

**Mendelova univerzita v Brně**

**Zahradnická fakulta v Lednici**



**Zahradnická  
fakulta**

**Ověření účinnosti ošetření osiva nízkoteplotním plazmatem  
s ohledem na zdravotní stav a produkční vlastnosti**

**Diplomová práce**

Vedúci diplomovej práce

doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.

Vypracoval

Bc. Filip Gazdík

Lednice 2017

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Filip Gazdík**  
Studijní program: Zahradnické inženýrství  
Obor: Zahradnictví  
Název tématu: **Ověření účinnosti ošetření osiva nízkoteplotním plazmatem s ohledem na zdravotní stav a produkční vlastnosti**  
Rozsah práce: 50 stran

Zásady pro vypracování:

1. Jedním z perspektivních směrů v potravinářství, které směřují k eliminaci kontaminací nežádoucími patogeny, je využití metod fungujících na základě emise vhodného záření či částic. V tomto ohledu byl nedávno popsán antibakteriální účinek tzv. studené plazmy. I v semenářském průmyslu známe některé patogeny jako je např. bakterie *Xanthomonas campestris p. campestris*, jejichž přítomnost v osivu je vysoce nežádoucí. Prvotním úkolem bude shromáždit dostupné informační zdroje na téma přístupů používaných v semenářském průmyslu pro eliminaci nežádoucích patogenů a zpracovat získané informace v literárním úvodu DP.
2. Ověřit účinek studené plazmy popř. jiných typů fyzikálního ošetření na osivo zelí hlávkového s ověřeným výskytem Xcc prostřednictvím polních pokusů s takto ošetřeným a neošetřeným osivem. Úkolem bude vést fotodokumentaci porostů a hodnotit jejich kondici.
3. V diskusi zhodnotit celkové výhody a nevýhody takového ošetření.

Seznam odborné literatury:

1. SOPER, D. *A Guide to Seed Treatments in the UK*. 4. vyd. Farnham: British Crop Protection Council, 2001. 52 s. ISBN 1-901396-28-2.
2. CHLOUPEK, O. *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. 3. vyd. Praha: Academia, 2008. 307 s. Česká matice technická. ISBN 978-80-200-1566-2.
3. BENECH-ARNOLD, R. L. – SANCHEZ, R. A. *Handbook of seed physiology : applications to agriculture*. New York: Food Products Press, 2004. 480 s. ISBN 1-56022-929-2.
4. BIDDLE, A. *Seed Treatment : Challenges & Opportunities*. Farnham: British Crop Protection Council, 2001. 14 s. ISBN 1-901396-76-2.
5. VALŠÍKOVÁ, M. – KOPEC, K. *Semenářství zeleniny a květín*. 1. vyd. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2010. 131 s. ISBN 978-80-552-0487-1.
6. Randeniya, L. K., & de Groot, G. J. (2015). Non-Thermal Plasma Treatment of Agricultural Seeds for Stimulation of Germination, Removal of Surface Contamination and Other Benefits: A Review. *Plasma Processes and Polymers*, 12(7), 608-623.

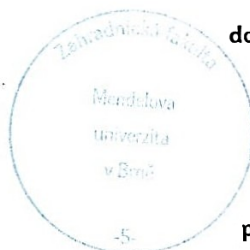
Datum zadání diplomové práce: leden 2016


Termín odevzdání diplomové práce: květen 2017

L. S.

  
**Bc. Filip Gazdík**  
Autor práce

  
**doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.**  
Vedoucí ústavu



  
**doc. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.**  
Vedoucí práce

  
**prof. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.**  
Děkan ZF MENDELU

## Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že som prácu *Ověření účinnosti ošetření osiva nízkoteplotním plazmatem s ohledem na zdravotní stav a produkční vlastnosti* vypracoval samostatne a všetky použité pramene a informácie uvádzam v zozname použitej literatúry. Súhlasím, aby moja práca bola zverejnená v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách v znení neskorších predpisov a v súlade s platnou Smernicou o zverejňovaní vysokoškolských záverečných prác.

Som si vedomý, že sa na moju prácu vzťahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon a že Mendelova univerzita v Brne má právo na uzavretie licenčnej zmluvy a použitie tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona.

Ďalej sa zaväzujem, že pred spísaním licenčnej zmluvy o použití diela inou osobou (subjektom) si vyžiadam písomné stanovisko univerzity, že predmetná licenčná zmluva nie je v rozpore s oprávnenými záujmami univerzity a zaväzujem sa uhradiť prípadný príspevok na úhradu nákladov spojených so vznikom diela, a to až do jej skutočnej výšky.

V Lednici, dňa: .....

.....

Podpis

## **Pod'akovanie**

Chcel by som poďakovať vedúcemu práce, pánovi doc. Mgr. Miroslavovi Baránkovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť a za pomoc pri spracovávaní tejto diplomovej práce.

Ďalej by som chcel poďakovať Ing. Bc. Eliške Peňázovej za odborné vedenie pri laboratórnych prácach a za trpezlivosť a Ing. Jakubovi Pečenkovi za pomoc pri ošetrovaní experimentu počas mojej neprítomnosti.

A v neposlednej rade by som chcel poďakovať mojej rodine, ktorá ma po celú dobu môjho štúdia plne podporovala a bez ktorej by som to nebol dokázal.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>2. CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>10</b>
<b>3. LITERÁRNY PREHĽAD .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Metódy úpravy osiva .....</b>	<b>11</b>
3.1.1 Mechanické metódy ošetrovania osiva .....	11
3.1.1.1 <i>Predčistenie</i> .....	12
3.1.1.2 <i>Dosušenie</i> .....	12
3.1.1.3 <i>Skarifikácia</i> .....	13
3.1.1.4 <i>Kalibrácia</i> .....	13
3.1.2 Fyzikálne metódy ošetrovania osiva .....	14
3.1.2.1 <i>Stratifikácia</i> .....	14
3.1.2.2 <i>Hydratačné metódy</i> .....	15
3.1.2.2.1 <i>Prehydratácia</i> .....	15
3.1.2.2.2 <i>Priming</i> .....	15
3.1.2.3 <i>Nakličovanie</i> .....	17
3.1.2.4 <i>Vysoké teploty</i> .....	18
3.1.2.4.1 <i>Ošetrovanie horúcou vodou</i> .....	18
3.1.2.4.2 <i>Ošetrovanie horúcim vzduchom</i> .....	18
3.1.2.4.3 <i>Ošetrovanie horúcou parou</i> .....	19
3.1.2.4.4 <i>Mikrovlnné ošetrovanie</i> .....	19
3.1.2.5 <i>Nízke teploty</i> .....	19
3.1.2.6 <i>Ožarovanie</i> .....	20
3.1.2.7 <i>Elektromagnetické pole</i> .....	20
3.1.2.8 <i>Oxid uhličitý</i> .....	20
3.1.2.9 <i>Studená plazma</i> .....	20
3.1.3 Chemické metódy ošetrovania osiva .....	22
3.1.3.1 <i>Mokrú morenie</i> .....	22
3.1.3.2 <i>Suché morenie</i> .....	23
3.1.4 Biologické metódy ošetrovania osiva .....	23
3.1.4.1 <i>Stimulátory</i> .....	24

3.1.4.2	<i>Stopové prvky</i> .....	24
3.1.4.3	<i>Inokulácia mikrobiálnymi kultúrami</i> .....	24
3.1.4.4	<i>Výťažky z rastlín</i> .....	26
3.1.5	Kombinované metódy ošetrovania osiva .....	26
3.1.5.1	<i>Obalovanie</i> .....	26
3.1.5.2	<i>Peletizácia</i> .....	27
3.1.5.3	<i>Inkrustácia</i> .....	27
<b>3.2</b>	<b>Studená plazma v praxi</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b><i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i></b> .....	<b>31</b>
3.3.1	Opis patogénu .....	31
3.3.2	Životný cyklus .....	32
3.3.3	Možnosti ochrany .....	33
<b>4.</b>	<b>MATERIÁL A METÓDY</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Opis modelovej plodiny</b> .....	<b>35</b>
4.1.1	Opis pestovaného kultivaru .....	35
<b>4.2</b>	<b>Opis lokality pokusu</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Založenie a ošetrovanie pokusu</b> .....	<b>35</b>
4.3.1	Úprava osiva pred výsevom .....	35
4.3.2	Dizajn pokusu .....	36
4.3.3	Príprava pozemku .....	37
4.3.4	Výsev .....	37
4.3.5	Okopávanie, pletie .....	37
4.3.6	Pretrhávajúce .....	37
4.3.7	Chemická ochrana .....	37
4.3.8	Zber .....	38
<b>4.4</b>	<b>Hodnotené parametre</b> .....	<b>38</b>
4.4.1	Klíčivosť .....	38
4.4.2	Zdravotný stav .....	38
4.4.3	Vitalita .....	38
4.4.4	Výnos .....	39
4.4.5	Skladovateľnosť .....	39
<b>4.5</b>	<b>Termínovanie úkonov</b> .....	<b>39</b>

<b>4.6 Laboratórne metódy .....</b>	<b>40</b>
4.6.1 Kultivácia osiva na médiu.....	40
4.6.2 Izolácia DNA .....	40
4.6.3 PCR.....	41
<b>5. VÝSLEDKY PRÁCE.....</b>	<b>42</b>
<b>5.1 Vplyv ošetrovania na klíčivosť .....</b>	<b>42</b>
<b>5.2 Vplyv ošetrovania na zdravotný stav .....</b>	<b>43</b>
<b>5.3 Vplyv ošetrovania na vitalitu .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4 Vplyv ošetrovania na výnos .....</b>	<b>46</b>
<b>5.5 Skladovateľnosť .....</b>	<b>47</b>
<b>6. DISKUSIA.....</b>	<b>48</b>
<b>7. ZÁVER.....</b>	<b>50</b>
<b>8. SÚHRN A RESUME, KĹÚČOVÉ SLOVÁ.....</b>	<b>52</b>
<b>9. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>53</b>
<b>9.1 Knižné zdroje .....</b>	<b>53</b>
<b>9.2 Internetové zdroje.....</b>	<b>56</b>
<b>10. PRÍLOHY .....</b>	<b>64</b>
<b>10.1 Zoznam obrázkov .....</b>	<b>64</b>
<b>10.2 Zoznam grafov, schém a tabuliek .....</b>	<b>65</b>



## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

Xcc – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

TVI – *Trichoderma virens*

MPA – mäsopeptónový agar

Px – Phyto Xano Camp Agar Base

PCR – polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

NK – negatívna kontrola (variant)

PK – pozitívna kontrola (variant)

NP – negatívny, plazmovaný variant

PP – pozitívny, plazmovaný variant

NPH – negatívny, plazmovaný, morený (TVI) variant

PPH – pozitívny, plazmovaný, morený (TVI) variant

# 1. ÚVOD

V dnešnej dobe, kedy ľudská populácia stále narastá a miznú sa zdroje energií a potravín, začínajú si ľudia stále viac uvedomovať dôležitosť poľnohospodárstva ako jedného z najdôležitejších zdrojov obživy. Poľnohospodárstvo samotné vždy bolo a vždy bude, ale postupom času pôdy degradujú a zvyšuje sa tlak chorôb a škodcov. Z tohto dôvodu sa stále vyvíjajú nové chemické prípravky, ktoré sú však väčšinou škodlivé pre životné prostredie a čo je horšie, škodcovia sa im časom prispôbujú a tým sa ich účinok vytráca.

Jedným z možných spôsobov ochrany plodín pred chorobami a škodcami je predsejbová úprava osiva, ktorá osivo od vysatia chráni a tiež môže podporovať jeho ďalší rast. Táto práca popisuje rôzne metódy ošetrovania osiva, od starých osvedčených metód, ako napríklad namáčanie vo vode, až po nové experimentálne metódy ako napríklad mikrovlnné žiarenie alebo ošetrovanie studenou plazmou. Ďalej opisuje konkrétny patogén, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson, jeho vplyv na rastliny a možnú ochranu.

## 2. CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bolo overiť účinnosť ošetrovania osiva studenou (nízkoteplotnou) plazmou. Vypracovať literárny prehľad o možnostiach ošetrovania osiva, so zameraním na patogén *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. Ďalej overiť účinok ošetrovania osiva kapusty hlávkovej (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) s overeným výskytom zmieneného patogénu studenou plazmou prostredníctvom poľného pokusu s takto ošetrovaným a neošetrovaným osivom. Cieľom pokusu bolo zhodnotiť vplyv ošetrovania osiva na zdravotný stav a produkčné vlastnosti plodiny.

## 3. LITERÁRNY PREHĽAD

### 3.1 Metódy úpravy osiva

Pojem ošetrovanie osiva predstavuje fyzikálnu, chemickú alebo biologickú úpravu osiva pred výsevom s cieľom potlačiť, obmedziť alebo vyhubiť patogény, hmyz alebo škodcov, ktorí napádajú osivo, sadenice alebo rastliny a zahŕňa metódy od základného namáčania až po peletizáciu (Sharma a kol., 2015). Ďalej má za cieľ zvýšiť životnosť osiva, stimulovať klíčenie, stimulovať jeho synchronizáciu, chrániť pred kontamináciou (Valšíková a Kopec, 2010) a odbúrať dormanciu (Sharma a kol., 2015). Samotné ošetrovanie osiva však nie je úplne spoľahlivé, pretože existuje množstvo patogénov, u ktorých nie sú známe metódy úpravy, ktoré by zničili patogén, ale zároveň nepoškodili samotné osivo (Neergaard, 1969).

Desai (2004) uvádza, že hlavné choroby a škodcovia, ktorých je možné odstrániť metódami ošetrovania osiva sú:

- Systémové choroby napádajúce semená počas zberu a skladovania,
- Systémové choroby napádajúce semená v štádiu kvitnutia rastliny,
- Nesystematické choroby napádajúce semená počas zberu a skladovania,
- Hniloby semien a plesne semenáčov,
- Skladoví a pôdni škodcovia.

#### 3.1.1 Mechanické metódy ošetrenia osiva

Osivo dopestované na poli môže obsahovať podstatné množstvo rastlinných a ďalších prímiesí, od menej ako 20% až do viac ako 80% v závislosti na druhu rastliny a metóde zberu (McDonald a Kwong, 2005). Bezprostredne po zbere je nutné osivo ošetriť, aby sa zabránilo stratám na kvalite. Medzi prvé zásahy patrí predčistenie a dosušenie. Pri technologických úpravách osiva dochádza k zložitej manipulácii a preto je nutné dbať na to, aby nedochádzalo k mechanickému poškodzovaniu osiva (Ehrenbergerová, 2014). Mechanické metódy úpravy osiva sú navrhnuté na odstraňovanie infekčných prímiesí z osiva. Takto upravené osivo však zvyčajne nie je úplne zbavené patogénov a vyžaduje preto ďalšie ošetrenia (Desai, 2004).

### 3.1.1.1 *Predčistenie*

Predčistenie musí nasledovať bezprostredne po zbere. Je nutné vtedy, keď osivo obsahuje veľa prímiesí, tj. úlomkov rastlín, prachu a kamienkov, pretože je vysoké riziko zaparenia a straty vitality a klíčivosti (Chloupek, 2008). Dôležité je odstrániť hlavne prach, ktorý bráni priechodu vzduchu a zelených častí rastlín, z ktorých sa dostáva vlhkosť do už suchých semien (Ehrenbergerová, 2014).

Na predčisťovanie osiva sa spravidla využívajú jednoduché zariadenia pracujúce na princípe separácie na základe špecifickej hmotnosti, veľkosti alebo tvaru semien. Klasické čistiace postupy využívajú separáciu za pomoci prúdu vzduchu, prepád osiva rôznej hmotnosti a tvaru na sitách rôznych rozmerov, vytriasanie a nárazové triedenie, rotovanie plošín alebo valcov s rôznymi úpravami povrchov, prichytávanie osiva na drsnom povrchu, pôsobenie magnetu pri primiešaní železného prachu k niektorým semenám burín a mnohé ďalšie postupy (Houba a Hosnedl, 2002). Moderné postupy využívajú aj obrazové analýzy, kedy je v pamäti fixovaný veľkostný a tvarový ideotyp semena príslušnej odrody a ostatné sa vylučujú (Ehrenbergerová, 2014).

### 3.1.1.2 *Dosušenie*

Rozhodujúcou úpravou semien je zníženie ich vlhkosti pred ďalšou manipuláciou. Prírodné osivo s obsahom vody 16 – 25% (niekedy aj viac) treba dosúšať najmenej pod 12% podľa požiadaviek normatívu pre jednotlivé druhy, optimálne na 7 až 9%, podľa druhu. Na dlhšie uskladnenie náchylnejších semien je vhodnejšie dosušenie až na 5 až 6%. Odporúčaná teplota pre dosušenie je 30 – 35 °C, závisí to však na druhu, odrode, stupni zrelosti a iných, často nekontrolovateľných faktoroch (Valšíková a Kopec, 2010).

Chloupek (2008) uvádza, že vhodnými podmienkami pre dosušenie sú postupné znižovanie vlhkosti a teplota neprevyšujúca 25 °C. Rýchlosť sušenia je obecné závislá na veľkosti semien; veľké vysychajú pomalšie a pokiaľ sa rýchlo zvýši ich teplota, dochádza k vnútornému pnutiu a môžu praskať. Preto sa musia dosúšať pomaly. Nedošeté semená sa dosušajú pomalšie ako zrelé, pretože je v nich voda inak viazaná. Najúčinné je dosušenie teplým vzduchom, pretože ohriatie vzduchu o 1 °C zníži jeho relatívnu vlhkosť o 4 – 5%.

K bezpečnému zníženiu vlhkosti sa najlepšie hodia roštové sušiarne vybavené aktívnou ventiláciou studeným, poprípade podľa potreby predhriatym vzduchom,

so šnekovým alebo iným premiešavaním. Malé množstvá osiva je možné prehadzovať aj ručne pri rozložení na drevených alebo sacích podlahách v tenkej vrstve. V praxi sa tiež používajú kontajnery so sieťovaným dnom, ktoré možno vrstviť na seba a aktívne ich prevetrávať (Houba a Hosnedl, 2002).

#### 3.1.1.3 *Skarifikácia*

Nepriepustnosť osemenia je vlastnosť niektorých semien, kedy je osemenie nepriepustné pre vodu. Pojem skarifikácia označuje procedúru, ktorá modifikuje osemenie tak, aby umožnilo príjem vody a výmenu plynov a vytvorila priestor pre vývoj embrya (Safo a kol., 2001). Kimura a Islam (2012) označujú skarifikáciu ako techniku fyzikálneho poškodzovania osemenia, s cieľom oslabiť jeho tvrdosť, pričom sa zachová životaschopnosť semena.

Dôležité metódy skarifikácie semien zahŕňajú skarifikáciu vysokou teplotou, prerušovanou teplotou, mechanickú skarifikáciu a chemickú skarifikáciu (kyselinou). Skarifikácia vysokou teplotou pracuje na princípe narušenia alebo naprasknutia osemenia pôsobením vysokých teplôt. Metóda prerušovanej teploty spočíva v narušení osemenia vystavením semena teplotným rozdielom, minimálnej a maximálnej teplote. Mechanická skarifikácia zahŕňa mechanické vytvorenie rýh na osemení pre zvýšenie príjmu vody. Skarifikácia kyselinou je chemická metóda naleptania osemenia, čím sa znižuje jeho tvrdosť (Kimura a Islam, 2012). Hrušková a Hofbauer (1999) ďalej uvádzajú metódy ako napríklad zahrievanie semien vo vlhkej atmosfére, namáčanie semien vo vode a zahriatie na danú teplotu, ožarovanie infračervenými lúčmi, pôsobenie ultrazvuku, pôsobenie lúhov, kyselín, organických látok a iné.

#### 3.1.1.4 *Kalibrácia*

Kalibrácia (frakcionácia) je veľkostné triedenie podľa dĺžky a šírky, alebo podľa hmotnosti semena. Dosahuje sa ňou vyšší podiel klíčivých semien. Väčšie frakcie dávajú vitálnejšie porasty a často aj vyššiu a skoršiu úrodu. Môže sa vykonávať po zbere alebo v rámci predsejbovej prípravy. Väčšinou vznikajú tri frakcie: a to najmenšie, stredné a najväčšie semená. Veľkosť semien jednotlivých frakcií je daná druhom. Biologicky najhodnotnejšie osivo býva zo strednej frakcie, napriek tomu sú najviac žiadané najväčšie frakcie. Výsev kalibrovaného osiva zabezpečuje rovnomerný výsev, rovnomerné

vzchádzanie a vývoj. Vybrané, biologicky jednotné frakcie osiva poskytujú vyrovnanejšiu poľnú vzchádzavosť a jednotnejší porast, ktorý má predpoklady vyššieho nárastu biomasy a úrody. Veľkostne alebo hmotnostne frakciované osivo má vyššiu klíčivosť o 4 – 11% (Valšíková a Kopec, 2010).

### 3.1.2 Fyzikálne metódy ošetrovania osiva

Fyzikálne metódy úpravy osiva sú používané primárne na likvidáciu patogénov nachádzajúcich sa vnútri semien. Avšak, nechrania semená pred pôdnymi organizmami, ale sú efektívne len voči patogénom nachádzajúcich sa na alebo v semenách (Desai, 2004).

McDonald a Kwong (2005) upozorňujú na to, že metódy spadajúce pod pojem „priming“ ako napríklad osmokondicionovanie, matrikondicionovanie, tekutý priming a iné, slúžia na podporu klíčenia, ale nevedú ku klíčeniu samotnému. Zmyslom týchto ošetrení je prinútiť semeno dokončiť prvé fázy klíčenia pred samotným výsevom. Naopak metóda nakličovania býva často spojovaná s primingom, avšak nakličovacie metódy vedú už k samotnému prerazeniu klíčku osemením.

Zulueta-Rodríguez a kol. (2015) poukazujú na to, že priming by sa nemal brať na ľahkú váhu, pretože s tým ako zvyšuje rýchlosť a uniformitu klíčenia, môže aj podporovať rast a rozvoj hubových ochorení.

#### 3.1.2.1 Stratifikácia

Stratifikácia je odborný botanický termín, týkajúci sa pozberového dozrievania semien rastlín, napr. semien drevín a trvaliek. Zvyčajne ide o technológiu umožňujúcu klíčenie, alebo ovplyvňujúcu vlastnosti klíčenia. Bežným spôsobom pri niektorých druhoch je stratifikácia zberaných semien v jemnom suchom piesku v bezmrazivej miestnosti pri priemernej teplote 10 – 15 °C. To umožňuje i odložiť výsev na vhodný jarný termín. Semená okrasných drevín sa stratifikujú v primerane vlhkom piesku a vysievajú sa až keď začnú klíčiť. Semená niektorých rastlín vyžadujú stratifikáciu v tráviacom systéme živočíchov a iné lepšie klíčia po premrznutí (Valšíková a Kopec, 2010).

### 3.1.2.2 Hydratačné metódy

Metódy založené na čiastočnej hydratácii semien pred výsevom, bez toho, aby došlo ku klíčeniu. Princíp úpravy spočíva v úplnom alebo čiastočnom napučaní semien, ktoré je postačujúce na aktiváciu metabolických procesov, ale už nie na klíčenie. Po tomto ošetrení sa musia semená opätovne vysušiť (Ehrenbergerová, 2014). Hydratačné úpravy sa využívajú predovšetkým u osiva zeleniny a kvetín (Chloupek, 2008).

#### 3.1.2.2.1 Prehydratácia

Metóda s neriadeným príjmom vody, ktorá je semenám voľne dostupná a jej príjem je regulovaný len vodným potenciálom semena. Proces musí byť včas ukončený, aby nedošlo k predčasnému vyklíčeniu semien (zvyčajne trvá 6 – 12 hodín, v závislosti na botanickom druhu) (Valšíková a Kopec, 2010). Množstvo prijatej voľne dostupnej vody sa pohybuje okolo 50% hmotnosti čerstvého semena (McDonald a Kwong, 2005).

#### 3.1.2.2.2 Priming

Z anglického slova „the prime“ = začiatok, „naštartovanie“ klíčenia. Všetky spôsoby primingu majú podobný princíp, ktorého prínosom je zmäkčenie pletív, retardácia rastu korenkov a embrya, zvýšenie syntézy makromolekúl, aktivity enzýmov a metabolizmu (Chloupek, 2008). Princíp spočíva v napučaní semena v osmotickom roztoku, čo mu umožní nasiaknuť vodu a započat' tak prvé fázy klíčenia. Následne sú semená vysušené na ich pôvodný obsah vody a uskladnené alebo vysiate (Matsushima a Sakagami, 2013). Proces spätného sušenia je pri všetkých uvedených metódach významným faktorom ovplyvňujúcim výslednú kvalitu osiva. Musí byť pozvoľný, v prvej fázy sušenia s rýchlym odstránením prebytočnej vody. Hydratačné úpravy sa robia ako predsejbové a nepredpokladá sa dlhodobé skladovanie (Valšíková a Kopec, 2010).

- *Osmotický priming* - metóda s riadeným príjmom vody, kedy semená napučávajú v prostredí so zníženým osmotickým potenciálom (osmokondicionovanie) (Valšíková a Kopec, 2010). Ako osmotikum sa používajú roztoky rôznych zlúčenín, napríklad soli  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NaCl}$  alebo organické zlúčeniny ako polyethylenglykol (PEG), glycerol alebo mannitol. Výhodou solí



je, že ióny solí môžu tiež byť semenami prijaté a môžu tak poskytovať semenám dusík a ďalšie prvky, avšak nevýhodou je ich možná toxicita pre semená (Houba a Hosnedl, 2002). Semená inkubované v roztoku PEG sú limitované v príjme vody druhom semien a koncentráciou PEG v roztoku. Množstvo prijatej vody sa pohybuje okolo 40% hmotnosti čerstvého semena (McDonald a Kwong, 2005).

- *Matričný priming* – priming v pevnej fázy (solid matrix priming – SMP), matrikondiciovanie. Namiesto roztoku sa používa pevný nosič s nízkym matričným potenciálom. Ako nosič sa používajú prírodné látky, napríklad vermikulit, rašelinník alebo piesok, alebo komerčne vyrábané nosiče, napríklad Celite, Micro-Cel (syntetický kremičitan vápenatý) alebo Zonolite (vermikulit) (Houba a Hosnedl, 2002). Ďalej sa používajú syntetické silikáty s veľkým aktívnym povrchom, schopným absorbovať živiny, pesticídy, rastové regulátory a naopak eliminovať toxické látky a inhibítory zo semien (Chloupek, 2008). Pri tejto metóde sa semená zmiešajú so zvlhčeným pevným nosičom, z ktorého prijímajú vodu. Doba expozície je dlhšia (až dva týždne) (Valšíková a Kopec, 2010). Po skončení je nosič odstránený na sítach. Použitie vermikulitu alebo jemne mletej bridlice umožňuje dodať semenám viac vzduchu ako pri použití osmotika, pretože nosič nie je nikdy úplne nasýtený a semeno sa tak stále nachádza v aneróbnom prostredí (Houba a Hosnedl, 2002).
- *Dymový priming* – (smoke priming) metóda stimulácie klíčenia dymom vzniknutým spaľovaním rastlinného materiálu (Chloupek, 2008). Kulkarni a kol. (2011) rozdeľujú formy aplikácie dymu na aerosól, dymovú vodu a zlúčeniny derivované z dymu. Aerosólová metóda spočíva v priamom vystavení osiva dymu zo spaľovaného rastlinného materiálu. Metóda aplikácie dymovej vody spočíva v ošetrovaní osiva vodou, v ktorej je rozložený dym za vzniku zriedeného dymového extraktu. Metóda ošetrovaním zlúčeninami derivovaných z dymu je založená na princípe izolácie rastových regulátorov z dymu spaľovaného rastlinného materiálu.
- *Hydropriming* – *drum priming* (kontrolovaná hydratácia, bubnový priming) – metóda, pri ktorej je k osivu pridané len presne určené množstvo vody pre dosiahnutie požadovanej vlhkosti semien. Existujú dva spôsoby aplikácie potrebného množstva vody. V prvom prípade sa presné množstvo vody pridá naraz k osivu v miešacom bubne a osivo je ponechané vlhké v uzatvorenom kontajnery (zvyčajne 14 dní). Následne je osivo vysušené na svoju pôvodnú

vlhkosť. Druhý postup spočíva v cyklickom pridávaní vody až do dosiahnutia požadovanej vlhkosti tak, aby nikdy v systéme neostala voľná neabsorbovaná voda. Po pridání vody je osivo na určitú dobu ponechané vlhké a následne vysušené (Houba a Hosnedl, 2002).

### 3.1.2.3 *Nakličovanie*

Nakličovanie je proces, pri ktorom je semenu umožnené vytvoriť klíček, (na rozdiel od primingu) a až potom je proces zastavený (McDonald a Kwong, 2005). Je kombináciou hydratačných úprav a nakličovania (Valšíková a Kopec, 2010).

Najjednoduchším spôsobom nakličovania semien je umiestniť ich do okysličenej vody na niekoľko dní. Následne na to je nutné oddeliť naklíčené semená od nenaklíčených. Jednou z možných metód je ich umiestnenie do roztoku maltrínu, pričom naklíčené semená vyplávajú na hladinu (McDonald a Kwong, 2005).

Ďalšou metódou nakličovania, ktorú popisuje Valšíková a Kopec (2010) je umiestnenie napučaných semien v tenkej vrstve na fóliu a prikrytie ďalšou fóliou, aby ostali vlhké. Nakličuje sa len do doby, kým sa objavia klíčky.

Možnosti výsevu naklíčeného osiva sú:

- *Hydrovýsev* – aplikácia naklíčených semien spolu s vodou a inými materiálmi vo forme suspenzie. Vhodné pre osievanie ťažko prístupných alebo strmých plôch trávou, kvetmi alebo inou pokryvnou vegetáciou (Benech-Arnold a Sánchez, 2004).
- *Fluidný výsev* – technika výsevu predklíčených semien v ochrannom obale. Má obmedziť vplyv prostredia na vzchádzanie, ktoré je rýchlejšie, vyrovnanjšie a dosahuje vyššiu úroveň. Často ani následné vysušenie v pôde nevedie k zhoršeniu výsledkov. Pretože občas nie je možné naklíčené semená ihneď vysiať, skladujú sa v chlade a prevetrávajú vlhkým vzduchom, alebo v plastových vreckách vo vákuu, alebo dusíku, alebo v hydroxyethyl-celulóze, tj. vo výsevnom géle, vždy za nízkych teplôt (Chloupek, 2008).
- *Výsevné pásiky* – metóda výsevu, kedy sú semená uložené náhodne alebo pravidelne medzi vrstvami biodegradovateľného papiera alebo plastu atď., vo forme rohoží, mriežok alebo úzkych pásikov, niektoré obsahujú aj rastové médiá a sú vkladané do pôdy za sucha (Benech-Arnold a Sánchez, 2004). Na pásiku alebo v pásiku býva 1 a viac druhov semien, nalepených v optimálnych

vzdialenostiach. Pásiky sa rovno kladú do riadkov v príslušnej hĺbke (Valšíková a Kopec, 2010).

- „*Umelé semená*“ – explantátové kultúry pre mikropropagáciu. „*Umelé semená*“ sú zvyčajne tvorené somatickým embryom, zabaleným do umelo vytvorených analógov semenných obalov. Takýto obal musí chrániť embryo pred dehydratáciou, pred poškodením počas skladovania a manipulácie a musí embryu umožniť spoľahlivé vyklíčenie a vzídenie v priaznivých podmienkach. Okrem embrya, vytvoreného biotechnologickými metódami, môže obal obsahovať aj živiny (umelý endosperm), prípadne aj niektoré fytohormóny, aktívne v procese klíčenia a vývoja mladej rastliny. Umelé semená môžu byť buď hydratované, alebo vysušené. Pri hydratovaných sa využíva k obalovaniu napr. polyoxyetylén alebo alginát sodný (Chloupek, 2008).

#### 3.1.2.4 *Vysoké teploty*

Ošetrovanie zvýšenou teplotou umožňuje regulovať široké spektrum patogénov a vírusov na povrchu a zväčša i vo vnútri semien. V rastlinách sa mení aktivita enzýmov, intenzita fotosyntézy a dýchania, dosahuje sa vyššia úrodnosť porastov a niekedy aj otužovanie rastlín (Valšíková a Kopec, 2010).

##### 3.1.2.4.1 *Ošetrovanie horúcou vodou*

Veľmi stará metóda ošetrovania osiva proti pôdnym chorobám za použitia teplôt dosť vysokých na to, aby usmrtili patogén, ale nie dosť vysokých na to, aby poškodili semeno. Táto metóda je ekologicky prijateľnejšia ako chemické ošetrovanie, ale môže zapríčiniť zníženie životaschopnosti semien (Sharma a kol., 2015). Osivo vo vreckách zo sieťoviny je ponárané do horúcej vody o presnej teplote, ktorá zabezpečí zničenie patogénov, pričom semená ostanú nepoškodené. Po úprave sú semená opätovne vysušené na pôvodnú vlhkosť (Houba a Hosnedl, 2002).

##### 3.1.2.4.2 *Ošetrovanie horúcim vzduchom*

Najjednoduchšou metódou ošetrovania horúcim vzduchom je solarizácia, kedy je osivo ohrievané radiáciou zo slnka. Používa sa však len v teplých krajinách, ale nie je veľmi

využívaná kvôli nepresnosti a komplikáciám pri aplikácii vo väčšej miere (Sharma a kol., 2015). Ďalšími metódami sú sušenie v peciach, veľkých komorách alebo priechodných sušičkách. Nevýhody ošetrovania horúcim vzduchom sú dlhá doba expozície, ktorá je všeobecne omnoho dlhšia ako pri aplikácii horúcej vody a nutnosť znovu hydratovať ošetrované osivo, aby sa dosiahlo dobrého klíčenia (Grondeau a kol., 1994).

#### 3.1.2.4.3 *Ošetrovanie horúcou parou*

Stredná cesta medzi ošetrovaním horúcou vodou a vzduchom. Aplikácia tohto typu ošetrovania vyžaduje špecifické zariadenie, ktoré pozostáva z komory, kde sa ukladá rastlinný materiál a kde naň prúdi vzduch. Do tohto prúdu vzduchu je vháňaná para o danej teplote a vlhkosť sa reguluje množstvom vháňanej pary. Nevýhodami tejto metódy sú potreba špecifického zariadenia, čo môže byť nákladné a to, že určitý rastlinný materiál môže byť touto metódou vážne poškodený, napr. veľké semená. Naproti tomu výhodami sú kratší čas expozície, menej absorbovanej vody ako pri ponáraní a menšie zníženie klíčivosti (Grondeau a kol., 1994).

#### 3.1.2.4.4 *Mikrovlňné ošetrovanie*

Aplikácia mikrovlňnej radiácie s cieľom vyhubiť patogény v semenách. Mikrovlňná radiácia môže zabíjať mikroorganizmy teplom, ale tiež by mohla rozrušovať patogénne bunky (Grondeau a kol., 1994).

#### 3.1.2.5 *Nízke teploty*

Pri niektorých druhoch zeleniny môže viesť ošetrovanie nízkymi teplotami k urýchleniu zberu, zvýšenie úrod a otužilosti proti jarným mrazom. Zvýši sa aj energia klíčenia. Potvrdilo sa to pri teplomilných zeleninách (rajčiakoch, uhorkách, paprike), aj pri cibuli, mrkve a petržlene. Metóda spočíva v tom, že osivo sa nechá najprv napučať vo vode na 12 hodín. Potom sa vystaví striedavým teplotám, a to po dobu 12 hodín teplotám od 0 do -2 °C a na ďalších 12 hodín teplote okolo 21 °C. Takto sa striedajú teploty po dobu 7 – 10 dní. Pritom treba semená miešať a kropiť vodou, aby nevyschli. Ak sa pri hlúbovinách použije nízka teplota -2 až -4 °C, nevybiehajú predčasne do kvetu. Po skončení procesu je potrebné semená ihneď osušiť (Valšíková a Kopec, 2010).

### 3.1.2.6 *Ožarovanie*

Sharma a kol. (2015) zmiňujú metódy ošetrovania osiva ožarovaním, ktoré sú ale menej rozšírené, nakoľko miera expozície nutná na usmrtenie patogénu často usmrcuje aj samotné osivo. Patria sem metódy pracujúce na princípe rádioaktívneho žiarenia, gama žiarenia, mikrovlnného žiarenia, UV žiarenia, ultrazvuku a vysoko energetických elektrónov.

### 3.1.2.7 *Elektromagnetické pole*

Bolo zistené, že elektromagnetické (elektrické a magnetické) pole spôsobuje fyziologicko-chemické zmeny v semenách. Zrýchľuje sa príjem vody, dýchanie a fotosyntéza klíčiacych semien sa zintenzívňuje, čo vedie k zvýšenej životaschopnosti semien (Lynikiene a kol., 2006). Jedná sa o nedeštruktívne, suché ošetrenie, ktoré zvyšuje percento klíčivosti, rýchlosť klíčenia a príjem vody mnohých plodín (Thomas a kol., 2013).

Na ošetrenie sa využívajú striedavé alebo jednosmerné koróny, vysokofrekvenčné elektromagnetické alebo elektrostatické polia, ako aj magnetické polia s rôznymi intenzitami (Lynikiene a kol., 2006). Benech-Arnold a Sánchez (2004) uvádzajú, že bežne sa pre ošetrovanie osiva používa statické alebo premenlivé magnetické pole s intenzitou od 0,25 do 1,0 T alebo elektrické pole s intenzitou do 100 kV.m<sup>-1</sup>, alebo aj viac.

### 3.1.2.8 *Oxid uhličitý*

Spilimbergo a Bertucco (2003) popisujú použitie CO<sub>2</sub> pod tlakom ako jednu z nových perspektívnych metód studenej pasterizácie alebo sterilizácie tekutých alebo pevných materiálov.

### 3.1.2.9 *Studená plazma*

Ošetrenie studenou plazmou je rýchla, ekonomicky nenáročná a životnému prostrediu prijateľná metóda úpravy osiva a zvyšovania výnosu. Má významný vplyv na široké spektrum vývojových a fyziologických procesov rastlín, vrátane zníženia miery

bakteriálnych infekcií osiva, zmeny povrchových štruktúr, zvýšenie priepustnosti osemenia a stimulácie klíčenia a rastu rastlín (Ling a kol., 2014). V praxi sa komerčne využíva napríklad v mikroelektronických technológiách, medicíne, spracovaní potravín, jadrovej fúzii a implantácii iónov pri modifikáciách materiálov (Ling a kol., 2015).

Plazma je čiastočne ionizovaný plyn získaný excitáciou plynných molekúl a atómov za použitia priameho (DC) alebo striedavého (AC) elektrického prúdu (s frekvenciou do 100 kHz), rádiového výboja (s frekvenciou od 100 kHz do 100 MHz) alebo mikrovlnného výboja (s frekvenciou nad 100 MHz). Je zmesou voľných elektrónov, iónov, radikálov a neutrálnych častíc (atómov a molekúl v ich základnom alebo excitovanom stave) (Randeniya a de Groot, 2015). Má neutrálny náboj kvôli rovnováhe medzi pozitívne a neutrálne nabitými časticami. Elektróny a fotóny sú označované ako častice „ľahké“, zatiaľ čo ostatné častice sú označované ako „ťažké“. Vďaka týmto unikátnym vlastnostiam býva plazma označovaná ako štvrté látkové skupenstvo (Misra a kol., 2011).

Plazma môže byť charakterizovaná na základe tepelnej rovnováhy medzi časticami. Pri vysokoteplotnej plazme majú všetky častice (molekuly, atómy, ióny, radikály a elektróny) rovnakú teplotu (Randeniya a de Groot, 2015), vysokú kinetickú energiu (Denes a kol., 2003). Na udržanie tejto rovnováhy sú nutné veľmi vysoké teploty ( $5 \times 10^3 - 20 \times 10^3$  K) (Randeniya a de Groot, 2015) a je generovaná za vysokého tlaku (Misra a kol., 2011). V prípade veľkých odchýliek v tepelnej rovnováhe (ióny a neutrálne častice majú omnoho nižšie teploty ako elektróny), dostávame tzv. studenú plazmu (nizkoteplotnú) (Randeniya a de Groot, 2015) s teplotou blízko okoliu (30-60 °C). Je generovaná za atmosférického alebo zníženého tlaku (vákua) a vyžaduje menej energie (Misra a kol., 2011). Kinetická energia elektrónov je vysoká, zatiaľ čo energia atomárnych a molekulárnych častíc je nízka. Teploty studenej plazmy sú blízke normálnym atmosférickým teplotám a všeobecne sú pod bodom varu vody (Denes a kol., 2003).

Sterilizačný účinok plazmy bol po prvýkrát zdokumentovaný v roku 1960 a technológia bola patentovaná v roku 1968 (Menashi, 1968). K lýze mikroorganizmov dochádza pri vystavení buncových povrchov prúdu radikálov o vysokej intenzite. Prúd radikálov spôsobuje lézie na povrchu buniek mikroorganizmov, ktoré nie sú schopné rýchlej regenerácie, čo vedie k ich rýchlemu zničeniu. Tento proces sa nazýva „leptanie“. Fenomén hromadenia lézií vzniká na základe akumulácie elektrostatických síl na vonkajšom povrchu živých buniek. Účinok studenej plazmy závisí na dvoch faktoroch:

type substrátu a charakterizácii mikroorganizmov ako napríklad množstvo, typ alebo fyziologické štádium. Antimikrobiálny účinok studenej plazmy ďalej spočíva v narúšaní bunčných membrán, denaturácii DNA a chemických väzieb. Presný mechanizmus interakcie medzi mikroorganizmami a časticami v plazme nie je doposiaľ známy, ale určité reakcie ako napríklad oxidácia a peroxidácia prebiehajúca vo vnútri alebo na povrchu buniek je katalyzovaná prevažne iónmi z plazmy (Dey a kol., 2016).

### 3.1.3 Chemické metódy ošetrovania osiva

Chemické morenie je všeobecne používaný postup úpravy osiva väčšiny poľnohospodárskych druhov, vrátane osív niektorých zelenín (Houba a Hosnedl, 2002), slúžiaci k hubeniu patogénov prenosných osivom (Ehrenbergerová, 2014). Metódy chemického ošetrovania osiva sú najpoužívanejšie vďaka ich účinnosti a jednoduchosti (Desai, 2004). Prostriedkami pre chemické ošetrovanie sú fungicídy a insekticídy, aplikované na semená, na ochranu pred chorobami semien a kľúčnych rastlín a pred škodcami. Typické chemické ošetrenie neposkytuje výhody spojené s urýchlením klíčenia, odolnosťou voči suchu alebo zvýšením výnosu (Sharma a kol., 2015).

V súčasnosti majú niektoré používané moridlá systémový účinok a nepôsobia tak len proti chorobám prenosných osivom, ale aj proti ranným infekciám chorôb prenosných vetrom, alebo pochádzajúcich z pôdy, do štádia 2 – 3 listov (Ehrenbergerová, 2014).

#### 3.1.3.1 Mokrú morenie

Metódy mokrého morenia zahŕňajú namáčanie semien vo vodnom roztoku fungicídu po určenú dobu, po ktorej sú semená vyňaté a vysušené pred výsevom alebo skladovaním. Táto metóda je časovo náročná, pretože potrebuje prácu navyše a priestory na sušenie (Desai, 2004). Na morenie sa používajú roztoky rôznych pesticídov, ale aj dusičnanu alebo fosforečnanu draselného, chloridu ortuťnatého, hypochloridu sodného, kyseliny boritej, jantárovej a iné (Valšíková a Kopec, 2010).

Desai (2004) rozdeľuje metódy mokrého morenia na:

- *Slurry metóda* – osivo je kompletne obalené tuhú kašovitou suspenziou (slurry) z vody a chemikálií. Sušenie po ošetrení nie je potrebné, pretože suspenzia obsahuje menej ako 1% vody.

- *Quick-wet metóda* – osivo je premiešavané s koncentrovaným roztokom prchavého fungicídu.

### 3.1.3.2 *Suché morenie*

Suché morenie zabezpečuje rovnomerné namorenie semien, avšak dochádza k veľkým stratám moridla v priebehu morenia, vyžaduje prísne hygienické opatrenia a účinnosť nie je najlepšia (Chloupek, 2008).

Jemné práškové moridlá sa miešajú s osivom v osobitnom prístroji. Nosným materiálom na morenie je prášková substancia, označovaná obchodným názvom. Musí mať neutrálne vlastnosti pre prostredie, pre napučanie osiva, pre tvorbu klíčku a jeho prerastanie pôdou počas poľnej vzchádzavosti. Výhodou suchého morenia je, že sa môže osivo vysievať ihneď (Valšíková a Kopec, 2010).

### 3.1.4 Biologické metódy ošetrovania osiva

Pojem „biologická ochrana“ a jeho odvodené synonymum „bioochrana“, sú používané v rôznych oblastiach biológie, hlavne v entomológii a rastlinnej patológii. V entomológii označuje použitie živého hmyzu ako predátorov, entomopatogénnych hlístovcov alebo mikrobiálnych patogénov na potlačenie populácie rôznych hmyzích škodcov. V rastlinnej patológii označuje aplikáciu mikrobiálnych antagonistov na potlačenie choroby, ako aj použitie špecifických patogénov na potlačenie buriny. V oboch oblastiach sú organizmy potlačujúce rozvoj škodcov alebo chorôb označované ako „bioagenz“. V širšom poňatí, pojem biologická ochrana zahŕňa aj použitie prírodných produktov extrahovaných alebo fermentovaných z rôznych zdrojov (Pal a kol., 2006).

Nega (2014) definuje biopesticídy ako živé organizmy alebo prírodné látky derivované zo živých organizmov slúžiace na potláčanie patogénnych populácií. Rozdeľuje ich do štyroch skupín: mikroorganizmy (mikrobiálne pesticídy), ostatné organizmy (hlístovce, hmyz...), prírodné látky derivované zo živých organizmov (biochemické pesticídy) a ochranné látky zabudované v rastlinách (geneticky modifikované rastliny).

Na rozdiel od väčšiny pesticídov, ktoré potlačujú veľké spektrum mikroorganizmov, biologické úpravy pôsobia cielene, často len proti jednému patogénu (Houba a Hosnedl, 2002).



#### 3.1.4.1 *Stimulátory*

Mnoho štúdií popisuje priaznivé účinky giberelínov, etylénu alebo cytokinínov ako napríklad benzyl adenínu v kombinácii s primingom u semien zeleru, alebo kyslíkom obohatený osmopriming u druhov pokryvných rastlín. Pridanie takýchto rastových regulátorov (stimulátorov) počas primingu môže zvýšiť klíčivosť niektorých druhov semien. Prípadne ošetrovanie semien rastovými retardantami vyvoláva zakrpatený rast, ktorého sa využíva napríklad pri ošetrovaní pokryvných rastlín, ktoré majú tendenciu etiolizovaného rastu pri nedostatku svetla (Benech-Arnold a Sánchez, 2004).

#### 3.1.4.2 *Stopové prvky*

K zvýšeniu kvality osív prispieva predsejbové máčanie semien v slabých roztokoch mikrobiogénnych (stopových) prvkov. Súčasne sa pozorovalo zvýšenie odolnosti proti chorobám. Skúšal sa selén, molybdén a ich zmesi s ďalšími zložkami. Uplatňujú sa tiež v zmesiach pre inkrustáciu a obalovanie (Valšíková a Kopec, 2010).

#### 3.1.4.3 *Inokulácia mikrobiálnymi kultúrami*

Pal a kol. (2006) definujú biologickú ochranu ako cieľené využitie introdukovaných alebo v pôde voľne žijúcich organizmov, iných ako chorobe rezistentných hostiteľských rastlín, pre potlačenie aktivity a šírenia jedného alebo viacerých rastlinných patogénov.

Rastlinné patogény sú v prírode do určitej miery redukované rôznymi mikroorganizmami, a to hubami, baktériami a vírusmi. Niektoré z nich sú používané ako biologická ochrana. Cieľové rastlinné patogény zahŕňajú huby, oomycéty, baktérie, vírusy a parazitické hlístovce (Nega, 2014). Ošetrovanie osiva mikroorganizmami zahŕňajúce huby a baktérie (rody *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobia* atď.) zlepšuje široké spektrum biotických, abiotických a fyziologických stresov pôsobiacich na semeno a kľúčne rastliny. Inokulácia semien takýmito biologickými agentami v kombinácii s primingom (biopriming) urýchľuje klíčenie a rast rastliny a zvyšuje uniformitu (Sharma a kol., 2015).

Mnoho húb disponuje mechanizmami, ktoré im umožňujú efektívne uzdraviť alebo predísť chorobám, ako listovým, tak aj koreňovým. Jednou z metód ochrany je tzv. mykoparazitizmus, kde huba alebo len jej vlákno priamo napáda, alebo sa priživuje

na inej hube. Ďalšou metódou je produkcia antibiotík alebo enzýmov inhibujúcich rast alebo konkurencieschopnosť iných organizmov. Ochrana tiež môže byť dosiahnutá prostredníctvom konkurencie, kedy bioagenz rýchlo kolonizuje rastlinné povrchy a vytvára tak „živú bariéru“, ktorá znemožňuje prístup iným patogénom. Ďalšou metódou je mobilizácia výživy v pôde, proces, ktorým sa živiny v pôde stanú prístupnejšími pre rastlinu, čo má za následok zlepšenie zdravotného stavu a zvýšenie odolnosti rastliny (Brimner a Boland, 2003).

Nega (2014) uvádza niektoré skupiny mikrobiálnych antagonistov, ktoré sú používané ako bežné komerčné prípravky proti:

- Patogénnym hubám a oomycétam – pôdne patogény a patogény infikujúce nadzemné časti rastlín. Najrozšírenejší bioagenti sú z rodu *Trichoderma* (*T. harzianum* Rifai), používaná proti patogénom z okruhu *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium* a ďalším pôdnym patogénom. Ďalej *Agrobacterium radiobacter* Smith & Townsend, nepatogénny druh, ktorý kolonizuje koreňovú sféru a produkuje antibiotiká, ktoré bránia vstupu *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend a druhu *Bacillus subtilis* Ehrenberg, *Pseudomonas fluorescens* Migula a *P. aureofaciens* Kluyver, ktoré redukujú padanie klíčnych rastlín a hniloby.
- Patogénom na listoch a stonkách – rod *Leucanicillium*, ktorý je primárnym hubovým patogénom hmyzu a má tiež účinok proti niektorým hubovým ochoreniam rastlín, *Ampelomyces quisqualis* Ces používaný proti plesniam, *Nectria inventa* Pethybr. a *Gonatobotrys simplex* Corda, ktoré sú parazitmi rodu *Alternaria*. Ďalej potom *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich, ktorý je používaný proti *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.
- Patogénom nadzemných častí – niektoré druhy *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Streptomyces* môžu predchádzať kolonizácii listových a stonkových pletív niektorými rastlinnými patogénmi.
- Rastlinným parazitickým hlístovcom – endoparazitické huby ako napríklad *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams, sú schopné infikovať samice hlístovcov a ich vajíčka.

#### 3.1.4.4 *Výťažky z rastlín*

Výťažky z rastlín môžu obsahovať prírodné antimikrobiálne zlúčeniny, ktoré sa používajú na dezinfekciu semien ako alternatíva k ošetrovaniu fungicídmi alebo v kombinácii s fyzikálnymi ošetrovaniami. Tieto výťažky obsahujú esenciálne oleje a pri niektorých druhoch výťažkov sa potvrdil účinok v kultúrach *in vitro*, ako napríklad výťažky z čajovníku, klinčeku, mäty, rozmarínu, vavrínu, oregana alebo tymiánu. Ďalšie účinné zlúčeniny boli extrahované z rodu *Allium*. Rastliny v tomto rode obsahujú sírnaté zlúčeniny a preukázalo sa, že niektoré z nich majú antimikrobiálny účinok (Mancini a Romanazzi, 2013). Hlavné aktívne zložky esenciálnych olejov sú známe vďaka širokému spektru fungicídnej aktivity ako proti ľudským, tak aj rastlinným patogénom. Tieto látky ovplyvňujú fyziologické funkcie mikroorganizmov alebo zapríčiňujú štrukturálne zmeny hýf a spór a rôzne huby reagujú odlišným spôsobom (Dal Bello a Sisterna, 2010). Dal Bello a Sisterna (2010) popisujú rôzne typy extraktov a ich účinky na jednotlivé choroby ako napríklad *Alternaria*, *Fusarium* a iné.

Mancini a Romanazzi (2013) popisujú ďalšiu účinnú látku, a to chitosan, fungicídny biopolymér, extrahovaný z krabiého panciera, ktorý sa preukázal byť účinný voči rôznym hubám. Navyše aplikácia tohto biopolyméru na semená zvyšuje index klíčenia, urýchľuje klíčenie, rast výhonkov a koreňov a ich dĺžku.

#### 3.1.5 Kombinované metódy ošetrovania osiva

##### 3.1.5.1 *Obalovanie*

Obalovanie osiva je najúčinnější a ekologicky najvhodnější metóda ochrany semien a semenáčov pred chorobami a škodcami, pretože sa používa len malé množstvo účinnej látky (Chloupek, 2008). Umožňuje aplikáciu chemických prípravkov, hnojív a rastových látok priamo na semeno. Používa sa najmä ak ide o presný výsev a o drobné, nepravidelné semená. Obalovaním sa dosiahne presná kalibrácia na dostatočnú veľkostnú kategóriu. Cieľom je úpravou tvaru a povrchu dosiahnuť guľovitý tvar s vopred určenou veľkosťou, alebo hmotnosťou (Valšíková a Kopec, 2010).

Na obalovanie sa používa obalovacia hmota zložená z jemne mletých minerálnych komponentov (mastenec, vápenec, živec, kremeň), rašeliny alebo drevnej múčky (napr. bukovej), lepidla (napr. dextrín) a účinných ochranných látok (fungicidy

a insekticídy). Zvyčajne sa pridávajú aj stopové prvky, prípadne ďalšie bioaktívne zložky, podporujúce klíčenie a vzhádzanie. Pri obalovaní sa produkt farbí pre lepšiu viditeľnosť pri sejbe, manipulácii a kontrole v pôde (Valšíková a Kopec, 2010).

### 3.1.5.2 Peletizácia

Peletizácia je definovaná ako poťahovanie semena vrstvou inertného materiálu, ktorým sa mení pôvodný tvar a veľkosť semena, zvyšuje sa jeho hmotnosť a zlepšuje vysievateľnosť (Houba a Hosnedl, 2002). Mnoho semien rôznych plodín sú malé a nepravidelného tvaru, čo znemožňuje presný výsev dostupnou mechanizáciou (Sharma a kol., 2015).

Semená sú vložené do peletizačného bubna alebo panvy, postriekané vodou, je k nim pridané plnidlo (v suchej práškovej forme) a adhezívum (lepidlo). Ako plnidlá sa používajú napríklad íly, vápenec, mastenec alebo vermikulit a za adhezíva potom slúžia napríklad arabská guma, želatína, methycelulóza alebo polyvinylalkohol. Konkrétne používané zmesi sú prísne stráženým firemným tajomstvom. Pre zlepšenie vlastností osív sú do peliet pridávané aj inokulanty, fungicídy a hnojivá. Pre odlišenie rôznych výrobcov a produktov sa do peliet pridávajú farbivá (Houba a Hosnedl, 2002). Desai (2004) uvádza ako ďalší dôvod peletizácie odpudzovanie vtákov a hlodavcov.

### 3.1.5.3 Inkrustácia

Inkrustácia je technika nanášania tenkej vrstvy prídavných látok na osivo, ako napríklad pesticídov, hnojív alebo nitrifikačných baktérií. Na rozdiel od peletizácie, inkrustácia kopíruje tvar semena a nijak významne nemení jeho tvar (George, 1999). Pôvodným účelom inkrustácie bola ochrana osiva pred pôdnymi hubami, ktoré spôsobujú padanie klíčnych rastlín ako *Pythium*, *Phytophthora* a *Rhizoctonia* (McDonald a Kwong, 2005).

Materiálom pre inkrustáciu je zmes polymérov, aditívum (napr. fungicíd, insekticíd, mikroprvky) a farbivo. Semeno je do roztoku s rozpusteným polymérom a aditívom buď ponorené, alebo sa roztok aplikuje nastriekavaním. Po aplikácii je semeno okamžite vysušené. Proces inkrustácie môže byť opakovaný s rôznymi aditívami, takže sa na povrchu semena vytvára niekoľkonásobný film (Houba a Hosnedl, 2002).

### 3.2 Studená plazma v praxi

Nishioka a kol. (2016) skúmali dezinfekčný účinok ošetrenia studenou plazmou, za zníženého tlaku, na osivo hlúbovín infikovaných baktériou *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. Počet životaschopných buniek *X. campestris* na osive bol  $10^{6.6}$  cfu.semeno<sup>-1</sup> (z angl. cfu = bunky schopné tvoriť kolónie) pred ošetrením plazmou, po 5 minútach ošetrenia klesol o  $10^{3.9}$ , po 40 minútach o  $10^{6.6}$  cfu.semeno<sup>-1</sup>. Ďalšie testy ukázali, že už po 5 minútach ošetrenia došlo k poškodeniu bunecnej membrány a cieľového úseku DNA. Pri tomto ošetrení však vzniklo aj teplo a ozón, ale na inaktivácii *X. campestris* sa podieľali minimálne.

Porovnanie účinku ošetrenia studenou plazmou za atmosférického a zníženého tlaku na osivo rodu *Brassica* infikované patogénom *Rhizoctonia solani* Kühn vypracovali Nishioka a kol. v roku 2014. Dospeli k záveru, že ošetrenie plazmou za atmosférického tlaku znížilo výskyt patogénu zo 100% na 3%, ale opozdilo klíčenie. Ošetrenie plazmou za zníženého tlaku zredukovalo výskyt patogénu z 83% na 1,7% po 10 minútovom pôsobení a inaktivačný účinok závisel na dobe pôsobenia plazmy. Klíčivosť sa v tomto prípade veľmi nelíšila od klíčivosti kontrolného variantu.

Vplyv ošetrenia studenou plazmou z korónového výboja bol sledovaný na osive repky olejnej (*Brassica napus* L.) s overeným výskytom aeróbných baktérií, plesní a kvasiniek, *Bacillus cereus* Frankland & Frankland, *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers a *Salmonella* spp. Ďalej sa sledovala klíčivosť osiva a fyzikálnochemické vlastnosti klíčnych rastlín. Z výsledkov vyplynulo, že po 3 minútovom ošetrení plazmou, boli všetky mikroorganizmy zredukované o 1,2 – 2,2 log a po 2 minútovom ošetrení sa dokonca zvýšila klíčivosť a rast rastlín. Fyzikálnochemické a sensorické vlastnosti rastliny neboli ošetrením ovplyvnené (Puligundla a kol., 2017). Ling a kol. (2015) sledovali vplyv ošetrenia plazmou na osivo repky olejnej (*Brassica napus* L.) pri strese zo sucha. Zistili, že toto ošetrenie zvyšuje klíčivosť a odolnosť osiva repky pred poškodením spôsobovaným stresom zo sucha.

Pre reguláciu a podporu rezistencie u rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) voči hnedej hnilobe zemiaku (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.) sa skúšalo ošetrenie studenou plazmou, ktorého výsledky ukázali, že toto ošetrenie zvýšilo rezistenciu voči hnedej hnilobe o 25%, významne zvýšilo klíčivosť a rast rastliny a tiež zvýšilo príjem vápniku a bóru (Jiang a kol., 2014). Ďalším vplyvom ošetrenia osiva

rajčiaku jedlého studenou plazmou (vzniknutej za atmosférického tlaku dielektrickým bariérovým výbojom) bolo zvýšenie výnosu plodov až o 25% oproti neošetrenej kontrole (Zhou a kol., 2011).

Osivo reďkvi siatej (*Raphanus sativus* L.) bolo ošetrené čistou kyslíkovou a čistou dusíkovou plazmou za zníženého tlaku (100 Pa). Výsledky ukázali, že ošetrenie plazmou nemalo vplyv na nástup klíčenia. Avšak, po 7 dňovej kultivácii sa ukázalo, že rastliny ošetrené kyslíkovou plazmou boli o 60% vyššie ako kontrolné rastliny. Rastliny ošetrené dusíkovou plazmou boli veľmi podobné kontrole (Kitazaki a kol., 2012). Mihai a kol. (2014) ošetrovali osivo reďkvi siatej studenou atmosférickou plazmou a zistili, že ošetrenie malo len malý vplyv na klíčivosť, ale ovplyvnilo počiatočný rast. Výhony a korene ošetrených semien boli dlhšie a ťažšie ako u kontrolného variantu. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté po 20 minútovom ošetrení, kde dĺžka koreňov a výhonov bola zvýšená o 11% a váha koreňov o 30%.

Volin a Young (2000) zisťovali účinok kombinácie inkrustácie osiva a ošetrenia studenou plazmou na päť druhov plodín. Osivo bolo obalené vrstvou makromolekúl (menej ako 5 $\mu$ m) v kombinácii s plazmou. Na zabrzdenie klíčenia boli použité dva zdroje hydrofóbných plynov, tetrafluormetán (CF<sub>4</sub>) a octadecafluorodecalin (ODFD). Osivo reďkvi siatej (*Raphanus sativus* L.) a dva kultivary hrachu siateho (*Pisum sativum* L. cv. 'Little Marvel' a *P. sativum* cv. 'Alaska') ošetrené CF<sub>4</sub> vykázalo podstatné zabrzdenie klíčenia v porovnaní s kontrolou. Podobné výsledky v zabrzdení klíčenia vykazovali aj sója fazuľová (*Glycine max* (L.) Merr.), kukurica siata (*Zea mays* L.) a fazuľa obyčajná (*Phaseolus vulgaris* L.) ošetrené ODFD.

Podrobný vplyv ošetrenia studenou plazmou (vzniknutou difúznym koplánym povrchovým bariérovým výbojom) na rast, anatomické a biochemické zmeny bol sledovaný na kukurici siatej (*Zea mays* L.), ktoré bolo aplikované po dobu 60 až 120 sekúnd. Ošetrenie zapríčinilo, že klíčne rastliny mali o 21% dlhšie korene, o 10% vyššiu hmotnosť koreňov v čerstvom stave a o 14% vyššiu hmotnosť koreňov v suchom stave pri ošetrení plazmou po dobu 60 sekúnd. Naopak rastliny vystavené plazme po dlhšiu dobu (120 s) mali kratšie korene a nižšiu hmotnosť ako kontrolné neošetrené rastliny (Henselová a kol., 2012).

Bormashenko a kol. (2015) sledovali účinky studenej plazmy na šošovicu jedlú (*Lens culinaris* Medikus), fazuľu obyčajnú (*Phaseolus vulgaris* L.) a pšenicu (*Triticum* spp.). Ošetrené semená vykličili skôr ako kontrolné. Pri fazuli po 70 hodinách vykličilo menej ako 10% semien pri kontrole a skoro 50% semien pri plazmou ošetreného variantu.

Podobné rozdiely boli dosiahnuté aj na šošovici a pšenici.

Sója fazuľová (*Glycine max* (L.) Merr.), ako plodina so slabou klíčivosťou, bola podrobená ošetreniu studenou héliovou plazmou pri zníženom tlaku (150 Pa) po dobu 15 sekúnd. Pokusy dokázali, že najlepšie výsledky malo ošetrenie plazmou pri výkone 80 W. Rastliny z takto ošetrovaného osiva mali o 21,42% dlhšie korene a o 27,51% vyššiu hmotnosť suchých koreňov oproti kontrole. Taktiež príjem vody po 10 hodinách bol o 14% vyšší pri ošetrovanom osive (Ling a kol., 2014).

Mitra a kol. (2013) skúmali pôsobenie studenej atmosférickej plazmy na osivo cíceru baranieho (*Cicer arietinum* L.), na ktoré boli aplikované mikroorganizmy. Výsledky ukázali, že 2 a 5 minútová expozícia osiva plazme bola dostačujúca na zníženie mikroorganizmov na povrchu semien o 1 až 2 log. Ďalej sa ukázalo, že expozícia na 1 minútu zvýšila klíčivosť osiva o 89,2% a tiež zvýšila vlhkosť osiva.

Randeniya a de Groot (2015) popisujú porovnanie kombinácie ošetrenia studenou vzduchovou plazmou a vysokofrekvenčným magnetickým poľom na osivo lupiny úzkolistej (*Lupinus angustifolius* L.), gelegy (*Gelega virginiana* L.) a komonice bielej (*Melilotus albus* Med.). Kombinácia ošetrení viedla k zvýšeniu klíčivosti a životaschopnosti klíčnych rastlín o 10 až 20%. Ďalej popisujú účinok studenej plazmy na pšenicu letnú (*Triticum aestivum* L.), lupinu úzkolistú (*Lupinus angustifolius* L.) a kukuricu siatu (*Zea mays* L.), kde bolo osivo vystavené plazme na dobu 10 minút. Výskum ukázal, že stupeň infekcie hubami sa znížil o 77% po 5 minútovej expozícii plazme, avšak 72% pokles infekcie sa ukázal aj pri kontrolných vzorkách držaných vo vákuu.

Vplyvom studenej plazmy za atmosférického tlaku na osivo pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) sa zaoberali aj Dobrin a kol. (2015). Doby expozície boli 5, 15 a 30 minút, pričom najlepších výsledkov sa dosiahlo pri 15 minútach. Pri ošetrovanom osive sa zvýšil príjem vody o 10 – 15% a po štvordennej kultivácii sa tiež značne zvýšila dĺžka koreňov a ich hmotnosť v suchom stave.

Rovnaké ošetrenie bolo aplikované aj na osivo ovsa siateho (*Avena sativa* L.) a pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.) v 3 až 40 minútových intervaloch, kde toto ošetrenie zvýšilo rýchlosť príjmu vody obiliek oboch druhov. Účinok studenej plazmy na klíčenie však mal väčší účinok na pomaly klíčiace obilky pšenice (Randeniya a de Groot, 2015).

Dormantné osivo mrlíku bieleho (*Chenopodium album* L.) bolo ošetrované studenou plazmou z mikrovlnného výboja, čo viedlo k značnému zvýšeniu klíčivosti

pri expozícii plazme po dobu od 12 do 48 minút (Sera a kol., 2008).

Khamsen a kol. (2016) vytvorili systém na produkciu hybridnej studenej plazmy založenej na mikrokorónovom výboji jednej dielektrickej bariéry a využili toto ošetrovanie na inaktiváciu mikroorganizmov bežne sa vyskytujúcich na plevách osiva ryže siatej (*Oryza sativa* L.). Plazma pracuje v normálnych podmienkach a nie je potrebné vákuum. Ošetrovanie kompletne inaktivovalo všetky huby a mikroorganizmy, zvýšilo klíčivosť o 8% a kvalitu rastlín.

Účinok plazmy bol skúmaný aj na osive pavlovnie plstnatej (*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.), ktoré bolo ošetrované vzduchovou a argónovou studenou plazmou. Osivo bežne klíči na svetle a všeobecne nie je napádané patogénmi ani infekciami. Z výskumu vyplynulo, že ošetrovanie vzduchovou spolu s argónovou plazmou viedlo k značnému zvýšeniu klíčivosti, naproti tomu ošetrovanie samotnou argónovou plazmou malo minimálny účinok na klíčivosť. Tiež sa zistilo, že pôsobenie plazmy dlhšie ako 15 minút vedie k znižovaniu klíčivosti (Puač a kol., 2006).

### 3.3 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

#### 3.3.1 Opis patogénu

Taxonomické zaradenie (MicrobeWiki.kenyon.edu):

- **Riša** – *Bacteria*
- **Kmeň** – *Proteobacteria*
- **Trieda** – *Gamma Proteobacteria*
- **Rad** – *Xanthomonadales*
- **Čel'ad'** – *Xanthomonadaceae*
- **Rod** – *Xanthomonas*
- **Druh** – *Xanthomonas campestris*
- **Patovar** – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (ďalej len Xcc) je malá, tyčinkovitá, Gram-negatívna, nesporulujúca baktéria, s jedným bičíkom a biochemickými



vlastnosťami typickými pre rod *Xanthomonas*. Produkuje žltý extracelulárny polysacharid nazývaný xanthan na glukózu obsahujúcom médiu (Sharma, 2006). Spôsobuje hnedú bakteriózu (angl. black rot) na rastlinách z čeľade *Brassicaceae* (Vicente a Holub, 2013) a je rozšírená po celom svete (viz. prílohy, obr. 3) (Agrios, 2005). Xcc sa často vyskytuje na vlhkých pôdach pri teplotách 20 až 30 °C, ktoré sú typické pre tropické a subtropické pásmo (Issazadeh a kol., 2012).

### 3.3.2 Životný cyklus

Xcc prežíva na infikovaných semenách a rastlinných zvyškoch v pôde (Sharma, 2006), kde môže takto prežívať až 2 roky, no vo voľnej pôde nevydrží viac ako 60 dní (Miller a kol., 1996). Tiež prežíva na burine z čeľade *Brassicaceae* ako napríklad planá reďkev, repa a horčica, žerucha alebo kapsička pastierska (Bost, 2011). Nemá aktívne mechanizmy prieniku do hostiteľa (Griffiths a Roe, 2005), takže rastlinu infikuje prirodzenými otvormi nad alebo pod povrchom pôdy. Nadzemné otvory zahŕňajú hydratody a prieduchy, ktorými baktéria preniká do rastliny za dažďa alebo pri závlahe a pod zemou preniká cez koreňový systém. Tiež preniká do rastliny cez rany vzniknuté na koreňoch pri presádzaní alebo cez mechanické poškodenia spôsobené škodcami (Kucharek a Stranberg, 2000).

Hnedá bakterióza sa môže objaviť na rastline v ktoromkoľvek rastovom štádiu. Na mladých rastlinách sa objavuje na klíčkoch a spôsobuje ich černanie a opad (Assis a kol., 1999). Prvé príznaky po infekcii rastliny sa objavujú za 7 až 14 dní (za optimálnych podmienok 25 – 30 °C) (Miller a kol., 1996), za chladného počasia za viac než 6 týždňov (Bost, 2011), vo forme veľkých chlorotických škvŕn na okrajoch listov, ktoré postupne hnednú a usychajú (viz. prílohy, obr. 4a – 4f). Odtiaľ infekcia postupuje do stonky, odkiaľ sa šíri do vrchných aj spodných častí rastliny. Infikované stonky a stopky listov na priereze vykazujú černanie cievnych zväzkov (viz. prílohy, obr. 5a - 5c), objavujú sa žlté kvapky slizu s baktériami a niekedy sa objavujú aj v dutinách vo vnútri stonky alebo pod pokožkou. Bakteriálna suspenzia často vyteká na povrch listov cez hydratody alebo rany a následne sa za dažďa, vetra alebo prenosom náradím šíri a infikuje ďalšie rastliny (Agrios, 2005).

### 3.3.3 Možnosti ochrany

Ochrana pred Xcc je založená predovšetkým na prevencii počas vegetácie (Cagaň, 2010). Bost (2011) uvádza rôzne typy prevencie ako napríklad kupovanie zdravého a certifikovaného osiva a priesad, použitie aspoň 3-ročného osevného postupu, používať vždy nové alebo vydezinfikované sadbovače, nepoužívať postrekovače na závlahu a zamedziť vzájomnému dotyku mokrých rastlín, udržiavať čistotu mechanizácie a náradia, rýchlo po zbere zorať rastlinné zbytky aby sa stihli dostatočne rozložiť, použitie chemického ošetrenia počas vegetácie a v neposlednej rade vyberať odolné odrody. Kucharek a Strandberg (2000) ďalej odporúčajú nevysievať kapustu bližšie ako cca pol kilometra od iných plodín/záhrad s rastlinami z rovnakej čeľade, odstraňovať buriny z okolia patriacej do rovnakej čeľade, použiť predsejbové ošetrenie horúcou vodou a kontrolovať porast každý deň a prípadne odstraňovať napadnuté rastliny. Onsando (1987) ďalej navrhuje použitie trávneho mulča, ktorý zamedzuje špliechaniu vody so zeminou na rastliny a tým znižuje riziko sekundárnej infekcie. Prihnojovanie dusíkom počas vegetácie môže tiež zvýšiť obranyschopnosť rastliny a tým spomaliť a zamedziť vstupu Xcc (McElhaney a kol., 1998).

Najpoužívanejšou metódou ochrany je namáčanie osiva vo vode s teplotou 50 °C na 30 minút. Toto ošetrenie býva kombinované s použitím antibiotík a chemikálií (Agrios, 2005). Minchinton (1996) uvádza, že najlepšie výsledky ošetrenia horúcou vodou sa dosiahlo po 20 minútach namáčania, s primiešaním NaOCl (100 ppm). Tiež namáčanie osiva v kyslom roztoku ZnSO<sub>4</sub> (pH 2.8) s teplotou 38 – 40 °C významne redukuje výskyt Xcc. Osivo je však nutné po tomto zákroku namočiť na 2 minúty do čistej vody a vysušiť (Huang a Lee, 1988). Ďalšími účinnými chemikáliami sú napríklad metamsodium (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NNaS<sub>2</sub>), ktorý sa aplikuje formou závlahy alebo priamo do pôdy do hĺbky až 40 cm (Kritzman a Ben-Yephet, 1990) a chlorid ortuťnatý (HgCl<sub>2</sub>) (Bhat, a Masoodi, 2000).

Inokulum Xcc na semenách môže byť zredukované/inaktivované rôznymi antibiotikami (Sharma, 2006). Na základe laboratórnych experimentov sa dokázalo, že značnú mieru účinnosti proti Xcc majú chloramfenikol (Aveling a Robbertse, 1990), chlórtracyklín, oxytetracyklín (tiež ako postrek na list) (Bhat a kol., 2000), streptocyklín (Bhat a Masoodi, 2000) a validamycin A, ktorý inhibuje množenie Xcc (Ishikawa a kol., 2004).

Rod *Bacillus* je najpoužívanejším biologickým antagonistom Xcc. Antagonizmus je založený na rôznych mechanizmoch, ako napríklad konkurencia, indukcia rezistencie

alebo produkcia antibiotík (Monteiro a kol., 2005). Aplikácia antagonistov na korene je značne účinnejšia ako na osivo alebo na list (Massomo a kol., 2004). Issazadeh a kol. (2012) skúmali vybrané druhy rodu *Bacillus* a zistili, že najúčinnejšie proti Xcc sú druhy *Bacillus thuringiensis* Berliner, *B. cereus* Frankland & Frankland, *B. Subtilis* Ehrenberg, *B. megaterium* de Bary a *B. pumilus* Meyer & Gottheil. Wulff a kol. (2002) analyzovali sekundárne metabolity troch druhov rodu *Bacillus* a ich vplyv na Xcc a zistili, že najúčinnejšie sú sekundárne metabolity druhu *Bacillus amyloliquefaciens* Priest et al., a to surfactín, iturín, bacillomycín a azalomycín.

Z rastlinných extraktov majú najväčší antibakteriálny účinok na Xcc extrakt z listov *Camellia sinensis* Kuntze. Ďalšie rastliny s inhibičným účinkom príslušných extraktov na Xcc sú *Acacia arabicae* (Lam.) Willd., *Aegle marmelos* (L.) Corrêa, *Acacia catechu* (L.f.) Hurter & Mabb., *Achyranthes aspera* (L.), *Asparagus racemosus* Willd., *Azadirachta indica* Juss., *Callistemon lanceolatus* (Sm.) DC. a *Acacia farnesiana* (L.) Wight et Arn (Bhardwaj a Laura, 2009).

## **4. MATERIÁL A METÓDY**

### **4.1 Opis modelovej plodiny**

#### 4.1.1 Opis pestovaného kultivaru

*Brassica oleracea* var. *capitata* (L.) cv. 'ALBATROS F1' (viz. prílohy, obr. 6) - hybridná odroda neskorej kapusty, určená na skladovanie. Hlávka je stredne veľká, veľmi pevná, pravidelne vyplnená a veľmi dobre uzavretá. Má vysokú odolnosť proti predčasnému praskaniu hlávok. Hmotnosť hlávky je 2,2 – 2,8 kg. Odporúčaný pestebný spon je 50 × 50 cm. Vegetačná doba od výsadby je 140 – 150 dní (MoravoSeed.cz).

### **4.2 Opis lokality pokusu**

Pokus bol situovaný v Lednici na Morave (Česká republika), na Zahradníckej fakulte Mendelovej univerzity v Brně, v areáli Mendelea – ústavu genetiky.

Územie pracoviska Lednice patrí do teplej oblasti, suchej podoblasti, teplého okresu, suchého s miernou zimou a mierne kratším slnečným svitom. Počas vegetačného obdobia spadne 323 mm zrážok, čo je 61% celkového ročného úhrnu. Teplota vzduchu 10 °C a viac nastupuje 19. apríla a končí 10. októbra, trvá teda 175 dní. Územie má celkovú nadmorskú výšku 180 m.n.m. a jeho väčšina je pokrytá sprašovými usadeninami o rôznej mocnosti, na ktorých sa vyskytujú prevažne černozeme (mendelu.cz).

### **4.3 Založenie a ošetrovanie pokusu**

#### 4.3.1 Úprava osiva pred výsevom

Osivo bolo rozdelené na dve polovice, pričom jedna polovica bola inokulovaná namorením osiva v infekčnej suspenzii *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (ďalej len Xcc) o koncentrácii buniek patogénu  $10^8$  po dobu 1 hodiny. Následne na to bolo osivo prevezené na Jihočeskú univerzitu v Českých Budějoviach,

kde jeho časť bola ošetrovaná studenou plazmou a inokulovaná namorením mykoparazitickou pôdnou hubou *Trichoderma virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (ďalej len TVI).

Ošetrovanie studenou plazmou a TVI prebehlo dňa 19. 02. 2016 na zemiedľskej fakulte Jihočeskej univerzity v Českých Budějovicích, na katedre rastlinnej výroby a agroekológie.

Pre ošetrovanie osiva bola použitá studená mikrovlnná plazma, aplikovaná za zníženého tlaku 100 Pa. Ošetrovanie prebehlo vo vákuovej komore (SurfaceTreat, CZ), so vzduchom ako nosným plynom. Pracovná sila mikrovlnnej plazmy odpovedá výkonu 500 W. Osivo bolo nasypané na Petriho misky a vystavené plazme po dobu 4 minúty.

TVI bola nakultivovaná na agare so zemiakovou dextrózou (PDA) pri teplote 25 +/- 1 °C po dobu 10 dní. Konídie boli prenesené do destilovanej vody s 0,05% Tween 80 (polyoxyethylensorbitanmonooleát) pomocou inokulačnej kľučky a koncentrácia spór v suspenzii bola vypočítaná za použitia Neubauerovej komôrky. Suspenzia so spórmi bola upravená na koncentráciu 2.106 konídií na mililiter. Karboxymethylcelulóza (CMC, 1% roztok) bola použitá ako adhezívum pre lepšie príľnutie spór na povrch osiva. Obaľovací roztok bol pripravený zmiešaním suspenzie so spórmi s 1% roztokom CMC v pomere 1:1. Osivo bolo premiešané s obaľovacím roztokom a následne vysušené vo flowboxe pri teplote 21 °C. Takto vysušené osivo bolo presypané do plastových sáčkov, ktoré boli skladované v chladničke pri teplote 8 +/- 1 °C až do doby výsevu.

#### 4.3.2 Dizajn pokusu

Pokus bol rozdelený na 6 variantov, pričom 3 varianty pozostávali zo zdravého osiva (negatívny kontrolný variant, negatívny plazmovaný v., negatívny plazmovaný a namorený TVI v.) a 3 varianty z osiva inokulovaného Xcc (pozitívny kontrolný v., pozitívny plazmovaný v., pozitívny plazmovaný a namorený TVI v.). Každý variant bol vysiaty v troch opakovaniach, aby sa predišlo možným odchýlkam spôsobených nerovnosťami pozemku, v sponě 50 × 50 cm a pozostával z 10 rastlín kapusty (celkom 18 pokusných parciel a 180 rastlín). Okolo celého pokusného pozemku bol vysiaty ochranný pás zo zdravého, neupraveného osiva, kvôli možnému napadnutiu zverou z okolia (viz. prílohy, schéma 1). Jednotlivé varianty boli od seba vzdialené 1 meter.

#### 4.3.3 Príprava pozemku

Na pokusnom pozemku sa v predchádzajúcom vegetačnom období (2015) nachádzala kukurica (*Zea mays* L.), ktorej zvyšky boli na jeseň zaorané. Na jar 2016 bol pozemok skultivovaný rotavátorom.

#### 4.3.4 Výsev

Osivo bolo vysiate na pripravený pozemok ručne, dňa 14. 04. 2016, za použitia značkovača pre požadovaný spon 50 × 50 cm. Na jednotlivé pozície bolo vysiatych po 5 semenách z určených variant a v určenom poradí podľa schémy (viz. prílohy, schéma 1). Takto vysiate osivo bolo zahrnuté vrstvou zeminy a varianty boli opatrené odpovedajúcimi ceduľami (viz. prílohy, obr. 7).

#### 4.3.5 Okopávanie, pletie

Okopávanie a pletie prebiehalo ručne, približne jedenkrát za mesiac, vždy pri vyhodnocovaní vitality a zdravotného stavu porastu (viz. kapitola **4.5 Termínovanie úkonov**). Cieľom bolo odstránenie buriny, nakyprenie povrchu pôdy a rozrušenie pôdneho prísušku.

#### 4.3.6 Pretrhávanie

Pretrhávanie a jednotenie porastu prebehlo dňa 26. 05. 2016 a pozostávalo z ponechania jednej vybranej rastliny na každej lokalite (na každej lokalite bolo vysiatych 5 semien) (viz. prílohy, obr. 8, 9). Časť vyradených rastlín bola podrobená rozborom a zvyšok bol odstránený. V prípade úplného výpadku na lokalite bolo na toto miesto dosadená rastlina (z pretrhávania) z rovnakej varianty ako bol samotný výpadok (viz. prílohy, obr. 10a, 10b).

#### 4.3.7 Chemická ochrana

Chemická ochrana prebiehala preventívne jedenkrát za mesiac a ďalej podľa potreby v prípade silného tlaku škodcov. Jediným významným škodcom bola skočka

kapustová (*Phyllotreta nemorum* L.). Proti tomuto škodcovi boli použité chemické prípravky ako napríklad Calypso® 480 SC, Karate® Zeon alebo Markate 50, aplikované podľa návodu od výrobcu.

#### 4.3.8 Zber

Zber prebehol dňa 14. 10. 2016. Jednotlivé hlávky boli odrezané od hlúbu nožom, ktorý bol pred každou hlávkou vydezinfikovaný prípravkom Savo® Original a následne boli všetky hlávky zvážené.

### 4.4 Hodnotené parametre

#### 4.4.1 Klíčivosť

Klíčivosť bola hodnotená pri pretrhávaní a jednotení porastu 26. 05. 2016 ako priemerný počet vyklíčených semien v jednotlivých variantách. Tento parameter bol vyjadrený v percentách.

#### 4.4.2 Zdravotný stav

Zdravotným stavom sa rozumela prítomnosť príznakov napadnutia rastliny Xcc. Pre hodnotenie sa sledovali príznaky na listoch a hlávkach typické pre tento patogén a ich rozširovanie sa v poraste. Za rastliny napadnuté patogénom sa považovali tie, ktoré mali príznaky aspoň na jednom liste.

#### 4.4.3 Vitalita

Vitalitou sa rozumela veľkosť rastlín v jednotlivých variantoch. Hodnotená bola na základe stupnice od 0 do 4 (0-uhynutá, 1-malá, slabá rastlina, 2-malá rastlina, 3-stredne veľká rastlina, 4-veľká rastlina), ktorá bola vytvorená vždy pri aktuálnom hodnotení na základe najmenej, malej, strednej a najväčšej rastliny v poraste. Po vytvorení hlávok sa už veľkosť rastlín nesledovala, vzhľadom na subjektivnosť tohto hodnotenia.

#### 4.4.4 Výnos

Pri hodnotení výnosu sa sledovala hmotnosť hlávok v čase zberu (14. 10. 2016). Hodnotená bola celková hmotnosť hlávok v gramoch.

#### 4.4.5 Skladovateľnosť

Dvadsať náhodne vybraných hlávok (10 zdravých hlávok z iného poľa a 10 s potvrdeným výskytom Xcc) bolo uskladnených pri teplote 0,5 – 1 °C a relatívnej vzdušnej vlhkosti 70%. Po dobu 12 týždňov bola sledovaná ich hmotnosť a jej prípadné zmeny počas skladovania v dobe od 11. 01. 2017 do 29. 03. 2017. Jednotlivé hlávky boli vážené v 7 dňových intervaloch.

### 4.5 Termínovanie úkonov

Tab. 1 – Kalendár termínov

Úkon	Termín
Ošetrovanie osiva	19. 02. 2016
Výsev	14. 04. 2016
Okopanie, pletie	23. 05. 2016
Pretrhanie, zjednotenie, vyhodnotenie klíčivosti	26. 05. 2016
Okopanie, pletie	09. 06. 2016
Hodnotenie I. + okopanie, pletie	30. 06. 2016
Hodnotenie II. + okopanie, pletie	21. 07. 2016
Hodnotenie III. + okopanie, pletie	25. 08. 2016
Hodnotenie IV.	29. 09. 2016
Hodnotenie V.	14. 10. 2016
Zber, váženie	14. 10. 2016



## 4.6 Laboratórne metódy

### 4.6.1 Kultivácia osiva na médiu

Osivo pred overovaním prítomnosti Xcc bolo nutné nakultivovať na médiu pre namnoženie bakteriálnych kultúr. Boli použité dva druhy médií: mäsopeptónový agar (MPA) ako univerzálne médium a selektívne médium Phyto Xano Camp Agar Base (Px) s použitím prídavku NNB - PHS015, pre izoláciu Xcc zo semien. Semená boli nanosené na médiá podľa variantov ošetrovania v množstve približne 50 semien, pričom každý variant bol kultivovaný ako na MPA tak aj na Px médiu. Kultivácia prebiehala za tmy, po dobu 3 dní pri teplote 25 °C (nepublikovaná metodika overená na ústave Mendeleum). Za túto dobu osivo pozitívne na Xcc na médiách naklíčilo a vytvorili sa bakteriálne kultúry. Pre testovanie Xcc bolo vybrané podozrivé osivo so žltými bakteriálnymi kultúrami (viz. prílohy, obr. 11).

### 4.6.2 Izolácia DNA

Vzorky (semená alebo časti rastlín) boli pred izoláciou zmrazené na -80 °C a následne zhomogenizované v trecej miske. Takto zhomogenizovaný materiál bol pridaný do roztoku lyzačného pufru a proteinázy K.

Izolácia DNA zo vzoriek (semená alebo listy) prebiehala za použitia komerčného kitu NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany) podľa návodu od výrobcu na výsledný objem 50 µl.

Koncentrácia vyizolovanej DNA bola zmeraná fluorometricky kitom PicoGreen® podľa návodu od výrobcu (Molecular Probes, Eugene). PicoGreen® roztok bol zriedený na pomer 1:200 podľa protokolu od výrobcu v Tris-EDTA pufre (TE; 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5). 1 µl každej vzorky DNA bol zmiešaný s 49 µl 1 × TE pufru a 50 µl zriedeného PicoGreen® roztoku. Meranie prebehlo na fluorometre (Turner BioSystems Modulus) s absorbancom 750 nm.

#### 4.6.3 PCR

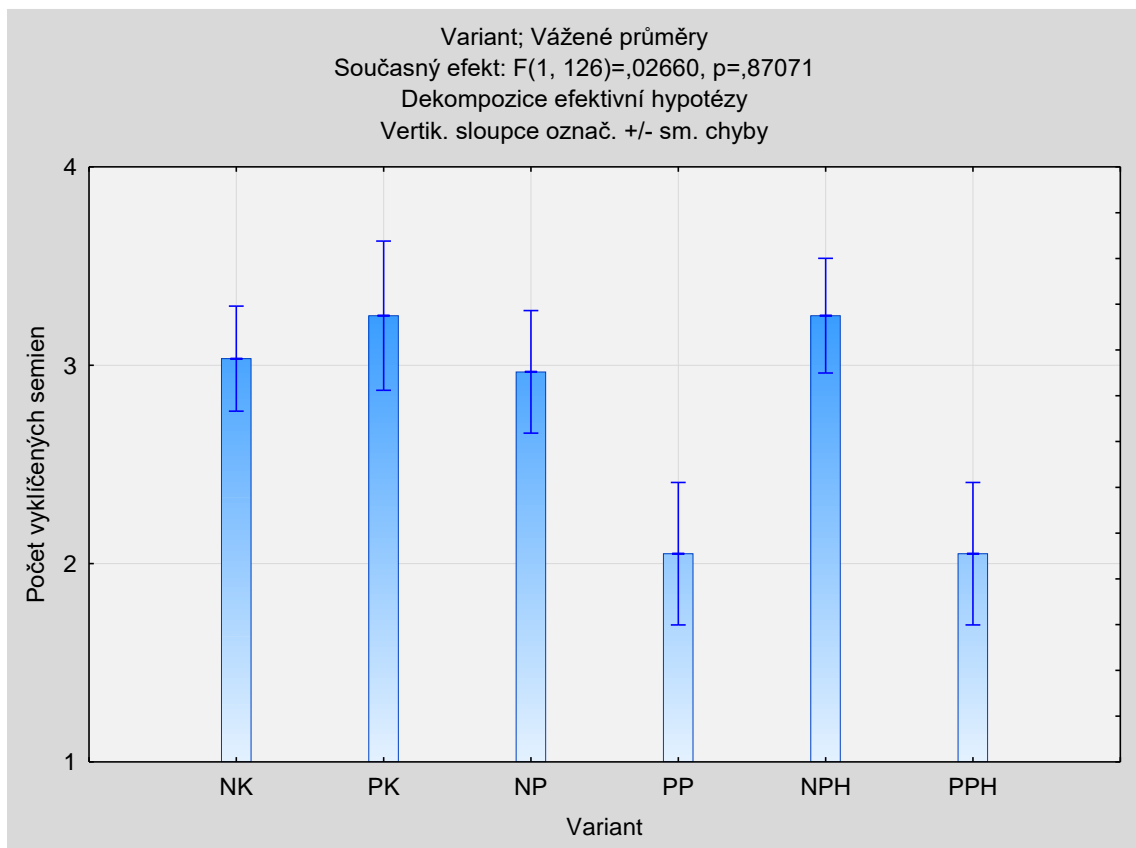
Pre amplifikáciu bol použitý kit GoTaq® G2 Flexi (Promega, Madison, USA). Celkový objem reakčného PCR mixu bol 20,8 µl, pozostávajúci z 10,5 µl vody (HPLC), 4 µl 5 × GoTaq® Flexi Buffer pre polymerázu (Promega, Madison, USA), 1,2 µl 25 nM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Madison, USA), 0,2 µl 10 µM dNTP mixu (Invitex, Berlin, Germany), 0,2 U GoTaq® G2 Flexi DNA polymerázy (5 U·µl<sup>-1</sup>) (Promega, Madison, USA), 1 µl od každého primera (10 µM) a 2 µl testovanej DNA. Ako primere špecificky komplementárne k vybraným úsekom genómu Xcc boli použité DLH 120 + DLH 125 za podmienok popísaných v publikácii Berg et al., (2005). Druhý primerový pár bol odvodený z tzv. hrpF regiónu vychádzajúceho zo skratky anglického termínu „hypersensitive reaction and pathogenicity“ (presná sekvencia bude zo strany ústavu Mendeleum ešte len publikovaná). Pre hrpF amplifikáciu bol použitý nasledujúci program: 3 minúty pri 95 °C pre počiatočnú denaturáciu, 40 × opakovaný cyklus pri 95 °C na 40 sekúnd, 63 °C na 40 sekúnd a 72 °C na 40 sekúnd, so záverečným krokom pri 72 °C na 5 minút. PCR produkty boli analyzované elektroforézou na 1,2% agarózovom géle, ofarbené GelRed™ a vizualizované na UV transiluminátore.

## 5. VÝSLEDKY PRÁCE

### 5.1 Vplyv ošetrenia na klíčivosť

Graf 1 (viz. prílohy, tab. 2a, 2b) znázorňuje, že najväčšej klíčivosti dosiahli varianty NK (negatívna kontrola), PK (pozitívna kontrola), NP (negatívny, plazmovaný variant) a NPH (negatívny, plazmovaný a morený variant) a preukázateľne sa líšili od variantov PP (pozitívny, plazmovaný v.) a PPH (pozitívny, plazmovaný a morený v.), ktoré mali klíčivosť najnižšiu.

Graf 1 - Klíčivosť



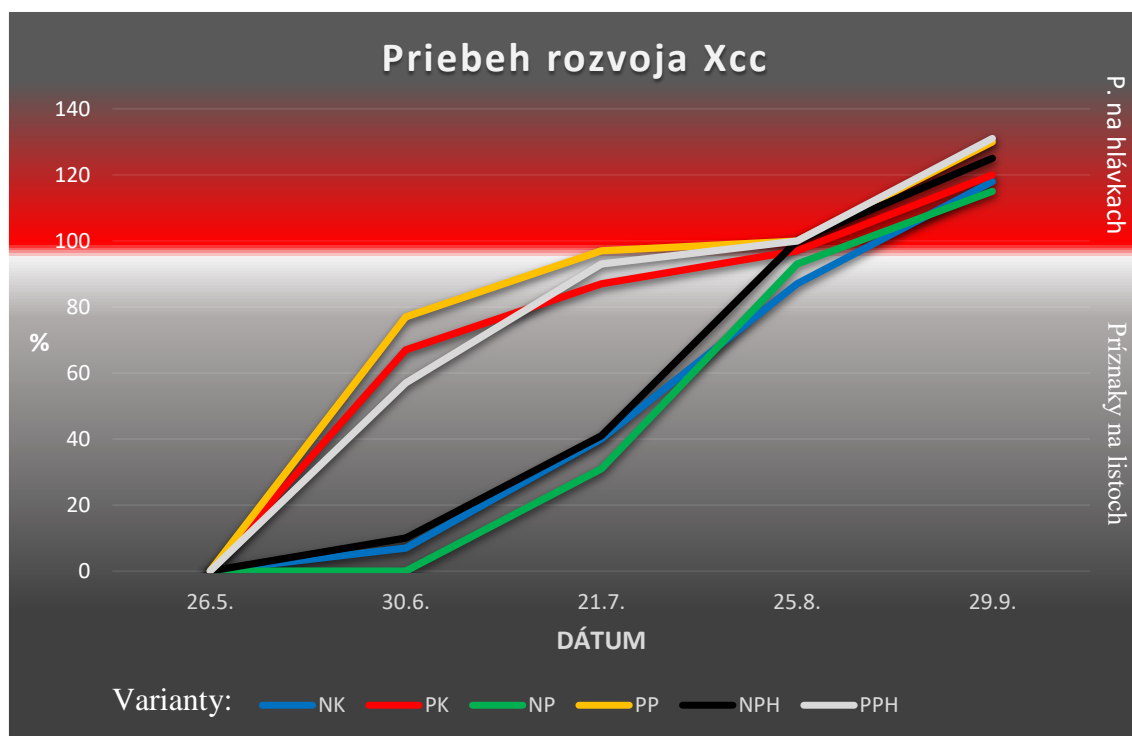
Z dôvodov preukázateľného rozdielu variantov, boli niektoré opakovania vyradené z celkového hodnotenia (viz. prílohy, graf 6).

## 5.2 Vplyv ošetrenia na zdravotný stav

Graf 2 znázorňuje priebeh rozvoja príznakov *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson (ďalej len Xcc) v poraste v dobe od 26. 05. 2016 do 29. 09. 2016.

Sivá (spodná) časť grafu znázorňuje rozvoj príznakov na listoch vzhľadom na jednotlivé varianty. Po dosiahnutí 100% zamorenia porastu (na listoch), boli sledované príznaky na samotných hlávkach (červená – horná časť grafu).

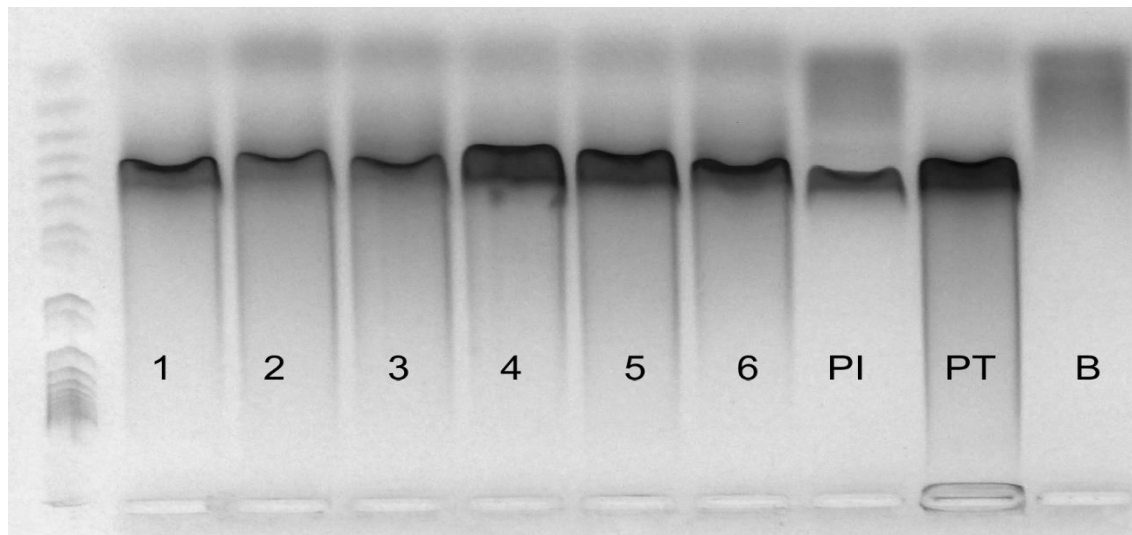
Graf 2 – Priebeh rozvoja Xcc



Priebeh rozvoja Xcc mal dve tendencie nárastu. Negatívne varianty NK, NP a NPH (modrá, zelená a čierna krivka) vykazovali spočiatku takmer nulovú infekciu Xcc, ktorá sa postupne a pomaly rozširovala. Druhá tendencia nárastu sa prejavila u pozitívnych variantov PK, PP a PPH (červená, žltá a biela krivka), ktoré už od počiatku hodnotenia vykazovali príznaky infekcie Xcc a rýchlo sa šírili. Porast dosiahol 100% infekcie (na listoch) približne v rovnakej dobe (25. 08. 2016).

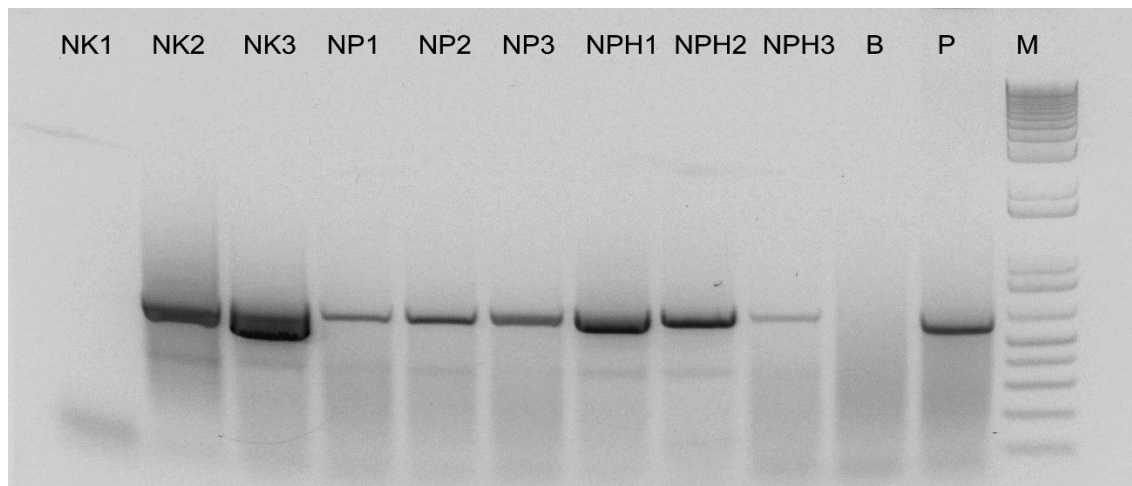
Obr. 1 potvrdzuje prítomnosť produktov o dĺžke 619 pb typických pre Xcc vo všetkých vzorkách osiva nakultivovaných na médiách Px a MPA (pozitívne varianty PK, PP a PPH) (viz. prílohy, obr. 12a, 12b, tab. 3), s použitím primerového páru DLH 120 a DLH 125 (Berg et al., 2005).

Obr. 1 – Prítomnosť produktov o dĺžke 619 pb, typických pre *Xcc* vo vzorkách osiva, s použitím primerového páru DLH 120 a DLH 125; B – blank; PI, PT – pozitívna kontrola, DNA ladder (Invitrogen). Vzorky 1-3 (PK, PP, PPH) boli kultivované na médiu MPA, vzorky 4-6 (PK, PP, PPH) na médiu Px.



Pri vyhodnotení dňa 21. 07. 2016 bolo zistené rozširovanie sa príznakov *Xcc* aj na rastliny v pôvodne zdravej polovine pokusu (varianty NK, NP a NPH). Obr. 2 potvrdzuje prítomnosť *Xcc* produktov o dĺžke 619 pb vo vzorkách listov zo zmienovaných variantov odobraných dňa 21. 07. 2016. Prítomnosť *Xcc* sa potvrdila vo všetkých vzorkách (NK2 až NPH3) okrem vzorky NK1. Koncentrácia vyizolovanej DNA zo vzoriek je uvedená v prílohách (viz. prílohy, tab. 4).

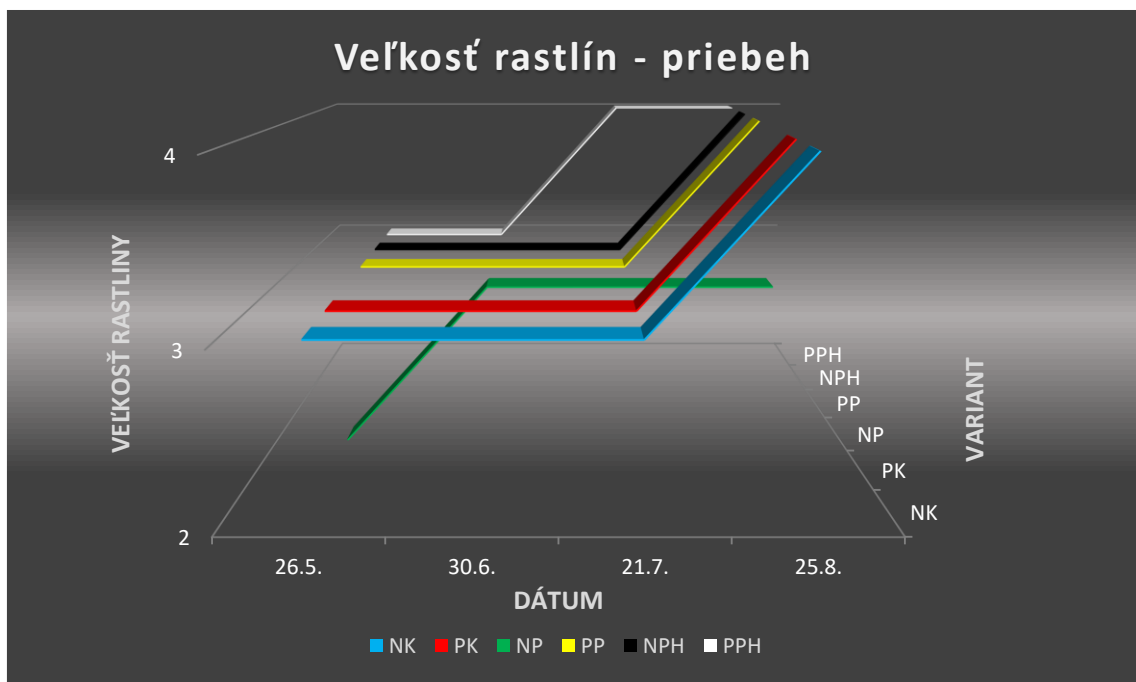
Obr. 2 – prítomnosť produktov o dĺžke 619 pb, typických pre *Xcc* vo vzorkách listov zo zdravej polovice pokusného pozemku za použitia primerového páru DLH 120 a DLH 125; B – blank; P – pozitívna kontrola, M – DNA ladder (Invitrogen)



### 5.3 Vplyv ošetrenia na vitalitu

Graf 3 znázorňuje vitalitu (veľkosť rastlín) (viz. prílohy, obr. 13a – 19b) v priebehu hodnotenia porastu na základe jednotlivých variantov. Veľkosť rastlín bola v priebehu pokusu vyrovnaná, okrem variantu NP, v ktorom rastliny rástli pomalšie, čo sa ukázalo v hodnoteniach 26. 05. 2016 a 25. 08. 2016. Naproti tomu, najrýchlejší rast rastlín sa ukázal vo variante PPH, v hodnotení 21. 07. 2016.

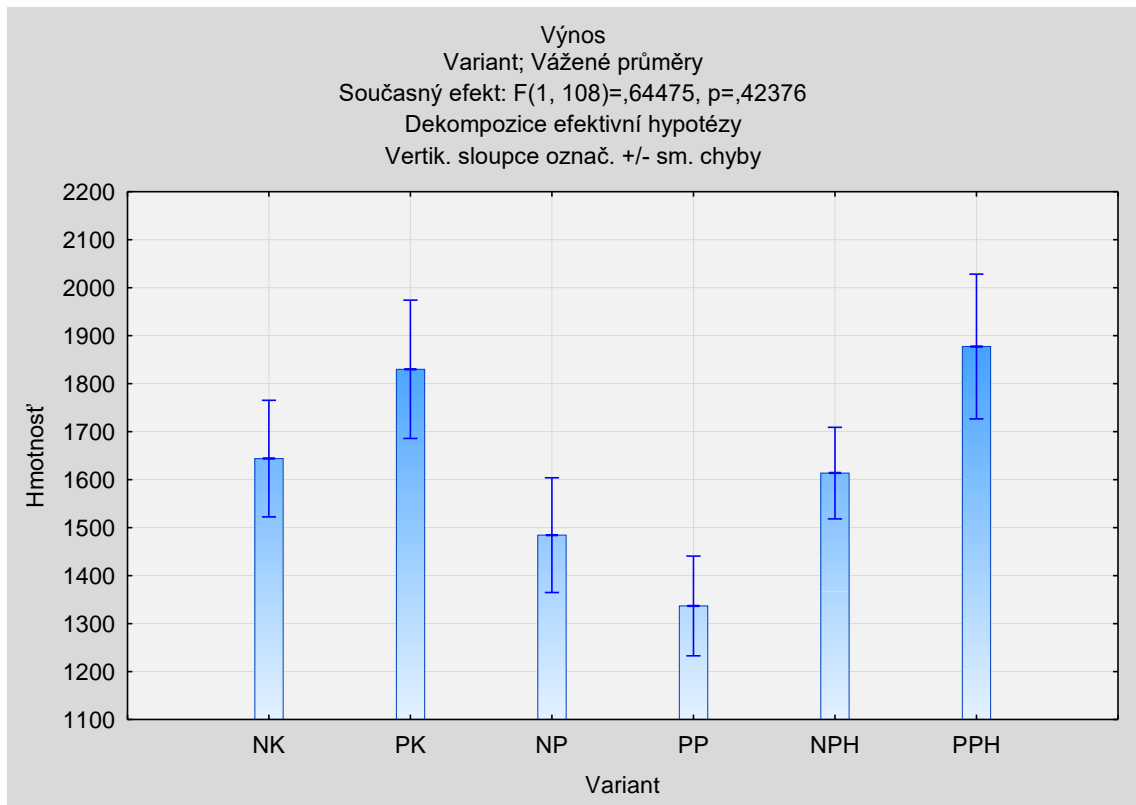
Graf 3 – Veľkosť rastlín – priebeh



## 5.4 Vplyv ošetrenia na výnos

Graf 4 znázorňuje rozdiely vo výnose medzi variantmi (viz. prílohy, tab. 5a, 5b), pričom preukázateľne vyšší výnos bol zistený u variantov PPH a PK, ako u variantov NP a PP. Najväčšieho výnosu dosahoval variant PPH a naopak najnižšieho variant PP. Z dôvodov preukázateľného rozdielu variantov, boli niektoré opakovania vyradené z celkového hodnotenia (viz. prílohy, graf 7).

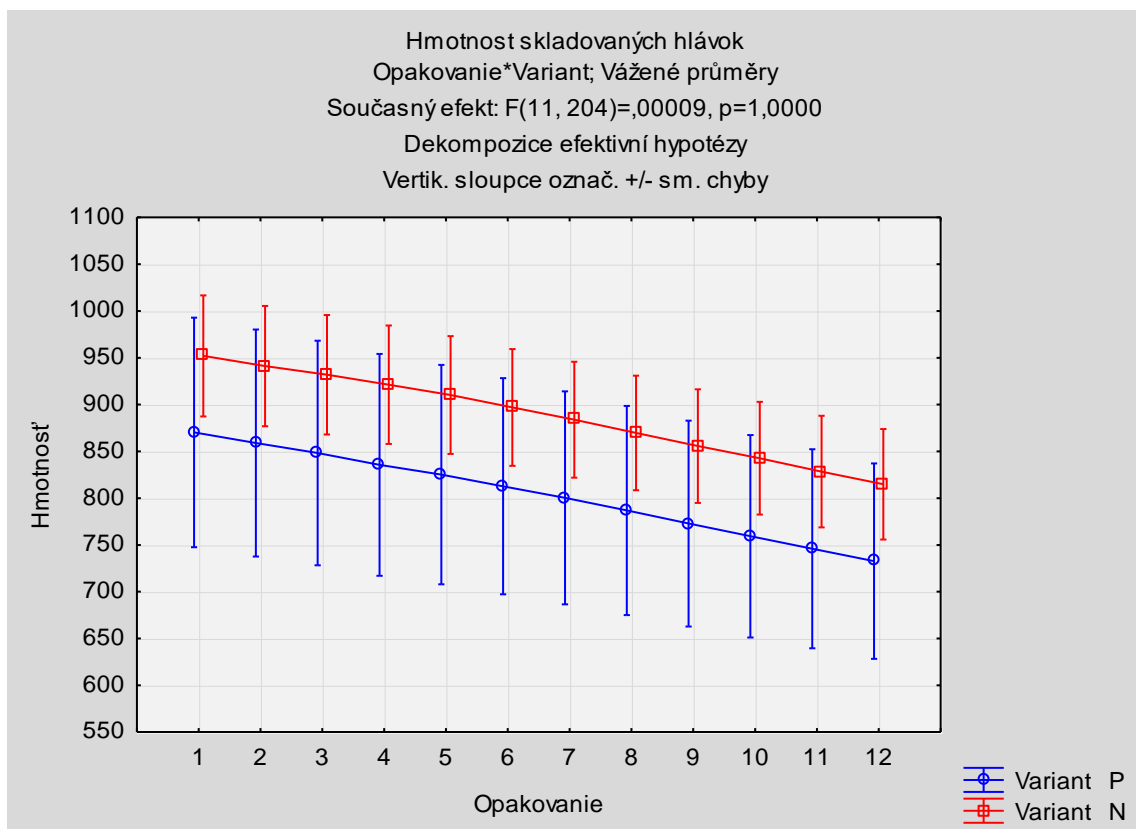
Graf 4 – Hmotnosť hlávok - výnos



## 5.5 Skladovateľnosť

Skldované hlávky, ako zdravé (červená krivka) tak aj s overeným výskytom Xcc (modrá krivka) (viz. prílohy, obr. 20 - 22), vykazovali počas skladovania úbytky na hmotnosti. Graf 5 znázorňuje preukázateľné úbytky na hmotnosti v dobe od 11. 01. 2017 do 29. 03. 2017 (viz. prílohy, tab. 6). Tieto úbytky na hmotnosti sa v jednotlivých hodnoteniach v rámci variant líšili o menej ako 1% (viz. prílohy, tab. 7).

Graf 5 – Úbytok na hmotnosti skladovaných hlávok





## 6. DISKUSIA

Mitra a kol. (2014) a mnoho ďalších autorov uvádzajú, že ošetrovanie osiva studenou plazmou podstatne znižuje výskyt mikroorganizmov na povrchu osiva a taktiež urýchľuje samotné klíčenie. Z vlastného pokusu priekazne vyplynulo, že plazma nemala viditeľný účinok na klíčenie u negatívnych variantov, v porovnaní s kontrolnými. Avšak klíčivosť u pozitívnych variantov ošetrovaných plazmou bola znížená. Dey a kol. (2016) vo svojej práci uvádzajú, že plazma môže mať ako pozitívne tak aj negatívne účinky na klíčenie osiva. Tieto rozdiely v reakcii na plazmu môžu byť spôsobené typom plazmy, druhom osiva a tiež dobou expozície osiva (Mihai a kol., 2014). Aj Dobrin a kol. (2015) došli k záveru, že plazma mala len veľmi malý účinok na klíčivosť semien. Volin a kol. (2000) skúmali obalovanie osiva makromolekulami vzniknutými pri tvorbe studenej plazmy ako napríklad tetrafluormethán a iné, a zistili, že plazma v tomto prípade môže klíčenie osiva oddialiť. Nishioka a kol. (2016) vo svojich pozorovaniach zistili, že pre úplnú inaktiváciu Xcc na osive, je potrebná až 40 minútová expozícia plazme a pri 5 minútovom ošetrovaní sa Xcc inaktivuje len o polovicu. V našom prípade šlo o 4 minútové ošetrovanie, ktoré je bežne používané u väčšiny druhov osiva. Z tohto dôvodu mohlo dôjsť k znižovaniu vitality klíčkov priamo pôsobením Xcc ([plantwise.org](http://plantwise.org)) a ošetrovanie plazmou nemuselo mať priamy vplyv na klíčivosť vzhľadom na stále pretrvávajúcu infekciu.

Rozvoj Xcc v rámci porastu sa vyvíjal podľa infikovanosti variantov, bez ohľadu na ošetrovanie plazmou alebo TVI. Po určitom čase, sa začali príznaky Xcc šíriť aj na ďalšie neinfikované varianty. Kucharek a Stranberg (2000) popisujú mechanizmy prenosu Xcc, pričom jedným z pravdepodobných mechanizmov v našom pokuse bol prostredníctvom mechanických poškodení škodcami. Bunn a kol. (2015) zmieňujú prenos patogénov ako *Erwinia* alebo *Alternaria* hmyzím vektorom *Phyllotreta nemorum* L., ktorý bol v našom pokuse, aj cez chemickú ochranu, hojne rozšírený. Výskumom šírenia Xcc prostredníctvom vektora, skočky (*Phyllotreta nemorum* L.), sa zaoberali Shelton a Hunter (1985), kde zistili, že škodca sajúci na infikovaných rastlinách je schopný nakaziť až 15,6% ďalších rastlín (5 z 32 rastlín). Vzhľadom na dlho trvajúci a silný tlak tohto škodcu, je možné povedať, že v našom pokuse bola *Phyllotreta nemorum* L. zdrojom sekundárnej infekcie Xcc u pôvodne negatívnych variantov z hľadiska prítomnosti Xcc.

Z pokusu vyplynulo, že NP variant (negatívny, plazmovaný) mal pomalší rast oproti ostatným variantom (viz. prílohy, obr. 23). Táto skutočnosť je v rozpore s doterajšími výsledkami pokusov so studenou plazmou. Na základe poznatkov z výskumu Dey a kol. (2016) je možné sa domnievať, že zvolený typ generovania plazmy (mikrovlnný) a doba expozície (4 minúty) nie je najvhodnejšia pre osivo kapusty hlávkovej (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). Naproti tomu, variant NPH (negatívny, plazmovaný, morený TVI) vykazoval rýchlejší rast oproti ostatným variantom. *Trichoderma* spp. je v dnešnej dobe bežne využívaný biofungicíd (Mukherjee, 2012). Benítez a kol. (2004) popisujú priaznivý účinok pôdnej huby *Trichoderma* na rastliny, kde táto huba podporuje rast rastlín a obranné mechanizmy, alebo pôsobí ako antagonista k hubovým ochoreniam. V praxi je to však iné, pretože *Trichoderma* je kultivovaná v riadených podmienkach, ktoré počas klíčenia osiva vo voľnej pôde vôbec nemusia nastať (Howell, 2003). Fontenelle a kol. (2011) dokazujú, že *Trichoderma* spp. je schopná indukovať u rastlín rezistenciu k patogénu *Xanthomonas euvesicatoria* Jones et al.

Najväčšieho výnosu dosiahli varianty PK (pozitívna kontrola) a PPH (pozitívny, plazmovaný, morený TVI), teda dva pozitívne, infikované varianty. Cook a kol. (1952) uvádzajú, že rastliny kapusty môžu ostať bez príznakov vo vegetatívnej fáze až do kvitnutia. Z tohoto dôvodu by mohlo byť možné, že tieto varianty, ktoré boli infikované už od počiatku, si udržali určitú vitalitu a dosiahli výnosu, bez toho, aby sa choroba plne rozvinula. Pri variante PPH mohla vyšší výnos zapríčiniť aj *Trichoderma virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (TVI). Naopak najnižšieho výnosu dosiahli znovu plazmované varianty a to NP (negatívny, plazmovaný) a PP (pozitívny, plazmovaný). Tým sa znovu potvrdzuje už raz zmienená teória Mihai a kol. (2014), že typ plazmy zvolený pre náš pokus a tiež doba expozície nemusia byť vhodné.

Úbytky na hmotnosti pri skladovaní boli vyrovnané v rámci variantov (pozitívny a negatívny z hľadiska prítomnosti Xcc) a rozdiely v úbytkoch medzi variantmi v jednotlivých hodnoteniach boli menej ako 1% (viz. graf 5; prílohy - tab.7). Uyenaka (1990) uvádza, že ideálne podmienky pre skladovanie kapusty hlávkovej sú teplota 0 °C a relatívna vzdušná vlhkosť nad 90%, inak dochádza k vyparovaniu vody a scvrkávaniu hlávok. Čo sa týka samotnej prítomnosti Xcc v hlávkach, tak navonok, rovnako ako u negatívneho variantu, nebola u pozitívneho variantu zaznamenaná. Vysvetlením môže byť skutočnosť, že udávaná optimálna teplota pre rozvoj Xcc je 25 – 30 °C (Miller a kol., 1996), teda výrazne mimo podmienky nastavené v chladiacej komore.

## 7. ZÁVER

Ošetrovanie osiva studenou plazmou je na základe dostupných informácií relatívne novým a perspektívnym spôsobom ozdravovania osiva od patogénov a tiež podpory vývoja a rastu rastlín. Aj keď tento spôsob znie moderne, dnes je už v niektorých krajinách bežne dostupným a používaným spôsobom ošetrovania osiva.

V tejto konkrétnej práci sa však nepotvrdili pozitívne účinky plazmy, ako je tomu vo väčšine publikácií a výskumov. Klíčivosť oplazmovaných semien sa ukázala byť nižšia v porovnaní s ostatnými variantmi a priebeh rozvoja Xcc nebol týmto ošetrením ovplyvnený. Výnos sa síce ukázal vyšší u jedného oplazmovaného variantu, ale v kombinácii s Xcc. Pri vitalite rastlín sa oplazmovaný variant ukázal ako pomalšie rastúci oproti ostatným variantom a naopak najrýchlejšie rastúci variant bol s kombináciou Xcc, TVI a plazmy zároveň. Zaujímavé výsledky boli získané v rámci experimentu porovnávajúcim skladovateľnosť hlávok infikovaných a neinfikovaných Xcc. Ukázalo sa, že hmotnostné úbytky obidvoch variantov v čase boli podobné, infekcia Xcc teda nespôsobovala výraznejšie hmotnostné straty a ich skladovateľnosť bola tiež podobná neinfikovaným variantom.

Aj cez tieto nie príliš povzbudivé výsledky je treba pripomenúť poznatky z niektorých publikácií, ktoré poukazujú na skutočnosť, že nie všetky typy plazmy sú vhodné pre všetky druhy osiva a ich účinok je ovplyvňovaný intenzitou a dobou pôsobenia plazmy. Predkladané výsledky je teda vhodné chápať ako výsledky iniciačného pokusu, ktorý naznačil ďalšie možné prístupy pre rozvoj tejto problematiky. Výsledky tejto diplomovej práce podávajú podnet napríklad na zameranie sa na hľadanie špecifického typu plazmy, jej parametrov (energia, doba expozície) a na konkrétny druh osiva tak, aby sa docielilo najlepšieho možného účinku na osivo. Tým sa myslí najvhodnejší spôsob ako docieľiť inaktivácie Xcc tak, aby nedošlo k poškodeniu samotného osiva a tiež zlepšenie samotných vlastností osiva ako je urýchlené klíčenie a následný rast.

Ďalším dôležitým poznatkom v tomto experimente bola sekundárna infekcia spôsobená škodcami. Na túto skutočnosť je treba v budúcich experimentoch brať silný zreteľ a zabezpečiť pokusným rastlinám ochranu, či už formou postrekov alebo nakrytím netkanou textíliou.

A v neposlednej rade, varianty by bolo vhodné viac priestorovo oddeliť a pokusné rastliny pestovať na omnoho väčšej ploche.

## 8. SÚHRN A RESUME, KLÚČOVÉ SLOVÁ

### Súhrn

Diplomová práca bola zameraná na overenie účinnosti ošetrenia osiva kapusty hlávkovej (*Brassica oleracea* var. *capitata*) nízkoteplotnou (studenou) plazmou a jej vplyv na zdravotné a produkčné vlastnosti rastlín a na účinok proti patogénu *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). Ako doplnkové ošetrenie bola použitá pôdna huba *Trichoderma virens* (TVI). Z pokusu vyplynulo, že nízkoteplotná mikrovlnná plazma, pri zníženom tlaku, výkone 500 W a dobe pôsobenia 4 minúty, nemala významný vplyv na Xcc, ale mala však pozitívny vplyv, v kombinácii s Xcc a TVI, na vitalitu rastlín a ich výnos. Ďalej sa ukázalo, že toto ošetrenie malo v kombinácii s Xcc negatívny vplyv na klíčivosť rastlín. Ošetrenie nízkoteplotnou plazmou s použitými parametrami sa pre kapustu hlávkovú ukázalo ako nevhodné.

**KLúčové slová:** nízkoteplotná (studená) plazma, znížený tlak, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Trichoderma virens*, ošetrenie osiva, kapusta hlávková

### Resume

The diploma thesis was focused on evaluation of non-thermal (cold) plasma seed treatment of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), on its health and production properties and on the effects against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc). A soil fungus *Trichoderma virens* (TVI) was used as additional seed treatment. The field experiment showed that microwave, low pressure, 500 W non-thermal plasma and 4 minute exposure time did not have a significant effect on Xcc, but had a positive influence - in combination with Xcc and TVI - on plants' vitality and yield. Further, this plasma treatment, in combination with Xcc, had a negative impact on seeds' germination. Non-thermal plasma treatment with the above-mentioned parameters proved to be unsuitable for cabbage seed treatment.

**Keywords:** non-thermal (cold) plasma, low pressure, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Trichoderma virens*, seed treatment, cabbage

## 9. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

### 9.1 Knižné zdroje

1. AGRIOS, George N. *Plant pathology*. 5th ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2005, s. 653-654. ISBN 0-12-044565-4.
2. ASSIS, Sayonara M.P., Rosa L.R. MARIANO, Sami J. MICHEREFF, Gil SILVA a Elizabeth A.A. MARANHAO. Antagonism of Yeasts to *Xanthomonas Campestris* pv. *Campestris* on Cabbage Phylloplane in Field. *Revista de Microbiologia*. 1999, **30**, 191-195. ISSN 0001-3714.
3. BENECH-ARNOLD, Roberto L. a Rodolfo A. SÁNCHEZ. *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*. New York: Haworth Reference Press, c2004, s. 131-138. ISBN 1-56022-928-4.
4. BENÍTEZ, Tahía, Ana M. RINCÓN, M. Carmen LIMÓN a Antonio C. CODÓN. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. Sevilla (Spain): University of Sevilla, 2004, **7**, 249-260.
5. BHARDWAJ, Surender Kumar a Jitender Singh LAURA. Antibacterial Activity of Some Plant-Extracts Against Plant Pathogenic Bacteria *Xanthomonas Campestris* PV. *Campestris*. *INDIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH*. Rohtak (India): M.D. University, 2009, **43**(1), 26-31.
6. BUNN, Bonnie, Diane ALSTON a Marion MURRAY. Flea Beetles on Vegetables: (Coleoptera: Chrysomelidae). *UTAH PESTS: Fact Sheet*. Utah: Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory, 2015, **174**(15).
7. CAGÁŇ, Ľudovít. *Choroby a škodcovia poľných plodín*. 1. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2010, s. 787-788. ISBN 978-80-552-0354-6.
8. COOK, A.A., J.C. WALKER a R.H. LARSON. Studies on the disease cycle of black rot of crucifers. *Phytopathology*. 1952, **42**, 162-167.
9. DAL BELLO, Gustavo a Marina SISTERNA. Use of Plant Extracts as Natural Fungicides. In: ARYA, Arun a Analía Edith PERELLÓ. *Management of Fungal Plant Pathogens*. Preston (UK), 2010, s. 51-66. ISBN 978 1 84593 603 7.

10. DENES, Ferencz S., Raymind A. YOUNG, Sorin MANOLACHE a John C. VOLIN. *Cold-Plasma Treatment of Seeds to Remove Surface Materials*. US 6,543,460 B1. Uděleno 2003.
11. DESAI, Babasaheb B. *Seeds handbook: biology, production, processing, and storage*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker, c2004, s. 513-516. ISBN 9780824748005.
12. DEY, Anirban, Prasad RASANE, Asish CHOUDHURY, Jyoti SINGH, Daniel MAISNAM a Pallavi RASANE. Cold Plasma Processing: A review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 2016, **9**(4), 2980-2984. ISSN 0974-2115.
13. EHRENBERGEROVÁ, Jaroslava. *Odrůdy, osivo a sadba*. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2014, s. 78-81. ISBN 978-80-7509-003-4.
14. GEORGE, Raymon A.T. *Vegetable seed production*. 2nd ed. New York: CABI Pub., 1999, s. 64-65. ISBN 0851993362.
15. HOUBA, Miroslav a Václav HOSNEDL. *Osivo a sadba: praktické semenářství*. Praha: Martin Sedláček, 2002, s. 121-129. ISBN 80-902413-6-0.
16. HOWELL, C.R. Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*. Southern Plains Agricultural Research Center, 2003, **87**(1).
17. CHLOUPEK, Oldřich. *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Vyd. 3., upr. 2. Praha: Academia, 2008, s. 235-243. Česká matice technická (Academia). ISBN 978-80-200-1566-2.
18. KUCHARÉK, Tom a Jim STRANDBERG. Black Rot of Crucifers. *Plant Pathology Fact Sheet*. Florida: University of Florida, 2000.
19. LYNIKIENE, S., A. POZELIENE a G. RUTKAUSKAS. Influence of corona discharge field on seed viability and dynamics of germination. *INTERNATIONAL Agrophysics*. 2006, (20), 195-200.
20. MASSOMO, S.M.S., C.N. MORTENSEN, R.B. MABAGALA, M.A. NEWMAN a J. HOCKENHULL. Biological Control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *Phytopathology*. Berlin (Germany): Blackwell Verlag, 2004, **152**, 98-105. ISSN 0931-1785.
21. MCDONALD, Miller B. a Francis Y. KWONG. *Flower seeds: biology and technology*. 1. Cambridge, MA: CABI Pub., 2005, s. 219-259. ISBN 0851999069.

22. MENASHI, W.P. *Treatment of Surfaces*. 3,383,163. Uděleno 1968.
23. MILLER, Sally A., F. SAHIN a Randall C. ROWE. Black Rot of Crucifers. *Extension FactSheet: Plant Pathology*. The Ohio State University, 1996.
24. MINCHINTON, E.J. *Control of black rot contamination in brassica seeds*. 1. Gordon, N.S.W: Horticultural Research, 1996, s. 8-9. ISBN 1864231513.
25. MONTEIRO, Leila, Rosa de Lima Ramos MARIANO a Ana Maria SOUTO-MAIOR. Antagonism of *Bacillus* spp. Against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY: An International Journal*. Brazil, 2005, **48**(1), 23-29. ISSN 1516-8913.
26. NEERGAARD, Paul. *Handbook for Phytosanitary Inspectors in Africa: Seed-Borne Diseases - Inspection for Quarantine in Africa*. 1. Nigeria, 1969, s. 387.
27. NEGA, Alemu. Review on Concepts in Biological Control of Plant Pathogens. In: *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. Jimma (Ethiopia): Jimma University, 2014, s. 33-54. ISSN 2224-3208.
28. PUACĀ, N., Z.Lj. PETROVIĆ, Z. GIBA, D. GRUBIŠIĆ a A.R. DORDEVIĆ. Low-Temperature Plasma Treatment of Dry Empress-Tree Seeds. In: D'AGOSTINO, Riccardo, Pietro FAVIA, Christian OEHR a Michael R. WERTHEIMER. *Plasma Processes and Polymers: 16th International Symposium on Plasma Chemistry*. Taormina (Italy): John Wiley, 2006, s. 193-205. ISBN 9783527605576.
29. SHARMA, K.K., U.S. SINGH, Pankaj SHARMA, Ashish KUMAR a Lalan SHARMA. Seed treatments for sustainable agriculture: A review. *Journal of Applied and Natural Science*. 2015, **1**(7), 521-539.
30. SHARMA, P.D. *Plant pathology*. Oxford: Alpha Science International, 2006, s. 12.7-12.8. ISBN 1842653148.
31. SHELTON, A.M. a J.E. HUNTER. Evaluation of the potential of the flea beetle *Phyllotreta cruciferae* to transmit *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, causal agent of black rot of crucifers. *Canadian Journal of Plant Pathology*. New York, 1985, **7**(3), 308-310.
32. VALŠÍKOVÁ, Magdaléna a Karel KOPEC. *Semenárstvo zeleniny a kvetín*. 1. Nitra: Nakladateľstvo SPU, 2010, s. 41-58. ISBN 978-80-552-0487-1.



33. WULFF, Ednar G., Cames M. MGUNI, Carmen N. MORTENSEN, Chandroo L. KESWANI a John HOCKENHULL. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2002, **108**, 317-325.

## 9.2 Internetové zdroje

34. AVELING, T.A.S. a P.J. ROBBERTSE. Evaluation of antibiotics against *Xanthomonas campestris* causing black rot of Brassica. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford (UK): CAB International, 1990, s. 229-231. ISSN 0370-1263. Dostupné také z:<http://www.cabi.org/isc/abstract/19912303469>
35. BHAT, N.A. a S.D. MASOODI. Efficacy of various antibiotics against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* the casual pathogen of black rot of cabbage. In: *Invasive Species Compendium: Applied Biological Research*. Wallingford (UK): CAB International, 2000, s. 161-163. ISSN 0972-0979. Dostupné také z:<http://www.cabi.org/isc/abstract/20013173331>
36. BHAT, N.A., S.D. MASOODI a S.H. SIDIQUE. Chemical control of black rot of cabbage under field conditions in Kashmir valley. In: *Invasive Species Compendium*. Wallingford (UK): CAB International, 2000, s. 87-89. ISSN 0972-0979. Dostupné také z:<http://www.cabi.org/isc/abstract/20013173308>
37. BORMASHENKO, E., Y. SHAPIRA, R. GRYNIOV, G. WHYMAN, Y. BORMASHENKO a E. DRORI. Interaction of cold radiofrequency plasma with seeds of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Experimental Botany*. 2015, **66**(13), 4013-4021. DOI: 10.1093/jxb/erv206. ISSN 0022-0957. Dostupné také z:<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erv206>
38. BOST, Steve. Black Rot of Crucifers. *Plant diseases*. Tennessee: The University of Tennessee, 2011, (0W273). Dostupné také z:  
[http://trace.tennessee.edu/utk\\_agexdise/52/](http://trace.tennessee.edu/utk_agexdise/52/)
39. BRIMNER, Theresa A. a Greg J. BOLAND. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems*. 2003, **100**(1), 3-16. DOI: 10.1016/S0167-8809(03)00200-7. ISSN 01678809. Dostupné také z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880903002007>

40. DOBRIN, Daniela, Monica MAGUREANU, Nicolae Bogdan MANDACHE a Maria-Daniela IONITA. The effect of non-thermal plasma treatment on wheat germination and early growth. *Innovative Food Science*. 2015, **29**, 255-260. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.02.006. ISSN 14668564. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856415000429>
41. FONTENELLE, A.D.B., S.D. GUZZO, C.M.M. LUCON a R. HARAKAVA. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection* [online]. 2011, **30**(11), 1492-1500 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1016/j.cropro.2011.07.019. ISSN 02612194. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219411002559>
42. GRIFFITHS, Phillip D. a Cathy ROE. Response of Brassica oleracea var. capitata to Wound and Spray Inoculations with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *REPORTS: Breeding, Cultivars, Rootstocks, and Germplasm Resources*. 2005, **40**(1), 47-49. Dostupné také z: <http://hortsci.ashspublications.org/content/40/1/47.abstract>
43. GRONDEAU, Catherine, Régine SAMSON a D. C. SANDS. A Review of Thermotherapy to Free Plant Materials from Pathogens, Especially Seeds from Bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1994, **13**(1), 57-75. DOI: 10.1080/07352689409701908. ISSN 0735-2689. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689409701908>
44. HENSELOVÁ, Mária, Ľudmila SLOVÁKOVÁ, Michal MARTINKA a Anna ZAHORANOVÁ. Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma. *Biologia*. 2012-01-1, **67**(3), 490-497. DOI: 10.2478/s11756-012-0046-5. ISSN 1336-9563. Dostupné také z: <http://www.degruyter.com/view/j/biolog.2012.67.issue-3/s11756-012-0046-5/s11756-012-0046-5.xml>
45. HRUŠKOVÁ, Hana a Jan HOFBAUER. *PROBLEMATIKA TVRDOSEMENNOSTI JETELOVIN*. Troubsko: Agris, 1999. ISSN 1804-1930. Dostupné také z: [http://www.agris.cz/zemedelstvi?id\\_a=111116](http://www.agris.cz/zemedelstvi?id_a=111116)
46. HUANG, T.C. a H.L. LEE. Hot acidified zinc sulfate as seed soaking agent for the control of crucifer black rot. *AGRIS*. 1988, , 245-258. Dostupné také z: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302655536>

47. ISHIKAWA, Ryo, Mayumi SUZUKI-NISHIMOTO, Atsushi FUKUCHI a Kazuho MATSUURA. Effective Control of Cabbage Black Rot by Validamycin A and Its Effect on Extracellular Polysaccharide-Production of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Journal of Pesticide Science*. 2004, **29**(3), 209-213. DOI: 10.1584/jpestics.29.209. ISSN 1348-589x. Dostupné také z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jpestics/29.209?from=CrossRef>
48. ISSAZADEH, Khosro, Sara Kazemi RAD, Saeed ZARRABI a Mohammad Reza RAHIMIBASHAR. Antagonism of *Bacillus* species against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *African Journal of Microbiology Research*. 2012, **6**(7), 1615-1620. DOI: 10.5897/AJMR12.075. ISSN 19960808. Dostupné také z: [http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract/2012/23Feb/Issazadeh et al.htm](http://www.academicjournals.org/ajmr/abstracts/abstracts/abstract/2012/23Feb/Issazadeh%20et%20al.htm)
49. JIANG, Jiafeng, Yufang LU, Jiangang LI, Ling LI, Xin HE, Hanliang SHAO, Yuanhua DONG a Mohammed YOUSFI. Effect of Seed Treatment by Cold Plasma on the Resistance of Tomato to *Ralstonia solanacearum* (Bacterial Wilt). *PLoS ONE*. 2014-5-19, **9**(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0097753. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0097753>
50. KHAMSEN, Natthaporn, Damrongvudhi ONWIMOL, Nithiphat TEERAKAWANICH, Sanchai DECHANUPAPRITTHA, Weerawoot KANOKBANNAKORN, Komsan HONGESOMBUT a Siwapon SRISONPHAN. Rice ( *Oryza sativa* L.) Seed Sterilization and Germination Enhancement via Atmospheric Hybrid Nonthermal Discharge Plasma. *ACS Applied Materials*. 2016, **8**(30), 19268-19275. DOI: 10.1021/acsami.6b04555. ISSN 1944-8244. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsami.6b04555>
51. KIMURA, E. a M.A. ISLAM. Seed Scarification Methods and their Use in Forage Legumes. *Research Journal of Seed Science*. 2012-2-1, **5**(2), 38-50. DOI: 10.3923/rjss.2012.38.50. ISSN 18193552. Dostupné také z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=rjss.2012.38.50>

52. KITAZAKI, Satoshi, Kazunori KOGA, Masaharu SHIRATANI a Nobuya HAYASHI. Growth Enhancement of Radish Sprouts Induced by Low Pressure O<sub>2</sub> Radio Frequency Discharge Plasma Irradiation. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2012, **51**(1). DOI: 10.1143/JJAP.51.01AE01. ISSN 0021-4922. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1347-4065/51/01AE01>
53. KRITZMAN, G. a Y. BEN-YEPETH. Control by metham-sodium of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and the pathogen's survival in soil. In: *Invasive Species Compendium: Phytoparasitica*. Wallingford (UK): CAB International, 1990, s. 217-227. ISSN 0334-2123. Dostupné také z: <http://www.cabi.org/isc/abstract/19912305960>
54. KULKARNI, M.G., M.E. LIGHT a J. VAN STADEN. Plant-derived smoke: Old technology with possibilities for economic applications in agriculture and horticulture. *South African Journal of Botany*. 2011, **77**(4), 972-979. DOI: 10.1016/j.sajb.2011.08.006. ISSN 02546299. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254629911001141>
55. LING, Li, Jiang JIAFENG, Li JIANGANG, Shen MINCHONG, He XIN, Shao HANLIANG a Dong YUANHUA. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Scientific Reports*. 2014-7-31, **4**, -. DOI: 10.1038/srep05859. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep05859>
56. LING, Li, Jiang JIAFENG, Li JIANGANG, Shen MINCHONG, He XIN, Shao HANLIANG a Dong YUANHUA. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Scientific Reports*. 2014, **4**(5859). DOI: 10.1038/srep05859. ISBN 10.1038/srep05859. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep05859>
57. LING, Li, Li JIANGANG, Shen MINCHONG, Zhang CHUNLEI a Dong YUANHUA. Cold plasma treatment enhances oilseed rape seed germination under drought stress. *Scientific Reports*. 2015, **5**(1). DOI: 10.1038/srep13033. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep13033>
58. Lokalizace a přírodně-výrobní podmínky podniku. *Mendelova univerzita v Brně: Školní zemědělský podnik Žabčice* [online]. Brno (Czech republic): Mendelova univerzita v Brně, 2016 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://szp.mendelu.cz/onas/26430-poloha>

59. MANCINI, Valeria a Gianfranco ROMANAZZI. Seed treatments to control seedborne fungal pathogens of vegetable crops. *Pest Management Science*. 2014, **70**(6), 860-868. DOI: 10.1002/ps.3693. ISSN 1526498x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ps.3693>
60. MATSUSHIMA, Ken-Ichi a Jun-Ichi SAKAGAMI. Effects of Seed Hydropriming on Germination and Seedling Vigor during Emergence of Rice under Different Soil Moisture Conditions. *American Journal of Plant Sciences*. 2013, **04**(08), 1584-1593. DOI: 10.4236/ajps.2013.48191. ISSN 2158-2742. Dostupné také z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/ajps.2013.48191>
61. MCELHANEY, R., A.M. ALVAREZ a C.I. KADO. Nitrogen limits Xanthomonas campestris pv. campestris invasion of the host xylem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1998, **52**(1), 15-24. ISSN 0885-5765. Dostupné také z: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB1997047884>
62. MIHAI, Adriana Laura, Daniela DOBRIN, Monica MAGUREANU a Mona Elena POPA. Positive effect of non-thermal plasma treatment on radish seeds. *Romanian Reports in Physics*. 2014, **66**(4), 1110-1117. Dostupné také z: [https://www.researchgate.net/publication/268817765\\_Positive\\_effect\\_of\\_non-thermal\\_plasma\\_treatment\\_on\\_radish\\_seeds](https://www.researchgate.net/publication/268817765_Positive_effect_of_non-thermal_plasma_treatment_on_radish_seeds)
63. MISRA, N. N., B. K. TIWARI, K. S. M. S. RAGHAVARAO a P. J. CULLEN. Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens. *Food Engineering Reviews*. 2011, **3**(3-4), 159-170. DOI: 10.1007/s12393-011-9041-9. ISSN 1866-7910. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12393-011-9041-9>
64. MITRA, Anindita, Yang-Fang LI, Tobias G. KLÄMPFL, Tetsuji SHIMIZU, Jin JEON, Gregor E. MORFILL a Julia L. ZIMMERMANN. Inactivation of Surface-Borne Microorganisms and Increased Germination of Seed Specimen by Cold Atmospheric Plasma. *Food and Bioprocess Technology*. 2014, **7**(3), 645-653. DOI: 10.1007/s11947-013-1126-4. ISSN 1935-5130. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-013-1126-4>

65. MUKHERJEE, Mala, Prasun K. MUKHERJEE, Benjamin A. HORWITZ, Christin ZACHOW, Gabriele BERG a Susanne ZEILINGER. Trichoderma–Plant–Pathogen Interactions: Advances in Genetics of Biological Control. *Indian Journal of Microbiology*. 2012, **52**(4), 522-529. DOI: 10.1007/s12088-012-0308-5. ISSN 0046-8991. Dostupné také z:  
<http://link.springer.com/10.1007/s12088-012-0308-5>
66. NISHIOKA, Terumi, Yuichiro TAKAI, Mitsuo KAWARADANI, Kiyotsugu OKADA, Hideo TANIMOTO, Tatsuya MISAWA a Shinichi KUSAKARI. Seed Disinfection Effect of Atmospheric Pressure Plasma and Low Pressure Plasma on *Rhizoctonia solani*. *Biocontrol Science*. 2014, **19**(2), 99-102. DOI: 10.4265/bio.19.99. ISSN 1342-4815. Dostupné také z:  
<http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/bio/19.99?lang=en>
67. NISHIOKA, Terumi, Yuichiro TAKAI, Tomoko MISHIMA, Mitsuo KAWARADANI, Hideo TANIMOTO, Kiyotsugu OKADA, Tatsuya MISAWA a Shinichi KUSAKARI. Low-Pressure Plasma Application for the Inactivation of the Seed-borne Pathogen *Xanthomonas campestris*. *Biocontrol Science*. 2016, **21**(1), 37-43. DOI: 10.4265/bio.21.37. ISSN 1342-4815. Dostupné také z:  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bio/21/1/21\\_37/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bio/21/1/21_37/_article)
68. ONSANDO, J. M. Management of black rot of cabbage (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) in Kenya. *Tropical Pest Management*. 1987, **33**(1), 5-6. DOI: 10.1080/09670878709371102. ISSN 0143-6147. Dostupné také z:  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09670878709371102>
69. PAL, K. K. a B MCSPADDEN GARDENER. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. 2006. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02. ISSN 1935-9411. Dostupné také z:  
<http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/Pages/BiologicalControl.aspx>
70. PULIGUNDLA, Pradeep, Je-Wook KIM a Chulkyoon MOK. Effect of corona discharge plasma jet treatment on decontamination and sprouting of rapeseed (*Brassica napus* L.) seeds. *Food Control*. 2017, **71**, 376-382. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.07.021. ISSN 09567135. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095671351630384X>

71. RANDENIYA, Lakshman K. a Gerard J. J. B. DE GROOT. Non-Thermal Plasma Treatment of Agricultural Seeds for Stimulation of Germination, Removal of Surface Contamination and Other Benefits: A Review. *Plasma Processes and Polymers*. 2015, **12**(7), 608-623. DOI: 10.1002/ppap.201500042. ISSN 16128850. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ppap.201500042>
72. SAFO, D., J. LOPES a E.M. SHUMBA. *Effect of seed scarification on germination* [online]. Zimbabwe, 2001 [cit. 2017-04-13]. Dostupné z: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=ZW2005100126>
73. SPILIMBERGO, S. a A. BERTUCCO. Non-thermal bacterial inactivation with dense CO<sub>2</sub>. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, **84**(6), 627-638. DOI: 10.1002/bit.10783. ISSN 0006-3592. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.10783>
74. ŠERÁ, Božena, Vítězslav STRAŇÁK, Michal ŠERÝ, Milan TICHÝ a Petr ŠPATENKA. Germination of *Chenopodium Album* in Response to Microwave Plasma Treatment. *Plasma Science and Technology*. 2008, **10**(4), 506-511. Dostupné také z: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.598.6450&rep=rep1&type=pdf>
75. UYENAKA, J.R. Storage of Cabbage: FACTSHEET. *Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs* [online]. Ontario: Queen's Printer for Ontario, 1990 [cit. 2017-04-25]. Dostupné z: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/facts/90-055.htm>
76. VICENTE, Joana G. a Eric B. HOLUB. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology*. 2013, **14**(1), 2-18. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x. ISSN 14646722. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x>
77. VOLIN, John C., Ferencz S. DENES, Raymond A. YOUNG a Scott M.T. PARK. Modification of Seed Germination Performance through Cold Plasma Chemistry Technology. *Crop Science*. 2000, **40**(6), 1706-. DOI: 10.2135/cropsci2000.4061706x. ISSN 1435-0653. Dostupné také z: <https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/40/6/1706>

78. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *CABI Plantwise: Knowledge Bank* [online]. CABI Plantwise [cit. 2017-04-22]. Dostupné z:  
<http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx?speciesID=47001&dsID=56919&loc=global>
79. *Xanthomonas campestris*. *MicrobeWiki* [online]. Gambier (Ohio): Kenyon College, 2010 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z:  
[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Xanthomonas\\_campestris](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Xanthomonas_campestris)
80. Zelí hlávkové bílé ALBATROS F1. *MoravoSeed* [online]. Mikulov, 2016 [cit. 2017-04-16]. Dostupné z:  
<http://www.moravoseed.cz/index.php?stranka=sortiment&kategorie=1&druh=79>
81. ZHOU, Zhuwen, Yanfen HUANG, Size YANG a Wei CHEN. Introduction of a new atmospheric pressure plasma device and application on tomato seeds. *Agricultural Sciences*. 2011, **02**(01), 23-27. DOI: 10.4236/as.2011.21004. ISSN 2156-8553. Dostupné také z:  
<http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/as.2011.21004>
82. ZULUETA-RODRÍGUEZ, Ramón, Luis HERNÁNDEZ-MONTIEL, Bernardo MURILLO-AMADOR, Edgar RUEDA-PUENTE, Liliana CAPISTRÁN, Enrique TROYO-DIÉGUEZ a Miguel CÓRDOBA-MATSON. Effect of Hydropriming and Biopriming on Seed Germination and Growth of Two Mexican Fir Tree Species in Danger of Extinction. *Forests*. 2015, **6**(9), 3109-3122. DOI: 10.3390/f6093109. ISSN 1999-4907. Dostupné také z:  
<http://www.mdpi.com/1999-4907/6/9/3109/>



## 10. PRÍLOHY

### 10.1 Zoznam obrázkov

- Obr. 3 – Rozšírenie Xcc vo svete
- Obr. 4a – Príznyaky Xcc na liste
- Obr. 4b – Príznyaky Xcc na liste
- Obr. 4c – Príznyaky Xcc na liste
- Obr. 4d – Príznyaky Xcc na liste
- Obr. 4e – Príznyaky Xcc na liste
- Obr. 4f – Príznyaky Xcc na liste
- Obr. 5a – Černanie cievnych zväzkov
- Obr. 5b – Černanie cievnych zväzkov
- Obr. 5c – Černanie cievnych zväzkov
- Obr. 6 – Odroda 'ALBATROS F1'
- Obr. 7 – Výsev kapusty hlávkovej
- Obr. 8 – Vyklíčené rastliny
- Obr. 9 – Pretrhané rastliny
- Obr. 10a – Zjednotený porast
- Obr. 10b – Zjednotený porast
- Obr. 11 – Bakteriálne kultúry Xcc
- Obr. 12a – Osivo nakultivované na médiách (pohľad zhora)
- Obr. 12b – Osivo nakultivované na médiách (pohľad zdola)
- Obr. 13a – Veľkosť rastlín (26. 05. 2016)
- Obr. 13b – Veľkosť rastlín (26. 05. 2016)
- Obr. 14a – Veľkosť rastlín (09. 06. 2016)
- Obr. 14b – Veľkosť rastlín (09. 06. 2016)
- Obr. 15a – Veľkosť rastlín (30. 06. 2016)
- Obr. 15b – Veľkosť rastlín (30. 06. 2016)
- Obr. 16a – Veľkosť rastlín (21. 07. 2016)
- Obr. 16b – Veľkosť rastlín (21. 07. 2016)
- Obr. 17a – Veľkosť rastlín (25. 08. 2016)

- Obr. 17b – Veľkosť rastlín (25. 08. 2016)  
Obr. 18a – Veľkosť rastlín (29. 09. 2016)  
Obr. 18b – Veľkosť rastlín (29. 09. 2016)  
Obr. 19a – Veľkosť rastlín (14. 10. 2016)  
Obr. 19b – Veľkosť rastlín (14. 10. 2016)  
Obr. 20 – Skladované hlávky  
Obr. 21 – Prítomnosť PCR produktov typických pre Xcc – negatívne hlávky  
Obr. 22 – Prítomnosť PCR produktov typických pre Xcc – pozitívne hlávky  
Obr. 23 – Pomalší rast NP variantu oproti ostatným variantom

## **10.2 Zoznam grafov, schém a tabuliek**

Graf 6 – Klíčivosť (opakovania)

Graf 7 – Výnos (opakovania)

Schéma 1 – Rozvrhnutie pokusného pozemku

Tabuľka 2a – Počet vyklíčených semien negatívnych variantov

Tabuľka 2b – Počet vyklíčených semien pozitívnych variantov

Tabuľka 3 – Koncentrácie vyizolovanej DNA (Vzorky osiva)

Tabuľka 4 – Koncentrácie vyizolovanej DNA (Vzorky listov)

Tabuľka 5a – Výnos negatívnych variantov (v gramoch)

Tabuľka 5b – Výnos pozitívnych variantov (v gramoch)

Tabuľka 6 – Hmotnosť skladovaných hlávok (Tukeyov HSD test)

Tabuľka 7 – Rozdiely v stratách na hmotnosti skladovaných hlávok medzi variantmi