
VPLIV RAZLIČNIH NAČINOV IZPOSTAVITVE HLADNI KISIKOVI
PLAZMI NA DEKONTAMINACIJO IN KALITEV SEMEN TATARSKE
AJDE

BIOLOGIJA
RAZISKOVALNA NALOGA

Barbara Makovec in Rok Sušnik
3. letnik

Mentor: mag. prof. Eva Šajn, Gimnazija Vič

Somentor: asist. mag. mag. Jure Mravlje, Biotehniška fakulteta UL

2022
Gimnazija Vič

POVZETEK

Semena kmetijskih rastlin so pogosto kontaminirana z glivami, izpostavljena so jim na poljih ali med shranjevanjem. Nekatere glive povzročajo rastlinska obolenja ali pa izločajo mikotoksine, kar ogrozi uporabo semen za sejanje, hrano ali krmo. V naši raziskavi smo preučevali vpliv hladne plazme (HP) na kaljivost semen in glivne združbe, prisotne na semenih tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*), ter pri tem primerjali učinke neposredne in posredne izpostavitve semen plazmi. HP smo proizvedli z uporabo induktivno sklopljenega radiofrekvenčnega napajalnika s frekvenco 27,12 MHz in plina kisika (O₂) pri delovnem tlaku 50 Pa in delovni moči 700 W. Parametri so bili pri vseh obdelavah enaki, spreminjala sta se le način in čas izpostavitve semen plazmi. V nasprotju z drugimi raziskavami smo ugotovili, da je imela obdelava semen s HP v vseh primerih negativne učinke na kaljivost semen. Po identifikaciji z molekularnimi metodami smo primerjali številčnost in raznolikost gliv na s plazmo obdelanih semenih in klasično steriliziranih semenih (30 % vodikov peroksid H₂O₂). Najvišji nivo dekontaminacije je bil dosežen pri 30- in 60-sekundni neposredni izpostavitvi semen plazmi. Ugotovili smo, da je neposredna izpostavitvev semen plazmi veliko bolj uspešna pri dekontaminaciji semen kot posredna, a se pri njej močno zmanjša tudi kaljivost. Kljub temu so nekatere vrste gliv (predvsem *Hannaella sp.*) ostale prisotne tudi po najdaljši obdelavi s HP. Naši rezultati so pokazali, da bi bila obdelava semen s HP uporabna pri uporabi semen za namene prehrabene industrije ter pri shranjevanju semen, ne bi pa bila uporabna pri nadaljnjem sejanju semen. Menimo, da so za določitev optimalnih parametrov obdelave semen tatarske ajde s HP potrebne nadaljnje raziskave.

Ključne besede: hladna plazma, tatarska ajda, dekontaminacija, kaljivost, glivna okuženost

ABSTRACT

Crop seeds are often contaminated with fungi. Contamination can occur in fields or during storage. The use of seeds for sowing, food or feed can be compromised by some fungi via plant disease or the production of mycotoxins. In our study, we investigated the effects of cold plasma (CP) on seed germination and fungal contamination of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*) seeds. We also compared the effects of direct and indirect exposure of seeds to CP. The plasma was generated by an inductively coupled radio frequency power supply with a frequency of 27, 12 MHz, the gas used was oxygen (O₂) at an operating pressure of 50 Pa and an operating power of 700 W. These parameters remained the same across all treatments with only the duration and mode of exposure being changed. We found that CP treatment had negatively affected seed germination. After identification with molecular methods, the frequency and diversity of fungal species were compared between different CP treatments and chemically sterilised (30 % H₂O₂) seeds. The highest levels of decontamination were achieved with direct 30- and 60-second CP treatments. Direct CP exposure was much more effective at decontaminating the seeds than indirect exposure, however, it also greatly reduced seed germination. Nevertheless, some species of fungi (e. g. *Hannaella sp.*) proved to be more resistant to CP treatment. Our results indicate that CP may be used in the decontamination of seeds meant for postharvest and food production, but not for further sowing. More research is needed to determine the optimal parameters of CP treatment for Tartary buckwheat seeds.

Keywords: cold plasma, Tartary buckwheat, decontamination, seed germination, fungal contamination

Kazalo vsebine

1	Uvod	9
1.1	Opredelitev problema	9
1.2	Namen raziskovalne naloge	9
1.3	Hipoteze	9
2	Teoretični del	10
2.1	Tatarska ajda (<i>Fagopyrum tataricum Gaertn.</i>)	10
2.2	Značilnosti gliv	11
2.2.1	Zgradba glivne celice	11
2.2.2	Delitev gliv	11
2.2.3	Liza glivne celice	12
2.3	Plazemske tehnologije	13
2.3.1	Vrste plazme	13
2.3.2	Pridobivanje plazme	14
2.3.3	Uporaba hladne plazme	15
2.4	Vpliv hladne plazme na biološki material	16
2.4.1	Biološki mehanizmi	16
2.4.2	Fizikalni mehanizmi	17
2.4.3	Vpliv hladne plazme na glive	17
3	Material in metode dela	18
3.1	Uporabljene kemikalije	18
3.2	Laboratorijska oprema	18
3.3	Izvor semen tatarske ajde	19
3.4	Obdelava semen s plazmo	19
3.5	Kalitveni testi	20
3.6	Priprava gojišč	20
3.7	Izolacija gliv do čistih kultur	21
3.8	Izolacija glivne DNA	21
3.8.1	Pomnoževanje izolirane DNA s PCR	21
3.8.2	Sekvenciranje	21
3.8.3	Identifikacija nukleotidnih zaporedij	21
3.9	Statistična analiza	21
4	Rezultati z razpravo	22
4.1	Vpliv hladne plazme na kaljivost semen	22

4.2	Vpliv hladne plazme na dekontaminacijo gliv	24
4.3	Raznolikost glivnih morfortipov in identifikacija izoliranih gliv	26
4.3.1	Identifikacija gliv in vpliv hladne plazme nanje	32
5	Zaključek	39
6	Viri	40

Kazalo slik

1	Fotografija posredne obdelave semen tatarske ajde s kisikovo hladno plazmo na IJS. Avtorica: Barbara Makovec, 2021.	15
2	Shema generatorja hladne plazme, ki prikazuje neposredni in posredni način obdelave semen. Prirejeno po Starič in sod. [1].	19
3	Fotografija kalitvenega testa semen. Avtor: Rok Sušnik, 2021.	20
4	Fotografija glivnega testa semen. Avtor: Rok Sušnik, 2021.	20
5	Kaljivost semen tatarske ajde (povprečje \pm standardna napaka, n = 100 semen). Različne črke nad stolpci označujejo statistična razmerja med obdelavami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test).	22
6	Povprečno število glivnih morfotipov na seme pri različnih obdelavah semen tatarske ajde s hladno plazmo. Različne črke predstavljajo statistično pomembne razlike med obdelavami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test).	25
7	Rezultati elektroforeze vzorcev 1-14. Na vrhu je standardna kontrola. Avtorja: Barbara Makovec in Rok Sušnik, 2022.	29
8	Rezultati elektroforeze vzorcev 15-27 ter pozitivna in negativna kontrola. Avtorja: Barbara Makovec in Rok Sušnik, 2022.	29
9	Delitev na nitaste glive in kvasovke.	32
10	Delež glivnih morfotipov, ki so se pojavili na okuženih semenih.	32
11	Število gliv vrste <i>Hannaella sp.</i> (morfotip X) pri posamezni obdelavi s HP.	33
12	Število gliv vrste <i>Rhodotorula glutinis</i> (morfotip Y) pri posamezni obdelavi s HP.	33
13	Število gliv vrste <i>Didymella sp.</i> (morfotip A1) pri posamezni obdelavi s HP.	33
14	Število gliv vrste <i>Montagnula opulenta</i> (morfotip A2) pri posamezni obdelavi s HP.	33
15	Število gliv vrst <i>Setosphaeria turcica</i> in <i>Alternaria sp.</i> (morfotip A3) pri posamezni obdelavi s HP.	34
16	Število gliv vrste <i>Bipolaris sp.</i> (morfotip A4) pri posamezni obdelavi s HP.	34
17	Število gliv vrste <i>Aureobasidium pollulans</i> (morfotip B) pri posamezni obdelavi s HP.	35
18	Število gliv vrste <i>Arthrimum arundinis</i> (morfotip C) pri posamezni obdelavi s HP.	35
19	Število gliv vrste <i>Didymella sp.</i> oziroma <i>Cladosporium sp.</i> (morfotip D), pri različnih obdelavah s HP.	35
20	Število gliv (morfotip E), ki smo jih identificirali kot vrsto <i>Botrytis cinerea</i> oziroma vrsto <i>Phlebia sp.</i> , pri različnih obdelavah s HP.	35
21	Gojišče K+ 4. Avtor: Rok Sušnik, 2021.	36
22	Število gliv vrste <i>Epicoccum nigrum</i> (morfotip F) pri posamezni obdelavi s HP.	36
23	Število gliv vrste <i>Pithomyces charatrum</i> oziroma <i>Aspergillus sp.</i> ali <i>Penicillium sp.</i> (morfotip G) pri različnih obdelavah s HP.	36
24	Število gliv vrste <i>Rhizopus sp.</i> (morfotip H) pri posamezni obdelavi s HP.	37
25	Število gliv vrste <i>Fusarium sp.</i> (morfotip I) pri posamezni obdelavi s HP.	37
26	Število gliv vrste <i>Sordaria sp.</i> (morfotip J) pri posamezni obdelavi s HP.	37

- 27 Število gliv vrste *Penicillium brevicompactum* (morfortip K) pri različnih obdelavah s HP. . . 37
- 28 Delitev najdenih gliv glede na redove in primerjava po posameznih načinih obdelave s HP. . 38

Kazalo preglednic

1	Kemikalije, reagenti in encimi, uporabljeni pri poskusih.	18
2	Opis glivnih morfotipov, izoliranih iz semen tatarske ajde	26
3	Najustreznejši BLAST® primerek izoliranih gliv iz semen tatarske ajde. <i>Tabela vsebuje interno oznako morfotipa, oznako pripadajočega PDA gojišča, najustreznejši BLAST primerek ter delež ujemanja s primerjanim vzorcem (v %). Zraven je zapisana pristopna številka posamezne glive in ime glivne vrste ter uvrstitev v pripadajočo taksonomsko skupino. Vrste, ki jih nismo mogli določiti s sekvenciranjem in orodjem BLAST®, smo določili na podlagi morfoloških značilnosti.</i>	30

1 Uvod

1.1 Opredelitev problema

S strmo naraščajočim številom svetovnega prebivalstva, ki naj bi po ocenah Združenih narodov do leta 2050 doseglo skoraj 10 milijard [2], bodo za globalno oskrbo s hrano ključni novi in inovativni pristopi za pridelavo in predelavo hrane. Okolju prijazne tehnologije, ki ščitijo pridelke ali prehranske proizvode pred propadanjem ali škodljivimi organizmi in s tem zmanjšajo izgube in podaljšajo njihov rok uporabnosti, so bistvene za zagotavljanje globalne preskrbe s hrano [3]. Eno izmed takšnih alternativ predstavlja tehnologija obdelave semen s hladno plazmo, ki je v zadnjih letih pritegnila pozornost mnogih svetovnih raziskovalcev iz različnih področij, predvsem iz kmetijstva in živilske industrije. Uporaba novih tehnologij, kakršna je obdelava semen s hladno plazmo, ima potencial za nadomestitev tradicionalnih pristopov sterilizacije semen ali hrane, kot je na primer uporaba pesticidov, ki na pridelkih in v okolju puščajo škodljive kemične ostanke. Številni za pridelke škodljivi organizmi so razvili odpornost proti pesticidom, kar je povzročilo uporabo pesticidov v še večjih (prekomernih) količinah. V prihodnosti bo ključnega pomena razvoj novih ekonomičnih, učinkovitih in okolju prijaznih rešitev za obvladovanje patogenov tako pred setvijo semen kot med skladiščenjem po žetvi.

Uporaba tehnologije hladne plazme za sterilizacijo oziroma dekontaminacijo semen je novo in danes hitro razvijajoče se področje v znanosti. Dosedanje raziskave kažejo, da ima hladna plazma lahko zelo učinkovito protimikrobno delovanje, zaradi česar predstavlja obetavno izhodišče za razvoj novih načinov učinkovite in okolju prijazne sterilizacije bioloških materialov, kot so semena, z minimalnim vplivom na njihovo kakovost in hranilno vrednost [3]. Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*) velja za eno izmed najbolj zdravih in s hranili bogatih poljščin. V zadnjih letih zaradi naraščajočih trendov zdrave prehrane raste povpraševanje po izdelkih iz tatarske ajde in s tem po tatarski ajdi sami. Poleg tega je tatarska ajda zelo nezahtevna in trpežna poljščina, zato bi v prihodnosti lahko postala gospodarsko zelo pomembno alternativno žito. Novi pristopi uporabe hladne plazme bi lahko zagotovili donosnejšo in bolj trajnostno pridelavo in predelavo tatarske ajde ter, v širšem smislu, vseh ostalih poljščin.

1.2 Namen raziskovalne naloge

Namen naloge je bil preučiti in dokazati vpliv hladne kisikove plazme na kaljivost semen tatarske ajde in samo učinkovitost hladne plazme pri sterilizaciji semen. Glive, ki se nahajajo na površini semen tatarske ajde pred in po obdelavi s hladno plazmo, smo želeli izolirati, morfološko analizirati ter molekulsko identificirati. Primerjati smo želeli vpliv neposredne in posredne izpostavitve semen hladni plazmi na kaljivost in glivno kontaminacijo semen.

1.3 Hipoteze

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

1. Obdelava semen s hladno plazmo bo vplivala na njihovo kaljivost.
2. Pri krajšem času obdelave semen bo kaljivost primerljiva ali boljša kot v kontrolni skupini, pri daljših obdelavah pa bo kaljivost semen slabša.
3. Med neposredno in posredno izpostavitvijo semen plazmi bodo razlike v kaljivosti.
4. Z daljšanjem časa obdelave semen s hladno plazmo se bo zmanjševala kontaminacija z glivami.
5. Z daljšanjem časa obdelave semen s hladno plazmo se bo zmanjševala vrstna raznolikost identificiranih gliv.

2 Teoretični del

2.1 Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*)

Tatarska ajda izvira z območja Himalaja. Zaradi svoje trdoživosti in odpornosti proti nizkim temperaturam je primerna za gojenje v višje ležečih predelih, saj uspeva tudi na nadmorski višini preko 3000 metrov, medtem ko navadna ajda uspeva na bolj zmernih nadmorskih višinah. Ajda ni pravo žito, sodi med dresnovke (*Polygonaceae*), vendar jo zaradi podobnih hranilnih lastnosti in načina setve uvrščamo k žitom. Tako tatarsko kot njeno sestrsko vrsto, navadno ajdo (*Fagopyrum esculentum Moench*), lahko sejemo kot glavni ali strniščni posevek [4].

Cvetovi tatarske ajde so zelene do rumenkaste barve, v čemer se razlikuje od navadne ajde, ki cveti belo, rdečkasto ali rožnato. Navadna in tatarska ajda se razlikujeta tudi v načinu oprasitve: tatarska ajda je samooprašna rastlina (tj. ne potrebuje pomoči žuželk za oprasitev), navadna ajda pa je žužkocvetna – temu primerno je navadna ajda tudi medonosna rastlina, tatarska ajda pa ne. Cvetni listi tatarske ajde so majhni in ozki, dolgi od dva do tri milimetre; njena semena pa so manjša in bolj zgrbančena od semen navadne ajde, ki so pravilne trikotne oblike [4]. Semena tatarske ajde so obdana s trdo vlaknasto lupino, ki obdaja semensko ovojnico, kalček in endosperm. Kalček vsebuje velike količine beljakovin, škroba in vitaminov in se nahaja v sredini endosperma [5].

Tatarska ajda slovi po visoki vsebnosti polifenolov, predvsem flavonoidov, ki so antioksidanti in ščitijo celice pred prostimi radikali, ki bi jih lahko poškodovali, flavonoid rutin pa preprečuje tudi krhkost kapilar in s tem nastanek edemov in krčnih žil [6]. Flavonoidi, med katerimi sta pri ajdi najpomembnejša že omenjen rutin in kvercetin, so po kemijski sestavi rastlinski sekundarni presnovni produkti, ki jih sintetizirajo višje rastline, mahovi ter praproti, njihova naloga pa je absorpcija UV-B svetlobe, kar ščiti rastline pred škodljivimi učinki UV-B sevanja in različnimi boleznimi [4].

Tatarska ajda vsebuje več flavonoidov in drugih polifenolov kot navadna ajda, ima pa tudi uravnoteženo aminokislinsko zgradbo in je kakovosten vir mineralov, vlaknin, in vitaminov B1, B2 in B6, zato je mnogo bolj zdrava od njene sestrске vrste, visoka vsebnost rutina in kvercetina pa ji daje bolj grenak okus. Blaži negativne učinke nekaterih kroničnih bolezni, kot so diabetes, hipertenzija in hiperholesterolemija, in bolezni srca in ožilja. Tako navadna kot tatarska ajda ne vsebujeta glutena, zato jo lahko uživajo tudi bolniki s celiakijo [7].

V Sloveniji navadno ajdo poznamo že okoli 600 let, tatarsko ajdo pa je k nam v 19. stoletju prinesel Žiga Zois iz takratne Češke. Ajda je pomemben del kulinarčne dediščine, pri čemer izstopajo jedi, kot so ajdova kaša, ajdovi žganci in ajdov kruh z orehi. Tatarska ajda se je v Sloveniji močno razširila v letih 1815 in 1816, ko je vladala huda lakota zaradi učinkov podnebne anomalije (nižja temperatura, manjša količina sončne svetlobe ipd.), ki je bila posledica izbruha vulkana na območju Tihega oceana. Slovenski kmetje so s pridelovanjem tatarske ajde nadaljevali do okoli leta 1920. V drugi polovici 20. stoletja so začeli opuščati pridelovanje navadne, še bolj pa tatarske ajde. Razlogov za to je več, kot glavna razloga pa štejemo pridelovanje koruze, po kateri ni več možno sejati strniščnega posevka, in zaraščanje hribovskih območij, ki so še posebej primerna za pridelovanje tatarske ajde [4].

V Evropi se tatarsko ajdo za človeško prehrano danes prideluje le na približno 50 ha v čezmejni regiji Islek, ki obsega severni Luksemburg, regijo Westeifel v Nemčiji in obmejno območje nemško govorečega dela Belgije. V Sloveniji smo tatarsko ajdo začeli znova pridelovati po letu 2000 zlasti na ekoloških kmetijah na Dolenjskem in v Beli Krajini. Tatarska ajda izloča snovi, ki učinkujejo kot naravni herbicidi, ki zatirajo kaljenje in rast plevelov, zato je posebej primerna za ekološko pridelavo [7]. Poleg tega tudi ne potrebuje škropljenja s pesticidi in je nasploh zelo skromna rastlina. Večje zanimanje za zdravo prehrano je v zadnjih letih prispevalo k večjemu povpraševanju po ajdi in izdelkih, narejenih tako iz navadne kot iz tatarske ajde [8].

2.2 Značilnosti gliv

Kraljestvo gliv spada v domeno evkariontov in se deli na 11 skupin z različnimi morfološkimi in genetskimi lastnostmi. Vsem je skupna odsotnost klorofila v celicah in heterotrofni način pridobivanja energije. Lahko so enocelični ali večcelični organizmi, celično steno imajo navadno zgrajeno iz hitina. Glive so v glavnem sestavljene iz vode (69—90 %), ogljikovih hidratov in lipidov [9].

2.2.1 Zgradba glivne celice

Glivne celice so večje od bakterijskih in povečini manjše od rastlinskih ter živalskih. Njihova celična sestava je podobna drugim evkariontom, saj vsebujejo pravo jedro in notranje celične strukture, ki so kompleksnejše kot pri prokariotski celici [9]. Znotraj membrane v citoplazmi najdemo naslednje organele: jedro, endoplazemski retikel (ER), mitohondrije, Golgijev aparat, mešičke in vakuole.

- Plazemska membrana (ali plazmalema) služi transportu snovi v celico in iz nje. Je izbirno prepustna ter sestavljena iz fosfolipidnega dvosloja, v katerega so vgrajene beljakovine in glikoproteini, tako da tvorijo *tekoči mozaik* [10].
- Celična stena ščiti celico pred mehanskimi poškodbami in ji daje obliko. Skoznje potekajo interakcije med celicami in sprejemanje signalov [10].
- Glivne celice so lahko obdane tudi s kapsulo, ki ščiti celico pred dehidracijo in napadi imunskih celic [10].
- Jedro je obdano z dvojno membrano in vsebuje kromosome (DNA-beljakovinske komplekse), ki prenašajo genetsko informacijo hčerinskim celicam pri celični delitvi. V jedru poteka transkripcija RNA [10].
- Mitohondriji imajo dvoslojno membrano in poleg tega vsebujejo kompleksnejše notranje membrane [11]. V njih pri aerobnih pogojih poteka celično dihanje, pri anaerobnih pogojih pa metabolizem maščobnih kislin, steroidov in aminokislin [10].
- Prisotna sta tako gladki kot zrnati endoplazemski retikel (ER). Na ribosomih zrnatega ER poteka sinteza beljakovin [10].
- V Golgijevem aparatu (GA) poteka modifikacija beljakovin, ki so se sintetizirale na ER. GA sodeluje tudi pri prenosu lipidov in oblikovanju lizosomov [11].
- Vakuole skladiščijo hranilne ali odpadne snovi ter skrbijo za uravnavanje kislosti. So zelo dinamične, saj fuzijske in fizijske reakcije omogočajo spreminjanje velikosti, oblike in številčnosti med procesi, kot sta celična delitev in osmoza. V hipotoničnem okolju se fuzija vakuole poveča, v hiperoničnem okolju pa vakuole postanejo razdrobljene, njihov volumen pa se zmanjša. Nitaste glive imajo omrežje cevastih vakuol, ki po hifah prenašajo hranilne snovi [9].

2.2.2 Delitev gliv

Glive se navadno pojavljajo v dveh oblikah rasti, lahko so bodisi kvasovke bodisi nitaste glive. Posebnost so dimorfne glive, ki se pod vplivom okolja lahko preobrazijo [12].

Nitaste glive

Večina nitastih gliv ima dolge razvejane niti, imenovane hife, ki služijo podpori pri razmnoževanju in diseminaciji [10]. Specializirane hife omogočajo vegetativno (nespolno) razmnoževanje v obliki spor [13]. Najdemo jih v večini filogenetskih skupin, večina človeških patogenov pa spada v deblo *Ascomycota* (zaprtotrosnice) [14]. Hife so sestavljene iz tankih, prozornih, cevastih cevi, ki so zapolnjene s protoplazmo. Več hif tvori micelij, ki daje koloniji značilno barvo, teksturo in topologijo. Poznamo 3 vrste micelija:

- Vegetativni micelij prodre površje sredstva in absorbira hranilne snovi.
- Zračni micelij raste nad površjem agarja in je lahko puhaste teksture.
- Rodoviten micelij z zračnimi hifami, ima reproduktivne strukture, kot so konidiji ali sporangiji [9].

Celice višjih gliv so ločene s septo, ki daje hifam strukturno podporo. Septa hife ločuje v manjše razdelke, ki ločujejo poškodovane dele hif od nepoškodovanih delov kolonije [10]. Hkrati je septa perforirana, kar omogoča prehajanje citoplazme in protoplazme med razdelki [9].

Celične stene nitastih gliv različnih taksonomskih skupin so sestavljene iz različnih polisaharidov. Lahko vsebujejo hitin, glukan, manoproteine, hitozan, poliglukuronsko kislino ali celulozo (neprave glive), pa tudi manjše količine proteinov in glikoproteinov [10]. To nam omogoča delitev v različne evolucijske podskupine. Sestava celične stene pri posameznih glivah je lahko odvisna od starosti hif in tudi od sestave okolja, na njeno kemično zgradbo pa vplivata pH in temperatura [9]. Celična stena je dinamična struktura, ki se razlikuje od ene vrste glive do druge. Pigmenti, kot je melanin, so lahko pri nekaterih glivah vgrajeni v celično steno (npr. *Aspergillus niger*) in ščitijo pred biotskim in abiotskim stresorji, kot je UV sevanje [15].

Zaprto trosnice (*Ascomycota*) in odprto trosnice (*Basidiomycota*) sta debli, ki skupaj tvorita podkraljestvo gliv, imenovano *Dikarya*. Sporulacija zaprtotrosnic poteka v meščikih, pri odprto trosnicah pa ti nastajajo na zunanji površini lističev. Razlikujejo se v naravi hif in načinu kaljenja trosov. Pri zaprtotrosnicah lahko že klijajoči (enojedrni) micelij tvori trosnjake, pri odprto trosnicah pa ne [16].

Glive kvasovke

Glive kvasovke so enocelični organizmi, ki predstavljajo približno 1 % kraljestva gliv. Trenutno poznamo nekaj več kot 1500 različnih vrst [17]. So evkarionti, ki so preprosti za gojenje v laboratoriju, saj jim ustreza toplo, kislo in aerobno okolje. Struktura glivne celice kvasovk je podobna celicam ostalih gliv. Ima jedro obdano z ovojnico, ki se nahaja v citoplazmi. Citoplazma je kisla koloidna raztopina s proteini, glikogenom in drugimi topnimi makromolekulami [18]. Citoskelet je zgrajen iz mikrotubulov in mikrofilamentov, najpogostejša sestavna beljakovina pa je aktin, ki lahko deluje tudi kot signalni mehanizem za sprožitev programirane celične smrti oz. apoptoze celice [19].

Glive kvasovke imajo lahko, tako kot druge glive, spolne in nespolne razmnoževalne cikle. Lahko so okrogle, ovalne, eliptične ali cilindrične oblike, včasih pa tvorijo nitaste strukture. Vrste kvasovk se delijo glede na način brstenja in glede na nekatere druge morfološke in fiziološke lastnosti [9]. Najbolj pogost način vegetativne rasti gliv kvasovk je nespolno razmnoževanje z brstenjem [20]. Pri tem se jedro razdeli med starševsko in hčerinsko celico, ki se nato odcepi. Lahko se delijo tudi s cepitvijo, pri čemer nastaneta dve enaki hčerinski celici. V primeru pomanjkanja hranilnih snovi se diploidne celice pri sporulaciji delijo z mejozo in s spolnim razmnoževanjem ustvarijo haploidne celice, ki pod stresnimi pogoji težje preživijo [21].

2.2.3 Liza glivne celice

Na celično smrt (liza celice), ki je definirana kot dokončna in nepovratna izguba sposobnosti razmnoževanja celice, vplivajo številni fizikalni, kemični in biološki faktorji. Gliva lahko umre, če je izpostavljena pretirani toploti ali mrazu, visokonapetostni elektriki, ioniziranem sevanju, visokim hidrostatičnim in osmotskim pritiskom, in ob stiku s kemičnimi ali biološkimi fungicidnimi sredstvi. Ko fiziološki zaščitni mehanizmi celice ne zadoščajo za obrambo pred zunanjimi dejavniki, celice odmrejo oziroma reagirajo s programirano celično smrtjo (apoptoza) [22]. Glive kvasovke, izpostavljene višjim temperaturam, lahko prej doživijo celično smrt. Raziskave so pokazale, da oksidativni stres, ki deluje na citoskelet kvasovk, sproži apoptotski odziv celice [19]. To lastnost izkoriščajo pri pasterizaciji hrane in pijače [23]. Kemični dejavniki, ki imajo fungicidne učinke, so strupene organske spojine, prosti kisikovi radikali in težke kovine [24].

2.3 Plazemske tehnologije

Plazma je četrto agregatno stanje snovi, ki nastane, ko plinu dovajamo energijo v obliki toplote, električnega toka ali elektromagnetnega sevanja [25]. Je ioniziran plin, ki je zaradi vsebnosti nabitih delcev električno prevoden. Sestavljajo ga ioni, elektroni, prosti radikali, atomi in molekule, kot so reaktivne kisikove vrste (ang. *reactive oxygen species* oz. ROS) in reaktivne dušikove vrste (ang. *reactive nitrogen species* oz. RNS), v osnovnem ali vzbujenem stanju, pa tudi elektromagnetno sevanje (UV sevanje in vidna svetloba) [3]. Veliko število trkov med elektroni in drugimi komponentami plazme zagotavlja enakomerno razporeditev notranje energije, kar se navzven kaže kot kvazi-nevtralnost. Za plazmo je značilno kolektivno obnašanje delcev, kar pomeni, da imajo lokalne motnje lahko močan vpliv na oddaljene predele plazme [26].

Plazma predstavlja skoraj 99 % vidnega vesolja [27], na Zemlji pa jo lahko opazimo pri nekaterih plamenih ognja, strelah [28] in severnemu siju [29]. Umetno proizvedeno plazmo uporabljamo v neonskih znakih, televiziji, fluorescentnih žarnicah, pa tudi pri izdelavi elektronske opreme, jedrskih fuzijskih reaktorjih [30], obdelavi površin [31], čiščenju onesnaženega zraka in vode [32] in uničevanju patogenov [33].

2.3.1 Vrste plazme

Plazmo lahko razdelimo na visokotemperaturno ali ravnotežno in nizkotemperaturno ali neravnotežno plazmo [22].

Visokotemperaturna (ravnotežna) plazma nastane pri visokem tlaku (> 10 kPa) in temperaturah okoli 5000 – 50000 K, za njeno tvorbo pa moramo dovesti veliko električne energije. Zanj je značilna visoka gostota elektronov (navadno nad $10^{22} / m^{-3}$), ter ekvivalentnost temperatur elektronov (T_e) in težjih delcev (T_{td}), tako da velja $T_e = T_{td}$. Pri visokotemperaturnih plazmah so molekularne komponente povečini nepovezane, atomske vrste pa so delno ionizirane. Zaradi tega prenos energije poteka tako v obliki kinetične energije, kakor je to pri navadnih plinih, kot tudi s prenosom toplote disociacije in ionizacije, posledica tega pa je visoka toplotna prevodnost [26].

Nizkotemperaturna (neravnotežna) plazma ima manjšo gostoto elektronov, ki pa imajo višjo temperaturo kot težki delci. Ioniziran je majhen delež plina, hkrati pa je stopnja disociacije relativno visoka. Nizkotemperaturna plazma se deli na kvazi-ravnotežno plazmo (s temperaturo okoli 100 – 150 °C) in na ne-ravnotežno plazmo (temperatura < 60 °C). Pri prvi obstaja lokalno termodinamično ravnovesje med zvrstmi, pri neravnotežni plazmi pa je ohlajanje ionov in nenabitih molekul bolj učinkovito kot prenos energije iz elektronov. Plin tako ohranja nizko temperaturo, zato to vrsto plazme imenujemo tudi hladna plazma [3].

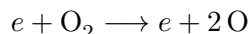
Hladno plazmo (HP) lahko pridobimo pri atmosferskem ali zmanjšanem tlaku (vakuum), za tvorbo pa ne potrebujemo tako visokega vhodnega napajanja kot pri visokotemperaturni plazmi [34].

Gibanje elektronov in ionov v smeri električnega polja je občasno prekinjeno s trkom ob nevtralne molekule plina (*nmp*), pri tem pa se elektroni (*e*) in ioni (*i*) obnašajo zelo različno, saj je izmenjana energija odvisna od razmerja med njihovimi masami. Pri ionih, kjer je $m_i/m_{nmp} \sim 1$, to pomeni delitev energije z drugim delcem, tako da se ion po vsakem trku skoraj ustavi. Pri elektroni, kjer je $m_e/m_{nmp} \ll 1$, se izmenja le majhen delež razpoložljive energije. Elektroni se tako v danem električnem polju segrejejo dosti bolj kot temperatura ionov in s tem plina [35].

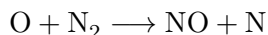
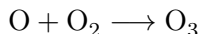
Lastnost toplotnega neravnovesja je osnova za praktično uporabnost HP, saj vroči elektroni usmerjajo električno energijo v proizvodnjo reaktivnih radikalov, hkrati pa ne segrevajo plina.

Ob prisotnosti električnega polja so nabiti delci pospešeni. Ko delec v praznem prostoru pospešimo z napetostjo enega volta pravimo, da ima delec energijo 1 elektronvolt (eV). Velja $1,0 \text{ eV} = 1,6 \times 10^{-19} \text{ J}$. Prevodna energija delca pri sobni temperaturi je 0,04 eV, ionizacijska energija atoma ali molekule pa je navadno okoli 10 do 20 eV. Pri vmesnih energijah se lahko dogajajo različni molekularni procesi, kot je prehod v vzbujeno stanje ali disociacija na reaktivne radikale [35].

Kisikova molekula ob trku z elektronom razpade na atome:



Atomarni kisik, ki je sam po sebi pomemben radikal, lahko služi kot predhodnik za druge zvrsti, kot je ozon ali dušikov oksid:



Pogoj za te reakcije je, da ima elektron vsaj nekaj eV energije, kar je precej več kot jo je na voljo pri sobni temperaturi. Pri pridobivanju plazme je zato ključno, da z virom napetosti elektronom in posledično ostalim zvrstem dovedemo dovolj energije. Z reakcijo nastane veliko število kratkotrajnih radikalov, ki se razkrojijo v manjše število dolgotrajnejših (reaktivnih) spojin, te pa so obstojne tudi po odstranitvi vira napetosti [35].

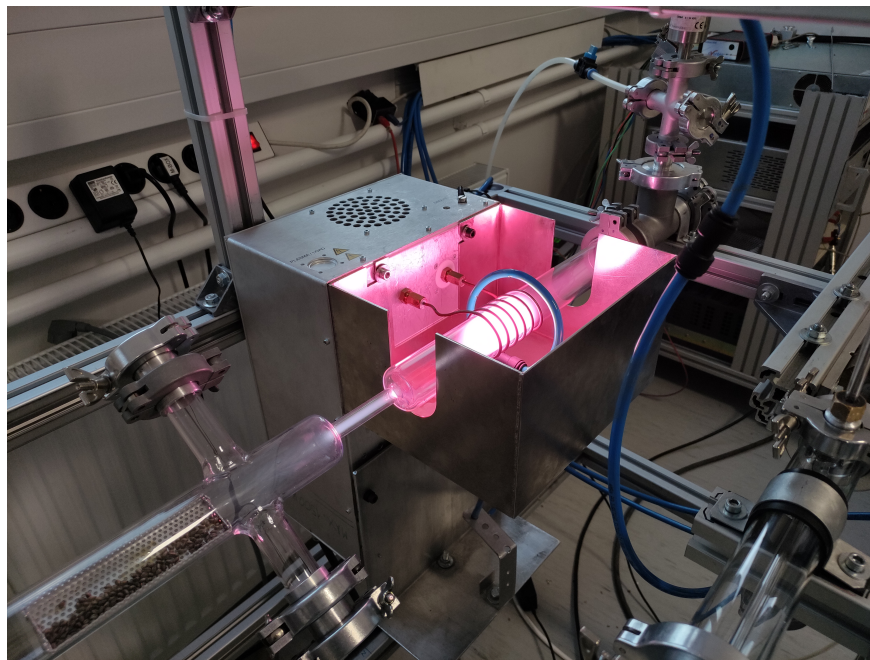
V kisikovi plazmi, kjer je kot glavni reagent uporabljen kisik, so dolgotrajnejše zvrsti atomarni kisik, dikisik in ozon. Zaradi visoke oksidativnosti se reaktivne kisikove spojine pogosto uporabljajo pri obdelavi hrane, predvsem tiste bogate z vitaminom C [35].

2.3.2 Pridobivanje plazme

Najpogosteje uporabljena metoda za generiranje plazme je vplivanje na nevtralni plin z električnim poljem. Vsak plin namreč vsebuje nek delež nabitih delcev (torej elektronov in ionov), ki nastanejo zaradi vpliva kozmičnih žarkov oziroma radioaktivnega sevanja. Ti naboji so ob prisotnosti električnega polja pospešeni do visokih energij (nekaj elektronvoltov), pri katerih lahko vzbudijo, disociirajo ali ionizirajo nevtralne molekule. Sekundarni elektroni so prav tako pospešeni proti katodi, kar vodi do večjega števila trkov, ki prenašajo kinetično energijo elektronov. Ponovna kombinacija nabitih delcev zviša temperaturo plina [34]. Pri prožnih trkih elektroni zaradi majhne mase ohranijo večino energije, pri neprožnih trkih pa energijo navadno prenesejo naprej. Radikalne zvrsti, ki nastanejo zaradi stika z elektroni povzročijo verigo kemijsko-plazemskih reakcij [35].

Plazma se ustvari tako, da skozi (delno) ioniziran plin teče električni tok, ki plinu oddaja energijo in ga ohranja ioniziranega in prevodnega. Iz električnega polja se energija prenese na elektrone, ti pa jo ob dovolj visokoenergijskih trkih prenesejo na druge komponente. S tem plazma ohranja enakomerno razporeditev notranje energije [36]. Pri tem se smer električnega polja spreminja, s tem pa se izmenično spreminja tudi smer gibanja elektronov, kar nam omogoča oblikovanje enotnejše plazme. Radio-frekvenčne razelektritve navadno delujejo v frekvenčnem razponu: $f = \omega/2\pi \simeq 1 - 100$ MHz [34]. Pri tem lahko uporabimo dva tipa električne konfiguracije, kapacitivno povezovanje in induktivno povezovanje. Pri slednjem načinu so elektrode povsem ločene od reakcijske komore, kar znižuje možnost kontaminacije s snovmi na elektrodah [37]. Induktivno sklopljena plazma (angl. *inductively coupled plasma* ali ICP) je vzbujena z električnim poljem, ki ga ustvarimo s transformatorjem iz radio-frekvenčnega toka v prevodniku. Spreminjajoče se magnetno polje prevodnika inducira električno polje, v katerem so pospešeni elektroni in plazma. Tuljava, po kateri teče tok, je lahko napeljana znotraj ali zunaj komore in je lahko v obliki vijačnice ali spirale [34].

Material je lahko plazmi izpostavljen na dva različna načina. Prvi je neposredna ali *glow* izpostavitve, kjer je vzorec v neposrednem stiku s plazmo ter plazemskimi delci in z UV sevanjem, ki pri tem nastanejo. Če obdelava vzorca poteka v post-razelektrivnem območju in je s tem vzorec plazmi izpostavljen posredno, govorimo o posredni ali *afterglow* izpostavitvi (kot prikazuje Slika 1). Pri tem vzorec postavimo v nekoliko oddaljeno sosednjo komoro, s čimer znižamo količino dovedene toplote in preprečimo stik z reaktivnimi snovmi in nabitimi delci. Tako vzorec ni izpostavljen UV sevanju in nanj vplivajo le nizke koncentracije dlje živečih plazemskih snovi, kot so reaktivne dušikove in kisikove zvrsti. Zaradi blažjega termičnega vpliva in manjše izpostavitve plazmi so navadno obdelovalni časi pri posrednem (*afterglow*) načinu obdelave daljši kot pri neposrednem (*glow*) načinu [38].



Slika 1: Fotografija posredne obdelave semen tatarske ajde s kisikovo hladno plazmo na IJS. Avtorica: Barbara Makovec, 2021.

2.3.3 Uporaba hladne plazme

Plazemske tehnologije se v elektrotehniki uporabljajo za jedkanje, prikazne zaslone in razsvetlitev, v industriji pa za obdelavo površin polprevodnikov in za predelavo tekstila. V analizi kemiji se plazma uporablja za ionizacijo molekul in atomov pri optični spektroskopiji in masni spektrometriji [39]. Uporaba se je dandanes razširila tudi na področje medicine (celjenje ran, zobozdravstvo) in obdelave bioloških materialov [40, 41].

HP vpliva na kaljivost in rast semen s spreminjanjem njihove fiziologije in biokemičnih lastnosti. S HP obdelana voda lahko spodbudi rast rastlin in okrepi učinkovanje umetnih gnojil [42]. Raziskave kažejo, da se lahko HP uporablja tudi za dekontaminacijo semen, saj prosti radikali in reaktivne kisikove zvrsti, ki pri tem nastanejo, zatredo okužbe z glivami in bakterijami ter pozitivno vplivajo na kaljivost in rast kulturnih rastlin, kot je pšenica [43] [44], soja [45], koruza [46], riž [47], ječmen [48], paradižnik [43] in redkev [49]. Tako obdelava s hladno plazmo predstavlja okolju prijazno alternativo kemičnim pesticidom, ki poleg obremenitve okolju predstavljajo nevarnost človeškemu zdravju.

2.4 Vpliv hladne plazme na biološki material

Učinkovitost dekontaminacije s HP je odvisna od različnih procesnih parametrov, ki jih določimo že pred obdelavo materiala s plazmo [50]. Med njih spadajo vhodna moč (tj. napetost in frekvenca), čas obdelave, vrsta plina, pretok in način izpostavitve (neposreden ali posreden). Večjo učinkovitost dekontaminacije s HP je mnogo avtorjev zaznalo pri višji vhodni moči [51–55]. Način izpostavljenosti je tudi pomemben dejavnik pri učinkovitosti dekontaminacije materiala s HP. Rezultati različnih študij [51–55] so nedosledni, vendar jih je večina pokazala, da je neposredna izpostavljenost materiala bolj učinkovita kot posredna. Pomembna je tudi izbira plina, iz katerega pridobimo plazmo. Vrsta plina določa vrsto in količino reaktivnih kemijskih zvrsti, ki jih proizvede HP. Eto in sod. [56] so v svoji raziskavi opazili, da višja vsebnost kisika (O_2) v plinu privede k večji količini nastalih ROS, zlasti ozona (O_3), ki pripomore k večji učinkovitosti dekontaminacije materiala.

Okoljski dejavniki, kot so pH, sestava živil in relativna vlažnost, prav tako pomembno vplivajo na učinkovitost dekontaminacije materiala s HP [50]. Odkrito je bilo, da kislost živil vpliva na odpornost bakterij proti različnim obremenitvam, kot so toplota, električno polje in podobno [57, 58]. Prav tako ima večja relativna vlažnost pozitiven učinek na učinkovitost dekontaminacije, saj se pri razgradnji plina v plazmo tvori več reaktivnih radikalov iz molekul vode, prisotnih zaradi vlage [59].

Da bi se plazemska tehnologija uspešno in širše uporabljala v praksi, je ključnega pomena jasna razlaga njenih mehanizmov za dekontaminacijo materiala oz. inaktivacijo mikroorganizmov [50]. Številne raziskave so odkrile, da je HP zelo učinkovita pri inaktivaciji različnih mikroorganizmov [52, 60–65], kljub temu pa je poznavanje mehanizmov tega procesa še vedno pomanjkljivo, podatki pa so zaradi zapletenosti procesov, ki se dogajajo v interakcijah med plazmo in biološkim materialom, neenotni in nedosledni. Mehanizmi delovanja HP na biološki material torej še niso čisto jasni, v grobem pa so Liao in sod. [50] potencialne mehanizme razdelili na biološke in fizikalne.

2.4.1 Biološki mehanizmi

Poškodbe DNA zaradi UV sevanja: Sprva so raziskovalci menili, da so poškodbe DNA, ki vodijo do inaktivacije mikroorganizmov, neposredno povezane z UV sevanjem, sproščenim pri nastanku plazme [60, 66]. Znano je, da UV svetloba, sploh pri valovnih dolžinah okoli 260 nm, lahko vodi do reakcije med timinom in citozinom iste verige DNA, kar močno okrne sposobnost pomnoževanja DNA v mikroorganizmu. Mnogo raziskav je pokazalo, da UV sevanje predstavlja enega izmed glavnih dejavnikov uničenja mikrobov pri neposredni izpostavitvi materiala plazmi [67–70].

Lipidna peroksidacija: Mehanizem delovanja plazme lahko temelji na oksidativnih poškodbah membran ali znotrajceličnih komponent (DNA, beljakovine, ogljikovi hidrati itd.), ki so posledica reakcij z reaktivnimi kemijskimi zvrstmi, ki jih vsebuje plazma. Izmed znotrajceličnih komponent naj bi bili najhujše prizadeti membranski lipidi, predvsem polinenasičene maščobne kisline, ki so zaradi lokacije blizu celične površine in njihove občutljivosti na ROS posebej dovzetni za poškodbe te narave [71–73].

Spremembe proteinov: Potencialen mehanizem delovanja plazme je tudi sprememba strukture in funkcije beljakovin. Več raziskav je pokazalo, da je po izpostavljenosti biološkega materiala plazmi prišlo do kemijskih sprememb in degradacije membranskih beljakovin [67, 74, 75]. Venezia in sod. [75] so opazili, da beljakovine, ki so bile neposredno izpostavljene plazmi, kažejo spremenjene elektroforetske profile z degradacijo. Ugotovili so tudi, da se je struktura beljakovin na celični membrani zanesljivo spremenila, saj se bakteriofagi niso uspeli pritrditi na svoj določen membranski receptor, to je beljakovino.

Induciranje apoptoze: ROS igrajo vlogo v različnih celičnih presnovnih poteh kot signalne molekule. Znano je, da lahko poleg oksidativnega stresa povzročijo tudi programirano celično smrt oz. apoptozo, iz česar sklepamo, da ROS, vsebovane v plazmi, lahko povzročijo enak učinek [76–78].

2.4.2 Fizikalni mehanizmi

Elektrostatska motnja: Lunov in sod. [70] razlagajo, da elektrostatske sile, ki so posledica kopičenja nabitih delcev, nastalih v plazmi, povzročijo motnje na celični membrani, čemur sledi celična smrt. Mendis, Rosenberg in Azam [79] pojasnjujejo, da, ko elektrostatski odboji, ki nastanejo z bombardiranjem površine celice z nabitimi delci, presežejo natezno trdnost celičnih membran, celična membrana postane nestabilna in hitro zlomljiva, kar tudi vodi do celične smrti.

Elektroporacija: Zaradi električnega polja, ki se ustvari v plazmi, je mehanizem delovanja HP podoben mehanizmu delovanja pulzirajočega električnega polja oz. PEF [50]. To je izrazito opazno pri neposrednem načinu izpostavitve materiala plazmi, saj le-ta zagotavlja prisotnost dovolj močnega električnega polja, da lahko deluje protimikrobno, in sicer se v celični steni formirajo pore, ki vodijo do iztekanja citoplazme in končno celične smrti [80, 81]. Nasprotno pa se v posrednem načinu izpostavitve obdelani vzorci nahajajo daleč od območja nastajanja plazme, kar pomeni, da so oddaljeni tudi od nastalega električnega polja, šibka jakost električnega polja pa pri tem načinu izpostavitve skorajda nima dekontaminacijskega učinka [82].

Podrobni mehanizmi protimikrobnega delovanja HP so še vedno neraziskani, kar ovira razvoj HP in njene širše uporabe. V ta namen je potrebno izvesti več sistematičnih in celovitih raziskav o vplivih HP na mikroorganizme in njeno uporabo za dekontaminacijo biološkega materiala.

2.4.3 Vpliv hladne plazme na glive

Mikroorganizmi, na katerih so bile opravljene raziskave o vplivu HP, obsegajo Gram-pozitivne in Gram-negativne bakterije [69, 83], bakterije, ki tvorijo biofilme [84], bakterijske spore [85], kvasovke in glive [86], prione [87] in viruse [88]. Med navedenimi mikrobi je inaktivacija gliv (plesni in kvasovke) s HP področje velikega zanimanja za prehransko industrijo in kmetijstvo, saj te glive predstavljajo veliko skupino mikroorganizmov, odgovornih za kvarjenje hrane in pridelkov [89].

Hayashi in sod. [90] poročajo o pomembni vlogi atomarnega kisika (O) pri inaktivaciji gliv *Aspergillus oryzae* in *Penicillium digitatum*. Ugotovili so, da so glivne celice po delovanju atomarnega kisika viabilne a hkrati nekultivabilne (tj. so žive, vendar se ne morejo razmnoževati), spore hif pa izgledajo nagubane. Suhem in sod. [91] so po obdelavi celic gliv *Aspergillus flavus* s plazmo opazili, da so glivne celice izgubile viabilnost, saj je prišlo do iztekanja celične vsebine. Na podlagi rezultatov teh in drugih raziskav [89, 92, 93] je moč sklepati, da obdelava glivnih celic s plazmo vodi do uničenja celične stene, kar povzroči iztekanje znotrajceličnih komponent, pri čemer pa je treba opozoriti na dejstvo, da je obseg sprememb v glivnih celicah odvisen tudi od časa izpostavitve glivnih celic plazmi.

Številne raziskave [86, 94–97] trdijo, da se inaktivacija glivnih celic zgodi zaradi enega ali več sledečih učinkov plazme na celice:

- poškodbe celične membrane: kratek čas izpostavitve plazmi (približno 30 sekund) povzroči motnje v delovanju celične membrane, nadaljnja izpostavljenost pa popolno inaktivacijo glivne celice;
- morfološke spremembe: izrazito se lahko spremeni celična membrana in njena prepustnost [51, 98, 99], a korenite morfološke spremembe celičnih struktur niso nujne za inaktivacijo glivnih celic, so pa potem prisotne znotrajcelične nanostrukturne spremembe [89];
- pri majhnih količinah plazme bi lahko glivne celice šle v proces apoptoze [96];
- ROS povzročijo oksidacijo znotrajceličnih organelov, še posebej dovzetni za to so lipidi, v kasnejših fazah pa lahko poteče tudi oksidacija beljakovin [54, 99, 100].

Potrebno je omeniti, da večina študij poudarja glavno vlogo ROS, medtem ko je zračna plazma mešanica ROS, reaktivnih dušikovih zvrsti (RNS) in UV sevanja, katerega predvidevano vlogo smo že opredelili v prejšnjem poglavju [89]. Vloga RNS pri dekontaminaciji materiala s HP je manj raziskana zaradi težavnosti ločevanja učinkov ROS in RNS. Da bi bolje razumeli interakcije med glivnimi celicami in plazmo, je potrebnih več raziskav.

3 Material in metode dela

3.1 Uporabljene kemikalije

Pri raziskovalnem delu smo uporabili kemikalije, reagente in encime, navedene v Preglednici 1.

Preglednica 1: Kemikalije, reagenti in encimi, uporabljeni pri poskusih.

Kemikalija/reagent/encim	Proizvajalec
10-kratni PCR pufer	Thermo Scientific
Agarosa (SeaKem® LE Agarose)	Lonza
Etanol (96 %)	Stella Tech
Etidijev bromid	Sigma
H ₂ O ₂ (30 %)	Sigma
Kloramfenikol	Sigma
Komplet za izolacijo DNA (GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit)	Sigma-Aldrich
Nukleotidi dNTP mix	Thermo Scientific
PDA (potato dextrose agar)	Biolife
Polimeraza Taq (Taq DNA Polymerase)	Thermo Scientific
Velikostni standard (Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder)	Fermentas
Začetni oligonukleotid ITS1-F	Sigma-Aldrich
Začetni oligonukleotid ITS4	Sigma-Aldrich

3.2 Laboratorijska oprema

- Bunsenov gorilnik
- Centrifuga (Sigma 3K30)
- Digestorij
- Erlenmajerice
- Filter papir
- Laminarij
- Parafilm
- PCR stroj "PTC-150 MiniCycler"(MJ Research, Biorad)
- Plastične petrijevke
- Sistem za elektroforezo (IEC 1010-1, Amersham pharmacia)
- Spatule
- Tekoči dušik N₂
- Terilnice s pestili
- UV transluminator s kamero (UVtech)

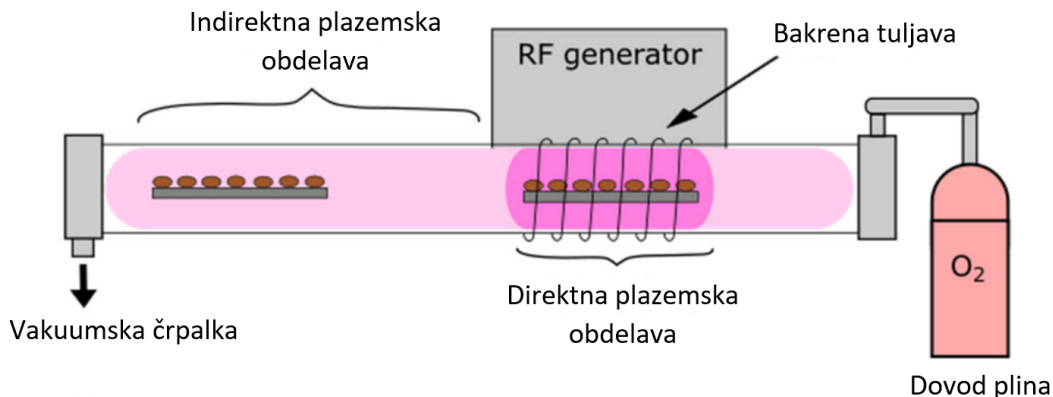
3.3 Izvor semen tatarske ajde

Semena tatarske ajde so bila pridobljena iz Mlina Rangus (Dolenjska). Eksperimenti so bili opravljeni leta 2021.

3.4 Obdelava semen s plazmo

Semena smo za namen raziskave obdelali z radio-frekvenčnim (RF) generatorjem hladne plazme na Institutu Jožef Stefan (IJS). Uporabili smo čisti plin kisik O_2 (99,99 %) pri delovnem tlaku 50 Pa in delovni moči 700 W. Parametri so bili pri vseh obdelavah enaki, spreminjali smo le način izpostavitve plazmi (neposreden ali posreden) in čas izpostavitve semen plazmi (0, 30, 60, 120, 180 in 240 sekund). Čas izpostavitve 0 sekund je predstavljal kontrolno skupino (K). Semena, ki so bila v generatorju plazme izpostavljena le vakuumu (in ne plazmi), in sicer za najdaljši čas izpostavitve (240 s), so predstavljala vakuumsko kontrolo (VK). Pri analizi glivnih morfotipov smo uporabili še z vodikovim peroksidom (30 % H_2O_2) sterilizirano kontrolo (KS).

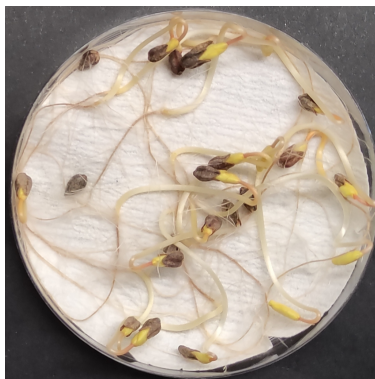
Plazmo smo proizvedli z induktivno sklopljenim (IC) radiofrekvenčnim (RF) napajalnikom s frekvenco 27,12 MHz (Slika 2). Semena tatarske ajde smo za obdelavo položili na aluminijast pladenj, ki smo ga postavili v komoro, kjer je nastajala plazma, za neposredno (*glow*) izpostavitvev oziroma v sosednjo komoro, ki ni bila neposredno izpostavljena plazmi, za posredno (*afterglow*) izpostavitvev semen plazmi. Semena, ki so bila plazmi izpostavljena neposredno (pri približno $270^\circ C$), so imela čas obdelave 30 oziroma 60 sekund (GL30 in GL60); semena, ki so bila plazmi izpostavljena posredno, pa so imela čas obdelave 60, 120, 180 oziroma 240 sekund (AG60, AG120, AG180 in AG240) pri približno $100^\circ C$. S plazmo smo obdelali večje število semen (približno 150) in jih po obdelavi vakuumsko zaprli v sterilne vrečke, ki so bile primerno označene, da bi preprečili kontaminacijo.



Slika 2: Shema generatorja hladne plazme, ki prikazuje neposredni in posredni način obdelave semen. Prirejeno po Starič in sod. [1].

3.5 Kalitveni testi

S kalitvenimi testi ugotavljamo, kolikšno število semen bo vzkliko v določenih razmerah. V naši raziskavi smo kalitvene teste opravili tako, da smo 20 semen določene obdelave položili v plastično petrijevko, na dno katere smo položili filtrirni papir, ki smo ga navlažili z destilirano vodo (Slika 3). Kalitveni test je bil za vsako različno obdelavo semen opravljen v petih ponovitvah (tj. skupno smo uporabili 100 semen iz iste obdelave). Semena smo pustili kaliti v rastnih komorah na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani pri konstantni temperaturi 22 °C in 60 % relativni zračni vlažnosti v temi. Poskus je potekal teden dni. Število skaljenih semen smo prešteli prvi, drugi, tretji, četrti, peti in sedmi dan kalitve ter si podatke zapisali. Kot skaljeno seme smo upoštevali semena, pri katerih je skozi semensko lupinico prodrla radikula (koreninica).



Slika 3: Fotografija kalitvenega testa semen. Avtor: Rok Sušnik, 2021.

3.6 Priprava gojišč

Gojišča iz krompirjevega dekstroznega agarja (PDA) so nam pripravili na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Za preprečitev rasti bakterij je bil gojiščem dodan antibiotik kloramfenikol. Tako pripravljena gojišča smo uporabili za nadaljnje poskuse.

Skupno smo za posamezno skupino semen uporabili 10 petrijevk z agarjem, s pomočjo katerih smo opazovali vpliv HP na rast glivnih združb. Na vsako petrijevko smo sterilno ob plamenu gorilnika enakomerno razporedili pet semen iz iste skupine. Petrijevke smo nato zatesnili s parafilmom in jih en teden inkubirali v rastnih komorah pri konstantni temperaturi 22 °C in 60 % relativni zračni vlažnosti v temi. Po enem tednu smo petrijevke pregledali in jih fotografirali (Slika 4).



Slika 4: Fotografija glivnega testa semen. Avtor: Rok Sušnik, 2021.

3.7 Izolacija gliv do čistih kultur

Na videz podobne glive smo razvrstili v skupine glede na njihove morfološke značilnosti (morfotipizacija). Glive, ki so si bile morfološko podobne (enak morfotip) smo označili z isto črko abecede. Za nadaljnjo izolacijo posameznih morfotipov smo izbrali najmanj dve plošči, kjer so zrastle glive istega morfotipa. S spatulo smo izrezali približno 5 mm × 5 mm velik košček agarja, ki je vseboval posamezno glivo (ob robu, kjer je bila gliva najmlajša), in ga prenesli na novo gojišče. Vsak morfotip smo po istem postopku izolirali do čistih kultur, s čimer smo jih ločili od ostalih gliv, ki so zrastle na isti petrijevki. Petrijevke z novimi gojišči smo ustrezno označili, jih zaprli s parafilmom in inkubirali v rastni komori pri zgoraj opisanih pogojih en teden.

3.8 Izolacija glivne DNA

Čiste glivne kulture smo postrgali iz petrijev in jih v terilnicah strli v 50 ml tekočega dušika. Tako pripravljen glivni material smo nato dali v mikrocentrifugirke in jih shranili v hladilnik za nadaljnje analize. Vse vzorce smo ustrezno označili z novimi oznakami. Glivno DNA smo izolirali s pomočjo komercialnega kompleta "GenElute® Plant Genomic DNA Miniprep Kit" po navodilih proizvajalca. V zadnjem koraku (spiranje DNA iz vezavne kolone) smo na vezavno kolono odpipetirali 50 µL predhodno na 65 °C segrete Elution Solution in centrifugirali 1 minuto pri 12.000 g ter postopek ponovili še enkrat, tako da smo pridobili 100 µL eluata. Nato smo vsebino v mikrocentrifugirki (tj. eluat, ki vsebuje čisto glivno DNA) shranili na -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.8.1 Pomnoževanje izolirane DNA s PCR

Izolirano glivno DNA posameznih morfotipov smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Z reakcijo smo pomnoževali ITS (ang. Internal Transcribed Spacer) odsek glivne DNA, za kar smo uporabili glivno specifični par univerzalnih oligonukleotidnih začetnikov ITS1-f/ITS4 in Taq polimerazo. Raztopine za PCR so bile pripravljene v skladu z Mravlje in sod. [101], prav tako pogoji PCR. Po izvedeni PCR smo uspešnost reakcije preverili z elektroforezo na agaroznem gelu.

3.8.2 Sekvenciranje

Sekvenciranje pridobljenih pomnožkov glivne DNA je bilo opravljeno pri komercialnem ponudniku Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska).

3.8.3 Identifikacija nukleotidnih zaporedij

Pridobljena nukleotidna zaporedja (sekvence) smo obdelali s programom MEGA-X in poiskali najboljša ujemanja v bazi NCBI GenBank s pomočjo spletnega orodja BLAST®.

3.9 Statistična analiza

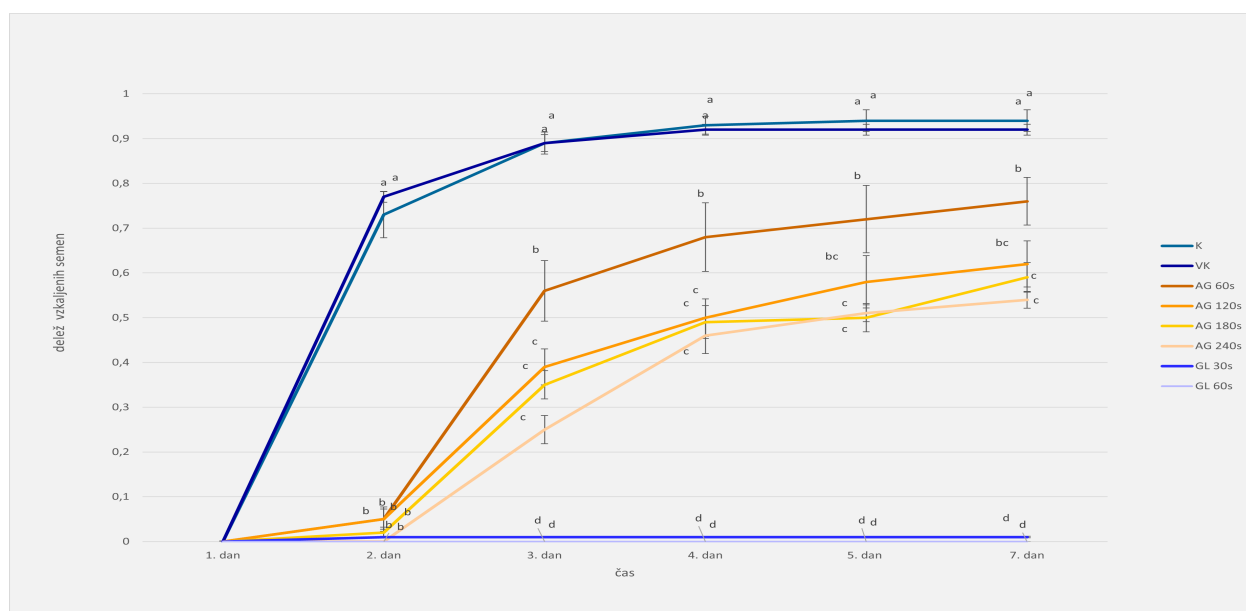
Pridobljene rezultate smo analizirali s programskim kompletom Statistica (Statsoft 7.0.61.0 EN) in MS Excel 2013. Statistično značilne razlike smo izračunali s pomočjo programa enosmerne analize variance (ANOVA) s Tukeyevim post-hoc testom. Grafe smo narisali v Excelu.

4 Rezultati z razpravo

4.1 Vpliv hladne plazme na kaljivost semen

Na grafu (Slika 5) je prikazan delež vzkljelih semen v odvisnosti od časa oziroma glede na zaporedni dan spremljanja kalitve. Primerjali smo kaljivost semen med različnimi obdelavami semen s HP. Posamezne obdelave so prikazane z različnimi barvami.

Na Sliki 5 lahko vidimo, da sta se kontrolni skupini statistično značilno razlikovali od vseh drugih obdelav tekom celotnega poskusa. Prvi dan tatarska ajda ni kalila. Drugi dan se obdelave s HP med seboj niso statistično razlikovale. Tretji in četrti dan opazovanja ter vse do konca poskusa se neposredni (*glow*) obdelavi statistično močno razlikujeta od drugih obdelav, saj je tekom poskusa pri 30-sekundni neposredni obdelavi vzklilo le eno seme, pri 60-sekundni neposredni obdelavi pa ni vzklilo nobeno seme. Od preostalih obdelav se tretji in četrti dan statistično razlikuje tudi najkrajša posredna (*afterglow*) obdelava. Posredne obdelave za 120, 180 in 240 sekund se tretji in četrti dan poskusa med seboj statistično ne razlikujejo. Peti in tudi zadnji dan poskusa opazimo, da je kaljivost semen 120-sekundne posredne obdelave statistično podobna tako 60-sekundni kot 180- in 240-sekundni posredni obdelavi, druge obdelave pa so v enakem statističnem razmerju kot prej. Na koncu poskusa kaljivost nobene izmed obdelav s HP ni bila primerljiva s kaljivostjo kontrolnih skupin, pri katerih je vzklilo dobrih 90 % vseh semen. Največjo kaljivost semen izmed semen, obdelanih s HP, je s približno 75-odstotno kaljivostjo semen imela 60-sekundna posredna obdelava.



Slika 5: Kaljivost semen tatarske ajde (povprečje \pm standardna napaka, $n = 100$ semen). Različne črke nad stolpci označujejo statistična razmerja med obdelavami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test).

Večina raziskav na področju vpliva tehnologij HP na kalitev je pokazala, da ima HP pozitiven učinek na kalitev semen. Mnogo avtorjev opaža, da je tehnologija HP pozitivno vplivala na rast in kaljivost semen pri različnih raziskovanih rastlinskih vrstah, kar nakazuje, da obdelava semen s HP spodbuja kalitev, poveča odpornost semen in močno zavira rast patogenov, saj zmanjša površinsko kontaminiranost semen s patogenimi mikroorganizmi [102–112]. Naši rezultati niso skladni s temi raziskavami, saj v našem poskusu nismo ugotovili, da bi izpostavitve semen HP prispevala k povečanju kaljivosti semen tatarske ajde, temveč jo je zmanjšala. Kaljivosti kontrolnih skupin se je najbolj približala 60-sekundna posredna obdelava, vendar je tudi ta bila bistveno manjša.

Prej navedene študije [102–112] so se osredotočale na najbolj pogoste in množično gojene kulturne rastline, kot so pšenica, koruza, ječmen, soja in čičerika, pri katerih so predvsem krajše obdelave s HP doprinesle k povečani kaljivosti semen [106, 108, 113, 114]. V nekaterih primerih HP ni imela vpliva na kaljivost semen [46], nekateri avtorji pa tudi niso uspeli pokazati pozitivne zveze med obdelavami s plazmo in kaljivostjo semen [105, 115]. Kljub povečini pozitivnim učinkom krajših obdelav s HP je znano, da daljše obdelave povzročijo opazno zmanjšanje v kaljivosti obdelanih semen [46, 102, 108, 113, 114]. Vpliv plazme na semena se spreminja tudi glede na vrsto uporabljene plazme. Filatova in sod. [105, 115] so pri svojem poskusu semena stročnic in drugih posevkov (*Lupinus angustifolius*, *Galega virginiana*, *Melilotus albus* in *Glycine max*) obdelali s 5,28 MHz RF zračno plazmo in elektromagnetnim poljem ter opazili tako pozitivne kot negativne vplive plazme na semena za razliko od nas, ki smo opazili le negativne učinke plazme. Te raziskave potrjujejo, da je vpliv HP na kaljivost semen odvisen od vrste rastlinskih semen, vrste uporabljene plazme in časa izpostavitve semen plazmi. Pomembno pa je omeniti, da kaljivost semen ni odvisna le od genetskih dejavnikov, temveč tudi od okoljskih dejavnikov, kot so podnebje, prst in količina dostopne vode [103].

Vpliv HP na semena navadne oziroma tatarske ajde so, po našem znanju, raziskovali le Šera in sod. [116], Lampe [117] in Mravlje in sod. [101]. Šera in sod. [116] so raziskovali učinke HP na semenih navadne ajde, pri čemer so našli manjše pozitivne učinke na kaljivost semen pri 180-sekundni obdelavi z GlidArc nizkotemperaturno zračno plazmo pri atmosferskem tlaku ter močno negativne učinke s SDBD (ang. *Surface Dielectric Barrier Discharge*) plazmo pri enako dolgi obdelavi. Vse daljše obdelave so imele negativne učinke na kaljivost semen navadne ajde, kar nakazuje, da je ajda zelo občutljiva na obdelavo s plazmo. Raziskava avtorja Lampe [117] je obrodila rezultate, podobne našim, saj je potrdila le negativen učinek HP na kaljivost semen navadne ajde. Prav tako so Mravlje in sod. [101] opazili le negativen vpliv HP na kalitev semen navadne in tatarske ajde. Obe raziskavi sta pri tem izpostavili, da je bila pri krajših obdelavah s HP (15 – 45 s) kaljivost semen navadne oziroma obeh vrst ajde primerljiva s kontrolo skupino, pri daljših obdelavah (90 s in 120 s) pa se je kaljivost močno zmanjšala. Ključna razlika med raziskavama Mravlje in sod. [101] ter Lampe [117] (in tudi našo raziskavo) in raziskavo Šera in sod. [116] je, da so slednji uporabili šibkejše, atmosferske plazme, mi, Mravlje in sod. [101] in Lampe [117] pa smo uporabili močnejše, nizkotlačne plazme. Mravlje in sod. [101] so opazili tudi, da je navadna ajda bolj občutljiva na obdelavo s HP kot njena sorodna vrsta, kar pripisuje dejstvu, da je tatarska ajda bolj bogata s polifenoli. Tatarska ajda izvira iz višjih nadmorskih višin in vsebuje večje koncentracije snovi, ki ščitijo pred UV sevanjem, zaradi česar je morda bolj odporna proti UV sevanju pri obdelavi s HP.

Pomembno je omeniti, da so avtorji pri vseh doslej navedenih raziskavah uporabljali neposredno (*glow*) izpostavitev plazmi. Primerjava posredne in neposredne izpostavitve materiala plazmi je še dokaj neraziskano področje plazemske tehnologije. Po naših podatkih so Starič in sod. [1] doslej edini preučevali učinke posredne in neposredne izpostavitve semen kisikovi plazmi, in sicer so primerjali dve različni vrsti zimskih žit (Apache in Bezostaya 1) pri neposredni obdelavi s plazmo z vhodno močjo 200 W za 5 oziroma 30 sekund ter pri posredni obdelavi s plazmo z vhodno močjo 600 W za 3 oziroma 5 sekund. Njihovi rezultati so pokazali, da se je semenski ovoj pri neposredni izpostavitvi nanostrukturno spremenil, pri posredni izpostavitvi pa ne, kar pripisujejo prisotnosti ionov pri neposredni izpostavitvi, saj le-ti povzročajo poškodbe površine semen; pri posredni izpostavitvi pa na semena vplivajo le dlje obstojne reaktivne kemijske zvrsti [1, 27]. Ugotovili so tudi, da je 3-sekundna posredna izpostavitev semen žita Apache povečala njihovo kaljivost, pri vseh ostalih izpostavitvah semen žita Apache ter pri vseh izpostavitvah semen žita Bezostaya 1 pa so opazili zmanjšano kaljivost semen, kar je večinoma v skladu tudi z našimi rezultati.

Iz pridobljenih rezultatov lahko našo prvo hipotezo, da bo obdelava semen s HP vplivala na njihovo kaljivost, potrdimo, saj je HP negativno vplivala na kaljivost semen tatarske ajde. Drugo hipotezo, da bo kaljivost semen po krajši obdelavi s HP primerljiva ali boljša kot v kontrolni skupini, pri daljših obdelavah pa manjša, smo delno potrdili, saj so tako krajše kot daljše obdelave zmanjšale kaljivost semen tatarske ajde. Potrdimo lahko tudi tretjo hipotezo, da bodo med neposredno in posredno obdelavo semen s HP razlike, saj so bila semena, obdelana na posreden način, bolj kaljiva od tistih, obdelanih na neposreden način. Da bi še boljše opredelili vpliv HP na semena tatarske ajde, bi semena po obdelavi s HP lahko opazovali še pod elektronskim mikroskopom, kakor so to storili Starič in sod. [1]. Glede na naše rezultate uporaba HP za izboljšanje kaljivosti ne da želenih rezultatov, zato bi bila uporaba HP na tatarski ajdi za ta namen brez pomena.

4.2 Vpliv hladne plazme na dekontaminacijo gliv

Plazma je razširjena alternativna oblika sterilizacije površin [118]. Pri obdelavi s hladno plazmo se ustvari veliko antimikrobnih zvrsti, kot so ozon, enoatomarni kisik, prosti radikali (superoksid, dušikov oksid, itn.) in ultravijolično sevanje [73]. Sprva je veljalo, da ima ključno vlogo pri sterilizaciji in dekontaminaciji površin UV sevanje [119], kasneje pa so v raziskavah dokazali tudi vpliv kisikovih atomov v vlogi oksidantov [120]. Izvedenih je bilo več študij, pri katerih so s hladno-plazemsko obdelavo pri atmosferskem tlaku poskušali zmanjšati okuženost različnih semen z glivami. Ugotovili so, da se z daljšim časom obdelave število prisotnih gliv zmanjša [106, 108, 121]. Podobno so dokazali v raziskavi, kjer so preučevali vpliv neposredne izpostavitve semen plazmi pri nizkem tlaku [101].

V naši raziskavi smo proučevali vpliv posredne (*afterglow*) in neposredne (*glow*) izpostavitve semen HP pri nizkem tlaku. Pri posredni izpostavitvi se je biološki material nahajal v sosednji komori kot plazma, zaradi česar ni bil v neposrednem stiku s kratko-živečimi (in bolj reaktivnimi) plazemskimi zvrstmi, prav tako pa je bil izpostavljen nižji temperaturi. Pri neposredni izpostavitvi se je biološki material nahajal v isti komori, kot je bila ustvarjena plazma, s čimer je prišel v kontakt z vsemi plazemskimi zvrstmi, hkrati pa je bil izpostavljen višji temperaturi [122]. Kisikova plazma je sama po sebi rožnate barve, mi pa smo opazili še belo in modrikasto barvo. To je rezultat izhajanja vode iz semena in razpadanja vodnih molekul na H in OH, ki pri tvorjenju plazme oddajajo drugačno svetlobo.

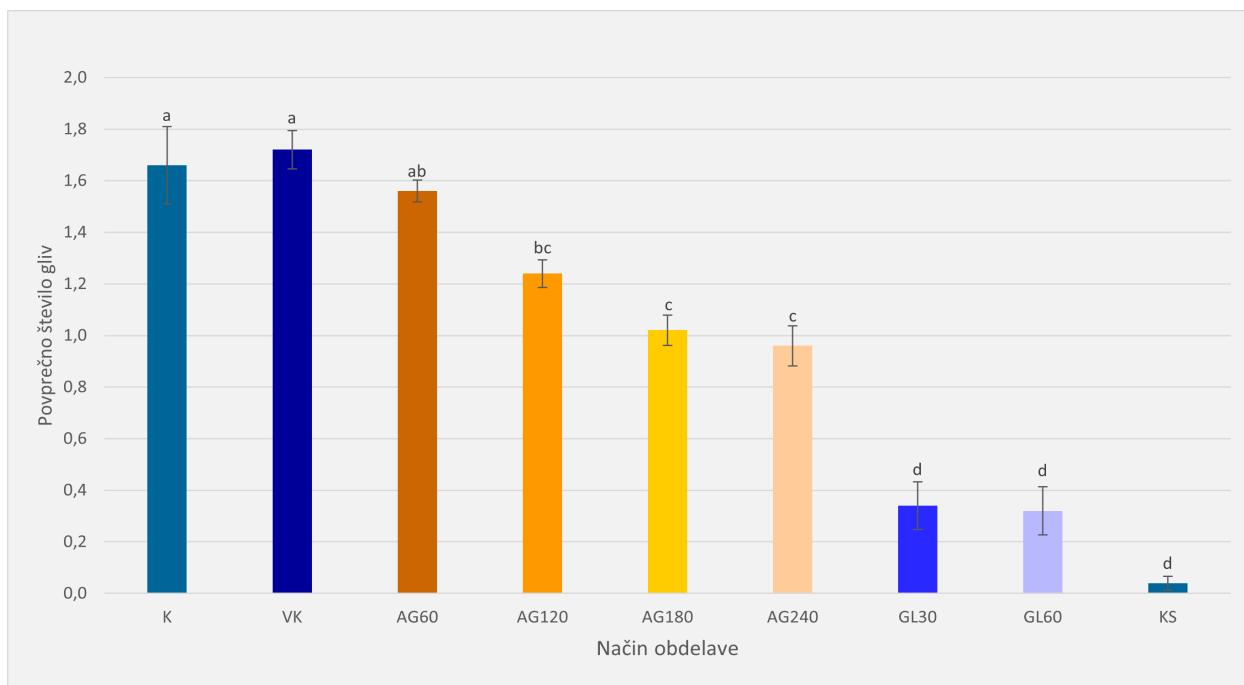
Povprečno število morfotipov pri posredni izpostavitvi se je po 60-sekundni obdelavi zmanjšalo za 6 %, po 120-sekundni za 25 %, po 180-sekundni za 39 %, po 240-sekundni pa za 42 % v primerjavi s kontrolno skupino. 120-, 180- in 240-sekundne posredne obdelave se statistično značilno razlikujejo od kontrolne skupine in so zmanjšale povprečno število gliv, prisotnih na semenih. Potrdili smo hipotezo, da se z daljšanjem obdelave s HP zmanjšuje število gliv na semenih tatarske ajde, kar se tudi sklada s prej omenjenimi raziskavami drugih avtorjev.

Pri neposredni obdelavi s HP se je po 30 sekundah izpostavitve število morfotipov zmanjšalo za 8 %, po 60 sekundah pa za 81 %. Tu se povprečno število gliv na seme ni močno razlikovalo glede na čas obdelave, kot smo predvideli na začetku. Neposredna obdelava semen s plazmo se je izkazala za podobno učinkovito kot površinska sterilizacija semen s H_2O_2 .

Iz grafa (Slika 6) je razvidno, da je neposredna obdelava semen tatarske ajde s HP učinkovitejša od posredne, saj dosežemo večjo stopnjo dekontaminacije v krajšem času. To lahko pripišemo večji izpostavitvi UV sevanju pri neposredni obdelavi, saj sevanje poškoduje genetski material (DNA) gliv. Učinek sterilizacije je bil zaradi uporabe kisikove plazme še hitrejši, saj so nastale ROS pospešile odnašanje celic mikrobov. S tem se je povečala količina UV fotonov, ki so lahko dosegli mikrobsko DNA, in jih uničili [66]. Pri posredni izpostavitvi semena niso bila tako zelo izpostavljena UV sevanju, dosegle pa so jih le dolgo-živeče plazemske zvrsti.

Učinkovitost obdelave semen s hladno plazmo je odvisna od učinkovanja UV fotonov, to pa je odvisno od strukture obdelovanega materiala. Površina semen je neenakomerno nagubana in posledično različno debela, kar ne omogoča povsem homogene sterilizacije [123]. Semena so bila tekom obdelave na mrežasti kovinski podlagi, ki je ponekod onemogočala stik s plazmo (in posledično ROS ter UV sevanjem). Za bolj homogeno obdelavo bi lahko semena rotirali, tako da bi bila površina semena enakomerno izpostavljena okolju.

Pri daljših izpostavitvah se vzorci bolj segrejejo, kar lahko vpliva na biološko sestavo semen. Segrevanje vzorca se zgodi zaradi interakcij prostih radikalov s substratom. Raziskave so pokazale, da povišana temperatura pospeši sterilizacijo, saj pripomore k degradaciji glivnih celic [101].

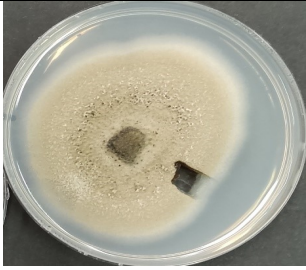
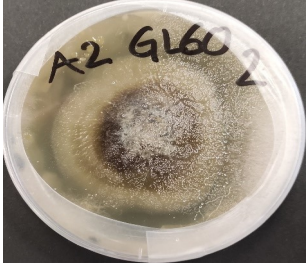


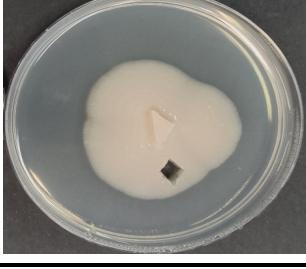


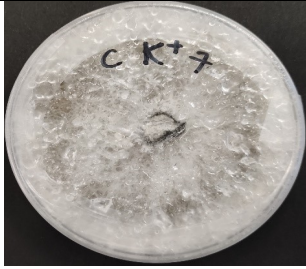
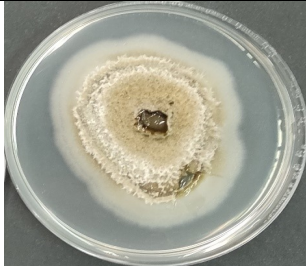



Slika 6: Povprečno število glivnih morfotipov na seme pri različnih obdelavah semen tatarske ajde s hladno plazmo. Različne črke predstavljajo statistično pomembne razlike med obdelavami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test).

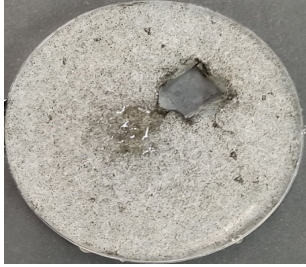
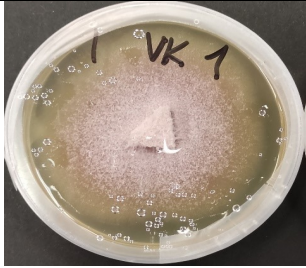
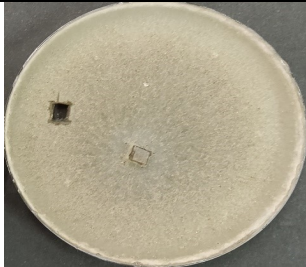
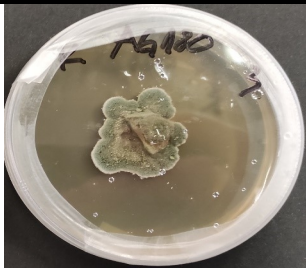


4.3 Raznolikost glivnih morfotipov in identifikacija izoliranih gliv

Na 90 gojiščih je skupno zraslo 436 gliv, ki smo jih razdelili na 16 morfotipov glede na njihove morfološke lastnosti (obarvanost zgoraj in spodaj, tekstura površine). Najdeni morfotipi so označeni s črkami abecede in predstavljeni v Preglednici 2, podskupine pa so označene še s pripadajočo številko (npr. A1).

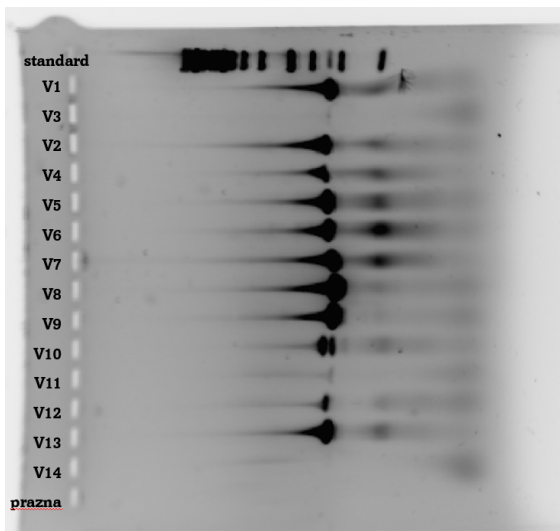
Preglednica 2: Opis glivnih morfotipov, izoliranih iz semen tatarske ajde

Morfotip	Obarvanost (zgoraj)	Obarvanost (spodaj)	Površina in tekstura	Fotografija
A1	bledo zelena	zeleni kolobarji	droben puh	
A2	svetlo rjava	svetlo zelena	gladka z drobnim puhom	
A3	svetlo rjava	zelena	zrnata	
A4	svetlo zelena	zelena	gost bel puh	
B	bela	bela	gladka	

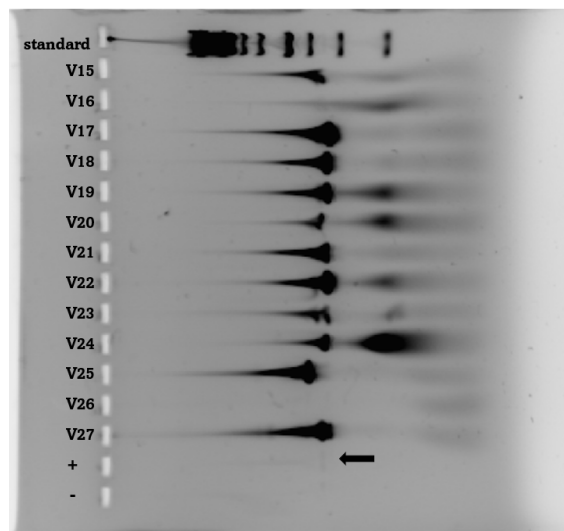
Morfotip	Obarvanost (zgoraj)	Obarvanost (spodaj)	Površina in tekstura	Fotografija
C	bela	bela	nitkasta	
D	zelena z belim robom	temno zelena	droben puh	
E	bela	rožnata	tanke nitke	
F	bela	oranžna	droben puh	
G	bela s črnimi pikami	svetlo rumena	droben puh	

Morfotip	Obarvanost (zgoraj)	Obarvanost (spodaj)	Površina in tekstura	Fotografija
H	bela z drobnimi črnimi pikami	bela	zasede celotno posodo, mrežasta, puhasta	
I	bela prekrita s puhom	vijolična	puhasta	
J	svetlo rjava	zelena	prekrita z nitkami	
K	temno zelena z belim robom	bela	rahlo zrnata	
X	svetlo rjava	svetlo rjava	gladka sluzasta	
Y	rožnata	rožnata	gladka sluzasta	

Izolirali smo po dva različna vzorca vsakega morfotipa ter jih vzgojili do čistih kultur. Podvajanje vzorcev je služilo natančnejšemu določanju morfotipov, saj sta se enaki kulturi pojavili neodvisno druga od druge. V primeru, da se morfotip ni nikjer ponovil, smo izolirali le ta vzorec. Na novo zraslo glivo smo strli v tekočem dušiku, izolirali glivno DNA ter jo pomnožili s PCR reakcijo. Uspešnost PCR reakcije smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Da so rezultati elektroforeze verodostojni in pravilni, smo poleg naših vzorcev v napravo za elektroforezo vstavili tudi standard (velikostno lestvico), negativno kontrolo, ki je v našem primeru bil vzorec s PCR mešanico, v katerega smo namesto DNA dali avtoklavirano destilirano vodo, in pozitivno kontrolo, ki je zanesljivo vsebovala DNA znane glive (na Sliki 8 je označena s puščico; lisa je slabo vidna, ker smo vzorec preveč redčili). Pred nanosom vzorcev na gel smo vanj dodali etidijev bromid, ki se vrinja v verige DNA in posledično omogoča vizualizacijo DNA pod UV lučjo (Slika 7 in Slika 8). Odebeljena lisa na velikostnem območju med 600 in 800 bp pomeni, da so bili ti deli DNA pomnoženi s PCR reakcijo, kar pomeni, da je bila PCR reakcija uspešna, vzorec pa je bil veljaven. Veljavne vzorce smo poslali na sekvenciranje.



Slika 7: Rezultati elektroforeze vzorcev 1-14. Na vrhu je standardna kontrola. Avtorja: Barbara Makovec in Rok Sušnik, 2022.



Slika 8: Rezultati elektroforeze vzorcev 15-27 ter pozitivna in negativna kontrola. Avtorja: Barbara Makovec in Rok Sušnik, 2022.

Iz pridobljenih sekvenc (ki so nam jih analizirali v podjetju Macrogen na Nizozemskem) smo s spletnim orodjem Nucleotide BLAST® določili glivno vrsto. V Tabeli 3 so prikazani rezultati genetske identifikacije gliv. Za večino izolatov je prikazan po en najboljši zadetek. Glive, za katere nismo uspeli pridobiti sekvence ali pa je bilo sekvenciranje neuspešno, smo določili glede na njihove morfološke značilnosti. Število glivnih izolatov oziroma določenih morfotipov se bistveno ne razlikuje od raziskave Mravlje in sod. [101], ki je s podobno uspešnostjo izolirala in identificirala 25 različnih morfotipov iz semen tatarske ajde.

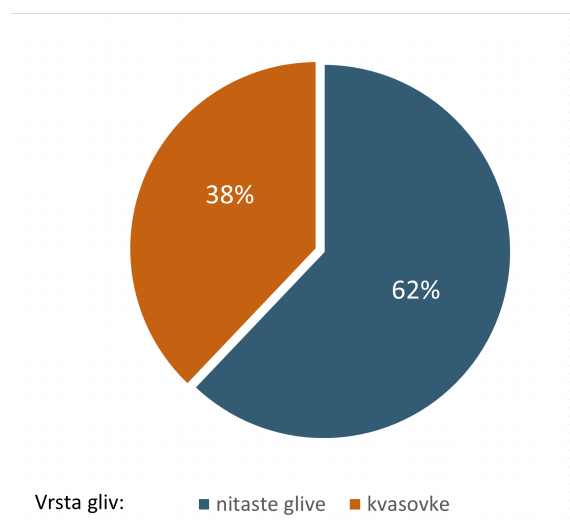
Preglednica 3: Najustreznejši BLAST® primerek izoliranih gliv iz semen tatarske ajde. Tabela vsebuje interno oznako morfortipa, oznako pripadajočega PDA gojišča, najustreznejši BLAST primerek ter delež ujemanja s primerjanim vzorcem (v %). Zraven je zapisana pristopna številka posamezne glive in ime glivne vrste ter uvrstitev v pripadajočo taksonomsko skupino. Vrste, ki jih nismo mogli določiti s sekvenciranjem in orodjem BLAST®, smo določili na podlagi morfoloških značilnosti.

GLIVA			Najbližji BLAST zadetek	Ujemanje (%)	Pristopna št.	Določena glivna vrsta	Red
Oznaka morfortipa	Oznaka plošče	Oznaka vzorca					
A1	GL60 8	V17	<i>Didymella sp.</i> isolate LT132	96.72 %	JQ388925.1	<i>Didymella sp.</i>	Pleosporales
A2	GL60 2	V1	<i>Montagnula opulenta</i>	96.72 %	JQ388925.1	<i>Montagnula opulenta</i>	Pleosporales
A3	AG180 9	V11	/	/	/	<i>Alternaria sp.</i>	Pleosporales
A3	AG60 6	V4	<i>Exserohilum turcicum</i>	91.08 %	NR_163537.1	<i>Exserohilum turcicum</i>	Pleosporales
A4	AG60 6	V5	<i>Bipolaris sp.</i> isolate NPL5H	99.10 %	MK409133.1	<i>Bipolaris sp.</i>	Pleosporales
A4	AG240 7	V20	<i>Bipolaris sp.</i> isolate NPL5H	99.02 %	MK409133.1	<i>Bipolaris sp.</i>	Pleosporales
B	K+ 1	V3	/	/	/	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Dothideales
C	K+ 7	V6	<i>Arthrinium arundinis</i> strain CS1_14	98.92 %	MK460870.1	<i>Arthrinium arundinis</i>	Xylariales
D	GL30 8	V7	<i>Didymella sp.</i> isolate QS43	98.70 %	MH257407.1	<i>Didymella sp.</i>	Pleosporales
D	AG240 4	V9	<i>Cladosporium sp.</i> isolate Su-XI-1	99.28 %	MF475929.1	<i>Cladosporium sp.</i>	Cladosporiales

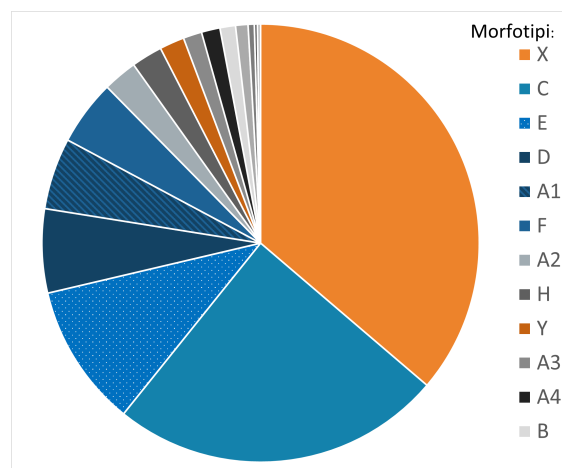
GLIVA			Najbližji BLAST zadetek	Ujemanje (%)	Pristopna št.	Določena glivna vrsta	Red
Oznaka mor- fotipa	Oznaka plošče	Oznaka vzorca					
E	K+ 4	V19	<i>Botrytis cinerea</i> isolate OAS-07	98.82 %	MW308544.1	<i>Botrytis cinerea</i>	Helotiales
E	KS 9	V25	<i>Phlebia sp.</i> strain FeC167	99.58 %	MW447097.1	<i>Phlebia sp.</i>	Polyporales
F	VK 3	V18	<i>Epicoccum nigrum</i> strain ISK3_1	99.82 %	MK460963.1	<i>Epicoccum nigrum</i>	Pleosporales
F	K+ 10	V22	<i>Epicoccum nigrum</i> strain A54	99.62 %	KT898620.1	<i>Epicoccum nigrum</i>	Pleosporales
G	AG180 8	V10	<i>Pithomyces chartarum</i>	98.63 %	HQ026491.1	<i>Pithomyces chartarum</i>	Pleosporales
G	VK 1	V13	<i>Aspergillus sp.</i> 085241B	98.93 %	JF312217.1	<i>Aspergillus sp.</i>	Eurotiales
H	K+ 6	V14	/	/	/	<i>Rhizopus sp.</i>	Mucorales
I	AG240 9	V21	<i>Fusarium proliferatum</i> strain BIONCLF	99.26%	MH591759.1	<i>Fusarium proliferatum</i>	Hypocreales
I	VK 1	V24	<i>Fusarium sp.</i> isolate FuVe	99.39 %	MW426276.1	<i>Fusarium sp.</i>	Hypocreales
J	VK7	V12	<i>Sordaria sp.</i> E04	100.00 %	KC867279.1	<i>Sordaria sp.</i>	Sordariales
K	AG180 3	V15	<i>Penicillium brevicompactum</i>	99.82 %	LN809022.1	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Eurotiales
K	VK 9	V16	/	/	/	<i>Penicillium sp.</i>	Eurotiales
X	VK 2	V26	/	/	/	<i>Hannaella sp.</i>	Tremellales
Y	VK 4	V27	<i>Rhodotorula glutinis</i>	98.99 %	LC413754.1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Sporidiobolales

4.3.1 Identifikacija gliv in vpliv hladne plazme nanje

Skoraj dve tretjini (62 %) vseh identificiranih gliv spada med nitaste glive, preostalih 28 % pa uvrščamo med glive kvasovke (Slika 9). Identificirali smo dva različna morfortipa gliv kvasovk, med nitaste glive pa smo uvrstili preostalih 14 morfortipov (Slika 10).



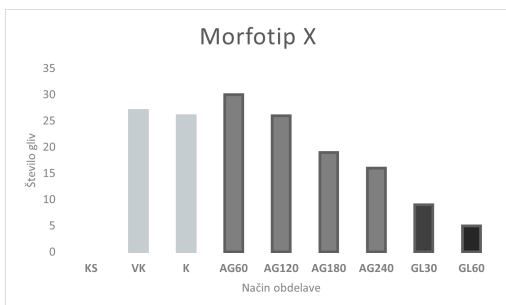
Slika 9: Delitev na nitaste glive in kvasovke.



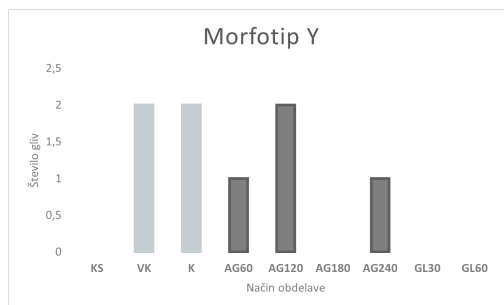
Slika 10: Delež glivnih morfortipov, ki so se pojavili na okuženih semenih.

Najpogostejši morfortip (X), ki je predstavljal 36 % vseh gliv smo identificirali kot glivo kvasovko, vrste *Hannaella sp.* Zaradi neuspešnih rezultatov sekvenciranja smo identifikacijo izvedli na podlagi morfoloških značilnosti ter jih primerjali s predhodnimi raziskavami [101, 117]. Vrsto *Hannaella sp.* najdemo na površinah listov različnih rastlin, vključno z rižem, pšenico in sadnimi drevesi. So epifiti, kar pomeni da naseljujejo površinski del organizmov [124]. Iz grafa (Slika 11) je razvidno, da se je okužba s to vrsto zmanjševala z daljšim časom obdelave, tako pri posrednem kot tudi pri neposrednem načinu. Najnižjo stopnjo okuženosti semen (80 % manjšo) v primerjavi s kontrolo smo dosegli pri neposredni obdelavi za 60 sekund. Kljub temu nam glivne vrste ni uspelo popolnoma zatreti. Mravlje in sod. [101] so to vrsto našli pri semenih navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*). Tu se je okuženost z daljšim časom neposredne izpostavitve plazmi prav tako zmanjševala, a so bila nekatera semena tudi po 120 sekundah neposredne obdelave s HP kontaminirana. Potrebne bi bile nadaljnje raziskave vpliva daljše izpostavitve semen tatarske ajde direktni plazmi in vpliv na okuženost semen z glivo *Hannaella sp.*

Morfotip Y je predstavljal 1,8 % vseh gliv in smo ga določili kot glivo vrste *Rhodotorula glutinis*, red Sporidiobolales, deblo prostotrosnice. Je aerobna gliva kvasovka in epifit, na večini gojišč pa je značilno rožnate barve. V naravi jo lahko najdemo v zemlji, zraku ter morski vodi. Je najpogosteje najdena gliva na rokah zdravstvenih delavcev [125] in je hkrati patogena. Pri pacientih z oslABLJENIM imunskim sistemom lahko povzroči blago okužbo s fungemijo [126]. Je zelo odporna na fungicidna sredstva, dokazano uspešno sredstvo proti njej pa je amphotericin B [127]. Raziskave kažejo, da je lahko predhodna obdelava z *Rhodotorula glutinis* učinkovito sredstvo za preprečevanje razvoja *Penicillium expansum* in *Botrytis cinerea* na jabolkih in pomarančah, saj deluje kompetitivno s preostalima glivama za prostor in hranilne snovi [128], kar potrjuje tudi naša raziskava.



Slika 11: Število gliv vrste *Hannaella sp.* (morfotip X) pri posamezni obdelavi s HP.

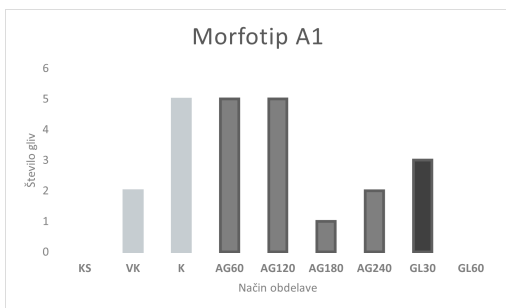


Slika 12: Število gliv vrste *Rhodotorula glutinis* (morfotip Y) pri posamezni obdelavi s HP.

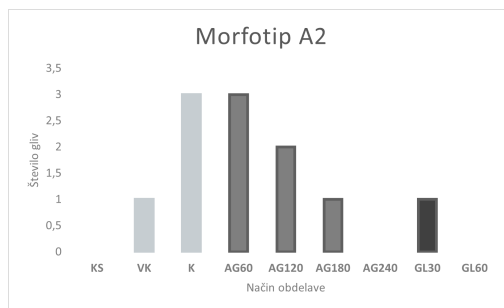
Morfotip A smo zaradi podobnih morfoloških značilnosti razdelili v štiri podskupine (A1, A2, A3 in A4).

Morfotip A1 smo določili za vrsto *Didymella sp.*, ki je predstavljala 5 % vseh gliv. Spada v deblo zaprtotrosnic, red Pleosporales, natančneje v družino Didymellaceae. Rod *Didymella* je razširjen pri poljščinah in okrasnih rastlinah, najdemo pa ga tudi pri divjih rastlinah. Navadno jih najdemo v mrtvih ali živečih nadzemnih predelih zelnatih in olesenelih rastlin. Nekatere vrste so lahko patogene, za okužbo pa so še posebno dovzetne rastline z nizko vitalnostjo. Bolezen lahko povzroči nekrozo stebela in odmiranje vejic [129]. Učinki posredne plazemske obdelave so se pojavili samo pri daljših, 180- in 240-sekundnih izpostavitvah. Stopnja okuženosti se je pri 30-sekundni neposredni obdelavi zmanjšala, po 60 sekundah obdelave pa se glive vrste *Didymella sp.* niso več razvile (Slika 13).

Morfotip A2 smo določili za glivo *Montagnula opulenta*, ki je predstavljala 2,5 % vseh gliv. Spada v deblo zaprtotrosnice, red Pleosporales, natančneje v družino Montagnulaceae. Za to vrsto je značilna debela želatinasta ovojnica okoli spor, ki so prekrite z izrastki rjave do svetlo-rjave barve. Vrsto najpogosteje najdemo v travah in kladodah (preobraženih listih) kaktusov iz rodu *Opuntia* [130]. Raven okužbe semen s to glivo se je zmanjševala s časom. Po 240 s posredne obdelave oziroma po 60 s neposredne obdelave se gliva ni več razvila (Slika 14).



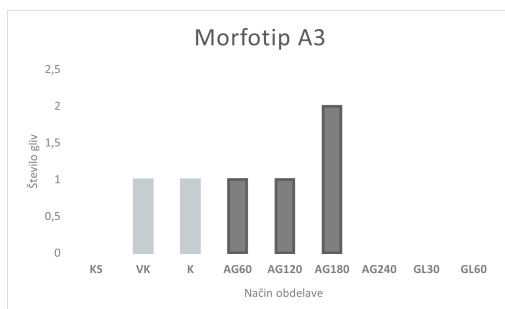
Slika 13: Število gliv vrste *Didymella sp.* (morfotip A1) pri posamezni obdelavi s HP.



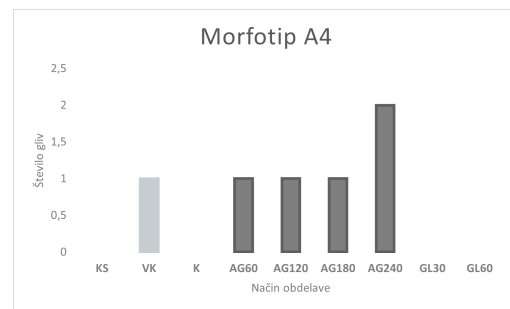
Slika 14: Število gliv vrste *Montagnula opulenta* (morfotip A2) pri posamezni obdelavi s HP.

Morfotip A3 smo po sekvenciranju določili za dve različni vrsti, *Exserohilum turcicum* in *Alternaria sp.*. Slednjega smo zaradi neuspešnega sekvenciranja določili glede na morfološke značilnosti. Obe vrsti spadata v deblo zaprtotrošnic, red Pleosporales. Morfotip A3 je predstavljal 1,3 % vseh gliv. Vrsta *Exserohilum turcicum* je patogena in povzroča listno pegavost koruze, kar močno vpliva na pridelavo koruze po vsem svetu, posebno na območjih z visoko vlažnostjo. Med okužbo rastline izloča nekatere proteine in tako z različnimi mehanizmi uniči imunski sistem rastline [131]. Vrsta *Alternaria sp.* povzroča tudi črno listno pegavost in druga obolenja listov rastlin. Prav tako pa izloča mikotoksine, ki lahko negativno vplivajo na zdravje ljudi in pridelavo žit po celem svetu [132]. Na ti dve vrsti posredna plazemska obdelava do 240 s ni imela posebnega vpliva. Pri 240 s posredne obdelave kot tudi pri 30 s in 60 s neposredne obdelave pa se nista več pojavljali (Slika 15). Kljub majhnemu vzorcu (skupno 6 primerkov) lahko sklepamo, da daljša obdelava s HP onemogoči nadaljnji razvoj teh vrst gliv.

Morfotip A4 je bil identificiran za vrsto *Bipolaris sp.*, ki spada v deblo zaprtotrošnic, red Pleosporales, natančneje v družino Pleosporaceae. Ta vrsta je predstavljala 1,3 % vseh gliv. Povzroča listno pegavost na vrstah trave [133], pšenice [134] in koruze [135]. Glivne spore so vidne kot temno rjave pege na poškodbah obolelih listov [134]. Na glivo posredna obdelava s plazmo ni imela posebnega vpliva (Slika 16). Gliva se ni pojavila pri nobeni izmed neposrednih obdelav, a zaradi majhnega števila vzorcev tega morfotipa težko sklepamo dejansko učinkovitost obdelave s HP.



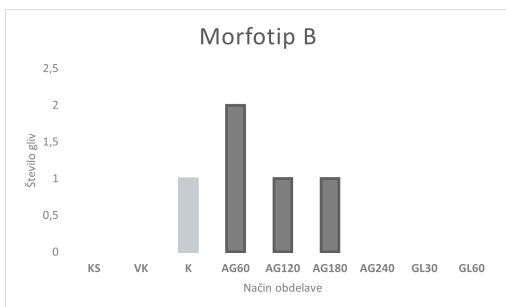
Slika 15: Število gliv vrst *Setosphaeria turcica* in *Alternaria sp.* (morfotip A3) pri posamezni obdelavi s HP.



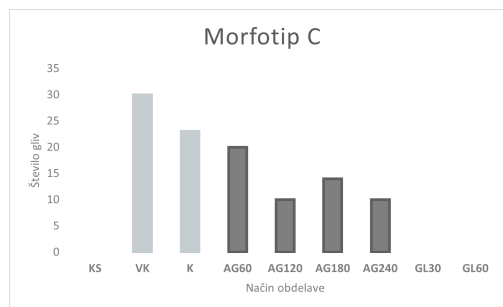
Slika 16: Število gliv vrste *Bipolaris sp.* (morfotip A4) pri posamezni obdelavi s HP.

Morfotip z oznako B je predstavljal 1,2 % vseh gliv. Tega morfotipa nam ni uspelo sekvencirati, a smo njegovo vrsto določili na podlagi morfoloških značilnosti, in sicer gre za glivo vrste *Aureobasidium pullulans* iz reda Dothideales. Zanj je značilen izgled podoben kvasovkam, najdemo pa jo lahko v zelo različnih okoljih, med drugim tudi na žitu ječmena [136]. V biotehnologiji se uporablja za proizvodnjo polisaharida pullulana in antimikotika aureobasidin A, v kmetijstvu pa kot sredstvo za biološko kontrolo. Je patogena in lahko povzroči okužbe pri ljudeh [137]. Vpliv obdelave s HP se je pokazal šele pri 240 s posredni izpostavitvi oziroma pri obeh neposrednih izpostavitvah (Slika 17), a zaradi majhnega vzorca težko sklepamo o učinkovitosti obdelave s HP glede na to vrsto.

Morfotip z oznako C je predstavljal 25 % vseh gliv in je druga najpogostejša najdena gliva. Identificirali smo jo za glivo vrste *Arthrinium arundinis*. Spada med nitaste glive, v red Xylariales. Za rod *Arthrinium* je značilna velika ekološka raznolikost. Predstavniki tega rodu so znani endofiti (tj. uspevajo znotraj rastline) rastlinskih tkiv in morskih alg [138], so pa tudi rastlinski patogeni, saj na primer vrsta *Arthrinium arundinis* povzroča pegavost zrn tatarske ajde [139] in ječmena [140], sorodna vrsta *Arthrinium sacchari* pa povzroča izgubo vlage pri pšenici [141]. Okuženost semen tatarske ajde s to vrsto pada z dolžino posredne izpostavitve, pri neposredni izpostavitvi pa se gliva ne pojavi (Slika 18). Sklepamo lahko, da je neposredna izpostavitvev HP učinkovit način dekontaminacije glive *Arthrinium arundinis*.



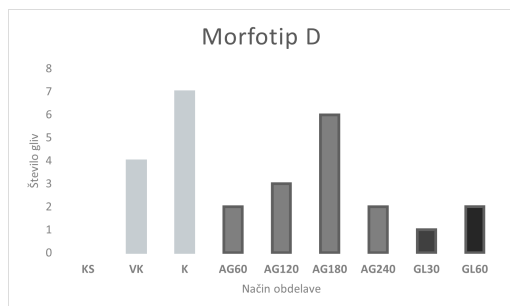
Slika 17: Število gliv vrste *Aureobasidium pollulans* (morfotip B) pri posamezni obdelavi s HP.



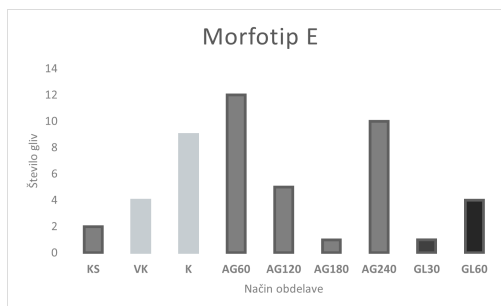
Slika 18: Število gliv vrste *Arthrinium arundinis* (morfotip C) pri posamezni obdelavi s HP.

Morfotip z oznako D (6,1 % vseh gliv) se je izkazal za dve različni vrsti, *Didymella sp.* in *Cladosporium sp.*. Obe spadata v razred Dothideomycetes. Predstavniki rodu *Didymella* so pogosti patogeni na bučevkah, kjer povzročajo pegavost [142], našli pa so jo tudi na semenih tatarske ajde [101]. Vpliva lahko na celotno rastlino (vključno s stebлом, listi in plodom), v primeru da izvira iz semena pa vpliva neposredno na sadike [142]. Sklepamo lahko, da obdelava semen s HP zmanjša kontaminacijo semen, in sicer je neposredna obdelava bolj učinkovita od posredne (Slika 19). Glive iz rodu *Cladosporium* pogosto najdemo na rastlinah in so značilne olivno zelene barve. Nekatere vrste so endofiti [143] ali rastlinski patogeni, druge pa so glivne zajedalke [144]. Večje količine glivnih spor, ki se prenašajo po zraku, lahko delujejo kot alergeni in močno vplivajo na ljudi z astmo in drugimi boleznimi dihal [145].

Tretji najpogostejši morfotip, ki je predstavljal 11 % vseh gliv je bil morfotip E. Vzorca, ki smo ju zaradi podobnih morfoloških lastnosti označili pod oznako E, spadata v različni debli. Prvi je vrste *Botrytis cinerea* (deblo zaprtotrosnice), drugi sodi v deblo prostotrosnice in je rodu *Phlebia*. Prva povzročča okužbe na nekaterem sadju [128], nanjo pa antagonistično deluje gliva vrste *Rhodotorula glutinis*. Vrsta *Botrytis cinerea* spada v red Helotiales. V kmetijstvu je znana pod imenom siva plesen in lahko okuži rastline pred ali po žetvi, pojavi pa se lahko tudi v semenih. Je patogena vrsta in lahko okuži poljščine, kot so koruza [146], pšenica [147] in ajda [148]. Vsebuje tudi mikoviruse oziroma mikofage, ki lahko okužijo druge glive [149]. Morfotip E se je edini pojavil v sterilizirani kontroli, in sicer dvakrat neodvisno. Iz rezultatov ni mogoče zanesljivo sklepati, ali je obdelava semen s HP vplivala na zatiranje okužbe z glivami (Slika 20).



Slika 19: Število gliv vrste *Didymella sp.* oziroma *Cladosporium sp.* (morfotip D), pri različnih obdelavah s HP.



Slika 20: Število gliv (morfotip E), ki smo jih identificirali kot vrsto *Botrytis cinerea* oziroma vrsto *Phlebia sp.*, pri različnih obdelavah s HP.

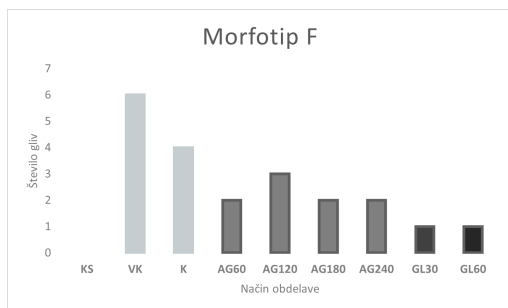
Glivo *Botrytis cinerea* (morfotip E) smo z 98.82 % gotovostjo identificirali na plošči K+ 4, kjer se pojavi skupaj z morfotipom Y (vrsta *Rhodotorula glutinis*) (Slika 21). Kot je razvidno iz Slike 21 so hife *Botrytis cinerea* (seme 1) zelo razrasle v primerjavi z drugimi glivami. Okoli semena (2), okuženega z glivo *Rhodotorula glutinis*, se rast hif vidno upočasni in ne preraste glive kvasovke (preraste pa ostale dosežene glive na petrijevki). Neposredna obdelava s HP je popolnoma uničila to glivno vrsto tako pri 30- kot 60-sekundni obdelavi (Slika 12).



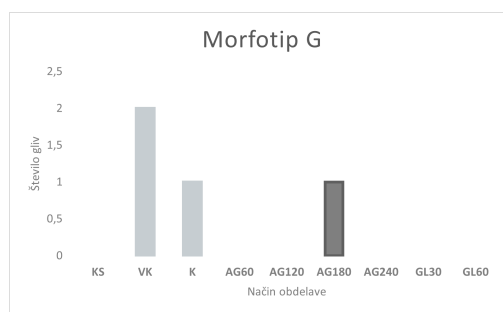
Slika 21: Gojišče K+ 4. Avtor: Rok Sušnik, 2021.

Morfotip F je bil identificiran za vrsto *Epicoccum nigrum*, ki spada v deblo zaprtotrosnice, red Pleosporales, natančneje v družino Didymellaceae. Predstavlja je 5 % vseh gliv. Lahko rastlinski patogen ali endofit in je široko razširjena vrsta glive, saj jo najdemo tako v zemlji kot v žitih in semenih koruze, v krompirju ter v breskvah. Zanj so značilni barviti oranžno-rjavi pigmenti, ki se lahko uporabijo kot protiglivna sredstva proti drugim patogenim glivam, kot je *Alternaria solani* [150]. Deluje kot biokontrolno protiglivno sredstvo proti rjavi gnilobi v koščičastem sadju, ki jo povzročata glivi *Monilinia laxa* in *Monilinia fructigena* [151]. Pri obdelavi semen s HP stopnja okuženosti pade, a razlike med časi posredne obdelave niso očitne. Neposredna obdelava se je izkazala za uspešnejšo, a tudi tu nismo uspeli eliminirati vseh okužb s to glivo, kot je razvidno iz grafa (Slika 22).

Z isto oznako morfotipa (G) smo označili dve oziroma tri različne vrste; prva je *Pithomyces charatrum*, druga pa je zaradi neuspešnega sekvenciranja bila določena morfološko, in sicer gre lahko za glivo vrste *Aspergillus sp.* ali *Penicillium sp.* — za podrobnejšo opredelitev vrste bi morali opazovati spore tega vzorca pod mikroskopom. Vse vrste spadajo v deblo zaprtotrosnice, razred Pezizomycetes. Skupaj so predstavljale 0,92 % vseh gliv. Za ta razred so značilne posebne strukture valjaste oblike, iz katerih izpuščajo spore [152]. Poleg kontrole se ta morfotip pojavi le enkrat, in sicer pri posredni obdelavi za 180 s (Slika 23).



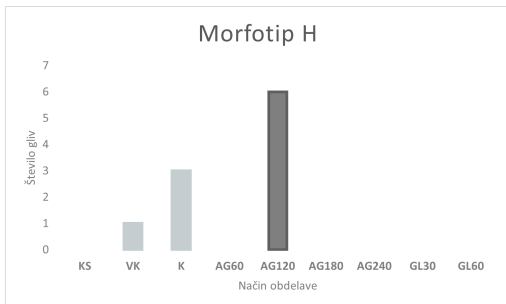
Slika 22: Število gliv vrste *Epicoccum nigrum* (morfotip F) pri posamezni obdelavi s HP.



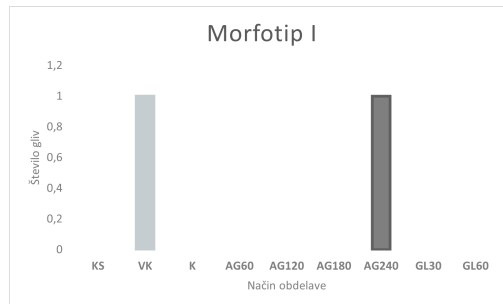
Slika 23: Število gliv vrste *Pithomyces charatrum* oziroma *Aspergillus sp.* ali *Penicillium sp.* (morfotip G) pri različnih obdelavah s HP.

Morfotip H smo identificirali za glivo vrste *Rhizopus sp.*, predstavljala je 2,3 % vseh gliv. Najdemo jo v zemlji, različnih sadjih in iztrebkih živali. Je patogena, pri rastlinah lahko povzroči gnilobo, pri ljudeh pa boleznih dihal [153]. Morfotip se poleg kontrole pojavi le pri 120 s posredni obdelavi in to v največjem številu v primerjavi z drugimi obdelavami (Slika 24).

Z oznako morfotipa I smo določili glivo vrste *Fusarium sp.*, eden od vzorcev pa se je izkazal za vrsto *Fusarium proliferatum*. Morfotip I spada v deblo zaprtotrosnice, red Hypocreales in je predstavljal 0,46 % vseh gliv (neodvisno se je pojavila le dvakrat). Znana je kot patogen koruze in drugih poljščin, pri ljudeh pa lahko povzroči glivni keratitis, pri čemer nastanejo hude okvare vida [154]. Poleg kontrole se pojavi le enkrat, in sicer pri posredni obdelavi za 240 s (Slika 25).



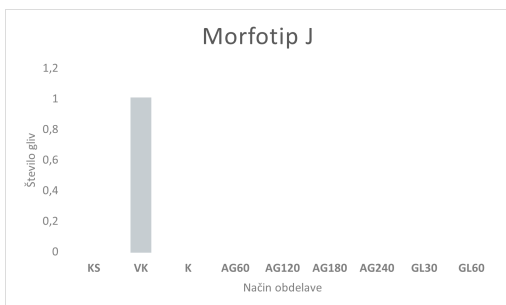
Slika 24: Število gliv vrste *Rhizopus sp.* (morfotip H) pri posamezni obdelavi s HP.



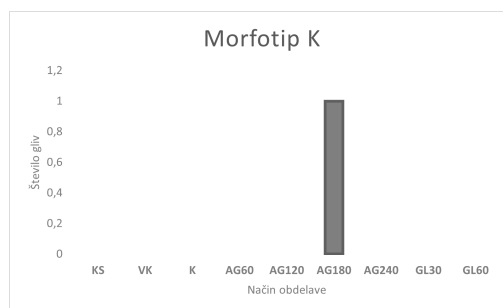
Slika 25: Število gliv vrste *Fusarium sp.* (morfotip I) pri posamezni obdelavi s HP.

Morfotip J se je izkazal za glivo iz rodu *Sordaria*, spada v deblo zaprtotrosnice, red Sordariales. Glive tega rodu so v naravi pogoste, a predstavljajo le majhen delež vseh gliv na svetu. Pri nas smo našli le en primer, ki je predstavljal 0,23 % vseh izoliranih gliv. Njihov naravni habitat so gnojišča, najdemo pa jih tudi v zemlji in na semenih. Trenutno ni potrjenih informacij o škodljivosti na zdravje ali strupenosti [155]. Vrsta se pojavi le enkrat, in sicer v vakuumski kontroli (Slika 26).

Morfotip K smo določili za vrste iz rodu *Penicillium*. Enemu izmed vzorcev je sekvenciranje določilo točno vrsto, in sicer *Penicillium brevicompactum*, drug vzorec pa smo lahko določili le za pripadnika rodu *Penicillium*. Obe vrsti spadata v deblo zaprtotrosnice, red Eurotiales. Pri nas se je morfotip K pojavil le enkrat, kar je predstavljal 0,23 % vseh primerov gliv. Pogosto so te glive najdene v sadju, kjer delujejo kot šibek patogen. Povzročajo gnilobo pri shranjenih jabolkih in grozdju, gobah, manioki in krompirju [156]. Morfotip K se ne pojavi v kontroli, ampak le pri posredni obdelavi za 180 s (Slika 27).



Slika 26: Število gliv vrste *Sordaria sp.* (morfotip J) pri posamezni obdelavi s HP.



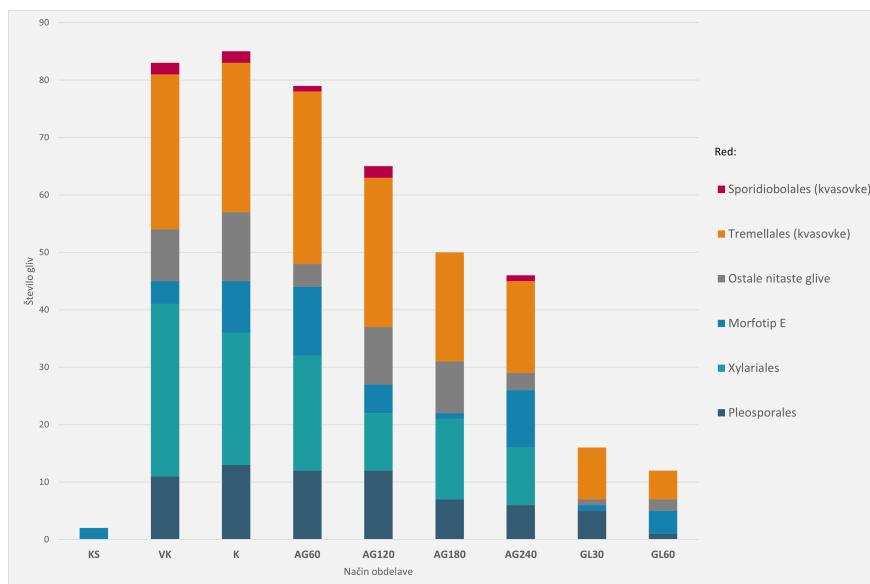
Slika 27: Število gliv vrste *Penicillium brevicompactum* (morfotip K) pri različnih obdelavah s HP.

Približno tretjino vseh identificiranih gliv uvrščamo med glive kvasovke (iz redov Tremellales in Sporidiales). Vidne razlike v dekontaminaciji gliv vrste *Hannaella sp.* so se pojavile šele pri daljših posrednih obdelavah s HP (180 s in 240 s) ter pri obeh neposrednih obdelavah, kar pripisujemo dejstvu, da je neposredna obdelava s HP močnejša, saj vsebuje večjo koncentracijo reaktivnih zvrsti ter semena segreje na višjo temperaturo kot posredna obdelava, zaradi česar je posredna obdelava šibkejša in zahteva daljši čas obdelave. Znano je tudi, da so kvasovke bolj odporne na obdelavo s HP zaradi debelih celičnih sten iz polisaharidov [73].

V red Pleosporales spadajo vsi morfotipi A in morfotip F (Slika 28). Pri nekaterih morfotipih, kjer smo določili različne vrste gliv, so nekatere prav tako spadale v ta red (morfotipa D in G). Skupno (tj. vključno z morebitnimi pripadniki) je ta red predstavljal 22 % vseh najdenih gliv. Neposredna izpostavitvev HP se je izkazala za učinkovit način dekontaminacije tega redu gliv. Drugi avtorji so glivo vrste *Epicoccum nigrum* našli tudi na semenih navadne ajde [101, 157, 158], torej njena razširjenost ni omejena le na tatarsko ajdo. Mravlje in sod. [101] so ugotovili, da obdelava semen s HP nima vpliva na pojav vrste *Epicoccum nigrum* na semenih navadne ajde. Na semenih tatarske ajde te vrste niso identificirali, kar pripisujejo naključju ali pa dejstvu, da na njeno rast zavira gliva *Alternaria sp.*, ki je predstavljala najpogostejšo glivo na semenih tatarske ajde v njihovi raziskavi in na vrsto *Epicoccum nigrum* deluje antagonistično. Za razliko od Mravlje in sod. [101] se pri nas pojavita obe glivi. Ugotovili smo, da obdelava s HP zmanjša kontaminacijo semen tatarske ajde z obema vrstama gliv, kar je posebej dobro za vrsto *Alternaria sp.*, saj povzroča različna listna obolenja.

Edini predstavnik redu Xylariales je bila gliva vrste *Arthrimum arundinis* (morfotip C). Opazili smo, da posredna obdelava s HP za 60 sekund ni imela velikega vpliva na zmanjšanje števila gliv. To pripisujemo dejstvu, da mora plazma za uspešno dekontaminacijo priti v stik z glivo samo, ta gliva pa je endofit, kar pomeni, da se lahko nahaja globoko v rastlinskem tkivu. Pri krajših obdelavah plazma oz. v njej prisotne reaktivne kemijske zvrsti ne prodrejo dovolj globoko v seme, da bi lahko poškodovali glivno DNA, povzročili morfološke spremembe membrane ali poškodbe znotrajceličnih organelov. Pri daljših obdelavah se je število najdenih gliv te vrste zmanjševalo, najverjetneje zaradi globljega prodora plazme v semena. Pri neposredni obdelavi se glive redu Xylariales niso pojavile, saj so bila semena direktno izpostavljena UV sevanju in kratkoživečim ROS. Po tem sodeč bi bil neposreden način obdelave semen tatarske ajde učinkovit način za dekontaminacijo gliv vrste *Arthrimum arundinis* in s tem zatiranja pegavosti, ki se pojavlja na tatarski ajdi [139].

Tretji najpogostejši rod je predstavljal morfotip E. Vzorca tega morfotipa, ki smo ju poslali na sekvenciranje, sta se izkazala za različni glivni vrsti *Botrytis cinerea* in *Phlebia sp.*, zato ne moremo zanesljivo določiti, kateri vrsti pripada morfotip, saj bi bilo za to potrebna izolacija in identifikacija več dodatnih vzorcev. Vrsta *Phlebia sp.* spada v red Pleosporales, za katere se je že izkazala učinkovitost obdelave s HP. Na morfotip E dolžina obdelave s HP ni imela vidnega učinka, saj na število najdenih gliv ni vplival čas obdelave s HP. Pri neposredni obdelavi je bilo povprečno najdenih manj gliv kot pri kontroli, a je bilo število gliv večje pri daljšem obdelovalnem času. To je edina glivna vrsta, ki se ne sklada z našo četrto hipotezo, s katero smo predvidevali zmanjševanje števila gliv z daljšim časom obdelave.



Slika 28: Delitev najdenih gliv glede na redove in primerjava po posameznih načinih obdelave s HP.

5 Zaključek

Okolju prijazne tehnologije za izboljšanje kakovosti poljščin in hrane so ključnega pomena kot alternativa kemičnim sredstvom (npr. pesticidom) za zatiranje patogenov v semenih. Ena izmed novejših tehnologij, ki to omogoča, je dekontaminacija semen s hladno plazmo. HP je ioniziran plin, ki se ga med drugim uporablja za sterilizacijo površin. V raziskovalni nalogi smo odkrili, da je HP učinkovit način za dekontaminacijo različnih vrst gliv kvasovk in nitastih gliv, saj je neposredna izpostavitvev ponekod primerljiva klasični sterilizaciji s H_2O_2 . Pokazali smo poprej neznane vplive HP na semena tatarske ajde pri daljših obdelovalnih časih pri neposredni in posredni obdelavi.

Pri delu smo raziskovali vpliv kisikove hladne plazme na kaljivost semen tatarske ajde in možnost zmanjšanja glivnih okužb. Semena smo izpostavili posredni in neposredni obdelavi s plazmo v različnih časovnih intervalih. Potrdili smo hipotezo, da obdelava s HP vpliva na kaljivost semen, saj se je ta zmanjševala s časom posredne obdelave, pri neposredni obdelavi pa semena niso kalila. Kontaminacija z glivami se je zmanjševala z daljšim časom izpostavitve HP. Neposredna izpostavitvev HP se je izkazala za veliko bolj učinkovito pri dekontaminaciji semen, saj smo pri najdaljši (60-sekundni) obdelavi glivno okuženost zmanjšali za kar 86 %, pri najdaljši posredni obdelavi (240-sekundni) pa le za 54 %. Z daljšanjem časa izpostavitve HP se je zmanjševala vrstna raznolikost zraslih gliv. Najpogostejše vrste gliv, ki so na semenih ostale prisotne tudi po najdaljših obdelavah, so *Hannaella sp.*, *Didymella sinensis* oz. *Cladosporium cladosporioides* in *Botrytis cinerea* oz. *Phlebia sp.* Z neposredno obdelavo smo med drugim uspešno odstranili okužbo z drugo najpogostejše najdeno glivo, vrsto *Arthrimum arundinis*, ki povzroča pegavost zrn tatarske ajde. Sklepamo, da je neposredna obdelava s HP učinkovit način sterilizacije in odprave okužbe s to boleznijo, a bi bile na tem področju potrebne dodatne raziskave.

Osredotočili smo se na razlike pri različnih dolžinah obdelave in načinu izpostavitve. Ko so semena hladni plazmi izpostavljena neposredno, temperatura kljub hlajenju komore doseže 270 °C, pri posredni izpostavitvi za dlje časa pa do 100 °C. Učinek dekontaminacije na semenih bi bil lahko posledica segrevanja semen, kar bi morali preveriti z dodatnimi poskusi. Semena bi lahko postavili za trajanje obdelave v pečico, segreto na 100 °C, in nato preverjali razrast gliv. Ugotovili smo, da tehnologija HP predstavlja obetaven način za dekontaminacijo semen tatarske ajde, a so potrebne nadaljnje raziskave pri določanju optimalnih parametrov (kot sta trajanje in način izpostavitve). Glede na naše rezultate bi se prihodnje raziskave lahko osredotočile na kaljivost semen tatarske ajde pri krajših izpostavitvah HP. V naši raziskavi smo sekvencirali po dva različna vzorca vsakega morfotipa, ki sta se ponekod izkazala za dve različni vrsti gliv. To je privedlo do pomanjkanja podatkov in s tem nedokončnega sklepa o vplivu HP na posamezno glivno vrsto. Pri razvrščanju gliv na morfotipe smo se zanašali na podobnosti njihovih morfoloških lastnosti, ki pa so se ponekod precej razlikovale. V nadaljnjih raziskavah bi morali biti bolj pozorni na ustrezno izolacijo morfotipov ter na vzorčenje in sekvenciranje več predstavnikov istega morfotipa. To bi lahko dosegli z natančnejšo delitvijo neidentificiranih gliv na več morfotipnih skupin, ki bi imele različne morfološke lastnosti. Tako bi lahko bolj enolično določili vrsto posamezne skupine gliv, in s tem vpliv HP na dekontaminacijo različnih vrst.

Menimo, da je HP obetaven način za sterilizacijo semen tatarske ajde, saj bi s tem lahko dvignili kakovost poljščin brez uporabe kemičnih sredstev. Razvoj alternativnih zelenih tehnologij se nam zdi ključnega pomena za trajnostni razvoj kmetijstva in preskrbo s kakovostno lokalno hrano. Izpopolnjenje načina obdelave semen tatarske ajde s HP bi lahko privedlo do širše uveljavitve takega načina dekontaminacije.

Pri raziskovalnem delu smo pridobili uporabna znanja s področja raziskovanja v biologiji. Usvojili smo temeljne veščine raziskovalnega dela, kot so načrtovanje poskusov, analiziranje primarnih virov, opravljanje zanesljivih meritev, interpretiranje rezultatov ter način pisanja raziskovalne naloge, izboljšali pa smo se tudi na področju timskega dela. Ta raziskovalna naloga nam je omogočila vpogled v svet raziskovanja, nagradila našo vedoželjnost in radovednost ter nam dala nov zagon za morebitne prihodnje raziskave.

6 Viri

- [1] P. Starič, S. Grobelnik Mlakar, in I. Junkar. Response of two different wheat varieties to glow and afterglow oxygen plasma. *Plants*, 10(8), 2021. ISSN 2223-7747. doi:10.3390/plants10081728. URL <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/8/1728>.
- [2] Odbor Združenih narodov za ekonomske in socialne zadeve. Growing at a slower pace, world population is expected to reach 9.7 billion in 2050 and could peak at nearly 11 billion around 2100, 2019. URL <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2019.html>.
- [3] N.N. Misra, O. Schlüter, in P.J. Cullen. *Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications*. Elsevier Science, 2016. ISBN 9780128014899. URL <https://books.google.si/books?id=9o1CCQAAQBAJ>.
- [4] M. Germ, B. Vombergar, M. Vogrinčič, A. Golob, in I. Kreft. Tatarska ajda v Sloveniji. *Proteus*, 82(1): 15–19, 2019.
- [5] P. Van Hung, T. Maeda, in N. Morita. Buckwheat starch structure and characteristics a review. *Eur. J Plant Sci. Biotechnol*, 3:23–28, 2009.
- [6] T. Morishita, H. Yamaguchi, in K. Degi. The contribution of polyphenols to antioxidative activity in common buckwheat and tartary buckwheat grain. *Plant production science*, 10(1):99–104, 2007.
- [7] G. Bonafaccia, L. Gambelli, N. Fabjan, in I. Kreft. Trace elements in flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 83(1):1–5, 2003.
- [8] G. Bonafaccia, M. Marocchini, in I. Kreft. Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food chemistry*, 80(1):9–15, 2003.
- [9] J. Silva, S. Gonzales, J. Palacios, in G. Oliver. The fungal hypha. *Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P.–Encyclopedia of food microbiology*, 2:850–853, 2000.
- [10] G. M. Walker in N. A. White. Introduction to fungal physiology. *Fungi: biology and applications*, str. 1–35, 2017.
- [11] N.A. Campbell. *Biology*. Menlo Park, 1996.
- [12] J. Wendland. Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. *Fungal Genetics and Biology*, 34(2):63–82, 2001.
- [13] J. W. Kronstad in C. Staben. Mating type in filamentous fungi. *Annual review of genetics*, 31(1): 245–276, 1997.
- [14] M. L. Berbee. The phylogeny of plant and animal pathogens in the ascomycota. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(4):165–187, 2001.
- [15] N. Singaravelan, I. Grishkan, A. Beharav, K. Wakamatsu, S. Ito, in E. Nevo. Adaptive melanin response of the soil fungus aspergillus niger to uv radiation stress at “evolution canyon”, mount carmel, israel. *PLOS ONE*, 3:1–5, 08 2008. doi:10.1371/journal.pone.0002993. URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002993>.
- [16] D. Woodward. Fungi ii - phyla ascomycota and basidiomycota, Sep 2014. URL <https://wikispaces.psu.edu/display/BI0L110F2013/Fungi+II+-+Phyla+Ascomycota+and+Basidiomycota#FungiII-PhylaAscomycotaandBasidiomycota-Terms>.
- [17] C.s Kurtzman, J. W. Fell, in T. Boekhout. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, 2011.
- [18] M. Osumi. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron*, 29(2-3):207–233, 1998.
- [19] J.E. Leadsham, V.N. Kotiadis, D.J. Tarrant, in C.W. Gourlay. Apoptosis and the yeast actin cytoskeleton. *Cell death & differentiation*, 17(5):754–762, 2010.
- [20] M. K. Balasubramanian, E. Bi, in M. Glotzer. Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Current Biology*, 14(18):R806–R818, 2004.
- [21] R. Carlos in P. Gabor. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer, 2006.

- [22] P. Gibbon. Introduction to plasma physics. *arXiv preprint arXiv:2007.04783*, 2020.
- [23] C. Zufall in K. Wackerbauer. The biological impact of flash pasteurization over a wide temperature interval. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(3):163–168, 2000.
- [24] G. Farrugia in R. Balzan. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in Oncology*, 2:64, 2012.
- [25] R.J. Goldston. *Introduction to Plasma Physics*. CRC Press, 2020. ISBN 9781439822074. URL <https://books.google.si/books?id=TZHxDwAAQBAJ>.
- [26] S. Sneha. Thermal plasma technology: The prospective future in material processing. *Journal of Cleaner Production*, 142:3131–3150, 2017. ISSN 0959-6526. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.10.154>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652616317851>.
- [27] A. Fridman. *Plasma Chemistry*. Cambridge University Press, 2008. ISBN 9781139471732. URL <https://books.google.si/books?id=ZzmtGEHCC9MC>.
- [28] J. Dwyer in A. M. Uman. The physics of lightning. *Physics Reports*, 534(4):147–241, 2014. ISSN 0370-1573. doi:<https://doi.org/10.1016/j.physrep.2013.09.004>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037015731300375X>. The Physics of Lightning.
- [29] G. Paschmann, S. Haaland, R. A. Treumann, in R. Treumann. *Auroral plasma physics*, volume 15. Springer Science & Business Media, 2003.
- [30] G. Federici, C. H. Skinner, J. N. Brooks, J. P. Coad, C. Grisolia, A. A. Haasz, A. Hassanein, V. Philipps, C. S. Pitcher, in J. Roth. Plasma-material interactions in current tokamaks and their implications for next step fusion reactors. *Nuclear Fusion*, 41(12):1967, 2001.
- [31] P. K. Chu, J.Y. Chen, L.P. Wang, in N. Huang. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 36(5-6):143–206, 2002.
- [32] G. R. Stratton, C. L. Bellona, F. Dai, T. M. Holsen, in S. M. Thagard. Plasma-based water treatment: Conception and application of a new general principle for reactor design. *Chemical Engineering Journal*, 273:543–550, 2015.
- [33] X. Zhang, D. Liu, R. Zhou, Y. Song, Y. Sun, Q. Zhang, J. Niu, H. Fan, in S. Yang. Atmospheric cold plasma jet for plant disease treatment. *Applied Physics Letters*, 104(4):043702, 2014.
- [34] H. Conrads in M. Schmidt. Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology*, 9(4):441–454, oct 2000. doi:10.1088/0963-0252/9/4/301. URL <https://doi.org/10.1088/0963-0252/9/4/301>.
- [35] M. Turner. Chapter 2 - physics of cold plasma. In *Cold Plasma in Food and Agriculture*, str. 17–51. Academic Press, San Diego, 2016. ISBN 978-0-12-801365-6. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801365-6.00002-0>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128013656000020>.
- [36] J. V. R. Heberlein. Generation of thermal and pseudo-thermal plasmas. *Pure and Applied Chemistry*, 64(5):629–636, 1992. doi:10.1351/pac199264050629. URL <https://doi.org/10.1351/pac199264050629>.
- [37] H. Haraguchi, T. Hasegawa, in M. Abdullah. Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry: excitation mechanisms and analytical feasibilities. *Pure and Applied Chemistry*, 60(5): 685–696, 1988.
- [38] J. Mravljje, M. Regvar, in K. Vogel-Mikuš. Development of cold plasma technologies for surface decontamination of seed fungal pathogens: Present status and perspectives. *Journal of Fungi*, 7(8): 650, 2021.
- [39] S. U. Kadam, N. N. Misra, in N. Zaima. Mass spectrometry based chemical imaging of foods. *RSC Adv.*, 6:33537–33546, 2016. doi:10.1039/C6RA02269C. URL <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA02269C>.
- [40] S. Cha in Y. Park. Plasma in dentistry. *Clinical plasma medicine*, 2(1):4–10, 2014.

- [41] B. Haertel, T. Von Woedtke, K.-D. Weltmann, in U. Lindequist. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. *Biomolecules & therapeutics*, 22(6):477, 2014.
- [42] D. P. Park, K. Davis, S. Gilani, C. Alonzo, D. Dobrynin, G. Friedman, A. Fridman, A. Rabinovich, in G. Fridman. Reactive nitrogen species produced in water by non-equilibrium plasma increase plant growth rate and nutritional yield. *Current Applied Physics*, 13:S19–S29, 2013.
- [43] J. Jiang, X. He, L. Li, J. Li, H. Shao, Q. Xu, R. Ye, in Y. Dong. Effect of cold plasma treatment on seed germination and growth of wheat. *Plasma Science and Technology*, 16(1):54, 2014.
- [44] P. Starič, I. Junkar, K. V. Mikuš, in M. Mozetič. Exploring the effects of cold plasma on wheat seed surface, germination and growth. In *Biology and Life Sciences Forum*, volume 4, str. 11. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020.
- [45] L. Ling, J. Jiafeng, L. Jiangang, S. Minchong, H. Xin, S. Hanliang, in D. Yuanhua. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Scientific reports*, 4(1):1–7, 2014.
- [46] A. Zahoranová, L. Hoppanová, J. Šimončicová, Z. Tučeková, V. Medvecká, D. Hudecová, B. Kaliňáková, D. Kováčik, in M. Černák. Effect of cold atmospheric pressure plasma on maize seeds: enhancement of seedlings growth and surface microorganisms inactivation. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 38(5):969–988, 2018.
- [47] S. Yodpitak, S. Mahatheerant, D. Boonyawan, P. Sookwong, S. Roytrakul, in O. Norkaew. Cold plasma treatment to improve germination and enhance the bioactive phytochemical content of germinated brown rice. *Food chemistry*, 289:328–339, 2019.
- [48] E. Feizollahi, B. Iqdiam, T. Vasanthan, M. S. Thilakarathna, in M. S. Roopesh. Effects of atmospheric-pressure cold plasma treatment on deoxynivalenol degradation, quality parameters, and germination of barley grains. *Applied Sciences*, 10(10):3530, 2020.
- [49] K. Matra. Non-thermal plasma for germination enhancement of radish seeds. *Procedia Computer Science*, 86:132–135, 2016.
- [50] X. Liao, D. Liu, Q. Xiang, J. Ahn, S. Chen, X. Ye, in T. Ding. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control*, 75:83–91, 2017.
- [51] B. G. Dasan, M. Mutlu, in I. H. Boyaci. Decontamination of aspergillus flavus and aspergillus parasiticus spores on hazelnuts via atmospheric pressure fluidized bed plasma reactor. *International Journal of Food Microbiology*, 216:50–59, 2016.
- [52] S. Deng, R. Ruan, C. K. Mok, G. Huang, X. Lin, in P. Chen. Inactivation of escherichia coli on almonds using nonthermal plasma. *Journal of food science*, 72(2):M62–M66, 2007.
- [53] X. Liu, F. Hong, Y. Guo, J. Zhang, in J. Shi. Sterilization of staphylococcus aureus by an atmospheric non-thermal plasma jet. *Plasma Science and Technology*, 15(5):439, 2013.
- [54] H. Lu, S. Patil, K. M. Keener, P. J. Cullen, in P. Bourke. Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and dna. *Journal of applied microbiology*, 116(4):784–794, 2014.
- [55] H. Yun, B. Kim, S. Jung, Z. A. Kruk, D. B. Kim, W. Choe, in C. Jo. Inactivation of listeria monocytogenes inoculated on disposable plastic tray, aluminum foil, and paper cup by atmospheric pressure plasma. *Food control*, 21(8):1182–1186, 2010.
- [56] H. Eto, Y. Ono, A. Ogino, in M. Nagatsu. Low-temperature sterilization of wrapped materials using flexible sheet-type dielectric barrier discharge. *Applied physics letters*, 93(22):221502, 2008.
- [57] M. M. Kayes, F. J. Critzer, K. Kelly-Wintenberg, J. R. Roth, T. C. Montie, in D. A. Golden. Inactivation of foodborne pathogens using a one atmosphere uniform glow discharge plasma. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(1):50–59, 2007.
- [58] P. Manas in R. Pagán. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of applied microbiology*, 98(6):1387–1399, 2005.

- [59] P. Muranyi, J. Wunderlich, in M. Heise. Influence of relative gas humidity on the inactivation efficiency of a low temperature gas plasma. *Journal of applied microbiology*, 104(6):1659–1666, 2008.
- [60] M. K. Boudam, M. Moisan, B. Saoudi, C. Popovici, N. Gherardi, in F. Massines. Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of uv photons as obtained with the same gas mixture. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 39(16):3494, 2006.
- [61] M. Laroussi in F. Leipold. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and uv radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 233(1-3):81–86, 2004.
- [62] K.S. Lassen, B. Nordby, in R. Grün. The dependence of the sporicidal effects on the power and pressure of rf-generated plasma processes. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 74(1): 553–559, 2005.
- [63] M. Selcuk, L. Oksuz, in P. Basaran. Decontamination of grains and legumes infected with aspergillus spp. and penicillium spp. by cold plasma treatment. *Bioresource technology*, 99(11):5104–5109, 2008.
- [64] C. A. J. Van Gils, S. Hofmann, B. Boekema, R. Brandenburg, in P. J. Bruggeman. Mechanisms of bacterial inactivation in the liquid phase induced by a remote rf cold atmospheric pressure plasma jet. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 46(17):175203, 2013.
- [65] Q. Yu, C. Huang, F. Hsieh, H. Huff, in Y. Duan. Sterilization effects of atmospheric cold plasma brush. *Applied physics letters*, 88(1):013903, 2006.
- [66] M. Moisan, J. Barbeau, M. Crevier, J. Pelletier, N. Philip, in B. Saoudi. Plasma sterilization. methods and mechanisms. *Pure and applied chemistry*, 74(3):349–358, 2002.
- [67] D. Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman, in A. Fridman. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics*, 11(11):115020, 2009.
- [68] J. Ehlbeck, U. Schnabel, M. Polak, J. Winter, T. Von Woedtke, R. Brandenburg, T. Von dem Hagen, in K. D. Weltmann. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(1):013002, 2010.
- [69] M. Laroussi, D. A. Mendis, in M. Rosenberg. Plasma interaction with microbes. *New Journal of Physics*, 5(1):41, 2003.
- [70] O. Lunov, O. Churpita, V. Zablotskii, I. G. Deyneka, I. K. Meshkovskii, A. Jäger, E. Syková, Š. Kubínová, in A. Dejneka. Non-thermal plasma kills bacteria: Scanning electron microscopy observations. *Applied Physics Letters*, 106(5):053703, 2015.
- [71] M. Y. Alkawareek, S. P. Gorman, W. G. Graham, in B. F. Gilmore. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *International journal of antimicrobial agents*, 43(2):154–160, 2014.
- [72] S. G. Joshi, M. Cooper, A. Yost, M. Paff, U. K. Ercan, G. Fridman, G. Friedman, A. Fridman, in A. D. Brooks. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative dna damage and membrane lipid peroxidation in escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(3):1053–1062, 2011.
- [73] T. C. Montie, K. Kelly-Wintenberg, in J. R. Roth. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (ouagd) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE Transactions on plasma science*, 28(1):41–50, 2000.
- [74] I. Digel, A. T. Artmann, K. Nishikawa, M. Cook, E. Kurulgan, in G. M. Artmann. Bactericidal effects of plasma-generated cluster ions. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 43(6):800–807, 2005.
- [75] R. A. Venezia, M. Orrico, E. Houston, S. Yin, in Y. Y. Naumova. Lethal activity of nonthermal plasma sterilization against microorganisms. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 29(5):430–436, 2008.

- [76] H. J. Ahn, K. Kim, K. Geunyoung, E. Moon, S. Yang, in J. Lee. Atmospheric-pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals. *PLoS one*, 6(11):e28154, 2011.
- [77] D. J. Dwyer, D. M. Camacho, M. A. Kohanski, J. M. Callura, in J. J. Collins. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Molecular cell*, 46(5):561–572, 2012.
- [78] V. Temkin in M. Karin. From death receptor to reactive oxygen species and c-jun n-terminal protein kinase: the receptor-interacting protein 1 odyssey. *Immunological reviews*, 220(1):8–21, 2007.
- [79] D. A. Mendis, M. Rosenberg, in F. Azam. A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE transactions on plasma science*, 28(4):1304–1306, 2000.
- [80] A. J. H. Sale in W. A. Hamilton. Effects of high electric fields on microorganisms: I. killing of bacteria and yeasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 148(3):781–788, 1967.
- [81] U. Zimmermann, G. Pilwat, in F. Riemann. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysical journal*, 14(11):881–899, 1974.
- [82] X. M. Zhu in M. G. Kong. Electron kinetic effects in atmospheric dielectric-barrier glow discharges. *Journal of applied physics*, 97(8):083301, 2005.
- [83] E. Sysolyatina, A. Mukhachev, M. Yurova, M. Grushin, V. Karalnik, A. Petryakov, N. Trushkin, S. Ermolaeva, in Y. Akishev. Role of the charged particles in bacteria inactivation by plasma of a positive and negative corona in ambient air. *Plasma Processes and Polymers*, 11(4):315–334, 2014.
- [84] P. Puligundla in C. Mok. Potential applications of nonthermal plasmas against biofilm-associated micro-organisms in vitro. *Journal of applied microbiology*, 122(5):1134–1148, 2017.
- [85] S. Patil, T. Moiseev, N. N. Misra, P. J. Cullen, J. P. Mosnier, K. M. Keener, in P. Bourke. Influence of high voltage atmospheric cold plasma process parameters and role of relative humidity on inactivation of bacillus atrophaeus spores inside a sealed package. *Journal of Hospital Infection*, 88(3):162–169, 2014.
- [86] K. Ishikawa, H. Mizuno, H. Tanaka, K. Tamiya, H. Hashizume, T. Ohta, M. Ito, S. Iseki, K. Takeda, in H. Kondo. Real-time in situ electron spin resonance measurements on fungal spores of penicillium digitatum during exposure of oxygen plasmas. *Applied Physics Letters*, 101(1):013704, 2012.
- [87] J. Julák, O. Janoušková, V. Scholtz, in K. Holada. Inactivation of prions using electrical dc discharges at atmospheric pressure and ambient temperature. *Plasma Processes and Polymers*, 8(4):316–323, 2011.
- [88] P. Pradeep in M. Chulkyoon. Non-thermal plasmas (ntps) for inactivation of viruses in abiotic environment. *Research Journal of Biotechnology Vol*, 11:6, 2016.
- [89] N. N. Misra, B. Yadav, M. S. Roopesh, in C. Jo. Cold plasma for effective fungal and mycotoxin control in foods: mechanisms, inactivation effects, and applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(1):106–120, 2019.
- [90] N. Hayashi, Y. Yagyū, A. Yonesu, in M. Shiratani. Sterilization characteristics of the surfaces of agricultural products using active oxygen species generated by atmospheric plasma and uv light. *Japanese Journal of Applied Physics*, 53(5S1):05FR03, 2014.
- [91] K. Suhem, N. Matan, M. Nisoa, in N. Matan. Inhibition of aspergillus flavus on agar media and brown rice cereal bars using cold atmospheric plasma treatment. *International journal of food microbiology*, 161(2):107–111, 2013.
- [92] B. Avramidis, G. and Stüwe, R. Wascher, M. Bellmann, S. Wieneke, A.s von Tiedemann, in W. Viöl. Fungicidal effects of an atmospheric pressure gas discharge and degradation mechanisms. *Surface and Coatings Technology*, 205:S405–S408, 2010.
- [93] B. G. Dasan, I. H. Boyaci, in M. Mutlu. Nonthermal plasma treatment of aspergillus spp. spores on hazelnuts in an atmospheric pressure fluidized bed plasma system: Impact of process parameters and surveillance of the residual viability of spores. *Journal of Food Engineering*, 196:139–149, 2017.

- [94] H. Hashizume, T. Ohta, K. Fengdong, J. and Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, in M. Ito. Inactivation effects of neutral reactive-oxygen species on penicillium digitatum spores using non-equilibrium atmospheric-pressure oxygen radical source. *Applied Physics Letters*, 103(15):153708, 2013.
- [95] H. Hashizume, T. Ohta, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, in M. Ito. Oxidation mechanism of penicillium digitatum spores through neutral oxygen radicals. *Japanese Journal of Applied Physics*, 53(1):010209, 2013.
- [96] H. Hashizume, T. Ohta, K. Takeda, K. Ishikawa, M. Hori, in M. Ito. Quantitative clarification of inactivation mechanism of penicillium digitatum spores treated with neutral oxygen radicals. *Japanese Journal of Applied Physics*, 54(1S):01AG05, 2014.
- [97] S. Iseki, H. Hashizume, F. Jia, K. Takeda, K. Ishikawa, T. Ohta, M. Ito, in M. Hori. Inactivation of penicillium digitatum spores by a high-density ground-state atomic oxygen-radical source employing an atmospheric-pressure plasma. *Applied Physics Express*, 4(11):116201, 2011.
- [98] L. Cerioni, S. I. Volentini, F. E. Prado, V. A. Rapisarda, in L. Rodríguez-Montelongo. Cellular damage induced by a sequential oxidative treatment on penicillium digitatum. *Journal of applied microbiology*, 109(4):1441–1449, 2010.
- [99] M. H. Kang, Y. J. Hong, P. Attri, G. B. Sim, G. J. Lee, K. Panngom, G. C. Kwon, E. H. Choi, H. S. Uhm, in G. Park. Analysis of the antimicrobial effects of nonthermal plasma on fungal spores in ionic solutions. *Free Radical Biology and Medicine*, 72:191–199, 2014.
- [100] K. Panngom, S. H. Lee, D. H. Park, G. B. Sim, Y. H. Kim, H. S. Uhm, G. Park, in E. H. Choi. Non-thermal plasma treatment diminishes fungal viability and up-regulates resistance genes in a plant host. *PloS one*, 9(6):e99300, 2014.
- [101] J. Mravlje, M. Regvar, P. Starič, M. Mozetič, in K. Vogel-Mikuš. Cold plasma affects germination and fungal community structure of buckwheat seeds. *Plants*, 10(5):851, 2021.
- [102] J. C. Volin, F. S. Denes, R. A. Young, in S. M. T. Park. Modification of seed germination performance through cold plasma chemistry technology. *Crop science*, 40(6):1706–1718, 2000.
- [103] L. K. Randeniya in G. de Groot. Non-thermal plasma treatment of agricultural seeds for stimulation of germination, removal of surface contamination and other benefits: a review. *Plasma Processes and Polymers*, 12(7):608–623, 2015.
- [104] S. Živković, N. Puač, Z. Giba, D. Grubišić, in Z. Petrović. The stimulatory effect of non-equilibrium (low temperature) air plasma pretreatment on light-induced germination of paulownia tomentosa seeds. *Seed Science and Technology*, 32(3):693–701, 2004.
- [105] I. Filatova, V. Azharonok, M. Kadyrov, V. Beljavsky, A. Gvozдов, A. Shik, in A. Antonuk. The effect of plasma treatment of seeds of some grain and legumes on their sowing quality and productivity. *Rom. J. Phys*, 56:139–143, 2011.
- [106] A. Mitra, Y. Li, T. G. Klämpfl, T. Shimizu, J. Jeon, G. E. Morfill, in J. L. Zimmermann. Inactivation of surface-borne microorganisms and increased germination of seed specimen by cold atmospheric plasma. *Food and Bioprocess Technology*, 7(3):645–653, 2014.
- [107] N. Khamsen, D. Onwimol, N. Teerakawanich, S. Dechanupaprittha, W. Kanokbannakorn, K. Hongesombut, in S. Srisonphan. Rice (oryza sativa l.) seed sterilization and germination enhancement via atmospheric hybrid nonthermal discharge plasma. *ACS applied materials & interfaces*, 8(30):19268–19275, 2016.
- [108] A. Zahoranová, M. Henselová, D. Hudecová, B. Kaliňáková, D. Kováčik, V. Medvecká, in M. Černák. Effect of cold atmospheric pressure plasma on the wheat seedlings vigor and on the inactivation of microorganisms on the seeds surface. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 36(2):397–414, 2016.
- [109] C. L. Porto, L. Sergio, F. Boari, A. F. Logrieco, in V. Cantore. Cold plasma pretreatment improves the germination of wild asparagus (asparagus acutifolius l.) seeds. *Scientia Horticulturae*, 256:108554, 2019.

- [110] S. P. Shashikanthalu, L. Ramireddy, in M. Radhakrishnan. Stimulation of the germination and seedling growth of cuminum cyminum l. seeds by cold plasma. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 18:100259, 2020.
- [111] M. Billah, S. A. Sajib, N. C. Roy, M. M. Rashid, M. A. Reza, M. M. Hasan, in M. R. Talukder. Effects of dbd air plasma treatment on the enhancement of black gram (vigna mungo l.) seed germination and growth. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 681:108253, 2020.
- [112] M. C. Pérez-Pizá, L. Prevosto, P. E. Grijalba, C. G. Zilli, E. Cejas, B. Mancinelli, in K. B. Balestrasse. Improvement of growth and yield of soybean plants through the application of non-thermal plasmas to seeds with different health status. *Heliyon*, 5(4):e01495, 2019.
- [113] I. Filatova, V. Azharonok, V. Lushkevich, A. Zhukovsky, G. Gadzhieva, K. Spasic, S. Zivkovic, N. Puac, S. Lazovic, in G. Malovic. Plasma seeds treatment as a promising technique for seed germination improvement. In *Proceeding of the 31st International Conference on Phenomena in Ionized Gases*, volume 2068971, 2013.
- [114] M. Henselová, L. Slováková, M. Martinka, in A. Zahoranová. Growth, anatomy and enzyme activity changes in maize roots induced by treatment of seeds with low-temperature plasma. *Biologia*, 67(3): 490–497, 2012.
- [115] I. Filatova, V. Azharonok, E. Gorodetskaya, L. Mel'nikova, O. Shedikova, in A. Shik. Plasma-radiowave stimulation of plant seeds germination and inactivation of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the International Plasma Chemistry Society*, 19:627, 2009.
- [116] B. Šerá, I. Gajdová, M. Černák, B. Gavril, E. Hnatiuc, D. Kováčik, V. Kříha, J. Sláma, M. Šerý, in P. Špatenka. How various plasma sources may affect seed germination and growth. In *2012 13th International Conference on Optimization of Electrical and Electronic Equipment (OPTIM)*, str. 1365–1370. IEEE, 2012.
- [117] M. Lampe. Vpliv obdelave s hladno kisikovo plazmo na glivno združbo semen navadne ajde. Master's thesis, Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, 2020. URL <http://pefprints.pef.uni-lj.si/6460/>.
- [118] A. J. Moreira, R. D. Mansano, T. A. Pinto, R. Ruas, L. da Silva Zambon, M. V. da Silva, in P. B. Verdonck. Sterilization by oxygen plasma. *Applied surface science*, 235(1-2):151–155, 2004.
- [119] T. T. Chau, K. C. Kao, G. Blank, in F. Madrid. Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. *Biomaterials*, 17(13):1273–1277, 1996.
- [120] K. Kelly-Wintenberg, T. C. Montie, C. Brickman, J. R. Roth, A. K. Carr, K. Sorge, L. C. Wadsworth, in P. P. Y. Tsai. Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a one atmosphere uniform glow discharge plasma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(1):69–74, 1998.
- [121] S. Taheri, G. I. Brodie, D. Gupta, in M. V. Jacob. Afterglow of atmospheric non-thermal plasma for disinfection of lentil seeds from botrytis grey mould. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66:102488, 2020.
- [122] M. Laroussi. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma processes and polymers*, 2(5):391–400, 2005.
- [123] K. Lee, K. Paek, W. Ju, in Y. Lee. Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *Journal of Microbiology*, 44(3):269–275, 2006.
- [124] L. Qiang, L. Lijiao, F. Huiyu, T. Wenying, B. Zhijie, C. Xiong, X. Wang, in W. Huang. Characterization of the complete mitochondrial genome of basidiomycete yeast hannaella oryzae: intron evolution, gene rearrangement and its phylogeny. *Frontiers in Microbiology*, 12:1144, 2021.
- [125] L. J. Strausbaugh, D. L. Sewell, R. C. Tjoelker, T. Heitzman, T. Webster, T. T. Ward, in M. A. Pfaller. Comparison of three methods for recovery of yeasts from hands of health-care workers. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(2):471–473, 1996.
- [126] F. Wirth in L. Z. Goldani. Epidemiology of rhodotorula: an emerging pathogen. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2012, 2012.

- [127] M. H. Miceli, J. A. Díaz, in S. A. Lee. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet infectious diseases*, 11(2):142–151, 2011.
- [128] H. Zhang, L. Wang, L. Ma, Y. Dong, S. Jiang, B. Xu, in X. Zheng. Biocontrol of major postharvest pathogens on apple using *rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. *Biological Control*, 48(1):79–83, 2009.
- [129] S. A. Ahmadpour, R. Farokhinejad, in M. Mehrabi-Koushki. Further characterization and pathogenicity of *didymella microchlamydospora* causing stem necrosis of *morus nigra* in iran. *Mycosphere*, 8:835–852, 2017.
- [130] A. Aptroot. Redisposition of some species excluded from *didymosphaeria* (ascomycotina). *Nova Hedwigia*, 60(3):325–380, 1995.
- [131] J. Wang, L. Feng, Z. Hang, Z. Yan, J. Wu, S. Shen, J. Dong, in Z. Hao. Bioinformatic analysis and functional characterization of cfem proteins in *setosphaeria turcica*. *Journal of Integrative Agriculture*, 20(9):2438–2449, 2021.
- [132] S. M. Tralamazza, K. C. Piacentini, C. Henrique T. Iwase, in L. de Oliveira Rocha. Toxigenic *alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Current opinion in food science*, 23:57–63, 2018.
- [133] N. M. Kleczewski in S. L. Flory. Leaf blight disease on the invasive grass *microstegium vimineum* caused by a *bipolaris* sp. *Plant disease*, 94(7):807–811, 2010.
- [134] K.B. Alam, M.A. Shaheed, A.U. Ahmed, in P.K. Malaker. *Bipolaris* leaf blight (spot blotch) of wheat in bangladesh. *Wheat in heat-stressed environments: irrigated, dry areas and rice-wheat farming systems*, str. 339–342, 1994.
- [135] E. Aregbesola, A. Ortega-Beltran, T. Falade, G. Jonathan, S. Hearne, in R. Bandyopadhyay. A detached leaf assay to rapidly screen for resistance of maize to *bipolaris maydis*, the causal agent of southern corn leaf blight. *European Journal of Plant Pathology*, 156(1):133–145, 2020.
- [136] M. Olstorpe, J. Schnürer, in V. Passoth. Microbial changes during storage of moist crimped cereal barley grain under swedish farm conditions. *Animal feed science and technology*, 156(1-2):37–46, 2010.
- [137] C. Gostinčar, R. A. Ohm, T. Kogej, S. Sonjak, M. Turk, J. Zajc, P. Zalar, M. Grube, H. Sun, in J. Han. Genome sequencing of four *aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC genomics*, 15(1):1–29, 2014.
- [138] P. W. Crous in J. Z. Groenewald. A phylogenetic re-evaluation of *arthrinium*. *IMA fungus*, 4(1): 133–154, 2013.
- [139] I. Kreft. *Fagopyrum (Novosti o ajdi)*. VTOZD za agronomijo, Center za biotehnologijo BF, 1989.
- [140] C. Martinezcano, W.E. Grey, in D.C. Sands. 1st report of *arthrinium-arundinis* causing kernel blight on barley, 1992.
- [141] D. C. Mavragani, L. Abdellatif, B. McConkey, C. Hamel, in V. Vujanovic. First report of damping-off of durum wheat caused by *arthrinium sacchari* in the semi-arid saskatchewan fields. *Plant disease*, 91(4):469–469, 2007.
- [142] M. Corlett. A taxonomic survey of some species of *didymella* and *didymella*-like species. *Canadian Journal of Botany*, 59(11):2016–2042, 1981.
- [143] I. H. Khan, H. Sohrab, R. Satyajit, S. T. Fakir, M. H. Choudhury, in M. Abdul. Cytotoxic and antibacterial naphthoquinones from an endophytic fungus, *cladosporium* sp. *Toxicology Reports*, 3: 861–865, 2016. ISSN 2214-7500. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.10.005>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214750016300828>.
- [144] D. E. Torres, R. I. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía, P. Guevara-Fefer, G. J. Márquez-Guzmán, in C. Pérez-Martínez. *Cladosporium cladosporioides* and *cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *puccinia horiana* henn., the causal agent of chrysanthemum white rust. *PloS one*, 12(1):e0170782, 2017.

- [145] X. Havaux, A. Zeine, A. Dits, in O. Denis. A new mouse model of lung allergy induced by the spores of *alternaria alternata* and *cladosporium herbarum* molds. *Clinical & Experimental Immunology*, 139(2):179–188, 2005.
- [146] A. Have, W. Mulder, J. Visser, in J. A. L. van Kan. The endopolygalacturonase gene *bcpg1* is required for full virulence of *botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(10):1009–1016, 1998.
- [147] B. Paul. Characterisation of a new species of *pythium* isolated from a wheat field in northern france and its antagonism towards *botrytis cinerea* causing the grey mould disease of the grapevine. *FEMS microbiology letters*, 224(2):215–223, 2003.
- [148] C. Wang, S. Yuan, W. Zhang, N. Tzibun, in X. Ye. Buckwheat antifungal protein with biocontrol potential to inhibit fungal (*botrytis cinerea*) infection of cherry tomato. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(24):6748–6756, 2019.
- [149] M. Choquer, E. Fournier, C. Kunz, C. Levis, J. Pradier, A. Simon, in M. Viaud. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1):1–10, 12 2007. ISSN 0378-1097. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x. URL <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>.
- [150] A. M. Mohamed. One-step functionalization of silver nanoparticles using the orsellinic acid compound isolated from the endophytic fungus *epicoccum nigrum*: characterization and antifungal activity. *Int J Nano Chem*, 1(3):103–110, 2015.
- [151] A. De Cal, I. Larena, M. Liñán, R. Torres, N. Lamarca, J. Usall, P. Domenichini, A. Bellini, X. O. De Eribe, in P. Melgarejo. Population dynamics of *epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. *Journal of Applied Microbiology*, 106(2):592–605, 2009.
- [152] D. S. Hibbett, M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, in R. Lücking. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological research*, 111(5):509–547, 2007.
- [153] V. Cheng, A. Chan, J. and Ngan, K. To, S. Leung, H. Tsoi, W. Yam, J. Tai, S. Wong, in H. Tse. Outbreak of intestinal infection due to *rhizopus microsporus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(9): 2834–2843, 2009.
- [154] S. Sun, Q. Lui, L. Han, Q. Ma, S. He, X. Li, H. Zhang, J. Zhang, X. Liu, in L. Wang. Identification and characterization of *fusarium proliferatum*, a new species of fungi that cause fungal keratitis. *Scientific Reports*, 8(1):1–9, 2018.
- [155] Fungal library *Sordaria* sp. *Sordaria* sp. <https://www.eurofinsus.com/environment-testing/built-environment/technical-support/fungal-library/sordaria-sp/>, 2021. Dostopano: 2022-03-13.
- [156] J. I. Pitt in A. D. Hocking. *Fungi and food spoilage*, volume 519. Springer, 2009.
- [157] E. Kovačec, M. Likar, in M. Regvar. Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. *Fungal biology*, 120(5): 666–678, 2016.
- [158] P. N. Singh, I. R. Sindhu, in G. Singhal. Fungi recorded from seeds and seedlings of *fagopyrum esculentum*. *J. Indian*, 1984.