

PLANT PRODUCTS TREATMENT WITH ESSENTIAL OILS AGAINST PATHOGENS

VYUŽITÍ SILIC K OŠETŘENÍ ROSTLINNÝCH PRODUKTŮ PROTI PATOGENNÍM ORGANISMŮM

Šmíd J., Klouček J., Pulkrábek J.

Department of Crop Production, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamycka 129, 165 21 Praha 6 - Suchbøl, Czech Republic

E-mail: smidj@af.czu.cz

ABSTRACT

Seeds (100 pcs.) of *Papaver somniferum* and *Triticum aestivum* were treated with four Essential oils (EO). Seeds were placed onto the filter paper infused with EO on the bottom of Petri dishes (90 mm diameter), hermetically sealed and kept in 20 or 50°C for 24 hours. EOs from *Origanum vulgare*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia caryophyllata* and *Cymbopogon citratus* were tested in concentrations of 8; 16; 32 and 64 $\mu\text{l.l}^{-1}$ of air. Chemical composition of EOs were analyzed by GC-MS. After the treating, seeds were placed on sterile Petri dishes with Sabouraud Dextrose Agar with tetracycline (15 mg.l^{-1}) and kept in 25°C. 48 hours after placement on agar number of contaminated seeds were counted. Seeds treated with the same manner were tested for germination. The highest inhibition of fungi growth shown treating of poppy seeds with *O. vulgare* EO (75% above the control in 8 $\mu\text{l/l}$ concentration and 100% in 32 $\mu\text{l/l}$), less inhibition shown treating wheat seeds with *C. citratus* (66% in 64 $\mu\text{l/l}$). There were no significant difference in germination between the control and seeds treated in 16 $\mu\text{l/l}$ concentration, but difference between control and seeds treated in 64 $\mu\text{l/l}$ concentration were significant. Use of EOs in seed treatment is possible, but the method is still not developed.

Key words: Essential oils, plant pathogens, seed treatment, oregano, clove, cinnamon, lemongrass

Acknowledgments: This presentation is supported by University internal grant agency - CIGA 20122008 – Plant products treatment with essential oil vapours under different physical conditions.

ÚVOD

Lidé využívali antimikrobiální aktivity silic odedávna. Ještě před objevem mikroorganismů v 17. st. pozorovali lidé výsledky jejich činnosti a hledali prostředky k jejich potlačení, jelikož mikroorganismy způsobovaly kažení potravin, choroby i epidemie. Brzy poznali, že substráty ošetřené siličnatými rostlinami méně podléhají zkáze, čehož využívali při mumifikaci, kořenění jídel, vykuřování prostor atd. Jako první popsal inhibiční účinky silic na mikroorganismy Chamberlain v r.1887. Po objevu antibiotik ustoupily silice jako antimikrobiální agens do pozadí, jelikož účinek antibiotik byl rychlejší, spolehlivější i levnější. V poslední době ale opět roste zájem o přírodní antimikrobiální látky, protože mikroorganismy tvoří rezistentní kmeny a současná antimikrobiální agens mohou mít negativní dopad na životní prostředí. Předmětem naší práce bylo ošetřování přirozeně kontaminovaného osiva máku a pšenice z ekologického zemědělství. Kromě vlivu na míru kontaminace byl sledován i vliv na klíčivost semen. Cílem práce, jejichž dílčí výsledek je prezentován, je ověření možnosti využití silic jako antimikrobiálního agens k ošetřování rostlinných produktů.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky osiva a sadby byly pořízeny z polních pokusů katedry rostlinné výroby. Osivo a sadba byly pěstovány v režimu ekologického zemědělství, byl tak minimalizován vliv předchozího ošetření při pěstování. Silice byly zakoupeny od firmy BIOMEDICA spol. s r.o.

Pro analýzu složení pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), relativní podíly jednotlivých složek silice byly hodnoceny pomocí plynového chromatografu s plamenionizačním detektorem Agilent 6890 GC-FID.

Použité silice a jejich složení je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1: Silice a jejich chemické složení

Latinský / český název	Čeleď	Složení silice
<i>Origanum vulgare</i> / Dobromysl obecná	<i>Lamiaceae</i> / Hluchavkovité	p-cymen 5,16 % tymol 2,93 % karvakrol 64,56 %
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> / Skořicovník ceylonský	<i>Lauraceae</i> / Vavřínovité	limonen 4,98 % linalool 4,97 % cinamaldehyd 73,06 % eugenol 3,54 % cinamylacetát 3,7%
<i>Syzygium aromaticum</i> / Hřebíčkovce vonný	<i>Myrtaceae</i> / Myrtovité	eugenol 82,32 % beta-karyofylen 14,44 %
<i>Cymbopogon citratus</i> / Voňatka citronová	<i>Poaceae</i> / Lipnicovité	verbenol 33,49 % nerol 3,96 % neral 45,3 % neryl acetát 3,27 %

Dávky silic 8 µl, 16 µl, 32 µl a 64 µl byly v mikrozkušavkách doplněny ethylacetátem (CH₃COOCH₂CH₃; Lach-Ner, s.r.o.) na objem 250 µl. Pipetou byl objem přenesen na disky z filtračního papíru o průměru 90 mm. Ethylacetát se nechal z disku odpařit po dobu 1 minuty. Do skleněné Petriho misky (objem 110 ml) bylo spolu s diskem napuštěným silicí umístěno 100 semen máku nebo 50 semen pšenice a miska uzavřena parafilmem. Byly tak získány výsledné koncentrace 73 µl/l, 146 µl/l, 292 µl/l, 584 µl/l silice na litr vzduchu. Testy byly provedeny pro každou koncentraci po 200 semenech. Misky s disky pouze s ethylacetátem nebo bez ethylacetátu sloužily jako kontrolní vzorky.

Misky byly ponechány při teplotě 20 °C nebo 50 °C v termostatu po dobu 24h. Během této doby došlo k odpaření silice z filtračního papíru.

Do plastové Petriho misky bylo pomocí krokového dávkovače (Eppendorf) odměřeno 20 ml média, na které bylo přesypáno ošetřené osivo. Jako médium byl použit SDA (Saboured Dextrose Agar; OXOID LTD.) s přísadkou antibiotika (Tetracyklin 15 mg/l; SIGMA-ALDRICH), antibiotikum bylo do agaru přidáno pro zamezení růstu bakterií. Po zatuhnutí agaru byly na médium přenesena ošetřená semena. Misky s agarem a osivem byly uloženy při teplotě 25 °C a vizuálně hodnocen počet napadených semen po 24 – 36 hodinách.

U semen ošetřených silicí byla srovnána klíčivost se semeny neošetřenými. Zkouška byla provedena standardním testem podle vyhlášky č. 369/2009 Sb., o podrobnostech uvádění osiva a sadby pěstovaných rostlin do oběhu. Test klíčivosti byl proveden při 20 °C v plastových miskách na filtračním papíru, ve čtyřech opakováních po 50 semenech. Klíčivost byla hodnocena po 6 dnech od založení pokusu.

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit program STATISTICA (data analysis software system), verze 9.1., StatSoft, Inc. Nejdříve byl proveden rozbor naměřených dat a analýza vlivných

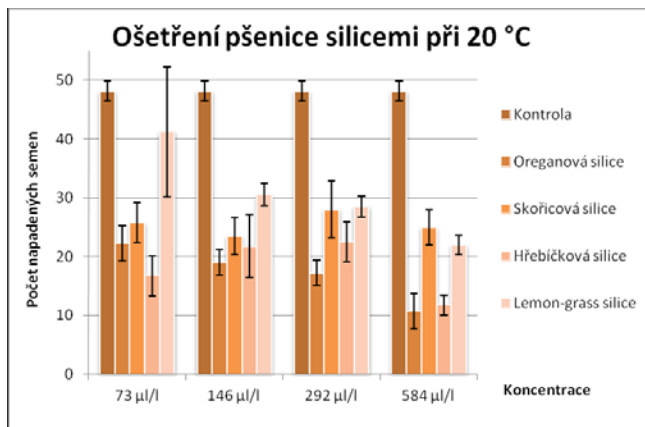
bodů. Vlastní hodnocení bylo provedeno analýzou rozptylu – ANOVA (GLM metoda – General Linear Model). Pro podrobnější vyhodnocení a porovnání rozdílů mezi průměry byla využita metoda Tukey (HSD).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Ošetření osiva pšenice

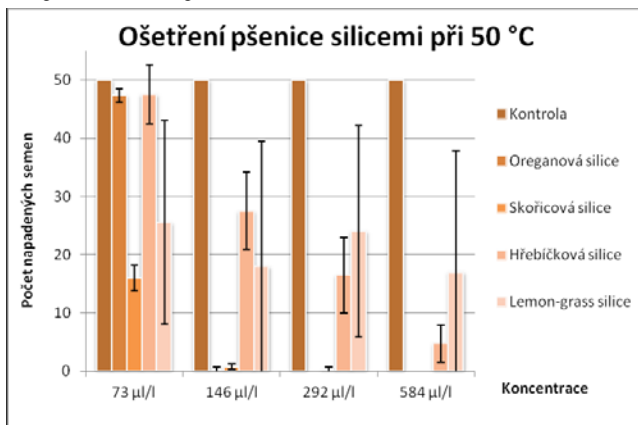
Výsledky ošetření při teplotě 20 °C jsou uvedeny v grafu 1 a ošetření při 50 °C v grafu 2.

Graf 1: Ošetření pšenice silicemi při 20 °C



Z grafu je patrné, že neúčinnější při teplotě ošetření 20 °C je oreganová a hřebíčková silice v koncentraci 584 µl/l. Dále je účinná hřebíčková silice v koncentraci 73 µl/l, oreganová silice 146 µl/l a 292 µl/l. Obecně lze konstatovat, že při této teplotě ošetření není statisticky významný rozdíl v působení mezi koncentracemi 73 µl/l – 292 µl/l jednotlivých silic. Nejméně účinná je silice voňatky citronové.

Graf 2: Ošetření pšenice silicemi při 50 °C

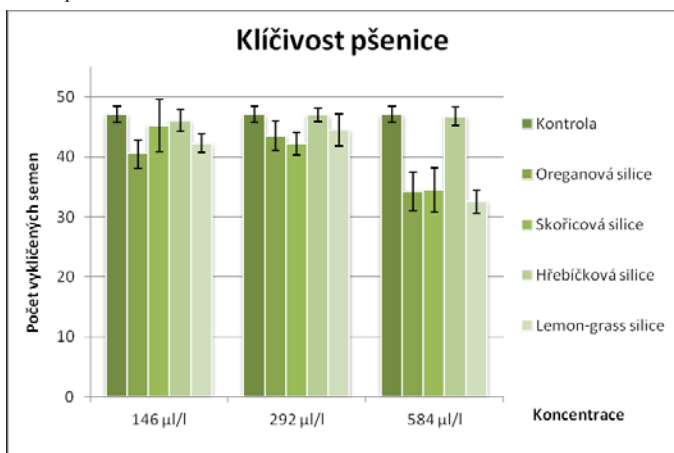


Působení silic při teplotě 50 °C je jasně účinnější oproti teplotě 20 °C, oreganová a skořicová silice jsou při této teplotě výrazně účinné již v koncentraci 146 µl/l. Oreganová silice v koncentraci 292 µl/l a 584 µl/l a skořicová v koncentraci 584 µl/l inhibují výskyt mikroorganismů úplně (výskyt 0 %). Nejnižší koncentrace 73 µl/l je neefektivní, jistou účinnost v této koncentraci vykazuje jen skořicová silice. Nejméně účinné jsou silice hřebíčková a voňatky citronové.

Klíčivost pšenice

Osivo bylo ošetřeno silicemi v teplotě 50 °C po dobu 24h. Test klíčivosti byl proveden při 20 °C na filtračním papíru, klíčivost byla hodnocena po 6 dnech od založení pokusu. Výsledky jsou uvedeny v grafu 3.

Graf 3: Klíčivost pšenice



Nejméně ovlivňuje klíčivost hřebíčková silice ve všech koncentracích, skořicová v koncentraci 146 $\mu\text{l/l}$ a voňatka citronová v koncentraci 292 $\mu\text{l/l}$. Největší inhibici klíčení vykazují silice voňatková, oreganová a skořicová v koncentraci 584 $\mu\text{l/l}$.

Nejúčinnější proti patogenům na osivu pšenice jsou silice skořicová a oreganová v koncentraci 584 $\mu\text{l/l}$ a oreganová v koncentraci 292 $\mu\text{l/l}$, které ovšem negativně působí na klíčivost a rychlost růstu pšenice.

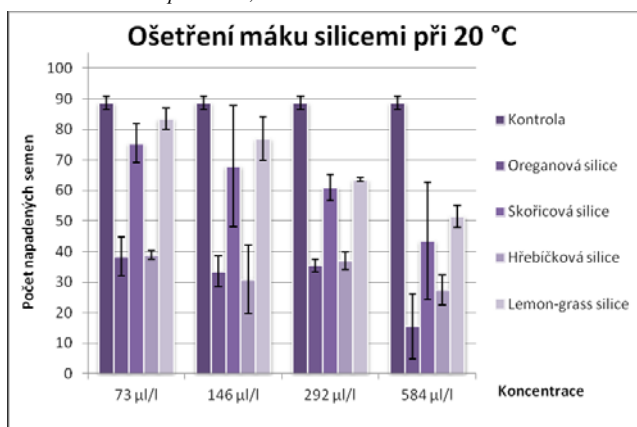
Proto se pro ošetření nejlépe hodí silice skořicová v koncentraci 146 $\mu\text{l/l}$ při teplotě ošetření

50 °C. Silice v této koncentraci potlačuje patogeny a zároveň výrazně neovlivňuje klíčivost a vzrůst semen.

Ošetření osiva máku

Osivo ošetřené silicemi při teplotě 20 °C a 50 °C bylo přesypáno na agar SDA s přidavkem antibiotika tetracyklinu, hodnocen byl počet napadených semen houbovými patogeny. Výsledky ošetření při teplotě 20 °C jsou uvedeny v grafu 4 a ošetření při 50 °C v grafu 5.

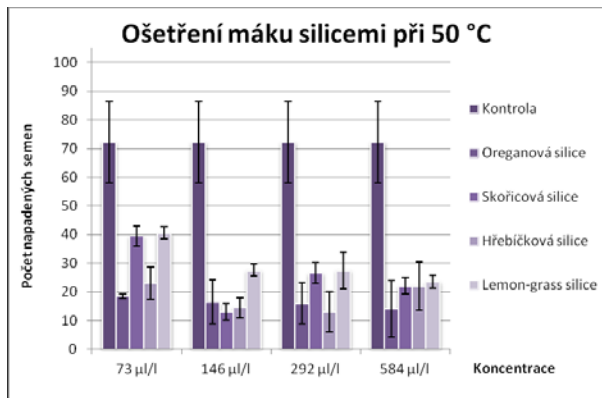
Graf 4: Ošetření máku silicemi při 20 °C,



Z grafu je patrné, že nejučinnější při teplotě ošetření 20 °C je oreganová silice v koncentraci 584 $\mu\text{l/l}$. Dále je účinná hřebíčková silice v koncentraci 584 $\mu\text{l/l}$ a 146 $\mu\text{l/l}$.

Lze konstatovat, že v této teplotě ošetření nejsou statisticky významné rozdíly v působení silic oreganové, skořicové a hřebíčkové v koncentracích 73 $\mu\text{l/l}$ – 292 $\mu\text{l/l}$.

Graf 5: Ošetření máku silicemi při 50 °C,



Při teplotě ošetření 50 °C je neefektivnější hřebíčková silice v koncentraci 292 µl/l, skořicová 146 µl/l, oreganová 584 µl/l a hřebíčková 146 µl/l. Dále oreganová v koncentracích 73 µl/l – 292 µl/l.

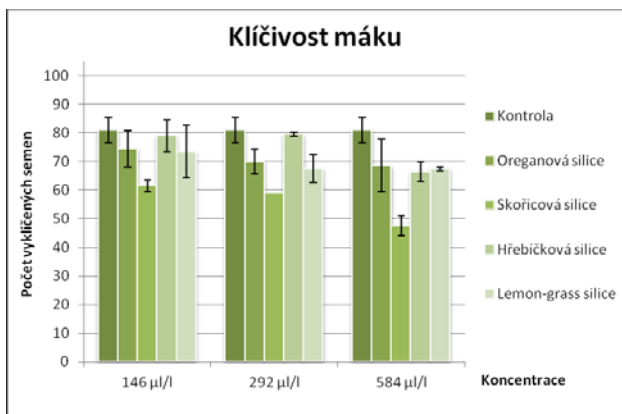
Je zajímavé, že v koncentraci 146 µl/l a 292 µl/l vykazuje hřebíčková silice lepší výsledky než při ošetření vyšší koncentrací, taktéž skořicová silice 146 µl/l je účinnější než ve vyšších koncentracích.

Klíčivost máku

Osivo bylo ošetřeno silicemi v teplotě 50 °C po dobu 24h.

Test klíčivosti byl proveden při 20 °C na filtračním papíru, klíčivost byla hodnocena po 6 dnech od založení pokusu. Výsledky jsou uvedeny v grafu 6.

Graf 6: Klíčivost máku



Nejvíce klíčivost inhibuje skořicová silice ve všech koncentracích. Nejméně naopak silice hřebíčková v koncentraci 146 $\mu\text{l/l}$ a 292 $\mu\text{l/l}$. Pro ošetření máku proti plísnovým patogenům je nejvhodnější silice hřebíčková v koncentraci 146 $\mu\text{l/l}$ nebo 292 $\mu\text{l/l}$ při teplotě působení

50 °C, která výrazně neinhibuje klíčivost semen.

ZÁVĚR.

Na základě výsledků této studie se silice jeví jako perspektivní látky využitelné pro ošetření osiva a sadby zemědělských plodin. Díky přírodnímu původu silic a jejich antimikrobiálním účinkům jsou vítanou alternativou k běžně používaným chemickým látkám. Použití silic je vhodné především v ekologickém zemědělství, kde není moření chemickými látkami povoleno. Pro použití v praxi je nutné ověřit tyto výsledky v provozních podmínkách.