

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

---

Studijní program: Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Detekce patogenů zemědělských plodin pomocí  
metagenomické analýzy**

---

**Autor:** Bc. Johana Kolářová

**Vedoucí práce:** Ing. Eva Jozová, Ph.D.

České Budějovice

2020

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací 5 a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne .....

Johana Kolářová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí práce paní Ing. Evě Jozové, Ph.D. za odborné vedení v laboratoři, za cenné rady a pomoc při písemném zpracování této diplomové práce. Také bych ji chtěla poděkovat za její vstřícnost, ochotu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat panu prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za rady, které mi poskytl nejen během zpracovávání této práce.

Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině a všem svým přátelům za trpělivost, podporu a pomoc, kterými mě zahrnovali během celé doby studia.

Děkuji.

## Abstrakt

V této diplomové práci byl hodnocen vliv ošetření osiva nízkoteplotním plazmatem (LTP) na výskyt patogenů na osivu pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) a řepky olejné (*Brassica napus* L.). Pro posouzení vlivu ošetření LTP byl porovnáván výskyt detekovaných patogenů izolovaných z neošetřeného osiva a z osiva ošetřeného LTP po dobu 4 a 8 minut. Pro detekci patogenů byla provedena metagenomická analýza pomocí kultivačních metod. Kultivací vzorků osiva na PDA (potato dextrose agar) médiu a následným pasážováním bylo připraveno celkem 182 čistých mikrobiálních kultur. Z vybraných 130 vzorků čisté mikrobiální kultury byla izolována DNA pomocí metody CTAB-PVP. Dále byly pomocí polymerázové řetězové reakce provedeny amplifikace prokaryontního genu kódujícího 16S rRNA a eukaryontního genu kódujícího 28S rRNA. Jednotlivé mikroorganismy byly identifikovány na základě sekvencí získaných ampliconů.

Ošetřením osiva pšenice seté byly eliminovány významné fytopatogeny rodů *Pseudomonas* sp. a *Fusarium* sp. Ošetřením osiva řepky olejné byly eliminovány fytopatogenní bakterie *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Pantoea agglomerans*, houby *Alternaria infectoria*, *Cladosporium pseudocladosporioides*, houbám podobný organismus *Phytophthora cambivora* a kontaminanty potravin a krmiv houbových rodů *Aspergillus* sp. a *Penicillium* sp. Pomocí ošetření osiva LTP je možné eliminovat výskyt nežádoucích mikroorganismů na povrchu osiva. Proto je vhodné toto ošetření využít jako alternativní postup k chemickému ošetření osiva.

**Klíčová slova:** nízkoteplotní plazma, metagenomická analýza, gen kódující 16S rRNA, gen kódující 28S rRNA, fytopatogeny, eliminace mikroorganismů

## Abstract

The effect of seed treatment by low-temperature plasma (LTP) on the occurrence of pathogens on seeds of wheat (*Triticum aestivum* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) was evaluated in this thesis. The presence of detected pathogens isolated from untreated seeds and from seeds treated by LTP for 4 and 8 minutes were compared for evaluation the effect of LTP treatment. The detection of pathogens was done by metagenomic analysis using culture methods. A total of 182 pure microbial cultures were prepared by culturing the seed sample on PDA (potato dextrose agar) medium and subsequent transfer of isolated microbial material. DNA was isolated by CTAB-PVP from selected 130 samples of pure microbial cultures. Furthermore, amplifications using polymerase chain reaction of the prokaryotic gene encoding 16S rRNA and the eukaryotic gene encoding 28S rRNA were done. Particular microorganisms were identified based on the sequences of the obtained amplicons.

Important phytopathogens of genera *Pseudomonas* sp. and *Fusarium* sp. on wheat seeds was eliminated by seed treatment using LTP. Treatment of oilseed rape seeds eliminated the phytopathogenic bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Pantoea agglomerans*, fungi *Alternaria infectoria*, *Cladosporium pseudocladosporioides*, fungal-like organism *Phytophthora cambivora* and food and feed fungal contaminants *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. LTP seed treatment can eliminate unfavorable microorganisms from the seed surface. It is suitable to apply this treatment as an alternative form to the chemical seed treatment.

**Key words:** low-temperature plasma, metagenomic analysis, gene encoding 16S rRNA, gene encoding 28S rRNA, phytopathogens, elimination of microorganisms

# Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Literární přehled.....</b>	<b>8</b>
2.1 Interakce rostlin a mikroorganismů .....	8
2.1.1 Kompatibilita .....	9
2.1.2 Inkompatibilita.....	9
2.2 Negativní vlastnosti hub.....	10
2.2.1 Mykotoxiny.....	11
2.3 Významné patogeny pšenice seté ( <i>Triticum aestivum</i> L.) .....	12
2.3.1 Bakterie.....	12
2.3.2 Houby.....	12
2.4 Významné patogeny řepky olejné ( <i>Brassica napus</i> L.) .....	13
2.4.1 Bakterie.....	13
2.4.2 Houby.....	14
2.4.3 Nádorovky .....	15
2.5 Významné kontaminanty rostlinných produktů.....	15
2.6 Ošetření osiva.....	17
2.6.1 Chemické metody .....	18
2.6.2 Biologické metody.....	19
2.6.3 Fyzikální metody .....	20
2.7 Plazma.....	21
2.7.1 Obecná charakteristika plazmatu .....	21
2.7.2 Rozdělení plazmatu.....	22
2.7.2.1 Mikrovlnný výboj za sníženého tlaku.....	22
2.7.2.2 Atmosférický typ výboje plazmatu - Gliding arc .....	23
2.7.3 Nízkoteplotní plazma.....	24
2.7.3.1 Využití nízkoteplotního plazmatu v zemědělství.....	25
2.7.4 Využití plazmatu v ostatních odvětvích průmyslu .....	27
2.8 Metody identifikace mikroorganismů .....	28
2.8.1 Kultivační metody.....	28
2.8.2 Mikroskopické metody .....	28

2.8.3	Chemické metody .....	29
2.8.4	Sérologické metody .....	29
2.8.5.	Cytogenetické metody .....	29
2.8.6	Molekulárně biologické metody .....	29
2.8.7	Elektroforetické metody.....	31
2.8.8	Fagotypizace .....	32
<b>3.</b>	<b>Cíle diplomové práce.....</b>	<b>33</b>
<b>4.</b>	<b>Materiál a metodika .....</b>	<b>34</b>
4.1	Popis odrůd plodin .....	34
4.2	Ošetření osiva nízkoteplotním plazmatem .....	34
4.3	Kultivace mikroorganismů a odběr vzorků.....	36
4.4	Extrakce DNA a její kontrola.....	36
4.5	Polymerázová řetězová reakce .....	38
4.6	Elektroforéza .....	40
4.7	Sekvenování .....	40
4.8	Alignment získaných sekvencí.....	40
<b>5.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam použitých literárních zdrojů .....</b>	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam použitých internetových zdrojů .....</b>	<b>72</b>
	<b>Příloha č. 1 .....</b>	<b>74</b>
	<b>Příloha č. 2 .....</b>	<b>75</b>
	<b>Příloha č. 3 .....</b>	<b>76</b>
	<b>Příloha č. 4 .....</b>	<b>77</b>
	<b>Příloha č. 5 .....</b>	<b>78</b>

# 1. Úvod

Kvalitní osivo je základním prvkem zajišťujícím zemědělskou produkci. Přímým ošetřením osiva je zajištěna efektivní eliminace patogenů přenosných osivem a snižování výnosových ztrát. Pro udržitelnou produkci osiva, zvyšování ekonomické efektivnosti zemědělské produkce a eliminaci zatížení životního prostředí je snaha používat alternativní postupy (biologické a fyzikální) k chemickému ošetření osiva (Sharma a kol., 2015). Používané metody ošetření osiva musí splňovat požadavky udržitelného rozvoje zemědělství. Musí být zajištěn jejich minimální vliv na životní prostředí a zároveň kvůli zvyšování globální lidské populace musí být zajištěno zvyšování produkce potravin a krmiv (Araújo a kol., 2016).

Tyto požadavky je možné zajistit alternativním postupem ošetření osiva pomocí nízkoteplotního plazmatu (low-temperature plasma, LTP). Tímto ošetřením může být podpořeno klíčení a růst rostlin (Filatova a kol., 2013; Roy a kol., 2018), dochází k eliminaci patogenů vyskytujících se na povrchu osiva (Selcuk a kol., 2008; Puligundla a kol., 2017), redukci významných mykotoxinů (Havelka a kol., 2019) a může být zvyšován výnos plodin. Ošetření osiva LTP může být právě díky schopnosti eliminovat patogeny využíváno v ochraně rostlin (Mráz a kol., 2014; Kordas a kol., 2015).

Jedním z cílů této diplomové práce je detekce mikroorganismů osidlujících povrch osiva pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) a řepky olejné (*Brassica napus* L.). Tyto plodiny byly vybrány pro svůj pěstitelský význam. Pšenice setá je v České republice nejpěstovanější obilninou a řepka olejná nejpěstovanější olejinou. Dále byl v rámci této práce posuzován vliv ošetření osiva nízkoteplotním plazmatem na eliminaci detekovaných mikroorganismů.



## **2. Literární přehled**

### **2.1 Interakce rostlin a mikroorganismů**

Mikroorganismy mohou být symbionty, parazity či patogeny rostlin (Kůdela a kol., 2002). Jsou schopny kolonizovat široké spektrum substrátů. Jako saprotrofové, či biotrofové mohou osidlovat rostliny, živočichy i ostatní mikroorganismy. Saprotrófní mikroorganismy se živí exudátem živých rostlin nebo organickými látkami z odumřelých těl a částí rostlin. Biotrofní mikroorganismy potřebují pro získání živin živého hostitele (Thines a kol., 2006).

Typickým příkladem symbiotického vztahu je vztah hlízkových bakterií a rostlin z čeledi bobovitých, nebo mykorrhiza. Mykorrhiza je oboustranně prospěšný vztah houby a rostliny. Rostlina je pro houbu zdrojem uhlíkatých sloučenin. Houba umožňuje rostlině lepší příjem anorganických živin nebo vody. Také jí může poskytovat vitaminy a organický dusík (Oliver a Schweizer, 1999).

Mnoho mikroorganismů, které kolonizují rostliny, neposkytují svým hostitelům žádné benefity. Vystupují jako patogeny a původci onemocnění rostlin (Thines a kol., 2006). Pro projev onemocnění rostliny je nutné spolupůsobení přítomnosti virulentního patogena, náchylného hostitele a příznivých podmínek vnějšího prostředí (pro rozvoj patogena), a to ve stejném prostoru a čase (Kůdela a kol., 2002).

Evoluční vývoj fytopatogenů a jejich hostitelských rostlin probíhal současně. Původním vztahem mikroorganismů a rostlin byla inkompatibilita (neslučitelnost), ze které se následně vyvinula kompatibilita (slučitelnost). Původně saprofytické mikroorganismy se během vývoje stávaly více závislé na svých hostitelích. Fytopatogeny jsou životně závislé na hostitelském organismu. Jsou vystaveny selekčnímu tlaku pro kompatibilitu s rostlinným hostitelem a jsou adaptovány na specifické hostitele. Naopak pro hostitele je žádoucí, aby byl potlačen růst a vývoj patogena. Proto jsou hostitelské rostliny selektovány na inkompatibilitu s patogeny. U rostlin jsou vyvinuty obecné mechanismy inkompatibility proti širokému spektru mikroorganismů (Kůdela a kol., 2002).

### 2.1.1 Kompatibilita

Kompatibilita (slučitelnost) je schopnost určitého druhu, patovaru či rasy mikroorganismu být pro určitý druh či odrůdu rostliny patogenem a možností rostliny být pro daný mikroorganismus hostitelem. Tato interakce je podmíněna molekulárně biologickými, genetickými a biochemickými vlastnostmi potenciálního patogena a hostitele (Kůdela a kol., 2002).

Infekce rostlin houbovými patogeny může probíhat odlišnými způsoby. Některé patogeny mohou vstupovat do hostitele jeho přirozenými otvory, či poraněními. Houbové patogeny mohou mít specializované struktury pro průnik neporušeným povrchem hostitele (např. apresoria, nebo enzymy degradující kutikulu a buněčnou stěnu buněk hostitele). Většina těchto fytopatogenů kolonizuje všechny orgány rostlinného těla. Kolonizace může probíhat intercelulárním, nebo intracelulárním prorůstáním mycelia. Fytopatogeny mohou usmrtit svého hostitele a žít se jeho odumřelými pletivy (nekrotrofové), nebo mohou kolonizovat a případně dokončovat svůj životní cyklus pouze na živých hostitelských rostlinách (biotrofové). Biotrofní houby nesou specializované struktury tzv. haustoria, která jim umožňují signální a živinovou výměnu s hostitelskými buňkami (Punja, 2004).

### 2.1.2 Inkompatibilita

Inkompatibilita (neslučitelnost) je stav, kdy určitý druh, patovar či rasa mikroorganismu nemůže být pro určitý druh či odrůdu rostliny patogenem a nemožností rostliny být pro daný mikroorganismus hostitelem (Kůdela a kol., 2002). Častou rezistencí je nehostitelská rezistence, která zabraňuje potenciálním patogenům být pro rostlinu infekčními. Rezistence je často realizována fyzikálními bariérami hostitele nebo časným rozpoznáním patogena (Punja, 2004).

Veškeré rostlinné druhy vykazují nehostitelskou rezistenci ke specifickým patogenům. Ta je založena na více faktorech, které mohou být v rámci druhu hostitele segregovány, aniž by byla narušena celková rezistence rostliny. Oproti tomu hostitelská rezistence je exprimována jednotlivými genotypy v rámci hostitelského druhu. Rezistence hostitele je obvykle specifická proti danému genotypu patogenu. Hostitelská rezistence je často podmíněna geny rezistence, jejichž produkty přímo nebo nepřímo reagují s produkty genu avirulence patogena (Heath, 2000).

Rostliny mohou při interakci s patogenem formovat kolem místa vniku patogena vrstvu odumřelých buněk a tím jej lokalizovat v daném místě, zabránit jeho šíření do okolních buněk a eliminovat i šíření toxických látek jím produkovaných. Rostliny jsou také schopny formovat vrstvu ligninu okolo prorůstajících hyf houbového patogena a tím úspěšně zastavit jeho šíření v rostlině (Oliver a Schweizer, 1999).

Rostliny reagují na infekci patogenem více způsoby. Mohou produkovat vysoce reaktivní superoxidové radikály, enzymy, které degradují houbovou buněčnou stěnu (chitinázy a glukonázy) nebo kyselinu salicylovou. Superoxidové radikály a kyselina salicylová jsou signálními molekulami systémově získané rezistence. Infekce v jedné části rostliny vede k produkci těchto signálních molekul, které způsobují obrannou reakci i v ostatních neinfikovaných částech rostliny. Tímto způsobem je zajištěna neúspěšnost budoucí infekce daným patogenem (Oliver a Schweizer, 1999).

K houbové infekci jsou náchylnější poškozené části rostlin nebo semen. Poškozené části jsou přístupnější pro spory hub, které mohou ve vlhkém prostředí klíčit v mycelium a rozšiřovat se v těle hostitele. Poškození mohou být způsobena hmyzem, ptactvem, hlodavci nebo nepříznivým počasím před i po sklizni. Dalšími příčinami poškození semen mohou být špatné pracovní postupy při sklizni a posklizňovém zpracování semen (Golob, 2007).

## **2.2 Negativní vlastnosti hub**

Houby jsou schopny rozkládat většinu organických látek produkovaných rostlinami. Houby jsou ale i významnými patogenními organismy pro řadu ekonomicky významných plodin. Infekce celých životaschopných rostlin nebo rostlinných produktů vede kvůli rozkladu organické hmoty či produkci toxinů k ekonomickým ztrátám (Oliver a Schweizer, 1999).

Infekce polních plodin houbovými organismy může způsobovat snížení kvantity i kvality sklizně. Produkované mykotoxiny mohou být pro zvířata i člověka vysoce toxické. Z těchto důvodů je prováděna kontrola krmiv proti kontaminaci mikroorganismy (Diaz, 2005).

Druhy hub produkující mykotoxiny, tzv. toxigenní houby, mohou být děleny do dvou skupin. Na ty, které kolonizují rostlinného hostitele a produkují toxiny před sklizní. Infekce hostitele těmito houbami je ovlivněna interakcemi mezi houbovým organismem a daným hostitelským druhem. Do druhé skupiny toxigenních hub se řadí ty, které kolonizují hostitele až po sklizni, tzv. původci skládkových chorob. Invaze těmito houbami je ovlivněna kvalitou a kvantitou živin plodiny, fyzikálními a biologickými faktory (Miller, 1995).

### 2.2.1 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundárními metabolity hub a pro houby jsou postradatelné. Jsou produkovány, jestliže je organismus vystaven konkurenčnímu organismu nebo stresu – např. změnám teplot, vlhkosti nebo aerace (Diaz, 2005). Mykotoxiny mohou poskytovat organismu výhodné vlastnosti oproti konkurenčním organismům (houbám, kvasinkám nebo bakteriím) v jeho prostředí. Mykotoxiny nejsou produkovány všemi druhy hub, ani všemi kmeny určitého druhu (Golob, 2007).

Mezi významné producenty mykotoxinů se řadí druhy rodu *Fusarium*, které produkují více než 70 druhů mykotoxinů (např. fumonisiny). Rod *Fusarium* má pro své široké spektrum mykotoxinů a pro své široké rozšíření globální ekonomický vliv (Diaz, 2005). Dalšími významnými mykotoxiny jsou aflatoxiny (produkovány druhy rodu *Aspergillus*). Významnými producenty mykotoxinů (např. patulinu a ochratoxinu) jsou také druhy rodu *Penicillium* (Miller, 1995).

Většina mykotoxinů je relativně tepelně stabilních. Předpokládá se, že mohou zůstat i v tepelně upravených produktech (Rundberget a kol., 2004). Mykotoxiny vykazují odlišnou toxicitu u odlišných živočišných druhů. Pozření potravy, nebo krmiva kontaminovaného mykotoxiny může způsobit akutní, nebo chronické mykotoxikózy. Otrava aflatoxiny může způsobovat krvácivý průjem, poruchy imunitního systému či metabolismu živin. Ochratoxiny jsou významnými nefrotoxiny a hepatotoxiny. Zmíněné mykotoxiny spolu s fumonisiny a patulinem jsou potenciálními karcinogeny nebo teratogeny (Seo a Yu, 2005).

## 2.3 Významné patogeny pšenice seté (*Triticum aestivum* L.)

### 2.3.1 Bakterie

#### *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*

*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* je původcem bakteriálního hnědnutí bázi plev pšenice a ječmene. Tato choroba může být rozvinuta, jsou-li od doby metání po dobu mléčné zralosti plodiny významné dešťové srážky (Kůdela a kol., 2002). Ve střední a východní Evropě je tato choroba nejvýznamnější bakteriální chorobou obilnin. Symptomy této choroby jsou změna barvy báze plev (viz obr. 18, příloha č. 1) a nekrózy listů a stébel. Většina kmenů bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* produkuje toxiny syringomyciny a syringopeptiny (Iacobellis a kol., 1997).

#### *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*

*Xanthomonas translucens* pv. *translucens* je gram-negativní bakterie, která je významným patogenem pšenice a triticales a způsobuje bakteriální listové skvrnitosti (viz obr. 19, příloha č. 1) a černání plev (Kůdela a kol., 2002). Tento patogen může být šířen zemědělskými stroji a nástroji. Bakterie vstupuje do rostlin průduchy a ranami. Hostitel je kolonizován svým xylémem (Kölliker a kol., 2006).

### 2.3.2 Houby

#### *Oculimacula yallundae*, *Oculimacula aciformis*

Druhy *Oculimacula yallundae* a *Oculimacula aciformis* jsou považovány za nejvýznamnější houbové původce chorob pat stébel a označovány jako stéblolam pšenice. Nebyly popsány významné rozdíly v postupu infekce druhů *Oculimacula yallundae* a *Oculimacula aciformis*, a proto se za původce stéblolamu považují oba druhy. Stéblolam má významný ekonomický vliv na pěstování ozimé pšenice (Wan a kol., 2005). Ztráty na výnosech jsou způsobeny rozsáhlými lézemi (viz obr. 20, příloha č. 2), které brání normálnímu pohybu živin a vody v rostlině a celá rostlina může poléhat (Ray a kol., 2006).

#### *Puccinia triticina*

Rez pšeničná způsobená houbovým patogenem *Puccinia triticina* je nejčastější rzí pšenice. Jejím mezihostitelem je vytrvalá rostlina žluťucha (*Thalictrum* L.).

*Puccinia triticina* je obligátní parazit, který produkuje letní výtrusy - urediospory (Kalina a Váňa, 2010). Tyto spory mohou být rozšiřovány větrem. Tímto způsobem mohou být infikovány rostliny i stovky kilometrů daleko od zdroje infekce. Typickými projevy rzi pšeničné jsou rezavé skvrny na listech pšenice (viz obr. 21, příloha č. 2) způsobené rezavými urediosporami. Ztráty na výnosu jsou způsobené malou velikostí zrn a jejich menším počtem v klasu pšenice (Bolton a kol., 2008).

### ***Tilletia caries***

Tento houbový patogen je původcem mazlavé sněti pšeničné a celosvětově způsobuje nejvíce devastující škody na pšenici. Tento patogen osidluje obilky pšenice a žita. Zde jsou produkovány teliospory (zimní výtrusy) houby. Infikovaná zrna jsou černá, tvrdá a obsahují zapáchající, mazlavou hmotu s teliosporami (viz obr. 22, příloha č.3). Infekce může být následně rozšiřována pomocí napadených obilek hostitele (Schlaich a kol., 2006).

### ***Ustilago tritici***

Zástupci rodu *Ustilago* se vyznačují vysokou hostitelskou specifitou a organotropií. Organotropie je schopnost tvořit spory jen na určitých orgánech hostitele. Konkrétně *Ustilago tritici* tvoří teliospory jen na zrnech hostitele. *Ustilago tritici* je původcem prašné sněti pšenično-ječné (Kalina a Váňa, 2010). Významným symptomem této choroby je černé zbarvení zrn pšenice (viz obr. 23, příloha č. 3). Zrna mají černou barvu kvůli mase teliospor patogena, které zde vznikají. Průměrné ztráty na výnosech při postižení porostu prašnou snětí jsou 15 až 30 % (Anjum a kol., 2012).

## **2.4 Významné patogeny řepky olejné (*Brassica napus* L.)**

### **2.4.1 Bakterie**

#### ***Pseudomonas syringae* pv. *maculicola***

*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* je původcem bakteriální listové skvrnitosti nejméně 25 druhů brukvovitých rostlin. Škody způsobené tímto patogenem jsou vyšší v kombinaci s mrazovým poškozením (Kúdela a kol., 2002). Typickými příznaky této choroby jsou malé hnědé skvrny a vodnaté, chlorotické a nekrotické léze na spodní straně listů (viz obr. 24, příloha č. 3). S postupující infekcí se mohou

jednotlivé léze spojovat a způsobovat celkové poškození listů a tím způsobovat ztráty na výnosech (Peters a kol., 2004).

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

Tato bakterie způsobuje černou žilkovitost brukvovitých rostlin. V tropických a subtropických oblastech je tato choroba jednou z nejvýznamnějších chorob brukvovitých rostlin. Symptomy choroby jsou listové skvrnitosti (viz obr. 25, příloha č. 4), či tracheobakteriózy. Jsou-li infikovány rostliny ve fázi semenáčků, odumírají, nebo zůstávají zakrnělé (Kůdela a kol., 2002). Bakterie infikuje rostlinu hydatodami, poraněními nebo infikovanými semeny. Typickými příznaky černé žilkovitosti brukvovitých jsou žlutě ohraničené tmavé skvrny ve tvaru písmene V na listech hostitele (Singh a kol., 2016).

## **2.4.2 Houby**

### ***Alternaria brassicae***

Pro rod *Alternaria* je typické tmavé zbarvení konidií a mycelia. Konidie tohoto druhu jsou běžně přítomny v ovzduší a mohou způsobovat alergické reakce dýchacích cest živočichů (Kalina a Váňa, 2010). Houba *Alternaria brassicae* způsobuje čern řepkovou. Touto chorobou mohou být poškozeny listy, šešule i semena hostitele. Jestliže jsou části rostliny kolonizovány tímto patogenem, jsou zbarveny černě (viz obr. 26, příloha č. 4). Na posklizňových zbytcích i semenech může přežívat patogen mnoho let a může být dále rozšiřován (Köhl a kol., 2010).

### ***Sclerotinia sclerotiorum***

*Sclerotinia sclerotiorum* je celosvětově rozšířený houbový patogen řepky, který může způsobovat ztráty na výnosech až 50 %. Infekce je iniciována askosporami, které jsou uvolňovány z apothecií. Ta na jaře vyrůstají na sklerociích, která jsou přes zimu uložena v půdě (Clarkson a kol., 2014). Symptomy infekce *Sclerotinia sclerotiorum* jsou vodnaté léze na listech a stoncích. Tyto léze nekrotizují a prorůstá na nich bílé mycelium se sklerocii (viz obr. 27, příloha č. 4). Ta jsou zřetelným znakem infikovaných rostlin (Bolton a kol., 2006).

## ***Verticillium longisporum***

*Verticillium longisporum* je houbový patogen způsobující verticiliové vadnutí řepky. Infekce hostitele se projevuje chlorózami na bočních větvích a listech a hnědými pruhy a diskoloracemi na stoncích. Později mohou být pod epidermis stonku viditelná mikrosklerocia (viz obr. 28, příloha č. 5), kterými může být infekce následně šířena. Symptomy této choroby se objevují 3 – 4 týdny před sklizní plodiny. Projevem této infekce může být i předčasné dozrávání řepky. Ztráty na výnosech způsobené tímto patogenem mohou být 10 – 50 % (Dunker a kol., 2008).

### **2.4.3 Nádorovky**

#### ***Plasmodiophora brassicae***

Kosmopolitní rozšíření rodu *Plasmodiophora* souvisí s areálem výskytu jeho hostitelů. Tento rod se řadí do třídy *Phytophyta* (nádorovky) do skupiny *Rhizaria* (Hwang a kol., 2012). Nádorovky jsou obligátními, endoparazitickými, intracelulárními nekrotrofy. Obvykle způsobují hypertrofii a hyperplazii částí rostlin (viz obr. 29, příloha č. 5). *Plasmodiophora brassicae*, nádorovka kapustová, napadá kořeny brukvovitých rostlin (především košťálových zelenin, ale i řepky olejné). Infekce je rozšiřována pomocí cyst (dormantních spor), které jsou rozptýlené v buňkách hostitele. Ochrana proti tomuto patogenu je založena na vhodných agrotechnických postupech, např. v nepěstování brukvovitých rostlin na infikovaných pozemcích po dobu 5 – 8 let (Kalina a Váňa, 2010).

## **2.5 Významné kontaminanty rostlinných produktů**

### ***Aspergillus sp.***

Tento rod hub patří spolu s rodem *Penicillium* k nejvýznamnějším rodům řádu *Eurotiales*. Rod *Aspergillus*, kropidlák, je anamorfa. Jeho teleomorfy jsou řazeny do rodů *Eurotium*, *Emericella*, *Fennelia*, *Neosyrtoya* a *Chaetosartorya*. Pro rod *Aspergillus* jsou typické kulovitě zakončené konidiofory. Většina zástupců tohoto rodu jsou saprotrofní organismy. Některé druhy mohou být pro živočichy i člověka škodlivé. Někteří zástupci tohoto rodu (např. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*) mohou způsobovat tzv. aspergilózy (choroby dýchacích cest, středního ucha, rohovky atd.) nebo produkovat mykotoxiny. Mezi nebezpečné, pravděpodobně karcinogenní



mykotoxiny patří sterigmatocystin (produkovaný druhem *Aspergillus versicolor*) a aflatoxin B<sub>1</sub> produkovaný druhem *Aspergillus flavus*. Tento druh se typicky vyskytuje na zapařených plodech podzemnice olejné. Naopak některé druhy jsou biotechnologicky využívány při výrobě potravin ze sóji a rýže a při výrobě organických látek, např. kyseliny citronové (Kalina a Váňa, 2010). Pro výrobu kyseliny citronové je využíván *Aspergillus wentii* nebo diploidní kmen *Aspergillus niger* vzniklý parasexuálním křížením (Schuster a kol., 2002).

### ***Fusarium* sp.**

Některé druhy rodu *Fusarium* jsou anamorfou rodu *Giberella*. Do rodu *Fusarium* patří více než 80 druhů hub, které mohou být saprofyty, nebo parazity rostlin, ostatních hub, hmyzu a obratlovců včetně člověka (Kalina a Váňa, 2010). Druhy rodu *Fusarium* často kolonizují obilniny, zejména kukuřici setou (*Zea mays* L.) a pšenici setou. Řada druhů rodu *Fusarium* může produkovat široké spektrum sekundárních metabolitů, z nichž některé mohou být toxické pro živočichy i člověka a mohou být detekovány i v produktech vyrobených z infikovaných plodin (Cendoya a kol., 2018). Některé mykotoxiny, např. fumonisiny mohou být karcinogenní (Ivić a kol., 2009).

### ***Penicillium* sp.**

Pro anamorfní rod *Penicillium*, štětičkovec, jsou typické konidiofory ve tvaru štětiček. Teleomorfní rody pro rod *Penicillium* jsou *Eupenicillium* a *Talaromyces*. U většiny druhů není teleomorfa popsána. Mezi významné druhy tohoto rodu patří producenti cytostatik (např. kyseliny mykofenolové) a producenti antibiotik: penicilinu (produkovaný některými kmeny *Penicillium chrysogenum*) nebo griseofulvinu (produkovaný *Penicillium griseofulvum*). Některé druhy jsou využívány v potravinářském průmyslu při výrobě sýrů (*Penicillium camembertii*, *Penicillium roquefortii*) nebo masných výrobků (*Penicillium nalgiovense*). Naopak *Penicillium italicum* je typickým patogenem citrusových plodů (Kalina a Váňa, 2010). Rod *Penicillium* je jedním z nejpočetnějších rodů hub vyskytujících se na potravinových zbytcích. Zde se mohou vyskytovat i nebezpečné druhy produkující mykotoxiny (patuliny, citrinin apod.), např. druhy *Penicillium crustosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum* nebo *Penicillium expansum* (Rundberget a kol., 2004).

## 2.6 Ošetření osiva

Mikroflóra osiva může být složena z patogenních i nepatogenních organismů. Některé patogenní mikroskopické houby (např. *Fusarium*), které jsou přenosné osivem, mohou snižovat klíčivost a následně vzházivost rostlin (Houba a kol., 2002). Roční ztráty na výnosech obilnin způsobené během posklizňové fáze mohou být 9 % v rozvinutých zemích a až 20 % v zemích rozvojových (Hou a kol., 2016).

Během posklizňové fáze může docházet kvůli mikrobiálním infekcím, nesprávným technologickým postupům či stárnutím skladovaných produktů k ekonomicky významným ztrátám. Vhodnými skladovacími podmínkami, chemickým, biologickým či fyzikálním ošetřením předem přečištěného, vysušeného a přetříděného osiva lze zajistit jeho mikrobiální bezpečnost a eliminovat tak ztráty (Mari a Guizzardi, 1998). Prevence kontaminace osiva mykotoxiny by měla probíhat již během předsklizňové fáze kontrolou toxigenních hub, především rodů *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* a *Penicillium* (Varga a Tóth, 2005).

Osivo je základním prvkem zemědělské produkce. Porosty přibližně 90 % plodin jsou zakládány osivem. Choroby a škůdci přenosní osivem mohou způsobit významné výnosové ztráty, nejsou-li včas eliminováni. V dnešní době je v zemědělství kladen velký důraz na zvyšování produkce se současným snižováním potřeby prostoru, vody a lidské práce. Těchto výsledků již nelze dosáhnout tradičními postupy pro eliminaci škůdců (např. sanitací, střídáním plodin, pěstováním směsných kultur, aplikací organických hnojiv apod.) (Sharma a kol., 2015).

Přímé ošetření osiva chemickými, biologickými či fyzikálními postupy vede k efektivní redukci patogenů (i redukci iniciačního inokula), k udržitelné produkci osiva, snížení ceny a k eliminaci zatížení životního prostředí. Tyto postupy mohou díky eliminaci patogenů, které se mohou na rostlině vyskytovat již během klíčení, vést ke zvýšení výnosů. Pro ošetření osiva jsou využívány postupy s vysokou účinností, která vede ke zlepšování ekonomické efektivity zemědělské produkce. Tyto metody mohou být použity v rámci integrované ochrany rostlin (Sharma a kol., 2015).

Ošetřování osiva je kontrolováno legislativou. V České republice je základní právní normou pro užívání přípravků na ochranu rostlin zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči. Tento zákon reguluje povolování, používání a kontrolování

přípravků na ochranu rostlin. Dle tohoto zákona nesmí mít použité přípravky na ochranu rostlin negativní vliv na životní prostředí ani na zdraví lidí a zvířat. Strategickým dokumentem Evropské unie je směrnice Evropské parlamentu a rady 2009/128/ES, kterou je řízena činnost společenství za účelem dosažení udržitelného používání pesticidů. Tato směrnice zajišťuje udržitelné používání pesticidů, snižování rizik aplikace pesticidů (snižování vlivu na lidské zdraví a životní prostředí) a používání integrované ochrany rostlin (Harašta a kol., 2015).

Používané metody ošetření osiva musí splňovat požadavky udržitelného rozvoje zemědělství. Musí být zajištěn minimální vliv na životní prostředí a zároveň kvůli zvyšování globální lidské populace musí být zajištěno zvyšování produkce potravin a krmiv (Araújo a kol., 2016).

### **2.6.1 Chemické metody**

Chemické moření osiva je používáno u většiny zemědělských plodin včetně zelenin. Mezi první užívaná mořidla patřily síran měďnatý a hydroxid sodný (Houba a kol., 2002). Od 20. let 20. století byla užívána suchá i kapalná rtuťnatá mořidla, která byla pro svou těkavost vysoce účinná ale zároveň nebezpečná pro životní prostředí. Od 80. let minulého století je čisté osivo ošetřováno suspenzí nebo dispergovatelným granulátem organických sloučenin - např. difenoconazolu, gludioxonilu, fluoxastrobinu a mnoha dalších (Dumalášová a kol., 2007).

Mořidla by měla být dostatečně toxická proti cílovému patogenu, neškodná pro rostliny, zvířata a lidi, snadno aplikovatelná a stabilní po dobu skladování osiva. Osivo by mělo být namořeno jen po dobu nezbytně nutnou, aby nedocházelo k degradaci živého semene (Houba a kol., 2002).

Chemické metody mohou být také použity pro eliminaci mykotoxinů v osivu. Pro detoxikaci osiva kontaminovaného ochratoxiny nebo aflatoxiny může být použita amoniace. Chemické úpravy osiva však mohou změnit nutriční a biologické vlastnosti osiva, proto nejsou využívány často (Varga a Tóth, 2005).

Mezi chemické metody lze zařadit i skladování osiva v řízené atmosféře. Obsah O<sub>2</sub> nižší než 0,14 % a obsah CO<sub>2</sub> vyšší než 50 % jsou hodnoty, při kterých je inhibován růst mycelia hub a produkce mykotoxinů. Pro tento způsob ošetření musí být osivo skladováno v hermeticky uzavřených skladech (Neme a Mohammed, 2017).

Užívaná chemická mořidla mají nesporný pozitivní vliv v ošetřování osiva proti patogenům. Jedním z problémů moření osiva ale může být vzrůstající rezistence patogenů k daným chemickým látkám. Dalšími důsledky nadměrného používání fungicidů může být znečišťování životního prostředí, kontaminace potravin nebo zvyšování ceny potravin. Použité pesticidy se mohou vyskytovat v životním prostředí i v potravinách ve formě perzistentních organických látek. Mnoho chemických látek užívaných v zemědělství může eliminovat prospěšné mikroorganismy (např. endofytické houby a bakterie). Se vzrůstajícími obavami ohledně užívání toxických látek pro ošetření osiva jsou vyvíjeny alternativní postupy ošetření osiva. Ty by měly podporovat růst ošetřené plodiny a eliminovat její patogeny s obdobným nebo lepším účinkem než metody chemické ochrany (Syed Ab Rahman a kol., 2018).

## 2.6.2 Biologické metody

Biologické metody ošetření osiva jsou vyvíjeny jako alternativní postupy chemických metod ošetření osiva. Systém biologické ochrany je levný, nezatěžující životní prostředí a trvale udržitelný (Syed Ab Rahman a kol., 2018).

Biologická ošetření osiva jsou používána pro snížení vlivu patogenů, pro podporu růstu plodiny a rozvoje prospěšných mikroorganismů a hmyzu. Osivo je inokulováno různými druhy bakterií a hub. Tato inokula mohou svým růstem potlačovat růst patogena a rozvoj choroby nebo mohou být hostitelsky specifickými patogeny cílového škůdce (Syed Ab Rahman a kol., 2018). Typickým příkladem je ošetření osiva houbou *Trichoderma harzianum*, která potlačuje půdní patogeny rodů *Pythium*, *Rhizoctonia* nebo *Fusarium* (Houba a kol., 2002). Houby rodu *Trichoderma* a bakterie rodů *Streptomyces*, *Bacillus*, *Agrobacterium* *Pseudomonas* a *Erwinia* mohou produkovat antimikrobiální látky, které potlačují růst cílových patogenů (Syed Ab Rahman a kol., 2018).

Účinnost biologického ošetření osiva je dána schopností použitého druhu regulovat daný patogen, množstvím jednotek použitého druhu na semeni a způsobem aplikace. Procesu úpravy osiva musí být probíhat za aseptických podmínek (Houba a kol., 2002).

Mezi biologická ošetření lze zařadit i aplikace přírodních produktů a chemických látek (např. antioxidantů a esenciálních olejů) extrahovaných z rostlin,

hub a bakterií (Syed Ab Rahman a kol., 2018). Některé esenciální oleje skořicovníku a hřebíčkovce mohou eliminovat růst hub *Fusarium* sp., *Penicillium verrucosum* nebo *Aspergillus ochraceus* (Neme a Mohammed, 2017).

Biologická detoxikace osiva je definována jako enzymatická degradace nebo biotransformace mykotoxinů pomocí celých buněk nebo enzymových systémů. Pro degradaci aflatoxinů může být použita bakterie *Flavobacterium aurantiacum*. Pro degradaci fumonisinů může být osivo ošetřeno fungálními druhy *Exophiala spinifera*, *Rhinochrysiella atrovirens* nebo bakteriálním rodem *Caulobacter* (Varga a Tóth, 2005).

### 2.6.3 Fyzikální metody

Díky fyzikálnímu ošetření osiva lze redukovat množství použitých hnojiv a tím snižovat míru kontaminace životního prostředí. Dále lze těmito metodami snižovat množství použitých fungicidů, díky možné dezinfekci osiva před setím i po dobu skladování. Osivo může být ošetřováno např. elektromagnetickými vlnami, magnetickými poli, ultrazvukem nebo ionizujícím zářením (Araújo a kol., 2016).

Osivo může být ošetřeno termálně metodami využívající plazmatu, jehož zdrojem může být přímo proud nebo vysokofrekvenční (rádiové vlny) nebo zdroje mikrovlnného záření (Bonizzoni a Vassallo, 2002). Rádiové vlny mohou být díky své vlnové délce a hloubce penetrace použity pro ošetření velkého množství materiálu. Pro úspěšné komerční využití musí tato metoda poskytovat dostatečnou mortalitu škůdců s ohledem na karanténní a fyto-sanitární opatření, nesmí ovlivňovat kvalitu produktů a musí být ekonomicky výhodná pro průmyslové využití. Nevýhoda této metody je neuniformní ošetření daného materiálu. Aby byla zajištěna rovnoměrná eliminace škůdců na osivu, je tato metoda často kombinována s ošetřením horkou vodou nebo vzduchem (Hou a kol., 2016).

Obsah mykotoxinů v osivu lze snížit mechanickou separací zrn na základě odlišné hustoty či odlišného zbarvení. Pro snížení obsahu některých mykotoxinů (např. zearalonů a fumonisinů) v osivu může být osivo promýváno vodou nebo roztokem uhličitanu sodného (Varga a Tóth, 2005). Obsah mykotoxinů produkovaných rodem *Fusarium* může být také snížen působením gamma záření.

Ovšem ošetřování radioaktivním zářením způsobuje změny genetické informace osiva a není účinné pro eliminaci všech mykotoxinů (Neme a Mohammed, 2017).

Jednou z dalších metod fyzikálního ošetření osiva je moření horkou vodou. Tato metoda slouží k eliminaci širokého spektra patogenů nechemickým způsobem. Teplota vody musí být dostatečně vysoká, aby došlo ke zničení patogenů, ale zároveň nesmí dojít k poškození osiva. Osivo je po úpravě opět vysušeno na doporučenou skladovací vlhkost, ale jeho dlouhodobé skladování doporučováno není (Houba a kol., 2002).

## **2.7 Plazma**

### **2.7.1 Obecná charakteristika plazmatu**

Plazma je označováno jako čtvrté skupenství hmoty. Je-li plynné fázi látky dodána tepelná energie, dojde k její částečné a následně úplné ionizaci a látka se stává plazmatem. Poprvé termín plazma použil Irwing Langmuir v roce 1928 a charakterizoval jej jako oblast výboje v plynu, která není ovlivněna stěnami elektrod a vykazuje následující vlastnosti:

1. Plazma je tvořeno volnými nosiči elektrického náboje (Kulhánek, 2017). Plazma je tvořeno ionty, elektrony, neutrony, fotony a makromolekulárními a polymerními částicemi (Shishoo, 2007).
2. Plazma vykazuje kolektivní chování. Na elektrická či magnetická pole reaguje jako celek a může je i vytvářet.
3. Plazma je kvazineutrální - v makroskopickém objemu je stejné množství kladných i záporných částic (Kulhánek, 2017).

Plazma tvoří většinu atomární hmoty vesmíru. Plazmatem jsou tvořeny hvězdy, mlhoviny a v celé sluneční soustavě se vyskytuje plazma slunečního větru. Na Zemi se plazma přirozeně vyskytuje jen v kanálech blesků, v ionosféře a v polárních zářích (Kulhánek, 2017).

Zdroje plazmatu mohou být nízkofrekvenční záření (o frekvenci 50 – 450 kHz), vysokofrekvenční záření (13,56 – 27,12 MHz), mikrovlnné záření (915 MHz, nebo 2,45 GHz) nebo výboj stejnosměrného, či střídavého proudu (Shishoo, 2007). Elektrický výboj poskytuje mezi 2 elektrodami hmotu s vysokou teplotou a hustotou.

Je-li zajištěn dostatečný proud plynu, může plazma přesahovat jednu z elektrod ve formě plazmového paprsku. Tato skutečnost je využívána v praxi při ošetřování materiálů (Bonizzoni a Vassallo, 2002).

## **2.7.2 Rozdělení plazmatu**

Plazma lze dělit dle mnoha kritérií, např. dle stupně jeho ionizace, schopnosti tvořit elektron-pozitronové páry, dle vodivosti, termodynamické rovnováhy plazmatu, míry interakcí jednotlivých částic plazmatu, výskytu prachu v plazmatu a teploty plazmatu. Dle teploty je plazma děleno na vysokoteplotní (fúzní) plazma a nízkoteplotní. Ve vysokoteplotním plazmatu jsou teploty elektronů a plynu v rovnováze, a to v řádech tisíců stupňů Kelvina. Oproti tomu teploty nízkoteplotního plazmatu v rovnováze nejsou (Kulhánek, 2017).

Plazma lze dělit dle způsobu jeho generování. Generovat plazma lze termickou ionizací plynu. K ionizaci plynu dochází až při teplotách řádově tisíců stupňů Kelvina, které poškozují živé organismy i většinu materiálů. Proto není tento způsob generování plazmatu vhodný pro průmyslové či biologické použití (Machala, 2009).

Druhým způsobem generování plazmatu je ionizace neutrálního plynu pomocí elektrického pole. Pro technologické a technické aplikace je tento způsob nejpoužívanějším typem generování plazmatu (Conrads a Schmidt, 2000). V elektrickém poli se nabitě částice začnou pohybovat zrychleným pohybem. Zrychlené částice se mohou srážet s jinými částicemi plynu a tím plyn ionizovat. Elektrické výboje, které mohou v elektrickém poli vznikat, mohou být jednosměrné, střídavé a pulzní. Vzniklé elektrické pole lze dle konfigurace elektrod dělit na homogenní (rovinné uspořádání elektrod) a nehomogenní (např. koaxiální uspořádání elektrod). Nehomogenní elektrické pole je typické pro korónový výboj. Dalšími typy výbojů jsou dielektrický bariérový výboj, přechodná jiskra, vysokotlaký žhavicí výboj a mnoho dalších (Machala, 2009).

Níže popsané výboje byly použity v praktické části této diplomové práce.

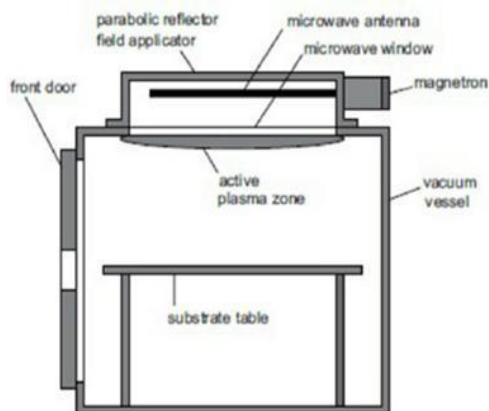
### **2.7.2.1 Mikrovlnný výboj za sníženého tlaku**

Mikrovlnné výboje jsou generovány vysokofrekvenčním elektromagnetickým polem. A jsou široce používány pro tvorbu plazmatu v různých odvětvích (průmyslové, medicínské a vědecké aplikace). Charakteristickými vlastnostmi

mikrovlenných výbojů je jejich vlnová délka, která odpovídá velikosti plazmové aparatury (Conrads a Schmidt, 2000). Vlnové délky mohou být od jednotek milimetrů až po desítky centimetrů (Lebedev, 2010). Pro nejčastěji používanou frekvenci elektromagnetických vln 2,45 GHz je vlnová délka mikrovlenného výboje 12,24 cm (Conrads a Schmidt, 2000).

Mikrovlenné výboje mohou být generovány za atmosférického, zvýšeného i sníženého tlaku. Tyto výboje mohou vznikat v uzavřených, otevřených a rezonančních systémech (Conrads a Schmidt, 2000). Výhodou výbojů vzniklých za sníženého tlaku s neelektrodovým původem je minimální kontaminace ošetřovaného materiálu nežádoucími částicemi plynu nebo produkty elektrodové eroze (Lebedev, 2010).

Pro tvorbu mikrovlenného výboje lze využít přístroj generující mikrovlenné plazma při sníženém tlaku (5 – 200 Pa). Elektromagnetické pole je tvořeno magnetronem, který je umístěn nad vakuovou komorou. Mikrovlenné výboje jsou spojovány přes křemennou vrstvu v plazma. Nad křemennou vrstvou je umístěn parabolický reflektor, který zajišťuje rovnoměrné ošetření vzorku (Lebedev, 2015).



Obr. 1: Schéma generátoru mikrovlenného plazmatu (Lebedev, 2015)

#### 2.7.2.2 Atmosférický typ výboje plazmatu - Gliding arc

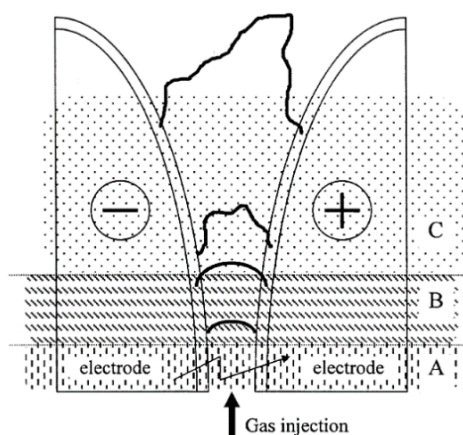
Výboj typu Gliding arc (klouzavý obloukový výboj) vzniká mezi dvěma nebo více divergujícími elektrodami, které jsou umístěny v proudu rychlého plynu. Gliding arc vzniká při atmosférickém nebo vyšším tlaku (Fridman a kol., 1999). Výboj typu Gliding arc generuje ve vzduchu reaktivní částice – např. atomární kyslík, ozon, oxidy dusíku, dusitanové ionty nebo hydroxylové radikály (Černý a kol., 2019).



Vysokonapěťový zdroj poskytuje elektrické pole, které je potřebné pro vznik výboje mezi elektrodami. Výboj vzniká v místě, kde jsou od sebe elektrody vzdáleny 1 – 2 mm. Pro vzduch při atmosférickém tlaku a vzdálenosti elektrod 1 mm je hodnota napětí potřebná pro vznik výboje 3 kV (Fridman a kol., 1999).

Po jeho vzniku přechází výboj do rovnovážného stavu, kdy dochází k formaci stabilního plazmového kanálu. V tomto kanálu je malý objem rovnovážného plazmatu. Toto plazma se pohybuje v proudu plynu. Délka oblouku výboje se během tohoto pohybu zvětšuje až do doby, kdy potřebná elektrická energie pro jeho udržení dosáhne maximální hodnoty dostupné ze zdroje napájení (Fridman a kol., 1999).

Jestliže dosáhne délka výboje své kritické hranice, dochází k nerovnovážnému stavu plazmatu. Teplo uvolňované plazmatem začne převyšovat hodnoty energie dodávané zdrojem a plazma není možné udržet v termodynamické rovnováze. Výsledkem je ochlazení teploty plynu plazmatu na cca 2 000 K (cca 1700 °C). Vodivost plazmatu je udržena vysokou teplotou elektronů (cca 11 000 K; cca 10 700 °C) a dochází k postupné ionizaci plynu. Výhodou tohoto typu výboje oproti mikrovlnnému výboji je cenová dostupnost (Fridman a kol., 1999).



Obr. 2: Fáze vzniku výboje *Gliding arc*, A) vznik výboje, B) rovnovážný stav a C) nerovnovážný stav (Fridman a kol., 1999)

### 2.7.3 Nízkoteplotní plazma

Nízkoteplotní plazma (low-temperature plasma, LTP) je tvořeno elektrony, jejichž energie může dosahovat hodnot 0,5 až 5 eV, dále ionty a neutrálními molekulami plynu. Energie těchto částic odpovídá teplotám 300 – 600 K, tzn. 27 °C - cca 330 °C (Basner a kol., 2000).

Většina LTP není v termodynamické rovnováze. Teplota elektronů bývá vyšší, než teplota těžkých částic a plynu. Zdroje LTP mohou produkovat chemicky bohaté prostředí i při teplotách blízkých pokojové teplotě, při normálním i sníženém tlaku. Je tedy možné ošetřovat materiály reaktivními plazmatickými částicemi nedestruktivním způsobem (Adamovich a kol., 2017).

Procesy využívající plazmatu mohou být rozděleny na homogenní reakce (reakce plynných fází) a heterogenní reakce, tj. reakce plazmatu a povrchu pevného, popř. kapalného materiálu. Heterogenní interakce mohou být dále děleny do tří kategorií. Je to postup, kdy je nežádoucí materiál z povrchu působením plazmatu odstraněn. Další formou ošetřování materiálu plazmatem je „plasma-enhanced chemical vapor deposition“ (PECVD), kdy je nový materiál ve formě filmu kumulován na ošetřovaném materiálu. Třetím postupem může docházet k fyzikální nebo chemické modifikaci materiálu (d'Agostino a kol., 2005).

#### **2.7.3.1 Využití nízkoteplotního plazmatu v zemědělství**

Využití LTP je jednou z efektivních posklizňových úprav osiva. Může být využito pro eliminaci nežádoucích mikroorganismů, nebo pro zlepšení biologických vlastností osiva. Efekt LTP aplikovaného na osivo může být ve zlepšení klíčení, zakořeňování a růstu celé rostliny (celkové zvýšení výnosu), v inaktivaci nežádoucích organismů (patogenních či kontaminujících mikroorganismů či hmyzu) nebo v konzervaci kazících se produktů (Adamovich a kol., 2017). Ošetřením LTP lze snížit množství aplikovaných chemických látek a tedy snížit dopad na životní prostředí (Puač a kol., 2018).

Nízkoteplotní plazma začalo být využíváno od začátku tohoto století. Ošetření plazmatem přináší pozitivní výsledky (např. procentuální zvýšení klíčení ošetřených semen) nezávisle na typu semen. Výsledek ošetření závisí na hodnotě energie plazmatu, době ošetření a na použitém typu ionizovaného plynu. Působením LTP může být modifikována smáčivost povrchu semen a tím zvýšena míra klíčivosti. S rozvojem přístrojů pro tvorbu plazmatu za normálního atmosférického tlaku jsou rozšiřovány možnosti aplikací LTP (Puač a kol., 2018).

Tímto způsobem mohou být ošetřovány i vzešlé rostliny. Např. ošetřením LTP sazenic jahod došlo k 25 % nárůstu obsahu antokyanů v ovoci. Tyto pigmenty

(a zároveň antioxidanty) vykazují schopnost redukovat mnohá lidská onemocnění. Tento postup by mohl být využit ve farmacii (Puač a kol., 2018).

Nízkoteplotní plazma má baktericidní účinky. Na ošetření nízkoteplotním plazmatem jsou více citlivé Gram-pozitivní bakterie než Gram-negativní. Ale oba typy bakterií vykazují po ošetření LTP zpomalení růstu a snížení míry reprodukce (Mráz a kol., 2014). LTP má i fungicidní účinky. Proto může být použito pro dekontaminaci velkého množství zrn určených pro produkci krmiv. Dále může být ošetření LTP využito pro redukci mykotoxinů, např. aflatoxinů v mléce (Puač a kol., 2018).

Mechanismy inaktivace mikroorganismů pomocí LTP lze dělit na biologické a fyzikální. Mezi biologické mechanismy patří degradace DNA ultrafialovým zářením, které je produkováno plazmatem, oxidativní degradace membrán nebo intracelulární složek (DNA, proteinů, lipidů i polysacharidů), modulace proteinů a změna jejich funkce, nebo indukovaná apoptóza. Mezi fyzikální mechanismy mikrobiální inaktivace pomocí LTP patří elektrostatická disrupce buněčných membrán, elektroporace a následná buněčná smrt (Liao a kol., 2017).

Obdobné výsledky jako přímé ošetření osiva LTP může mít i aplikace plazmatem-aktivované vody (plasma-activated water, PAW). Při této aplikaci nedochází k degradaci materiálu působením plazmatu. PAW může obsahovat atomární kyslík, superoxidové radikály, ozón, hydroxylové radikály, atomární dusík, dále peroxid vodíku, oxidy dusíky nebo dusičnanové ionty. PAW může být použita pro tvorbu antimikrobiálních a desinfekčních roztoků pro posklizňová ošetření rostlinných produktů. Aplikací PAW může být zvýšena klíčivost semen a díky obsahu dusičnanových iontů může být podpořen růst rostlin (Thirumdas a kol., 2018).

LTP může být také využito jako ekologická alternativa chemické dekontaminace a modifikace půdy. LTP může zvýšit viabilitu prospěšných mikroorganismů (např. bakterií fixujících vzdušný dusík) a eliminovat nežádoucí organismy. Např. ošetřením půdy půlprocentním ozónem generovaným plazmatem bylo eliminováno 83 % hád'átek bez redukce prospěšných mikroorganismů a hmyzu (Puač a kol., 2018).

## 2.7.4 Využití plazmatu v ostatních odvětvích průmyslu

Ošetření materiálu plazmatem je prováděno z následujících důvodů: destrukce toxických nebo škodlivých materiálů, povrchová úprava existujících materiálů nebo tvorba nových materiálů. Vysokoteplotní plazma může být použito pro destrukci pevných, kapalných či plyných toxických látek nebo pro tvorbu antikoročních vrstev a tepelných bariér (Bonizzoni a Vassallo, 2002).

Principem ošetření materiálu plazmatem je penetrace energeticky bohatých iontů, elektronů nebo fotonů do cílového materiálu, kde jsou částicemi plazmatu štěpeny chemické vazby a může docházet k atomárním kolizím a změnám struktury na atomární úrovni. Může docházet k difúzi či depozici reaktivních částic, které mohou dále reagovat (Adamovich a kol., 2017).

Nízkoteplotní plazma je v posledních letech nejrychleji se rozvíjející oblastí fyzikálního výzkumu. LTP je využíváno ve výzkumu elektrodynamické, atomární a molekulární fyziky, v oblasti materiálových a povrchových úprav, ve výzkumu chemického a elektrického inženýrství, v biologii a medicíně (Adamovich a kol., 2017).

LTP může být použito pro povrchové úpravy polymerů (zejména pro změnu povrchového napětí). Lze jej využít pro snížení propustnosti obalových materiálů potravin či léčiv. Textilní materiály mohou být ošetřeny LTP pro jejich snadnější a trvalejší barvení a impregnaci. (d'Agostino a kol., 2005).

V biomedicíně může být LTP použito pro sterilizaci nástrojů. Ošetřením LTP mohou být eliminovány všechny živé buňky, nebo proteiny (např. priony). Tato metoda by mohla nahradit ozařování kontaminovaných materiálů destruktivním ultrafialovým zářením, nebo používání toxických chemických látek (d'Agostino a kol., 2005). Tímto způsobem by mohly být sterilizovány i některé potraviny (Puač a kol., 2018). Působení LTP může mít terapeutický vliv. LTP může indukovat tvorbu imunogenních buněk v exponovaném tumoru. Tato skutečnost by mohla být využita pro léčbu pokročilých fází rakoviny (Adamovich a kol., 2017).

LTP může být využito i v enviromentální sféře, zejména při remediaci (působením plazmaticky vzniklého  $O_3$ ) a při elektrostatické precipitaci. Elektrostatická precipitace je využívána pro eliminaci průmyslových emisí (zejména

skleníkových plynů). Díky LTP by mohly být ze vzdušného dusíku syntetizovány dále zpracovatelné sloučeniny dusíku a tím by mohl být snížen jeho obsahu ve vzduchu (Adamovich a kol., 2017).

## **2.8 Metody identifikace mikroorganismů**

### **2.8.1 Kultivační metody**

Kultivační metody nejsou vhodné pro identifikaci některých mikroorganismů. Např. environmentální či medicínské vzorky mohou obsahovat značné množství nekultivovatelných mikroorganismů (Daims a Wagner, 2007). Většina buněk obsažených v získaných vzorcích je životaschopných, ale na médiu za standardních podmínek netvoří pozorovatelné kolonie, např. kvůli nepřítomnosti limitujících živin (Zengler a kol., 2002). Jen přibližně 1 % mikroorganismů je kultivovatelných *in vitro* (Pätzold a kol., 2008).

Bakteriální mikroorganismy jsou typicky kultivovány 24 – 72 hodin. Pro tvorbu typických houbových kolonií, díky kterým lze identifikovat jednotlivé druhy hub, je doba kultivace alespoň 5 dnů. Konkrétní doba, teplota a další podmínky (přístup vzduchu, pH, relativní vlhkost apod.) kultivace závisí na druhu kultivovaného mikroorganismu a použitým typu kultivačního média (Bursová a kol., 2014).

Jedním z nejpoužívanějších médií pro izolaci a kultivaci hubových organismů je Sabouraudův agar. Toto médium je selektivní a je používáno pro kultivaci hub nebo vláknitých bakterií. Pro další inhibici růstu bakterií se toto médium obohacuje o antibiotické či antimikrobiální látky, např. chloramfenikol (Gupta a kol., 2013).

### **2.8.2 Mikroskopické metody**

Jestliže jsou analyzovány mikroorganismy, které nelze separovat ze získaných vzorků a následně je kultivovat, je vhodné použít mikroskopické metody (Ríos a kol., 2004). Některé fungální druhy lze identifikovat pomocí světelné mikroskopie dle struktury jejich hyf a reprodukčních orgánů (Speranza a kol., 2010).

Jednou z mikroskopických metod používaných v mykologii je fluorescenční mikroskopie. Mnoho patogenních a saprofytických hub má, jestliže jsou vystaveny ultrafialovému záření, schopnost fluorescence. Jednotlivé druhy mohou být identifikovány na základě spektra jejich autofluorescence (Speranza a kol., 2010).

Také mohou být využívány fluorescenčně značené rRNA (ribozomální ribonukleová kyselina) sondy komplementární k druhově specifické sekvenci DNA (Rickerts a kol., 2011). Jedním z limitů světelné a fluorescenční mikroskopie je rozlišení. Pro překonání tohoto limitu jsou využívány metody elektronové mikroskopie (Speranza a kol., 2010).

### **2.8.3 Chemické metody**

Používanými chemickými metodami pro identifikaci bakterií je Gramovo či Ziehl-Neelsenovo barvení. Obě metody jsou rychlé, levné a poskytují přímou vizualizaci buněk a informace o struktuře buněčné stěny. Tyto metody však nejsou vhodné pro identifikaci organismů na úrovni druhu (Moter a Göbel, 2000).

### **2.8.4 Sérologické metody**

Jednou z používaných metod pro identifikaci bakteriálních druhů je imunofluorescence. Pro identifikaci druhů jsou používány druhově specifické monoklonální protilátky, které se ale mohou vázat i nespecificky. Přesnost této metody závisí na fenotypové variabilitě antigenů cílového organismu a míře exprese daných antigenů (Moter a Göbel, 2000).

### **2.8.5 Cytogenetické metody**

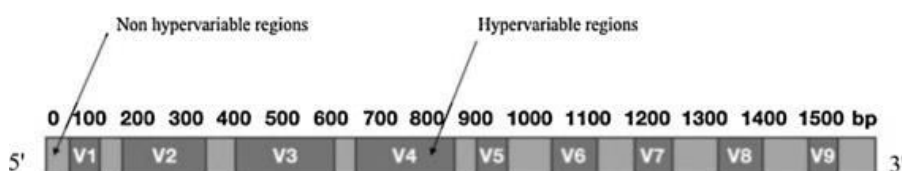
Pro identifikaci i kvantifikaci mikroorganismů lze použít fluorescenční *in situ* hybridizaci (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), při níž je použit značený oligonukleotid, který je komplementární k RNA cílového organismu. Bakterie jsou identifikovány dle sekvencí 16S nebo 23S rRNA (Daims a Wagner, 2007). Pro identifikaci fungálních druhů lze použít např. 28S rRNA (Rickerts a kol., 2011). Buňky jsou vizualizovány pomocí fluorescenční mikroskopie a kvantifikovány dle počtu vizualizovaných buněk přímou, nebo digitální analýzou obrazu. FISH není vhodnou metodou pro identifikaci mikroorganismů na nižší úrovni než na úrovni druhů (Daims a Wagner, 2007).

### **2.8.6 Molekulárně biologické metody**

Molekulární metody jsou používány pro překonání limitací tradičních identifikačních metod. Jednou z těchto limitací je neschopnost kultivovat některé organismy *in vitro* nebo jejich obtížná kvantifikace (Cumagun, 2012).

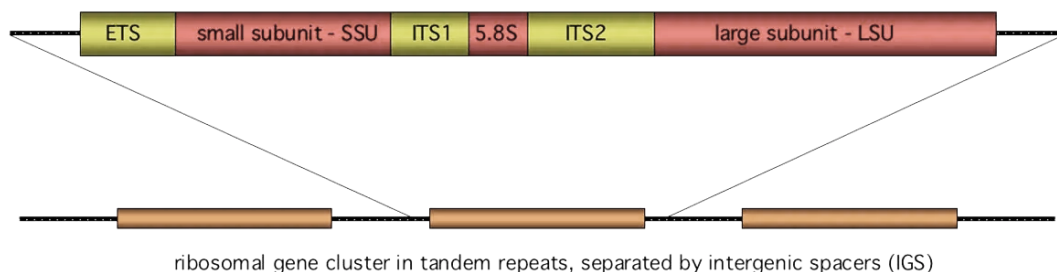
Mikrobiální druhy lze identifikovat dle variability druhově specifických sekvencí genetických markerů - dle fingerprintů. Analýza těchto markerů je vysoce informativní a dobře reprodukovatelná. Tyto metody je vhodné použít, jestliže nelze identifikovat organismy na úrovni druhů dle variability konzervativních genů (viz níže). Fingerprintové metody jsou používány pro fylogenetické studie a pro detekci a identifikaci organismů na poddruhové úrovni (Cumagun, 2012). Pro přesnou identifikaci mikrobiálního druhu je vhodné analyzovat až 20 markerů, které nejsou ve vzájemné vazbě. Metodami, které byly dříve hojně používány k analýze genetických markerů, jsou náhodná amplifikace polymorfni deoxyribonukleové kyseliny (DNA; random amplified polymorphic DNA, RAPD), polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism, RFLP) nebo polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (amplified fragment length polymorphism, AFLP) (McDonald, 1997).

S rozvojem technologie polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) a sekvenování došlo i k rozvoji technologií pro identifikaci mikrobiálních druhů založených právě na těchto metodách. Pro identifikaci bakteriálních organismů je využívána analýza variability konzervativního genu pro 16S rRNA (Davies a kol., 2001). Tento gen se vyznačuje vlastnostmi, díky nimž může být využit jako fylogenetický marker. Gen pro 16S rRNA se vyskytuje u všech organismů říše prokaryot. Pro prokaryotické buňky má konstantní esenciální funkci a je u něj vykazována nízká evoluční rychlost. Tento gen je složen z konzervativních oblastí a 9 variabilních úseků specifických pro daný bakteriální taxon (viz obr. 3). Kvůli vysoké konzervativitě genu často nelze identifikovat bakteriální organismy na úrovni druhů (Uhlík a kol., 2013).



Obr. 3: Struktura genu pro 16S rRNA (Renvoisé a kol., 2013)

Pro molekulární identifikaci hub, která je založena na analýze variability konzervativních lokusů, mohou být použity internal transcribed spacer regiony (ITS1 a ITS2). ITS regiony jsou považovány za standardní lokusy pro identifikaci houbových organismů (Demírel, 2016). Pro přesnější určení druhů hub identifikovaných dle sekvence ITS lze použít analýzu vysoce variabilní intergenic spacer sequence (IGS) (Cumagun, 2012). Další geny, které mohou být použity pro identifikaci hub, jsou gen pro 28S rRNA také označován jako gen kódující velkou ribozomální podjednotku (large subunit, LSU), který je složen ze dvou hypervariabilních domén D1 a D2 obklopených konzervativními regiony, a gen pro 18S rRNA označovaný jako gen pro malou ribozomální podjednotku (small subunit, SSU) (Demírel, 2016; Liu a kol., 2012).



Obr. 4: Schéma genů kódujících eukaryotní rRNA (Sonnenberg a kol., 2007)

Pro PCR identifikaci houbových organismů lze také využít vysoké variability některých house-keeping genů – např. genu pro  $\beta$ -tubulin, genu pro translační elongační faktor 1 alpha, genu pro kalmodulin nebo mitochondriálních genů kódující podjednotky 1 a 2 cytochrom c oxidázy (*cox I* a *cox II*). Pro bezpečnou identifikaci daného organismu je vhodné analyzovat sekvence více lokusů (Cumagun, 2012).

## 2.8.7 Elektroforetické metody

Elektroforetické metody umožňují kromě analýz spojených s molekulárně-genetickými metodami i analýzu proteinových profilů organismu. Analýzy proteinů mohou být využity pro identifikaci druhů, jejichž morfologické znaky neumožňují přesnou identifikaci geneticky odlišných druhů. Nebo mohou být využity pro identifikaci geneticky podobných organismů, které se mohou vyskytovat ve více morfologických variantách (Helmy, 2011).

Hojně využívanou elektroforetickou metodou pro identifikaci hub je denaturující proteinová elektroforéza (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel



electrophoresis, SDS-PAGE). Na základě analýzy všech buněčných proteinů je možné taxonomicky rozlišit organismy na druhové i poddruhové úrovni (Helmy, 2011).

### **2.8.8 Fagotypizace**

Fagotypizace je metoda identifikace bakteriálních druhů na základě schopnosti daného bakteriofága infikovat určitý druh či kmen bakterie. Bakteriofág je schopen infikovanou buňku lyzovat. Je-li bakteriální kultura kultivována s daným bakteriofágem, kterým je infikovatelná, objeví se v médiu prázdná místa (lyzované bakteriální buňky). Tato metoda nemá kvůli nízkému počtu případů absolutní specifčnosti daného bakteriofága a bakteriálního druhu široké uplatnění (Kúdela a kol., 2002).

### **3. Cíle diplomové práce**

1. Ošetření osiva nízkoteplotním plazmatem, izolace a kultivace mikroorganismů povrchové mikroflóry semen a příprava čistých mikrobiálních kultur
2. PCR analýza genů kódujících 16S rRNA u bakterií a 28S rRNA u hub
3. Identifikace mikrobiálních druhů pomocí sekvenční analýzy ampliconů genů kódujících 16S rRNA a 28S rRNA
4. Analýza vlivu ošetření osiva nízkoteplotním plazmatem na druhové spektrum mikroorganismů osidlujících osivo pšenice seté a řepky olejné

#### **4. Materiál a metodika**

Tato kapitola bude vložena a doplněna po vydání vědecké publikace.

## **5. Výsledky**

Výsledky jsou zpracovávány do vědecké publikace. Budou vloženy a doplněny po jejím vydání.

## **6. Diskuze**

Diskuze bude vložena a doplněna po vydání vědecké publikace.

## 7. Závěr

V rámci této diplomové práce byly pomocí sekvenační analýzy detekovány patogeny osidlující osivo pšenice seté a řepky olejné. Pro detekci mikroorganismů vyskytujících se na osivu byla použita metagenomická analýza pomocí kultivačních metod. Následně byl posuzován vliv ošetření osiva nízkoteplotním plazmatem na druhovou skladbu mikroorganismů, které se vyskytují na povrchu osiva před a po jeho ošetření.

Kultivací semen na PDA médiu a následným pasážováním bylo připraveno 182 čistých mikrobiálních kultur. Dle odlišné morfologie bylo vybráno 130 kultur, které byly dále analyzovány. Ze vzorků mikrobiálních kultur byla extrahována DNA pomocí metody CTAB-PVP. Tato metoda byla vybrána pro svou efektivnost a širokou využitelnost pro extrakci DNA z odlišných materiálů.

Jednotlivé mikroorganismy byly identifikovány pomocí sekvenační analýzy genů pro rRNA. Konkrétně bakterie byly identifikovány na základě sekvence části genu pro 16S rRNA a houby a houbám podobné mikroorganismy na základě sekvence části genu pro 28S rRNA. U jednotlivých vzorků byly provedeny PCR amplifikace částí zmíněných genů. Jednotlivé amplikony byly sekvenovány pomocí Sangerovy metody. Získané sekvence byly hodnoceny pomocí nástroje BLAST. Jestliže nebylo možné mikroorganismy identifikovat jen pomocí tohoto nástroje, byla získaná sekvence analyzována společně s vysoce homologními sekvencemi (vybranými dle míry identity v NCBI GenBank) pomocí programů Clustal X2 a FigTree.

Pro analýzu účinnosti ošetření osiva LTP v eliminaci mikroorganismů osidlujících osivo byl kvalitativně analyzován výskyt jednotlivých mikrobiálních druhů na neošetřeném osivu a na osivu ošetřeném LTP po dobu 4 a 8 minut. Ošetřením osiva pšenice seté výbojem typu Gliding arc byly eliminovány patogeny rodů *Pseudomonas* sp. a *Fusarium* sp. Naopak tímto ošetřením nebyly eliminovány bakterie *Bacillus amyloliquefaciens*, potenciálně patogenní rod *Pantoea* sp. ani významné houbové patogeny pšenice seté rodu *Alternaria* a druh *Pyrenophora tritici-repens* a potenciální živočišné patogeny a organismy znehodnocující potraviny *Mucor circinelloides* a *Rhizopus oryzae*.

Osivo řepky olejné bylo ošetřeno LTP mikrovlnným výbojem za sníženého tlaku. Tímto ošetřením byl eliminován výskyt všech detekovaných fytopatogenů (bakterií *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Pantoea agglomerans*, hub *Alternaria infectoria*, *Cladosporium pseudocladosporioides* a houbám podobného organismu *Phytophthora cambivora*) a některých kontaminantů (*Aspergillus versicolor* a *Penicillium chrysogenum*). Tímto ošetřením osiva nebyl eliminován výskyt většiny detekovaných druhů bakteriálního rodu *Bacillus* sp. ani hub *Aspergillus glaucus* a *Rhizopus oryzae*.

Jednotlivé druhy mikroorganismů zřejmě vykazují odlišnou vnímavost k působení LTP. V rámci navazujícího výzkumu by bylo vhodné provést optimalizaci parametrů ošetření osiva LTP tak, aby došlo k úplné eliminaci všech detekovaných patogenů a zároveň nebyla snížena životaschopnost osiva. Za takových podmínek by bylo možné a vhodné ošetření osiva LTP používat v udržitelném systému zemědělství pro ochranu rostlin jako alternativní formu k chemickému ošetření osiva.

## 8. Seznam použitých literárních zdrojů

- ADAMOVICH, I., BAALRUD, S. D., BOAGERTS, A., BRUGGEMAN, P. J., CAPPELLI, M., COLOMBO, V., CZARNETZKI, U., EBERT, U., EDEN, J. G., FAVIA, P., GRAVES, D. S., HAMAGUCHI, S., HIEFTJE, G., HORI, M., KAGANOVICH, I. D., KORTSHAGEN, U., KUSCHNER, M. J., MASON, N. J., MAZOUFFRE, S., MEDEDOVIC THAGARD, S., METELMANN, H-R., MIZUNO, A., MOREAU, E., MURPHY, A. B., NIEMERA, B. A., OERHLEIN, G. S., PETROVIC, Z. L., PITCHFORD, L. C., PU, Y-K., RAUF, S., SAKAI, O., SAMUKAWA, S., STARIKOVSKAIA, S., TENNYSON, J., TERASHIMA, K., TURNER, M. M., VAN DE SANDEN, M. C. M. a VARDELLE, A. (2017). The 2017 Plasma Roadmap: Low temperature plasma science and technology, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 50(32): 1 – 46.
- AMBRICO, P. F., ŠIMEK, M., ROTOLO, C., MORANO, M., MINAFRA, A., AMBRICO, M., POLLASTRO, S., GERIN, D., FARETRA, F. a DE MICCOLIS, R. M. (2020). Surface Dielectric Barrier Discharge plasma: a suitable measure against fungal plant pathogens, *Scientific Reports*, 10(1): 1 – 17.
- ANJUM, T., FATIMA, S. a AMJAD, S. (2012). Physiological changes in wheat during development of loose smut, *Tropical Plant Pathology*, 37(2): 102 – 107.
- ARAÚJO, S. S., PAPARELLA, S., DONDI, D., BENTIVOGLIO, A., CARBONERA, D. a BALESTRAZZI, A. (2016). Physical methods for seed invigoration: advantages and challenges in seed technology, *Frontiers in Plant Science*, 7: 1 – 12.
- AVRAMIDIS, G., STÜVE, B., WASCHER, R., BELLMANN, M., WIENEKE, S., VON TIEDEMANN, A. a VIÖL, W. (2010). Fungicidal effects of an atmospheric pressure gas discharge and degradation mechanisms, *Surface and Coatings Technology*, 205(1): S405 – S408.
- BASNER, R., SCHMIDT, M., BECKER, K. a DEUTSCH, H. (2000). Electron Impact Ionization of Organic Silicon Compounds, *Advances In Atomic, Molecular and Optical Physics*, 43: 147 – 185.
- BOLTON, M. D., THOMMA, B. P. H. J. a NELSON, B. D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen, *Molecular Plant Pathology*, 7(1): 1 – 16.



- BOLTON, M. D., KOLMER, J. A. a GARVIN, D. F. (2008). Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*, *Molecular Plant Pathology*, 9(5): 563 – 275.
- BONIZZONI, G. a VASSALLO, E. (2002). Plasma physics and technology; industrial applications, *Vacuum*: 64: 327 – 336.
- BURSOVÁ, Š., NECIDOVÁ, L. a DUŠKOVÁ, M. (2014). Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Obecná mikrobiologie. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-742-8.
- CENDOYA, E., CHIOTTA, M. L., ZACHETTI, V., CHULZE, S. N. a RAMIREZ, M. L. (2018). Fumonisin and fumonisin-producing *Fusarium* occurrence in wheat and wheat by products: A review, *Journal of Cereal Science*, 80: 158 – 166.
- CHAVES, M. S., MARTINELLI, J. A., WESP-GUTERRES, C., GRAICHEN, F. A. S., PATUSSI BRAMMER, S., SCAGLIUSI, S. M., DA SILVA, P. R., WIETHÖLTER, P., MONTAN TORRES, G. A., YAMAZAKI LAU, E., CONSOLI, L. a SOARES CHAVES, A. L. (2013). The importance for food security of maintaining rust resistance in wheat, *Food Security*, 5: 157 – 176.
- CHEN, L., CAI, Y., ZHOU, G., SHI, X., SU, J., CHEN, G. a LIN, K. (2014). Rapid Sanger sequencing of the 16S rRNA gene for identification of some common pathogens, *Public Library of Science One*, 9(2): 1 – 10.
- CLARKSON, J. P., FAWCETT, L., ANTHONY, S. G. a YOUNG, C. (2014). A model for *Sclerotinia sclerotiorum* infection and disease development in lettuce, based on the effects of temperature, relative humidity and ascospore density, *Public Library of Science One*, 9(4): 940 – 949.
- CONRADS, H. a SCHMIDT, M. (2000). Plasma generation and plasma sources, *Plasma Sources Science and Technology*, 9: 441 – 454.
- CUMAGUN, CH. J. R. (2012). Plant Pathology. Rijeka: InTech. ISBN 978-953-51-0489-6.
- ČADEŽ, N., BELLORA, N., ULLOA, R., HITTINGER, CH. T. a LIBKIND, D. (2019). Genomic content of a novel yeast species *Hanseniaspora gamundiae* sp. nov. from fungal stromata (*Cyttaria*) associated with a unique fermented beverage in Andean Patagonia, Argentina, *Public Library of Science One*, 14(1): 1 – 19.
- ČERNÝ, P., BARTOŠ, P., OLŠAN, P. a ŠPATENKA, P. (2019). Hydrophobization of cotton fabric by Gliding Arc plasma discharge, *Current Applied Physics*, 19(2): 128 – 136.

- D'AGOSTINO, R., FAVIA, P., OEHR, CH. a WERTHWIMER, M. R. (2005). Low-Temperature Plasma Processing of Materials: Past, Present, and Future, *Plasma Processes and Polymers*, 2: 7 – 15.
- DAIMS, H. a WAGNER, M. (2007). Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75: 237 – 248.
- DAVIES, C. E., WILSON, M. J., HILL, K. E., STEPHENS, P., HILL, C. M., HARDING, K. G. a THOMAS, D. W. (2001). Use of molecular techniques to study microbial diversity in the skin: Chronic wounds reevaluated, *Wound Repair and Regeneration*, 9(5): 332 – 340.
- DIAZ, D.E. (2005). The Mycotoxin blue book. Nottingham: Nottingham University Press. ISBN 1-904761-19-4.
- DEMÍREL, R. (2016). Comparison of rDNA regions (ITS, LSU, and SSU) of some *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* spp., *Turkish Journal of Botany*, 40: 576 – 583.
- DOYLE, J.J. a DOYLE J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*, 12: 13 – 15.
- DUMALASOVÁ, V., FAJFEROVÁ, M. a BARTOŠ, P. (2007). Opatření k omezení škod působených snětí mazlavou a snětí zakrslou na pšenici. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. ISBN 978-80-87011-38-6.
- DUNKER, S., KEUNECKE, H., STEINBACH, P. a VON TIEDEMANN, A. (2008). Impact of *Verticillium longisporum* on yield and morphology of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in relation to systemic spread in the plant, *Journal of Phytopathology*, 156(11-12): 698 – 707.
- FILATOVA, I., AZHARONOK, V., LUSHKEVICH, V., ZHUKOVSKY, A., GADZHIEVA, G., SPASIĆ, K., ŽIVKOVIĆ, S., PUAČ, N., LAZOVIĆ, S., MALOVIĆ, G. a PTROVIĆ, Z. L. (2013). Plasma seeds treatment as a promising technique for seed germination improvement, *31st International Conference on Phenomena in Ionized Gases*, Granada, Spain.
- FRIDMAN, A., NESTER, S., KENNEDY, L. A., SAVELIEV, A. a MUTAF-YARDIMCI, O. (1999). Gliding arc gas discharge, *Progress in Energy and Combustion Science*, 25: 211 – 231.

- GOLOB, P. (2007). On-farm mycotoxin control in food and feed grain. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 978-92-5-105852-7.
- GUPTA, V. K., TUOHY, M. G., AYYACHAMY, M., O'DONOVAN, A. a TURNER, K. M. (2013). Laboratory Protocols in Fungal Biology. Dordrecht: Springer. ISBN 978-1-4614-2356-0.
- HAGGE, J., BÄSSLER, C., GRUPPE, A., HOPPE, B., KELLNER, H., KRAH, F., Müller, J., SEIBOLD, S., STENGEL, E. a THORN, S. (2019). Bark coverage shifts assembly processes of microbial decomposer communities in dead wood, *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1912).
- HARAŠTA, P., PETERKA, V., TALICH, P., ŘEHÁK, V. a ZAPLETAL, M. (2015). Správné a bezpečné používání přípravků na ochranu rostlin. Praha: Ministerstvo zemědělství. ISBN 978-80-7424-265-3.
- HAVELKA, Z., BĚLÁKOVÁ, S., BOHATÁ, A., HARTMAN, I., KÁBELOVÁ, H., KŘÍŽ, P., BENEŠOVÁ, K., DIENSBIER, M., BARTOŠ, P. a ŠPATENKA, P. (2019). The effect of low-temperature plasma discharge on mycotoxin content in barley and malt, *Kvasný průmysl*, 65: 158 – 165.
- HEATH, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses, *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 315 – 319.
- HELMY, E. A. M. (2011). Characterization of *Penicillium roqueforti* varieties based on SDS-PAGE and PCR-RFLP profiles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44.
- HOU, L., JOHNSON, J. A. a WANG, S. (2016). Radio frequency heating for postharvest control of pests in agricultural products: A review, *Postharvest Biology and Technology*, 113: 106 – 118.
- HOUBA, M., HOSNEDL, V., PROKINOVÁ, E. a PAZDERA, J. (2002). Osivo a sadba. Praha: Nakladatelství Ing. Martin Sedláček. ISBN 80-902413-6-0.
- HWANG, S., STRELKOV, S. E., FENG, J., GOSSEN, B. D. a HOWARD, R. J. (2012). *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop, *Molecular Plant Pathology*, 13(2): 105 – 113.
- HWANG, S., STRELKOV, S. E., AHMED, H. U., ZHOU, Q., FU, H., FREUDA-AGYEMAN, R. a TURNBULL, G. D. (2017). First report of *Verticillium dahliae*

- Kleb. Causing wilt symptoms in canola (*Brassica napus* L.) in North America, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7: 514 - 526.
- IACOBELLIS, N. S., FIGLIUOLO, G., JANSE, J., SCORTICHINI, M. a CIUFFREDA, G. (1997). Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*. In: RUDOLPH K., BURR T.J., MANSFIELD J.W., STEAD D., VIVIAN A. a VON KIETZELL J. (ed). *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Dordrecht: Springer. ISBN 978-94-011-5472-7.
  - IVIĆ, D., DOMIJAN, A., PERAICA, M., MILIČEVIĆ, T. a CVJETKOVIĆ, B. (2009). *Fusarium* spp. contamination of wheat, maize, soybean, and pea in Croatia, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60: 435 – 442.
  - KALINA, T. a VÁŇA, J. (2010). Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1036-8.
  - KITAZAKI, S., KOGA, K., SHIRATANI, M. a HAYASHI, N. (2012). Growth enhancement of radish sprouts induced by low pressure O<sub>2</sub> radio frequency discharge plasma irradiation, *Japanese Journal of Applied Physics*, 51(1S).
  - KÖHL, J., VAN TONGEREN, C. A. M., GROENENBOOM-DE HAAS, B. H., VAN HOOFF, R. A., DRIESSEN, R. a VAN DER HEIJDEN, L. (2010). Epidemiology of dark leaf spot caused by *Alternaria brassicicola* and *A. brassicae* in organic seed production of cauliflower, *Plant Pathology*, 59(2): 358 – 367.
  - KÖLLIKER, R., KRAEHENBUEHL, R., BOLLER, B. a WIDMER, F. (2006). Genetic diversity and pathogenicity of the grass pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*, *Systematic and Applied Microbiology*, 29(2): 109 – 119.
  - KORDAS, L., PUSZ, W., CZAPKA, T. a KACPRZYK, R. (2015). The Effect of Low-Temperature Plasma on Fungus Colonization of Winter Wheat Grain and Seed Quality, *Polish Journal of Environmental Studies*, 24(1): 381 – 384.
  - KŮDELA, V., NOVACKY, A. a FUCIKOVSKY, L. (2002). Rostlinolékařská bakteriologie. Praha: Academia. ISBN 80-200-0899-3.
  - KULHÁNEK, P. (2017). Úvod do teorie plazmatu. Praha: Aldebaran Group for Astrophysics. ISBN 978-80-904582-2-2.
  - LANE, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E. a GOODFELLOW, M. (ed). *Nucleic Acid Sequencing Techniques in Bacterial Systematics*. New York: John Wiley and Sons. ISBN 978-04-719290-6-2.

- LEBEDEV, Y. A. (2010). Microwave discharges: generation and diagnostics, *Journal of Physics: Conference series*, 257(1).
- LEBEDEV, Y. A. (2015). Microwave discharges at low pressures and peculiarities of the processes in strongly non-uniform plasma, *Plasma Sources Science and Technology*, 24(5).
- LIAO, X., LIU, D., XIANG, Q., AHN, J., CHEN, S., YE, X. a DING, T. (2017). Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review, *Food Control*, 75: 83 – 91.
- LIU, K., PORRAS-ALFARO, A., KUSKE, C. R., EICHORST, S. A. a XIE, G. (2012). Accurate, rapid taxonomic classification of fungal Large-Subunit rRNA genes, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5): 1523 – 1533.
- LU, Q., LIU, D., SONG, Y., ZHOU, R. a NIU, J. (2014). Inactivation of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* by an atmospheric pressure cold plasma jet, *Plasma Processes and Polymers*, 11: 1028 – 1036.
- LUQUE, M. I., ANDRADE, M. J., RODRÍGUEZ, A., RODRÍGUEZ, M. a CÓRDOBA, J. J. (2012). Development of a protocol for efficient DNA extraction of patulin-producing molds from food for sensitive detection by PCR, *Food analytical methods*, 5(4): 684 – 694.
- MACHALA, Z. (2009). Plazma a živé organizmy, *Československý časopis pro fyziku*, 59(6): 370 – 376.
- MAITRA, S. S., KUMAR, B., KUMAR GHOSH, S. a TIWARY, B. K. (2015). Cross-reactivity of prokaryotic 16S rRNA gene-specific primers with genomes from eukaryotic organisms from marshlands, *Journal of Biology and Nature*, 2(2): 58 – 68.
- MARI, M. a GUIZZARDI, M. (1998). The Postharvest Phase: Emerging Technologies for the Control of Fungal Diseases, *Phytoparasitica*, 26(1): 59 – 66.
- MARSHALL, M. N., COCOLIN, L., MILLS, D. A. a VANDERGHEYNST, J. S. (2003). Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost, *Journal of Applied Microbiology*, 95: 934 – 948.
- MCDONALD, B. A. (1997). The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques, *Phytopathology*, 87(4): 448 – 453.

- MILLER, J. D. (1995). Fungi and Mycotoxins in Grain: Implication for Stored Product Research, *Journal of Stored Products Research*, 31(1): 1 – 16.
- MOHAMMED, A. M., AL-ANI, L. K. T., BEKBAYEVA L. a SALLEH, B. (2011). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* by *Pseudomonas fluorescens* and BABA *in vitro*, *World Applied Sciences Journal*, 15(2): 189 – 191.
- MOTER, A. a GÖBEL, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*, 41: 85 – 112.
- MUHAMMAD, S. a AMUSA, N. A. (2003). In-vitro inhibition of growth of some seedling blight inducing pathogens by compost-inhabiting microbes, *African Journal of Biotechnology*, 2(6): 161 – 164.
- MRÁZ, I., BERAN, P., ŠERÁ, B., GAVRIL, B. a HNATIUC, E. (2014). Effect of low-temperature plasma treatment on the growth and reproduction rate of some plant pathogenic bacteria, *Journal of Plant Pathology*, 96(1): 63 – 67.
- NA, Y. H., PARK., G., CHOI, E. H. a UHM, H. S. (2013). Effects of the physical parameters of a microwave plasma jet on the inactivation of fungal spores, *Thin Solid Films*, 547: 125 – 131.
- NEME, K. a MOHAMMED, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review, *Food Control*, 78: 412 – 425.
- NIEMIRA, B. A. (2012). Plasma Reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on Almonds Using Ambient Pressure Gases, *Journal of Food Science*, 77(3): M171 – M175.
- NILSSON, R. H., ANSLAN, S., BAHRAM, M., WURZBACHER, CH., BALDRIAN, P. a TEDERSOO, L. (2019). Mycobiome diversity: high-throughput sequencing and identification of fungi, *Nature Reviews Microbiology*, 17(2): 95 – 109.
- OBORNÍK, M., JIRKŮ, M. a DOLEŽEL, D. (2001). Phylogeny of mitosporic entomopathogenic fungi: Is the genus *Paecilomyces* polyphyletic?, *Canadian Journal of Microbiology*, 47(9): 813 – 819.
- O'DONNELL, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D. R. a TAYLOR J. W. (ed). *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic*

Speciation in Fungal Systematics. Wallingford: Centre for Agriculture and Bioscience International. ISBN 0851988652.

- OLIVER, R. P. a SCHWEIZER, M. (1999). Molecular fungal biology. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0-521-56784.
- OLŠAN, P., KŘÍŽ, P., HAVELKA, Z., BOHATÁ, A., STREJČKOVÁ, M., BARTOŠ, P. a ŠPATENKA, P. (2015). Rape treatment by the low pressure microwave plasma discharge and Gliding arc plasma. In: PAPP, P., ORSZÁGH, J., MORAVSKÝ, L., RIBAR, A. a MATEJČÍK, Š. (ed). Book of Contributed Papers: 20th Symposium on Application of Plasma Processes and COST TD1208 Workshop on Application of Gaseous Plasma with Liquids. Bratislava: Department of Experimental Physics, Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University. ISBN 978-80-8147-027-1.
- PÄTZOLD, R., KEUNTJE, M., THEOPHILE, K., MÜLLER, J., MIELCAREK, E., NGEZAHAYO, A. a ANDERS-VON AHLFTEN, A. (2008). *In situ* mapping of nitrifiers and anammox bacteria in microbial aggregates by means of confocal resonance Raman microscopy, *Journal of Microbiological Methods*, 72: 241 – 248.
- PELTIER, A. J., BRADLEY, C. A., CHILVERS, M. I., MALVICK, D. K., MUELLER, D. S., WISE, K. A. a ESKER, P. D. (2012). Biology, Yield loss and Control of *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean, *Journal of Integrated Pest Management*, 3(2): B1 – B7.
- PETERS, B. J., ASH, G. J., COTHER E. J., HAILSTONES, D. L., NOBLE D. H. a URWIN, N. A. (2004). *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity, *Plant Pathology*, 53(1): 73 – 79.
- PUAČ, N., GHERARDI, M. a SHIRATANI, M. (2018). Plasma agriculture: A rapidly emerging field, *Plasma Processes and Polymers*, 15(2): 170 – 174.
- PULIGUNDLA, P., KIM, J. a MOK, CH. (2017). Effects of Nonthermal Plasma Treatment on Decontamination and Sprouting of Radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds, *Food and Bioprocess Technology*, 10: 1093 – 1102.
- PUNJA, Z. K. (2004). Fungal disease resistance in plants – biochemistry, molecular biology and genetic engineering. New York: The Haworth Press. ISBN 1-56022-961-6.
- PURAHONG, W., MSPOOK, A., WU, Y. a CHEN, CH. (2019). Characterization of the *Castanopsis carlesii* deadwood mycobiome by Pacbio Sequencing of the

full-length fungal nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS), *Frontiers in Microbiology*, 10(983): 1 – 14.

- RENVOISÉ, A., BROSSIER, F., SOUGAKOFF, W., JARLIER, V. a AUBRY, A. (2013). Broad-range PCR: Past, present, or future of bacteriology?, *Médecine et maladies infectieuses*, 43: 322 – 330.
- RICKERTS, V., KHOT, P. D., MYERSON, D., KO, D. L., LAMBRECHT, E. a FREDRICKS, D. N. (2011). Comparison of quantitative real time PCR with sequencing and ribosomal RNA-FISH for the identification of fungi in Formalin fixed, paraffin embedded tissue specimens, *Infectious Diseases*, 11(202): 1 – 12.
- RÍOS, A., WIERZCHOS, J., SANCHO, L. G. a ASCASO, C. (2004). Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*, 50: 143 – 152.
- RUNDBERGET, T., SKAAR, I. a FLÅØYEN, A. (2004). The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes, *International Journal of Food Microbiology*, 90(2): 181 – 188.
- RAY, R. V., CROOK, M. J., JENKINSON, P. a EDWARDS, S. G. (2006). Effect of eyespot caused by *Oculimacula yallundae* and *O. acufiformis*, assessed visually and by competitive PCR, on stem strength associated with lodging resistance and yield of winter wheat, *Journal of Experimental Botany*, 57(10): 2249 – 2257.
- REES-GEORGE, J., VANNESTE, J. L., CORNISH, D. A., PUSHPARAJAH, I. P. S., YU, J. a TEMPLETON, M. D. (2010). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S – 23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions, *Plant Pathology*, 59(3): 453 – 464.
- ROY, N. C., HASAN, M. M., KABIR, A. H., REZA, M. A., TALUKDER, M. R. a CHOWDURY, A. N. (2018). Atmospheric pressure gliding arc discharge plasma treatments for improving germination, growth and yield of wheat, *Plasma Science and Technology*, 20(11): 115501 – 115501.
- SAHA, P., KALIA, P., SHARMA, M. a SINGH, D. (2016). New source of black rot disease resistance in *Brassica oleracea* and genetic analysis of resistance, *Euphytica*, 207: 35 – 48.



- SCHLOSS, P. D., JENIOR, M. L., KOUMPOURAS, CH. C., WESTCOTT, S. L. a HIGHLANDER, S. K. (2016). Sequencing 16S rRNA gene fragments using the PacBio SMRT DNA sequencing system, *PeerJ — the Journal of Life and Environmental Sciences*, 4: 1 – 16.
- SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J. C. a VAN DIJCK, P. W. M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 426 – 435.
- SCHLAICH, T., URBANIAK, BARTOSZ, M., MALGRAS, N., EHLER, E. BIRRER, CH. a MEIER, L. (2006). Increased field resistance to *Tilletia caries* provided by a specific antifungal virus gene in genetically engineered wheat, *Plant Biotechnology Journal*, 4(1): 63 – 75.
- SEENA, S., PASCOAL, C., MARVANOVÁ, L. a CÁSSIO, F. (2010). DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species, *Fungal Diversity*, 44: 77 – 87.
- SELCUK, M., OKSUZ, L. a BASARAN, P. (2008). Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment, *Bioresource Technology*, 99(11): 5104 – 5109.
- SEO, J. a YU, J. (2005). Toxigenic Fungi and Mycotoxins. In: AN, Z. (ed). Handbook of Industrial Mycology. New York: Marcel Dekker. ISBN 978-0-203-97055-3.
- SHARMA, K. K., SINGH, U. S., SHARMA, P., KUMAR, A. a SHARMA, L. (2015). Seed treatments for sustainable agriculture - A review, *Journal of Applied and Natural Science*, 7(1): 521 – 539.
- SHISHOO, R. (2007). Plasma technologies for textiles. Abington: Woodhead Publishing Limited. ISBN 978-1-84569-275-5.
- SINGH D., RATHAUR, P. S. a VICENTE, J. G. (2016). Characterization, genetic diversity and distribution of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* races causing black rot disease in cruciferous crops of India, *Plant Pathology*, 65(9): 1411 – 1418.
- SMITH, A. M., JAIN, M., MULRONEY, L., GARALDE, D. a AKESON, M. (2019). Reading canonical and modified nucleobases in 16S ribosomal RNA using nanopore native RNA sequencing, *Public Library of Science One*, 14(5): 1 – 15.

- SONNENBERG, R., NOLTE, A. W. a TAUTZ, D. (2007). An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification, *Frontiers in Zoology*, 4(6): 1 – 12.
- SPERANZA, M., WIERZCHOS, J., ALONSO, J., BETTUCCI, L., MARTÍN-GONZÁLEZ, A. a ASCASO, C. (2010). Traditional and new microscopy techniques applied to the study of microscopic fungi included in amber. In: MENDEZ-VILAS, A. a DIAZ ALVARES, J. (ed). *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. Badajoz: Formatex research Center. ISBN 978-84-614-6191-2.
- STING, R., EISENBERG, T. a HRUBENJA, M. (2019). Rapid and reasonable molecular identification of bacteria and fungi in microbiological diagnostics using rapid real-time PCR and Sanger sequencing, *Journal of Microbiological Methods*, 159: 148 – 156.
- SUNG, G., SUNG, J., HYWEL-JONES, N. L. a SPATAFORA, J. W. (2007). A multi-gene phylogeny of *Clavicipitaceae* (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(3): 1204 – 1223.
- SYED AB RAHMAN, S. F., SINGH, E., PIETERSE, C. M. J. a SCHENK, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens, *Plant Science*, 267: 102 – 111.
- ŠERÁ, B., ŠPATENKA, P., ŠERÝ, M., VRCHOTOVÁ, N. a HRUŠKOVÁ, I. (2010). Influence of plasma treatment on wheat and oat germination and early growth, *Institute of Electrical and Electronics Engineers Transaction on Plasma Science*, 38(10): 2963 – 2968.
- THINES, E., AGUIRRE, J., FOSTER A. J. a DEISING, H. B. (2006). Genetics of phytopathology: Secondary metabolites as virulence determinants of fungal plant pathogens, *Progress in Botany*, 67: 134 – 135.
- THIRUMDAS, R., KOTHAKOTA, A., ANNAPURE, U., SILIVERU, K., BLUNDELL, R., GATT, R. a VALDRAMIDIS, V. P. (2018). Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture, *Trends in Food Science & Technology*, 77: 21 – 31.

- TOMA, F. M. a ABDULLA, N. Q. F. (2013). Isolation and identification of fungi from spices and medicinal plants, *Research Journal of Environmental and Earth Sciences*, 5(3): 131 – 138.
- UHLÍK, O., STREJČEK, M., HROUDOVÁ, M., DEMNEROVÁ, K. a MACEK, T. (2013). Identifikace a charakterizace bakterií s bioremediačním potenciálem – od kultivace k metagenomice, *Chemické Listy*, 107: 614 – 622.
- VARGA, J. a TÓTH, B. (2005). Novel strategies to control mycotoxins in feeds: A review, *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(2): 189 – 203.
- VRABEC, M. (2015). Nástup nové odrůdy je dynamický, *Zemědělec*, 33: 26.
- WAN, A. M., BOCK, C. H., FITT, B. D. L., HARVEY, J. L. a JENKYN, J. F. (2005). Development of *Oculimacula yallundae* and *O. acufiformis* (eyespot) on leaf sheaths of winter wheat in the UK in relation to thermal time, *Plant Pathology*, 54(2): 144 – 155.
- WANG, A., LIN, W., CHEN, X., LU, G., ZHOU, J. a WANG, Z. (2008). Isolation and identification of *Sclerotinia* stem rot causal pathogen in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Zhejiang University - SCIENCE B*, 9(10): 818 – 820.
- ZENGLER, K., TOLEDO, G., RAPPÉ, M., ELKINS, J., MATHUR, E. J., SHORT, J. M. a KELLER, M. (2002). Cultivating the uncultured, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24): 15681 – 15686.

## 9. Seznam použitých internetových zdrojů

- 100 bp DNA Ladder, © 2020. [online] New England Biolabs [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://international.neb.com/products/n3231-100-bp-dna-ladder#Product%20Information>
- Bunt, © 2020. [online] Bayer Crop Science [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: <https://cropscience.bayer.co.uk/threats/diseases/cereal-diseases/bunt/>
- Cabbage club root, © 2017. [online] Pacific Pests and Pathogens - Fact Sheets [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: [http://www.pestnet.org/fact\\_sheets/cabbage\\_club\\_root\\_283.htm](http://www.pestnet.org/fact_sheets/cabbage_club_root_283.htm)
- Cauliflower brassica oleracea var botrytis *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, © 2020. [online] Nexles Europe [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: <https://www.nexles.com/articles/cauliflower-brassica-oleracea-var-botrytis-treatments-common-diseases-pests-vegetable/attachment/cauliflower-brassica-oleracea-var-botrytis-pseudomonas-syringae-pv-maculicola>
- Cereals – Wheat - *Triticum aestivum* L., © 2006. [online] Atlas of Plant Pathogenic Bacteria [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: <http://www.atlasplantpathogenicbacteria.it/wheat.htm>
- CTAB DNA extraction buffer, © 2020. [online] Cold Spring Harbor Protocols [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2009/3/pdb.rec11718.full>
- Eyespot, © 2020. [online] Bayer Crop Science [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: <https://cropscience.bayer.co.uk/threats/diseases/cereal-diseases/eyespot/>
- GoTaq® Green Master Mix (M712) Protocol, © 2020. [online] Promega Corporation [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-m712-protocol/>
- Julie, © 2020. [online] Selgen a. s. [cit. 2020-03-11]. Dostupné z: <https://selgen.cz/obiloviny/psenice-ozima-2/julie/>
- Leaf and pod spot (*Alternaria brassicae*) lesions on Oilseed Rape / Canola seedpods (*Brassica napus*), © 2020. [online] Nature Picture Library [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: <https://www.naturepl.com/stock-photo-oil-seed-rape-nature-image01338304.html>

- Loose smut of wheat, © 2020. [online] Koppert Biological Systems [cit. 2020-03-06]. Dostupné z: <https://www.koppert.com/challenges/disease-control/loose-smut-of-wheat/>
- Potato Dextrose Agar (PDA), © 2018. [online] Mycrobe [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://www.mycrobe.org/blog/2018/7/6/potato-dextrose-agar-pda>
- SMARAGD, © 2015. [online] RAPOOL [cit. 2020-03-11]. Dostupné z: <https://www.rapool.de/index.cfm/action/varieties/c/1/var/5.html>
- TAE and TBE Running Buffers Recipe & Video, © 2020. [online] Merck KGaA [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/tae-and-tbe-running-buffers-recipe.html>
- TE Buffer (1×), © 2020. [online] Cold Spring Harbor Protocols [cit. 2020-06-17]. Dostupné z: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2016/5/pdb.rec092338.full?sid=544e67da-6b71-4ff4-a356-39e22419bd1f>

## Příloha č. 1



Obr. 18: Změna barvy báze plev způsobená infekcí *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (Atlas of Plant Pathogenic Bacteria, 2006)



Obr. 19: Listové skvrnitosti způsobené infekcí *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* (Atlas of Plant Pathogenic Bacteria, 2006)

## Příloha č. 2



Obr. 20: Léze na stéblu pšenice – symptomy stéblolamu (Bayer Crop Science, 2020)



Obr. 21: Urediospory houby *Puccinia triticina*, a) symptomy na praporcovém listu pšenice, b) symptomy na adaxiální straně listu vzcházející rostliny a c) mikroskopická fotografie infikovaného listu s uvolňujícími se urediosporami (Chaves a kol., 2013)



### Příloha č. 3



Obr. 22: Zrna pšenice infikována *Tilletia caries* (Bayer Crop Science, 2020)



Obr. 23: Infikovaná zrna pšenice patogenem *Ustilago tritici* (Koppert Biological Systems, 2020)



Obr. 24: Nekrotické léze způsobené infekcí *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Nexles Europe, 2020)



## Příloha č. 4



Obr. 25: Listové skvrnitosti způsobené infekcí *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Saha a kol., 2016)

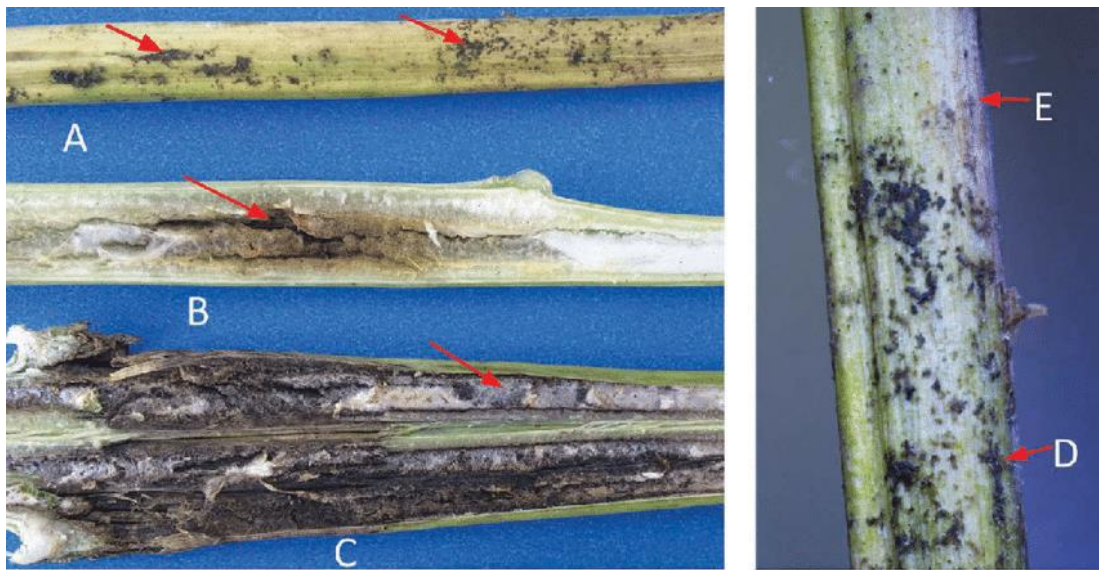


Obr. 26: Šešule řepky olejně infikované *Alternaria brassicae* (Nature Picture Library, 2020)



Obr. 27: Bílé mycelium s černými sklerocii – typické symptomy infekce *Sclerotinia sclerotiorum* (Peltier a kol., 2012)

## Příloha č. 5



Obr. 28: Symptomy infekce řepky olejné patogenem *Verticillium longisporum*, a) diskolorace na stonku, b) časné stádium infekce, c) pozdní stádium infekce a růst mikrosklerocií, d) a e) klíčení mikrosklerocií a produkce konidií (Hwang a kol., 2017)



Obr. 29: Nádory na kořenech brukve zelné vyvolané infekcí *Plasmodiophora brassicae* (Pacific Pests and Pathogens - Fact Sheets, 2017)