



Miroslav Baránek a kolektiv

Metodika ošetření osiv nanočásticemi za účelem zlepšení vybraných kvalitativních parametrů

Certifikovaná metodika

Mendelova univerzita v Brně

Miroslav Baránek a kolektiv

Metodika ošetření osiv nanočásticemi za účelem zlepšení vybraných kvalitativních parametrů

Certifikovaná metodika

2025



Oponenti

doc. Ing. Martin Koudela, Ph.D.¹

Ing. Lenka Clowezová²

¹ odborný oponent, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, 165 00 Praha - Suchbát

² oponent ze státní správy, Ministerstvo zemědělství ČR, Těšnov 65/17, Nové Město, 110 00 Praha 1, Česká republika

Vedoucí autorského kolektivu:

prof. Mgr. Miroslav Baránek, Ph.D.¹,  <https://orcid.org/0000-0002-1583-3588>

Kontakt: baranek@mendelu.cz

Autoři:

Ing. Jakub Pečenka, Ph.D.¹,  <https://orcid.org/0000-0001-6195-7592>

Ing. Dorota Tekielska¹,  <https://orcid.org/0000-0002-2863-5812>

Ing. Jana Čechová, Ph.D.¹,  <https://orcid.org/0000-0003-3027-6916>

doc. RNDr. Lukáš Richtera, Ph.D.²,  <https://orcid.org/0000-0002-8288-3999>

Ing. Jana Pekárková, Ph.D.²,  <https://orcid.org/0000-0001-9705-1565>

¹ Mendeleum – ústav genetiky, Zahradnická fakulta v Lednici, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

² Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení projektu NAZV „Využití inovativního potenciálu nanotechnologií pro zvýšení rentability vybraných oblastí zemědělské produkce“ vedeného pod označením QK22010031.

Publikaci bylo Ministerstvem zemědělství České republiky uděleno osvědčení č. MZE-78042/2025-13123 v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

O uplatnění byla uzavřena smlouva s firmou Moravoseed a.s.

© Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

ISBN 978-80-7701-071-9 (online ; pdf)

<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-071-9>



Open Access: Publikace Metodika ošetření osiv nanočásticemi za účelem zlepšení vybraných kvalitativních parametrů podléhá licenci Uveďte původ 4.0 (CC BY-NC-ND 4.0) Mezinárodní <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.cs>

ABSTRAKT

Cílem metodiky je popsat inovativní postupy pro ošetření osiv pomocí nanočástic a nanokompozitů, které vedou ke zlepšení zdravotního stavu semen, zvýšení jejich klíčivosti a následně i k posílení růstových parametrů rostlin. Metodika se zaměřuje na optimalizaci aplikace – konkrétně na volbu vhodného typu nanočástic/nanokompozitů, jejich koncentrace a délky působení – s cílem snížit mikrobiální kontaminaci a podpořit raný vývoj rostlin. Přestože nanotechnologie mají v zemědělství značný inovativní potenciál, v oblasti ošetření osiv dosud chybějí praktické metodické návody, které by umožnily jejich širší využití v praxi. Tato metodika proto přináší konkrétní doporučení pro efektivní aplikaci nanočástic a upozorňuje na klíčové faktory, které se v předchozích výzkumech ukázaly jako rozhodující pro dosažení požadovaného účinku – tedy typ nanočástic, jejich koncentrace, způsob aplikace a doba působení na semena. Na základě laboratorních testů a ověřování v praxi, prováděných na modelových plodinách, jako je brkev řepka či vybrané druhy zeleniny, poskytuje metodika ucelený rámec pro využití těchto technologií jak ve výzkumné sféře, tak v semenářské výrobě. Výsledky ukazují, že správně nastavené ošetření může významně snížit mikrobiální zatížení semen a zároveň urychlit proces klíčení. Popsané přístupy tak otevírají prostor pro širší zapojení nanotechnologií do moderní zemědělské produkce – s důrazem na jejich praktický přínos a dlouhodobou udržitelnost

Klíčová slova: osivo, nanočástice, nanopríming, antimikrobiální účinek, klíčení

ABSTRACT

Methodology for treating seeds with nanoparticles to improve selected quality parameters

The aim of this methodology is to describe innovative procedures for treating seeds with nanoparticles and nanocomposites that lead to improved seed health, increased germination rates and, subsequently, enhanced growth parameters of plants. The methodology focuses on optimising the application – specifically the choice of a suitable type of nanoparticles/nanocomposites, their concentration and duration of exposure – with the aim of reducing microbial contamination and supporting early plant development. Although nanotechnologies have considerable innovative potential in agriculture, in the field of seed treatment there is still a lack of practical methodological guidelines that would enable their wider use in practice. This methodology therefore provides concrete recommendations for the effective application of nanoparticles and highlights key factors that previous research has identified as crucial for achieving the desired effect – namely the type of nanoparticles, their concentration, the mode of application and the duration of exposure on the seeds. Based on laboratory tests and practical verification carried out on model crops such as oilseed rape and selected vegetable species, the methodology offers a comprehensive framework for the use of these technologies both in research and in seed production. The results show that properly adjusted treatment can significantly reduce the microbial load of seeds and at the same time accelerate the germination process. The approaches described thus open the way for broader integration of nanotechnologies into modern agricultural production – with an emphasis on their practical benefits and long-term sustainability.

Keywords: seed, nanoparticles, nanoprimering, antimicrobial effect, germination

OBSAH

1 Cíle metodiky	7
2 Vlastní popis metodiky – teoretický úvod.....	7
2.1 Nanočástice a jejich využití při pěstování rostlin.....	7
2.2 Ošetření osiv nanočásticemi – obvyklé účinky a používané typy nanočástic.....	9
2.2.1 Nanopriming ke snížení/eliminaci nežádoucí mikrobiální kontaminace semen	9
2.2.2 Nanopriming ke zlepšení růstových parametrů rostlin.....	11
3 Vlastní popis metodiky – praktická část	13
3.1 Zdroje, výběr a charakterizace nanočástic.....	13
3.2 Zásadní parametry pro úspěšné ošetření osiv vybranými nanočásticemi.....	16
3.3 Ošetření osiv nanočásticemi za účelem snížení výskytu patogenních mikroorganismů	19
3.3.1 Výběr vhodných nanočástic z hlediska jejich antimikrobiálního účinku	19
3.3.2 Ověření účinku ošetření na výskyt zájmového patogenu ...	24
3.3.3 Příklady výsledků a výstupů získaných v této oblasti členy autorského kolektivu	27
3.3.3.1 Eliminace patogenu <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i> (Xhc)	27
3.3.3.2 Využití nanočástic za účelem eliminace bakteriálních kontaminantů <i>in vitro</i> kultur	28
3.3.3.3 Srovnání účinnosti ošetření nanočásticemi a horkou vodou u osiv uměle inokulovaných patogenem <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	29
3.3.3.4 Hodnocení účinku nanočástic rGO-Cu-Ag a rGO-Cu-Zn jakožto alternativy v ochraně proti bakteriální skvrnitosti rajčete a paprik.....	29
3.4 Ošetření osiv nanočásticemi za účelem ovlivnit parametry klíčení a klíčních rostlin.....	32
3.4.1 Výběr vhodných nanočástic hlediska možného stimulačního účinku na klíčení	32
3.4.2 Ověření účinku ošetření na parametry klíčení	34
3.4.3 Příklady výsledků a výstupů získaných v oblasti ovlivnění klíčivosti členy autorského kolektivu.....	38
3.4.3.1 Zrychlení klíčení u osiv řepky olejky v důsledku ošetření nanočástic rGO-Cu	38

3.4.3.2 Zrychlení klíčení u osiv kořenových zelenin v důsledku ošetření vybranými nanočásticemi	39
3.4.3.3 Dopad ošetření nanočásticemi obsahujících měď na klíčící rostliny řepky olejky	40
4 Srovnání novosti postupů	41
5 Popis uplatnění certifikované metodiky.....	42
6 Ekonomické aspekty	43
7 Seznam použité literatury	44
8 Seznam publikací, které předcházely metodice	51

1 CÍLE METODIKY

Cílem metodiky je popsat inovativní postupy pro ošetření osiv pomocí nanočástic a nanokompozitů, které vedou ke zlepšení zdravotního stavu semen, zvýšení jejich klíčivosti a následně i k posílení růstových parametrů rostlin. Metodika se zaměřuje na optimalizaci aplikace – konkrétně na volbu vhodného typu nanočástic/nanokompozitů, jejich koncentrace a délky působení – s cílem snížit mikrobiální kontaminaci a podpořit raný vývoj rostlin.

Přestože nanotechnologie mají v zemědělství značný inovativní potenciál, v oblasti ošetření osiv dosud chybějí praktické metodické návody, které by umožnily jejich širší využití v praxi. Tato metodika proto přináší konkrétní doporučení pro efektivní aplikaci nanočástic a upozorňuje na klíčové faktory, které se v předchozích výzkumech ukázaly jako rozhodující pro dosažení požadovaného účinku – tedy typ nanočástic, jejich koncentrace, způsob aplikace a doba působení na semena.

Na základě laboratorních testů a ověřování v praxi, prováděných na modelových plodinách, jako je brkev řepka či vybrané druhy zeleniny, poskytuje metodika ucelený rámec pro využití těchto technologií jak ve výzkumné sféře, tak v semenářské výrobě. Výsledky ukazují, že správně nastavené ošetření může významně snížit mikrobiální zatížení semen a zároveň urychlit proces klíčení.

Popsané přístupy tak otevírají prostor pro širší zapojení nanotechnologií do moderní zemědělské produkce – s důrazem na jejich praktický přínos a dlouhodobou udržitelnost.

2 VLASTNÍ POPIS METODIKY – TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Nanočástice a jejich využití při pěstování rostlin

Nanočástice jsou charakteristické tím, že mají jednu nebo více rozměrových os v rozsahu 1–100 nm. Mohou se skládat z různých prvků a jejich sloučenin, zejména však z uhlíku, kovů, oxidů kovů a různých organických látek (Zítka *et al.*, 2013; Hasan, 2015; Wang *et al.*, 2017; Elmer & White, 2018; Fernando *et al.*, 2018). Podle rozměrů nanočástice dělíme na 0D (částice, u nichž všechny rozměry jsou v řádu nanometrů), 1D (kde jedna z dimenzí přesahuje hranici 100 nm), 2D (ploché útvary se dvěma rozměry většími než 100 nm) a 3D krystaly (všechny rozměry se blíží hranici 100 nm) (Zítka *et al.*, 2013; Dizaj *et al.*, 2015; Ealias & Saravanakumar, 2017; Sanzari *et al.*, 2019).

Tvar nanočástic může být plochý, sférický, válcovitý, dutý, kuželovitý, spirálovitý, nepravidelný atd., přičemž jejich povrch může být homogenní nebo nerovnoměrný s různými variacemi (Machado *et al.*,

2015). Díky vysokému poměru povrchu k objemu se vyznačují značnou reaktivitou, což je činí jedinečnými pro využití v mnoha průmyslových odvětvích včetně zemědělství.

Jedním z velmi častých způsobů využití je aplikace nanočástic (NPs) jako nanohnojiv za účelem zvýšení produkce plodin. Další významnou skupinu tvoří nanočástice používané jako nanopesticidy (Duhan *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2021), které využívají silný antimikrobiální účinek mnoha typů nanočástic. Tato vlastnost je nejčastěji popisována u stříbrných nanočástic, ale efektivní jsou také nanočástice na bázi titanu (Ti) a zinku (Zn) (Azizi-Lalabadi *et al.*, 2019), mědi (Cu) (Usman *et al.*, 2013), chitinu (Aliasghari *et al.*, 2016) a grafenoxidu (GO) (Dizaj *et al.*, 2014, Dizaj *et al.*, 2015; Kalwar & Shan, 2018; Fernando *et al.*, 2018). Bylo zjištěno, že při ošetření rostliny napadené patogenem bylo možné dosáhnout úplné eliminace nežádoucího mikroorganismu, a to i při nízkých koncentracích nanočástic (Li *et al.*, 2006; Dizaj *et al.*, 2014; Dizaj *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

Antimikrobiální vlastnosti nanočástic jsou ovlivněny tvarem, velikostí a koncentrací (Burman *et al.*, 2013; Dizaj *et al.*, 2014; Novotný *et al.*, 2019). Velikost nanočástic navíc ovlivňuje jejich schopnost proniknout do rostlinných pletiv s tím, že menší nanočástice vstupují do buněk snadněji. Princip antimikrobiálního účinku nanočástic je různorodý. Může dojít k náhlé změně osmotického tlaku a pH v důsledku rozpouštění nanomateriálu (Martins *et al.*, 2011). Dalším faktorem může být narušení buněčné membrány a enzymatických funkcí daného mikroorganismu (Ahmed *et al.*, 2016). Spolu s úplnou degradací buněčné membrány může docházet k urychlené fragmentaci DNA (Parra *et al.*, 2018).

Relativně novou oblastí využití nanočástic v zemědělství je jejich použití při úpravě osiva. Úprava osiva za účelem zlepšení jeho užitných vlastností se obecně nazývá priming, a pokud se k tomu využívají nanočástice, označuje se tento proces jako nanopriming. Nanopriming využívá nanočástice ke zvýšení klíčivosti semen, urychlení růstu sazenic a zlepšení odolnosti rostlin vůči stresovým faktorům, jako jsou sucho, vysoké teploty nebo infekce patogeny. Tento proces funguje prostřednictvím interakce nanočástic s buněčnými mechanismy v semenech, kde mohou regulovat metabolické dráhy nebo zlepšovat příjem vody a živin. Mezi nejčastěji používané nanočástice patří oxid křemičitý, oxid zinečnatý, nanočástice stříbra nebo uhlíkové nanomateriály, které mohou působit jak stimulujícím, tak ochranným způsobem. Výzkumy ukazují, že nanopriming může významně přispět ke zvýšení výnosu plodin, čímž se stává perspektivním nástrojem v moderním zemědělství (Marthandan *et al.*, 2020; Do Espirito Santo Pereira *et al.*, 2021).

2.2 Ošetření osiv nanočásticemi – obvyklé účinky a používané typy nanočástic

Skupina metod, které využívají proces namáčení semen ve vodě nebo vodných roztocích za účelem zlepšení jejich vlastností, zejména během klíčení, se historicky nazývá „primingové metody“. Na základě charakteru primingových činidel zahrnují tyto metody hydro-priming, halo-priming, osmo-priming nebo hormonální priming. Nanopriming je metoda ošetření semen pomocí různých druhů nanočástic (Mahakham *et al.*, 2017; Abbasi Khalaki *et al.*, 2020; Do Espirito Santo Pereira *et al.*, 2021). Podle zamýšleného použití lze nanopriming rozdělit na různé aplikace, jejichž cílem je:

- i) zlepšit zdravotní stav semen, zejména snížením kontaminace nežádoucími mikroorganismy
- ii) zvýšení tolerance k abiotickým stresovým faktorům
- iii) zlepšení produkčních vlastností rostlin, které ze semen ošetřených touto metodou vyrůstají.

Nanočástice mohou interagovat s povrchem semen a působit tak proti povrchově vázaným patogenům. V případě vnitřní infekce (Köhl & van der Wolf, 2005) je obvykle nutné zavést nanočástice do vnitřní části semene, což se odehrává mimo jiné průnikem přes aquaporiny, membránové proteiny podílející se na transportu vody a mnoha dalších malých molekul (Deshmukh *et al.*, 2017; Kumawat *et al.*, 2021). Protože jsou nanočástice obvykle aplikovány ve vodném roztoku, je důležité optimalizovat dobu ošetření semen, aby se zabránilo navození nežádoucího klíčení. K tomu může být využito ošetření s využitím podtlaku, které umožňuje lepší průnik nanočástic do vnitřních struktur semen a zároveň potenciálně eliminuje mikroorganismy přítomné uvnitř semen (Roberts *et al.*, 2006; Jisha *et al.*, 2012; Paparella *et al.*, 2015).

2.2.1 Nanopriming ke snížení/eliminaci nežádoucích mikrobiální kontaminace semen

Zejména v případě patogenů přenášených semeny (tzv. „seed born pathogens“) hraje klíčovou roli jako primární zdroj infekce právě semena resp. osiva. Proto stále existuje potřeba vývoje nových metod eliminace patogenů, které budou účinnější než současné metody, obvykle založené na fyzikálních principech. Jedním z nejslibnějších přístupů je ošetření osiva nanočásticemi (Pečenka *et al.*, 2021). Existuje široká škála nanočástic s odlišným chemickým složením, z nichž mnoho vykazuje antimikrobiální účinky. Principy tohoto antimikrobiálního efektu se mohou mezi různými nanočásticemi značně lišit, což dokazují různé studie zaměřené na nanočástice zinku

(Singh *et al.*, 2018), selenu (Sarkar *et al.*, 2021), mědi (Ingle *et al.*, 2014), stříbra (Ag) nebo chitosanu (Ma *et al.*, 2017). Při plánování metody ošetření semen je tedy nutné zohlednit předpokládaný mechanismus účinku použitých nanočástic. Svými antimikrobiálními vlastnostmi je známa celá řada kovových nanočástic a jsou v této oblasti také široce využívány. Například nanočástice na bázi sulfidu železnatého (FeS) významně snížily výskyt houby *Fusarium verticillioides* na rýžových semenech (*Oryza sativa* L.) a jejich účinek byl dokonce silnější než běžně používaný fungicid karbendazim. Také bylo pozorováno, že FeS nanočástice příznivě ovlivňují klíčení semen a vitalitu semenáčků (Ahuja *et al.*, 2019). Vliv nanočástic oxidu zinečnatého (ZnO), oxidu titaničitého (TiO₂) a stříbra na zdravotní stav semen a podporu klíčení byl testován na semenech chilli papriky (*Capsicum annuum* L.). Výsledky ukázaly, že tyto nanočástice nevyvolávají fytotoxickou reakci spojenou s nadměrným používáním kovů a zároveň vykazují silnou antimikrobiální aktivitu proti patogenům, jako jsou *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* a *Colletotrichum capsici* (Kumar *et al.*, 2020). Aplikace chitosan-guarových nanočástic (CGNP) na rýžová semena prokázala zlepšení klíčení a zároveň ochranu proti hlavním rýžovým patogenům *Pyricularia grisea* a *Xanthomonas oryzae*. CGNP měly vyšší antimikrobiální účinky než samotný chitosan nebo guarová guma (Sathiyabama & Muthukumar, 2020). Další studie zaměřená na antimikrobiální aktivitu Zn-chitosanových nanočástic proti patogenu *Curvularia lunata* ukázala, že i nízké koncentrace v rozmezí 0,01 až 0,16 % měly inhibiční účinek na testovanou houbu. Zinečnaté ionty v komplexu s chitosanem přinesly jejich pomalejší uvolňování, což vedlo k delšímu fungicidnímu efektu a zároveň sloužilo jako zdroj rostlinné výživy pro kukuřici (*Zea mays* L.) (Choudhary *et al.*, 2019). Při posuzování vhodnosti nanopríminingu byla také realizována studie za účelem ověřit, zda ošetřená semena nemají negativní dopad na půdní mikroflóru po zasetí. Z tohoto pohledu Shah a Belozeroва (2008) uvedli, že semena salátu (*Lactuca sativa* L.) ošetřená nanočásticemi oxidu křemičitého (SiO₂), palladia (Pd), zlata (Au) a mědi (Cu) vykazovala antimikrobiální účinek *in vitro*, ale ne *in situ*, což bylo vysvětleno jejich adsorpcí půdními složkami. Přímé srovnání ošetření semen nanočásticemi a konvenčním ošetřením horkou vodou (tzv. HWT) za účelem eliminace patogenních bakterií provedl Pečenka *et al.* (2021). Studie ukázala omezenou účinnost tradičního HWT při eliminaci *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (dále Xcc) na uměle infikovaných semenech zelí (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). Naopak nejvyšší koncentrace a doba expozice stříbrným nanočásticím vedla k úplné eliminaci životaschopných buněk Xcc ze semen (Pečenka *et al.*, 2021).

2.2.2 Nanopriming ke zlepšení růstových parametrů rostlin

Po nanoprimingu osiv bývá poměrně často pozorováno, že toto ošetření má pozitivní vliv na zlepšení klíčení semen a celkovou vitalitu rostlin. A to ať už při použití nanočástic se záměrem současně využít jejich antimikrobiální aktivitu, anebo v aplikacích zaměřených přímo na zlepšení růstových parametrů. Příkladem zde mohou být nanočástice stříbra (Ag) s dobře známým antimikrobiálním účinkem, při jejichž použití byl pozorován jejich pozitivní vliv i na vitalitu klíčících rostlin. Příkladem jsou výsledky studie o krátkodobé expozici stárnoucích semen rýže (*Oryza sativa* L.) nanočásticím stříbra, které byly vytvořeny pomocí zelené syntézy, a jejich následné sušení. Tento postup vedl ke zvýšení enzymatické aktivity a v důsledku toho také ke zvýšení rychlosti klíčení a následného vývoje semenáčků (Mahakham *et al.*, 2017). Příznivý účinek nanočástic stříbra (Ag) byl rovněž pozorován při jejich aplikaci na stárnoucí semena fazolí (*Vicia faba* L.). Tyto nanočástice snížily genotoxické účinky spojené se stárnutím semen (Younis *et al.*, 2019). Pro ošetření semen mungo (*Vigna radiata* L.) byly použity nanočástice oxidu hořečnatého (MgO), po jejichž aplikaci bylo zaznamenáno zvýšení klíčivosti a podpora prodloužování semenáčků (Vijai Anand *et al.*, 2020). Semena munga ošetřená nanočásticemi oxidu měďnatého (CuO) byla také použita ve studii Sarkar *et al.* (2021). Byly pozorovány podobné pozitivní účinky na klíčení a zvýšený příjem vody, podobně jako v případě nanočástic MgO (Sarkar *et al.*, 2021). Také výzkum účinku sulfidu kovů, konkrétně sulfidu stříbrného (Ag₂S) a sulfidu zinečnatého (ZnS) ukázal pozitivní vliv na rychlost klíčení semen a růstové parametry ošetřených semen sóji (*Glycine max* L.) a pšenice (*Triticum aestivum* L.) (Afsheen *et al.*, 2020). Jiný experiment potvrdil, že nanopriming semen kukuřice (*Zea mays* L.) nanočásticemi chitosanu se zakomplexovanými zinečnatými ionty (Zn) měl pozitivní vliv na klíčení semen. Zároveň byla kompenzována nedostatečná dostupnost zinku (Zn) v rostlinách a byl pozorován antimikrobiální účinek proti patogenní houbě *Curvularia lunata* (Choudhary *et al.*, 2019). Ke zvýšení klíčivosti semen rýže (*Oryza sativa* L.) a vitality semenáčků použili Afzal *et al.* (2021) dvě formy železných částic: oxid železnatý (FeO), který byl fytochemicky stabilizován extraktem z květů *Cassia occidentalis* L., a síran železnatý (FeSO₄). Výsledky ukázaly, že nanočástice FeO měly příznivější účinek na růst rostlin ve srovnání s FeSO₄ (Afzal *et al.*, 2021).

Mimo parametr zvýšené klíčivosti je velmi důležitá také dynamika tohoto procesu, a to zvláště u rostlinných materiálů, které z různých důvodů přirozeně vykazují sníženou míru klíčivosti. V tomto ohledu

mohou být příkladem triploidní odrůdy melounu (*Citrullus lanatus* (Thunb.)), které jsou ceněny zejména pro své bezsemenné plody. Aplikace směsných nanočástic obsahujících stříbro zde přispěla ke zvýšení rychlosti klíčení, metabolické aktivity, produkce biomasy, a tím i vyšším výnosům (Acharya *et al.*, 2020). Podobné výsledky ve smyslu zrychlení klíčení byly dosaženy v rámci experimentů realizovaných v rámci projektu NAZV QK22010031 u řepky nebo kořenových zelenin (Pečenka *et al.*, 2025; PUV 2025-42635).

Je nutné také připomenout, že ve velmi výrazné menšině ve srovnání s pozitivními účinky jsou reportovány výsledky, kde jednoznačný pozitivní účinek nanoprímingu nebyl dosažen. Příkladem mohou být výsledky nanoprímingu semen pšenice (*Triticum aestivum* L.) pomocí nanočástic oxidu zinečnatého (ZnO), které potvrdily příznivý vliv na klíčení semen, avšak negativně ovlivnil následný vývoj rostlin (Awasthi *et al.*, 2017). Do tohoto okruhu výsledků je také možné zařadit pozorování čtyř typů nanočástic na bázi zinku (Zn), které neměly negativní vliv na rychlost klíčení, avšak vykazovaly inhibiční účinek na prodlužování kořenů a výhonků rostlin čínské zeli (*Brassica pekinensis* L.) (Xiang *et al.*, 2015). Na základě poznatků získaných v rámci řešení projektu QK22010031 je však možné konstatovat, že případným negativním dopadům nanoprímingu lze dobře předcházet prostřednictvím volby vhodných nanočástic, jejich koncentrací, délkou ošetření a dalších faktorů, které jsou zdůrazněny v praktické části předložené metodiky.

Navzdory nepopiratelným přínosným účinkům nanočástic v různých oblastech zemědělské výroby je třeba vzít v úvahu i možná rizika, jako je nesprávné použití nebo kontaminace životního prostředí zbytky nanočástic (Ma *et al.*, 2010; Dimkpa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016; Tripathi *et al.*, 2017; Hubbard *et al.*, 2020). Pokud jde o regulaci výroby a používání nanočástic, je nezbytné dodržovat pravidla stanovená jednotlivými státy či regiony. První úroveň regulace má obecný charakter a obvykle považuje nanočástice za chemické látky. V případě EU byla v roce 2018 zavedena evropská chemická legislativa REACH EC 1907/2006, která obsahuje specifické požadavky na informace o nanočásticích a nová ustanovení pro hodnocení jejich chemické bezpečnosti a povinnosti následných uživatelů.

Druhou úroveň regulace představují aplikace nanočástic v zemědělství, které spadají pod pravidla pro výrobu a bezpečnost potravin. V případě EU je touto institucí EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin), který vytvořil vědeckou síť pro hodnocení rizik souvisejících s využitím nanotechnologií v potravinách a krmivech (EFSA Scientific Committee *et al.*, 2021). Poměrně komplexní a globální přehled přímo zaměřený na tuto problematiku publikoval Allan *et al.* (2021).

3 VLASTNÍ POPIS METODIKY – PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Zdroje, výběr a charakterizace nanočástic

Jak již bylo uvedeno, nanotechnologie jsou v posledních letech stále častěji využívány v různých segmentech zemědělství, včetně aplikací zaměřených na ošetření osiv. Jedním ze základních aspektů pro jejich širší využití je dostupnost vhodných a kvalitních materiálů od spolehlivých dodavatelů. Nanočástice se záměrem jejich využití pro ošetření osiv mohou být dostupné především prostřednictvím specializovaných firem zaměřených na nanomateriály, agrochemii a biotechnologie. Obvyklý okruh nabízených nanočástic představují oxidy kovů (např. oxid zinečnatý, oxid titaničitý), nanočástice stříbra či mědi s antimikrobiálními vlastnostmi nebo organické nanočástice schopné regulovat uvolňování živin. Další možností jsou také tzv. nanokompozitní částice kombinující zastoupení více chemických prvků nebo jiných chemických entit.

Mezi možné dodavatele nanočástic pro následné ošetření osiv například patří:

- **Sigma-Aldrich (Merck KGaA)** – nabízí širokou škálu nanočástic, včetně kovových oxidů a polymerních nanomateriálů. V současné době (květen 2025) je možné na domovských stránkách www.sigmaladrich.com zaznamenat nabídku až 230 typů nanočástic při zadání hesla „nanoparticle“.
- **American Elements** – specializuje se na chemické látky a nanomateriály, včetně nanočástic pro biologické aplikace. Nabízí velmi širokou škálu nanočástic nejrůznějšího složení a tvarů, kterou je možné ověřit na: <https://www.americanelements.com/nanomaterials-nanoparticles-nanotechnology.html>
- **Výzkumné ústavy a univerzity** – některé akademické instituce vyvíjejí specifické nanočástice a mohou je poskytovat v rámci spolupráce nebo projektů. V tomto ohledu je možné zmínit například Centrum materiálového výzkumu při Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně (<https://www.fch.vut.cz/vav/cmv/>); Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů (<https://www.rcptm.com/cs/about/>).
- Speciální postavení z hlediska předložené metodiky má pak Ústav chemie a biochemie AF MENDELU (<https://ucb.af.mendelu.cz/veda-a-vyzkum/>), konkrétně Laboratoř syntézy a charakterizace nanomateriálů. Na tomto pracovišti jsou rutinně zvládány syntézy konvenčních nanočástic na bázi mědi, stříbra, zinku, křemíku. Dále také nanočástice se složitější strukturou založených na kombinaci různých prvků v jednom materiálu, modifikace grafenoxidu

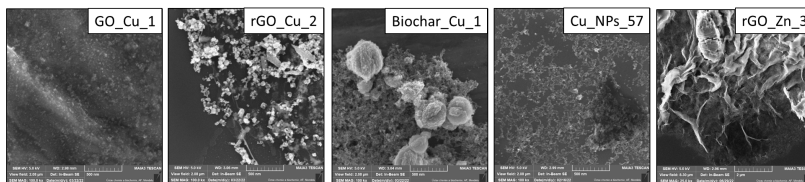
a dalších matric s vysokým obsahem uhlíku. Důležitým atributem tohoto pracoviště je také schopnost navýšit produkci nanočástic a nanokompozitů na větší objemy, pokud to situace vyžaduje.

Zcela zásadní je v tomto ohledu obracet se na ověřené dodavatele, pro které je samozřejmostí reprodukovatelnost realizovaných syntéz a hlavně přesná charakterizace vlastností obchodovaných nanočástic jako je velikost, tvar a chemické složení. Tyto parametry jsou totiž pro míru a charakter potenciálního účinku ošetření osiv zcela zásadní. Spolupráce s dodavateli bez odpovídajícího technického zázemí může znamenat, že parametry nanomateriálů nebudou přesně charakterizovány, což představuje významné riziko pro opakovatelnost výsledků a jejich interpretace. Dalším důležitým faktorem je preference nanočástic ve formě vodných disperzí, tedy v prostředí netoxickém pro rostlinná pletíva. Závěrem lze říci, že používání nanočástic v zemědělství je v EU a ČR regulováno s důrazem na bezpečnost a ochranu zdraví. V případě využití pro výzkumné účely spadají nanočástice do legislativního rámce vymezeného REACH. Před jejich komerčním využitím je nezbytné provést důkladné hodnocení rizik a zajistit, aby byly splněny všechny legislativní požadavky.

Charakterizace nanočástic

Pro efektivní a bezpečné využívání nanočástic při ošetření osiv je klíčové zajistit co nejpřesnější charakterizaci syntetizovaných nanomateriálů. Správně provedená charakterizace umožňuje nejen ověřit chemické složení a morfologii nanočástic, ale také pochopit jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, které významně ovlivňují výsledný biologický efekt. Syntetizovaná šarže nanočástic by proto měla být vždy podrobena důkladnému popisu s využitím souboru komplementárních analytických metod, jako je uvedeno například v práci Bytešníková *et al.* (2023).

K nejdůležitějším charakterizačním technikám patří transmisní elektronová mikroskopie (TEM) doplněná energiově disperzní rentgenovou spektroskopií (EDX), která umožňuje detailní vizualizaci velikosti, tvaru a vnitřní struktury částic, stejně jako stanovení jejich elementárního složení. Rovněž skenovací elektronová mikroskopie (SEM) poskytuje informace o morfologii a povrchových vlastnostech vzorků při vysokém rozlišení, což je zásadní pro posouzení homogenity a stability disperzí (viz příklad na Obrázku 1). Kombinace mikroskopie atomárních sil a skenovací elektronové mikroskopie (correlative AFM-in-SEM) dále umožňuje současně hodnotit topografii povrchu, jeho mechanické vlastnosti a chemické složení v jednom měření, což přináší komplexní pohled na analyzovaný materiál.



1: Morfologie vybraných nanomateriálů vizualizovaných pomocí SEM. Snímky zahrnují různé typy nanomateriálů na bázi grafenoxidu (GO) redukovaného grafenoxidu (rGO), biocharu a kovových nanočástic. SEM snímky poskytují detailní pohled na povrchovou strukturu, velikost, agregaci a distribuci kovových částic v matrici nosiče. Tato metoda charakterizace je zásadní pro hodnocení fyzikálních vlastností nanomateriálů, které mohou ovlivnit jejich biologickou aktivitu, stabilitu a interakci se strukturami semen nebo buňkami mikroorganismů. Snímky nanomateriálů byly pořízeny na UCB AF MENDELU pomocí MAIA 3 SEM (TESCAN, Brno, Česká republika). Byl použit detektor sekundárních elektronů v ose svazku s urychlovacím napětím 5,0 kV, pracovní vzdáleností 3–4 mm a zvětšením 100 000–50 000×.

Rentgenová fotoelektronová spektroskopie (XPS) slouží k analýze chemického složení v povrchové oblasti (řádově několik nanometrů) a k identifikaci chemických vazeb, což je důležité zejména u funkčně modifikovaných nanomateriálů. Strukturní informace o krystalické fázi nanočástic poskytuje rentgenová prášková difrakce (XRPD), která umožňuje určit přítomnost specifických krystalografických struktur a případných příměsí.

Zvláštní pozornost je třeba věnovat kompozitním nanomateriálům, které obsahují více prvků, například nanokompozitům na bázi redukovaného grafenoxidu s navázanými nanočásticemi kovů (rGO-Cu-Ag). V těchto případech je nutné přesně stanovit obsah jednotlivých kovových složek, aby bylo možné provádět správné výpočty a ředění v návaznosti na koncentraci jednotlivých prvků v pracovních suspenzích. Pro tento účel je vhodnou metodou atomová absorpční spektrometrie (AAS) nebo hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), která umožňuje citlivé a přesné kvantifikace jednotlivých kovů v kompozitních systémech.

Komplexní charakterizace nanomateriálů prostřednictvím těchto metod je nezbytným předpokladem pro správné nastavení podmínek ošetření osiv a následné hodnocení účinnosti nanoprimingu. Bez takto provedené charakterizace by nebylo možné spolehlivě interpretovat dosažené výsledky ani zaručit opakovatelnost jednotlivých aplikací. Pečlivé poznání struktury a složení nanomateriálů je proto zásadním krokem směrem k efektivnímu a bezpečnému využití nanotechnologií v oblasti úpravy osiv.

3.2 Zásadní parametry pro úspěšné ošetření osiv vybranými nanočásticemi

Ideální koncentrace a disperzní prostředí pro použití nanočástic

Jedním ze základních parametrů, které je nutné optimalizovat při aplikaci nanočástic na osiva, je jejich pracovní koncentrace. Na základě dosavadních experimentů autorského kolektivu i dostupných literárních údajů je zřejmé, že ideální koncentrace se může výrazně lišit v závislosti na chemickém složení nanočástic, jejich velikosti, tvaru, povrchových vlastnostech či způsobu stabilizace.

Typ použitého nanomateriálu významně ovlivňuje nejen interakci s povrchem semene, ale i schopnost pronikat do vnitřních struktur semen, což se následně odráží v účinnosti ošetření. Obecně platí, že s rostoucí koncentrací nanočástic roste potenciální účinek, například ve smyslu eliminace patogenů nebo stimulace klíčení. Od jisté úrovně koncentrací však začíná také riziko vzniku fyto toxických efektů, které mohou mít za následek nežádoucí snížení klíčivosti, zpomalení růstu či poškození buněčných struktur. Zbytečně vysoké koncentrace použité pro ošetření semen mohou také negativně ovlivňovat jeho rentabilitu.

Z tohoto důvodu je nezbytné věnovat dostatečnou pozornost optimalizaci koncentrace již v raných fázích práce s konkrétním typem nanočástice. Doporučuje se zahájit testování sérií předběžných pokusů zaměřených na fyto toxicitu, které by měly být provedeny na cílovém rostlinném druhu, a pokud možno i na konkrétní odrůdě nebo šarži osiva, jež budou později předmětem finální aplikace. Takové pretesty umožňují nejen detekovat potenciální rizika v podobě inhibice klíčení, ale zároveň slouží k vyhledání optimální koncentrace, která maximalizuje pozitivní efekty ošetření bez negativního vlivu na vitalitu rostlin. Test fyto toxicity by měl být navržen tak, aby zahrnoval srovnání klíčových parametrů klíčení, jako je rychlost klíčení, energie klíčení, procento vyklíčených semen a morfologie klíčících rostlin. Je vždy nezbytné porovnávat výsledky vůči kontrole. Pro maximální přehlednost a validitu výsledků je vhodné testovat širší spektrum koncentrací nanočástic, než jaké je zamýšleno pro finální použití v praxi, přičemž se doporučuje zahrnout i koncentrace pod a nad plánovanou pracovní hladinou. Předběžné testování fyto toxicity je tedy klíčovým krokem nejen pro minimalizaci rizik, ale i pro optimalizaci účinnosti celého procesu ošetření. Přesné nastavení koncentrace nanočástic může výrazně ovlivnit výsledné parametry semen a následně i růst a vývoj rostlin, což má zásadní význam pro praktickou využitelnost a úspěšnost nanopríminingu v zemědělských a semenářských aplikacích.

S ohledem na cílové využití v biologicky aktivních systémech, jako jsou rostliny či bakterie, je nezbytné volit nanomateriály stabilní ve vodných disperzích, které nevyžadují použití organických rozpouštědel ani dalších chemických látek s potenciální fytotoxicitou. Nevhodně zvolené disperzní médium by totiž mohlo nejen zkreslit výsledky testů klíčivosti, ale i samo o sobě působit toxicky, a tím ztížit interpretaci účinku samotných nanomateriálů. Z tohoto důvodu představuje biologická kompatibilita disperzního systému jedno ze základních kritérií, které je nutné při návrhu a realizaci testů s nanočásticemi dodržet. Tomu odpovídala i volba syntetické strategie autorského kolektivu metodiky, jež byla zaměřena na přípravu nanočástic přímo v biologicky kompatibilních vodných suspenzích. Na základě experimentálních zkušeností se zároveň ukázalo, že pro správné vyhodnocení výsledků je nutné do experimentálního designu zahrnout jak neošetřenou kontrolní variantu, tak i variantu ošetřenou samotným vodným médiem bez nanočástic. V některých případech totiž již samotné působení vodného prostředí použitého pro dispergaci nanočástic ovlivnilo vlastnosti semen. Bez této kontrolní skupiny by proto nebylo možné jednoznačně odlišit účinek samotných nanočástic od vlivu disperzního média.

Délka ošetření

Při běžném máčení osiv ve vodných disperzích nanomateriálů se v průběhu experimentů postupně ukázaly limity tohoto přístupu, a to na příkladu osiv čeledi *Brassicaceae*. U šarží hlávkového zelí (cv. Albatros) a vybraných kultivarů řepky (Ocelot, Onca, NK Morse) bylo zjištěno, že delší expozice v roztoku nanočástic zvyšuje riziko bobtnání semen a narušení integrity osemení. Tento jev byl výraznější u šarží s větším průměrem semen, tedy u kalibrovaných osiv nad 2 mm. Na základě praktických pozorování byla proto u těchto šarží stanovena maximální doba máčení na 1 hodinu při teplotě 22 °C a míchání 150 ot/min. Delší expozice vedla k nevratné aktivaci klíčících procesů, projevující se otevíráním osemení. Takto předklíčené osivo již nelze sušit ani skladovat a musí být okamžitě vyseto, což výrazně omezuje jeho praktické využití. Z tohoto důvodu byla doba máčení u problematických šarží následně zkrácena na 30 minut. Tento postup se ukázal jako vhodný kompromis mezi dostatečnou expozicí nanomateriálům a minimalizací nežádoucího bobtnání semen.

Z těchto pozorování lze vyvodit hypotézu, že se zvětšujícím se průměrem osiva dochází k relativnímu zvětšování povrchu osemení, které je vystaveno kontaktu s pracovní suspenzí. Větší povrchová plocha znamená větší kontaktní oblast pro absorpci tekutin. Navíc u větších semen bývá zpravidla osemení (testa) relativně tenčí v poměru k celkovému objemu semene, což také může způsobovat

rychlejší průnik nanočástic/vody dovnitř semene. Větší objem semene zároveň poskytuje vyšší absolutní množství bobtnajících vnitřních zásobních látek (např. škrobů a pektinů), které po nasátí vody expandují a vyvíjejí tlak na strukturu osemení. V souhrnu lze tedy říci, že větší semena mají nejen větší aktivní plochu pro příjem tekutin, ale zároveň i větší vnitřní kapacitu pro bobtnání, přičemž struktura testy nemusí být adekvátně zesílena k odolání těmto vnitřním silám. Tento kombinovaný efekt pak vysvětluje vyšší náchylnost větších semen k předčasnému praskání osemení při delších expozicích v primovacích roztocích. Tyto úvahy potvrzují také základní principy interakce voda – semeno v publikaci Bredford *et al.* (1995).

V dalších experimentech realizovaných autory metodiky bylo pozorováno, že osiva zástupců zelenin z čeledi miříkovité (Apiaceae) vykazují vyšší toleranci k delší době expozice roztoku s nanočásticemi, aniž by docházelo k nežádoucímu bobtnání osemení či aktivaci klíčivých procesů. Tato skutečnost umožnila testování účinku nanoprimingu při různých časech ošetření bez výrazného rizika předčasného klíčení, přičemž doba ošetření osiv probíhala v časových variantách 3, 6 a 9 hodin. Z výše uvedeného je zřejmé, že problém s nežádoucím klíčením je druhově závislý a při záměru aplikovat nanočástice u daného rostlinného druhu je vhodné provést vlastní předběžné testy a průzkum literatury zaměřený na daný rostlinný druh.

Aplikace v podmínkách sníženého tlaku

Využití podtlaku pro aplikaci nanomateriálů představuje alternativní technologii, která je zvláště přínosná tam, kde je žádoucí minimalizovat dobu kontaktu semen s disperzním médiem. Působení vakua urychluje pronikání pracovní suspenze do struktury osemení, a umožňuje tak dosáhnout srovnatelných či dokonce lepších účinků než při běžném máčení, ale v podstatně kratším čase. Nevýhodou této metody je nutnost specializovaného vybavení a její obtížnější využití při ošetřování velkých objemů osiv, což může být limitující pro komerční produkci.

Jedna z prvních prací využívajících podtlak byla studie týmu vedeného Roberts *et al.* (1999), ve které bylo vakuum využito pro infiltraci inokula bakterií *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na osivo kvěťáku. Autoři v této studii popisují postup, při kterém byly alikvoty semen (25 g, cca 6 000 semen) ponořeny do bakteriální suspenze a následně vystaveny podtlaku po dobu pěti minut. Po uvolnění vakua byla semena sušena v tenké vrstvě na papírových utěrkách za pokojové teploty pod proudem vzduchu a před výsevem 7 dní skladována při 4 °C. Důležitým aspektem této práce je skutečnost, že použití vakua nebylo spojeno s negativním ovlivněním klíčivosti osiva. Autoři totiž zahrnuli i kontrolní variantu, kdy bylo vakuové ošetření provedeno se sterilním

fyziologickým roztokem bez přítomnosti bakterií, přičemž se nezmiňují o tom, že samotná aplikace vakua za těchto podmínek poškozuje osivový materiál. Přístup je nyní široce akceptován, o čem svědčí znění jednoho z protokolů asociace ISTA (International Seed Quality Association) pro umělé inokulace semen bakteriálními patogeny za využití vakua (ISTA Seed health Committee, 2021).

V současné době je pak ve vědecké literatuře možné zaznamenat, že podtlak je využíván jak za účelem infiltrace patogenu při umělé inokulaci semen (He and Munkvold, 2012), tak i za účelem hlubšího průniku entity, která byla vybrána za účelem zlepšení vlastností ošetřených osiv, včetně nanočástic (O'Keefe *et al.*, 2025). Výše uvedené informace byly inspirací pro zařazení podtlaku i do experimentů realizovaných v rámci autorského kolektivu metodiky. Využití podtlaku bylo například experimentálně ověřeno při ošetření osiv stříbrnými nanočásticemi se zaměřením na eliminaci přítomnosti Xcc u osiva zelí (Pečenka *et al.*, 2021). Výsledky této studie prokázaly, že vhodně nastavené vakuové ošetření nevedlo k negativnímu ovlivnění klíčivosti ošetřených šarží a vakuové ošetření stříbrnými nanočásticemi se ukázalo jako účinnější v porovnání s metodou ošetření horkou vodou. Pro ošetření vakuem bylo v námi realizovaných experimentech obvykle využíváno osivo ponořené do disperze nanomateriálů, jednostupňové vakuové čerpadlo s výkonem 120 W a 18,9 l nerezová komora. Podtlak pro ošetření osiva byl -0,9 Bar po dobu 5 minut, přičemž na 1 objemový díl osiva byly použity vždy 4 objemové díly kapaliny. Získané poznatky potvrzují, že technologie využívající podtlak může být vhodnou alternativou běžného máčení, a to zejména u citlivých šarží osiv, které jsou náchylné k předčasnému bobtnání při delší expozici v suspenzi nanočástic.

3.3 Ošetření osiv nanočásticemi za účelem snížení výskytu patogenních mikroorganismů

3.3.1 Výběr vhodných nanočástic z hlediska jejich antimikrobiálního účinku

Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.2.1, do okruhu nanočástic s antimikrobiálním účinkem patří kovové nanočástice anebo nanočástice na bázi jejich oxidů. V okruhu aplikací na osiva se pak nejčastěji jedná o nanočástice obsahující stříbro (Ag), měď (Cu) nebo oxid zinečnatý (ZnO). Další skupinu tvoří nanočástice na bázi uhlíku jako jsou uhlíkové nanotrubicе nebo obvykle planární grafenoxid. V případě grafenoxidu pak může být využita jeho schopnost vázat kovové ionty a získat tak kombinované kompozitní materiály.

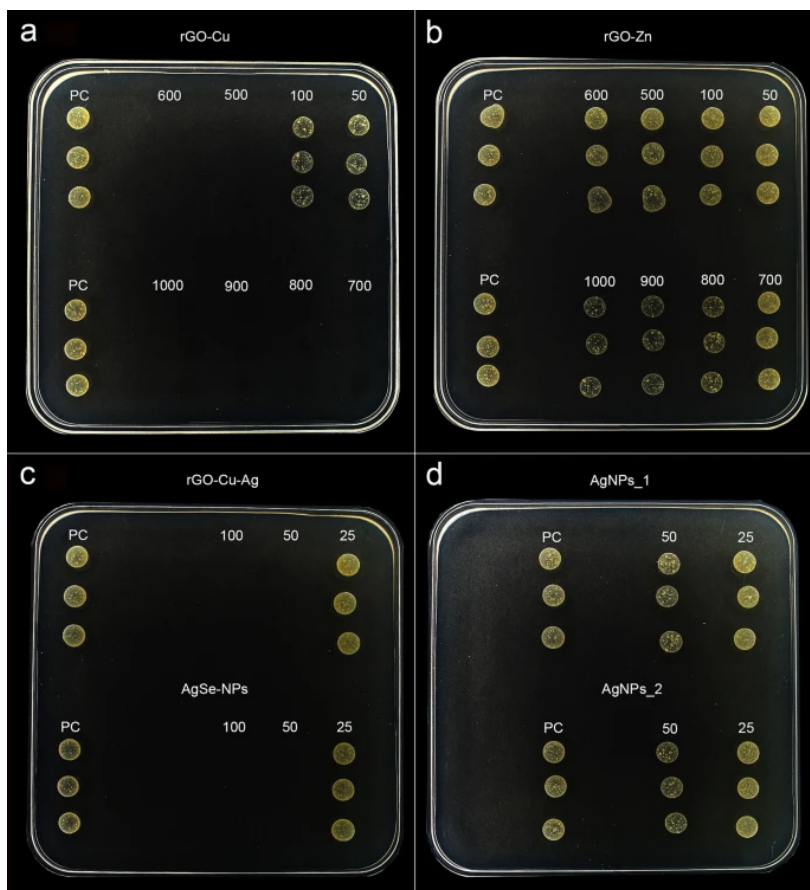
Na základě vlastních víceletých zkušeností členů autorského kolektivu v oblasti testování antimikrobiálních vlastností pak byly silné antimikrobiální vlastnosti zaznamenány i) u nanočástic na bázi mědi u patogenu rodu *Xanthomonas*, ii) nanočástice kombinující stříbro + měď + redukovaný grafenoxid (dále rGO-Cu-AgNPs) a stříbro + selen (dále AgSeNPs) z hlediska jejich obecného antibakteriálního účinku vůči kontaminantům v *in vitro* kulturách nebo patogenům rodu *Xanthomonas* iii) stříbrné nanočástice s výrazně vyšším účinkem proti patogenu rodu *Xanthomonas* než konvenčně používané ošetření horkou vodou iv) nanočástice kombinující zinek + měď + redukovaný grafenoxid (dále rGO-Cu-ZnNPs) u patogenu rodu *Xanthomonas*. Tyto výstupy jsou podrobněji popsány v rámci příkladových aplikací v rámci kapitoly 3.3.3.

Stanovení antibakteriální aktivity nanočástic

Kromě testování fytotoxicity je před samotnou aplikací na osiva nutné ověřit antibakteriální účinnost nanomateriálů vůči cílovým patogenům prostřednictvím *in vitro* testů minimální baktericidní koncentrace (MBC) a minimální inhibiční koncentrace (MIC). Stanovení MBC a MIC představuje nezbytný nástroj pro hodnocení biologické aktivity nanomateriálů a poskytuje klíčové informace pro optimalizaci jejich pracovních koncentrací při aplikacích zaměřených na ochranu rostlin proti bakteriálním patogenům.

Pro komplexní charakterizaci účinku nanočástic je klíčové nejprve stanovit minimální baktericidní koncentraci (MBC), tedy nejnížší koncentraci, při které dochází k úplné eliminaci životaschopných bakteriálních buněk. Postup spočívá v inkubaci standardizované bakteriální suspenze s různými koncentracemi testovaného nanomateriálu v kapalném živném médiu, po které následuje přenesení na pevné živné médium bez nanočástic. Po inkubaci v délce 24 hodin se vyhodnocuje přítomnost nebo absence růstu bakteriálních kolonií. Koncentrace, při níž je zaznamenána úplná absence růstu, je považována za MBC (viz příklad na **Obrázku 2**). Správné stanovení MBC je zásadní pro vyhodnocení baktericidního potenciálu daného nanomateriálu a jeho praktické využitelnosti v biologických systémech, jako je uvedeno v Tekielska *et al.* (2024).

Další metodou je stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), tedy nejnížší koncentrace, která inhibuje růst bakterií, aniž by nutně způsobila jejich smrt. Pro testování MIC existují různé experimentální přístupy. Jednou z metod je počítání kolonií po smíchání bakteriální suspenze s nanočásticemi. Čerstvě připravená suspenze bakteriálních buněk je smíchána s definovaným množstvím nanočástic, krátce inkubována za mírného protřepávání a poté rovnoměrně roznesena



2: Minimální baktericidní koncentrace testovaných nanomateriálů proti *Curtobacterium* A7_M15. Růst bakterií po ošetření rGO-Cu (a) a rGO-Zn (b) při koncentracích 50–1000 mg·l⁻¹ Cu/Zn, rGO-Cu-Ag a AgSe-NPs (c) při 25–100 mg·l⁻¹ Ag a AgNPs_1 a AgNPs_2 (d) při 25–50 mg·l⁻¹ Ag ve srovnání s pozitivní kontrolou (PC).

Zdroj: Tekielska et al., 2024

na pevné živné médium. Po inkubační době se provede sčítání kolonií a hodnotí se inhibiční účinek ve srovnání s kontrolou. Alternativním přístupem ke stanovení MIC je tzv. plate pouring metoda, kdy je bakteriální suspenze po expozici nanočásticím zalita teplým (45 °C) živným médiem s agarem. Tento postup umožňuje rovnoměrné

rozprostření bakterií i nanočástic v celém objemu média a může poskytovat vyšší citlivost při hodnocení inhibičního účinku některých nanomateriálů. Další možností je, že se bakteriální suspenze inkubuje za přítomnosti nanomateriálů, přičemž růstová křivka bakterií se měří spektrofotometricky. Tento přístup je však použitelný pouze u čirých roztoků nanomateriálů, u kterých není riziko interference se spektrofotometrickým stanovením.

Ve všech výše uvedených případech je klíčové používat standardizované výchozí koncentrace bakteriálních buněk, například bakteriální suspenze kalibrované na základě optické hustoty. Hodnota $OD_{600} = 0,1$ u patogenů rodu *Xanthomonas* odpovídá přibližně koncentraci $1 \cdot 10^8$ CFU·mL⁻¹ a slouží jako referenční standard.. Dále je nezbytné zahrnovat vhodné kontrolní varianty – pozitivní kontrolu bez nanočástic a případně také kontrolu s komerčním antimikrobiálním přípravkem. Testy by měly být prováděny v dostatečném počtu biologických i technických opakování za podmínek eliminujících vnější proměnné faktory, jako jsou teplota kultivace nebo rychlost míchání.

Pro účely testování antimikrobiální účinnosti nanomateriálů byla v rámci experimentů projektu NAZV AgriNano vyhodnocena celá řada typů nanomateriálů, a to jak jednoprvkových (např. AgNPs), tak kompozitních (např. rGO-Cu-Ag). U jednotlivých typů nanomateriálů byly testovány široké škály koncentrací a jejich účinnost byla hodnocena mimo jiné i s ohledem na hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC). Kritériem pro zařazení do praktických testů bylo nejen spektrum antimikrobiální aktivity, ale také vhodnost daného nanomateriálu pro konkrétní aplikační prostředí (např. *in vitro* kultury) a konkrétní patogen.

Tabulka I shrnuje příklady vybraných nanomateriálů testovaných v rámci projektu NAZV QK22010031 z hlediska jejich antibakteriálního účinku, jejich testované koncentrace a zájmové mikroorganismy (aplikace).

Je však třeba zdůraznit, že stanovené MIC/MBC je potřeba vnímat pouze jako vstupní hodnoty pro následné testy v podmínkách co nejblíže praktickému použití, tedy v kontextu interakcí mezi rostlinou, patogenem a nanomateriály. Výsledky získávané autorským kolektivem totiž obvykle ukazují, že pro dosažení účinné redukce patogenu *in planta* je často nutné použití vyšších koncentrací, než jaké se jeví jako dostačující při *in vitro* testování.

I: Příklady použitých nanočástic v testech jejich antimikrobiálního účinku vůči vybraným mikroorganismům

Druh nanočástice	MIC/MBC testovaných nanočástic	Aplikace
rGO-Cu-Ag_47	50** mg Ag·l ⁻¹	<i>in vitro</i> kultury <i>Prunus</i> spp. kontaminované <i>Curtobacterium</i> A7_M15
Ag-Se-NPs	50** mg Ag·l ⁻¹	
AgNPs-33	15.0** mg Ag·l ⁻¹	
AgNPs-34	25.0** mg Ag·l ⁻¹	
rGO-Cu-1	450.0* mg Cu·l ⁻¹	
rGO-Zn-3	75.0* mg Zn·l ⁻¹	
rGO-Cu-Ag-43	1.0–10.0 Ag* + 0.65–6.5 Cu* (mg·l ⁻¹)	
AgSeNPs-10	0.5 Ag* + 0,18 Se* (mg·l ⁻¹)	
AgSeNPs-11	< 20.0 Ag* + < 7.21 Se* (mg·l ⁻¹)	
AgSeNPs-12	< 5.0 Ag* + < 1.8 Se* (mg·l ⁻¹)	
AgSeNPs-13	< 5.0 Ag* + < 1.8 Se* (mg·l ⁻¹)	
AgSeNPs-14	50** mg Se·l ^{-1*}	<i>in vitro</i> kultury <i>Prunus</i> spp. kontaminované kmenem <i>Leifsonia</i> M4
rGO-Cu-Ag-47	50** mg Ag·l ^{-1*}	
AgNPs_29	3* mg Ag·l ⁻¹ , 10** mg Ag·l ⁻¹	patogen <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>
AgNPs_30	3* mg Ag·l ⁻¹	patogen <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>
AgSeNPs_30	19* mg Ag·l ⁻¹	patogen <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>
CuNPs_53	199* mg Cu·l ⁻¹ , 397** mg Cu·l ⁻¹	patogen <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>
rGO-Cu_25	169* mg Cu·l ⁻¹ , 847** mg Cu·l ⁻¹	patogen <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>
rGO-Cu-Ag_47	< 5.0 Ag* + < 5 Cu* (mg·l ⁻¹)	patogen <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
rGO-Ag	< 5.0 Ag* (mg·l ⁻¹)	patogen <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
rGO-Cu	< 5 Cu* (mg·l ⁻¹)	patogen <i>Xanthomonas euvesicatoria</i>

*hodnoty minimální inhibiční koncentrace, **hodnoty minimální baktericidní koncentrace

3.3.2 Ověření účinku ošetření na výskyt zájmového patogenu

Spolehlivá detekce přítomnosti patogenů v osivu je klíčová pro posouzení zdravotní nezávadnosti šarží a pro účinnou prevenci šíření chorob. Zavedení ověřených detekčních protokolů zároveň minimalizuje riziko falešně pozitivních výsledků a umožňuje včasnou identifikaci patogenu. Nezastupitelnou roli hraje také při hodnocení účinnosti různých způsobů ošetření z hlediska schopnosti patogen eliminovat. Při výběru vhodného postupu je možné vycházet z nabídky standardizovaných protokolů pro testování patogenů u osiv hospodářsky významných plodin, které poskytuje organizace ISTA. Seznam protokolů dostupných k 1. 9. 2025 je uveden v rámci Tabulky II.

II: Seznam protokolů nabízených organizací ISTA pro testování patogenů v osivech hospodářsky důležitých plodin

Patogen	Hostitel (rostlina)	ISTA protokol
<i>Alternaria dauci</i>	<i>Daucus carota</i>	7-001a,b
<i>Alternaria radicina</i>	<i>Daucus carota</i>	7-002a,b
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Helianthus annuus</i>	7-003
<i>Plenodomus lingam</i>	<i>Brassica</i> spp.	7-004
<i>Plenodomus biglobosus</i>	<i>Brassica</i> spp.	7-004
<i>Ascochyta pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	7-005
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7-006
<i>Alternaria linicola</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	7-007
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	7-007
<i>Colletotrichum lini</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	7-007
<i>Caloscypha fulgens</i>	<i>Picea engelmannii</i>	7-008
<i>Caloscypha fulgens</i>	<i>Picea glauca</i>	7-008
<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Pinus</i> spp.	7-009
<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	7-009
<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	7-010
<i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	7-011
<i>Trichoconiella padwickii</i>	<i>Oryza sativa</i>	7-012
<i>Ustilago nuda</i>	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	7-013a,b
<i>Parastagonospora nodorum</i>	<i>Triticum aestivum</i> subsp. <i>aestivum</i>	7-014

Patogen	Hostitel (rostlina)	ISTA protokol
<i>Epichloë coenophiala</i>	<i>Festuca</i> spp.	7-015
<i>Neotyphodium lolii</i>	<i>Lolium</i> spp.	7-015
<i>Phomopsis longicolla</i>	<i>Glycine max</i>	7-016
<i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	<i>Glycine max</i>	7-016
<i>Diaporthe phaseolorum</i> f. sp. <i>caulivora</i>	<i>Glycine max</i>	7-016
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Brassica</i> spp.	7-019a,b
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i>	<i>Brassica</i> spp.	7-019a
<i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>carotae</i>	<i>Daucus carota</i>	7-020
<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7-021
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>fuscans</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7-021
<i>Microdochium nivale</i>	<i>Triticum</i> spp.	7-022
<i>Microdochium majus</i>	<i>Triticum</i> spp.	7-022
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	7-023
Pea early browning virus (PEBV)	<i>Pisum sativum</i>	7-024
Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV)	<i>Pisum sativum</i>	7-024
<i>Aphelenchoides besseyi</i>	<i>Oryza sativa</i>	7-025
Squash mosaic virus (SqMV)	<i>Cucurbitaceae</i>	7-026
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Cucurbitaceae</i>	7-026
Melon necrotic spot virus (MNSV)	<i>Cucurbitaceae</i>	7-026
<i>Pyrenophora teres</i>	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	7-027
<i>Pyrenophora graminea</i>	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	7-027
Tobacco mosaic virus (TMV)	<i>Solanum lycopersicum</i>	7-028
Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Solanum lycopersicum</i>	7-028
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	7-029
<i>Acidovorax valerianellae</i>	<i>Valerianella locusta</i>	7-030
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	<i>Medicago sativa</i>	7-031

Patogen	Hostitel (rostlina)	ISTA protokol
<i>Ditylenchus dipsaci</i>	<i>Vicia faba</i>	7-031
<i>Ditylenchus gigas</i>	<i>Vicia faba</i>	7-031
<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	7-032
<i>Ascochyta rabiei</i>	<i>Cicer arietinum</i>	7-033

Jedním z důležitých aspektů, na který je třeba brát zřetel, je vysoká citlivost molekulárních metod detekce založených na PCR (polymerázové řetězové reakci). Teoreticky stačí jediná kopie zájmové sekvence, přičemž PCR metody detekují přítomnost cílové DNA bez ohledu na vitalitu buněk patogenu. To znamená, že i neživotaschopné buňky mohou poskytovat pozitivní PCR signál, což může vést k falešně pozitivním výsledkům hodnocení. Je-li nutné ověřit schopnost daného ošetření eliminovat nežádoucí buňky patogenu, je důležité se proto zaměřit na metody, které umožňují selektivní detekci signálu z živých buněk.

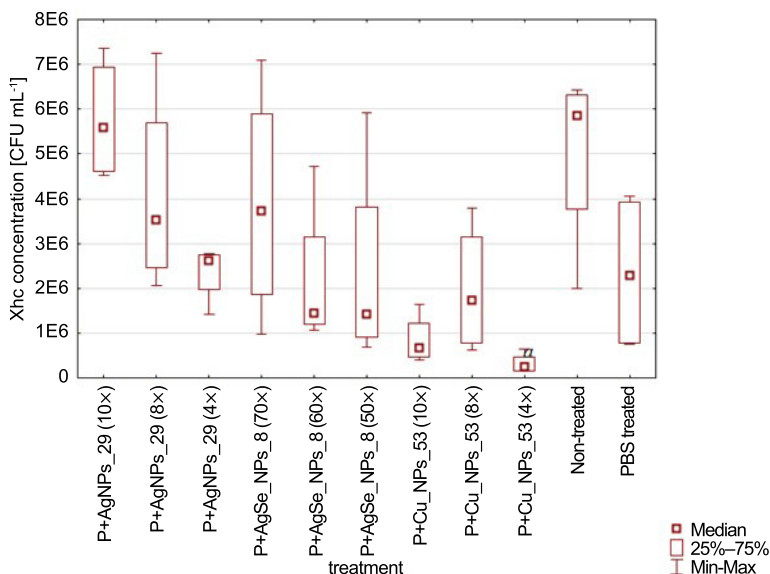
ISTA protokoly kombinují prescreen PCR a kultivační ověření. Nejprve se provede PCR prescreen k rychlé detekci DNA patogena. Pokud je prescreen negativní, šarže se hodnotí jako negativní na přítomnost Xcc. Pokud je prescreen pozitivní, následuje izolace na (polo)selektivním médiu; bez získání živých kolonií se šarže považuje za negativní. Získané izoláty se dále testují na patogenitu (bioassay). Teprve pokud se prokáže, že izolát je patogenní, hodnotí se šarže jako kontaminovaná; v opačném případě je možné označovat jako „healthy seed lot“.

Aktivity autorského kolektivu v oblasti detekce patogenů se se soustřeďuje hlavně na vývoj a aplikaci vlastních metodik kombinujících molekulární a kultivační přístupy pro detekci Xcc. Tyto výsledky byly prezentovány prostřednictvím certifikovaných metodik (Novotný *et al.*, 2019; Eichmeier *et al.*, 2017) a publikovaných odborných článků (Peňázová *et al.*, 2015; Peňázová *et al.*, 2018), které vycházejí z praktických zkušeností s detekcí Xcc ve specifických typech pletiv. Dalším příkladem je specifický detekční systém vyvinutý členy autorského kolektivu metodiky pro bakterie rodu *Leifsonia*. Ty se často vyskytují jako kontaminanty v *in vitro* explantátových kulturách. Metoda chráněná užitným vzorem (Eichmeier *et al.*, 2024) využívá qPCR s TaqMan sondou a umožňuje rychlou a citlivou detekci bez nutnosti časově náročné kultivace či sekvenace. Systém je založen na specifické sadě primerů (forward: AAGGAGCATCTGGCACCC, reverse: GATGTCCTTCTGTTCTC) a sondě (GGTCGAGAGCATCGCGAC, FAM-BHQ1) a je určen pro praktické využití při prevenci kontaminací rostlinných kultur.

3.3.3 Příklady výsledků a výstupů získaných v této oblasti čteny autorského kolektivu

3.3.3.1 Eliminace patogenu *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* (Xhc)

Uvedený patogen kořenové zeleniny může u napadených rostlin způsobovat velké hospodářské škody. V daném experimentu byla osiva nejdříve inokulována daným patogenem a následně ošetřena vybranými nanočásticemi. Dopad ošetření na míru výskytu patogenu v rostlinách vzešlých z jednotlivých variant osiv zachycuje Obrázek 3.



3: Koncentrace patogenu Xhc v rostlinách z osiv po umělé inokulaci a následném ošetření nanočásticemi. Koncentrace zásobních roztoků byly 100 mg·l⁻¹ pro AgNPs_29; 3703 mg·l⁻¹ Ag a 748 mg·l⁻¹ Se pro AgSeNPs_8; 3974 mg·l⁻¹ Cu pro CuNPs_53..

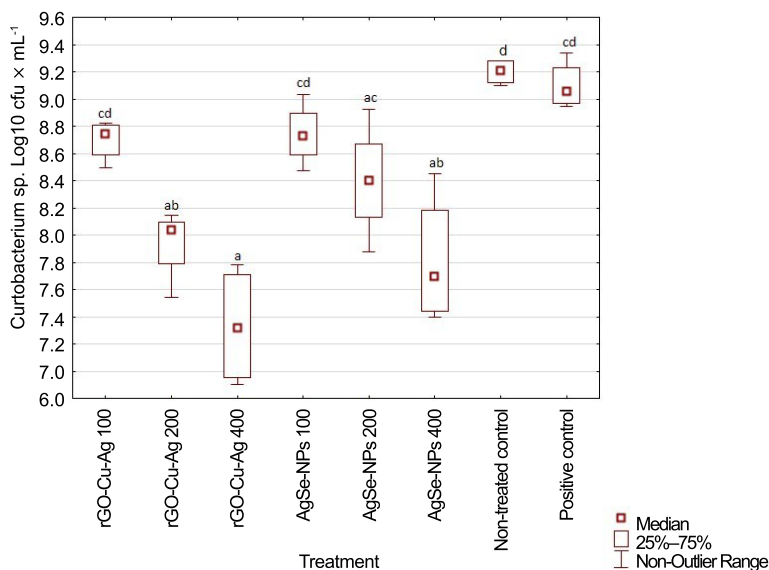
Zdroj: Wohlmuth et al., 2024

Výsledky ukázaly, že žádné z testovaných ošetření nevedlo k úplné eradikaci patogenu z klíčících rostlin. Nejvyšší efekt byl zaznamenán při použití měděných nanočástic (CuNPs) v koncentraci odpovídající 993 mg Cu·l⁻¹, kde došlo ke statisticky významnému snížení koncentrace Xhc buněk oproti kontrolním variantám. V případě AgNPs a AgSeNPs nebyla pozorována statisticky významná redukce koncentrace

patogenu, ačkoli trend poklesu při vyšších koncentracích byl patrný. Podrobnější informace je možné získat v publikaci Wohlmuth, Jan *et al.* «Eliminating the Pathogen *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* from Carrot Seeds Using Different Types of Nanoparticles.» *Agriculture*. 14.3 (2024): 498, ze které byl převzat také Obrázek 3.

3.3.3.2 Využití nanočástic za účelem eliminace bakteriálních kontaminantů rostlinných *in vitro* kultur

V provozech využívajících princip *in vitro* multiplikace se může opakovaně vyskytnout problém s výskytem bakteriálních kontaminací kultivačních médií. Ty mohou výrazně snížit kvalitu množených rostlinných materiálů, jejich vitalitu a tím také i jejich obchodovatelnost. V daném experimentu byl jako nejčastější kontaminant identifikován zástupce rodu *Curtobacterium* sp., následně vystavený působení nanočástic vybraných v předtestech. Dopad ošetření na míru výskytu kontaminující bakterie *Curtobacterium* sp. na takto ošetřených médiích zachycuje Obrázek 4.



4: Kvantifikace *Curtobacterium* sp. na kultivačních médiích ošetřených vybranými nanočásticemi o různých koncentracích

Zdroj: Tekielska *et al.*, 2024

Z výsledků je zřejmé, že inhibiční účinek byl pozorován u obou použitých nanočástic s mírně silnějším účinkem u nanokompozitní částice rGO-Cu-Ag. Z grafu je také zřejmá závislost na použité koncentraci, která však vždy musí být volena také s ohledem na možnou fytotoxicitu o vysokých koncentracích. Podrobnější informace je možné získat v publikaci Tekielska, Dorota, *et al.* „Elimination of *Curtobacterium* sp. strain A7_M15, a contaminant in *Prunus* rootstock tissue culture production, using reduced graphene oxide–silver–copper and silver–selenium nanocomposites.“ *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 11.1 (2024): 19, ze které byl také převzat Obrázek 4.

3.3.3.3 Srovnání účinnosti ošetření nanočásticemi a horkou vodou u osiv uměle inokulovaných patogenem *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Patogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* je jedním ze zásadních patogenů brukvovitých zelenin způsobující chorobu označovanou jako bakteriální černá žilkovitost brukvovitých. K jeho eliminaci se v praxi konvenčně používá ošetření horkou vodou v rozsahu 50–53 °C. V daném experimentu byla patogenem Xcc inokulována osiva zelí hlávkového, která byla následně vystavena působení různým typům stříbrných nanočástic a konvenčně používaným protokolům pro ošetření osiv horkou vodou (viz Tabulka III).

Ze získaných výsledků je zřejmé, že konvenčně používané ošetření horkou vodou mělo relativně nízký efekt na snížení koncentrace patogenu. Naopak použité nanočástice na bázi stříbra eliminovali ve variantě nejmenší rozměr + nejvyšší koncentrace tento patogen tak, že nebyl schopen vytvářet rostoucí kolonie. Podrobnější informace je možné získat v publikaci Pečenka *et al.* (2021).

3.3.3.4 Hodnocení účinku nanokompozitních částic rGO-Cu-Ag a rGO-Cu-Zn jakožto alternativy v ochraně proti bakteriální skvrnitosti rajčete a paprik

Původcem bakteriální skvrnitosti rajčete a paprik je patogen *Xanthomonas euvesicatoria*, který způsobuje v napadených porostech významné hospodářské ztráty. V rámci ochrany se proti této chorobě používají mědnaté přípravky. V experimentu, ve kterém byla použita nanočástice rGO-Cu-Ag, byl srovnán účinek nanočástice ve dvou koncentracích a s komerčně používaným přípravkem Kocide 2000 (viz Obrázek 5). V experimentu, ve kterém byl hodnocen účinek nanokompozitní částice rGO-Cu-Zn, byl jako srovnávací přípravek použit Champion 50 WG (viz Obrázek 6).

Z výsledků dosažených při použití nanokompozitní částice rGO-Cu-Ag a přípravku Kocide 2000 je zřejmé, že všechny ošetřené varianty

III: Výsledky srovnání ošetření stříbrnými nanočásticemi a horkou vodou na výskyt patogenu *Xcc* při kvantifikaci pomocí qPCR a počítáním živých kolonií

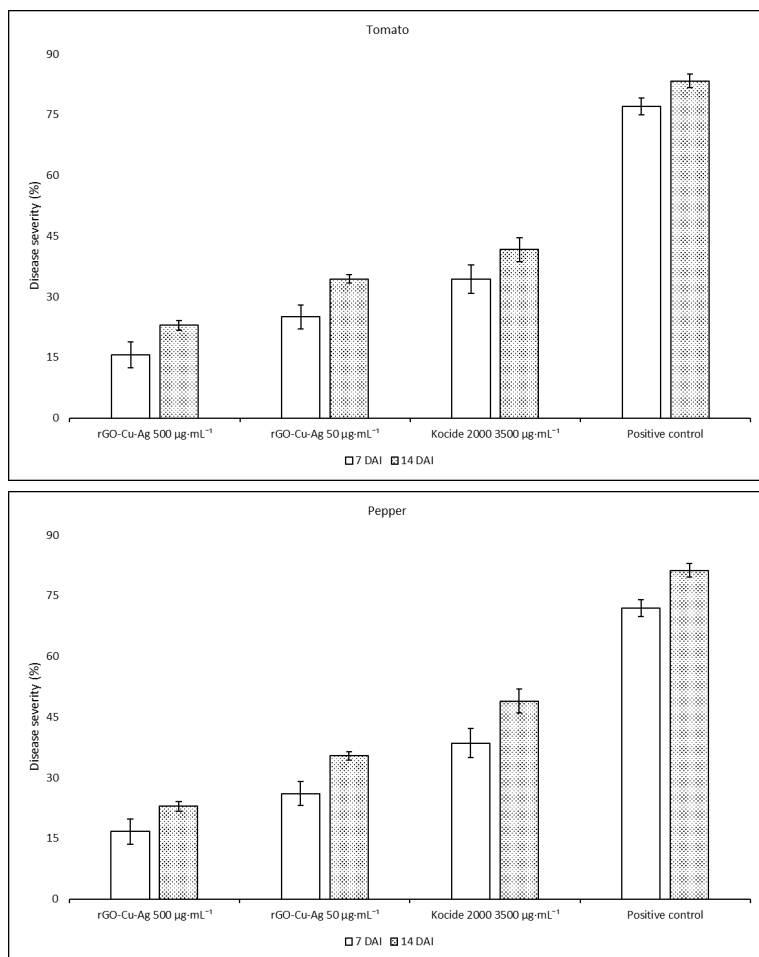
AgNPs size	Treatment	CFU/seedling	
	concentration/temperature	Real-time PCR	Colony counting
~2 nm	6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$1.39\cdot 10^4$	$1.11\cdot 10^{3*}$
	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$9.06\cdot 10^3$	$7.68\cdot 10^{2*}$
	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$1.00\cdot 10^4$	$3.08\cdot 10^{2*}$
	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$3.47\cdot 10^3$	---*
~22 nm	6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$2.10\cdot 10^4$	$2.74\cdot 10^3$
	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$9.92\cdot 10^3$	$1.91\cdot 10^3$
	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$9.25\cdot 10^3$	$7.65\cdot 10^{2*}$
	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$1.02\cdot 10^4$	$6.65\cdot 10^{2*}$
~29 nm	6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$2.08\cdot 10^4$	$4.93\cdot 10^3$
	12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$2.00\cdot 10^4$	$2.21\cdot 10^3$
	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$1.57\cdot 10^4$	$1.97\cdot 10^3$
	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$1.75\cdot 10^4$	$1.77\cdot 10^3$
HWT	50 °C	$2.80\cdot 10^4$	$2.64\cdot 10^3$
	53 °C	$2.09\cdot 10^4$	$1.81\cdot 10^3$
Positive control		$4.10\cdot 10^4$	$3.26\cdot 10^3$

* Significant reduction in *Xcc* colonies in comparison to the control

Zdroj: Pečenka *et al.*, 2021

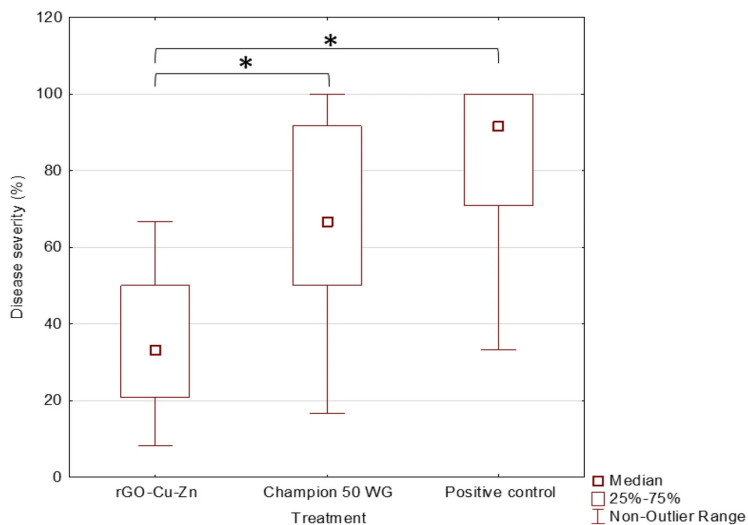
vykazovaly výrazně menší intenzitu symptomů než varianta neošetřená. Dále je zřejmé, že v případě použití nanočástic bylo dosaženo průkazně menší intenzity symptomů než u variant ošetřených přípravkem Kocide 2000, a to při výrazně nižších koncentracích mědi.

Výsledky při použití nanokompozitní částice rGO-Cu-Zn ukazují statisticky průkazně menší intenzitu symptomů jak při srovnání s neošetřenou variantou, tak i u varianty ošetřené mědnatým přípravkem Champion 50 WG. Tento efekt byl dosažen i přes to, že pracovní koncentrace mědi při ošetření danou nanočásticí byl výrazně menší než u přípravku Champion 50 WG. Podrobnější informace o těchto experimentech je možné získat v příslušných dvou publikacích i) Bytešníková *et al.* (2022) a ii) Bytešníková *et al.* (2023)



5: Srovnání intenzity symptomů na listech rajčete a papriky u variant ošetřených nanokompozitní částicí rGO-Cu-Ag, komerčním měďnatým přípravkem Kocide 2000 a neošetřené kontroly

Zdroj: Bytešníková *et al.*, 2022.



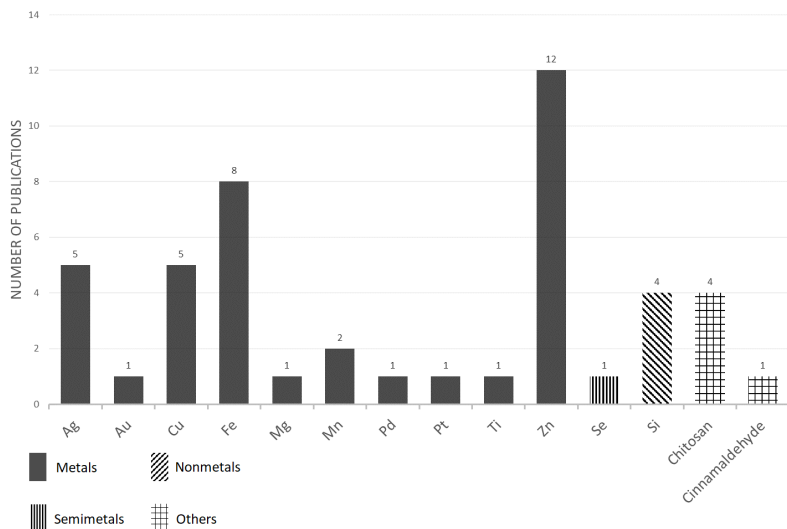
6: Srovnání intenzity symptomů na listech rajčete u variant ošetřených nanokompozitní částicí rGO-Cu-Zn, komerčním měďnatým přípravkem Champion a neošetřené kontroly. Koncentrace Cu a Zn v pracovním roztoku nanomateriálu byla u obou prvků cca 6.7 mg·l⁻¹.

Zdroj: Bytešníková et al., 2023

3.4 Ošetření osiv nanočásticemi za účelem ovlivnit parametry klíčení a klíčících rostlin

3.4.1 Výběr vhodných nanočástic hlediska možného stimulačního účinku na klíčení

Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.2.2, z hlediska stimulačního působení na proces klíčení byl tento efekt pozorován u celé řady nanočástic, přičemž u některých typů nanočástic je možné v literárních zdrojích zaznamenat tento efekt opakovaně. Možná poněkud překvapivě se pozitivní vliv objevuje při použití nanočástic obsahujících Ag, které jsou zároveň často popisovány jako nanočástice schopné snižovat bakteriální kontaminace osiv. Tím se zde teoreticky otevírá prostor pro synergii pozitivních efektů při jejich použití. Mezi další často zmiňované nanočástice se stimulačním účinkem jsou popisovány ty, které obsahují prvky Cu, Zn, Fe a nebo Si (viz Obrázek 7). V souladu s informacemi uvedenými v kapitole 3.2, je při výběru nanočástice pro ošetření je třeba brát v potaz i praktické aspekty, jako je stabilita disperze. Dále je důležité, aby médium, ve kterém jsou dané



7: Počet publikací používajících příslušné hlavní složky při aplikaci na semena. Obrázek je použitý z publikace Wohlmuth et al., 2022, v jejímž autorském kolektivu jsou také autoři této metodiky. Počet publikací odpovídá stavu do roku 2021.

nanočástice rozptýleny, nebylo problematické z hlediska toxicity pro rostlinná pletiva. Nejlépe je tedy upřednostňovat nanočástice ve vodných roztocích, jako je doporučeno v kapitole 3.2.

V rámci experimentů realizovaných autorským kolektivem předložené metodiky byla za tímto účelem testována celá řada nanočástic. Jednalo se jak o částice ať už spíše s konvenčním složením, tak i materiály s vysoce inovativním charakterem. Konkrétně můžeme zmínit relativně jednoduché nanočástice obsahující Ag, Zn, Cu a nebo Si. Tyto byly v dalších variantách vzájemně kombinovány anebo byly testovány nanočástice, které tyto prvky kombinovaly se selenem. Z hlediska kombinovaných nanočástic byly také testovány kompozitní částice, kde byla matrice ve formě grafenoxidu, redukováného grafenoxidu anebo biouhlu modifikována různými kovovými prvky popř. jejich kombinací. Z hlediska pozitivního účinku na prvotní fáze klíčení semen nakonec vykrystalizovala jako nejperspektivnější dvojice nanočástic na bázi SiO₂ a rGO-Cu. Příklady registrovaných pozitivních účinků z hlediska vlivu na první fáze klíčení včetně jejich dynamiky jsou pak uvedeny v rámci kapitoly 3.4.3.

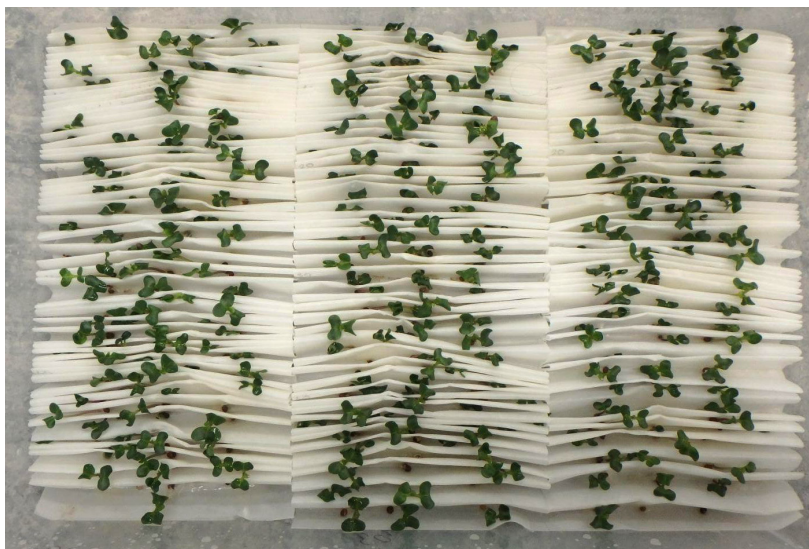
3.4.2 Ověření účinku ošetření na parametry klíčení

Je třeba připomenout, že zvláště u kombinací neověřených v předchozích experimentech, je důležité v rámci preliminárních testů určit optimální pracovní koncentraci daného nanomateriálu bez fyto toxického efektu a dobu působení nanomateriálu na osivo (více viz kapitola 3.2). V praxi autorského kolektivu se také ukázalo, že pozitivní stimulační efekt nelze paušalizovat napříč druhy a bohužel ani mezi odrůdami téhož druhu. Při testování nastávaly situace, kdy byl u většiny odrůd jednoho druhu zeleniny pozorován pozitivní efekt, naproti tomu byl u některých odrůd efekt ošetření negativní. I tento fakt podtrhává nutnost ověřit chování dané kombinace ošetření-nanomateriál-osivo, a to formou preliminárního testování pro vymezení bezpečných aplikačních hranic.

Po optimalizaci ošetření vybranými nanomateriály je třeba zvolit vhodné experimentální podmínky pro evaluaci dopadu ošetření na klíčení a další růstové parametry, nejlépe s ohledem na specifické podmínky daného rostlinného druhu. Pro získání úvodní orientace v problematice testování osiv je vhodné se opřít o mezinárodní standardy: rámcové definice, obecné postupy a druhové tabulky viz ISTA Rules (kap. „Germination Test“), posuzování „normálních/abnormálních“ semenáčků viz ISTA Seedling Evaluation Handbook (ISTA, 2018). Jako výchozí podklad pro hodnocení realizovaná autory metodiky pak byla využita hlavně metodika zkoušení osiva a sadby vydaná ÚKZÚZ (2014).

Jak již bylo naznačeno, pro každý rostlinný druh mohou existovat specifika, která ovlivňují přístup k potřebným pozorováním. Pro experimenty v rámci pracoviště autorů metodiky byly pro tento typ experimentů vybrány šarže odrůd osiv zeli hlávkového, brukve řepky a osiva zástupců čeledi Apiaceae. Postupy popsané níže tedy budou reflektovat hlavně zkušenosti s těmito druhy.

Co se týče výsevu, je vhodné si předem uvědomit do jaké fáze budou klíční rostliny ponechány. Pokud je záměr hodnotit rostliny až po vytvoření prvních pravých lístků, je možné zvolit výsev do malokapacitních květináčů s objemem buněk odpovídajícím předpokládané fenofázi hodnocení rostlin. V případě záměru hodnotit pouze klíční rostliny je možné pracovat v prostředí bez substrátů. U brukvovitých druhů byla osiva klíčena na papírech (Seed Testing Paper typ 3014, Hahnemühle, Německo) navlhčených sterilní demineralizovanou vodou do plné nasákavosti, aniž by z nich docházelo ke gravitačnímu odkapávání vody. Osivo brukvovitých klíčilo při 22 °C a 16 hodinové světelné periodě (viz Obrázek 8). Papíry s osivem byly umístěny v krabicích z transparentního plastu, které byly



8: Založení pokusu s ošetřenými osivy na testovacích papírech.

zakryty víkem, avšak nikoli vzduchotěsně, aby byla umožněna výměna plynů. Pro každou experimentální variantu bylo použito 150 semen (50 semen ve třech opakováních).

U čeledi Apiaceae byly zachovány shodné počty semen a opakování, přičemž byly zvoleny specifické klíčící podmínky: sterilní filtrační papíry, 8hodinová světelná perioda a střídání denní a noční teploty (30 °C den, 20 °C noc).

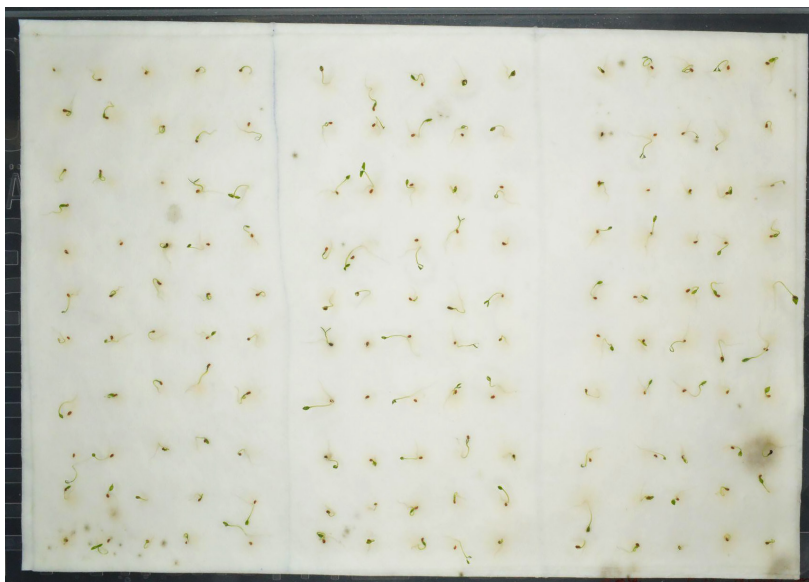
Co se týče hodnocení výsevů, u brukvovitých byla energie klíčení hodnocena 5. nebo 6. den od výsevu v závislosti na rychlosti klíčení dané odrůdy, procento klíčivosti bylo hodnoceno 10. den od výsevu (viz Obrázek 9). U zástupců čeledi Apiaceae hodnocení klíčivosti probíhalo v závislosti na druhu osiva: mrkev 14. den, celer 21. den a petržel 28. den po výsevu semen (viz Obrázek 10).

Mezi základní parametry patří celková procentuálně vyjádřená klíčivost osiva a energie klíčení. Mezi další dobře hodnotitelné parametry v prvních dnech po výsevu patří například procento vyklíčených rostlin v jednotlivých dnech po výsevu (odhaluje zrychlení klíčení). Na konci hodnotícího období je možné hodnotit vybrané parametry celých klíčících rostlin jako je délka kořene, stonku nebo celkový zdravotní stav rostliny. I zde lze s výhodou doporučit open

source software FIJI (ImageJ, Eliceiri/LOCi Group USA; Jug Group



9: Ukázka vyhodnocování klíčivosti ošetřených osiv zelí hlávkového 10 dní po výsevu.



10: Ukázka vyhodnocování klíčivosti ošetřených osiv celeru 21 dní po výsevu na sterilní filtrační papíry.

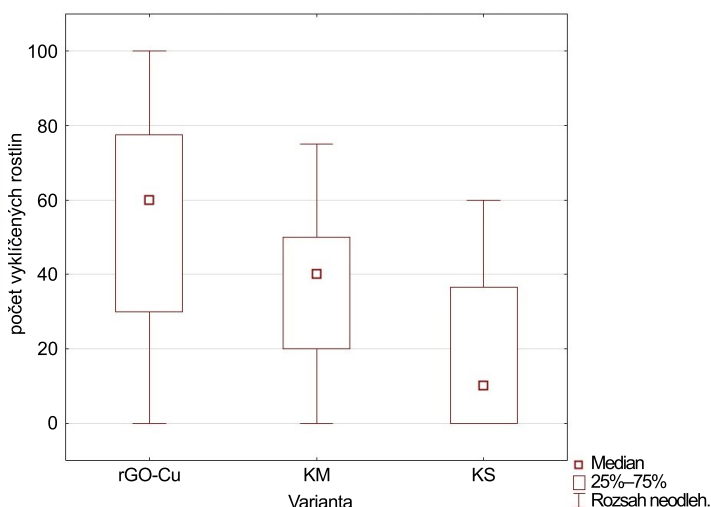
Itálie, MPI-CBG Německo). Tento nástroj má i další využití. Autory této metodiky byl využit rovněž pro stanovení počtu bakteriálních kolonií pro účely vyhodnocení antibakteriální aktivity nanomateriálů, a také pro analýzu vitality rostlin v *in vitro* kulturách. Experimentálně náročnější je pak stanovení sušiny jakožto významného biometrického ukazatele růstové vitality a celkového zdravotního stavu osiva a klíčících rostlin. Spočívá v sušení klíčících rostlin z jednotlivých variant přes noc v komorové sušárně při 105 °C a následném stanovení podílu čerstvé a suché hmoty.

Jak již bylo uvedeno výše, v rámci experimentů NAZV projektu AgriNano byla využita široká škála nanomateriálů různého chemického složení i morfologie. Velký objem dat získaných testováním mnoha koncentrací a použitím různých šarží a odrůd osiv umožnilo formulovat obecně platné závěry využitelné pro účely nanoprímingu v semenářské praxi. Z dosavadních výsledků vyplývá, že některé typy nanomateriálů – např. nanočástice na bázi oxidu křemičitého (SiO₂ NPs) mohou mít pozitivní vliv na počáteční fáze klíčení, a to především v podobě urychlení vyklíčení, rovnoměrnosti a vitality klíčících rostlin. Tento efekt byl nejvýraznější u zástupců čeledi Apiaceae, kteří obecně lépe tolerovali delší expozici primovacím roztokům, aniž by došlo k nežádoucímu bobtnání nebo poškození osemení. Naproti tomu u brukvovitých druhů, především u šarží s větší kalibrací semen, bylo nezbytné expozici zkrátit, jak bylo podrobně diskutováno v kapitole 3.2. Mezi další perspektivní materiál prokazující pozitivní výsledky spíše u testovaných osiv řepky pak byla nanočástice typu rGO-Cu, která zrychlovala klíčení anebo přinášela zvýšenou toleranci k fomové hnilobě (dosud nepublikováno). Část získaných výsledků je s více detaily prezentována v následující kapitole 3.4.3.

3.4.3 Příklady výsledků a výstupů získaných v oblasti ovlivnění klíčivosti členy autorského kolektivu

3.4.3.1 Zrychlení klíčení u osiv řepky olejky v důsledku ošetření nanočásticí rGO-Cu

V rámci experimentu byla ošetřena osiva celkem 6 odrůd řepky, přičemž ošetřené osivo bylo následně vyseto do sadbovačů, které byly umístěny do skleníku. V rámci experimentu byla monitorována rychlost klíčení jednotlivých odrůd pátý, šestý a sedmý den od výsevu. K významným rozdílům došlo pátý den po výsevu (viz Obrázek 11).

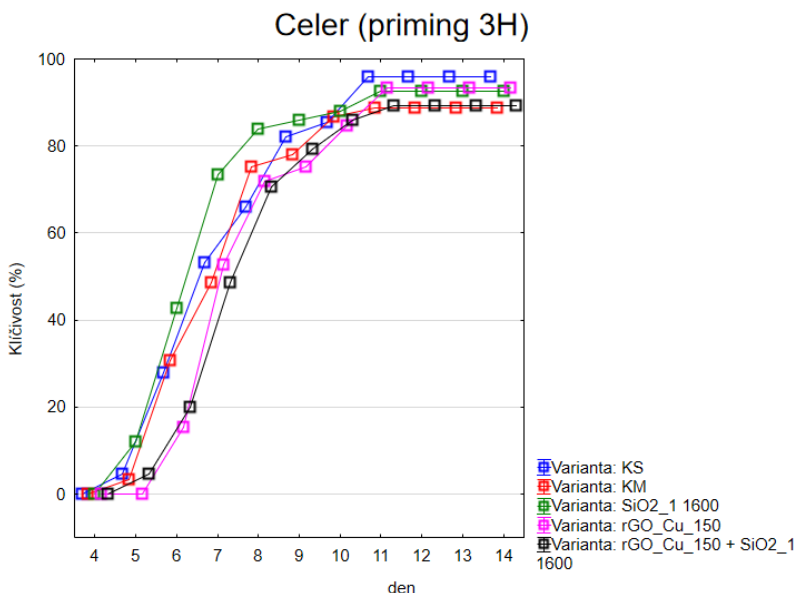


11: Souhrnné výsledky rychlosti klíčení osiva řepky pro všechny odrůdy po aplikaci rGO-Cu (100 mg Cu·l⁻¹).

Jak je z příloženého obrázku zřejmé, pátý den od výsevu došlo k signifikantnímu nárůstu rychlosti klíčení osiva ošetřeného nanokompozitem rGO-Cu o koncentraci 100 mg Cu·l⁻¹ ve srovnání s kontrolou bez ošetření (KS) a dosažené hodnoty byly výrazně vyšší také ve srovnání s kontrolou ošetřenou vodou (KM). Efekt zrychleného klíčení byl dosažen v globálním kontextu všech šesti testovaných odrůd. Více je k této problematice a designu experimentu možné nalézt v užitém vzoru Pečenka *et al.* (2025).

3.4.3.2 Zrychlení klíčení u osiv kořenových zelenin v důsledku ošetření vybranými nanočásticemi

Praxe uvádí, že proces klíčení osiv kořenových zelenin je ve srovnání s jinými druhy delší. Nabízí se zde tedy využít v literatuře popisovaný potenciál nanočástic zrychlit proces klíčení. Za tímto účelem byly založeny pokusy s osivy třech druhů kořenových zelenin, konkrétně se jednalo o mrkev, celer a petržel. Na rozdíl od osiv čeledi Brassicaceae bylo pozorováno, že osiva Apiaceae vykazují vyšší toleranci k delší době expozice v primovacím roztoku, aniž by docházelo k nežádoucímu bobtnání osemení či aktivaci procesů klíčení. Tato skutečnost umožnila testování účinku nanoprímingu při různých časech ošetření bez výrazného rizika předčasného klíčení. Byly použity tři varianty ošetření: nanočástice rGO-Cu (v koncentraci odpovídající $150 \text{ mg mg SiO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$) a kombinace obou těchto nanomateriálů o zmiňovaných koncentracích. Ošetření osiv probíhalo ve třech časových variantách: 3, 6 a 9 hodin, formou máčení při laboratorní teplotě a 150 rpm. Příklad dosažených výsledků je znázorněn na Obrázku 12.



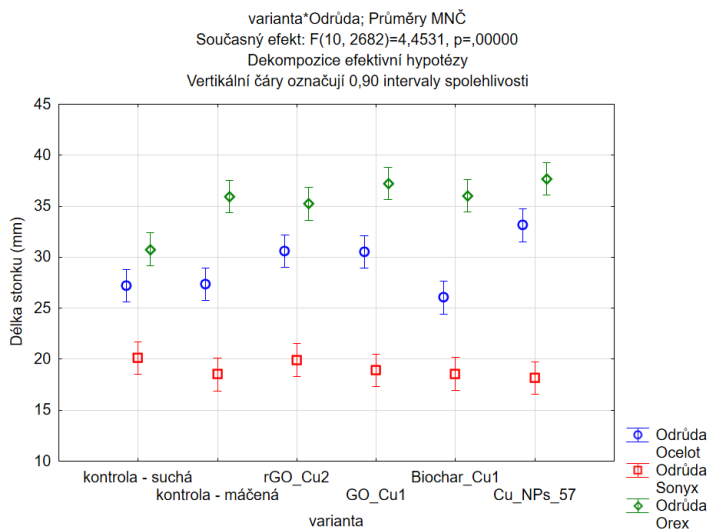
12: Vliv ošetření nanočásticemi rGO-Cu, SiO₂ a jejich směsi na rychlost klíčení ošetřeného osiva celeru.

Předběžné výsledky našich experimentů ukázaly, že nanopriming pomocí SiO_2NPs měl pozitivní vliv na rychlost klíčení osiv všech tří testovaných druhů, přičemž statisticky průkazné zrychlení klíčení oproti kontrolním variantám bylo zaznamenáno zejména v prvních pěti dnech od počátku klíčení. Tento efekt byl nejvýraznější při střední a delší době expozice, což naznačuje, že nanočástice na bázi SiO_2 , mohou fungovat jako stimulator klíčících procesů u osiv Apiaceae, zejména v počátečních fázích klíčení.

3.4.3.3 Dopad ošetření nanočásticemi obsahujícími měď na klíčící rostliny řepky olejky

V daném experimentu byly testovány účinky různých modifikací nanočástic na bázi mědi na vlastnosti semenáčů tří odrůd řepky olejné. Konkrétně se jednalo o nanočástice s pracovním označením GO-Cu1 (GO = grafenoxid), rGO-Cu2 (rGO = redukovaný grafenoxid), Biochar-Cu1 a Cu-NPs_57.

Z hodnocených parametrů byl zaznamenán pozitivní vliv ošetření na prodlužovací růst stonku (viz Obrázek 13), a to u dvou ze tří použitých odrůd. Tento výsledek je zároveň příkladem toho, že vnímavost jednotlivých odrůd/osiv na ošetření nanočásticemi, se může lišit. Tento závěr podporuje dříve formulované doporučení, že před aplikací



13: Vliv ošetření různými variantami nanočástic na bázi mědi na délku stonku klíčících rostlin.

nanoprimingu na neověřená osiva ve větším měřítku, je vhodné provést menší pre-test jejich vnímavosti. Podrobnější informace o tomto experimentu je možné získat v publikaci Baránek *et al.*, (2022), ze které byl také převzat Obrázek 13.

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Předkládaná metodika představuje problematiku nanoprimingu osiv jak na teoretické úrovni, tak i ve formě přehledných, laboratorně proveditelných postupů. Novost spočívá v představení zásadních aspektů ovlivňujících dopad nanoprimingu jako je volba typu nanočástice, nastavení koncentrace a doby působení. Dále jsou představeny následné postupy pro ověření účinku z hlediska schopnosti eliminovat patogeny vázané na osiva anebo na klíčení a raný růst.

Srovnání s dezinfekčními (sanitačními) postupy

Dosud používané metody zaměřené na eliminaci patogenů přenášených osivou jsou převážně fyzikální (např. teplotní ošetření) a jejich účinnost je často podmíněna úzkým optimem nastavení; při odchylce může docházet k oslabení klíčivosti. Nanopriming umožňuje zacílit i na vnitřní infekce (při vhodné aplikaci a podtlaku), a přitom si držet neutrální až příznivý dopad na klíčení. Ve srovnávacích pokusech byl například postup se stříbrnými nanočásticemi účinnější než ošetření horkou vodou u *Xanthomonas* na osivech brukvovitých.

Srovnání s postupy pro urychlení klíčení

Klasické „primingové“ metody (hydro-, osmo-, halo-, hormonální priming) jsou dlouhodobě využívány ke zrychlení a sjednocení klíčení, obvykle však bez cíleného antimikrobiálního účinku. Nanopriming naopak spojuje obě hlediska: může současně urychlit klíčení (prokázáno u testovaných zástupců Apiaceae a Brassicaceae) a snižovat výskyt patogenů, pokud se použijí vhodné typy nanočástic.

Praktický dopad novosti

V praxi to znamená, že nanopriming představuje jednu z mála úprav osiv, která dokáže v rámci jednoho postupu nabídnout jak sanitační efekt tak i zrychlení nástupu klíčení a raného růstu. Srovnatelná teplotní ošetření sledují primárně hygienizační cíl, účelem klasických metod primingu je zase primárně nastartovat fyziologické procesy v semenech, ale bez jejich dezinfekce. Vhodně zvolená aplikace nanoprimingu (včetně využití podtlaku) tak může překlenout mezeru mezi „dezinfekcí“ a „podporou vitality“ a nabídnout obě výhody současně.

5 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena především výzkumným a zkušebním pracovištím v oblasti biologie semen, rostlinné patologie a šlechtění, která potřebují ověřit dezinfekční a stimulační účinek nanoprimingu v laboratorních podmínkách. Dále nalezne uplatnění u semenářských firem při zvyšování standardů péče o cenné liniové materiály a novošlechtění.

Rozsah a typické scénáře použití

- ověření účinku nanoprimingu na snížení výskytu patogenů přenášejících osivu a na zrychlení klíčení u modelových i hospodářsky významných druhů zelenin (zejm. z čeledi brukvovitých a dalších vybraných druhů). Metodika poskytuje sadu kroků vedoucích k volbě vhodné nanočástice, nastavení koncentrace, doby působení a k jednoduchému laboratornímu ověření účinku.
- srovnávací zkoušky s konvenčními postupy (např. teplotní ošetření), kdy je cílem posoudit, zda nanopriming přináší kombinovaný efekt (sanitace + rychlejší nástup klíčení) tam, kde tradiční postupy míří primárně na hygienizaci.
- ošetření cenných semenných materiálů ve šlechtitelských firmách, a to jako prevence pro dlouhodobější uchování anebo naopak pro zvýšení klíčivosti problematických, ale pro firmu cenných šarží osiv.

Kde dává uplatnění největší smysl

- výzkumné a zkušební laboratoře (univerzity, výzkumné ústavy, šlechtitelské stanice) – pro optimalizaci parametrů nanoprimingu, srovnání s alternativními přístupy k ošetření osiv a dokumentaci účinku.
- semenářské firmy v malých objemech – zejména pro cenné šlechtitelské linie a novošlechtění, kde je relativně málo osiva a zároveň vysoká hodnota každé šarže; zde může nanopriming zvýšit šanci na bezproblémové vzházení a potenciálně přispět k širší použitelnosti takto ošetřených osiv.

Limity uplatnění ve velkém měřítku

Průmyslové/velkoobjemové ošetření osiv zatím není dořešeno; naráží na technické komplikace (rovnoměrnost zásahu, manipulace s velkým množstvím jak osiv, tak nanočástic) a zejména na obtížné „scale-up“ výroby perspektivních nanočástic v konstantní kvalitě. Metodika proto prozatím předpokládá využití v laboratorním a poloprodučním měřítku.

Bezpečnost a dopad na životní prostředí

- při „in house“ laboratorních aplikacích a použitých koncentracích je riziko šíření nanočástic do prostředí minimální: ošetření probíhá

mimo půdu, dávka ulpělá na osivech je velmi nízká a po aplikaci následuje osušení a standardní manipulace se suchým osivem. Zbytkové roztoky se likvidují jako laboratorní odpad dle interních předpisů pracoviště.

Shrnutí pro praxi

Metodika je okamžitě uplatnitelná v laboratořích jako nástroj k řízenému snížení mikrobiální zátěže osiv a ke zrychlení klíčení u vybraných kombinací, přičemž při deklarovaných dávkách nepředstavuje relevantní riziko pro životní prostředí. Pro průmyslové objemy zatím slouží jako přípravný krok (optimalizace, porovnání alternativ). Největší přínos je očekáván u malých, cenných šarží.

6 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na zavedení techniky na pracoviště

Pro rutinní provádění postačí běžné laboratorní prostředky: míchací lázně/třepačky, přesné váhy, filtrační a sušicí zařízení a standardní spotřební materiál (pipety, filtry, Petriho misky, klíční substráty). Zaváděcí náklady jsou tím pádem nízké, protože vycházejí z běžně dostupného a široce využívaného laboratorního vybavení a standardních provozních položek (materiál, energie, mzdy laboranta). Pokud je cílem prohloubit pronikání suspenze do semen, lze přidat jednoduché vakuové řešení (menší vakuová komora + čerpadlo) prostřednictvím zařízení běžně dostupných v konvenčních laboratořích, popřípadě pořízením nové aparatury, která představuje náklady na úrovni vyšších tisíců korun.

Cena nanočástic

Rozptyl cen nanočástic je poměrně výrazný. Nákladovost se liší podle typu a dostupnosti vstupních surovin. Běžně dostupné anorganické systémy (např. SiO_2) mívají nižší jednotkové náklady; kompozity s redukováným grafenoxidem (rGO) a/nebo kovy (Ag, Cu, Zn) vyžadují náročnější syntézu a kontrolu kvality, a proto bývá jejich příprava dražší. V obecné rovině se dle zkušeností pracoviště připravujícího nanočástice pro projekt NAZV QK22010031 materiálové náklady na ošetření 100 gramů osiva pohybují v rozmezí 200 Kč–400 Kč. To je částka bez započítání osobních nákladů, režii a bez nákladů na charakterizaci nanočástic, které mohou cenu finálně použité nanočástice výrazně navýšit. Konečný výběr nanočástic by měl zohlednit nejen cenu, ale i stabilitu disperze a cílový účinek (tzn. míru sanitace vs. stimulace). Pro průmyslové (velkoobjemové) ošetření zatím chybí ustálené technologické a cenové parametry. Teoreticky

platí, že s růstem sériového charakteru výroby mohou některé náklady jako je častá charakterizace nanočástic odpadat a jednotkové náklady tak mohou výrazně klesat. Výsledná cena závisí na konkrétním řešení nebo optimalizacích a dnes ji nelze univerzálně odhadnout.

Provozní náklady a očekávané úspory

- ošetření osiv snižující výskyt patogenů přenášovaných osivem by se mělo projevit menšími ztrátami při pěstování (nižší tlak chorob na počátku porostu, rovnoměrnější vzcházení). Ekonomicky se to může promítnout do lepší obchodovatelnosti a hodnoty produkce. Přesnější ekonomické odhady nelze formulovat, závisí na hektarovém výnosu dané plodiny, nákladům na konkrétní nanočástici a závažnosti daného patogenu šířeného osivem.
- nanopríming osiv malých, ale pro šlechtitelské firmy vysoce hodnotných šarží (linie, novošlechtění), může přinést zlepšení jejich životnosti. Právě v tomto smyslu se jeví potenciál nanoprímingu jako nejvyšší, protože chrání jedinečné šarže semen a podporuje jejich lepší vzcházení. Přímé vyčíslení přínosu je zde obtížné, nicméně ztráta takovýchto materiálů bývá pro šlechtitelskou firmu obecně citlivá a zpravidla těžko nahraditelná.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABBASI KHALAKI, M., MOAMERI, M., ASGARI LAJAYER, B., ASTATKIE, T. 2020. Influence of nano-priming on seed germination and plant growth of forage and medicinal plants. *Plant Growth Regulation*. 93, 13–28.
- ACHARYA, P., JAYAPRAKASHA, G. K., CROSBY, K. M., JIFON, J. L., PATIL, B. S. 2020. Nanoparticle-mediated seed priming improves germination, growth, yield, and quality of watermelons (*Citrullus lanatus*) at multi-locations in Texas. *Scientific Reports*. 10, 5037.
- AFSHEEN, S., NASEER, H., IQBAL, T., ABRAR, M., BASHIR, A., IJAZ, M. 2020. Synthesis and characterization of metal sulphide nanoparticles to investigate the effect of nanoparticles on germination of soybean and wheat seeds. *Materials Chemistry and Physics*. 252, 123216.
- AFZAL, S., SHARMA, D., SINGH, N. K. 2021. Eco-friendly synthesis of phytochemical-capped iron oxide nanoparticles as nano-priming agent for boosting seed germination in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science and Pollution Research*. 28, 40275–40287.

- AHMED, S., AHMAD, M., SWAMI, B. L., IKRAM, S. 2016. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*. 7(1), 17–28.
- ALIASGHARI, A., KHORASGANI, M. R., VAEZIFAR, S., RAHIMI, F., YOUNESI, H., KHOROUSHI, M. 2016. Evaluation of antibacterial efficiency of chitosan and chitosan nanoparticles on cariogenic streptococci: An *in vitro* study. *Iranian Journal of Microbiology*. 8(2), 93–100.
- ALLAN, J., BELZ, S., HOVELER, A., HUGAS, M., OKUDA, H., PATRI, A., RAUSCHER, H., SILVA, P., SLIKKER, W., SOKULL-KLUETTGEN, B. 2021. Regulatory landscape of nanotechnology and nanoplastics from a global perspective. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 122, 104885.
- AHUJA, R., SIDHU, A., BALA, A. 2019. Synthesis and evaluation of iron(ii) sulfide aqua nanoparticles (FeS-NPs) against *Fusarium verticillioides* causing sheath rot and seed discoloration of rice. *European Journal of Plant Pathology*. 155(1), 163–171.
- AZIZI-LALABADI, M., EHSANI, A., DIVBAND, B., ALIZADEH-SANI, M. 2019. Antimicrobial activity of Titanium dioxide and Zinc oxide nanoparticles supported in 4A zeolite and evaluation the morphological characteristic. *Scientific Reports*. 9, 17439.
- AWASTHI, A., BANSAL, S., JANGIR, L. K., AWASTHI, G., AWASTHI, K. K., AWASTHI, K. 2017. Effect of ZnO nanoparticles on germination of *Triticum aestivum* seeds. *Macromolecular Symposia*. 376, 1700043.
- BRADFORD, K. J. 1995. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J., GALILI, G. (Eds.). *Seed development and germination*. New York: Marcel Dekker, pp. 351–396.
- BURMAN, U., SAINI, M., KUMAR, P. 2013. Effect of zinc oxide nanoparticles on growth and antioxidant system of chickpea seedlings. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 95(4), 605–612.
- BYTEŠNÍKOVÁ, Z., PEČENKA, J., TEKIELSKA, D., PEKÁRKOVÁ, J., RIDOŠKOVÁ, A., BEZDIČKA, P., ..., RICHTER, L. 2023. Smart bactericide based on reduced graphene oxide decorated with copper and zinc nanoparticles. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 10(1), 116.
- CHOUDHARY, R. C., KUMARASWAMY, R. V., KUMARI, S., SHARMA, S. S., PAL, A., RALIYA, R., BISWAS, P., SAHARAN, V. 2019. Zinc encapsulated chitosan nanoparticle to promote maize crop yield. *International Journal of Biological Macromolecules*. 127, 126–135.

- DESHMUKH, R. K., NGUYEN, H. T., BELANGER, R. R. 2017. Editorial: Aquaporins: Dynamic Role and Regulation. *Frontiers in Plant Science*. 8, 1420.
- DIMKPA, C. O., MCLEAN, J. E., LATTA, D. E., MANANGÓN, E., BRITT, D. W., JOHNSON, W. P., BOYANOV, M. I., ANDERSON, A. J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: Phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research*. 14, 1125.
- DIZAJ, S. M., LOTFIPOUR, F., BARZEGAR-JALALI, M., ZARRINTAN, M. H., ADIBKIA, K. 2014. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. 44, 278–284.
- DIZAJ, S. M., MENNATI, A., JAFARI, S., KHEZRI, K., ADIBKIA, K. 2015. Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 5(1), 19–23.
- DO ESPIRITO SANTO PEREIRA, A., CAIXETA OLIVEIRA, H., FERNANDES FRACETO, L., SANTAELLA, C. 2021. Nanotechnology potential in seed priming for sustainable agriculture. *Nanomaterials*. 11(2), 267.
- DUHAN, J. S., KUMAR, R., KUMAR, N., KAUR, P., NEHRA, K., DUHAN, S. 2017. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*. 15, 11–23.
- EALIAS, A. M., SARAVANAKUMAR, M. P. 2017. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 263, 032019.
- EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE, MORE, S., BAMPIDIS, V., BENFORD, D., BRAGARD, C., HALLDORSSON, T., HERNANDEZ-JEREZ, A., HOUGAARD BENNEKOU, S., KOUTSOUMANIS, K., LAMBRE, C., *et al.* 2021. Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: Human and animal health. *EFSA Journal*. 19(5), e06768.
- EICHMEIER, A., PEŇÁZOVÁ, E., BARÁNEK, M. 2017. *Metodika detekce a kvantifikace bakterie Xanthomonas campestris pv. campestris pomocí TaqMan® Real Time PCR systému: Certifikovaná metodika*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-517-6
- EICHMEIER, A., PEČENKA, J., ČECHOVÁ, J., TEKIELSKA, D. A., BARÁNEK, M. 2024. *Sada pro molekulární identifikaci bakteriálních kontaminantů rodu Leifsonia metodou real-time PCR [Užitný vzor č. 37 657]*. Úřad průmyslového vlastnictví

- České republiky. Příhláška č. 2023-41431; podáno 1. 11. 2023; zapsáno 30. 1. 2024.
- ELMER, W., WHITE, J. C. 2018. The Future of Nanotechnology in Plant Pathology. *Annual Review of Phytopathology*. 56, 111–133.
- FERNANDO, S. S. N., GUNASEKARA, T. D. C. P., HOLTON, J. 2018. Antimicrobial Nanoparticles: Applications and mechanisms of action. *Sri Lankan Journal of Infectious Diseases*. 8(1), 2–11.
- HASAN, S. 2015. A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences*. 4, 1–3.
- HE, Y., MUNKVOLD, G. P. 2012. Comparison of extraction procedures for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in common bean seed. *Plant pathology*. 61(5), 837–843.
- HONG, J., WANG, C., WAGNER, D. C., GARDEA-TORRESDEY, J. L., HE, F., RICO, C. M. 2021. Foliar application of nanoparticles: Mechanisms of absorption, transfer, and multiple impacts. *Environmental Science: Nano*. 8, 1196–1210.
- HUBBARD, J. D., LUI, A., LANDRY, M. P. 2020. Multiscale and multidisciplinary approach to understanding nanoparticle transport in plants. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 30, 135–143.
- INGLE, A. P., DURAN, N., RAI, M. 2014. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(3), 1001–1009.
- ISTA 2018. *Handbook on seedling evaluation*. 4th Edition. International Seed Testing Association.
- ISTA SEED HEALTH COMMITTEE. 2021. *Organizing and analyzing results of the Seed Health Proficiency Tests*. PT-P-03, Version 3.0. International Seed Testing Association. <https://www.seedtest.org/api/rm/647V48YB6FBPKVV/pt-p-03-organizingandanalysingshpts3-0.pdf>
- JISHA, K. C., VIJAYAKUMARI, K., PUTHUR, J. T. 2013. Seed priming for abiotic stress tolerance: An overview. *Acta Physiologiae Plantarum*. 35, 1381–1396.
- KALWAR, K., SHAN, D. 2018. Antimicrobial effect of silver nanoparticles (AgNPs) and their mechanism—A mini review. *Micro & Nano Letters*, 13(3), 277–280.
- KÖHL, J., VAN DER WOLF, J. 2005. *Alternaria brassicicola and Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in organic seed production of Brassicaceae: Epidemiology and seed infection. Note 363. Wageningen: Plant Research International, pp. 1–28.

- KUMAR, G. D., RAJA, K., NATARAJAN, N., GOVINDARAJU, K., SUBRAMANIAN, K. S. 2020. Invigouration treatment of metal and metal oxide nanoparticles for improving the seed quality of aged chilli seeds (*Capsicum annum* L.). *Materials Chemistry and Physics*. 242, 122492.
- KUMAWAT, S., KHATRI, P., AHMED, A., VATS, S., KUMAR, V., JASWAL, R., WANG, Y., XU, P., MANDLIK, R., SHIVARAJ, S. M., et al. 2021. Understanding aquaporin transport system, silicon and other metalloids uptake and deposition in bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). *Journal of Hazardous Materials*. 409, 124598.
- LI, Y., LEUNG, P., YAO, L., SONG, Q. W., NEWTON, E. 2006. Antimicrobial effect of surgical masks coated with nanoparticles. *Journal of Hospital Infection*. 62(1), 58–63.
- MA, X., GEISLER-LEE, J., DENG, Y., KOLMAKOV, A. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*. 408(16), 3053–3061.
- MA, Z., GARRIDO-MAESTU, A., JEONG, K. C. 2017. Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review. *Carbohydrate Polymers*. 176, 257–265.
- MACHADO, S., PACHECO, J. G., NOUWS, H. P., ALBERGARIA, J. T., DELERUE-MATOS, C. 2015. Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts. *Science of the Total Environment*. 533, 76–81.
- MAHAKHAM, W., SARMAH, A. K., MAENSIRI, S., THEERAKULPISUT, P. 2017. Nanoprimer technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*. 7, 8263.
- MARTHANDAN, V., GEETHA, R., KUMUTHA, K., RENGANATHAN, V. G., KARTHIKEYAN, A., RAMALINGAM, J. 2020. Seed Priming: A Feasible Strategy to Enhance Drought Tolerance in Crop Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(21), 8258.
- MARTINS, C. H., CARVALHO, T. C., SOUZA, M. G., RAVAGNANI, C., PEITL, O., ZANOTTO, E. D., PANZERI, H., CASEMIRO, L. A. 2011. Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate(R) against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 22(6), 1439–1446.
- NOVOTNÝ, D., BARÁNEK, M., EICHMEIER, A., SALAVA, J., PEŇÁZOVÁ, E., PEČENKA, J., KOUDELA, M. 2019. *Prostředky diagnostiky a ochrany proti vybraným druhům škodlivých*

- mikroorganismů zelí*. Praha, Czech Republic: Výzkumný ústav rostlinné výroby. ISBN 978-80-7427-291-2
- O'KEEFE, T. L., TUGA, B., DENG, C., MOHAMUD, S., JAMOUS, R., SANDERS, M. A., ... HAYNES, C. L. 2025. Vacuum infiltration for priming of soybean seeds: optimization and particle tracking using fluorescent silica nanoparticles. *Chemical Science*. 16(17), 7249–7263.
- PAPARELLA, S., ARAUJO, S. S., ROSSI, G., WIJAYASINGHE, M., CARBONERA, D., BALESTRAZZI, A. 2015. Seed priming: State of the art and new perspectives. *Plant Cell Reports*. 34, 1281–1293.
- PARRA, A., TORO, M., JACOB, R., NAVARRETE, P., TRONCOSO, M., FIGUEROA, G., REYES-JARA, A. 2018. Antimicrobial effect of copper surfaces on bacteria isolated from poultry meat. *Brazilian Journal of Microbiology*. 49(Suppl 1), 113–118.
- PEČENKA, J., SVOBODOVÁ, K., EICHMEIER, A., BARÁNEK, M. 2017. Antibacterial effect of selected nanoparticles as revealed by doubling time of treated *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* cultures. In: *Proceedings of MendelNet 2016*. Brno: Mendel University in Brno, pp. 736–741.
- PEČENKA, J., BYTEŠNÍKOVÁ, Z., KISS, T., PEŇÁZOVÁ, E., BARÁNEK, M., EICHMEIER, A., TEKIELSKA, D., RICHTERA, L., POKLUDA, R., ADAM, V. 2021. Silver nanoparticles eliminate *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage seeds more efficiently than hot water treatment. *Materials Today Communications*. 27, 102284.
- PEČENKA, J., BARÁNEK, M., ČECHOVÁ, J., TEKIELSKA, D. A., BYTEŠNÍKOVÁ, Z., PEKÁRKOVÁ, J., RICHTERA, L., KOŘÍNEK, J. 2025. *Kompozitní materiál pro podporu klíčení rostlin* [Užitný vzor č. 38543; přihláška č. PUV2025-42635]. 2025, 22. dubna. Úřad průmyslového vlastnictví České republiky.
- PEŇÁZOVÁ, E., EICHMEIER, A., ČECHOVÁ, J., BARÁNEK, M., POKLUDA, R. 2015. Evaluation of different methods of DNA extraction for detection of bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage leaves. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*. 14(6), 141–150.
- PEŇÁZOVÁ, E., KOPTA, T., JURICA, M., PEČENKA, J., EICHMEIER, A., POKLUDA, R. 2018. Testing of inoculation methods and susceptibility testing of perspective cabbage breeding lines (*Brassica oleracea* convar. *Capitata*) to the black rot disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 66(1), 139–148.

- ROBERTS, S. J., HILTUNEN, L. H., HUNTER, P. J., BROUGH, J. 1999. Transmission from seed to seedling and secondary spread of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica transplants: effects of dose and watering regime. *European Journal of Plant Pathology*. 105(9), 879–889.
- ROBERTS, S. J., BROUGH, J., HUNTER, P. J. 2006. Modelling the spread of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in module-raised brassica transplants. *Plant Pathology*. 56, 391–401.
- SANZARI, I., LEONE, A., AMBROSONE, A. 2019. Nanotechnology in Plant Science: To Make a Long Story Short. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 7, 120.
- SARKAR, N., SHARMA, R. S., KAUSHIK, M. 2021. Innovative application of facile single pot green synthesized CuO and CuO@APTES nanoparticles in nanoprimering of *Vigna radiata* seeds. *Environmental Science and Pollution Research*. 28, 13221–13228.
- SARKAR, R. D., DEKA, J., KALITA, M. C. 2021. Plant extract mediated green synthesis of selenium nanoparticle and its antimicrobial activity: A brief review. *Innovative Microbiology and Biotechnology*. 2(1), 103–110.
- SATHIYABAMA, M., MUTHUKUMAR, S. 2020. Chitosan guar nanoparticle preparation and its in vitro antimicrobial activity towards phytopathogens of rice. *International Journal of Biological Macromolecules*. 153, 297–304.
- SHAH, V., BELOZEROVA, I. 2008. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water, Air, & Soil Pollution*. 197, 143–148.
- SINGH, A., SINGH, N., AFZAL, S., SINGH, T., HUSSAIN, I. 2018. Zinc oxide nanoparticles: A review of their biological synthesis, antimicrobial activity, uptake, translocation and biotransformation in plants. *Journal of Materials Science*. 53, 185–201.
- TEKIELSKA, D., PEČENKA, J., HAKALOVÁ, E., ČECHOVÁ, J., BYTEŠNÍKOVÁ, Z., RICHTERA, L., ... BARÁNEK, M. 2024. Elimination of *Curtobacterium* sp. strain A7_M15, a contaminant in *Prunus* rootstock tissue culture production, using reduced graphene oxide–silver–copper and silver–selenium nanocomposites. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 11(1), 19.
- TRIPATHI, D. K., TRIPATHI, A., SINGH, S., SINGH, Y., VISHWAKARMA, K., YADAV, G., SHARMA, S., SINGH, V. K., MISHRA, R. K., UPADHYAY, R. G. *et al.* 2017. Uptake, accumulation and toxicity

- of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: A concentric review. *Frontiers in Microbiology*. 8, 07.
- ÚSTŘEDNÍ KONTROLNÍ A ZKUŠEBNÍ ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝ. 2017. *Metodika zkoušení osiva a sadby*. 2. vyd. ÚKZÚZ.
- USMAN, M. S., EL ZOWALATY, M. E., SHAMELI, K., ZAINUDDIN, N., SALAMA, M., IBRAHIM, N. A. 2013. Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 8, 4467–4479.
- VIJAIANAND, K., ANUGRAGA, A. R., KANNAN, M., SINGARAVELU, G., GOVINDARAJU, K. 2020. Bio-engineered magnesium oxide nanoparticles as nano-priming agent for enhancing seed germination and seedling vigour of green gram (*Vigna radiata* L.). *Materials Letters*. 271, 127792.
- WANG, F., LIU, X., SHI, Z., TONG, R., ADAMS, C. A., SHI, X. 2016. Arbuscular mycorrhizae alleviate negative effects of zinc oxide nanoparticle and zinc accumulation in maize plants—A soil microcosm experiment. *Chemosphere*. 147, 88–97.
- WANG, L., HU, C., SHAO, L. 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*. 12, 1227–1249.
- XIANG, L., ZHAO, H. M., LI, Y. W., HUANG, X. P., WU, X. L., ZHAI, T., YUAN, Y., CAI, Q. Y., MO, C. H. 2015. Effects of the size and morphology of zinc oxide nanoparticles on the germination of Chinese cabbage seeds. *Environmental Science and Pollution Research*. 22, 10452–10462.
- YOUNIS, M. E., ABDEL-AZIZ, H. M. M., HEIKAL, Y. M. 2019. Nanoprimer technology enhances vigor and mitotic index of aged *Vicia faba* seeds using chemically synthesized silver nanoparticles. *South African Journal of Botany*. 125, 393–401.
- ZÍTKA, O. (ED.). 2013. *Moderní nanotechnologie na počátku 21. století: kolekce učebních textů projektu OPVK NANOTEAM*. 1. Vyd. Brno, Czechia: Vysoké učení technické v Brně.

8 SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- BARÁNEK, M., HAKALOVÁ, E., PEČENKA, J., TEKIELSKA, D. A., EICHMEIER, A., RICHTERA, L., BYTEŠNÍKOVÁ, Z., ČECHOVÁ, J. 2022. Vliv ošetření osiva řepky olejné nanočásticemi na parametry související s jejich klíčením. *Úroda*. 70(12), 221–228.
- BYTEŠNÍKOVÁ, Z., PEČENKA, J., TEKIELSKA, D., KISS, T., ŠVEC, P., RIDOŠKOVÁ, A., ... RICHTERA, L. 2022. Reduced graphene oxide-based nanometal-composite containing copper and

- silver nanoparticles protect tomato and pepper against *Xanthomonas euvesicatoria* infection. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 9(1), 84.
- BYTEŠNÍKOVÁ, Z., PEČENKA, J., TEKIELSKA, D., PEKÁRKOVÁ, J., RIDOŠKOVÁ, A., BEZDIČKA, P., ... RICHTERA, L. 2023. Smart bactericide based on reduced graphene oxide decorated with copper and zinc nanoparticles. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 10(1), 116.
- PEČENKA, J., SVOBODOVÁ, K., EICHMEIER, A., BARÁNEK, M. 2017. Antibacterial effect of selected nanoparticles as revealed by doubling time of treated *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* cultures. In: *Proceedings of MendelNet 2016*. Brno: Mendel University in Brno, pp. 736–741.
- PEČENKA, J., BYTEŠNÍKOVÁ, Z., KISS, T., PEŇÁZOVÁ, E., BARÁNEK, M., EICHMEIER, A., ... ADAM, V. 2021. Silver nanoparticles eliminate *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage seeds more efficiently than hot water treatment. *Materials Today Communications*. 27, 102284.
- PEČENKA, J., BARÁNEK, M., ČECHOVÁ, J., TEKIELSKA, D. A., BYTEŠNÍKOVÁ, Z., PEKÁRKOVÁ, J., RICHTERA, L., KOŘÍNEK, J. 2025. *Kompozitní materiál pro podporu klíčení rostlin* [Užitný vzor č. 38543; přihláška č. PUV2025–42635]. 22. dubna. Úřad průmyslového vlastnictví České republiky.
- TEKIELSKA, D., PEČENKA, J., HAKALOVÁ, E., ČECHOVÁ, J., BYTEŠNÍKOVÁ, Z., RICHTERA, L., ... BARÁNEK, M. 2024. Elimination of *Curtobacterium* sp. strain A7_M15, a contaminant in *Prunus* rootstock tissue culture production, using reduced graphene oxide–silver–copper and silver–selenium nanocomposites. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 11(1), 19.
- WOHLMUTH, J., TEKIELSKA, D., ČECHOVÁ, J., BARÁNEK, M. 2022. Interaction of the nanoparticles and plants in selective growth stages—usual effects and resulting impact on usage perspectives. *Plants*. 11(18), 2405.
- WOHLMUTH, J., TEKIELSKA, D., HAKALOVÁ, E., ČECHOVÁ, J., BYTEŠNÍKOVÁ, Z., RICHTERA, L., BARÁNEK, M. 2024. Eliminating the pathogen *Xanthomonas hortorum* pv. *carotae* from carrot seeds using different types of nanoparticles. *Agriculture*. 14(3), 498.

Název: Metodika ošetření osiv nanočásticemi za účelem zlepšení
vybraných kvalitativních parametrů
Certifikovaná metodika

Autoři: Miroslav Baránek a kolektiv

Vydala: Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno,
Česká republika

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně, Zemědělská 1,
613 00 Brno, Česká republika

Vydání: první, 2025

ISBN 978-80-7701-071-9 (online ; pdf)
<https://doi.org/10.11118/978-80-7701-071-9>

