

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA AGROBIOLOGIE, POTRAVINOVÝCH A
PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ
KATEDRA OCHRANY ROSTLIN



MYKOFLÓRA SEMEN MÁKU

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kristýna Černá

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Evženie Prokinová, CSc.

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Mykoflóra semen máku“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze, 1. dubna 2012

.....

Kristýna Černá

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své rodině, jež mě při mých vysokoškolských studiích vlídně podporovala, a svému příteli, jenž mi dodával odvahy.

Dále chci poděkovat své školitelce doc. Ing. Evženie Prokinové, CSc. z Katedry ochrany rostlin Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze za podnětné konzultace a Mgr. Ondřejovi Koukolovi, Ph.D. z Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za poskytnutí materiálů pro molekulárně biologické metody.

Rovněž chci poděkovat svým kolegyním a kamarádkám z mykologické laboratoře Katedry botaniky PřF UK, Tereze Konvalinkové a Zuzaně Suchánkové.

Můj dík patří též kamarádce Martině Nedomové, která mi byla při psaní oporou a po celou dobu mě vytrvale povzbuzovala.

Souhrn

Cílem této práce bylo zjistit spektrum hub osidlujících semena máku v makovicích, tedy zjistit přirozenou infekci makových semen. Za tímto účelem byla studována semena máku z ekologického zemědělství z lokality Budyně nad Ohří a z kontrolních ploch konvenčního zemědělství v Červeném Újezdě. V rámci metodiky byly použity metody inkubace semen ve vlhkých komůrkách a inkubace semen na agarových plotnách. Při inkubaci semen ve vlhkých komůrkách bylo nalezeno celkem 12 druhů a při inkubaci semen na agarových plotnách 14 druhů, převážně patogenních hub. Celkově bylo zaznamenáno 19 druhů hub. Nejčtenějším druhem izolovaným při inkubaci semen z obou lokalit metodou agarových ploten a při inkubaci semen z lokality Budyně nad Ohří metodou vlhkých komůrek bylo *Cladosporium cladosporioides*. Při kultivaci semen z lokality Budyně nad Ohří metodou vlhkých komůrek to byl druh *Dendryphion papaveris*. V rámci této práce byl učiněn první, objektivně potvrzený nález dvou původců helmintosporiózy máku v České republice, a to druhů *D. papaveris* a *D. penicillatum*.

Klíčová slova: semena máku setého, mykoflóra, agarové plotny, vlhké komůrky, helmintosporióza

Summary

The aim of this work was to determine the diversity of fungi inhabiting poppy seeds and to study their natural pathogens. The poppy seeds were collected from an organic farm in Budyně nad Ohří and from a conventional agricultural area in Červený Újezd. The agar plate method and the blotter method were used for the isolation of seed-borne fungi. 12 species of fungi were isolated by the usage of agar plate method and 14 species were isolated by the usage of blotter method. In total 19 species of fungi were isolated. In both localities the most frequently isolated species by agar plate method was *Cladosporium cladosporioides*. *C. cladosporioides* was also the most frequently isolated species during the incubation by blotter method from Budyně nad Ohří. The most prevalent species isolated by blotter method from Budyně nad Ohří was *Dendryphion papaveris*. This is the first time when two agents of helminthosporiosis (*D. papaveris* and *D. penicillatum*) were observed in the Czech Republic

Key words: poppy seeds, mycoflora, agar plate method, blotter method, helminthosporiosis

Obsah

1. Cíl práce	3
2. Úvod.....	4
3. Literární přehled.....	7
3.1. Historie pěstování máku	7
3.2. Taxonomie máku	8
3.3. Morfologie máku	8
3.4. Agrotechnika	9
3.5. Zdravotní stav máku	10
3.5.1. Abiotické faktory	11
3.5.2. Biotické faktory	12
3.5.2.1. Škůdci.....	13
3.5.2.2. Viry	13
3.5.2.3. Bakterie	14
3.5.2.4. Houby	14
3.6. Houby osidlující semena rostlin	17
3.7. Literární přehled hub izolovaných ze semen kulturních plodin	20
3.8. Charakteristika izolovaných hub ze semen máku	22
3.8.1. Rod <i>Alternaria</i>	23
3.8.2. Rod <i>Arthrimum</i>	24
3.8.3. Rod <i>Aspergillus</i>	25
3.8.4. Rod <i>Botrytis</i>	26
3.8.5. Rod <i>Cladosporium</i>	27
3.8.6. Rod <i>Dendryphion</i>	29
3.8.7. Rod <i>Doratomyces</i>	30
3.8.8. Rod <i>Epicoccum</i>	31
3.8.9. Rod <i>Fusarium</i>	32
3.8.10. Rod <i>Penicillium</i>	33
3.8.11. Rod <i>Rhizopus</i>	34
3.8.12. Rod <i>Verticillium</i>	35
3.9. Metody izolace patogenů ze semen	37
3.10. Molekulárně biologické metody determinace hub	38

4. Materiál a metody	40
4.1. Odběr vzorků semen.....	40
4.2. Inkubace semen a hub	41
4.3. Vyhodnocení inkubací a determinace hub	42
4.4. Molekulárně biologické metody.....	43
4.4.1. Izolace DNA	43
4.4.2. PCR.....	44
4.4.3. Elektroforéza.....	44
4.4.4. Čištění produktu PCR.....	45
4.4.5. Sekvenace	45
4.5. Statistické zpracování získaných dat.....	45
5. Výsledky	47
5.1. Primární data	47
5.2. Výpočet relativních četností.....	50
5.3. Simpsonův index diverzity.....	53
5.4. Výsledky sekvence DNA	54
6. Diskuze.....	55
7. Závěr	59
8. Seznam literatury	60
9. Příloha	76
9.1. Kolonie a mikroskopické snímky vybraných izolovaných hub	76
9.2. Systémy inkubačních metod.....	79
9.2.1. Inkubace semen ve vlhkých komůrkách.....	79
9.2.2. Inkubace semen na agarových plotnách	80

1. Cíl práce

Výchozí hypotéza:

Na (v) semenech máku je přítomna řada mikroskopických hub. Některé z nich jsou původci chorob semene a/nebo rostliny. Pro poznání vztahů semeno – houba je nutné dané mikromycety nejprve determinovat.

Cíl:

Izolovat mikromycety ze semen máku. Získané izoláty determinovat.

2. Úvod

Semeno představuje zárodek rostliny krytý osemením, který vzniká na základě pohlavního rozmnožování rostlin. Pouze ze zdravého a kvalitního semena může vyrůst vitální a konkurenceschopná rostlina. Význam semen rostlin obecně spočívá v jejich vlastní reprodukci a distribuci, mimoto ale poskytují člověku a jiným organismům obživu. Semena jsou člověkem využívána jako surovina pro výrobu potravin a krmiv a také pro semenářské účely. V obou případech je velmi důležitá kvalita semen.

Semena jsou osidlována řadou organismů (viry, bakterie, houby), jejichž míra patogenity a kvantita ovlivňuje zdravotní stav semena. K osidlování semen těmito organismy dochází v závislosti na použité agrotechnice, dále na stavu počasí během vegetace a také na průběhu sklizně, posklizňových úpravách a skladování. Ve velké míře se na osidlování semen podílejí houby. Houby jsou unikátní skupina heterotrofních eukaryotických organismů, které sehrávají velmi důležitou roli v ekosystémech. Semeno může být osídleno jedním nebo i více druhy hub. To záleží na velikosti a morfologii semene, dále na jeho chemickém složení, vnějších podmínkách a na přítomnosti houbových propagulí. Při osidlování semen zůstávají houby buď na povrchu semena, anebo prorůstají do jeho vnitřku.

K tomu, aby došlo k infekci rostliny a potažmo semen, jsou důležité tři základní faktory. Prvním faktorem je citlivý hostitel, druhým je virulentní patogen a třetím faktorem jsou příznivé vnější podmínky. K infekci tedy dochází tehdy, když se infekční propagule patogena střetnou s citlivým hostitelem a hostitel je navíc vystaven stresujícím podmínkám.

Hostitel se infekci primárně brání prostřednictvím výhodného habitatu a mechanických bariér (trichomy, kutikula, atd.). Tyto anatomicko-morfologické struktury poskytují rostlině pouze základní stupeň ochrany. Vyšší stupeň ochrany je závislý na chemickém složení pletiv a na charakteru biochemických procesů, k nimž dochází při reakci rostliny na přítomnost infekčních propagulí patogena. Semeno v půdě je vystaveno těsné blízkosti infekčních agens hub, kde se navíc nachází zóna zvýšené vzdušné relativní vlhkosti, která je nezbytná pro aktivaci patogena. Patogen potom může semeno snadno osídlit. Semeno na rostlině je oproti tomu před přímým působením patogenů z vnějšího

prostředí chráněno stěnou makovice. K infekci semen v makovici může dojít přes mechanické poškození nebo prorůstáním patogena vodivými svazky.

Mezi semena osidlující druhy patří patogenní a potenciálně patogenní, saprofytické druhy hub. Zvláštní skupinu tvoří houby, které se pouze zachytávají na povrchu semena jako kontaminace a semeno využívají jen jako vektor svého přenosu.

Saprofytické houby osidlují semena se sníženou vitalitou nebo semena již mrtvá. U dormantních, vitálních a vysoce kvalitních semen je osídlení saprotrofními houbami ojedinělé a vyskytuje se jen s nízkou hustotou. Vliv těchto hub na další poškozování semen proto není ve srovnání s patogenními druhy tak velký, ale mohou přesto způsobovat problémy při předosevní přípravě méně kvalitních semen s vyšším podílem mrtvých semen, neboť tato semena jsou přirozenými ohnisky pro jejich další šíření na okolní zdravá semena.

Významnou skupinu hub osidlujících semena rostlin tvoří patogenní druhy. V rámci jednotlivých druhů těchto patogenů často existuje značná substrátová specificita, která se následně odráží v množství popsaných forem *speciales*. Tyto houby mohou napadnout všechny části rostlinného těla, způsobit celkové oslabení rostliny a nakonec její úhyn. To platí i pro semena, která vlivem napadení špatně klíčí a často obsahují i zdraví nebezpečné toxiny, které mohou být houbami produkovány.

Zvláštní skupina saproparazitů zahrnuje zástupce, kteří jsou schopni po usmrcení hostitelské rostliny, včetně semen, přejít z parazitického na saprotrofní způsob života, a žít se tak odumřelými organickými zbytky hostitele. Ve chvíli, kdy se dostanou do blízkosti živého hostitele, opět přecházejí na parazitický způsob života.

Určitou ochranu semen proti houbám poskytuje moření. To ale zásadně neovlivní klíčivost, na níž mají houby osidlující semena primární vliv. Po vyklíčení rostlina pro svůj růst a vývoj vyžaduje optimální zásobu živin, rovnoměrně zpracovanou půdu, dostatečnou vláhu a světelné podmínky a také pesticidní ochranu. Pokud trpí stresem, ať už z důvodu nedostatečné agrotechniky nebo povětrnostních podmínek, pak je náchylná k napadení dalšími houbami, které mohou později přecházet do semen. Houbová onemocnění rostlin mohou značně redukovat výnos plodiny a také její celkovou rentabilitu pěstování. Z tohoto důvodu je pozornost věnována houbám způsobujícím různá onemocnění máku. Dosud nebyla v České republice uskutečněna práce, která by se zabývala výhradně houbami osidlujícími semena máku v makovicích, tedy přirozenou infekcí semen. Spektrum hub

izolované ze semen uskladněného máku je oproti těmto semenům ovlivňováno variabilními sklizňovými a posklizňovými podmínkami a může se tedy do jisté míry od spektra hub semen uvnitř makovic lišit.

3. Literární přehled

Následující literární přehled podává stručné informace o historii pěstování máku na českém území, o jeho taxonomii, morfologii a agrotechnice pěstování. Dále pojednává o rizicích, které pro mák představují různé abiotické a biotické faktory. Další část textu se zabývá problematikou semen a hub, kde je navíc zpracován přehled semen nejrůznějších plodin a z nich izolovaných hub. Dále je popisována charakteristika hub, které byly v rámci této diplomové práce izolovány a určeny. Poslední část literárního přehledu je věnována metodám, které jsou k inkubaci semen a následné kultivaci hub běžně využívány.

3.1. Historie pěstování máku

Zemědělství představovalo významnou složku kultury četných kmenů a národů, které obývaly naše země již od mladší doby kamenné. O tom vypovídají nejen nalezené nástroje, nářadí či keramika, ale také dochované zbytky pěstovaných plodin a chovaných zvířat (Klečka 1934).

Mezi prastaré plodiny nepochybně patří i mák, ačkoliv jeho historie není zatím dostatečně objasněna. Mnozí badatelé se domnívají, že divoký předek máku setého (*P. somniferum*) pochází ze západního Středomoří. Semena máku z období neolitu, případně eneolitu, jsou nalézána v malém množství po celé střední Evropě (Kreuz & Schäfer, 2008). Semena jsou zachována ve zuhelněné podobě, jak je patrné na Obr.1 .



Obr. 1: Zuhelněné semeno máku pocházející z doby železné (převzato z Kreuz & Schäfer, 2008)

Z území České republiky je známo jen několik ojedinělých nálezů semen máku. Nejstarší nález na našem území byl učiněn v Kroměříži a je datován do období eneolitu. Prozatím je však tento nález evidován pouze jako nepotvrzený. Mezi další místa nálezu zuhelnatělých semen lze jmenovat Hulín, Ostrov u Stříbra, Liboc, Vladař, Březno u Loun či Medlovice. Předpokládá se, že mák byl našimi předky využíván nejen jako potravinu, ale také jako zdroj opia. Do 19. století byl mák pěstován pouze na zahrádkách. Teprve později se začal pěstovat jako polní plodina, která byla zpočátku sklízena ručně. Postupem doby se od ruční sklizně upustilo a přešlo se k plně mechanizované sklizni jako je tomu dnes (Kočár & Dreslerová 2010).

3.2. Taxonomie máku

V roce 1753 popsal a pojmenoval slavný švédský přírodovědec a botanik Carl Linné (1707-1778) rostlinu, kterou znalo lidstvo již celá staletí. Touto rostlinou byl *Papaver somniferum* L., česky mák setý. V současné době rod *Papaver* zahrnuje přibližně 120 druhů (Novák & Preininger 1981). Aktuální taxonomické zařazení máku podle Biological Library (www.biolib.cz) je následující:

- říše: *Plantae* (rostliny)
 - oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné rostliny)
 - třída: *Rosopsida* (vyšší dvouděložné rostliny)
 - řád: *Ranunculales* (pryskyřníkotvaré)
 - čeleď: *Papaveraceae* (makovité)
 - rod: *Papaver* (mák)

3.3. Morfologie máku

Mák setý je jednoletá bylina, jejíž lodyha dorůstá do výšky 30 – 180cm. Počet větví na lodyze závisí na odrůdě, ale je velmi silně ovlivněn i sponem, ve kterém jsou rostliny pěstovány. Listy objímající lodyhu bývají jednoduché, podlouhlé, mírně zvlněné a zubovité. Jejich povrch je kryt nesmáčivou voskovou vrstvičkou (Vašák et al. 2010).

Květy vyrůstají zpravidla jednotlivě, jsou tvořeny dvěma opadavými kališními lístky a čtyřmi korunními lístky, které bývají nejčastěji bílé s fialovou kresbou, ale mohou nabývat nejrůznějších barev, od růžové přes červenou až tmavě fialovou. Tvar a velikost

korunních lístků bývá rozmanitý. Uvnitř květu vyrůstá pestík bez čnělky a velké množství tyčinek (150-250). Semeník pestíku je zakončen terčovitou paprscitou bliznou. Květ je většinou samosprašný. Po odkvětu se semeník přeměňuje v tobolku, tzv. makovici. Makovice se po dozrání buď otevírá drobnými otvory mezi paprsky blizny a uvolňuje množství drobných semen (tzv. hled'ák), nebo zůstává zcela uzavřena (tzv. slepák). Velikost a tvar tobolek jsou odrůdovým znakem a bývají ovlivňovány agrotechnikou a podmínkami prostředí (Fábry et al. 1975).

Semena jsou ledvinovitého tvaru. Jejich délka se pohybuje okolo 1 – 1,5 mm. Povrch semen je strukturován v šestiúhelníkové plošky, které jsou ohraničené mírně vyvýšenými žebry. Semena mohou být nejrůzněji zbarvená, odrůdy pěstované v České republice mají nejčastěji modré, šedomodré, bílé či okrové zbarvení osemení. Průměrná HTS (hmotnost 1000 semen) se pohybuje okolo 0,55g (Novák & Preininger 1981, Vašák et al. 2010).

Kořen rostliny je hluboký kůlový a proniká do hloubky okolo 50 – 80cm. Z hlavního kořene vyrůstá několik silných postranních kořenů a velké množství jemných vláscitých kořínků, které se vytvářejí mělce pod povrchem půdy (Fábry et al. 1975).

3.4. Agrotechnika

Kvalita produkce semen je do jisté míry ovlivňována použitou agrotechnikou. K základním agrotechnickým opatřením patří vhodně zvolený osevní postup, pečlivě zpracovaná a rovnoměrně prohnojená půda, optimální výsev a pesticidní ochrana. Základní informace o výsevu a porostu jarního máku jsou shrnuty v tabulce (Tab.1).

Tab. 1: Obecné informace o výsevu a porostu jarního máku (podle Edelbauer & Stangl 1993, Richter & Lošák 2004, Vašák et al. 2010)

UKAZATEL	HODNOTA
Termín setí	zavčas na jaře a jen do vyzrálé půdy
Nároky na živiny (na produkci 1t semen)	71kg N, 27kg P, 93kg K, 18kg S, 15kg Mg, 0,35 kg Mn, 0,2kg Zn, 0,11kg B
Výsevek (kg/ha)	0,8 – 1,7
Meziřádková vzdálenost (cm)	7,5 – 15 – 25
Hloubka setí (cm)	do max. 2
Hustota porostu (ks/m ²)	70 – 100
Počet makovic (ks/m ²)	100 – 120 (při sklizni 70 – 100)
Tvar makovic	kulaté až oválné
Jednotnost zrání makovic	vysoká
Termín sklizně	červenec - srpen
Hmotnost semen v makovici (g)	2 – 2,4
Hmotnost prázdné makovice (g)	1,8 – 2,2
Teoretický výnos (t/ha) -5% ztrát	1,6 – 2,3

3.5. Zdravotní stav máku

Správná agrotechnika je nezbytným předpokladem pro realizaci optimálního výnosu plodiny. Ačkoliv jsou splněny všechny požadavky pro pěstování máku, konečný výnos může být ještě ovlivněn mnoha faktory okolního prostředí. Na jedné straně stojí faktory abiotické, na druhé jsou biotičtí činitelé. Biotičtí činitelé představují organismy, které svým způsobem života oslabují hostitelskou rostlinu a nezřídka způsobují její úhyn. Mezi původce onemocnění rostlin patří viry, bakterie, fytoplazmy, houby, živočichové (bezobratlí i obratlovci), či parazitické rostliny. Ve vyšším zastoupení jsou u máku setého řešeny problémy s viry, bakteriemi, houbami a bezobratlými živočichy (Baudyš et al. 1958, Vašák et al. 2010).

3.5.1. Abiotické faktory

Abiotické faktory jsou dány jednak klimatickými podmínkami (srážky, teplota, vítr), jednak agrotechnikou (zpracování půdy, hnojiva, pesticidy, mechanická poškození).

Deštivé počasí v období dozrávání máku a těsně před sklizní způsobuje klíčení semen v nepoškozených makovicích. Tomuto problému lze předejít pěstováním odrůd se střechovitým bliznovým terčem, který zajišťuje stékání vody z makovic. Potíže ovšem představuje přílišný úhrn srážek v době dokvétání máku. V důsledku deštivého počasí bývají makovice obaleny odumřelými okvětními plátky. Takto obalené makovice se stávají cílem mnohých škůdců a chorob, kteří výnos významně redukují. Žádná preventivní opatření v tomto případě nepomohou (Vašák et al. 2010).

Ačkoliv je mák v počátečních fázích vývoje k nízkým teplotám relativně odolný, může při dlouhotrvajících mrazech docházet k potrhání pletiva klíčících rostlin. Takové rostliny záhy odumírají. Problém také činí střídání teplot, které klíčící rostlinky vytahují z půdy a způsobují jejich zaschnutí. Jedinou možnou ochranou proti tomuto typu odumírání je vhodný výběr pozemku. Mák při podzimních či časně jarních výsevech by neměl být pěstován na půdách se sklonem k tvorbě půdního škraloupu, dále na svazích a v mrazových kotlinách. Nejcitlivější částí rostliny máku k mrazu jsou samčí reprodukční orgány. Promrznutí tyčinek a pylu v době kvetení brání v opylení, což vede k tomu, že ačkoliv se semeník dále vyvíjí, makovice zůstává prázdná. K tomuto poškození mrazem dochází zejména u předčasných výsevů, ale také u podzimních výsevů ve spodních částech svahů, v mrazových kotlinách či u vodních toků (Fábry et al. 1975, Vašák et al. 2010).

Celoplošné poškození porostu máku bývá způsobeno krupobitím. I drobné proděravění makovice znamená 100% znehodnocení semen. Samotný úder krup bez proděravění vede k poškození až polovičního množství semen, odkud se škoda může šířit dál. Jakékoliv mechanické poškození poskytuje výhodnou vstupní bránu pro různé choroby a škůdce. Samotné poškození listové plochy snižuje asimilační plochu, což vede k dalšímu oslabení rostliny. Z hlediska agrotechnických opatření neexistuje žádná prevence proti tomuto typu poškození, proto je nezbytné pro každý případ úrodu pojistit (Vašák et al. 2010).

Časté a silné větry mohou způsobit poléhání porostu či vývraty rostlin. Odolnost vůči vývratu je závislá na hloubce a kvalitě kořenového systému, který rostlinu upevňuje v půdě. Z tohoto důvodu je nutné dbát na dostatečně hluboké a rovnoměrné zpracování

půdy. Kromě toho mohou posloužit regulátory růstu jako vhodné přípravky pro zpomalení růstu rostlin (Fábry et al. 1975).

Další příčinou abiotického poškození porostu máku bývá nedostatečná výživa. Mák je náročnou plodinou na přítomnost bóru, který společně se zinkem pozitivně ovlivňuje průběh opylení a tím i výnos semen. Na nedostatek bóru rostlina máku reaguje zhnědlým vegetačním vrcholem, hnědými zakrnělými poupaty a nakonec malými deformovanými makovicemi. Na pozemcích s nedostatečnou zásobou bóru je nutné věnovat pozornost jeho doplnění a obecně je u máku žádoucí během vegetace používat listová hnojiva s obsahem bóru. Nedostatečná výživa dalšími prvky, zejména dusíkem, způsobuje změnu zabarvení porostu, nejčastěji světlého či zažloutlého odstínu. Problém s nedostatkem dusíku bývá především při pěstování máku na chudších, promyvných a propustných půdách. Tam je potřeba s tímto problémem počítat a zohlednit jej v plánu hnojení. Příčinou změny zabarvení porostu nemusí být jen nedostatek živin, ale i jejich nadbytek, a to zejména v případě předávkování stopovými prvky (Baudyš et al. 1958, Dell & Huang 1997, Vašák et al. 2010).

Při aplikaci herbicidů či jiných pesticidů je možné použít nevhodná smáčedla. Následkem toho porost obvykle žloutne, objevují se tmavé nekrotizace, růst se zpomaluje a zastavuje. Účinnou ochranou je dodržování zásad správné aplikace přípravků, zejména je nutné se zaměřit na výběr vhodného přípravku, na správnou růstovou fázi rostliny, kdy si již rostlina vytvořila dostatečně silnou voskovou vrstvu na listech, dále aplikovat přípravky za podmračeného počasí či v podvečer, chránit mák proti zaplevelení a v případě aplikace systemického herbicidu po několika dnech aplikovat přípravky pro zlepšení regenerace a fytotoxicity (Vašák et al. 2010).

3.5.2. Biotické faktory

Biotické faktory představují riziko, kterému jsou rostliny vystaveny po celou dobu své existence. Škůdci způsobují mechanická poškození pletiv, která vedou k omezování asimilační plochy, ke snižování pevnosti a pružnosti pletiv a také k vyšší náchylnosti rostlin k napadení nejrůznějšími patogeny. Rostliny stresované suchem, nadměrnými teplotami, nedostatečnou výživou, přítomností škůdců, hub a plevelů či nadměrnou rostlinnou populací se potom stávají více citlivé k řadě rostlinných patogenů (Aldea et al. 2006, Bruns 2003, Hanlin 1990, Hanlin 1998a, Hanlin 1998b).

3.5.2.1. Škůdci

Mezi nejvýznamnější škůdce máku patří bejломorka maková (*Dasineura papaveris*), bejломorka poupatová (*Clinodiplosis cilicrus*), mšice maková (*Aphis fabae*), můra zelná (*Mamestra brassicae*), klopuška dvoutečná (*Calocoris norvegicus*), krytonosec kořenový (*Stenocarus ruficornis*), krytonosec makovicový (*Neoglocianus maculaalba*) a žlabatka stonková (*Timaspis papaveris*). Z potenciálních a méně významných škůdců máku lze jmenovat žlabatku makovicovou (*Aylax papaveris*), žlabatku makovou (*Aylax minor*), třásněnky (*Thysanoptera*), drátovce – larvy kovaříků (Elateridae), ponravy – larvy chroustů (Melolonthinae), chrousta obecného (*Melolontha melolontha*) či chrousta maďalového (*Melolontha hippocastani*). Kromě výše uvedených bezobratlých živočichů mohou na máku škodit také semenožraví ptáci (*Aves*). Z nich největší škody, ovšem vzhledem k rozsáhlým plochám pěstovaného máku v podstatě jen minimální, páchají sýkory (*Parus*), konopka obecná (*Carduelis cannabina*), zvonohlík zahradní (*Serinus serinus*), nebo zvonek zahradní (*Carduelis chloris*) (Fábry et al. 1975, Havel & Rotrekl 2004, Vašák et al. 2010, Vlažný et al. 2010).

Z ekonomického hlediska je za největší škody zodpovědná mšice maková a krytonosec kořenový, v zelinářských a chmelařských oblastech ještě můra zelná. Mšice maková na máku škodí od fáze přízemní růžice listů až do fáze zelených makovic. V období mezi těmito fázemi se na spodních stranách listů, na stoncích i na zelených makovicích vyskytují kolonie černých mšic. Posáté části máku se krotí a předčasně žloutnou. Tato mšice klade přezimující vajíčka na brslen, kalinu či pustoryl, odkud se zjara šíří na mák, ale také na porosty slunečnice, bobu nebo řepy (Vašák et al. 2010).

Po vzejití porostu máku se lze setkat s dospělci krytonosce kořenového, kteří svým žírem poškozují čepele listů. Samičky těchto brouků kladou vajíčka do nervatury spodní strany listů, kde se později líhnou larvičky, které se spouštějí na zem a poškozují kulový kořen rostliny. Rostlina následkem napadení krmí, hůře kvete a podehňuje (Kazda & Skuhrovec 2011).

3.5.2.2. Viry

Výskyt virových žloutenek v máku je pravidelnou záležitostí, ale škodlivost zatím nedosahuje významnější úrovně. Nejčastěji se uvádějí 2 původci viróz, a to vir mírného žloutnutí řepy, přenosný perzistentně mšicí broskvoňovou, a vir žloutenky řepy (BYV –

Beet yellow virus), přenosný semiperzistentně mšicí broskvoňovou a mšicí makovou. Stejně jako jejich přenašeči, jsou i tyto viry polyfágní. Případný výskyt virózy v máku tedy úzce souvisí s přítomností jejich přenašečů. Virózy na máku se projevují celkovým zakrněním rostliny, dále tvorbou menších, tužších a zároveň vzpřímenějších listů, které od báze žloutnou, zatímco u špičky si zachovávají původní tmavé zbarvení (Bittner 2005).

3.5.2.3. Bakterie

Nejvýznamnějšími bakteriálními onemocněními máku jsou bakteriální skvrnitost máku a stonková bakterióza máku setého. Původcem bakteriální skvrnitosti máku je bakterie *Xanthomonas papavericola*, která na listech vytváří nepravidelné vodnaté skvrny ohraničené žilnatinou. Tyto skvrny v pozdějších fázích žloutnou, zasychají, zůstávají průsvitné a předčasně usychají, což vzhledem ke snížené asimilační ploše negativně ovlivňuje konečný výnos plodiny. Za teplého a vlhkého počasí se infekce v porostu rychle šíří, a to hlavně zásluhou svého hmyzu, který infekci přenáší. Primárním zdrojem infekce je půda (Baudyš et al. 1958, Bittner 2005).

Druhou zmíněnou bakteriózou je stonková bakterióza máku setého, jejímž původcem je bakterie *Pectobacterium carotovorum* (syn. *Erwinia carotovora*). Toto onemocnění se projevuje v době vývoje prvních pupat, kdy rostliny od vrcholku za zelena náhle vadnou a za dalších pár dní uvadají úplně. V horní polovině stonku se objevuje ztmavlé místo, při smáčknutí nejprve měkké, později se zde stoněk nalomí. Dřeň je hnědě až černě zbarvená, vnitřek stěn je obalen bělavým slizovitým, po kvasnicích páchnoucím hlenem. K rozkladu ostatních částí rostlin dochází záhy. Primárním zdrojem infekce je vlhká půda. V dalším šíření této bakteriózy napomáhá hmyz (žlabatka stonková, klopuška dvousečná, krytonosec makovicový), ale také vítr a déšť (Bittner 2005).

3.5.2.4. Houby

Houbami zapříčiněné choroby způsobují na porostech máku nemalé škody. Mezi zmiňovaná houbová onemocnění máku patří helmintosporiíza máku (tmavohnědá skvrnitost), bílá sklerociová hniloba máku, černání stonku máku, spála a padání klíčnicích rostlin máku, šedá plísňovitost máku, černě máku, padlí máku, sněť máku a plíseň máku (Baudyš et al. 1958, Vašák et al. 2010, Kulhánek 2011). Původci zmíněných onemocnění jsou uvedeni v následující tabulce (Tab. 2).

Tab. 2: Přehled původců houbových onemocnění máku (a = anamorfa, t = teleomorfa)

ONEMOCNĚNÍ	PŮVODCE
Helmintosporióza máku	a: <i>Helminthosporium papaveris</i> t: <i>Crivellia papaveracea</i> (= <i>Pleospora papaveracea</i>)
Bílá sklerociová hniloba máku	t: <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Černání stonku máku	a: <i>Verticillium</i> spp.
Spála a padání klíčnicích rostlin máku	a: <i>Phomopsis</i> spp., <i>Thielaviopsis</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., rod <i>Pythium</i>
Šedá plísnovitost máku	a: <i>Botrytis cinerea</i> t: <i>Botryotinia fuckeliana</i>
Čerň máku	a: <i>Alternaria</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Ulocladium</i> spp., <i>Stemphylium</i> spp.
Padlí máku	t: <i>Erysiphe cruciferarum</i>
Sněť máku	t: <i>Entyloma fuscum</i>
Plíseň máku	<i>Peronospora arborescens</i>

Původce helmintosporiózy máku napadá všechny části rostliny. Jedná se o velmi rozšířené onemocnění přenosné osivem, které každoročně způsobuje značné výnosové ztráty. Onemocnění se projevuje již na mladých rostlinkách, a to hnědnutím a zaškrcováním kořenového krčku těsně nad povrchem půdy, což v konečné fázi vede k úhynu rostliny. Na starších rostlinách se přítomnost onemocnění vyznačuje tvorbou tmavohnědých hranatých skvrn na listech, případně modročerným páskováním stonků v době květu. Z ohnisek výskytu se onemocnění rychle šíří po celém porostu. Patogen ke konci vegetace přechází do makovic, kde napadá semena, jež se stávají, stejně jako posklizňové zbytky, zdrojem infekce (Bailey et al. 2000, Bailey et al. 2004, Bittner 2004).

Bílá sklerociová hniloba máku se projevuje v době od odkvětu do sklizně. Zdrojem infekce je půda, kde houba přežívá ve formě odolných černých sklerocií (tvrdých útvarů tvořených pevně spletenými houbovými vlákny, tzv. hyfami). Ze sklerocií klíčí mycelium (sít' propojených houbových vláken), které napadá kořenový systém rostliny, odkud se dále šíří do stonku. Stonky následkem toho měknou a na jejich povrchu se objevuje bílý vatovitý povlak. V pozdějších fázích stonek zahnívá (Bittner 2009).

Dalším onemocněním postihující kořeny a stonky máku je černání stonku máku, které vede k předčasnému zasychání rostlin doprovázenému tvorbou zakrnělých makovic. Habitus napadené rostliny je oproti zdravé rostlině menší. V dolní polovině stonků šedne až černá, kořenový systém také černá a redukuje se pouze na hlavní křovitý kořen (Vašák et al 2010).

Klíční rostliny v důsledku výsevu nemořené osiva na těžkých půdách velmi často podléhají spále a padání klíčnicích rostlin. Mladé rostlinky, které vzejdou a prorazí půdní škraloup, mají zaškrcený krček a jsou povadlé. Takto oslabené rostlinky bývají druhotně napadány řadou houbových patogenů, jimž následně podléhají. Kořeny postižených rostlin hnědnou a černají, listy vadnou a získávají hnědé zabarvení. Rostlina v konečné fázi odumírá (Vašák et al. 2010).

Mezi méně významná onemocnění máku patří šedá plísňovitost máku. Toto onemocnění se vykytuje především na starších nebo poškozených pletivech listů, stonků a makovic. Listy i stonky nejprve žloutnou, posléze hnědnou a zasychají. Stonky se často lámou a makovice předčasně dozrávají. Napadené části rostliny se pokrývají hustým šedohnědým myceliem houby. Původce onemocnění patří mezi polyfágní patogeny, což znamená, že napadá celou řadu dalších rostlinných druhů, včetně plevelů, které se potom stávají potenciálním zdrojem infekce (Bittner 2009).

Za deštivého počasí a opožděné sklizně, se lze na makovicích setkat černěmi máku, které bývají způsobeny řadou neparazitických hub. Černě na nadzemních částech rostliny vytvářejí černé sazovité povlaky, které však na kvalitu semen v makovicích a celkový výnos máku nemají výraznější vliv (Vašák et al 2010).

Padlí máku je řazeno mezi potenciálně hospodářsky významné choroby máku. Na nadzemních částech rostliny původce onemocnění vytváří bílé povlaky, napadená pletiva rostliny postupně odumírají. Stejně jako u šedé plísňovitosti máku je i původce padlí polyfágním patogenem (Vašák et al. 2010).

Sněť máku se viditelně projevuje v průběhu měsíců července a srpna tvorbou zpočátku bledých, později šedých, hnědnoucích až černých skvrn, které bývají občasně červeně lemovány. Černé chlamydospory (odolné nepohlavní tlustostěnné jednobuněčné spory vznikající mezi buňkami mycelia) bývají hustě nahloucheny v houbovém parenchymu listu, odkud skvrny získávají černé zabarvení. Listy následkem napadení předčasně opadávají, stávají se zdrojem infekce a vývin makovic se v důsledku snížení asimilační

plochy rostliny zhoršuje (Baudyš et al. 1958). V současné době nejsou o výskytu tohoto onemocnění žádné dostupné záznamy.

S plísní máku se lze setkat jak na mladých, tak i starších rostlinách. Na mladých rostlinách se onemocnění projevuje celkovým zakrněním, deformacemi, a dále chlorotickými skvrnami na listech, na jejichž místě se na spodní straně listu vytváří hustý povlak mycelia. Listy jsou vlivem napadení ztluštělé, křehké a jejich okraje se svinují směrem dolů. Květní stonky bývají vlivem nestejnomyerného růstu zakřivené a pokryté myceliem, poupata a makovice jsou malé a také zpravidla deformované. Pokud je rostlina infikována až v pozdějších fázích vývoje, onemocnění se projevuje malými, ostře ohraničenými, nekrotickými skvrnkami. Při silném napadení dochází k předčasnému hnědnutí a odumírání listů. Zdrojem infekce je napadené osivo a rostlinné zbytky v půdě (Baudyš et al. 1958, Bittner 2004).

Původcem plísně máku je *Peronospora arborescens*, která, ačkoliv je uvedena mezi houbovými patogeny, houbou ve skutečnosti není. Ze systematického hlediska houby náleží k vývojové eukaryotické linii („supergroup“) Opisthokonta, zatímco *P. arborescens*, k eukaryotické linii Chromalveolata. Do linie Chromalveolata náleží také již výše zmíněný rod *Pythium*, jeden z původců spály a padání klíčnicích rostlin máku (Simpson & Roger 2004).

3.6. Houby osidlující semena rostlin

Houby způsobující onemocnění rostlin se snaží stále udržovat v blízkosti hostitele. Období vegetačního klidu tedy přečkávají na posklizňových zbytcích hostitele, nebo zůstávají v pletivech přezimující rostliny, anebo přecházejí do semen. Houby potom semena využívají jako živný substrát nebo jako vektor přenosu (Baird & Carling 1998, Horsfall & Cowling 1978, Taber & Heacock 1962).

Do semene se patogenní organismy dostávají několika způsoby. Prvním způsobem je mechanický přenos, kdy se zárodek houby do semena dostává přes mechanické poškození způsobené savým hmyzem či mechanickou manipulací. Druhým způsobem je prorůstání mycelia do semeníků cestou mezibuněčných prostor či přímo vaskulárním systémem a dalším způsobem je infekce semene přes bliznu květu (Maude 1996).

Semena máku v makovicích osidluje určité spektrum hub, které je souborně označováno jako „polní houby“ („field fungi“). Tyto houby bývají zpravidla

reprezentovány rostlinnými patogeny, které osidlují semena plodiny ještě před sklizní. Toto spektrum hub je následně ovlivňováno sklizňovými a posklizňovými manipulacemi, kdy jsou semena vystavena dalšímu působení životaschopných částic hub exponovaných v prostředí (spory, konidie, fragmenty mycelia, sklerocia aj.). Tyto částice saprotrofních, ale také patogenních hub mohou snadno ulpívat na strukturovaném povrchu semene máku. Houby, které se na povrch semena dostávají až při sklizni, transportu či uskladnění, jsou obecně označovány jako „skládkové houby“ („storage fungi“). Skládkové houby mohou stejně jako polní houby způsobovat onemocnění semen. V některých případech jsou semena těmito houbami využívána pouze jako vektor přenosu (Pitt & Hocking 1997). Spektrum hub izolovaných ze semen před sklizní se tedy může do jisté míry lišit od spektra hub osidlujících již uskladněná semena. Semena mohou být za účelem distribuce využívána nejen houbami, ale také viry, bakteriemi či hlísty (Maude 1996). Velkého významu nabývají kontinentální a mezikontinentální transporty semen kulturních plodin osídlených patogeny, kteří se mohou na novém území rychle šířit a způsobovat na kulturních plodinách velké škody (Jones 2002, Procházková 2007).

V převážné většině případů původci onemocnění rostlin přenosní semenem nevyvolávají na semeni viditelné příznaky (Prokinová 2011). První známky napadení se projevují až sníženou klíčivostí semen určených k výsevu. Některá semena nevyklíčí vůbec, nebo vyklíčí, ale záhy podléhají deformacím a následným fatálním nekrotickým změnám. Příznaky přítomnosti patogenních hub se u dalších semen objevují až na klíčících rostlinách a v následujících fázích vzcházení. Klíčící rostliny oslabené infekcí jsou více náchylné k napadání dalšími patogenními houbami, které přečkávají klidové období na posklizňových zbytcích v půdě (Horsfall & Cowling 1978).

Jestliže se onemocnění projeví už na semeni, je charakterizováno změnami v zabarvení, deformacemi semene, redukcí jeho velikosti, vrásčitostí, tvorbou tmavých nekrotických skvrn na povrchu či zdrsněným osemením. Mimoto houbové choroby mohou vést až k tomu, že semena nedozrávají, případně se nevytvářejí vůbec. Dále mohou semena podléhat hnilobě a být houbou zničena úplně. Jeden z výše uvedených příznaků může příslušet několika různým onemocněním, většinou se však jedná o spolupůsobení více původců najednou (Prokinová 1997).

Význam hub na semenech máku odvisí od účelu následného využití semen, a to buď v semenářství, nebo v potravinářském průmyslu. U máku určeného pro semenářské

účely budou hlavní roli hrát především takové druhy hub, které způsobují onemocnění semen nebo následně z nich vyklíčených rostlin. Pro semena máku určeného k potravinářskému využití jsou stěžejní houby, které způsobují onemocnění semen, a houby, jež jsou potenciálními producenty mykotoxinů (Dijksterhuis & Samson 2007, Hocking et al. 2006, Horsfall & Cowling 1978).

Mykotoxiny jsou definovány jako nízkomolekulární organické sloučeniny, které jsou produktem sekundárního metabolismu toxinogenní hub (Chełkowski 1991). Tyto zdraví nebezpečné látky se spolu se semeny mohou dostat do potravy a následně dosti negativně ovlivňovat zdravotní stav člověka. Mykotoxiny v současnosti představují globální problém, jemuž je věnována stále značná pozornost (např. Alwakeel & Nasser 2011, Betina 1990, Černá 2011, Dijksterhuis & Samson 2007, Hocking et al. 2006, Chełkowski 1991, Leslie et al. 2008). Vzhledem k tomu, že bezpečnost potravin je jednou z priorit zemědělské politiky Evropské unie, může mít výskyt mykotoxinů v potravinách vážné důsledky jak pro zemědělskou, tak pro potravinářskou praxi. Vedle značných penalizací hraje významnou roli i publicita, která může vést až k likvidaci postiženého výrobce. Z těchto důvodů by měla být semena máku kontrolována, skladována a přepravována v takových podmínkách (nízká teplota a vlhkost), které zabraňují výskytu a růstu potenciálně toxinogenních hub (Stejskal et al. 2002).

Základním opatřením proti výskytu patogenních hub přenosných semeny je prevence v podobě správné agrotechniky, což zahrnuje vhodně zvolený oseední postup, kvalitní příprava půdy, vyrovnaná výživa atd. Nevhodně zvolená agrotechnika oslabuje rostliny, což ve svém důsledku vede k vyšší náchylnosti rostlin máku k napadení houbovými patogeny (Cleveland et al. 2003).

Jistou ochranu semen před přenosnými patogeny představuje fungicidní ochrana v podobě moření. Někdy však ani moření nezastaví růst těchto hub. V tomto případě však většinou nebývá chyba na straně účinné látky fungicidu, nýbrž na straně toho, kdo moření provádí. Nesprávný výběr, špatné dávkování a nerovnoměrná aplikace mořidla výrazně snižuje efekt moření. V zemědělské praxi byly prokázány pozitivní důsledky insekticidně-fungicidního moření máku, neboť fungicidní ošetření klíčící rostlinky máku nechrání před stejně závažným napadením způsobeným živočišnými škůdci (Horsfall & Cowling 1978, Prokinová 2011).

3.7. Literární přehled hub izolovaných ze semen kulturních plodin

Problematice hub osidlujících semena kulturních plodin je do současné doby věnována řada publikací z celého světa (Abdel-Hafez et al. 1987, Abdel-Hafez & Saber 1993, Abdel-Kader et al. 1979, Alwakeel & Nasser 2011, Andersen et al. 1996, Baird et al. 1993, Basak & Lee, 2002, Dawar et al. 2007, Domijan et al. 2005, Du et al. 2001, Eckard et al. 2011, Elwakil et al. 2007, Flannigan 1970, Hill & Lacey 1983, Jacobsen et al. 1995, Joffe 1969, Khan 1992, Kuthubutheen 1979, Lillehoj et al. 1976, Malaker et al. 2008, Marasas et al. 1979, McDonald 1970, Medić-Pap et al. 2007, Moubasher et al. 1972, Nasir 2003, Nik 1980, Petrie 1974, Pitt et al. 1994, Pitt & Hocking 1997, Richardson 1990, Shahnaz & Ghaffar 1991, Wicklow et al. 1988, Youssef et al. 2008 a další). Podle výše uvedených publikací je vytvořena Tab. 3, v níž jsou u semen příslušných plodin vyjmenovány nejčastěji izolované rody polních hub.

Tab. 3: Seznam nejčastěji detekovaných semenem přenosných rodů hub u vybraných zemědělských plodin

SEMENA	POLNÍ HOUBY
pšenice	<i>Alternaria, Aspergillus, Bipolaris, Cephalosporium, Chaetomium, Cladosporium, Curvularia, Drechslera, Epicoccum, Fusarium, Melanospora, Nigrospora, Penicillium, Sporotrichum, Stachybotrys</i>
ječmen	<i>Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Cladosporium, Drechslera, Epicoccum, Fusarium, Penicillium, Rhizopus</i>
oves	<i>Alternaria, Cladosporium, Epicoccum, Penicillium</i>
rýže	<i>Alternaria, Acremonium, Aspergillus, Bipolaris, Cephalosporium, Chaetomium, Cladosporium, Curvularia, Diplodia, Fusarium, Microdochium, Mucor, Nigrospora, Penicillium, Phoma, Sarocladium, Stachybotrys, Trichoderma</i>
kukuřice	<i>Alternaria, Aspergillus, Curvularia, Eupenicillium, Fusarium, Lasiodiplodia, Penicillium, Rhizoctonia, Rhizopus, Trichoderma</i>

sója	<i>Alternaria, Aspergillus, Botryodiplodia, Chaetomium, Choanephora, Cladosporium, Colletotrichum, Curvularia, Diaporthe, Drechslera, Fusarium, Lasiodiplodia, Macrophomina, Myrothecium, Nigrospora, Nodulisporium, Penicillium, Phoma, Phomopsis, Rhizoctonia, Rhizopus, Trichoderma, Zygosporium</i>
fazol	<i>Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Chaetomium, Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Rhizopus, Trichothecium</i>
cizrna	<i>Absidia, Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Cladosporium, Cochliobolus, Curvularia, Fusarium, Macrophomina, Microascus, Mucor, Myrothecium, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phoma, Rhizoctonia, Rhizopus, Syncephalastrum, Talaromyces, Thamnidium, Trichoderma, Trichothecium, Ulocladium</i>
slunečnice	<i>Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Cladosporium, Drechslera, Fusarium, Macrophomina, Rhizoctonia, Stemphylium, Ulocladium</i>
čirok	<i>Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Curvularia, Fusarium, Lasiodiplodia, Nigrospora, Phoma</i>
podzemnice olejná	<i>Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Cephalosporium, Chaetomium, Cladosporium, Curvularia, Drechslera, Fusarium, Lasiodiplodia, Macrophomina, Microascus, Mucor, Neurospora, Nigrospora, Paecilomyces, Penicillium, Phoma, Rhizoctonia, Rhizopus, Stemphylium, Syncephalastrum, Trichoderma, Trichothecium</i>
lískové ořechy	<i>Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Penicillium</i>
vlašské ořechy	<i>Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Rhizopus, Trichothecium</i>
řepka	<i>Alternaria, Arthrinium, Botrytis, Cladosporium, Epicoccum, Fusarium, Gonatobotrys, Penicillium, Rhizopus, Sclerotinia</i>

řepice	<i>Alternaria, Arthrinium, Botrytis, Cladosporium, Epicoccum, Fusarium, Gonatobotrys, Penicillium, Rhizopus, Sclerotinia, Stemphylium</i>
len	<i>Alternaria, Arthrinium, Botrytis, Cladosporium, Epicoccum, Fusarium, Gonatobotrys, Penicillium, Polyspora, Rhizopus, Stemphylium</i>
světlice	<i>Alternaria, Arthrinium, Botrytis, Cladosporium, Epicoccum, Fusarium, Gonatobotrys, Rhizopus, Penicillium, Stemphylium</i>

V dostupných zdrojích nebyla k dispozici žádná studie zaměřená výhradně na problematiku polních hub osidlujících semena máku setého. Pouze okrajově je toto téma zmíněno v několika publikacích (Hubert et al. 2003; Hubert et al. 2004; Leichtfried et al. 2004, Richardson 1990, Stejskal et al. 2002). V těchto studiích byly ze semen uskladněného máku izolovány houby z rodu *Alternaria*, *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. versicolor*), *Botrytis* (*B. cinerea*), *Cladosporium* (*C. herbarum*), *Dendryphon* (*D. penicillatum*), *Eupenicillium*, *Eurotium* (*E. repens*), *Fusarium* (*F. acuminatum*), *Mucor* (*M. dimorphosporus f. dimorphosporus*), *Penicillium* (*P. crustosum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum*), *Phoma* (*P. rhoeadis*) a *Scopulariopsis* (*S. brevicaulis*, *S. brumptii*).

3.8. Charakteristika izolovaných hub ze semen máku

Následující přehled je věnován houbám, které byly v rámci této diplomové práce zaznamenány. Každý příslušný rod je stručně popsán a jsou u něj uvedeny nejčastější substráty, na nichž byly příslušné druhy hub v minulosti nalezeny. Popsané rody jsou anamorfními stádii, tedy nepohlavními stádii hub, ke kterým je v rámci popisu uvedeno pohlavní stádium, tedy teleomorfa. U charakteristiky druhů hub jsou zmíněny především takové substráty, které mohou určitým způsobem se semeny máku, jakožto zkoumaným materiálem a zároveň substrátem, souviset.

3.8.1. Rod *Alternaria*

V současné době rod *Alternaria* zahrnuje 299 celosvětově rozšířených druhů, které náleží k teleomorfnímu rodu *Lewia* (Kirk et al 2008).

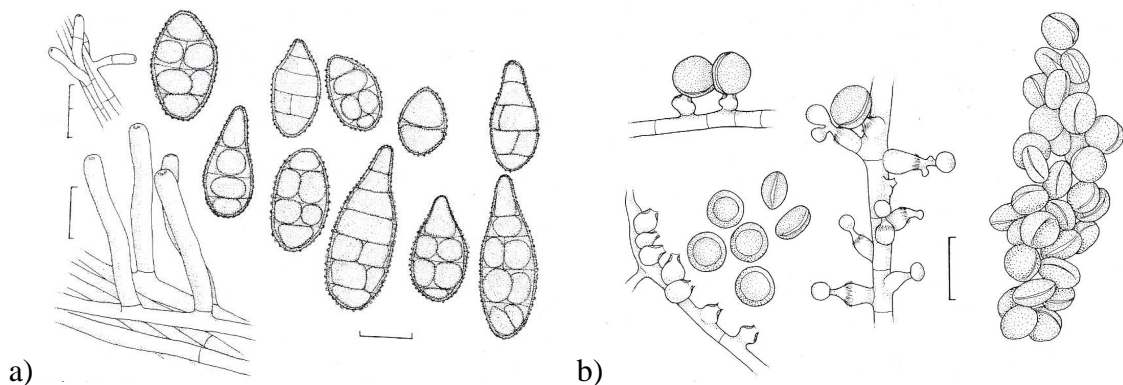
Z morfologického hlediska představuje nejvýraznější strukturu tohoto rodu konidie (nepohlavní spora). Konidie jsou velké (makrokonidie), tlustostěnné, tmavě pigmentované s příčnými a podélnými přepážkami (viz Obr. 2a). Obecně se tento typ konidií označuje jako zdřovitý (muriformní) (Domsch et al. 1980).

Rod *Alternaria* je kosmopolitně rozšířený rod zahrnující celou řadu půdních a fytopatogenních zástupců, jejichž nálezy jsou dokumentovány také z vlny, dřeva, opadu a jiných substrátů rostlinného původu. Jen výjimečně jsou některé druhy spojovány s patogenními jevy u lidí a u zvířat. Kromě toho se s druhy rodu *Alternaria* lze běžně setkat na zemědělských plodinách a na potravinách, ze kterých lze uvést obiloviny (pšenice, ječmen, kukuřice, rýže, čirok), zeleninu (rajčata, květák, okurka, meloun), ovoce (banány), luštěniny (fazole, hrášek), brambory, arašídy, ořechy (pekanové, lískové), koření, maso (sušené, chlazené, mražené) a mnoho dalších (Chełkowski 1991, Pitt & Hocking 1997).

Někteří zástupci rodu *Alternaria* jsou potenciálními producenty mykotoxinů, z nichž lze je jmenovat např. alternariol, alternariol monomethyl ether, altertoxin či kyselinu tenuazonovou (Malíř et al. 2003).

- *A. alternata*

A. alternata (viz 9. Příloha – Obr. 10) je nejběžnějším druhem rodu *Alternaria*, který byl izolován z celé řady substrátů. Tento kosmopolitně rozšířený druh se jako saprofyt vyskytuje v půdě, na rostlinných zbytcích, v kompostu, ve slané vodě, na potravinách, na textiliích a na dalších živných zdrojích. Vedle toho je *A. alternata* druhem, který napadá nejen celou řadu rostlinných druhů, ale v případě snížené imunity může vyvolat onemocnění i u člověka (Hatta et al. 2002, Acland et al. 1998, Domsch et al., 1980).



Obr. 2: a) konidiofory a konidie houby *A. alternata*, b) konidiofory s konidiogenními buňkami a konidii druhu *A. arundinis* (převzato z Domsch et al. 1980)

3.8.2. Rod *Arthrimum*

Do rodu *Arthrimum* v současnosti patří přibližně 31 druhů hojně rozšířených především v temperátních oblastech. Tento rod náleží k teleomorfnímu rodu *Apiospora* (Kirk et al 2008).

Zástupci rodu vytvářejí přehrádkovaný konidiofor (hyfa hub specializovaná k produkci nepohlavních konidií), z něhož vyrůstají krátké či podlouhlé konidiogenní buňky (buňky specializované k produkci konidií). Z těchto konidiogenních buněk vznikají světle hnědé, čočkovité konidie s výraznou ekvatoriální zárodečnou štěrbinou, viz Obr. 2b (Domsch et al. 1980).

Do tohoto rodu náleží druhy, které byly izolovány z odumřelého rostlinného materiálu a z půdy. Dále byl ojediněle jejich výskyt zjištěn i na potravinách. Produkce mykotoxinů nebyla u rodu *Arthrimum* dosud prokázána (Domsch et al. 1980, Pitt & Hocking 1997).

- *A. arundinis*

Místem výskytu druhu *A. arundinis* (teleomorfa: *Apiospora montagnei*) jsou rostlinné zbytky, shnilé dřevo, tlející tráva, sláma, hnůj a půda. Vedle toho byl tento druh zjištěn i na semenech ječmene, ovsa, kukuřice, rýže, hrachu, salátu a melounu. Jedná se o houbu, která přetrvává na povrchu substrátu bez prorůstání mycelia do jeho vnitřku (Domsch et al. 1980).

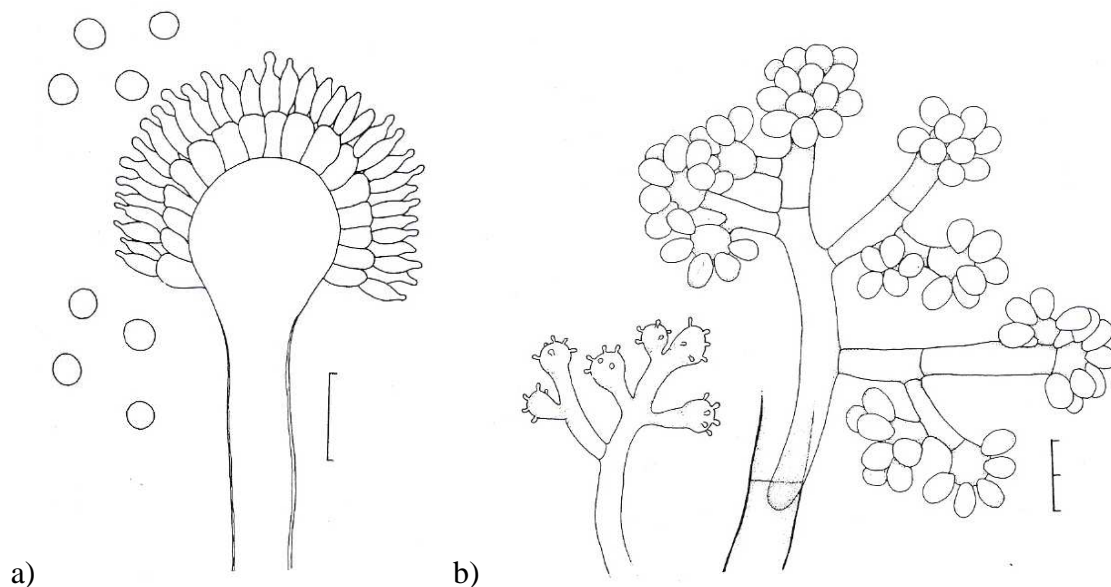
3.8.3. Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* zahrnuje asi 266 kosmopolitně rozšířených druhů, které náleží k několika teleomorfním rodům, *Emericella*, *Eurotium* a *Neosartorya* (Kirk et al. 2008).

Charakteristickým útvarem tohoto rodu je konidiofor, který je zakončený rozšiřujícím se hlavicovitým měchýřkem. Morfologicky tento útvar připomíná kropítko, odčehož je odvozen český název „kropidlák“. Měchýřek je po celém svém povrchu nebo jen na části pokryt konidiogenními buňkami, v tomto případě označovanými jako fialidy (konidiogenní buňky lahvicovitého tvaru). Fialidy mohou vyrůstat buď v jedné řadě (unisériální uspořádání) nebo ve dvou řadách nad sebou (bisériální uspořádání). Ze zúženého krčku fialid jsou produkovány konidie kulovitého či elipsovitého tvaru (viz Obr. 3a). Konidie mezi sebou bývají propojeny přes konektivy (plasmatickými můstky) do řetízků. Některé druhy vedle tohoto nepohlavního stádia na témže substrátu vytvářejí i pohlavní stádium ve formě kulovitých plodniček (Malíř et al. 2003).

Se zástupci tohoto rodu se lze běžně setkat v půdě, ovšem spíše teplejšího klimatu, dále na rozkládajícím se rostlinném materiálu, v kompostu, v obilních skladech, na kulturních plodinách, na potravinách, na pískovištích, v odpadních vodách a na mnoha dalších substrátech. Z kulturních plodin a potravin lze jmenovat obiloviny (čirok, ječmen, kukuřice, laskavec, pšenice, rýže, oves), produkty vyrobené z obilovin, luštěniny (sója, hrách, fazole), arašídy, ořechy (pistáciové, pekanové, kešu, kokosové, lískové, vlašské), ovoce (švestky, jahody, citrusy, ananas, granátová jablka, meloun, fíky, mango), zeleninu (rajčata), džemy, ovocné džusy, kakaové boby, koření, sýr, maso, masné výrobky či uzeniny (Domsch et al. 1980, Pitt & Hocking 1997, Raper & Fennell 1965).

Velký problém představují zejména potenciálně toxinogenní druhy, které mohou do svého okolí, tedy i do substrátu jako jsou zemědělské plodiny a potraviny, produkovat mykotoxiny, jež mohou u člověka a u zvířat vyvolávat závažné mykotoxikózy, tzv. aspergilózy (Domsch et al. 1980, Malíř et al. 2003, Pitt & Hocking 1997, Raper & Fennell 1965). Mezi nejvýznamnější mykotoxiny patří aflatoxiny, ochratoxiny, patulin, sterigmatocystin, kyselina cyklopiazonová. Jeden z aflatoxinů, konkrétně aflatoxin B₁, je uváděn jakožto nejsilnější známý přírodní karcinogen (Betina 1990).



Obr. 3: a) Biseriální konidiofor ukončený měchýřkem s fialidami a konidiiem rodu *Aspergillus*, b) Konidiofor se stopečkatými konidiogenními buňkami a konidiiem druhu *B. cinerea* (převzato z Domsch et al. 1980)

3.8.4. Rod *Botrytis*

Do hojně rozšířeného rodu *Botrytis* patří přibližně 54 druhů, které náležejí k teleomorfnímu rodu *Botryotinia* (Kirk et al. 2008).

Rod *Botrytis* se vyznačuje tvorbou vzpřímených konidioforů, které se apikálně opakovaně střídavě větví. Na konci větví se nacházejí zduřelé konidiogenní buňky, na jejichž povrchu jdou drobné stopečky, odkud vyrůstají konidie (viz Obr. 3b). Světle hnědě zbarvené, hladké konidie nabývají kulovitěho, oválného až elipsovitého tvaru (Domsch et al. 1980).

Zástupci tohoto rodu byli popsáni z půdy, dětských pískovišť, ze sena, z čistírenských kalů, z papírových výrobků, textilií či z potravin. Kromě toho jsou zástupci rodu *Botrytis* významnými patogeny kulturních plodin. Velmi citlivé k infekci je drobné ovoce, zelenina, cibule a česnek. K napadení může dojít jak na poli, tak v průběhu sklizně či posklizňově. Produkce mykotoxinů nebyla prokázána (Domsch et al. 1980, Pitt & Hocking 1997).

- ***B. cinerea***

Druh *B. cinerea* je významným polyfágním patogenem celé řady rostlinných druhů. Tento druh je původcem onemocnění ovoce (hroznové víno, jablka, hrušky, jahody, maliny, ostružiny), zeleniny (brukvovitá zelenina, listová zelenina, cibule, česnek, rajčata, papriky, okurky), luskovin (fazole, hrách), olejnin (řepka, slunečnice, mák), lnu a dalších. Kromě toho byla tato houba izolovaná z celé řady potravin. Hojný výskyt houby byl zaznamenán i na pařezech čerstvě poražených stromů (Pitt & Hocking 1997, Rayner 1977).

3.8.5. Rod *Cladosporium*

Do rodu *Cladosporium* spadá přibližně 150 druhů, které patří k teleomorfnímu rodu *Davidiella* (Kirk et al. 2008).

Konidiofory rodu *Cladosporium* jsou většinou nevětvené, na konci kolénkatě zprohýbané. Z konců konidioforů pučí konidie, kde z každé nově vypučené konidie pučí další nová, čímž na konidioforech vznikají řetízky, které se mohou ještě dále větvit. Konidie nepravidelného tvaru mohou být jednobuněčné až trojbuněčné (Bensch et al. 2010).

Tento rod zahrnuje saprofytní zástupce, kteří kontaminují řadu substrátů včetně potravin, a mohou mimo jiné napadat i některé druhy kulturních plodin. Zástupci tohoto rodu byli nalezeni na obilovinách (ječmen, pšenice, kukuřice, rýže), zelenině, ovoci (banány, broskve, maliny, meloun, jablka, švestky, třešně, višně, nektarinky), sóje, ořechách (lískové, vlašské, pekanové, kešu), arašídech, mase (čerstvé i mražené), masných výrobcích a sýrech (Malíř et al. 2003, Pitt & Hocking 1997). Mimoto je rod *Cladosporium* známým fytopatogenním rodem, který může výjimečně parazitovat i na člověku (Yegres et al. 1991). Mnohé druhy rodu *Cladosporium* byly izolovány z půdy, z opadu, z povrchu kořenů, ze znečištěných vod, ze dřeva a dalších substrátů (Crous et al. 2007, Domsch et al. 1980).

Produkce mykotoxinů nebyla u tohoto rodu zjištěna (Pitt & Hocking 1997).

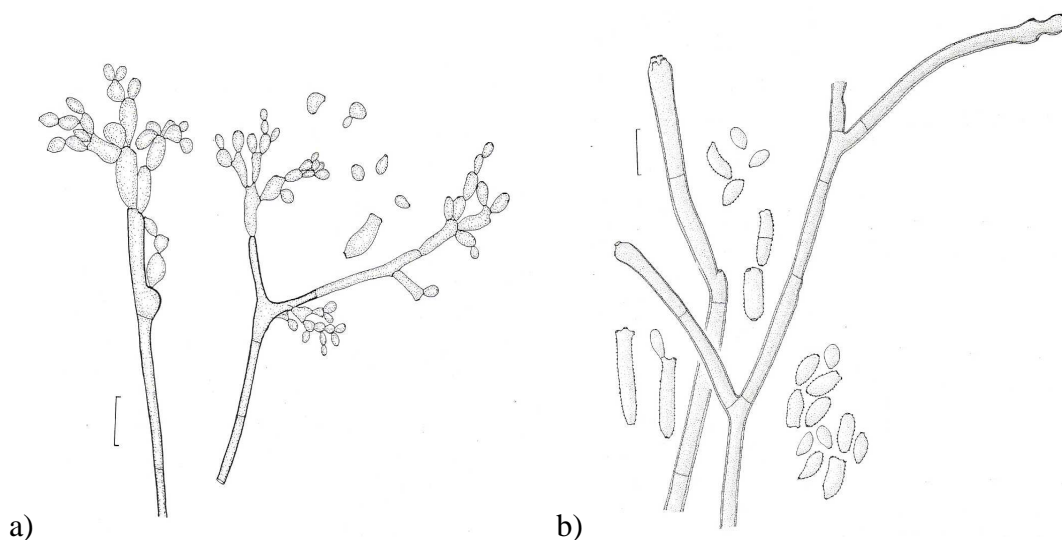
- ***C. cladosporioides***

Tento druh se vyznačuje saprofytním i parazitickým způsobem života. Jedná se o velmi běžnou kontaminantu, jejíž spory jsou vzhledem k velikosti snadno roznášeny větrem. *C. cladosporioides* (viz 9. Příloha – Obr. 9) byl izolován ze širokého spektra

substrátů včetně potravin. Konkrétně lze uvést půdu, organické zbytky, kompost, odpadní kaly, buničinu, ptačí hnízda, peří, dále uskladněné obiloviny (ječmen, pšenice, oves, žito), zeleninu, ořechy (lískové a vlašské), luskoviny (hrách, fazol), len, slunečnici, řepku, méně ovoce. Vedle toho se *C. cladosporioides* podílí na kažení sýrů a masa. Tento druh je známý také jako původce onemocnění rostlin a člověka (Gubler et al. 1999, Chen et al. 2009, Pitt & Hocking 1997, Van den Berg et al. 2008, Vieira et al. 2001).

- *C. herbarum*

Celosvětově rozšířený druh *C. herbarum* (viz Obr. 4b) se stejně jako výše zmíněný *C. cladosporioides* (viz Obr. 4a) vyznačuje jak saprofytním, tak parazitickým způsobem života a představuje také velmi běžnou kontaminantu. Tento druh se často vyskytuje na odumřelém rostlinném materiálu a v půdě, dále byl izolován z koryt řek, mořské vody, ptačích hnízd, peří, včelích pláství, z vlhké omítky, ze skladových prostor a dalších. Mnohdy se tento druh nachází také na čerstvém ovoci (jablka, nektarinky, meruňky, broskve, švestky, třešně), mase (čerstvém i mraženém), na obilnách zrnech (zejména pšeničných), potom také na ořechách a na luštěninách (Berner et al. 2007, Domsch et al. 1980, Pitt & Hocking 1997, Wei et al. 2001).



Obr.4: a) Proliferující konidiofory s konidii druhu *C. cladosporioides*, b) Konidiofory s konidii druhu *C. herbarum* (převzato z Domsch et al. 1980)

3.8.6. Rod *Dendryphion*

Teleomorfa polyfyletického, obecně hojně rozšířeného rodu *Dendryphion* spadá do čeledi *Pleosporaceae* (Kirk et al 2008).

Rod *Dendryphion* se vyznačuje tvorbou vzpřímených, tmavých, apikálně větvených konidioforů. Konidie vyrůstají z jizev konidiogenních buněk, jsou tmavé, vícebuněčné a mají cylindrický tvar s oblými konci. Konidie mohou vyrůstat buď jednotlivě, nebo v akropetálních (nejmladší konidie je na vrcholu) řetězcích (viz Obr. 5a). Tyto konidie jsou označovány jako vmezeřené (Domsch et al. 1980).

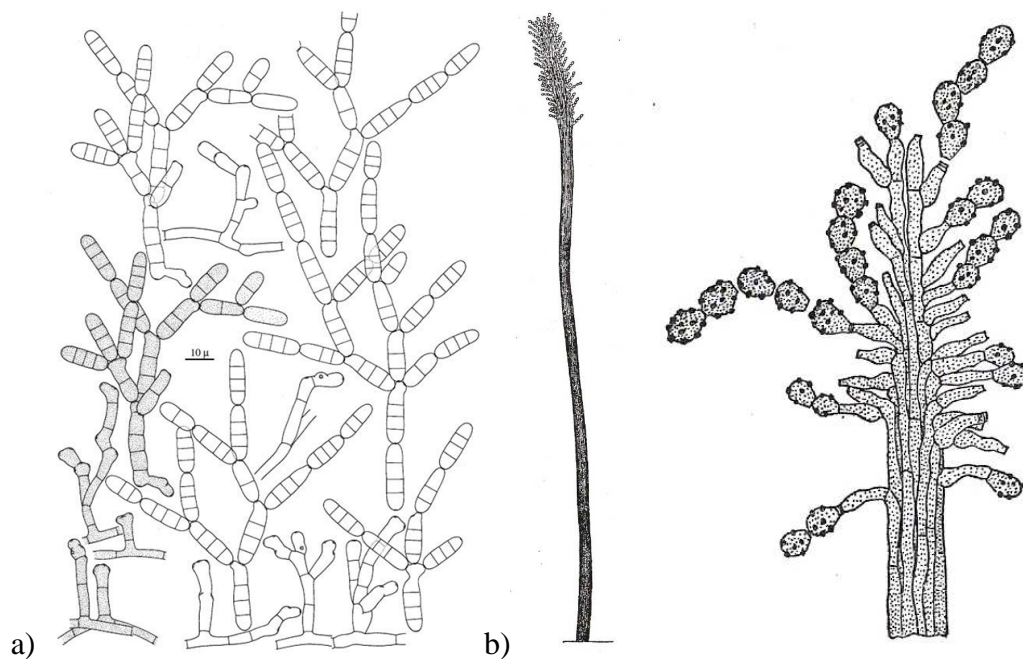
Zástupci tohoto rodu jsou jednak saprofyté, jednak parazité. Vyskytují se na odumřelých rostlinných zbytcích, včetně dřeva, na semenech pěstovaných trav, na kořenech obilnin a jiných rostlin a jen vzácně v půdě. Kromě toho do rodu *Dendryphion* spadají fytopatogenní druhy způsobující onemocnění kulturních plodin (Domsch et al. 1980, Ellis & Ellis 1984).

- *D. papaveris* (syn. *Brachycladium papaveris*)

D. papaveris (viz 9. Příloha – Obr. 14) se velmi podobá druhu *D. penicillatum*. Oba tyto druhy se od sebe liší nejen na základě molekulárních dat, ale také na základě morfologických znaků. Jedním z hlavních morfologických rozdílů je absence mikrosklerocií (tvrdých sterilních útvarů tvořených pevně spletenými hyfami) a makrokonidioforů u *D. papaveris*, zatímco u druhu *D. penicillatum* je tvorba těchto útvarů běžná. Mezi další rozdíly patří tvorba chlamydospor, která je pro *P. papaveris* typická. Další rozdíly v parametrech struktur obou druhů jsou uvedeny v publikaci Inderbitzin et al. 2006. Uvedená studie uvádí výskyt *D. papaveris* na semenech máku setého.

- *D. penicillatum* (syn. *Brachycladium penicillatum*)

Ještě v nedávné době nebyla taxonomie tohoto druhu zcela objasněna. Studie Inderbitzin et al. (2006) se touto problematikou zabývala a na základě morfologických a molekulárních dat zavedla pro anamorfní druh *D. penicillatum* a s ním spojenou teleomorfu *Pleospora papaveracea* nový rod *Crivellia*, konkrétně druh *C. papaveracea*. Tento druh byl izolován z rostlin máku setého, ze semen a z klíčnicích rostlin rodu *Papaver* (Inderbitzin et al. 2006, O'Neill et al. 2000).



Obr. 5: a) Konidiofor s konidiiemi druhu *D. penicillatum* (převzato z www.mycobank.org), b) Synnema a detail „hlavy“ synnematu s konidiogenními buňkami a konidiiemi druhu *D. nanus* (převzato z Ellis 1971)

3.8.7. Rod *Doratomyces*

Všeobecně rozšířený rod *Doratomyces* náleží k teleomorfě z čeledi *Microascaceae* (Kirk et al. 2008).

Charakteristickým rysem rodu *Doratomyces* je tvorba tmavých synnemat (svazky konidioforů). Při vrcholu se konidiofory větví a vytváří jakousi „hlavu“ synnematu. Konidiogenní buňky produkují jednobuněčné, často se řetězíci konidie, jejichž tvar je, v závislosti na druhu, kulovitý, oválný či vejčitý, na bázi jakoby seříznutý, viz Obr. 5b (Domsch et al. 1980).

Běžným místem výskytu druhů rodu *Doratomyces* je rozkládající se rostlinný materiál, hnůj, méně i půda (Domsch et al. 1980, Ellis & Ellis 1984, Kuthubutheen & Webster 1986).

- *D. nanus*

Druh *D. nanus* (viz 9. Příloha – Obr. 12) byl nalezen na odumřelém dřevě, kůře stromů, listech, rostlinných stoncích, v hnoji a na exkrementech (Ellis 1971, Kuthubutheen & Webster 1986).

3.8.8. Rod *Epicoccum*

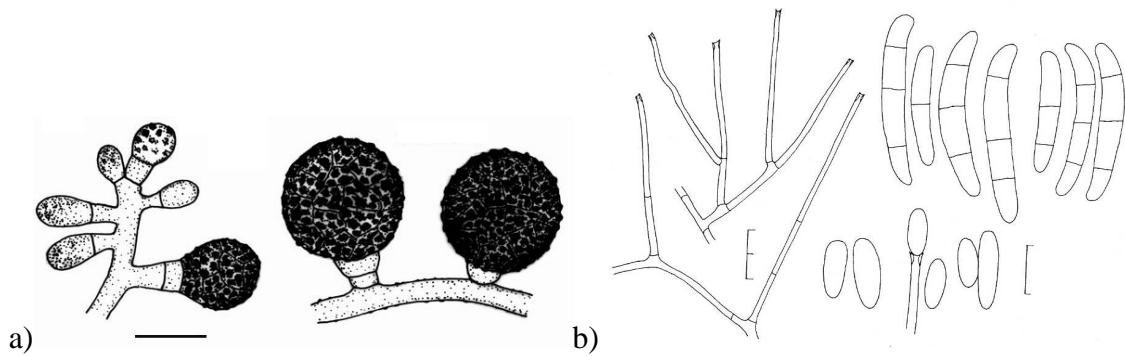
Teleomorfa celosvětově rozšířeného rodu *Epicoccum* přísluší do čeledi *Pleosporaceae* (Kirk et al. 2008).

Výrazným morfologickým znakem tohoto rodu jsou konidie. Jednotlivě vyrůstající konidie jsou tmavé, zdřovité, přibližně kulovitého až hruškovitého tvaru, často se světlou vystupující bazální buňkou. Krátké konidiofory vyrůstají jednotlivě nebo ve shlucích, jsou většinou nevětvené, světlé a nesou nevýrazné válcovité konidiogenní buňky, viz Obr. 6a (Domsch et al. 1980).

Zástupci rodu *Epicoccum* jsou saprofyté, mohou se však podílet i na sekundárním napadání stárnuoucích pletiv rostlin. Nálezy těchto hub jsou známy z odumřelých částí mnoha rostlinných druhů, ze semen trav a obilovin, z kontaminovaného papíru a textilií, ze vzduchu, z půdy, z opadu listnatých i jehličnatých stromů, z kompostu, z mořské vody, z rybníku, ze sedimentů řek, z kanalizace, kalů, z peří a exkrementů ptáků, kromě toho byly některé druhy nalezeny na větvičkách stromů, na prýtu a kořenech rostlin (např. banánu, hrachu, fazolu, cukrové řepy, brambor, čiroku, pšenice, dýně, jahod, řepky, trav). Dále byli někteří zástupci izolováni z hmyzu a také z člověka. Běžně se vyskytují na potravinách, méně se podílí na jejich kažení (Bruton et al. 1993, Domsch et al. 1980, Pitt & Hocking 1997).

- *E. nigrum*

E. nigrum je kosmopolitně rozšířený saprofytní druh, který je mimo jiné znám také jako kontaminanta klinického materiálu. Často se vyskytuje na sušených potravinách, obilovinách (pšenice, kukuřice), ořechách, čerstvé zelenině a sóje. Kromě toho je tento druh rostlinným patogenem, který způsobuje onemocnění okurek, rajčat, jablek, hrušek či hrachu (Bruton et al. 1993, Pitt & Hocking 1997).



Obr. 6: a) Konidiofory nesoucí konidiogenní buňky s tmavými zdřovitými konidii druhu *E. nigrum* (převzato z www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/images/plisne/perokresby/), b) Konidiofory s filaidami a typické makro- a mikrokonidie rodu *Fusarium* (převzato z Domsch et al. 1980)

3.8.9. Rod *Fusarium*

Rod *Fusarium*, který patří ke dvěma teleomorfním rodům *Gibberella* a *Haematonectria*, zahrnuje zhruba 111 druhů (Kirk et al 2008).

Zástupci rodu *Fusarium* vytvářejí více či méně větvené konidiofory, které nesou protáhlé konidiogenní buňky (fialidy). Konidiofory vyrůstají z mycelia jednotlivě, volně, případně se mohou shlukovat do makroskopických útvarů. Fialidy produkují konidie ve shlucích obalených slizem nebo v řetízcích. Charakteristickým znakem tohoto rodu je produkce dvou typů konidií, které se liší jak tvarem, tak i velikostí. Mikrokonidie jsou jednobuněčné, menší a mají zpravidla oválný či široce vejčitý tvar. Makrokonidie jsou větší, dvoubuněčné nebo vícebuněčné a nabývají srpkovitého tvaru (viz Obr. 6b). Právě tvar makrokonidií dal tomuto rodu české jméno „srpovnička“. V myceliu houby se často vyskytují chlamydospory a nezřídka také plodnice (Leslie et al. 2006).

Rod *Fusarium* je celosvětově rozšířený rod, jehož nálezy jsou známy z rostlinných zbytků, kořenů, rozkládajícího se dřeva, hnoje, půdy, slanisek, rašeliny, mořské vody, vápence, a z dalšího substrátu. Kromě saprofytních zástupců zahrnuje rod *Fusarium* i druhy patogenní, které způsobují onemocnění jak rostlin, tak živočichů včetně člověka. Fytopatogenní druhy jsou známy zejména z obilnin (čirok, ječmen, kukuřice, pšenice, oves, žito, kukuřice, žitovec), dále z ovoce (ananas, banány, citrusy, hrušky, jablka a jiné nezralé či nahnilé plody), ze zeleniny (brukvovitá zelenina, česnek, melouny, rajčata, papriky, okurky), z brambor, cukrové řepy, luskovin (sójové boby, hrách, fazole), z ořechů

(lískové, vlašské, pekanové) či z arašídů (Domsch et al. 1980, Leslie et al. 2006, Malíř et al. 2003).

U tohoto rodu se můžeme setkat s produkcí mykotoxinů. Hlavní skupiny mykotoxinů, které jsou zástupci tohoto rodu produkovány, jsou fumonisiny, deoxynivalenol, zearalenon, T-2 toxin, nivalenol, neosolaniol, monoacetoxyscirpenol a další (Malíř et al. 2003, Schothorst & van Egmond 2004).

3.8.10. Rod *Penicillium*

Tento rod zahrnuje asi 304 celosvětově rozšířených druhů, které náleží ke dvěma teleomorfním rodům *Eupenicillium* a *Talaromyces* (Kirk et al. 2008).

Konidiofory tohoto rodu mohou být jak větvené, tak i nevětvené. U druhů s nejjednodušším typem konidioforu jsou na nevětveném konidioforu přímo přisedlé konidiogenní buňky (fialidy). Další druhy na nevětveném konidioforu navíc vytvářejí ještě metuly (podpůrné buňky), na něž nasedají fialidy. Některé druhy vytvářejí složitější typ konidioforu, který je větvený a jednotlivé větve nesou metuly s fialkami (viz Obr. 7a). Od morfologie konidioforu, jenž připomíná štětičky, je opět odvozen český název rodu „štětičkovec“ (Malíř et al. 2003, Raper & Thom 1949).

Zástupci tohoto rodu patří mezi nejrozšířenější mikroskopické houby mírného a teplého klimatu. Druhy rodu *Penicillium* se vyskytují v půdě, v bažinách, v ovocných sadech a na vinicích, ve znečištěných vodách, v ovzduší, v bytových prostorech, na potravinách a na mnoha dalších substrátech. Kromě saprofytních druhů tento rod zahrnuje i patogenní druhy a druhy produkující antibiotika (Brian et al. 1957, Malíř et al. 2003). Výskyt tohoto rodu na kulturních plodinách a potravinách se překrývá s výskytem rodu *Aspergillus* (Betina 1980, Domsch et al. 1980, Pitt & Hocking 1997, Raper & Thom 1949, Samson et al. 2004).

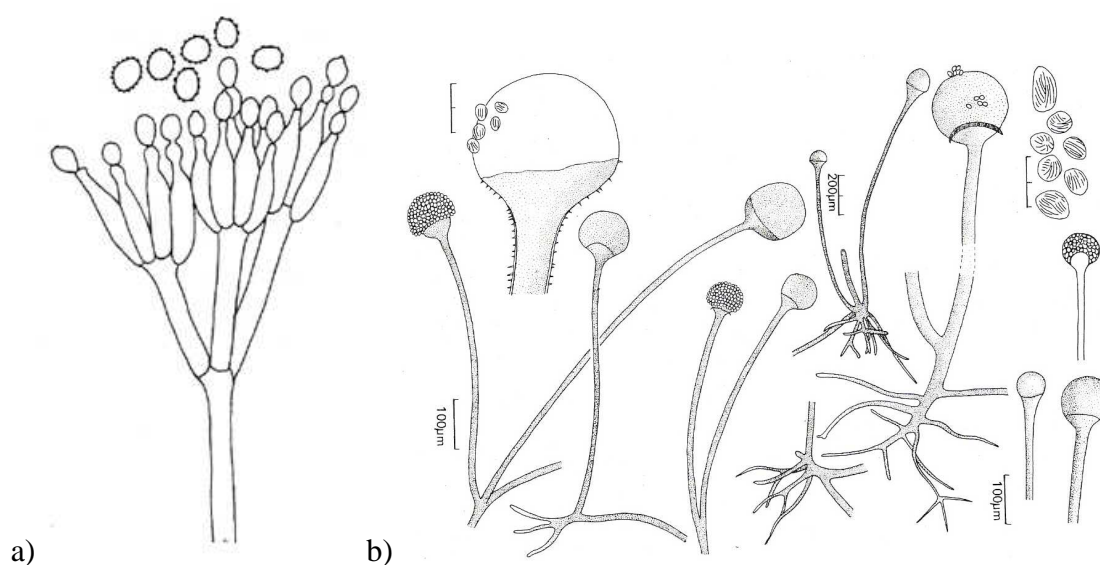
Rod *Penicillium* je známý svou schopností produkce mykotoxinů. Mezi nejvýznamnější produkované mykotoxiny patří ochratoxiny, patulin a kyselina cyklopiazonová (Malíř et al. 2003).

- ***P. expansum***

P. expansum (viz 9. Příloha – Obr. 13) je hojně rozšířeným druhem, který se nachází především na uskladněných rostlinných produktech, v menší míře také v půdě.

Z rostlinných substrátů lze jmenovat ovoce (jablka, hrušky, jahody, avokádo, grep, mango), u nichž způsobuje typickou hnilobu, dále zeleninu (mrkev, rajčata, zelí), cereálie (kukuřice, pšenice, rýže), maso, ořechy, cukrovka a mnoho dalších (Domsch et al. 1980, Chalutz et al. 1980, Khan & Dahot 2010, Lugauskas et al. 2005, Sanderson & Spotts 1995).

Tento druh je známým producentem mykotoxinů, z nichž lze jmenovat patulin, ochratoxin A, citrinin, penitrem A či rubratoxin B (Larsen & Frisvad 1998).



Obr.7: a) Konidiofor s metulami, fialidami a konidiemi rodu *Penicillium*, b) Sporangiofory s rhizoidy, sporangii a sporangiosporami druhu *R. oryzae* (převzato z Domsch et al. 1980)

3.8.11. Rod *Rhizopus*

Rod *Rhizopus*, na rozdíl od ostatních zmíněných rodů, náleží mezi spájkivé houby a zahrnuje celou řadu celosvětově rozšířených druhů (Kirk et al. 2008).

Tento rod se vyznačuje tvorbou coenocytického mycelia (mnohojaderné mycelium bez přepážek), z něhož vyrůstají sporangiofory (hyfy specializované k produkci sporangii) nesoucí sporangia (výtrusnice), která jsou vyplněna masou sporangiospor (nepohlavních spor). Pod sporangiofory vyrůstají z hyfy mycelia drobné rhizoidy, které slouží k uchycení houby k substrátu. Právě rhizoidy jsou pro tento rod jedním z charakteristických rysů (Domsch et al. 1980).

Tento rod se vyskytuje především v subtropických a tropických oblastech, ovšem výskyt v České republice není výjimečný. Zástupci tohoto rodu jsou známi z celého světa, a to z půdy, z tekoucích a znečištěných vod, z čistírenských kalů, guána, peří a mnohých dalších substrátů. Většina zástupců tohoto rodu upřednostňuje substrát bohatý na cukry (ovoce, potraviny). Ve výjimečných případech může rod *Rhizopus* parazitovat oslabené jedince člověka, u nichž potom vyvolává mukormykózy. Mukormykózy jsou řazeny k nejagresivnějším infekcím způsobených houbou, které se vyznačují velmi vysokou úmrtností infikovaných jedinců. V asijských zemích jsou některé druhy využívány v potravinářství k výrobě fermentovaných alkoholických nápojů (Domsch et al. 1980, Malíř et al. 2003, Pitt & Hocking 1997).

První mykotoxin, který byl izolován ze spájkivých hub, je rhizonin. Jak se však v nedávné době ukázalo, za produkci tohoto toxinu není zodpovědná houba (*Rhizopus microsporus*), jak se předpokládalo, nýbrž jeho endosymbiotická bakterie rodu *Burkholderia* (Partida-Martinez et al. 2007).

- ***R. oryzae***

Druh *R. oryzae* (viz 9. Příloha – Obr. 11) se vyskytuje především v tropických a subtropických oblastech. Tato houba byla izolována z rozkládajícího se rostlinného materiálu, z lodyh stárnoucích trav a povrchu kořenů, z půdy, z čistírenských kalů, z tekoucích i ze znečištěných vod, ptáčích hnízd a peří, z celé řady potravin, např. z burských oříšků, lískových oříšků, kukuřice, fazolí, čiroku, vigny, pšenice, ječmene či brambor (Adisa 1986, Domsch et al. 1980, Flannigan 1970, Pitt & Hocking 1997, Sahin & Kalyoncuoglu 1994). Kromě toho je *R. oryzae* původcem závažných mukormykóz člověka (Bauer et al. 1955, Scheven von et al. 2011, Winkler et al. 1996).

3.8.12. Rod *Verticillium*

Hojně rozšířený rod *Verticillium* náleží k teleomorfě z čeledi *Plectosphaerellaceae* (Kirk et al. 2008).

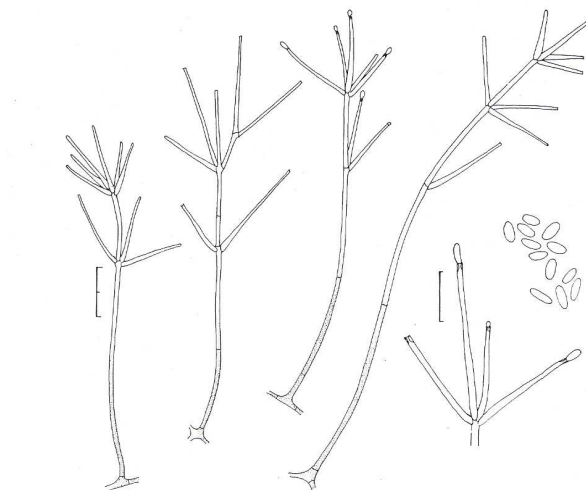
Tento rod se vyznačuje světlým vegetativním myceliem, ze kterého vyrůstají vzpřímené, přeslenitě větvené konidiofory nesoucí podlouhlé konidiogenní buňky typu fialid. Tyto fialidy produkují světlé či lehce zbarvené, většinou jednobuněčné konidie.

Konidie jsou produkovány buď ve slizovitých svazcích, nebo výjimečně v řetízcích, tvar je variabilní v závislosti na druhu (Domsch et al. 1980).

Rod *Verticillium* zahrnuje četné množství saprofytních druhů a několik fytopatogenních druhů, které způsobují onemocnění vodivých pletiv kulturních rostlin. S těmito houbami je možné se setkat v půdě, na odumřelém rostlinném materiálu, na potravinách a také na celé řadě hostitelských rostlin (Domsch et al. 1980, Nazar et al. 1991).

- *V. albo-atrum*

V. albo-atrum (viz Obr. 8) je společně s *V. dahliae* hlavním půdním fytopatogenním druhem z rodu *Verticillium*. Tato houba je původcem vadnutí celé řady rostlin, nevyjímaje kulturní plodiny a plevele. Z hostitelských rostlin lze jmenovat např. brambor, chmel, rajčata, vojtěšku, řepku, také jahodník, maliník, vičenec ligrus, fazol, hrách, jetel, okurku, lilek, muškát, mák nahoprutý, chryzantémy, astry, tabák, růže, javor, broskvoň, mandloň, slivoň, meruňku a mnoho dalších. *V. albo-atrum* je tedy polyfágním, druhově nespecifickým patogenem různých rostlinných druhů (Correll et al. 1988, Domsch et al. 1980, Nazar et al. 1991, Radišek et al. 2003, Smith 1965).



Obr. 8: Přeslenovité konidiofory s fialidami a konidii druhu *V. albo-atrum* (převzato z Domsch et al. 1980)

3.9. Metody izolace patogenů ze semen

Metody používané k detekci hub osidlujících semena máku se dělí na dvě skupiny. První skupinou jsou metody přímé detekce („direct inspection“) a druhou skupinou jsou metody inkubační („incubation methods“). Metody přímé detekce jsou takové metody, při nichž jsou semena třepána ve vodě obsahující smáčedla nebo v alkoholu a vzniklá suspenze je přímo zkoumána pod mikroskopem na přítomnost houbových propagulí. Tato metoda slouží k identifikaci hub přítomných pouze na povrchu semene a nemá tedy vypovídací hodnotu o tom, jaké houby osidlují vnitřek semen. Do metod inkubačních jsou řazeny tři standardní metody, a to metoda inkubace semen na agarových plotnách („agar testing“), metoda inkubace semen ve vlhkých komůrkách („blotter testing“) a metoda barvicí („staining method“) (Maude 1996).

Principem metody agarových ploten je inkubace semen na agarovém médiu v Petriho misce. Agarovým médiem bývá PDA (Potato Dextrose Agar), MEA (Malt Extract Agar) či jiné médium vhodné pro růst žádoucích druhů hub. Tato metoda indikuje přítomnost životaschopných propagulí saprotrofních i patogenních hub, které mohou semeno osidlovat. Inkubace semen se standardně provádí po dobu 7 dní při teplotě 20 °C. Druhá běžně používaná metoda vlhkých komůrek je založena na inkubaci semen na vlhkém savém papíru ve větší Petriho misce standardně při teplotě 20 °C po dobu 7 dní. Při této metodě je možné detekovat houby způsobující onemocnění semen nebo klíčnicích rostlin. V průběhu barvicí metody jsou semena vystavena působení 5 % roztoku hydroxidu sodného (NaOH) po dobu 24h při teplotě 20 °C a následně přečištěna laktofenolem. Poté jsou embrya semen prohlížena pod mikroskopem na přítomnost zlatohnědého mycelia hub (Maude 1996). Zředovací metoda („dilution plate method“) je obdobou metod přímé detekce a agarových ploten. V tomto případě jsou semena třepána ve sterilní destilované vodě, ale vzniklá suspenze není přímo pozorována pod mikroskopem, ale je vyseta na agarovou plotnu, kde probíhá vlastní kultivace hub (Alwakeer & Nasser 2011). Obměny standardních detekčních metod závisí na tom, jaký typ hub má být testován (Maude 1996).

Houby z povrchu semen bývají testovány metodou přímé detekce nebo inkubací semen na agarových plotnách anebo zředovací metodou. Pro houby osidlující vnitřek semene se používá metoda inkubace hub ve vlhkých komůrkách, případně metoda inkubace semen na agarových plotnách za předpokladu povrchové sterilizace semen.

Barvicí metoda je používána pro detekci hub, které nelze kultivovat ani jednou z předchozích metod, např. snětí (Alwakeel & Nasser 2011, Maude 1996).

Ve většině dostupných studií je k detekci hub osidlujících semena běžně používána metoda inkubace semen na agarových plotnách (Alwakeel & Nasser 2011, Dawar et al. 2007, Leichtfried et al. 2004, Medić-Pap et al. 2007, Nasir 2003, Nik 1980, Petrie 1974, Rothe & Wadekar 2011, Singh et al. 2011) a metoda inkubace semen ve vlhkých komůrkách (Begum et al. 2004, Dawar et al. 2007, Elwakil et al. 2007, Nik 1980, Nik & Parbery 1977, Nwachukwu & Umechuruba 2011, Petrie 1974, Rothe & Wadekar 2011, Singh et al. 2011). Další, avšak méně používanou metodou, je zřed'ovací metoda (Alwakeel & Nasser 2011, Hubert et al. 2003, Youssef et al. 2008).

Při zmíněných metodách detekce hub osidlujících semena kulturních plodin je z testovaného vzorku pro oplach nebo kultivaci odebráno určité množství semen. V dostupných studiích je za tímto účelem použito 60 (Alwakeel & Nasser 2011), 100 (Medić-Pap et al. 2007, Petrie 1974, Rothe & Wadekar 2011, Youssef et al. 2008), 200 (Basak & Lee 2002, Begum et al. 2004, Elwakil et al. 2007, Nik 1980) a 400 semen (Dawar et al. 2007).

3.10. Molekulárně biologické metody determinace hub

Aby bylo možné získat určitou sekvenci DNA, je zapotřebí nejprve vyizolovat příslušnou DNA z živého mycelia houby, následně potřebný úsek DNA amplifikovat pomocí PCR (Polymerase Chain Reaction) a nakonec získaný PCR produkt přečistit a osekvenovat.

Jednou z možných metod pro izolaci a následnou PCR je metoda tzv. jednobuněčné PCR, kdy stačí použít jen několik buněk daného jedince k získání PCR produktu a následné sekvenci amplifikované části DNA (Hans et al. 2000).

Amplifikace žádoucí sekvence DNA je umožněna metodou PCR. Nezbytným prvkem pro uskutečnění PCR je templátová DNA (DNA houby), dále DNA polymeráza, primery umožňující nasednutí DNA polymerázy na templát a zároveň ohraničující vybraný úsek DNA, dNTPs (deoxynukleotidtrifosfáty), což jsou stavební kameny pro nově vznikající řetězce DNA, pufr upravující chemické prostředí reakce a destilovaná voda. Směs těchto látek je vystavena střídání teplot v přístroji zvaném termocykler, kde dochází ke třem hlavním fázím. První fází je denaturace, kdy se rozplétají řetězce DNA, druhou

fází je annealing, kdy primery nasedají na specifická místa DNA, po jejich nasednutí nasedá i DNA polymeráza, a třetí hlavní fází je elongace, tedy vlastní syntéza DNA. Tyto fáze se opakují v několika cyklech, čímž dochází k mnohonásobné amplifikaci daného úseku DNA (Mullis & Faloona 1987).

4. Materiál a metody

4.1. Odběr vzorků semen

Semena máku setého použítá k vypracování této práce pocházela ze dvou odlišných lokalit.

První lokalitou byla plocha ekologicky pěstovaného máku v roce 2009 na ekologické farmě v Budyni nad Ohří, okres Litoměřice. Zájmové území patří do teplé až mírně suché oblasti. Léto je dlouhé, suché, teplé, s velmi krátkým přechodným obdobím. Jaro a podzim jsou teplé až mírně teplé. Zima je krátká, mírně teplá, suchá až velmi suchá, s velmi krátkým trváním sněhové pokrývky. Průměrná roční teplota je 8,5 °C. Nejvyšší průměrná teplota je v červenci (14,8 °C) a nejnižší je v lednu (-2, -3 °C). Průměrný roční úhrn srážek činí 555 mm. Nejvíce jich spadne ve vegetačním období (340 mm). Lokalita se nachází ve srážkovém stínu Krušných hor a patří do řepařské a obilnářské výrobní oblasti s rovinatým, mírně zvlněným až svažitém terénem. Nadmořská výška se pohybuje v rozmezí 250 – 600 m. Půda zájmového pozemku je hnědozem.

Na uvedené lokalitě byl založen porost máku odrůdy Major o celkové rozloze 10 ha. Vzhledem k ekologickému hospodaření nebyl porost pesticidně ošetřen. Z dané plochy bylo před sklizní náhodně odebráno 10 vzorků makovic, které byly označeny jako opakování 1-37 Bud, 2 Bud, 4 Bud, 5 Bud, 6 Bud, 8 Bud, 9 Bud, 10 Bud, 11 Bud a 12 Bud. Každé opakování mělo 10 makovic.

Druhou lokalitou byla Výzkumná stanice FAPPZ ČZU v Praze v Červeném Újezdě. Stanice se nachází na hranici okresů Praha-západ a Kladno. Tato lokalita spadá do oblasti mírně teplé, klimatického okrsku mírně suchého, s převážně mírnou zimou. Průměrná roční teplota vzduchu činí 6,9 °C. Průměrná teplota ve vegetačním období (1.4. - 30.9.) je 12,9 °C a průměrná teplota ve vegetačním klidu (1.12. - 28.2.) činí -2,2 °C. Úhrn srážek za toto období je 53 mm. Délka vegetačního období činí 150-160 dní. Průměrný roční úhrn srážek je 549 mm a průměrný vegetační úhrn srážek je roven 361 mm. Půdy jsou středně těžké. Půda zájmového pozemku je hnědozem.

Na této lokalitě byly v roce 2010 založeny pokusy, které měly také kontrolní (pesticidně neošetřené) varinty. Každá varianta měla čtyři opakování, každé opakování bylo o rozloze 10 m². Vysety byly odrůdy Major a Maraton. Protože cílem práce bylo zjistit druhy mikroskopických hub, které osidlují semena (bez ohledu na odrůdu), byly pro

odběr vzorků použity neošetřené (kontrolní) varianty pokusů. Z každého opakování bylo odebráno 10 makovic, ze semen byl získán směsný vzorek. Ten byl použit pro vlastní práci (opakování 1CU).

V obou případech byly v laboratoři Katedry ochrany rostlin FAPPZ ČZU v Praze makovice mechanicky rozlomeny a semena máku následně vysypána do sterilních uzavíratelných polyetylenových sáčků. Každý sáček byl označen příslušným kódem opakování. V další fázi byly sáčky převezeny do mykologické laboratoře Katedry botaniky PřF UK v Praze, kde byly vzorky semen dále zpracovávány.

4.2. Inkubace semen a hub

Ke zjištění přítomnosti mikroskopických hub osidlujících semena máku byly na základě literárních zdrojů použity dvě metody, a to inkubace semen ve vlhkých komůrkách a inkubace semen na agarových plotnách (viz 5.9. Metody izolace patogenů ze semen) Z každého opakování (celkem 11) bylo odebráno 100 semen pro kultivaci ve vlhkých komůrkách a 100 semen pro kultivaci na agarových plotnách.

Vlhké komůrky představují systém, jehož základem je velká Petriho miska, v tomto případě skleněná s průměrem dna 14 cm. Na dno Petriho misky byla umístěna polypropylenová mřížka (velikost ok 2 mm, tloušťka mřížky 1,3 mm), ta byla překryta vrstvou buničité vaty a na ní byl ještě položen filtrační papír (vše ve tvaru kruhu o průměru 13,5 cm). Petriho miska byla potom zabalena do alobalu a sterilizována v autoklávu (125 kPa, 121 °C, 20 min). Po vysterilizování byla zabalená Petriho miska přenesena do sterilního prostředí Flowboxu (Steril-VBH 48 MP/99), kde byla miska vyjmuta z alobalu. Následně byl vnitřek Petriho misky zavlhčen 7 ml destilované vody (sterilizované stejným způsobem) prostřednictvím pipety se sterilní špičkou. Na rovnoměrně zavlhčený filtrační papír bylo sterilní pinzetou (sterilovaná po každých 10 semenech v etanolu a nad kahanem) přeneseno 50 náhodně vybraných semen máku z polyetylenového sáčku příslušného opakování. Ke každému opakování tedy náležely 2 vlhké komůrky s celkem 100 semeny označené příslušným kódem. Založené vlhké komůrky byly následně umístěny do termostatu (BT 120 MR) a ponechány při teplotě 20 °C po dobu 7 dní. Po uplynutí této doby byla semena máku vyhodnocována na přítomnost hub. Vzhledem k časově náročnému vyhodnocování byla jednotlivá opakování z Budyně nad Ohří zakládána v 5 skupinách (po 4 komůrkách) s časovým intervalem 3 týdnů.

Inkubace semen na agarových plotnách je založena na principu umístění semen na sterilní agarové médium v Petriho misce. K tomuto účelu bylo použito Sabouraudovo agarové médium (SAB) od firmy HiMedia. Toto agarové médium se obecně používá ke kultivaci hub, včetně patogenních. Kromě toho je toto médium vhodné pro mykologický rozbor kosmetických přípravků a potravin (www.condalab.com/pdf/1024.pdf). Sabouraudovo agarové médium bylo připraveno podle návodu přiloženého k dehydratovanému výrobku a sterilizováno prostřednictvím autoklávu. Vysterilizovaný agar byl ve Flowboxu nalit do připravených sterilních plastových Petriho misek s průměrem dna 8,5 cm a ponechán vychladnout. Na ztuhlé médium v Petriho misce bylo sterilní pinzetou (sterilovaná po každých 10 semenech v etanolu a nad kahanem) přeneseno 20 náhodně vybraných semen máku z polyethylenového sáčku příslušného opakování. Ke každému opakování tedy náleželo 5 agarových ploten označených kódem s celkem 100 semeny. Založené agarové plotny byly následně ponechány v termostatu při teplotě 20 °C po dobu 7 dní. Po uplynutí této doby byly na semenech vyhodnocovány narostlé houby. Vzhledem k časově náročnému vyhodnocování byla opět jednotlivá opakování z Budyně nad Ohří zakládána v 5 skupinách (po 10 agarových plotnách) s časovým intervalem 3 týdnů.

Od každého opakování bylo náhodně vybráno 200 semen (100 semen na inkubaci ve vlhkých komůrkách a 100 semen na inkubaci na agarových plotnách). Počet 100 semen byl zvolen na základě obdobných inkubací uvedených v literatuře (např. Medić-Pap et al. 2007).

4.3. Vyhodnocení inkubací a determinace hub

Vyhodnocování inkubací ve vlhkých komůrkách bylo prováděno pod binokulární lupou (Leica EZ4, režim plného a průchozího světla, zvětšení 30x), kdy byla zjišťována přítomnost a počet jednotlivých druhů hub na každém semeni. Přítomné houby byly poté mikroskopovány (mikroskop Olympus CX31, zvětšení 400x a 1000x) a ihned určovány podle morfologických znaků prostřednictvím determinační literatury (Crous et al. 2007, Domsch et al. 1980, Ellis 1971, Pitt & Hocking 1997).

Neurčené houby byly pro další determinaci přeočkovány ožihanou očkovací jehlou na novou Petriho misku (průměr dna 8,5 cm) s 2^o SL (sladinovým agarem) z pivovarnické sladiny (2% hm. sacharózy na 1000 ml destilované vody + 20 g agaru) a dále kultivovány v termostatu při teplotě 20 °C. V následujících dnech byl sledován jejich růst a tvorba

morfologických determinačních znaků. Po vytvoření těchto znaků byly houby rozřazeny do jednotlivých rodů, a podle výše zmíněné determinační literatury dále přeočkovány na příslušné determinační médium (MEA, CYA, CZA) a následně určeny do druhu. Pro ověření správnosti určení některých hub a pro determinaci sterilních kmenů či kmenů určených pouze do rodů byly využity molekulárně biologické metody determinace.

Vyhodnocování semen inkubovaných na agarových plotnách bylo prováděno stejným způsobem, jaký je uveden u vyhodnocení inkubací ve vlhkých komůrkách.

4.4. Molekulárně biologické metody

Molekulárně biologické metody determinace hub byly prováděny v molekulární laboratoři Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

4.4.1. Izolace DNA

K vyizolování DNA bylo použito 10 kmenů hub označených KO6, KO9, KO14, KO17, KO47, KO52, KO88, KO115, KO122 a KO123 . Do 2 ml mikrozkušavky (typ Eppendorf (2 ml) s víčkem) bylo pipetou se sterilní špičkou napipetováno 100 μm InstaGene matrix buffer. Do mikrozkušavky byl ožihanou očkovací jehlou přidán kousek 7 dní starého mycelia příslušného kmenu houby a nakonec byly do mikrozkušavky sterilní pinzetou vloženy 3 sterilní skleněné kuličky (o průměru 1,5 mm). Za použití mlýnku na drcení rostlinného materiálu (Retsch MM400) byly buňky houbového mycelia rozdrceny. Mikrozkušavka byla následně přenesena do termobloku (Thermomixer compact, Eppendorf) s nastavenou teplotou na 56 °C a mícháním 700 rpm (otáček/s). Po 30 minutách byla mikrozkušavka vyndána a umístěna do vortexu (Vortex Genie 2, Scientific Industries) k promíchání na 10 sekund při maximálních otáčkách. Mikrozkušavka byla dále vrácena do termobloku s novou nastavenou teplotou 100 °C. Po 8 minutách byla mikrozkušavka opět promíchána ve vortexu (10 sekund, max. otáčky) a následně po dobu 2 minut centrifugována na centrifuze (Centrifuge 5415D, Eppendorf) při 12 000 rpm. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na přístroji NanoDrop (NanoDrop 1000 spectrophotometer, Thermo scientific) při $\lambda = 260 \text{ nm}$.

4.4.2. PCR

Do mikrozkušavky (mikrozkušavka PCR (0,2 ml) s plochým víčkem) umístěné v chladítku (IsoFreeze PCR) byly pipetou se sterilními špičkami napipetovány jednotlivé složky Mastermixu (směsi pro PCR):

- 9,9 µl destilované vody (dd H₂O)
- 4 µl enhanceru
- 0,4 µl nukleotidů (dNTP)
- 2 µl pufru G
- 0,25 µl primeru ITS1F
- 0,25 µl primeru ITS4
- 2 µl MgCl₂
- 0,2 µl polymerázy (GOLD)
- 1 µl DNA

Po napipetování všech složek byla mikrozkušavka vložena do Cycleru (Touchgene Gradient, Techne), kde probíhala PCR s následným cyklem:

Tab.4: Výsledný cyklus pro PCR

iniciální denaturace	94 °C	5 min	35 cyklů
denaturace	94 °C	1 min	
annealing	55 °C	1 min	
elongace	72 °C	1 min	
finální elongace	72 °C	10 min	

4.4.3. Elektroforéza

K přípravě 1% TBE gelu pro středně velkou vanu elektroforézy bylo potřeba 0,5 g agarózy I, 50 ml 1% TBE pufru a 1 kapka thiamid bromidu. Do Erlenmayerovy baňky byla navážena agaróza a přilít TBE pufr. Obsah baňky byl v mikrovlnné troubě (Zanussi ZM21M0) přiveden k varu. Po mírném vychladnutí byla do baňky přidána kapka diamid bromidu. Do připravené vany s hřebínky a nalepenou páskou po stranách byla nalita výsledná směs. Gel byl 20 min ponechán ztuhnout. Po ztuhnutí byl z vany vyjmut hřebínek a vana byla ponořena do elektrovany pro elektroforézu s TBE pufr. Do každé jamky v gelu byla napipetována směs 3 µl DNA produktu s 1 µl nanášecí barvičky (loading dye).

Po nanesení vzorků byl zapnut přívod proudu (100 V, 20 min). Po skončení byl gel z vany přendán pod UV lampu (Herolab UV T-20 M), kde byl za použití programu (Gel Logic 100 Imaging System Kodak) zjištěna úspěšnost izolace.

4.4.4. Čištění produktu PCR

Získané PCR produkty byly následně přečištěny kitem Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit / 250. Do zkumavky s PCR produktem bylo podle návodu přidáno 80 μ l H1(pufr). Směs byla přepipetována do kolonky (DF column) v nové mikrozukmavce (2 ml, Collection Tube). Mikrozukmavka byla následně centrifugována 1 min při 12 000 rpm. Potom byl obsah ze zkumavky slit a do kolonky bylo napipetováno 500 μ l směsi H2 + etanol. Mikrozukmavka byla 2 x po sobě centrifugována (1 min, 12 000 rpm) do sucha. Filtr kolonky byl pinzetou posléze přendán do nové mikrozukmavky (typ Eppendorf (1,5 ml) s víčkem). Nakonec bylo pipetou přidáno 20 μ l TE zahřátého na 65 – 70 °C v Termobloku (Thermomixer compact, Eppendorf). Mikrozukmavka byla centrifugována 2 min při 12 000 rpm a postavena do stojanu. Po čtyřech hodinách byla změřena konečná koncentrace DNA.

4.4.5. Sekvenace

Osekvenování získaných vzorků DNA zajistila společnost MacroGene v Jižní Korei.

4.5. Statistické zpracování získaných dat

Data získaná při vyhodnocování vzorků byla statisticky zpracována dvěma způsoby.

První analýza, která byla provedena, byl výpočet relativních četností (f_i) jednotlivých druhů hub na semenech máku v rámci příslušných opakování. Výsledky z tohoto statistického zpracování poskytly přehled o výskytu jednotlivých druhů hub na semenech máku v rámci jednotlivých opakování. K tomuto výpočtu byl použit vzorec:

$$f_i [\%] = \left(\frac{n_i}{n} \right) \cdot 100 \quad , \text{kdy} \quad i = 1, 2, 3, \dots, k$$

n_i – počet jedinců druhu

n – celkový počet jedinců

Na předchozí výsledky navázalo další statistické zpracování, a to Simpsonův index diverzity (D), který vyjadřuje pravděpodobnost, s jakou budou dva náhodně nalezení jedinci ve společenstvu náležet k odlišným druhům. Výsledky byly využity ke zhodnocení variability houbového spektra mezi jednotlivými opakováními. Vzorec výpočtu tohoto indexu je následující:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s (p_i)^2, \text{ kdy } p_i = \frac{n_i}{N}, \text{ tedy } D = 1 - \sum_{i=1}^s \left(\frac{n_i}{N}\right)^2$$

p_i – pravděpodobnost výběru jedince i -tého druhu

n_i – počet jedinců druhu

N – celkový počet jedinců ve společenstvu

Ke zpracování statistických dat a tvorbě grafů byla použita aplikace Microsoft Excel 2007.

5. Výsledky

5.1. Primární data

Na 2200 semenech inkubovaných ve vlhkých komůrkách a na agarových plotnách bylo zaznamenáno celkem 19 druhů hub (*Alternaria alternata*, *Arthrinium arundinis*, *Aspergillus* sp.1, *Aspergillus* sp.2, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Dendryphion papaveris*, *Dendryphion penicillatum*, *Doratomyces nanus*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp.1, *Penicillium expansum*, *Penicillium* sp.3, *Penicillium* sp.4, *Rhizopus oryzae*, *Verticillium albo-atrum*, oranžové sterilní mycelium) Ve vlhkých komůrkách bylo odizolováno 11 druhů hub, při inkubaci semen na agarových plotnách 14 druhů hub. Druhy hub se při obou inkubacích částečně překrývaly, značné rozdíly byly především v četnostech jednotlivých druhů hub v rámci téhož opakování při různé metodě inkubace. Nejvíce druhů hub bylo nalezeno v opakování 1 CU (11 druhů), nejméně v opakování 4 Bud (4 druhy). Zaznamenané druhy hub a jejich četnosti při obou inkubacích v rámci všech opakování jsou zaznamenány v Tab. 5 a Tab. 6.

Tab. 5: Druhy hub a jejich četnosti zaznamenané v jednotlivých opakování při inkubaci semen ve vlhkých komůrkách.

VK	1-37 Bud	2 Bud	4 Bud	5 Bud	6 Bud	8 Bud	9 Bud	10 Bud	11 Bud	12 Bud	1 CU
<i>A. alternata</i>	0	0	0	0	0	0	12	0	2	0	38
<i>A. arundinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp.1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp.2</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>B. cinerea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. cladosporioides</i>	1	0	0	2	10	0	0	0	0	0	64
<i>C. herbarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. papaveris</i>	74	56	54	67	68	78	69	75	30	30	23
<i>D. penicillatum</i>	12	12	0	28	12	22	12	16	10	10	0
<i>D. nanus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>E. nigrum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Fusarium sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium sp.1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. expansum</i>	14	2	4	2	2	10	0	4	84	94	2
<i>Penicillium sp.3</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium sp.4</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>R. oryzae</i>	0	28	46	13	2	0	14	0	0	0	1
<i>V. albo-atrum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
sterilní mycelium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

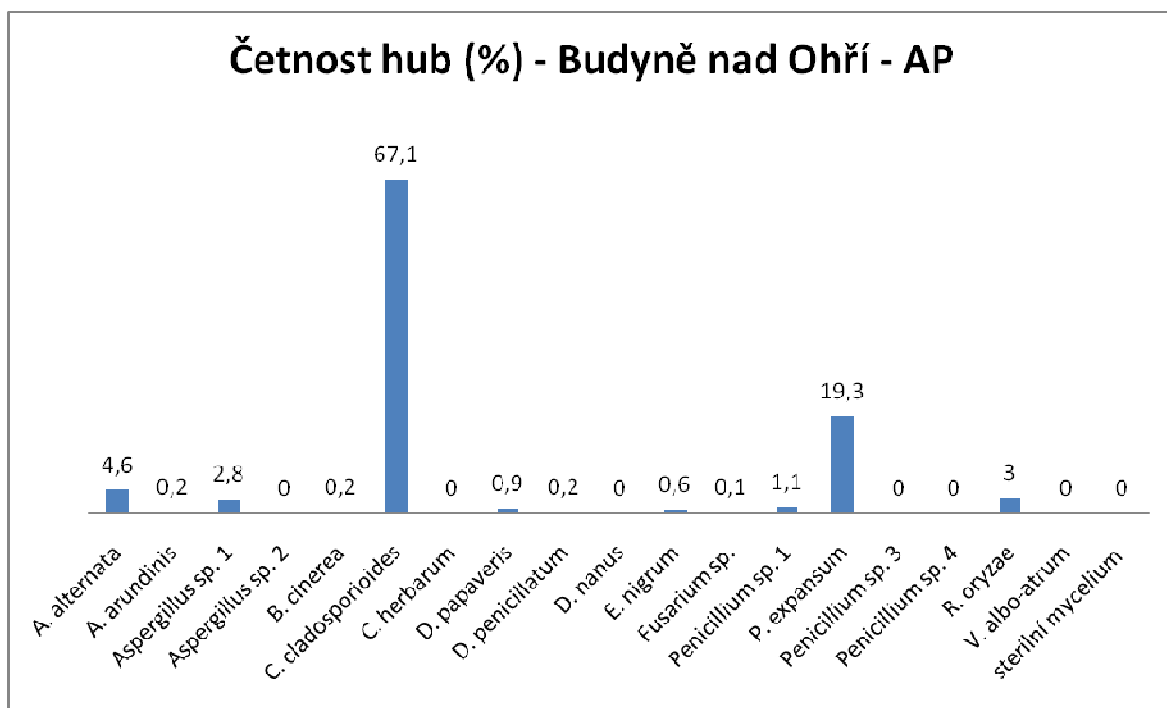
Tab. 6: Druhy hub a jejich četnosti zaznamenané na semenech jednotlivých opakování inkubovaných na agarových plotnách

AP	1-37 Bud	2 Bud	4 Bud	5 Bud	6 Bud	8 Bud	9 Bud	10 Bud	11 Bud	12 Bud	1 CU
<i>A. alternata</i>	2	2	0	0	5	5	22	10	1	0	26
<i>A. arundinis</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp.1</i>	16	5	0	2	0	5	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp.2</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. cinerea</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. cladosporioides</i>	81	81	84	87	81	82	92	75	10	6	48
<i>C. herbarum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>D. papaveris</i>	0	0	0	0	3	0	1	5	0	0	17
<i>D. penicillatum</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. nanus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. nigrum</i>	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Fusarium sp.</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium sp.1</i>	0	0	0	0	0	0	0	9	2	0	1
<i>P. expansum</i>	0	0	0	0	4	0	0	0	96	95	0
<i>Penicillium sp.3</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium sp.4</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>R. oryzae</i>	2	3	13	6	0	0	0	6	0	0	0
<i>V. albo-atrum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sterilní mycelium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18

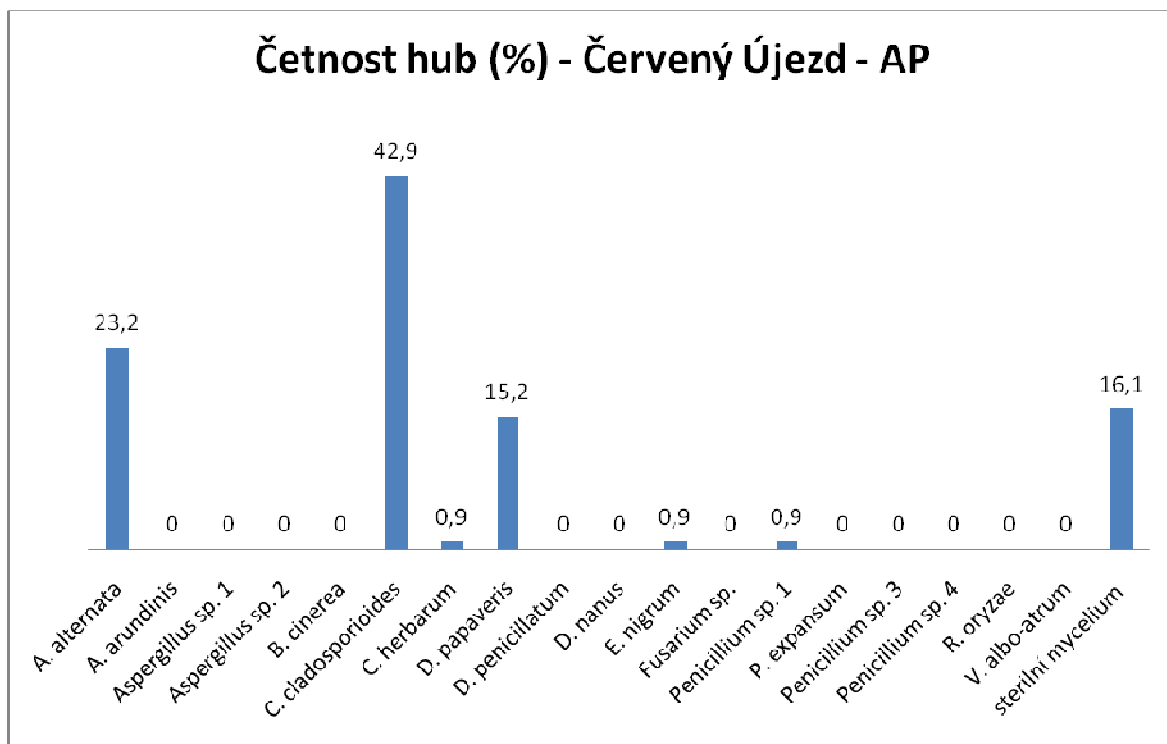
5.2. Výpočet relativních četností

Získaná data byla nejdříve podrobena výpočtu relativních četností (f_i) jednotlivých druhů hub na semenech v rámci příslušných opakování při obou způsobech inkubace. Při kultivaci semen ve vlhkých komůrkách byl v opakování 1 CU nejčetnější druh *C. cladosporioides*, v opakování 11 Bud a 12 Bud to byl druh *P. expansum* a v osmi zbývajících opakování měl nejvyšší četnost druh *D. papaveris*. Při kultivaci semen na agarových plotnách byl opět u opakování 11 Bud a 12 Bud nejčetnější druh *P. expansum*, zatímco u zbývajících devíti opakování to byl druh *C. cladosporioides*. Četnosti jednotlivých druhů hub v rámci lokalit a obou způsobů vyhodnocení inkubací jsou vyjádřeny v grafech (Graf 1 – 4).

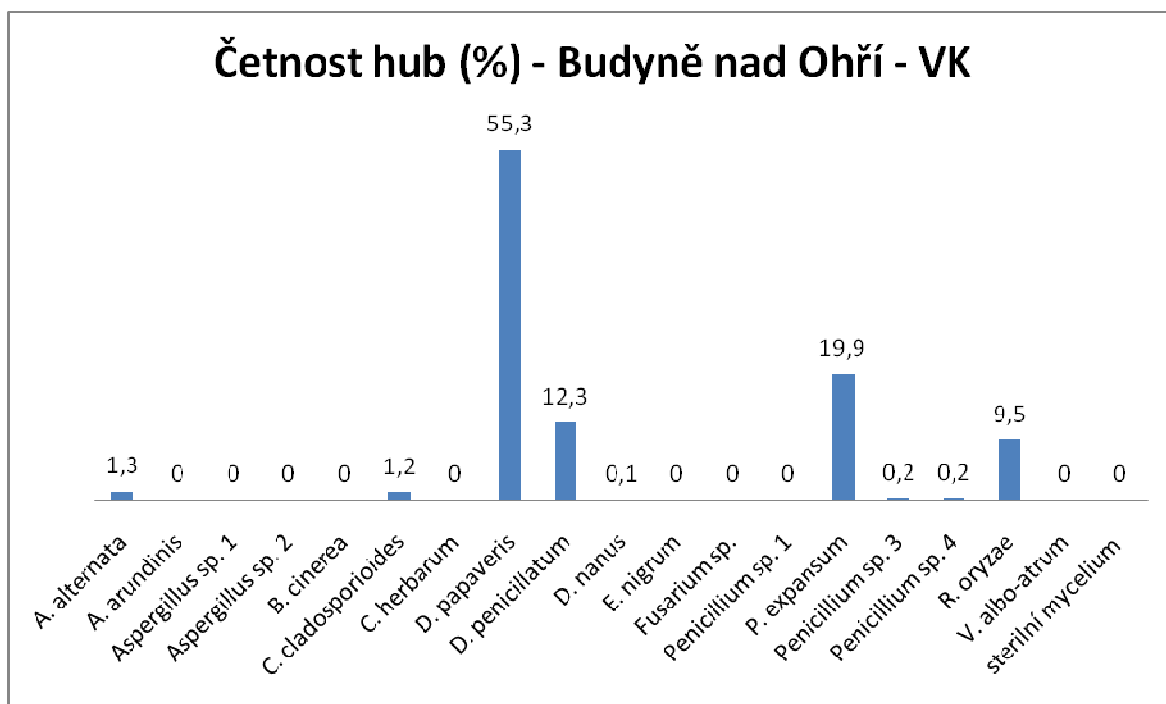
Graf 1: Četnost hub na lokalitě Budyně nad Ohří při inkubaci semen na agarových plotnách



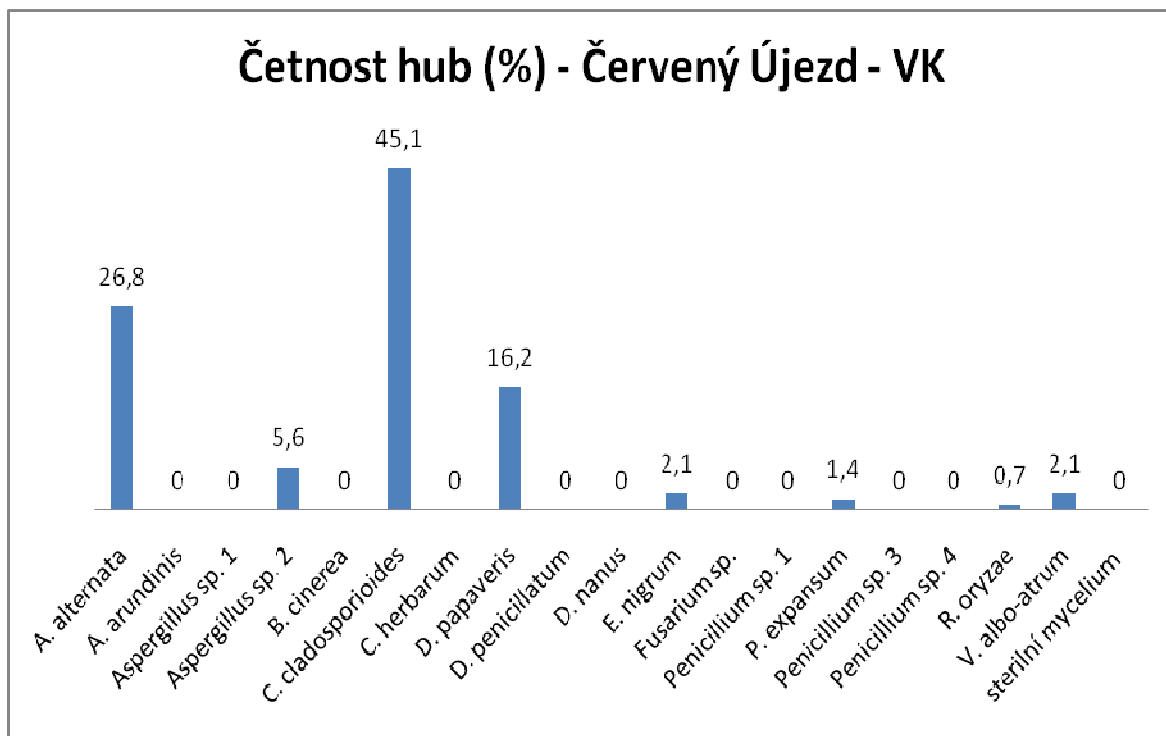
Graf 2: Četnost hub na lokalitě Červený Újezd při inkubaci semen na agarových plotnách



Graf 3: Četnost hub na lokalitě Budyně nad Ohří při inkubaci semen ve vlhkých komůrkách



Graf 4: Četnost hub na lokalitě Červený Újezd při inkubaci semen ve vlhkých komůrkách

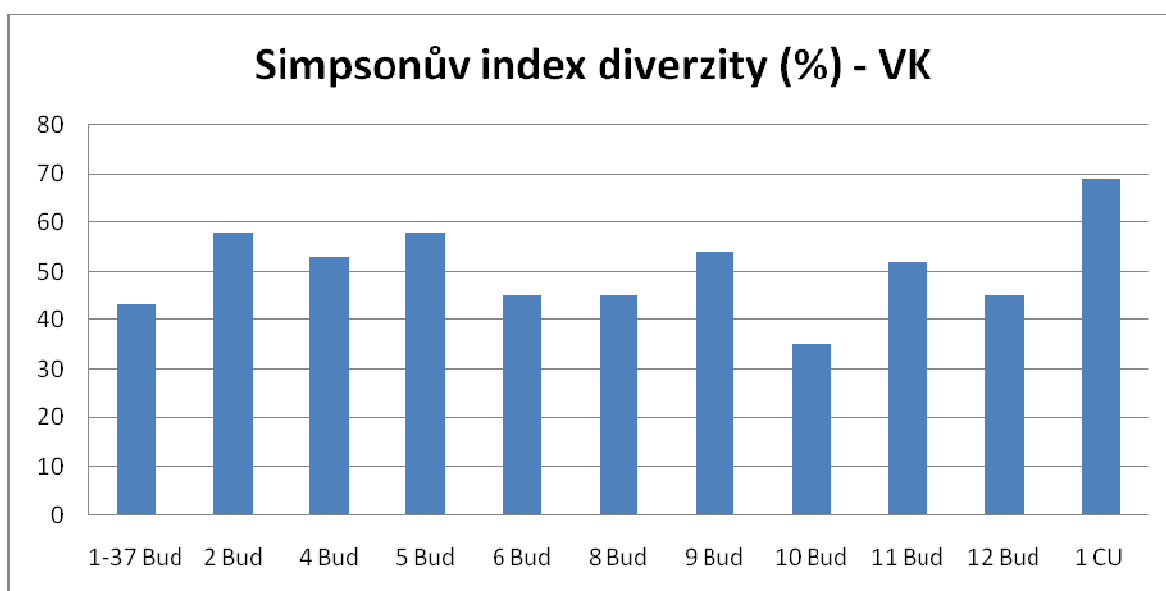


5.3. Simpsonův index diverzity

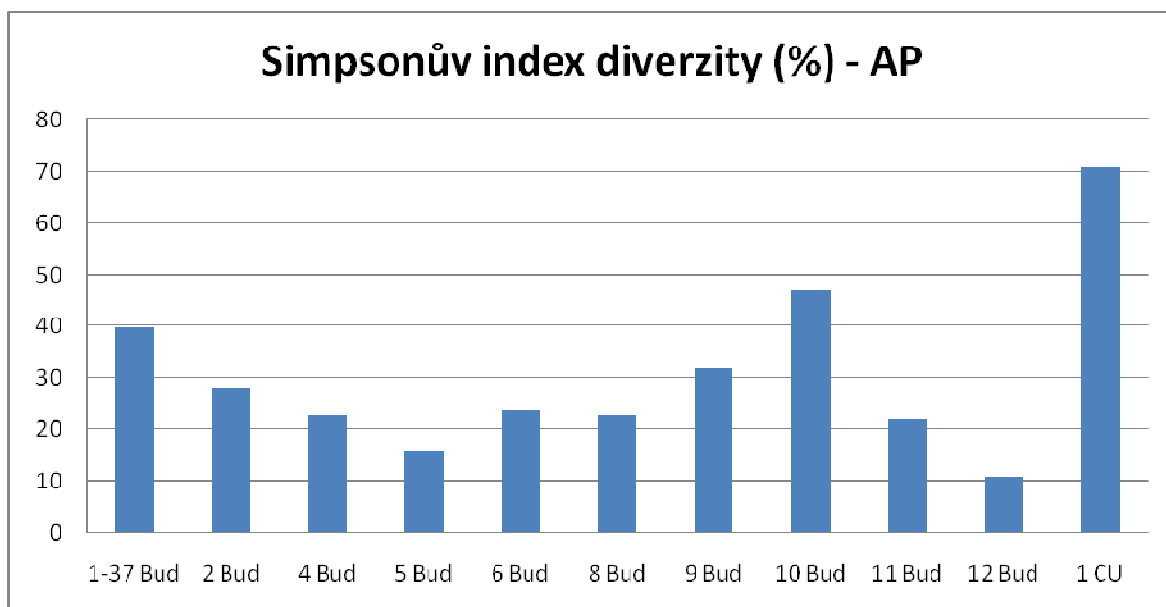
Nejvyšší Simpsonův index diverzity u obou způsobů inkubace byl zjištěn u opakovní 1 CU. Při porovnání obou způsobů inkubace byl, kromě opakování 10 Bud, u všech ostatních opakování zjištěn vyšší Simpsonův index diverzity, než při kultivaci semen na agarových plotnách. Z toho vyplývá, že inkubace semen pro detekci přítomných hub ve vlhkých komůrkách vyzdvihuje širší spektrum hub v porovnání s agarovými plotnami. Kultivace na agarových plotnách spektrum izolovaných hub také rozšířila.

Hodnoty Simpsonova indexu diverzity byly vyneseny do grafů (Graf 5 – 6).

Graf 5: Simpsonův index diverzity zaznamenaný u jednotlivých opakování při inkubaci semen ve vlhkých komůrkách



Graf 6: Simpsonův index diverzity zaznamenaný u jednotlivých opakování při inkubaci semen na agarových plotnách



5.4. Výsledky sekvence DNA

DNA byla izolována z celkem 10 kmenů hub. Z celkového počtu bylo 7 kmenů vybráno pro ověření správnosti určení (KO6, KO14, KO17, KO47, KO88, KO115, KO122), 2 kmeny pro určení do druhu (KO52, KO9) a 1 sterilní kmen pro celkové určení (KO123). Ze všech vzorků bylo úspěšně osekvenováno 8 kmenů hub. U zbývajících dvou kmenů se na základě výsledků elektroforézy izolace DNA nezdařila. Jednalo se o kmeny KO9 (*Fusarium* sp.) a KO123 (oranžové sterilní mycelium).

Kmeny, u nichž byla izolace DNA úspěšně provedena, byly osekvenovány a získané sekvence byly porovnávány s databází sekvencí v BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool). Výsledky porovnávání sekvencí byly následující:

- | | | | |
|--------|------------------------|---------|-------------------------|
| • KO6 | <i>A. alternata</i> | • KO52 | <i>Aspergillus</i> sp.1 |
| • KO14 | <i>D. penicillatum</i> | • KO88 | <i>D. papaveris</i> |
| • KO17 | <i>D. papaveris</i> | • KO115 | <i>D. penicillatum</i> |
| • KO47 | <i>A. alternata</i> | • KO122 | <i>D. papaveris</i> |

6. Diskuze

Odběry vzorků byly prováděny na dvou odlišných lokalitách v nestejném roce. První lokalitou byla ekologická farma v Budyni nad Ohří a druhou kontrolní pokusná plocha v Červeném Újezdě. Z obou těchto lokalit byly odebrány vzorky máku, které byly bez uskladnění ihned zpracovány. Semena tedy obsahovala pouze spektrum hub, které semena máku přirozeně osidluje bez vlivu chemického ošetření a následných sklizňových a posklizňových manipulací. Vzhledem k nezávislosti lokalit a ročníků, a tedy k variabilitě vnějších podmínek, vzorky semen poskytly informace o širším spektru hub, než by tomu mohlo být při odběru vzorků pouze z jedné lokality či v témže roce.

Metody inkubace semen ve vlhkých komůrkách a na agarových plotnách byly k detekci hub osidlujících semena máku zvoleny na základě obdobných studií uvedených v literatuře (Alwakeel & Nasser 2011, Begum et al. 2004, Dawar et al. 2007, Elwakil et al. 2007, Leichtfried et al. 2004, Medić-Pap et al. 2007, Nasir 2003, Nik 1980, Nik & Parbery 1977, Nwachukwu & Umechuruba 2011, Petrie 1974, Rothe & Wadekar 2011, Singh et al. 2011). Povrch semen nebyl před inkubací sterilizován, neboť semena byla odebrána přímo z makovic a nebyla tedy vystavena životaschopným částicím hub exponovaných v prostředí. Navíc některé druhy hub, které semena přirozeně osidlují, kolonizují pouze jejich povrch a do vnitřku semene nepronikají. Metoda inkubace semen ve vlhkých komůrkách vynesla spektrum hub, které kolonizuje vnitřek semena, a která mohou způsobit letální onemocnění klíčnicích rostlin. Naproti tomu inkubace semen na agarových plotnách odhalila nejen druhy hub, které osidlují vnitřek semena, ale také ty druhy, které kolonizují jeho povrch. Z těchto důvodů vzájemného doplnění informací o výskytu hub byly tyto metody vhodně zvolené a pro zjištění semene osidlujícího spektra hub dostatečné.

Semena, která byla při inkubacích prezentována jako sterilní, pravděpodobně neobsahovala životaschopné fragmenty hub. Vliv na sterilitě také mohly mít výkonné obranné mechanismy semene v podobě chemických látek (Kúdela et al. 1989).

Metoda determinace hub pomocí molekulárně biologických metod, v tomto případě prostřednictvím izolace DNA a následné sekvenace, pomohla potvrdit správnost určení 7 kmenů hub (KO6, KO14, KO17, KO47, KO88, KO115, KO122). Sekvence zbývajících kmenů z rodu *Aspergillus* se neshodovala s žádnou sekvencí uvedenou v databázi BLAST,

proto nebyl tento kmen určen do druhu, jak bylo zamýšleno. Pravděpodobně nebyl u tohoto kmenu správně zvolen sekvenovaný úsek DNA. Nezdár průběhu PCR u dvou kmenů (KO9 a KO123) byl patrně zapříčiněn kontaminací vzorku jinou DNA nebo nepřesností při pipetování. Vliv také mohlo mít nedostatečné promíchání příslušných chemikálií. Vzhledem k úspěšnosti reakce u ostatních vzorků nebyla chyba na straně výběru kitů pro izolaci a multiplikaci houbové DNA.

K detekci hub na semenech byl na základě literárních údajů vybrán stejný počet 100 semen pro inkubaci na agarových plotnách i ve vlhkých komůrkách (MediĆ-Pap et al. 2007, Petrie 1974, Rothe & Wadekar 2011, Youssef et al. 2008). Vyšší počet inkubovaných semen by sice mohl přinést údaje o dalších druzích hub, nicméně jednalo by se pouze o houby s velmi nízkou frekvencí výskytu a pro tuto práci jsou stěžejní právě ty druhy hub, které se vyskytují jako běžná součást mykoflóry semen hub a jejich výskyt není pouze vzácný. Navíc velikost vzorku i tak přinesla informace o houbách, které se na semenech vyskytovaly s četností nižší než 1 % a navíc kombinace dvou metod a variabilita vzorků zajistila rozšíření spektra detekovaných hub.

Nejčastěji izolovanou houbou při inkubaci semen z lokalit Budyně nad Ohří a Červený Újezd metodou agarových ploten a při inkubaci semen metodou vlhkých komůrek z lokality Budyně nad Ohří bylo *C. cladosporioides*. Při zbylé kultivaci semen ve vlhkých komůrkách z lokality Budyně nad Ohří to byl druh *D.papaveris*. Hojně se vyskytující druh *C. cladosporioides* osidluje povrch semen celé řady rostlin (např. Alwakeel & Nasser 2011, Kremer et al. 1983, Malaker et al. 2008, Nasir 2003), proto byl jeho výskyt očekávaný. Vysoká četnost výskytu tohoto druhu mohla také souviset s jeho mykoparazitismem na původci plísňě máku (*Peronospora arborescens*) (Nigam & Rai 1988). Výskyt tohoto původce je na máku dosti častý (Prokinová & Dvořák 2011). Standardní metody inkubace semen použité v této práci nejsou k tomuto původci dostatečně citlivé, tudíž nebyl jeho výskyt zaznamenán. Je proto možné, že výskyt tohoto původce mohl být zaštitěn výskytem druhu *C. cladosporioides*, což ve svém důsledku zapříčinilo zvýšený výskyt tohoto druhu.

Výskyt zástupce z rodu *Dendryphon* byl ve vysoké četnosti očekávan, neboť se jedná o původce jednoho z nejčastějších onemocnění máku, helmintosporiózy (Prokinová & Dvořák 2011). Zajímavý byl současný výskyt dvou druhů tohoto rodu, a to *D. papaveris* a *D. penicillatum*. Po morfologické determinaci byla správnost určení těchto dvou druhů

ověřena molekulárně biologickými metodami. V rámci České republiky se jedná o první, vysoce citlivou objektivní metodou doložené potvrzení faktu, že helmintosporióza máku je i na našem území zapříčiněna dvěma druhy rodu *Dendryphion* (syn. *Brachycladium*).

Přítomnost druhů *A. alternata*, *A. arundinis*, *B. cinerea*, *C. herbarum*, *E. nigrum*, *Fusarium* sp., *R. oryzae* a *V. albo-atrum* se dala vzhledem k údajům uvedeným v literatuře očekávat (viz kap. 3.7 Literární přehled hub izolovaných ze semen kulturních plodin). Jedná se o druhy, které mohou mít určitý podíl na odumírání rostlin.

Překvapivým a zároveň ojedinělým byl nález druhu *D. nanus*. Tato houba je známa pouze z odumřelého rostlinného materiálu. Výskyt tohoto druhu mohl být zapříčiněn kontaminací semene povrchem makovice při mechanickém rozrušení makovic za účelem odběru semen v laboratoři. Případně mohla být makovice mechanicky narušena již na poli, kde byl dostatečný zdroj odumřelého rostlinného materiálu, odkud mohly být spory anemochoricky nebo entomochoricky přeneseny na povrch spor uvnitř makovice.

Přítomnost zástupců rodu *Aspergillus* a *Penicillium* nebyla překvapivá, neboť výskyt těchto rodů na nejrůznějším materiálu, včetně semen ještě neuskladněných kulturních plodin, je velmi běžný. (např. Alwakeel & Nasser 2011, Basak & Lee 2002, Begum et al. 2004, Medić-Pap et al. 2007, Rothe & Wadekar 2011, Youssef et al. 2008). Nečekaný byl ovšem vysoký výskyt velmi běžně se vyskytujícího druhu *Penicillium expansum*, jehož četnost byla dokonce ve dvou opakováních vyšší než četnost *C. cladosporioides* a *D. papaveris*. Pravděpodobnost, že se jednalo o kontaminaci z ovzduší v laboratoři, je vzhledem k vysoké frekvenci málo pravděpodobná. Z tohoto důvodu by tento druh mohl mít určitou souvislost s přirozeným osídlením semen máku setého. V úvahu také přichází výskyt této houby jako sekundární infekce.

K vyhodnocení diverzity hub na semenech máku byl použit Simpsonův index diverzity, který odráží diverzitu hub v daném opakování. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší diverzity hub bylo při obou kultivacích dosaženo na lokalitě Červený Újezd. Naopak nejmenší Simpsonův index diverzity byl zjištěn na lokalitě Budyně nad Ohří, konkrétně v opakování 12 Bud při kultivaci na agarových plotnách a v opakování 10 Bud při kultivaci ve vlhkých komůrkách. Na těchto lokalitách byl v převážné většině na semenech zastoupen pouze jeden druh houby, zbylé druhy byly zastoupeny pouze s nízkou frekvencí. Z porovnání opakování pocházejících z lokality Budyně nad Ohří plyne, že v rámci jedné plochy existuje značná variabilita ve spektru hub osidlujících semena, která může záviset

na lokálních půdních či expozičních podmínkách. To také znamená, že pouze jeden odběr vzorku z plochy nemá žádnou vypovídací hodnotu o spektru hub, které se na dané ploše nachází. Směsný vzorek z lokality v Červeném Újezdě vznikl smícháním vzorků z jednotlivých opakování pokusných ploch. Vypovídací hodnota tohoto směsného vzorku byla značná, neboť z něj bylo izolováno nejvíce druhů hub a také zde byl zaznamenán nejvyšší Simpsonův index diverzity.

Ukazuje se, že semena máku setého jsou přirozeně osidlována řadou hub, které se významně podílejí na výsledné kvalitě semen. Bližší poznání přirozené mykoflóry přináší podnětné informace, které nacházejí své uplatnění v ochraně, a zároveň nabízejí možnosti dalšího studia v otázkách vzájemných interakcí, produkce mykotoxinů a také bližšího porozumění problematice dvou původců helmintosporiízy.

7. Závěr

- Při inkubaci semen ve vlhkých komůrkách bylo nalezeno 12 druhů a při inkubaci semen na agarových plotnách 14 druhů, převážně patogenních hub. Celkově bylo oběma metodami detekováno 19 druhů hub, z nichž některé jsou potenciálními producenty mykotoxinů.
- Nejčtenějším druhem při inkubaci semen z lokalit Budyně nad Ohří a Červený Újezd metodou agarových ploten a při inkubaci semen metodou vlhkých komůrek z lokality Budyně nad Ohří bylo *Cladosporium cladosporioides*. Při kultivaci semen z lokality Budyně nad Ohří metodou vlhkých komůrek to byl druh *Dendryphion papaveris*.
- Nejvyšší Simpsonův index diverzity byl stanoven ve směsném vzorku z lokality Červený Újezd. U zbývajících opakování v rámci jedné plochy na lokalitě Budyně nad Ohří nabýval tento index dosti variabilních hodnot.
- Na základě molekulárních dat byl učiněn v rámci České republiky první potvrzený nález dvou původců helmintosporiózy máku, a to druhů *Dendryphion papaveris* a *Dendryphion penicillatum*.

8. Seznam literary

ABDEL-HAFEZ, S.I.I., EL-KADY, I.A., MAZEN, M.B., EL-MAGHRABY, A.D. (1987) Mycoflora and trichothecene toxins of paddy grains from Egypt. *Mycopathologia* 100: 103-112.

ABDEL-HAFEZ, S.I.I., SABER, S.M. (1993) Mycoflora and mycotoxin of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and walnut (*Juglans regia* L.) seeds in Egypt. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 148: 137-147.

ABDEL-KADER, M.I.A., MOUBASHER, A.H., ABDEL-HAFEZ, S.I.I. (1979) Survey of the mycoflora of barley grains in Egypt. *Mycopathologia* 69: 143-147.

ACLAND, K.M., HAY, R.J., GROVES, R. (1998) Cutaneous infection with *Alternaria alternata* complicating immunosuppression: successful treatment with itraconazole. *British Journal of Dermatology* 138: 354-356.

ADISA, V.A. (1986) Microbial spoilage of *Solanum tuberosum* L. tubers in Nigeria. *Nahrung* 30: 709-712.

ALDEA, M., HAMILTON, J.G., RESTI, J.P., ZANGERL, A.R., BERENBAUM, M.R., FRANK, T.D., DELUCIA, E.H. (2006) Comparison of photosynthetic damage from arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings. *Oecologia* 149: 221-232.

ALWAKEEL, S.S., NASSER, L.A. (2011) Microbial contamination and mycotoxins from nuts in Riyadh, Saudi Arabia. *American Journal of Food Technology* 6(8): 613-630.

ANDERSEN, B., THRANE, U., SVENDSEN, A., RASMUSSEN, I.A. (1996) Associated field mycobiota on malt barley. *Canadian Journal of Botany* 74(6): 854-858.

BAILEY, B.A., APEL-BIRKHOFF, P.C., O'NEILL, N.R., PLASKOWITZ, J., ALAVI, S., JENNINGS, J.C., ANDERSON, J.D. (2000) Evaluation of infection processes and

resulting disease caused by *Dendryphion penicillatum* and *Pleospora papaveracea* on *Papaver somniferum*. *Phytopathology* 90 (7): 699-709.

BAILEY, B.A., O'NEILL, N.R., ANDERSON, J.D. (2004) Influence of adjuvants on disease development by *Pleospora papaveracea* on opium poppy (*Papaver somniferum*). *Weed Science* 52: 424-432.

BAIRD, R.E., BRENNEMAN, T.B., BELL, D.K., CULBREATH, A.K., MULLINIX, B.G. (1993) The peanut shell mycobiota of detached vs. mechanically harvested pods either treated or not treated with flutolanil. *Plant Disease* 77: 405-408.

BAIRD, R., CARLING, D. (1998) Disease: Survival of parasitic and saprophytic fungi on intact senescent cotton roots. *Journal of Cotton Science* 2: 27-34.

BASAK, A.B., LEE, M.W. (2002) Prevalence and transmission of seed-borne fungi of maize grown in a farm of Korea. *Microbiology* 30(1): 47-50.

BAUDYŠ, E., BENADA, J., ŠPAČEK, J. (1955) *Zemědělská fytopatologie II*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha. 775 str.

BAUER, H., AJELLO, L., ADAMS, E., HERNANDEZ, D.U. (1955) Cerebral mucormycosis: Pathogenesis of the disease; description of the fungus, *Rhizopus oryzae*, isolated from a fatal case. *The American Journal of Medicine* 18(5): 822-831.

BEGUM, N., ALVI, K.Z., HAQUE, M.I., RAJA, M.U., CHOCHAN, S. (2004) Evaluation of mycoflora associated with pea seeds and some control measures. *Plant Pathology Journal* 3(1): 48-51.

BENSCH, K., GROENEWALD, J. Z., DIJKSTERHUIS, J., STARINK-WILLEMSE, M., ANDERSEN, B., SUMMERELL, B. A., SHIN, H. D., DUGAN, F. M., SCHROERS, H. J., BRAUN, U., CROUS, P. W. (2010) Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology* 67 (1): 1-94.

- BERNER, D.K., SMALLWOOD, E.L., MCMAHON, M.B., LUSTER, D.G., KASHEFI, J. (2007) First report of leaf spot caused by *Cladosporium herbarum* on *Centaurea solstitialis* in Greece. *Plant Disease* 91(4): 463.
- BETINA, V. (1990) *Mykotoxíny: chémia – biológia – ekológia*. Vydavateľstvo ALFA, Bratislava. 288 str.
- BITTNER, V. (2004) Choroby máku v raných fázich vývoje. In: 3. makový občasník, Sborník odborných seminářů „Mák v roce 2004“. ČZU, 50-52.
- BITTNER, V. (2005) Virózy a bakteriózy na máku. In: 4. makový občasník, Sborník odborných seminářů „Mák v roce 2005“. ČZU, 82-84.
- BITTNER, V. (2009) Biotická poškození máku (4. část) - plíseň šedá a další houbové choroby máku. *Agromanuál* 6: 42-43.
- BRIAN, P.W., CURTIS, P.J., HEMMING, H.G., NORRIS, G.L.F. (1957) Wortmannin, an antibiotic produced by *Penicillium wortmannin*. *Transactions of the British Mycological Society* 40(3): 365-368.
- BRUNS, H.A. (2003) Controlling aflatoxin and fumonisin in maize by crop management. *Toxin Reviews* 22(2): 153-173.
- BRUTON, B.D., REDLIN, S.C., COLLINS, J.K., SAMS, C.E. (1993) Postharvest decay of cantaloupe caused by *Epicoccum nigrum*. *Plant Disease* 77: 1060-1062.
- CLEVELAND, T.E., DOWD, P.F., DESJARDINS, A.E., BHATNAGAR, D., COTTY, P.J. (2003) United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on pre-harvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Management Science* 59: 629–642.
- CORRELL, J.C., GORDON, T.R., MCCAIN, A.H. (1988) Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 78(8): 1017-1021.

CROUS, P.W., BRAUN, U., SCHUBERT, K., GROENEWALD, J.Z. (2007): The genus *Cladosporium* and simile dematiaceous hyphomycetes. *Studies in Mycology* 58, CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, 253 str.

ČERNÁ, K. (2011) Zařazení mykotoxinů do výuky na střední škole. Závěrečná práce Mimořádného studia k získání pedagogické způsobilosti. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Praha. 53 str.

DAWAR, S., SYED, F., GHAFAR, A. (2007) Seed borne fungi associated with chickpea in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 39(2): 637-643.

DELL, B., HUANG, L. (1997) Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil* 193. 103-120.

DIJKSTERHUIS, J., SAMSON, R. A. (Eds.) (2007) *Food Mycology: A multifaceted approach to fungi and food*. CRC Press, Boca Raton. 403 str.

DOMIJAN, A.M., PERAIKA, M., ZLENDER, V., CVJETKOVIĆ, B., JURJEVIĆ, Z., TOPOLOVEC-PINTARIĆ, S., IVIĆ, D. (2005) Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. *Food and Chemical Toxicology* 43(3): 427-432.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T H. (1980) *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London. 859 str.

DU, P.V., LOAN, L.C., CUONG, N.D., NGHIEP, H.V., THACH, N.D. (2001) Survey on seed borne fungi and its effects on grain quality of common rice cultivars in the Mekong Delta. *Omonrice* 9: 107-113.

ECKARD, S., WETTSTEIN, F.E., FORRER, H.-R., VOGELGSANG, S. (2011) Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. *Toxins* 3: 949-967.

EDELBAUER, A., STANGL, J. (1993) Nährstoffentzug durch den Waldviertler Graumohn (*Papaver somniferum* L.) im Verlauf der Vegetationszeit. *Journal für Landwirtschaftliche Forschung* 44: 15-17.

ELLIS, M.B. (1971) *Dematiaceous Hyphomycetes*. CAB International Mycological Institute, Kew. 608 str.

ELLIS, M.B., ELLIS, J.P. (1984) *Microfungi on land plants. An identification handbook*. Croom Helm, London, 818 str.

ELWAKIL, M.A., EL-SHERIF, E.M., EL-METWALLY, M.A. (2007) An innovative method for detecting slow growing seed-borne fungi of peanut. *The Plant Pathology Journal* 6(4): 306-311.

FÁBRY, A., A KOL. (1975) *Řepka, hořčice, mák a slunečnice*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha. 358 str.

FLANNIGAN, B. (1970) Comparison of seed-borne mycofloras of barley, oats and wheat. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 267-276.

GUBLER, W.D., FELICIANO, J.A., BORDAS, A.C., CIVEROLO, E.C., MELVIN, J.A., WELCH, N.C. (1999) First report of blossom blight of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* and *Cladosporium cladosporioides* in California. *Plant Disease* 83(4): 400.

HANLIN, R.T. (1990) *Illustrated genera of ascomycetes*. APS Press, Minnesota. 263 str.

HANLIN, R.T. (1998a) *Illustrated genera of ascomycetes, volume II*. APS Press, Minnesota. 258 str.

HANLIN, R.T. (1998b) *Combinated keys to illustrated genera of ascomycetes, volume I & II*. APS Press, Minnesota. 113 str.

HANS, S., ZHONG, X.Y., TROEGER, C., BURGEMEISTER, R., GLONING, K., HOLZGREVE, W. (2000) Current applications of single-cell PCR. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57(1): 96-105.

HATTA, R., ITO, K., HOSAKI, Y., TANAKA, T., TANAKA, A., YAMAMOTO, M., AKIMITSU, K., TSUGE, T. (2002) A conditionally dispensable chromosome controls host-specific pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Genetics* 161: 59–70.

HAVEL, J., ROTREKL, J. (2004) Výskyt škůdců na Moravě v roce 2003 a některé poznatky z ochrany proti nim. In. 3. makový občasník, Sborník odborných seminářů „Mák v roce 2004“. ČZU, 53-57.

HILL, R.A., LACEY, J. (1983) The microflora of ripening barley grain and the effects of pre-harvest fungicide application. *Annals of Applied Biology* 102: 455-465.

HOCKING, A. D., PITT, J. I., SAMSON, R. A. THRANE, U. (Eds.) (2006) *Advances in food mycology*. Springer, New York. 371 str.

HORSFALL, J.G., COWLING, E.B. (Eds.) (1978) *Plant disease. An advanced treatise Vol. II. How disease develops in populations*. Academic Press, New York. 436 str.

HUBERT, J., STEJSKAL, V., KUBÁTOVÁ, A., MUNZBERGOVÁ, Z., VÁŇOVÁ, M., ŽĎÁRKOVÁ, E. (2003) Mites as selective fungal carriers in stored grain habitats. *Experimental and Applied Acarology* 29: 69-87.

HUBERT, J., STEJSKAL, V., MUNZBERGOVÁ, Z., KUBÁTOVÁ, A., VÁŇOVÁ, M., ŽĎÁRKOVÁ, E. (2004) Mites and fungi heavily infested stores in the Czech republic. *Journal of Economic Entomology* 97(6): 2144-2153.

CHALUTZ, E., MATTOO, A.K., FUCHS, Y. (1980) Biosynthesis of ethylene: The effect of phosphate. *Plant, Cell & Environment* 3(5): 349-356.

CHEŁKOWSKI, J. (1991) Cereal grain: Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Elsevier, Amsterdam. 607 str.

CHEN, R.S., WANG, W.L., LI, J.C., WANG, Y.Y., TSAY, J.G. (2009) First report of papaya scab caused by *Cladosporium cladosporioides* in Taiwan. Plant Disease 93(4): 426.

INDERBITZIN, P., SHOEMAKER, R.A., O'NEILL, N.R., TURGEON, B.G., BERBEE, M.L. (2006) Systematics and mating systems of two fungal pathogens of opium poppy: the heterothallic *Crivellia papaveracea* with a *Brachycladium penicillatum* asexual state and a homothallic species with a *Brachycladium papaveris* asexual state. Canadian Journal of Botany 84 (8): 1304-1326.

JACOBSEN, B.J., HARLIN, K.S., SWANSON, S.P., LAMBERT, R.J., BEASLEY, V.R., SINCLAIR, J.B., WEI, L.S. (1995) Occurrence of fungi and mycotoxins associated with field mold damaged soybeans in the midwest. Plant Disease 79: 86-89.

JOFFE, A.Z. (1969) The mycoflora of fresh and stored groundnut kernels in Israel. Mycopathologia 39: 255-264.

JONES, D.R. (2002) Risk of spread of banana diseases in international trade and germplasm exchange. In: Acorbat. Memorias XV reuni3n. Realizada en Cartagena de Indias, Columbia. 105-113.

KAZDA, J., SKUHROVEC, J. (2011) Krytonosec makovicov3y (*Neoglocianus maculaalba* (Herbst, 1795)). In: 10. makov3y ob3asnik, Sborn3k odborn3ch semin3r3ů „M3k v roce 2011“. 3ZU, 82-83.

KHAN, A.J.K. (1992) Studies on fungi causing seed-borne diseases of wheat and rice and their control. Doctoral thesis. University of Karachi, Karachi. 261 str.

KHAN, M.Y., DAHOT, M.U. (2010) Effect of variol agriculture Wales and pure sugars on the production of single cell protein by *Penicillium expansum*. World Applied Sciences Journal 8: 80-84.

KIRK, P.M., CANNON, P.F., MINTER, D.W., STALPERS, J.A. (Eds.) (2008) Dictionary of the Fungi, 10th edition. CABI, Wallingford. 771 str.

KLEČKA, A. (1934) Rostlinná produkce v našem pravěkému zemědělství. Věstník československého zemědělského muzea 3: 98-102.

KOČÁR, P., DRESLEROVÁ, D. (2010) Archeobotanické nálezy pěstovaných rostlin v pravěku České republiky. Památky archeologické 101: 203-242.

KREMER, R.J., HUGHES, L.B., ALDRICH, R.J. (1983) Examination of microorganisms and deterioration resistance mechanisms associated with velvetleaf seed. Agronomy Journal 76(5): 745-749.

KREUZ, A., SCHÄFER, E. (2008) Archaeobotanical consideration of the development of Pre-Roman Iron age crop growing in the region of Hesse, Germany, and the question of agricultural production and consumption at hillfort sites and open settlements. Vegetation History and Archaeobotany 17: 159-179.

KULHÁNEK, I. (2011) Ochrana proti houbovým chorobám máku s fungicidy BASF již 10 let. In: 10. makový občasník, Sborník odborných seminářů „Mák v roce 2011“. ČZU, 68-69.

KUTHUBUTHEEN, A.J. (1979) Thermophilic fungi associated with freshly harvested rice seeds. Transactions of the British Mycological Society 73: 357-359.

KUTHUBUTHEEN, A.J., WEBSTER, J. (1986) Water availability and the coprophilous fungus succession. Transactions of the British Mycological Society 86(1): 63-76.

KŮDELA, V., BARTOŠ, P., ČAČA, Z., DIRLBEK, J., FRIC, F., LEBEDA, A., ŠEBESTA, J., ULRYCHOVÁ, M., VALÁŠKOVÁ, E., VESELÝ, D. (1989) Obecná fytopatologie. Academia, Praha. 388 str.

LARSEN, T.O., FRISVAD, J.C. (1998) Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on blackcurrant and cherry juice. *Food Additives and Contaminants* 15(6): 671-675.

LEICHTFRIED, D., KRIST, S., PUCHINGER, L., MESSNER, K., BUCHBAUER, G. (2004) Investigation of the natural microflora of poppy seeds (*Papaver somniferum*) and hazelnut kernels (*Corylus avellana*) including microbiological decomposition. *European Food Research and Technology* 219: 282-285.

LESLIE, J. F., SUMMERELL, B. A., BULLOCK, S. (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, Iowa. 388 str.

LESLIE, J. F., BANDYOPADHYAY, R., VISCONTI, A. (Eds.) (2008) Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade. CABI, Wallingford. 476 str.

LILLEHOJ, E.B., FENNELL, D.I., KWOLEK, W.F. (1976) *Aspergillus flavus* and aflatoxin in Iowa corn before harvest. *Science* 193: 495-496.

LUGAUSKAS, A., REPECKIENE, J., NOVOSINSKAS, H. (2005) Micromycetes, producers of toxins, detected on stored vegetables. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 12(2): 253-260.

MALAKER, P.K., MIAN, I.H., BHUIYAN, K.A., AKANDA, A.M., REZA, M.M.A. (2008) Effect of storage containers and time on seed quality of wheat. *Bangladesh Journal of Agricultural Research* 33(3): 469-477.

MALÍŘ, F., OSTRÝ, V. (Eds.) (2003) Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno. 349 str.

MARASAS, W.F.O., LEISTNER, L., HOFMANN, G., ECKHART, C. (1979) Occurrence of toxigenic strains of *Fusarium* in maize and barley in Germany. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 7: 289-305.

MAUDE, R.B. (1996) Seedborne diseases and their control: Principles and practice. CAB International, Wallingford. 280 str.

MCDONALD, D. (1970) Fungal infection of groundnut fruit before harvest. Transactions of the British Mycological Society 54: 453-460.

MEDIĆ-PAP, S., MILOŠEVIĆ, M., JASNIĆ, S. (2007) Soybean seed-borne fungi in the Vojvodina province. The Polish Phytopathological Society 45: 55-65.

MOUBASHER, A.H., EL-NAGHY, M.A., ABDEL-HAFEZ, S.I. (1972) Studies on the fungus flora of three grains in Egypt. Mycopathology 47: 261-274.

MULLIS, K.B., FALOONA, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase – catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 155: 335-350.

NASIR, N. (2003) Effect of fungicides in limiting the growth of seed borne fungi of soybean. Pakistan Journal of Plant Pathology 2(2): 119-122.

NAZAR, R.N., HU, X., SCHMIDT, J., CULHAM, D., ROBB, J. (1991) Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology 39(1): 1-11.

NIGAM, N., RAI, B. (1988) *Cladosporium cladosporioides* as a mycoparasite of *Peronospora arborescens*. Acta Botanica Indica 16(2): 257-259.

NIK, W.Z. (1980) Seed-borne fungi of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) and their control. Pertanika 3(2): 125-132.

NIK, W.Z., PARBERY, D.G. (1977) Studie sof seed-borne fungi of tropical pasture legume species. Australian Journal of Agricultural Research 28(5): 821-841.

NOVÁK, J., PREININGER, V. (1981) Taxonomické a fytochemické hodnocení rodu *Papaver* (*Papaveraceae*). Vydala Vysoká škola zemědělská v Praze, Praha, 157 str.

NWACHUKWU, E.O., UMECHURUBA, C.I. (2001) Antifungal activities of some leaf extracts on seed-borne fungi of african yam beans seeds, seed germination and seedling emergence. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 5(1): 29-32.

O'NEILL, N.R., JENNINGS, J.C., BAILEY, B.A., FARR, D.F. (2000) *Dendryphion penicillatum* and *Pleospora papaveracea*, destructive seedborne pathogens and potential mycoherbicides for *Papaver somniferum*. *Phytopathology* 90 (7): 691-698.

PARTIDA-MARTINEZ, L. P., FLORES DE LOOB, C., ISHIDA, K., ISHIDA, M., ROTH, M., BUDER, K., HERTWECK, CH. (2007) Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the zygomycota, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (3): 793-797.

PETRIE, G.A. (1974) Fungi associated with seeds of rape, turnip rape, flax, and safflower in western Canada. *Canadian Plant Disease Survey* 54(4): 155-165.

PITT, J. I., HOCKING, A.D. (1997) *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edition. Blackie Academic and Professional, London. 593 str.

PITT, J.I., HOCKING, A.D., BHUDHASAMAI, K., MISCAMBLE, B.F., WHEELER, K.A., TANBOON-EK, P. (1994) The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology* 23: 35-53.

PROCHÁZKOVÁ, Z. (2007) K problematice hub na semenech lesních dřevin. In: Aktuální problémy ochrany lesa, Setkání lesníků tří generací. Sborník referátů ze semináře, 13. září 2007, Praha. *Zpravodaj ochrany lesa* 14: 8-13.

PROKINOVÁ, E. (1997) Škodlivost patogenů přenosných osivem. In: Osivo a sadba: III. národní seminář k polním plodinám. Sborník referátů ze semináře, 11. března 1997, Praha. ČZU, 63-69.

PROKINOVÁ, E. (2011) Uznané mořené osivo je příliš drahé? *Zemědělec* 1: 11.

PROKINOVÁ, E., DVOŘÁK, L. (2011) Význam ošetření osiva máku. In: 10. makový občasník, Sborník odborných seminářů „Mák v roce 2011“. ČZU, 63-67.

RADIŠEK, S., JAKŠE, J., SIMONČIČ, A., JAVORNIK, B. (2003) Characterization of *Verticillium albo-atrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. Plant Disease 87(6): 633-638.

RAPER, K. B., FENNELL, D. I. (1965) The Genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. 686 str.

RAPER, K. B., THOM, CH. (1949) Manual of the *Penicillia*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. 875 str.

RAYNER, A.D.M. (1977) Fungal colonization of hardwood stumps from natural sources: I. Non-basidiomycetes. Transactions of the British Mycological Society 69(2): 291-302.

RICHARDSON, M.J. (1990) An annotated list of seed-borne diseases. Fourth edition. The International Seed Testing Association, Zürich

RICHTER, R., LOŠÁK, T. (2004) Aktuální otázky výživy máku. In: 3. makový občasník, Sborník odborných seminářů „Mák v roce 2004“. ČZU, 27-31.

ROTHER, S.P., WADEKAR, C.S. (2011) Studies on seed mycoflora of some medicinal plants in Acala district (MS) India. Bioscience Discovery 2(2): 196-198.

SAHIN, I., KALYONCUOGLU, M.E. (1994) Erkenntnisse über die Schimmelpilze in der Mikroflora von Hassel-, Walnüssen und Sonnen- Blumenkernen. Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel 16: 85-92.

SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C. (2004) Introduction to food- and airborne fungi, 7th edition. CBS, Utrecht. 389 str.

SANDERSON, P.G., SPOTTS, R.A. (1995) Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. Phytopathology 85(1): 103-110.

SHAHNAZ, D., GHAFAR, A. (1991) Detection of the seedborne mycoflora of sunflower. *Pakistan Journal of Botany* 23: 173-178.

SCHEVEN VON, R., LEBIEDZ, P., SPIEKER, T., UEKOETTER, A., BERDEL, W.E., KESSLER, T. (2011) Fulminant invasive pulmonary mucormycosis with *Rhizopus oryzae* in a patient with severe aplastic anaemia and common variable immunodeficiency. *Mycoses* 55(2): e32-e35.

SCHOTHORST, R.C., VAN EGMOND, H.P. (2004) Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states": Subtask: trichothecenes. *Toxicology Letters* 153(1): 133-143.

SIMPSON A. G. B., ROGER A. J. (2004): The real kingdoms of eukaryotes. *Current Biology* 14: R 693-R696.

SINGH, J., SRIVASTAVA, S., SHIKHA, SINHA, A., BOSE, B. (2011) Studies on seed mycoflora of wheat (*Triticum aktivum* L.) treated with potassium nitrate and its effect on germination during storage. *Research Journal of Seed Science* 4(3): 148-156.

SMITH, H.C. (1965) The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, and *V. tricorpus*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 8(3): 450-478.

STEJSKAL, V., HUBERT, J., KUBÁTOVÁ, A. (2002) Associated-food-hazards: Storage fungi and mites in poppy, mustard, lettuce and wheat. *Plant Protection Science* 38(2): 673-680.

TABER, W.A., HEACOCK, R.A. (1962) Location of ergot alkaloid and fungi in the seed of *Rivea corymbosa* (L.) Hall, f., "Ololiuqui". *Canadian Journal of Microbiology* 8(1): 137-143.

VAN DEN BERG, N., SERFONTEIN, S., MUNRO, C. (2008) First report of raceme blight caused by *Cladosporium cladosporioides* on macadamia nuts in South Africa. *Plant Disease* 92(3): 484.

VAŠÁK, J. A KOL. (2010) Mák. Powerprint, Praha. 352 str.

VIEIRA, M.R., MILHEIRO, A., PACHECO, F.A. (2001) Phaeohyphomycosis due to *Cladosporium cladosporioides*. *Medical Mycology* 39(1): 135-137.

VLAŽNÝ, P., CIHLÁŘ, P., VAŠÁK, J. (2010) Možnosti využití diagnostických metod v systému ochrany proti krytonosci kořenovému a plísni makové v jarním máku. In: 10. makový občasník, Sborník odborných seminářů „Mák v roce 2011“. ČZU, 77-81.

WATSON, D.H. (1984) An assessment of food contamination by toxic products of *Alternaria*. *Journal of Food Protection* 47: 485-488.

WEI, Z., XIANGZONG, K., HONGGUO, L. (2001) Phaeohyphomycosis caused by *Cladosporium herbarum*: the first case report in China. *China Journal of Leprosy and Skin Diseases* 17(2): 135-142.

WICKLOW, D.T., STUBBLEFIELD, R.D., HORN, B.W., SHOTWELL, O.L. (1988) Citreoviridin levels in *Eupenicillium ochrosalmoneum* - infested meize kernels at harvest. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1096-1098.

WINKLER, S., SUSANI, S., WILLINGER, B., APSNER, R., ROSENKRANZ, A.R., PÖTZI, R., BERLAKOVICH, G.A., POHANKA, E. (1996) Gastric mucormycosis due to *Rhizopus oryzae* in a renal transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology* 34(10): 2585-2587.

YEGRES, F., YEGRES, N.R., NISHIMURA, K., MIYAJI, M. (1991) Virulence and pathogenicity of human and environmental isolates of *Cladosporium carrionni* in new born ddY mice. *Mycopathologia* 114: 71-76.

YOUSSEF, M.S., EL-MAHMOUDY, E.M., ABUBAKR, M.A.S. (2008) Mesophilic fungi and mycotoxins contamination of Libyan cultivated four fabaceae seed. Research Journal of Microbiology 3(7): 520-534.

Internetové odkazy:

- www.biolib.cz
- www.condalab.com/pdf/1024.pdf
- www.mycobank.org
- www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/images/plisne/perokresby