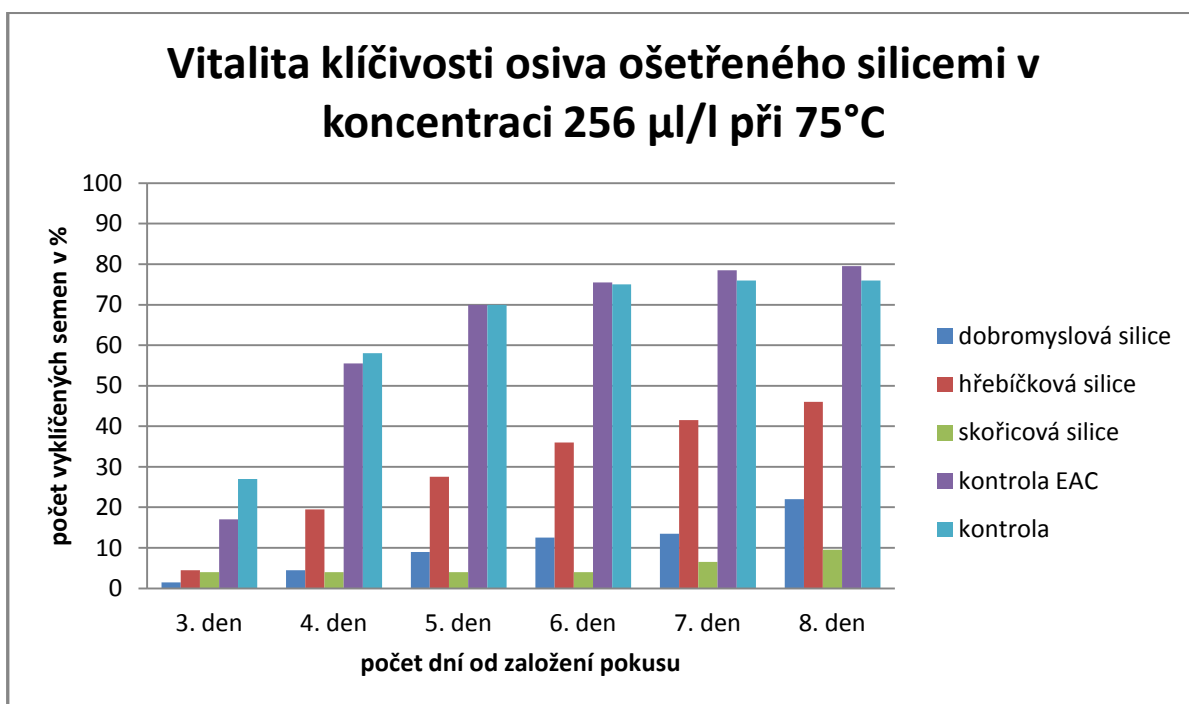
Z grafu 7 je patrné, že koncentrace 64 µl/l, 128 µl/l všech silic má minimální vliv na klíčivost osiva mrkve, a také v těchto koncentracích mají dobré inhibiční účinky na houbové patogeny (graf 5). Nejméně vhodným ošetřením je dobromyslová a skořicová silice v koncentraci 256 µl/l, která vykazuje negativní působení na klíčivost osiva (graf 9), zatímco v inhibici patogenů vykazuje nejlepší účinnost (graf 5).

Graf 8: Statistické vyhodnocení počtu klíčících semen mrkve z 50 semen ošetřených silicemi při 75 °C



Vliv ošetření silicemi při teplotě 75 °C na inhibici klíčivosti v koncentraci 256 µl/l u všech testovaných silic prokázal jako statisticky významný. A tudíž jak je patrné z grafu 8 není vhodným ošetřením osiva.

Graf 9: Vitalita klíčivosti osiva ošetřeného silicemi v koncentraci 256 $\mu\text{l/l}$ při teplotě 75 °C



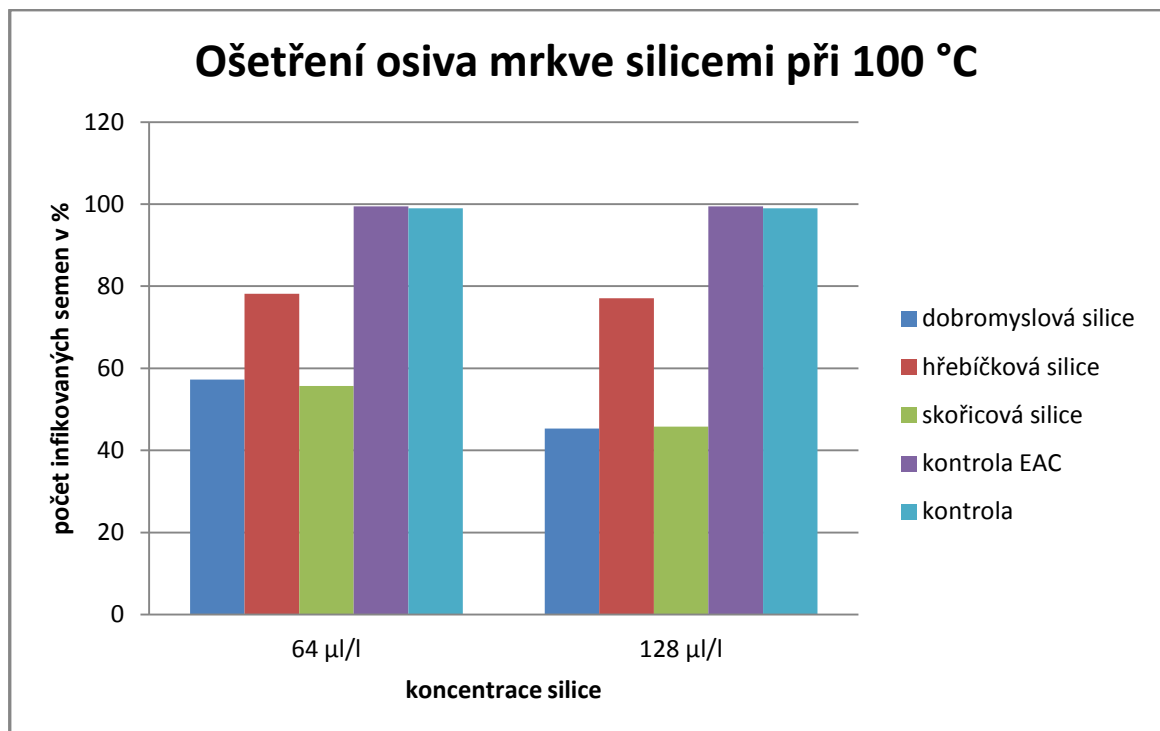
Ošetření osiva v koncentraci 256 $\mu\text{l/l}$ má nejúčinnější vliv na inhibici patogenů osiva (graf 5), ale jak je patrné z grafu má značné negativní působení na vitalitu klíčení. Nejvíce klíčivost ovlivňovala skořicová silice.

5.3 Ošetření osiva mrkve při 100°C

5.3.1 Inhibice plísní na semenech

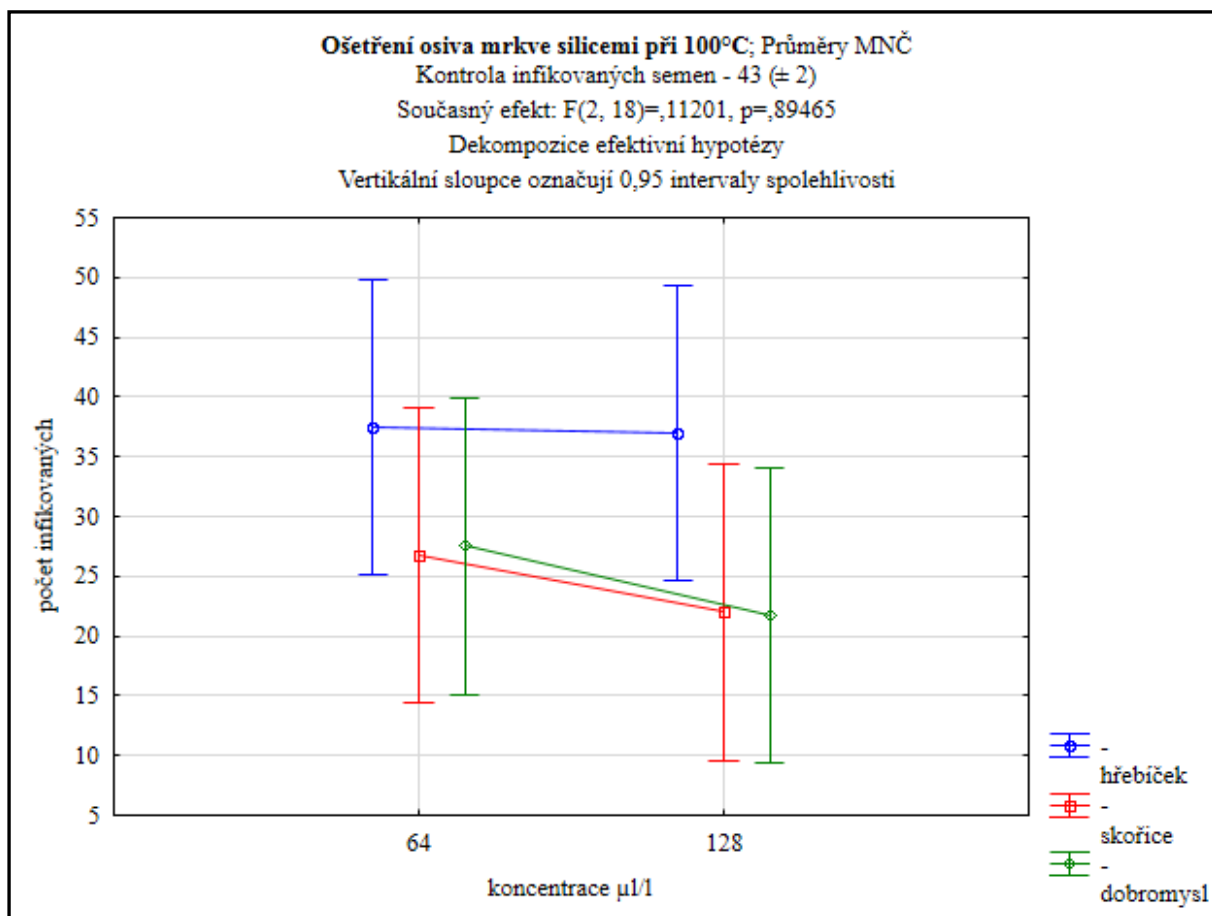
Ošetřené osivo mrkve silicí bylo kultivováno v termostatu při teplotě 100 °C po dobu 10 minut na mikrotitračních destičkách s médiem. Výsledky vlivu silic na houbové patogeny osiva jsou uvedeny v grafu 10 a statistické vyhodnocení počtu infikovaných semen mrkve v grafu 11.

Graf 10: Počet infikovaných semen v % na osivu mrkve ošetřeného silicemi při 100 °C



Ošetření osiva při teplotě 100 °C má největší účinnost na houbové patogeny osiva dobromyslová a skořicová silice v koncentraci 128 µl/l. Nejmenší účinnost vlivu ošetření má hřebíčková silice. Hřebíčková silice v obou koncentracích 64 a 128 µl/l má stejné působení na patogeny osiva.

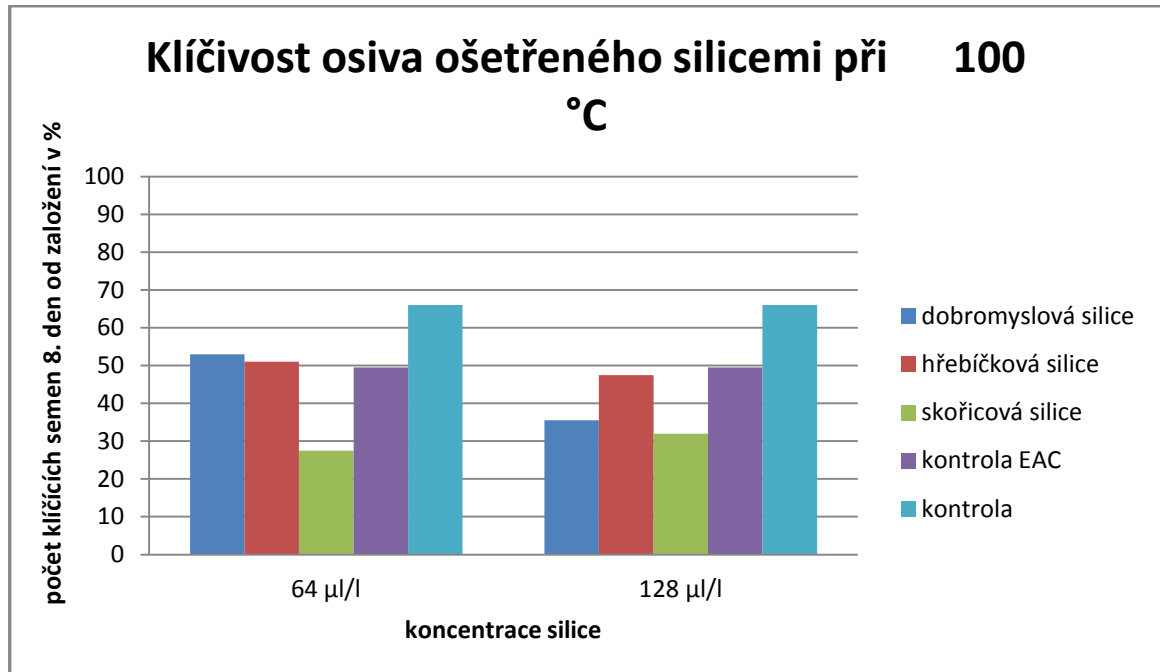
Graf 11: Statistické vyhodnocení počtu infikovaných semen mrkve ze 48 semen ošetřených silicemi při 100 °C



U ošetření osiva silicemi na inhibici půdních patogenů při teplotě 100 °C nebyl ani u jedné z testovaných silic a koncentrací prokázán statisticky významný rozdíl v ošetření osiva oproti kontrole.

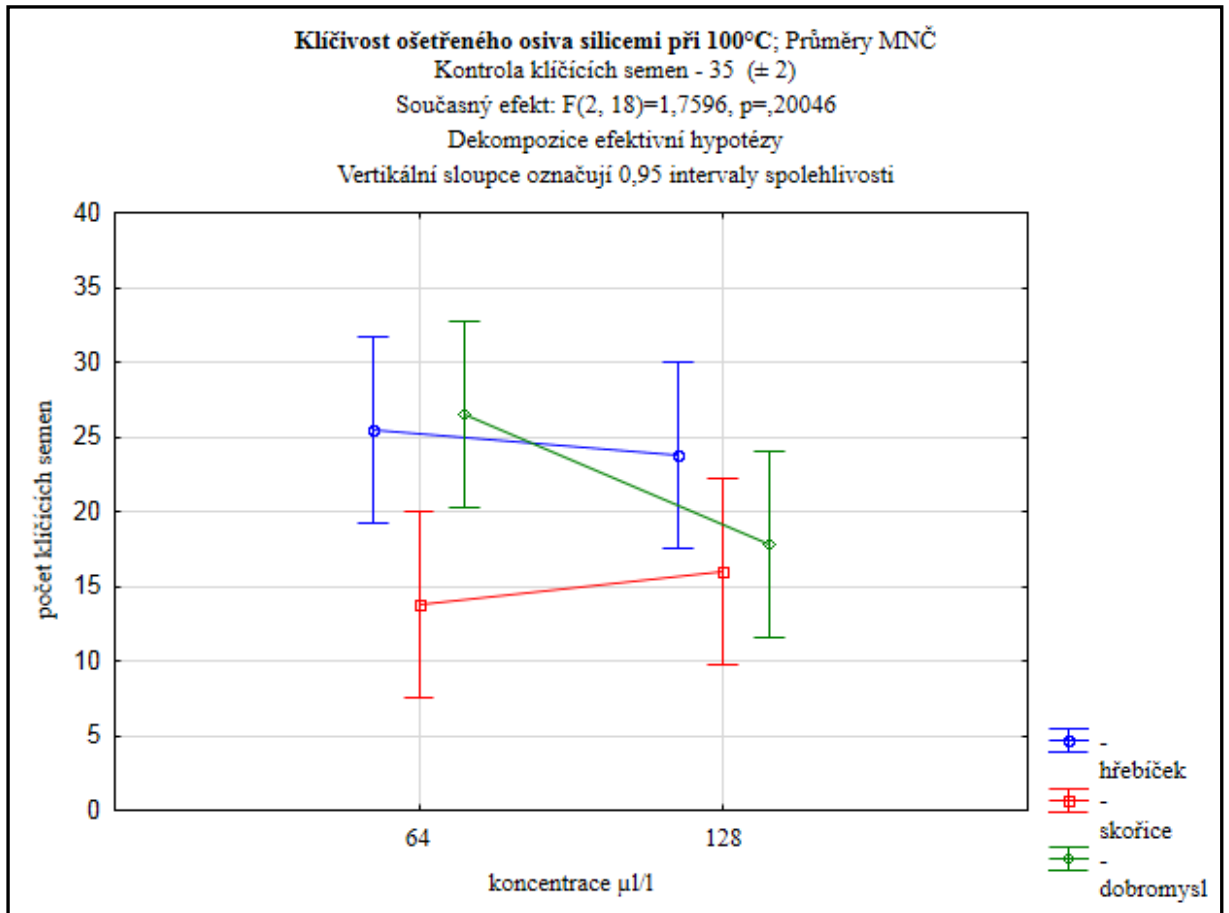
5.3.2 Klíčivost semen

Graf 12: Klíčivost osiva ošetřeného silicemi při 100 °C v %



V grafu 12 má největší vliv na klíčivost osiva ošetřeného silicemi při 100°C skořicová silice u obou koncentrací. Značný vliv na klíčivost má nejen silice ale i teplota 100 °C, která má negativní vliv na životaschopnost osiva. Statisticky významné rozdíly v klíčivosti ošetřeného osiva jsou uvedeny v grafu 13.

Graf 13: Statistické vyhodnocení počtu klíčících semen mrkve z celkového počtu 50 semen ošetřených silicemi při 100 °C



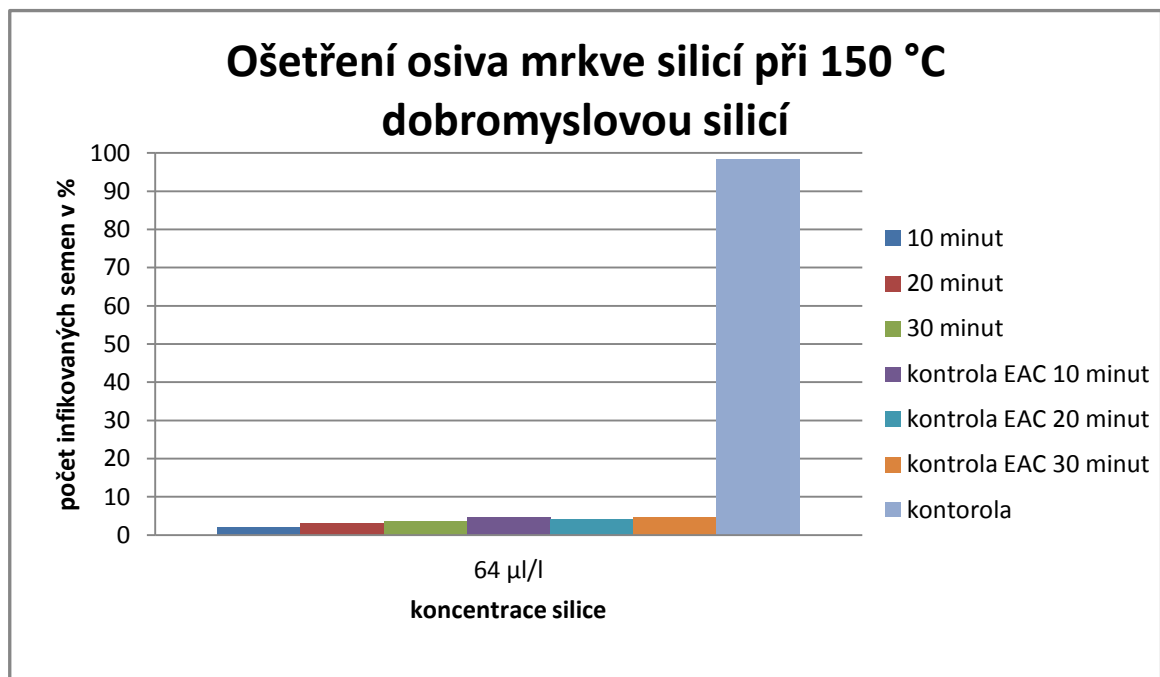
Statisticky významný rozdíl vlivu ošetření na klíčivosti byl prokázán v obou koncentracích u skořicové silice a u koncentrace 128 µl/l u dobromyslové silice.

5.4 Ošetření osiva mrkve při 150°C

5.4.1 Inhibice plísní na semenech

Ošetřené osivo mrkve silicí bylo kultivováno v termostatu při teplotě 150 °C po dobu 10 minut. Výsledky vlivu silic na houbové patogeny osiva jsou uvedeny v grafu 14 a jeho působení na klíčivost osiva je uveden v grafu 15.

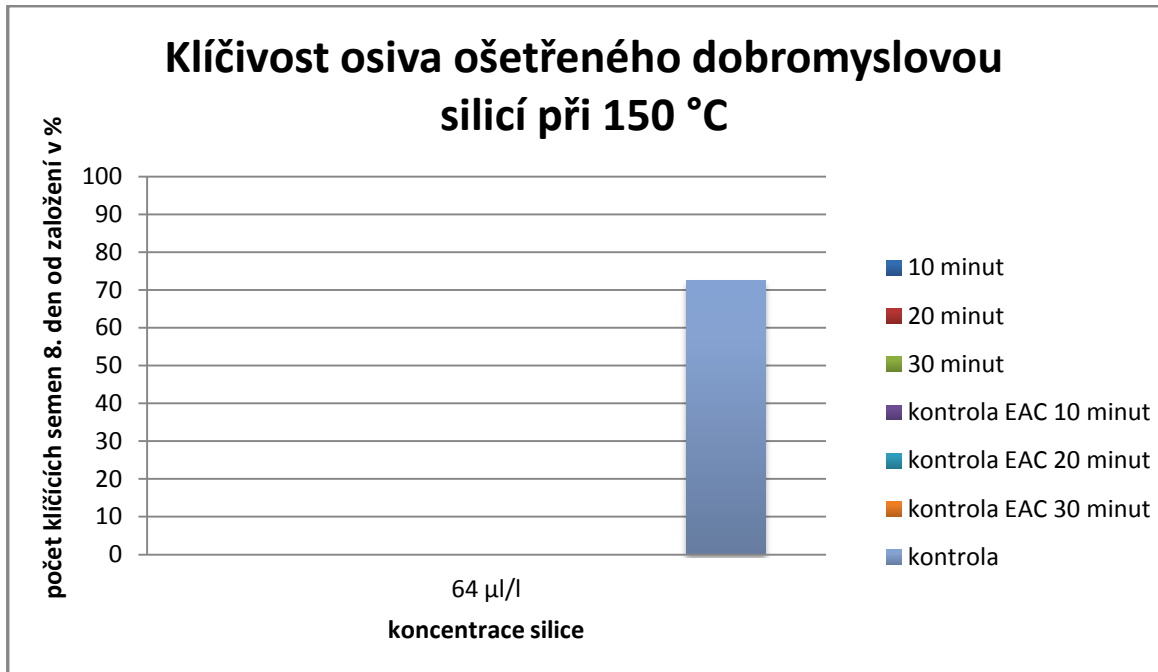
Graf 14: Počet infikovaných semen v % na osivu mrkve ošetřeného silicemi při 150 °C



Ošetřené osivo mrkve dobromyslovou silicí vykazovalo minimální aktivitu houbových patogenů na osivu spíše z důvodu fatálního působení vysoké teploty na houbové patogeny než vlivem působení silice, které je znatelné z porovnání kontroly EAC, jenž je tepelně ošetřená oproti neošetřené kontrole. Při teplotě 150 °C se na ošetřeném osivu vyskytují houbové patogeny jen v nepatrném množství.

5.4.2 Klíčivost semen

Graf 15: Klíčivost osiva ošetřeného dobromyslovou silicí při 150 °C v %



Ošetření osiva silicemi při teplotě 150 °C má fatální dopad na klíčivost osiva mrkve. Při zkoušce vlivu ošetření silice a teploty nevyklíčilo žádné semeno, jen osivo neošetřené kontroly.

6 Diskuze

Alternativou syntetických pesticidů k ošetření osiva jsou obecně přírodní produkty, do nichž můžeme zařadit organické kyseliny, rostlinné extrakty a silice, které jsou typickými antimikrobiálními látkami přírodního původu bez škodlivých účinků a mohou být využity k desinfekci semen (Van der Wolf, 2008). Rostlinné silice zvláště bohaté na fenolové sloučeniny mohou inhibovat růst mnoha druhů hub (Christian et Goggi, 2008). Vzhledem k velkému počtu různých chemických sloučenin přítomných v silicích nelze jejich antimikrobiální činnost přiřadit jedné sloučenině. Nejhojnější fenolickou funkční skupinou je monoterpen thymol a karvakrol. Mechanismus fungicidního účinku silic není zcela znám, ale předpokládá se, že v důsledku jejich lipofilní a částečně hydrofilní povahy mohou prostupovat skrz buněčnou membránu do cytoplazmy (Burt, 2004; Pawar et Thaker, 2006). Předpokládá se, že silice mohou degradovat buněčnou membránu, což způsobuje únik cytoplazmy z buňky a ztrátu iontů. Bylo zjištěno, že jako silné antimikrobiální látky mohou působit silice z tymiánu (*Thymus* spp.), dobromysli (*Origanum* spp.), hřebíčku (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry), skořice (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), křenu (*Ammanniacum rusticum* G.Gaertn., B.Mey. & Scherb.), máty (*Mentha* spp.), šalvěje (*Salvia officinalis* L.) atd. (Burt, 2004; Kalemba et Kunicka, 2003). V in-vitro testech bylo prokázáno, že silice z tymiánu, dobromysli a skořice jsou vysoce aktivní proti bakteriím a plísním přenášeným osivem. Vysoká antibakteriální aktivita byla také zaznamenána u citrusového extraktu, Bioseptu (gřepfruitový extrakt), který obsahuje jak silice, tak organické kyseliny (Van der Wolf, 2008).

Výsledky antimikrobiální aktivity některých silic jsou obtížně srovnatelné, protože bývají značně ovlivněny použitou metodikou, druhem testovaného mikroorganismu a možnými rozdíly citlivosti silic získaných z téhož druhu rostliny, ale za jiných podmínek nebo způsobu získání (Kalemba et Kunicka, 2003). Způsob testování silic není ještě standardizován, a proto jsou podobné výsledky publikovány v odlišných jednotkách podle použitého testu.

Experimentálně byl prokázán výraznější účinek silic v plynné fázi u hub než u bakterií, protože houby rostou více na povrchu a jsou tedy více vystaveny vlivu par (Bacalíková a Paulusová, 2012). Zatím není známá studie, kde by bylo využito plynné fáze silic k ošetření osiva. Naše práce byla zaměřena na vliv plynné fáze silic při různé teplotě, době ošetření a koncentraci na patogenní vláknité houby nacházející se na osivu.

V naší studii jsme testovali dobromyslovou (*O. vulgare*), hřebíčkovou (*S. aromaticum*) a skořicovou (*C. zeylanicum*) silici v kombinaci různých teplot ošetření a koncentrací silic. Nejúčinnější antifugální aktivitu na osivu mrkve prokázaly silice v koncentracích 128 $\mu\text{l/l}$ a 256 $\mu\text{l/l}$, naopak koncentrace 16 $\mu\text{l/l}$ a 32 $\mu\text{l/l}$ se prokázaly jako neúčinné. Skořicová a dobromyslová silice v koncentraci 256 $\mu\text{l/l}$ při teplotě ošetření 75 °C po dobu 1 hodiny nejlépe působila v antifugálních testech, kde u skořicové silice bylo osivo po ošetření infikováno jen z 0,52 %, a u dobromyslové 1,56 %, ale pro použití se koncentrace ošetření projevila jako nevhodná vzhledem k velkému snížení klíčivosti semen u dobromyslové na 22% a skořicové silice na 9,5%. Jako vhodné ošetření lze doporučit nižší koncentraci 128 $\mu\text{l/l}$, kde byla klíčivost u ošetření silicí dobromysli 68%, hřebíčku 65%, skořice 75,5% oproti neošetřené kontrole, která měla 80% klíčivost. Ošetření osiva hřebíčkovou silicí při 50 °C, kdy doba ošetření trvala 24 hodin, se projevilo nejvíce účinné v koncentraci 128 $\mu\text{l/l}$, kde po antifugálním ošetření bylo osivo napadené patogeny jen z 14,58%, tato koncentrace má stejné antifugální účinky jako koncentrace 256 $\mu\text{l/l}$. U obou koncentrací nebyl zaznamenán významný vliv na klíčivost, tudíž z ekonomického hlediska je výhodnější nižší koncentrace ošetření. Z našich výsledků je patrné, že koncentrace 256 $\mu\text{l/l}$ všech silic s rostoucí teplotou působí výrazné snížení klíčivosti osiva. V dynamice klíčení a na základě vitality bylo prokázáno, že ošetření silicemi v koncentraci 256 $\mu\text{l/l}$ při teplotě 75 °C je zcela nevhodné z důvodu vysokého snížení klíčivosti a zpomalení růstu rostliny, největší ovlivnění způsobovala skořicová silice. Ta měla 8. den 9,5% klíčivost oproti neošetřené kontrole (76%). Nejen fytoxicita silic, ale i teplota ovlivňuje klíčivost osiva, jak je patrné ze studie, kdy při teplotě 150 °C vykazovaly houbové patogeny minimální aktivitu, ale účinek na klíčivost osiva byl fatální (0% klíčivost osiva).

Osivo mrkve bylo také ošetřeno ve studii Koch et al. (2010), který zaznamenal účinnost ošetření semen mrkve 1% roztokem s tymiánovou silicí proti *Alternaria dauci* a *A. radicina*. Antimikrobiální účinnost tymiánové silice byla také zaznamenána u *Peronospora valerianellae* na polníčku, *Septoria petroselini* na petrželi a *Ascochyta* spp. na hrachu. Tymiánová silice obsahuje velké množství tymolu a další antimikrobiální látky, které mají aktivitu proti bakteriím a plísním přenosným osivem. Avšak kvůli jeho fytoxicitě je rozhodující výběr optimální koncentrace na ošetření osiva.

Jiné druhy osiv byly také ošetřeny ve studii Van der Wolf (2008) kdy byla použita metoda máčení 1000 semen v 7 ml roztoku o různých koncentracích po dobu 10 minut při pokojové teplotě, po ošetření se semena sušila při teplotě 20 °C na 32% relativní vlhkost. Ve studii byla

zkoumána antimikrobiální aktivita silic bazalky (*Ocimum L.*), skořice, hřebíčku, balmínu (*Leptospermum scoparium J.R.Forst. & G.Forst.*), dobromysli, máty peprné a tymiánu, organických kyselin (kys. mléčnou, octovou, citrónovou, propionovou a askorbovou) a rostlinných extraktů (Biosept, Tillecur, výtažky z kopřiv a zlatobýlu) na ošetření osiva proti patogenům přenosným osivem. Mezi sedmi testovanými přípravky nejlépe působily silice z dobromysli a tymiánu, které při nízké koncentraci (MIC < 0,03%) vykazovaly inhibici bakterií a hub (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Alternaria dauci* a *Botrytis aclada*). Biosept byl účinný proti houbám v relativně nízké koncentraci (MIC <0,07-0,15%), extrakt ze zlatobýlu a kopřivy nevykazoval žádnou aktivitu. Z organických kyselin byla proti houbovým patogenům nejaktivnější kyselina propionová; kyselina mléčná a octová prokázaly mírné účinky proti *Alternaria dauci*; kyselina citrónová a askorbová nevykazovaly žádnou aktivitu ani při nejvyšší koncentraci ošetření. Až 99% snížení počtu bakterií na osivu bylo zaznamenáno u ošetření tymiánovou silicí (0,33%), kyselinou octovou (2,5%), mléčnou a askorbovou (5%).

Christian a Goggi (2008) zjišťovali vlastnosti 18 rostlinných silic proti třem patogenům kukuřice (*Penicillium* spp., *Fusarium* spp. a *Pythium* spp.). Silice pocházející ze skořice, hřebíčku, dobromysli (*Origanum* spp.), saturejky (*Satureja montana L.*) a tymiánu (*Thymus vulgaris L.*) zcela inhibovaly všechny tři patogeny v in-vitro podmínkách kdy minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro všechny patogeny byla 800 µl/l. Sazenice kukuřice nevykazovaly žádné příznaky fytoxicity během zkoušky klíčení až do koncentrace 64 µl/kg.

V in-vitro podmínkách také testoval účinnost silic na inhibici houbových patogenů Velluti et al. (2004) a prokázal, že silice z dobromysli (*Origanum minutiflorum O.Schwarz & P.H.Davis*), hřebíčku, skořice, citrónové trávy (*Cymbopogon citratus Stapf*) a palmarosy (*Cymbopogon martini Stapf*) snížily infekci *Fusarium verticillioides* u semen kukuřice v koncentraci silice 1000 mg/kg. Silice z růžového dřeva (*Aniba rosaeodora Ducke*) v koncentraci 0,5 – 10 µl/ml, vavřínu (*Laurus nobilis L.*) v koncentraci 40 - 50 µl/ml, kašti (*Sassafras albidum (Nutt.) Nees*) v koncentraci 10 – 20 µl/ml a skořici v koncentraci 0,05 – 2,5 µl/ml inhibovaly růst *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. a *Penicillium* spp. (Simic et al., 2004).

Antimikrobiální aktivita silic má využití nejen v dezinfekci osiva, ale také má potenciál v potravinářství. Například ošetření silicemi má význam u naklíčených semen, kdy se těmito potravinami (výhonky) mohou přenášet bakterie patogenní pro člověka. Nejsilnější antibakteriální vlastnosti proti potravinovým patogenům (*Listeria monocytogenes*,

Escherichia coli, *Salmonella*, aj.) mají silice obsahující vysoké procento fenolických sloučenin jako je eugenol, karvakrol a thymol. V *in-vitro* testech prokázaly silice inhibiční účinky proti *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus* na úrovni mezi 0,2 – 10 µl/ml. Jako účinné antibakteriální látky s nízkou inhibiční koncentrací (MIC) 0,05-5µl/ml se *in-vitro* projeví složky silic karvakrol, thymol, eugenol, perillaldehyd a skořicová silice (Brut, 2004).

7 Závěr

V této diplomové práci bylo provedeno zhodnocení vlivu ošetření osiva mrkve obecné (*Daucus carota* L.) pomocí plynné fáze silic, zejména pak nalezení vhodné kombinace koncentrace silic, teploty a doby aplikace snižující přirozený výskyt vláknitých hub, a ověření vlivu působení silic na klíčivost semen.

Na základě studie aplikace silic byly zpracovány tyto výsledky:

1. a 2. hypotéza, že u osiva mrkve je možné ošetřením plynné fáze silic dosáhnout významného snížení počtu vláknitých hub na osivu mrkve za minimálního snížení klíčivosti byly potvrzeny. Avšak závisí na použité silici, koncentraci, teplotě ošetření.

- Nejúčinnější antifugální aktivitu na osivu mrkve prokázaly silice v koncentracích 128 $\mu\text{l/l}$ a 256 $\mu\text{l/l}$, naopak koncentrace 16 $\mu\text{l/l}$ a 32 $\mu\text{l/l}$ se prokázala jako neúčinná.
- Skořicová a dobromyslová silice v koncentraci 256 $\mu\text{l/l}$ a při teplotě ošetření 75 °C nejlépe působila v antifugálních testech, ale pro použití se projevila jako nevhodná vzhledem k velkému snížení klíčivosti semen a zpomalení růstu.
- Pro ošetření osiva mrkve proti plísňovým patogenům se projevila jako nejvhodnější skořicová silice v koncentraci 128 $\mu\text{l/l}$ při teplotě ošetření 75 °C, kdy docházelo k významnému potlačení houbových patogenů a minimálnímu snížení klíčivosti semen.
- Vhodným ošetřením se také ukázala dobromyslová silice v koncentraci 128 $\mu\text{l/l}$ při teplotě ošetření 75 °C a času ošetření 1 hodiny nebo hřebíčková silice v koncentraci 128 $\mu\text{l/l}$ při teplotě ošetření 50 °C a času ošetření 24 hodin, která prokázala stejnou inhibici patogenů jako koncentrace 256 $\mu\text{l/l}$. U obou teplot ošetření v koncentraci 128 $\mu\text{l/l}$ nebyl zaznamenán významný vliv na klíčivost.

Použití přírodních produktů - silic je přednostně vhodné v ekologickém zemědělství jako alternativa syntetických pesticidů k ošetření semen, kde nejsou chemické látky k ošetření povoleny. Pro praktické využití je potřeba tyto výsledky otestovat v provozních podmínkách, zejména vliv ošetření na růst rostlin.

8 Seznam literatury

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 446-475.
- Ballabenía, V., Tognolinia, M., Chiavarinia, M., Impicciatore, R., Bianchi, A., Barocelli, E. 2004. Novel antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from *Lavandula hybrida* Reverchon ‘grosso’. *Phytomedicine*. 11 (7-8). 596-601.
- Baser, K., Buchbauer G. 2010. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. Taylor & Francis Group. United States of America. p. 975. ISBN: 978-1-4200-6315-8
- Buchtová, I. 2013. Situační a výhledová zpráva zelenina. Ministerstvo zemědělství. Praha. 68 s. ISBN: 978-80-7434-130-4.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94. 223–253.
- Capouchova, I, Konvalinka, P., Stehno, Z., Prokinova, E. Janovska, D. Honsova, H., Blaha, L., Kas, M. 2012. Organic cereal seed quality and production. *Organic Farming and Food Production*. ISBN: 978-953-51-0842-9
- Đilvesi, K., Butaš, Daliborka, Jokić, G., Štatkić, S., Lončarević, V. (2009). Rezultati uticaja sredstva za zaprašivanje na kvalitet semena suncokreta u kontrolnom ogledu. *Journal on processing and energy in agriculture*. 13 (2). 146-148.
- Edris, E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents. *Phytotherapy research*. 21. 308-323
- Eschrig, U., Stahl, M., Delincée, H., Schaller, H. J., Röder, O. (2007). Electron seed dressing of barley - aspects of its verification. *European Food Research and Technology*. 224 (4). 489-497.
- Forsberg, G. (2004). Control of cereal seed-borne diseases by hot humid air seed treatment. Swedish University of Agricultural Sciences. 443. 43.

- Gardner, P. 1997. Superoxide-driven aconitase Fe-S center cycling. *Bioscience Reports*. 17 (1). 33-42.
- Grondeau, C., Samson, R., Sands, D. 1994. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*. (13) 1. 57-75.
- Hammer, K., Carson, C., Riley, T. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86 (6). 985-990.
- Haze, S., Sakai, K., Gozu, Y. 2002. Effects of fragrance inhalation on sympathetic activity in normal adults. *Japanese Journal of Pharmacology*. 90 (3). 247-253.
- Hossain, S., Aoshima, H., Koda, H., Kiso, Y. 2004. Fragrances in oolong tea that enhance the response of GABA_A receptors. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 68 (9). 1842-1848.
- Houba, M., Hosnedl, V. 2002. *Osivo a sadba, praktické semenářství*. Nakladatelství Ing. Martin Sedláček. Praha. 186 s. ISBN: 80-902413-6-0
- Christian, J., Goggi, S. 2008. Aromatic plant oil as fungicide for organic corn production. *Crop Science*. 48 (5). 1941-1951.
- Jensen, B., Knudsen, Inge M. B., Jensen, D. F. (2000). Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*. *European Journal of Plant Pathology*, 106. 233-242.
- Kalemba, D., Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. (10). 813-829.
- Kazda, J. (eds.). 2003. *Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny*. Nakladatelství Ing. Martin Sedláček. Praha. 158 s. ISBN: 80-86726-03-7.
- Kazda, J., Mikulka, J., Prokinová, E. 2010. *Encyklopedie ochrany rostlin*. Profi Press s. r. o.. Praha. 399 s. ISBN: 978-86726-34-2.

- Miguel, G., Simoes, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Carvalho, L. 2004. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry*. 86 (2). 183–188.
- Mitáček, T. (eds.)(2010). Pěstování léčivých a kořeninových rostlin v ekologickém zemědělství. Bioinstitut. Olomouc. 51 s. ISBN: 978-80-87371-05-3
- Nega, E., Ulrich, R., Werner, S., Jahn, M. 2003. Hot water treatment of vegetable seed – an alternative seed treatment method to control seed borne pathogens in organic farming. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 110 (3). 220-234.
- Nováček, F. 2009. *Fytochemické základy botaniky*. Fontána. Olomouc. 284 s. ISBN: 978-80-7336-457-1.
- Pavela, R. 2011. *Botanické pesticidy*. Kurent, s r.o.. České Budějovice. 128 s. ISBN: 978-80-87-111-26-0.
- Pawar, V.C., Thaker, V.S. 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*. 49. 316–323.
- Petříková, K., Hlušek, J. (eds). 2012. *Zelenina – pěstování, výživa, ochrana a ekonomika*. Profi press. Praha. 191 s. ISBN: 978-86726-50-2
- Petříková, K., Jánský, J., Malý, I., Peza, Z., Poláčková, J., Rod, J. 2006. *Zelenina pěstování, ekonomika, prodej*. Profi Press, s r.o.. Praha. s. ISBN: 9788086726205
- Prokinová, E. 2003. Houbové choroby přenosné osivem. *Úroda* (3) 8-9.
- Rod, J., Hluchý, M., Zavadil, K., Prášil, J., Somssich, I., Zacharda, M. 2005. *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy – Ochrana zeleniny v integrované produkci včetně prostředků biologické ochrany*. Biocont Laboratory, spol s r.o.. Brno. 392 s. ISBN: 80-901874-3-9.
- Růžičková, G. (ed). 2013. *Léčivé a kořeninové rostliny z čeledi miříkovité*. Vydavatelství Ing. Petr Baštan. Olomouc. 124 s. ISBN: 978-80-87091-37-1.
- Samsonová, P. (eds.). 2012. *Produkce osiv v ekologickém zemědělství*. Bioinstitut. Olomouc. 128 s. ISBN: 978-80-87371-01-5.

- Simic, A., Sokovic, M.D., Ristic, M., Grujic-Jovanovic, S., Vukojevic, J., Marin, P.D. 2004. The chemical composition of some lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*. 18. 713–717.
- Skočibušić, M., Bezic, N., Dunkic, V., Radonic, A. 2004. Antibacterial activity of *Achillea clavennae* essential oil against respiratory tract pathogens. *Fitoterapia* 75 (7-8). 733–736.
- Šarapatka, B., Urban, J. (eds.). 2006. Ekologické zemědělství v praxi. PRO-BIO. Šumperk. 502 s. ISBN: 978-80-903583-0-0.
- Van Der Wolf, J., Birnbaum, Y., Van Der Zouwen, P., Groot, S. 2008. Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acid and plant extracts. *Seed Science and Technology*. 36. 76-88.
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Marin, S. 2004. Effect of essential oil of cinnamon, clove, lemon grass, oregano, and palmarosa on growth of and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* in maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84 (10). 1141–1146.
- Vujošević, B., Radin, M., Čapelja, V. 2010. Possibility of using biological and physical methods as an alternative to chemical seed treatment. *Institute of Field and Vegetable Crops*. 14 (4). 191 – 193.
- Pavela, R., Žabka, M. Přípravek na ochranu před houbami. Česká republika. U1. 22675. 19.09.2011.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T., Thubthimthed, S. 2005. Antibacterial properties of essential oils from thai medicinal plants. *Fitoterapia* 76 (2). 233–236.
- Wattenberg, L. 1992. Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Research*. 52. 2085–2091.
- Wolf, A. 1999. Essential oil poisoning. *Clinical Toxicology*. 37 (6). 721-727.

8.1 Internetové zdroje

Bacalíková, B., Paulusová, H. Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál [online]. Praha. Národní archiv. leden 2012. [2014-01-08]. Dostupné z <<http://www.nacr.cz/Z-files/silice/silice.pdf>>.

9 Samostatné přílohy

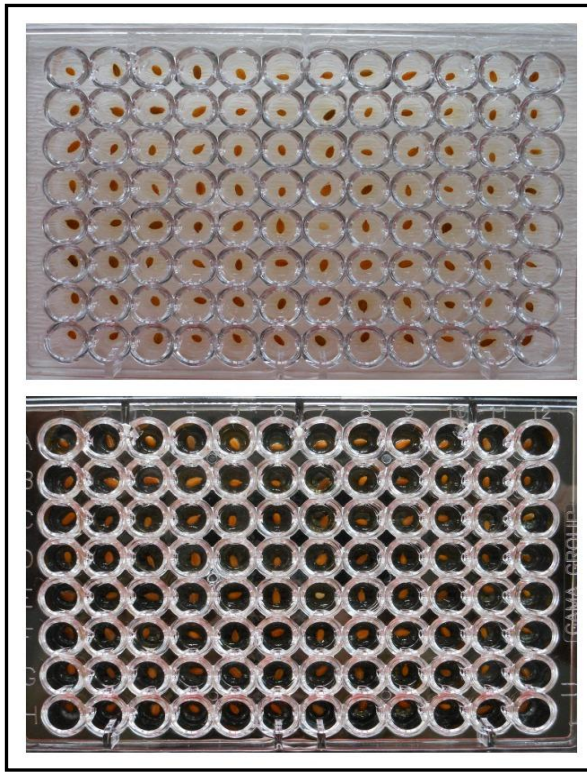
Seznam příloh:

Příloha 1: tabulky

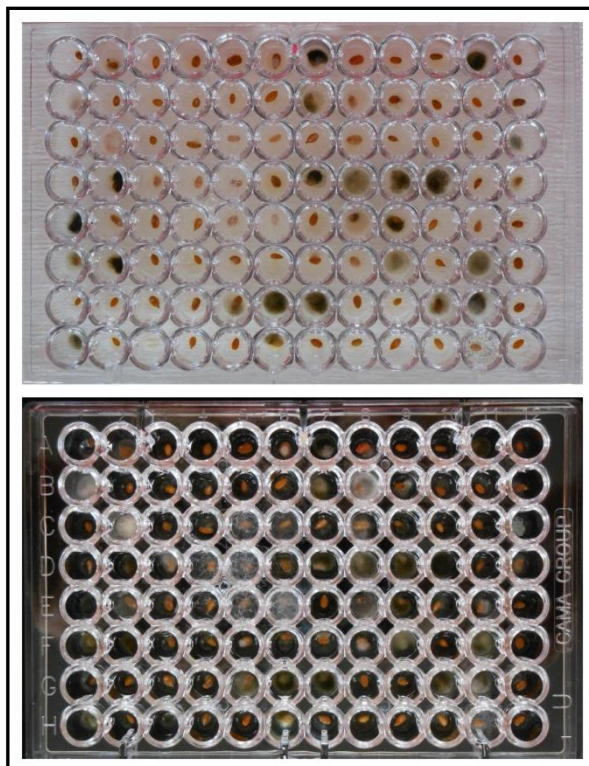
Tabulka 3: statistické vyhodnocení výsledků ošetřeného osiva silicemi – průměr a směrodatná odchylka infikovaných/klíčících semen (počet infikovaných semen ze 192 a počet klíčících semen z 200)

Příloha 2: fotodokumentace pokusů

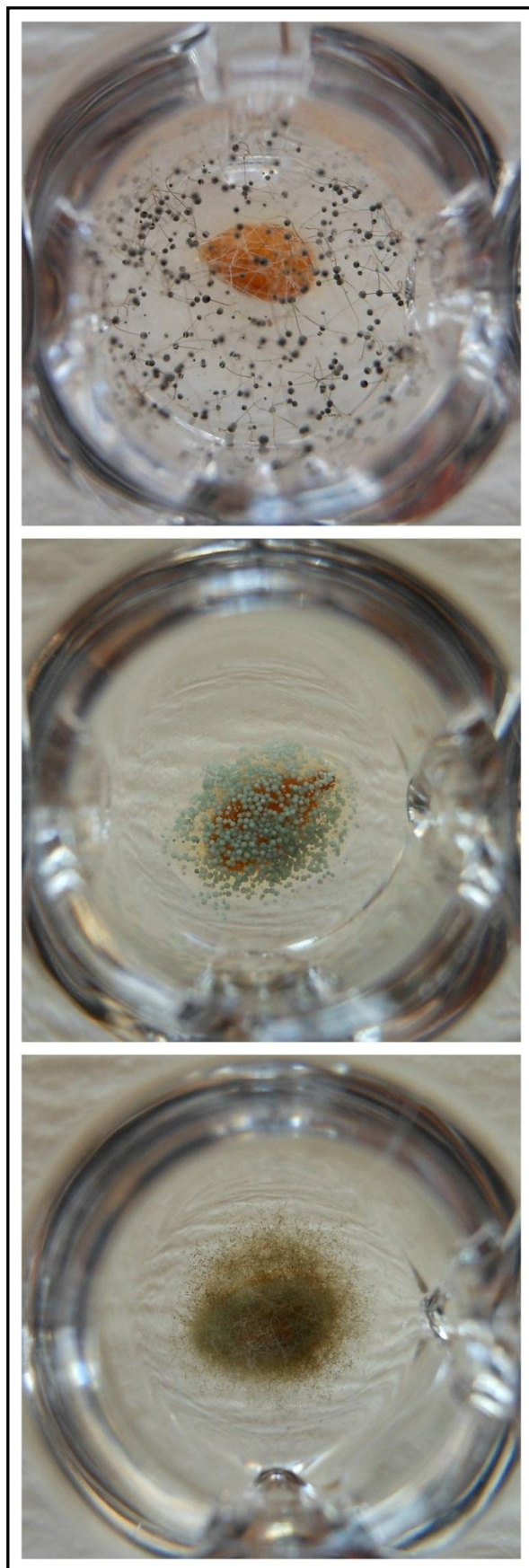
Obrázek 4: Vyhodnocení ošetřeného osiva hřebíčkovou silicí v koncentraci 64 $\mu\text{l/l}$ při teplotě 75 °C po dobu 1 hodiny



Obrázek 5: Kontrola bez ošetření sloužící k vyhodnocení ošetřeného osiva



Obrázek 6: Detaily kontaminovaného osiva v jamce mikrotitrační destičky



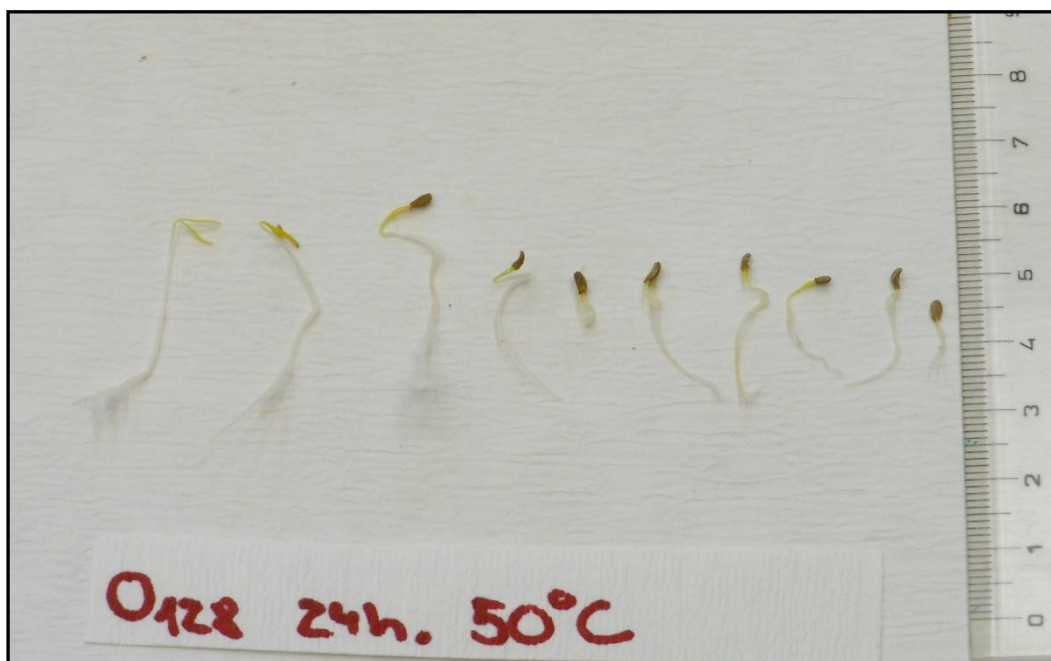
Obrázek 7: Zkouška klíčivosti osiva ošetřeného dobromyslovou silicí v koncentraci 128 $\mu\text{l/l}$ při 50°C po dobu 24 hodin



Obrázek 8: Zkouška klíčivosti neošetřeného osiva sloužící ke kontrole ošetřeného osiva (obr. 4)



Obrázek 9: Vliv ošetření silicí v koncentraci 128 $\mu\text{l/l}$ při 50°C po dobu 24 hodin na velikost klíčících rostlin



Obrázek 10: Kontrola klíčících rostlin sloužící k porovnání s ošetřeným osivem (obr. 6)

