

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Alternativní metody ochrany proti *Phytophthora cactorum*
na jahodníku**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Ondřej Weigricht

Obor studia: Rostlinolékařství

Vedoucí práce: doc. Ing. Miloslav Zouhar, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Alternativní metody ochrany proti *P. cactorum* na jahodníku jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval panu doc. Ing. Miloslavu Zouharovi, Ph.D. za odborné vedení vědeckého výzkumu a konzultací. Dále bych chtěl poděkovat za poskytnutí cenných informací a dat pro celkové zpracování této diplomové práce. Děkuji své manželce Kláře Weigrichtové za obětavou pomoc při zpracování výsledků i literární rešerše a za celkovou morální podporu.

Alternativní metody ochrany proti *P. cactorum* na jahodníku

Souhrn

Fytoftorová krčková hniloba jahodníku způsobená patogenem *Phytophthora cactorum* je choroba, která nabývá na významu mezi pěstiteli jahod z hlediska jejího rozšiřování v pěstebních systémech a úbytku adekvátních přípravků na ochranu rostlin.

Cílem diplomové práce bylo získat nové informace o účinnosti esenciálních olejů v ochraně jahodníku proti *P. cactorum* v in vitro a in vivo podmínkách. Negativní vliv na životaschopnost *Phytophthora cactorum* in vitro byl zjišťován testováním 10 izolátů tohoto patogenu metodou otrávených ploten a následným vyhodnocením procentuální inhibice růstu mycelia u jednotlivých typů esencí (A (hřebíček+skořice+tymián), B (geranie+tymián) a C (skořice+tymián+kafr)) v pěti různých koncentracích (1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001%), ve třech opakováních. Z výsledků jednoznačně vyplývá, že při použití 1% koncentrace esence bylo dosaženo 100% inhibice růstu u všech tří typů esencí, u všech deseti izolátů *P. cactorum*. V případě 0,1% koncentrace (A2, B2, C2) byla účinnost na inhibici růstu výrazně nižší oproti 1% koncentraci, pohybovala se v rozmezí 15,6-33,7 %.

Negativní vliv na životaschopnost *Phytophthora cactorum* in vivo probíhal v řízených podmínkách skleníku. Hostitelskou rostlinou pro *P. cactorum* byly zvoleny tři odrůdy jahodníku: Wendy, Karmen a Sonáta. Testovány byly tři přípravky založené na esenciálních olejích v 1% koncentraci (A1, č. 1), (B1, č. 2) a (C1, č. 3). Pro porovnání účinku esenciálních olejů na *P. cactorum* a jejich vliv na zdravotní stav rostlin byly založeny tyto varianty: rostliny napadené *P. cactorum* + esenciální oleje, zdravé rostliny + esenciální oleje, rostliny napadené *P. cactorum* bez esenciálních olejů, zdravé rostliny bez esenciálních olejů a rostliny napadené *P. cactorum* a ošetřené jediným registrovaným přípravkem Alliete. Každá varianta byla založena v 5 opakování. Z dosažených výsledků vyplývá, že jednoznačně došlo k napadení rostlin *P. cactorum* v kontrolních variantách, protože ve většině parametrů jsou statisticky významné rozdíly mezi zdravou a inokulovanou rostlinou napříč odrůdami kromě hmotnosti kořenů. Stejně tak jako v in vitro testech i v in vivo testech se projevila vyšší účinnost směsí číslo 1 (A) a 2 (B), je také možné sledovat určitý trend v rozdílech mezi odrůdami, ale tento trend nejeví statisticky významné rozdíly.

V dnešní době čelí syntetické chemické přípravky na ochranu rostlin stále složitějším podmínkám pro registraci a jejich užívání. K dosažení vysokých výnosů, kvalitní produkce a také udržitelného zemědělství je stále více potřeba implementovat metody ochrany rostlin, které se řídí pravidly integrované ochrany rostlin, zejména nepřímé (preventivní) a biologické metody. Je možné, že řešením pro tato kritéria jsou právě aromatické rostliny.

Klíčová slova: jahodník, ochrana rostlin, *Phytophthora cactorum*

Alternative methods of protection of strawberry against to *P. cactorum*

Summary

Phytophthora crown rot of strawberries caused by the pathogen *Phytophthora cactorum* is a disease that is gaining in importance among strawberry growers in terms of its spread in growing systems and the loss of adequate plant protection products.

The aim of the diploma thesis was to obtain new information about the effectiveness of essential oils in the protection of strawberries against *P. cactorum* in vitro and in vivo conditions. The negative effect on the viability of *Phytophthora cactorum* in vitro was determined by testing 10 isolates of this pathogen by the poisoned plate method and subsequently evaluating the percentage inhibition of mycelial growth in individual types of essences (A (clove + cinnamon + thyme), B (geranium + thyme) and C (cinnamon + thyme + camphor)) in five different concentrations (1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%), in triplicate. The results clearly show that using a 1% concentration of the essence, 100% growth inhibition was achieved in all three types of essences, in all ten *P. cactorum* isolates. In the case of 0.1% concentration (A2, B2, C2), the growth inhibition efficiency was significantly lower compared to the 1% concentration, ranging from 15.6-33.7%.

The negative effect on the viability of *Phytophthora cactorum* in vivo took place under controlled greenhouse conditions. Three varieties of strawberry were chosen as the host plant for *P. cactorum*: Wendy, Karmen and Sonata. Three preparations based on essential oils at 1% concentration (A1, No. 1), (B1, No. 2) and (C1, No. 3) were tested. To compare the effect of essential oils on *P. cactorum* and their effect on plant health, the following variants were established: plants infested with *P. cactorum* + essential oils, healthy plants + essential oils, plants infested with *P. cactorum* without essential oils, healthy plants without essential oils and plants infested with *P. cactorum* and treated with a single registered Alliete product. Each variant was based on 5 replicates. The results show that *P. cactorum* plants were clearly infested in the control variants, because in most parameters there are statistically significant differences between a healthy and inoculated plant across varieties other than root weight. As in vitro and in vivo tests, mixtures 1 (A) and 2 (B) showed higher efficacy, it is also possible to observe a certain trend in the differences between the varieties, but this trend does not show statistically significant differences.

Today, synthetic chemical plant protection products face increasingly complex conditions for registration and use. In order to achieve high yields, quality production and also sustainable agriculture, there is an increasing need to implement plant protection methods that follow the rules of integrated plant protection, especially indirect (preventive) and biological methods. It is possible that aromatic plants are the solution to these criteria.

Keywords: strawberry, plant protection, *Phytophthora cactorum*

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Jahodník	10
3.1.1 Faktory ovlivňující pěstování jahodníku	13
3.1.2 Abiotické faktory	13
3.1.3 Biotické faktory	13
3.2 Charakteristika <i>Phytophthora cactorum</i> (Lebert & Cohn) J. Schröt. 1886	15
3.2.1 Historie patogena	15
3.2.2 Diagnostické metody	17
3.2.2.1 Izolace	17
3.2.2.2 Symptomatická analýza	17
3.2.2.3 Rozlišovací znaky pro mikroskopickou identifikaci	18
3.2.2.4 Molekulární metody diagnostiky	18
3.2.3 Hostitelské spektrum	21
3.2.4 Životní cyklus <i>P. cactorum</i> na jahodníku	22
3.2.4.1 Životní cyklus <i>P. cactorum</i> způsobující kožovitou hnilobu jahod	22
3.2.4.2 Životní cyklus <i>P. cactorum</i> způsobující fytoftorovou krčkovou hnilobu jahodníku	23
3.3 Charakteristika fytoftorové krčkové hniloby jahodníku	24
3.3.1 Příznaky kožovité hniloby jahod	24
3.3.2 Příznaky fytoftorové krčkové hniloby jahodníku	25
3.4 Hospodářský význam	26
3.5 Metody ochrany jahodníku proti <i>P. cactorum</i>	27
3.5.1 Provádění ochranných opatření proti <i>P. cactorum</i>	30
3.5.1.1 Nepřímé metody ochrany	30
3.5.1.2 Fyzikální metody ochrany	31
3.5.1.3 Biologická ochrana	31
3.5.1.4 Chemická ochrana	33
3.5.2 Kožovitá hniloba jahod	35
3.5.2.1 Preventivní opatření	35
3.5.2.2 Nechemické metody ochrany	35
3.5.2.3 Chemická ochrana rostlin	35
3.5.2.4 Biologické metody ochrany	36
3.5.3 Fytoftorová krčková hniloba jahodníku	37

3.5.3.1	Nechemické metody ochrany	37
3.5.3.2	Chemická ochrana	37
3.5.3.3	Biologické metody ochrany	39
3.6	Esenciální oleje.....	40
3.6.1	Metody získávání olejů	41
3.6.2	Hřebíčkový esenciální olej (<i>Eugenia caryophyllata</i> (L.) Merr. et L. M. Perry, 1939) HR	41
3.6.3	Skořicový esenciální olej (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Schaeff., 1760) CINO42	
3.6.4	Tymiánový esenciální olej (<i>Thymus vulgaris</i> L., 1753) TV.....	42
3.6.5	Gerániový esenciální olej (<i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér., 1789) PG.....	43
3.6.6	Citronelový esenciální olej (<i>Cymbopogon winterianus</i> (L.) Spreng.) CW .	44
3.6.7	Kafrový esenciální olej (<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J.Presl, 1825) CINO45	
4	Metodika	46
4.1	Vliv esenciálních olejů na <i>P. cactorum</i> v in vitro testu	46
4.1.1	Přeočkování izolátů.....	48
4.1.2	Inokulace izolátů <i>P. cactorum</i> na otrávené plotny	48
4.1.3	Vyhodnocení výsledků	49
4.2	Vliv aplikace esenciálních olejů na <i>P. cactorum</i> v in vivo podmínkách nádobového testu 51	
4.2.1	Vyhodnocení výsledků	52
5	Výsledky	54
5.1	In vitro testy	54
5.1.1	In vivo testy	62
6	Diskuze	68
7	Závěr	70
8	Literatura.....	72
9	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

V dnešní době začínáme vidět nevýhody velkoobjemového používání syntetických chemických přípravků na ochranu rostlin zejména vzhledem k jejich rezdiálnímu chování v přírodě. Evropská unie i česká republika apelují na implementaci integrované ochrany rostlin a zároveň na stále přísnější pravidla pro registraci pesticidů a jejich užívání. Jahodník je velmi oblíbené stolní ovoce a pro své vlastnosti se vyznačuje vysokou tržní hodnotou.

Fytoftorová krčková hniloba jahodníku způsobená patogenem *Phytophthora cactorum* je choroba, která nabývá na významu mezi pěstiteli jahod z hlediska jejího rozšiřování v pěstebních systémech a úbytku adekvátních přípravků na ochranu rostlin. Za příznivých podmínek pro život může *P. cactorum* způsobit významné hynutí rostlin i přímé poškození plodů. Výsledkem jsou nejen ekonomické ztráty, ale také riziko zamoření pěstebních ploch patogenem.

P. cactorum je půdní patogen, který napadá kořenovou soustavu jahodníku, ale i květy nebo plody. Tím se boj proti tomuto patogenu výrazně ztěžuje, protože úplná eradikace v půdy je téměř nerálná. V případě, že radikálně dezinfikujeme silnými fumiganty (na fyzikální či chemické bázi) v polních podmínkách, díky komplexnosti půdního systému jsme nakonec schopni dosáhnout jen částečné účinnosti při kontrole patogena. Pro kontrolu fytoftorové krčkové hniloby jahodníku (FHKKJ) se při produkci ovoce pěstitelé spoléhají na fumigaci půdy, dezinfekci závlahové vody, použití zdravé sadby a na ochranná fungicidní ošetření. Se stále se zpřísňujícími pravidly a enormními náklady na registraci nových chemických přípravků na ochranu rostlin, je vidina vzniku nových téměř nereálná.

Nepřímé metody ochrany mají spíše preventivní charakter a jejich cílem je zamezit vzniku choroby vytvářením nepříznivých životních podmínek pro vývoj patogenů. Nicméně prevence a hygiena jsou nesmírně důležité základní složky ochranných opatření proti *P. cactorum*, protože tento patogen je nejčastěji introdukován infikovaným množitelenským materiálem (sazenice, řízky atd.). Významnou nepřímou metodou, která svým způsobem konkuruje vývoji nových metod ochrany, je šlechtění rostlin. Existují vyšlechtěné odrůdy, které disponují zvýšenou odolností či přímo rezistencí proti *P. cactorum*.

Jelikož je šlechtění rostlin bez použití GMO zdoluhavý proces, vzniká prostor pro vznik nových alternativních metod ochrany rostlin na principu biologicky aktivních látek jako adekvátní, efektivní, ekonomicky přijatelná a udržitelná forma. Například použití antagonistických mikroorganismů, které potlačují přímo životaschopnost *P. cactorum* (antagonistické rhizobakterie nebo parazitické houbové organismy). Dalším způsobem je podpora odolnosti rostlin pomocí symbiotických bakterií. Podle (Evenhuis, a další, 2014) lze snížit šíření infekce patogena dezinfekcí závlahové vody pomocí pomalé pískové filtrace, která účinně odstranila *P. cactorum* z drenážní vody. Závažnost onemocnění u rostlin jahodníku byla snížena o 45 až 65%. Nadějně výsledky ukázala ošetření kyselinou salicylovou, po které následovala inokulace endofytickou houbou *Acremonium strictum* a pěstování *Lepidium sativum* jako předplodinu.

Je možné, že řešením pro tato kritéria jsou právě aromatické rostliny. Během posledních 20 let začal vzrůstat zájem o výzkum aktivní látek a sekundárních metabolitů z rostlin s pesticidními účinky, který spěje k vývoji nových přípravků na této bázi. Tato práce se zaměřuje na alternativní metodu ochrany jahodníku proti *P. cactorum* za použití esenciálních olejů a jejich směsí z *Eugenia caryophyllata*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Thymus vulgaris*, *Pelargonium graveolens*, *Cymbopogon winterianus*, *Cinnamomum camphora*. Výzkum vlivu esenciálních olejů proti *P. cactorum* probíhá v in vitro podmínkách, tak i in vivo podmínkách.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza pro tuto diplomovou práci je založena tvrzení, zda existuje kombinace esenciálních olejů, které budou mít negativní vliv na životaschopnost *Phytophthora cactorum* v in vitro a in vivo podmínkách.

Cílem diplomové práce bylo získat nové informace o účinnosti esenciálních olejů v ochraně jahodníku proti *P. cactorum* v in vitro a in vivo podmínkách.

3 Literární rešerše

3.1 Jahodník

Jahodník je plodina, která se pěstuje prakticky ve všech místech mírného pásma, ale také částečně v subtropických či tropických oblastech. V dnešní době nabývá pěstování jahod stále většího významu, jelikož je to výborné stolní ovoce a zároveň vhodná surovina pro zpracovatelský průmysl. Jahodník získal na oblíbenosti díky: poměrně malé náročnosti na klimatické podmínky; brzkému přechodu do plodnosti po výsadbě; vysoké tržní hodnotě; poměrně menší potřebě pěstebních zásahů; malé pravděpodobnosti decimování úrody mrazy – každoroční plodnosti. Jahoda je prakticky první dozrávající čerstvé ovoce a pomocí bohatého sortimentu lze dopěstovávat čerstvé plody během celého vegetačního období. Další výhodou je vynikající chuť, aroma a vysoký obsah nutričních látek (zejména vitamínu C). Rod *Fragaria* (jahodník) čeleď Rosaceae (růžovité) je jediná bylina mezi ovocnými druhy mírného pásma, která se dostala do literatury již ve starověku díky peru Hippokrata, Plinia, Ovidia a Vergilia. Ve středověku se písemné zprávy o pěstování této byliny vyskytují stále častěji. Od 14. století byly ve Francii plané drobnoplodé odrůdy jahodník obecný (*Fragaria vesca* L., 1753), jahodník trávence (*Fragaria viridis* Weston, 1771) a jahodník truskavec (*Fragaria moschata* Duchesne, 1788) vyhlášeným a hojně pěstovaným ovocem. Avšak šlechtění těchto planých odrůd bylo zatím bez větších úspěchů. V roce 1760 se k těmto druhům přidala drobnoplodá varieta jahodník měsíční (*Fragaria vesca* var. *semperflorens*). Později byl do Evropy dovezen z Jižní Ameriky jahodník chilský (*Fragaria chiloënsis* (L.) Mill.) a ze Severní Ameriky jahodník virginický (*Fragaria virginiana* Duch.). Náhodné a posléze cílevědomé křížení těchto druhů patrně dalo vzniknout první kulturní velkoplodé odrůdě s názvem jahodník ananasový (*Fragaria ananassa* Duch.), která byla poprvé představena v letech 1766 ve Francii. Jiný výklad popisuje původ vzniku této odrůdy v Holandsku pod názvem jahodník velkoplodý (*Fragaria grandiflora*). U nás se velkoplodý jahodník poprvé vysadil v roce 1891 rukou zahradníka Rudolfa Strimpla. Dnes se pěstuje jahodník také zásluhou zahrádkářského hnutí prakticky na celém území, přičemž tento rod představuje více než 150 druhů. Pokud vezmeme v úvahu pouze nejdůležitější druhy lze tento počet snížit na 20. V příloze 1 jsou seskupeny podle počtu chromozomů na diploidní, tetraploidní, hexaploidní a oktaploidní druhy se základním haploidním počtem sedmi chromozomů (Harant, a další, 1986) (Novák, 2013) (Blažek, a další, 1998).

Jahodník patří mezi vytrvalé ovocné byliny dosahující výšky od 10 do 25 cm s docela mělkým kořenovým systémem viz příloha 2. Různě hustý trs jahodníku je tvořen přizemní růžicí trojčetných pilovitých listů, které vyrůstají z krátkého, někdy i rozvětveného stonku na řapících dlouhých 10–30 cm. Stonky jsou zakončeny vegetačním vrcholem s mladými listy, jinak srdíčkem a směrem k zemi přecházejí v kořenový krček (rozhraní mezi nadzemní a podzemní částí jahodníku). Kořenový krček u jahodníku lze charakterizovat jako podděložní, ztlustlá a později dokonce zdřevnatělá část hlavního kořene. Jeho postupným přirůstáním se vytváří podzemní osa – jednoduchý nebo u starších rostlin rozvětvený hnědě šupinatý oddenek. Jedinec je schopen se rozrůstat v hustý trs, protože každé rozvětvení oddenku je zakončeno opět kořenovým krčkem s vegetačním vrcholem. Dále rostlinu tvoří odnože (plazivé výhony, nebo šlahouny vyrůstající z přizemních stonků nad kořenovým krčkem), krátký a rozvětvený hlavní kořen s vedlejšími kořeny viz příloha 3. Přesto, že se převážná část kořenového systému rozprostírá v hloubce asi 10–30 cm, některé kořeny sahají do hloubky i přes 100 cm. Staré kořínky v průběhu existence rostliny postupně odumírají a tmavnou. Proces narůstání

mladých kořínků většinou probíhá na kořenovém krčku – na horní přirůstající části podzemní osy. Následně dochází ke známému nadzvedávání celé rostliny. Podle odrůdy vyrůstají ze stonku květní stvolky (bez odnoží), které se různě větví v okolkové vrcholíky bílých pětičetných květů. U nás pěstované odrůdy jsou oboupohlavní a samosprašné. Zdužnatělé lůžko opyleného květu pak vyroste v červeně se zbravující souplodí nažek – jahoda. Dle indukce kvetení se jahodník rozděluje na remontantní (stáleplodící), jednoplodící (sezóní, krátkodenní, červenový) a měsíční (indukce kvetení bez ohledu na fotoperiodu). Remontantní kultivary produkují ovoce vícekrát ročně (přibližně jednou za šest týdnů) kvůli jejich odlišné citlivosti na délku dne ve vztahu k teplotě, přičemž jednoplodící vytvářejí květní pupeny jen během krátkého dne (min. 7–14 cyklů) (Husaini, a další, 2016) (Novák, 2013) (Harant, a další, 1986).

Nemoci kořenů a kořenového krčku jahod nelze správně diagnostikovat a pochopit bez znalosti biologie zdravého kořenového systému. Z vytrvalých kořenů se tvoří přechodné rozvětvené vlásečnicové kořeny, které se časem přemění na strukturální kořeny vyrůstající z korkového kambia, jež se následně dělí dále na vlásečnicové. Naproti tomu vlásečnicové kořeny, které jsou zpočátku bílé a poté zbarvené do žluté až světle hnědé barvy, přirozeně odumírají nejpozději do dvou týdnů. Tato místa bývají brzy nahrazena nově vytvořenými kořeny. Přestože mají vlásečnicové kořeny krátkodobou existenci, zdraví a produktivita jahodníku závisí do značné míry právě na hladkém průběhu tohoto cyklu inicializace odumírání a nahrazování kořenů. Růst kořenů je ovlivněn nejen klimatickými faktory, vlastnostmi půdy a provzdušněním půdy, ale také množstvím zásob živin, které rostlina uloží. U jahod dochází k růstu kořenů primárně ve vegetačním období a reprodukční nečinnosti. Velkoplodé jahodníky nebo remontantní druhy mohou vstoupit do dormance, pokud nemají dostatečné množství zásob živin pro obnovu a podporu růstu kořenů. Tyto rostliny mají tendenci další rok špatně růst a jejich oslabený kořenový systém je snadnou kořistí pro patogenní houby. Vlásečnicové kořeny se nejsou schopné přizpůsobit výraznému snížení obsahu kyslíku a hynou, pokud míra nasycení půdy vodou dosahuje úrovně, kdy se vylučuje kyslík z půdy. Při krátkodobém podmáčení půdy jsou mrtvé kořeny nahrazeny novými, které jsou kratší a silnější schopné tolerovat vlhčí podmínky. Podmáčené půdy jsou obecně nepříznivé pro růst kořenů jahodníku a zároveň umožňují aktivní napadání kořenů houbovými patogeny. Nebezpečné je pro jahodník jarní střídání teplých a studených dnů, které mohou způsobit takzvané vytranspirování rostliny. V mírných pásmech světa v zimním období může docházet k poškození kořenů jahodníku střídajícím se jejich zmrznutím a rozmrznutím, což otevírá cestu pro infekci způsobenou houbovými patogeny kořenů.

Existují stovky různých vyšlechtěných kultivarů jahodníku, aby vyhovovaly konkrétním environmentálním nebo marketingovým požadavkům. Každý kultivar má odlišný výnosový potenciál v závislosti na klimatu a podmínkách, ve kterých se udržuje. Z toho důvodu se žádný kultivar celosvětově ani na celostátní úrovni nepěstuje. Od počátku 19. století se provádí šlechtitelský výzkum zaměřený na tvorbu nových kultivarů s lepšími inovativními vlastnostmi rostlin a plodů. Primárním cílem šlechtitelského programu v budoucnosti zůstane pravděpodobně výnos, prodloužení období sklizně (zejména u fotoperiodicky neutrálních genotypů), kvalita plodů (výživové hodnoty) a výzkum odolnosti rostlin za účelem omezení používání pesticidů. Stále důležitější bude výběr nových genotypů přizpůsobených pro rychlejší sklizeň (snadno sbíratelné plody, kompaktní habitus rostliny a plody s dlouhými stonky). V neposlední řadě budou muset šlechtitelské programy vzít v úvahu probíhající změny klimatu, konkrétně postupné zvyšování a náhlou změnu teplot. Klasická metoda šlechtění jahodníku na základě křížení, výběru získaných sazenic a následného vyhodnocení se bude stále více kombinovat s využitím genetických map a molekulárních markerů, což urychlí

dobu selekce. Tyto nové znalosti zlepšují další aplikaci přenosu genů (vedoucí ke geneticky modifikovaným organismům) a validaci genů kontrolujících důležité znaky (např. odolnost, kvalita a nutriční vlastnosti). Nicméně v tuto chvíli zůstává limitem aplikace technologie GMO nedostatečné přijetí ze strany spotřebitelů (Husaini, a další, 2016).

V přílohách 5, 6, 7 a 8 je postupně uvedeno několik statisticky zpracovaných dat ohledně vývoje jahodářství v České republice a Evropě. V současné době obchodní řetězce přestávají přijímat dodávky jahod vypěstovaných na poli a upřednostňují jahody sklizené pod krytem, které jsou prosté znečištění zeminou a mají harmonickou konzistenci a chuť. Masivnímu rozvoji pěstování jahod pod fóliovými kryty brání především investiční náročnost a také nedostatek zkušeností se zvládnutím této pěstitelské technologie. V roce 2019 tržby za celkovou produkci ovoce stouply v porovnání s předchozím rokem o 12 % a ve výsledku dosáhly celkem 2,3 mld. Kč. Z výnosů ovoce z produkčních sadů vznikla tržba 1,4 mld. Kč (tj. o 11 % více než v roce 2018), přitom majoritní podíl na tržbách měla jablka (65 %) a jahody (7,5 %) (Buchtová, 2020; 2013; 2010; 2002).

3.1.1 Faktory ovlivňující pěstování jahodníku

Stresové faktory omezující růst a vývoj rostlin se dělí do dvou hlavních skupin: biotické a abiotické. Biotická skupina stresorů zahrnuje patogeny (bakterie, houby a viry aj.), choroby (infekce) a konkurenci. Zatímco teplota, sůl, sucho, záplavy a toxicita těžkých kovů jsou příklady abiotických stresových faktorů. Všechny tyto stresové faktory představují pro rostliny hrozbu a brání jim v dosažení jejich plného genetického potenciálu, což omezuje celosvětovou produktivitu plodin (Husaini, a další, 2016).

3.1.2 Abiotické faktory

Jahodník díky své mnohotvárnosti a plasticitě můžeme pěstovat téměř ve všech oblastech České republiky při respektování nároků odrůdy na světlo a teplo. Uspokojivých výnosů a kvality plodů lze dosáhnout i v oblastech vyšších než 500 m. n. m., při průměrné roční teplotě 7 °C s nejrůznějšími půdními podmínkami kromě půd studených, jílovitých nebo zamokřených, popřípadě naopak štěrkovitých a vyložené písčité. Teplé a suché oblasti jsou ovšem pro pěstování nevhodnější. Obecně platí, že nejideálnější jsou jihozápadní svahy, kde panují nejlepší světelné, teplotní a vlhkostní podmínky. Nevhodné bývají východní a jižní expozice i mrazové kotliny. Optimální vláhové poměry se pohybují okolo 600–700 mm srážek, nicméně pokud vláhová dotace není v souladu s potřebami vláhy zejména v dubnu a květnu, je nutná doplňková závlaha. Obráceně při opakujících se srážkách a vyšších teplotách v červnu se zvyšuje riziko napadení plodů plísní šedou či jinými patogeny způsobující hniloby. Co se týče pH půdy, jahodníku vyhovuje mírně kyselé mezi 5,5 a 6,5. Na zásaditých půdách s pH nad 8 trpí jahodník přinejmenším živinovým deficitem projevujícím se chlorózami. Jahodník je velmi citlivý na zasolené půdy a na podmáčené půdy se stojatou vodou či vysokou hladinou spodní vody. Další faktory jako radiace a pesticidy mohou taktéž negativně ovlivňovat pěstování jahodníku (Harant, a další, 1986) (Blažek, a další, 1998).

Nerespektování nároků na stanovištní podmínky nebo náhlé klimatické změny způsobují stresové faktory, které jsou hlavní příčinou selhání plodin a negativně ovlivňují pěstování jahodníku. Abiotické stresy nutně nemusí vést k úmrtí jedince, nicméně oslabují celkový fitness rostliny, která je tak náchylnější vůči biotickým původcům stresové reakce. Jakákoli změna podmínek prostředí, která má za následek méně než optimální reakci rostlin, je považována za stresující. Rostliny mohou mít mechanismy vyhýbání se nebo tolerance (snášenlivosti) vůči jakémukoli stresovému faktoru, aby se vyrovnali se stresem. Jedním z nejdůležitějších způsobů, jak zvýšit produktivitu v podmínkách zatížených stresovými faktory, je vývoj nových kultivarů, které mohou tolerovat stres nebo se mu vyhnout. V tomto případě fyziologický a molekulární výzkum mechanismů abiotického stresu u různých druhů a kultivarů má velký význam pro budoucí šlechtitelské programy jahodníku, vzhledem k složitosti jevů abiotických stresů (Husaini, a další, 2016).

3.1.3 Biotické faktory

Mezi biotické faktory, které mohou stresovat rostliny jahodníku spadají vnitrodruhové a mezidruhové vztahy. Antagonistické vnitrodruhové vztahy neboli kompetice nastávají například v situaci špatně zvoleného výsadbového sponu rostlin, u kterých ve výsledku dochází ke snižování výnosového potenciálu. Mezi kulturní a plevelnou rostlinou dochází k mezidruhové interakci, která je pro kulturní rostlinu negativní například: kompetice, amensalismus, parazitismus nebo alelopatie. Další biotické faktory ovlivňující genetický potenciál jahodníku jsou škůdci a infekce (choroby). Jahodník je neustále vystavován mnoha druhům patogenů, jenž

mohou způsobit různé odchylky od normálních fyziologických funkcí rostliny. Příkladem z řady škůdců jahodníku je květopas jahodníkový (*Anthonomus rubi*), který nakousává stopky květních poupat a lokálně může zničit až 80 % úrody. Dalšími škůdci jsou zástupci mšice jahodníkové, kteří škodí jednak sáním na spodní straně listů, ale také mohou být vektory jahodníkových virů. Hádátka jahodníkové taktéž působí škody a snižuje výnosy až o 40-75 %. Hospodářský význam mají i škůdci jako: lalokonosec rýhovaný, mravenci, ptáci, plži, třásnokřídílí nebo svilušky (Maas, 1998) (Beránek, a další, 2021).

Původci chorob jsou viry, bakterie, houby, houbám podobné organismy aj. Největší zastoupení patogenních organismů je však z řad hub nebo houbám podobným organismům. Například listy zvládne infikovat padlí jahodníku (*Podosphaera aphanis* (Wallr.) U. Braun & S. Takam.), bílá listová skvrnitost jahodníku (původce *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lindau) nebo viróza jako je virus lemování žilek jahodníku aj. Široce polyfágním a variabilním druhem je šedá hniloba jahod, která napadá čepele a řapíky listů, stopky květů, květy, nezralé plody, ale zejména zrající a zralé plody. Jedná se o rozšířené a velice škodlivé onemocnění jahodníku, které za příznivých podmínek a u náchylných odrůd může způsobit až kalamitní ztráty. Dále se setkáváme s patogeny, které napadají kořenovou soustavu a kořenový krček. Většinou tyto organismy mají velmi škodlivý potenciál na jahodníku. Důsledkem bývá výrazné snížení výnosu, ohniskové hynutí rostlin a předčasná likvidace porostů. Do této skupiny lze zařadit například antraknózovou skvrnitost jahodníku (*Colletotrichum acutatum* Simmonds ex Simmonds), červenou hnilobu kořenů jahodníku (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman (1940)) a fytoftorovou krčkovou hnilobu jahodníku, kde původcem je *Phytophthora cactorum* Lebert & Cohn, (1870). O fytoftorové krčkové hnilobě se zmiňují podrobněji v dalších kapitolách (Beránek, a další, 2021) (Husaini, a další, 2016).

Podle (Agrios, 2005) choroby rostlin způsobené rodem *Phytophthora* jsou v zásadě dvou typů:

1. Nemoci, které postihují části rostlin přítomné v půdě nebo v kontaktu s půdou, např. kořeny, spodní stonky, hlízy, semena a masité plody ležící na půdě.
2. Nemoci, které postihují pouze nebo převážně nadzemní části rostlin, zejména listy, mladé stonky a plody (Agrios, 2005).

Propuknutí choroby není obligátní, jelikož na jedné straně rostliny disponují sofistikovanými obrannými mechanismy, které zahrnují předem vytvořené fyzikální a chemické bariéry nebo indukovatelné obranné mechanismy. Na druhé straně po vzájemném kontaktu původce onemocnění s hostitelem musí existovat vhodné podmínky pro vznik choroby. Jinak řečeno citlivost hostitelské rostliny (náchylnost), patogenita a virulence konkrétního patogena, příznivé podmínky prostředí (teplota, vlhkost atd.), čas a vliv člověka vyjadřují faktory nezbytné pro zahájení a rozvoj choroby rostlin. Tuto vzájemnou interakci všech pěti složek vyjadřuje čtyřúhelník choroby s tím, že intenzitu choroby ovlivňuje různá kombinace jednotlivých faktorů. U pěstovaných jahod (*F. × ananassa*) se každý kultivar liší svou citlivostí na různé patogeny, na jejich rasy nebo patotypy. Tyto rasy jsou nerovnoměrně rozmístěny po celém světě a často se vyskytují pouze v konkrétních pěstebních oblastech, a proto jsou způsobené škody a ekonomické ztráty pro každý region různého rozsahu (Husaini, a další, 2016) (Agrios, 2005).

3.2 Charakteristika *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt. 1886

Rodové označení *Phytophthora* má doslovný význam ničitel rostlin, a to z dobrého důvodu. Tento rod zahrnuje více než 80 druhů z většiny důležitých rostlinných patogenů. Druhy *Phytophthora* způsobují řadu ničivých chorob na celé řadě zástupců rostlin, od sazenic jednoleté zeleniny nebo okrasných rostlin až po plně vyvinuté ovocné stromy nebo keře a lesní stromy, na kterých je příčinou značných ekonomických ztrát. Většina reprezentantů tohoto rodu způsobuje hnilobu kořenů, padání klíčnicích rostlin a hnilobu kořenových krčků, hlíz a cibulovin podobně jako *Pythium* spp. Jiné jsou příčinou hniloby pupenů nebo plodů a některé mají za následek plísňě listů, mladých větviček a plodů. Některé druhy napadají pouze jeden nebo dva druhy hostitelských rostlin, jiné však mohou způsobit podobné nebo odlišné příznaky na mnoha různých druzích hostitelských rostlin. Nejznámějším druhem je *Phytophthora infestans*, původce plísňě bramborové, ale i několik dalších zástupců také patří mezi velmi fytopatogenní ničivé choroby: *Phytophthora cactorum*, *P. cambivora*, *P. cinnamoni*, *P. citrophthora*, *P. fragariae*, *P. palmivora* a *P. syringae*. Společným znakem je schopnost zapříčinění primárně kořenových hnilob a hnilob kořenových krčků, ale také rakoviny nebo hniloby plodů. Několik dalších druhů jako je *P. capsici*, *P. cryptogea*, *P. megasperma* a *P. parasitica*, způsobuje hniloby kořenů, stonků a plodů u mnoha druhů zeleniny, okrasných rostlin nebo dřevin a polních plodin. Druhy *Phytophthora cactorum* a *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* jsou nejvýznamější patogeni na jahodníku a vyskytují se téměř ve všech zemích, kde se jahody pěstují (Agrios, 2005) (Husaini, a další, 2016).

Phytophthora cactorum je ekonomicky významný půdní patogen mnoha bylin a dřevin. V souvislosti s touto diplomovou prací je cílem detailněji popsat kmen *P. cactorum*, který se vyskytuje na pěstovaných jahodách (*Fragaria vesca*, *F. × Ananassa* aj.), způsobující jak kožovitou hnilobu jahod, tak fytoftorovou hnilobu kořenového krčku. Například na jabloni (*Malus domestica*) je příčinou hniloby kořenového krčku a kořenů jiný kmen *P. cactorum*. Podobně je tomu u hniloby kořenů a syndromu odumírání na Rhododendronu. Obecně *Phytophthora cactorum* napadá širokou škálu hostitelů, ale ne všechny kmeny jsou však schopné infikovat všechny hostitelské druhy. Ukázalo se, že izoláty *Phytophthora cactorum* z kořenových krčků jahodníku jsou geneticky velmi uniformní a bylo dokázáno, že mají původ z jednoho klonu, přinejmenším v rámci EU. Analýza mikrosatelitů *Phytophthora cactorum* z jahodníku ukázala, že kožovitá hniloba jahod a krčková hniloba jsou způsobeny geneticky stejnými kmeny téhož druhu. Zároveň bylo zjištěno, že žádný z izolátů *Phytophthora cactorum* z jiných hostitelů nezpůsobil příznaky fytoftorové krčkové hniloby na jahodníku. Proto původce fytoftorové krčkové hniloby vykazuje stejný patotyp *Phytophthora cactorum* jako původce choroby kožovitá hniloba jahod, jelikož je nelze morfologicky odlišit (Hantula, a další, 2000) (Husaini, a další, 2016) (Schafleitner, a další, 2013).

3.2.1 Historie patogena

Phytophthora cactorum, která je příčinou fytoftorové krčkové hniloby jahodníku a kožovité hniloby jahod má dlouhou historii ve fytopatologii. Podle Risteskiho et al. (2019) rod *Phytophthora* byl poprvé zaznamenán v roce 1845, kdy německý mykolog Heinrich Anton de Bary identifikoval *Botrytis infestans* jako původce plísňě bramborové (plně popsána v roce 1876 jako *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary), která byla hlavním faktorem způsobující ztráty na výnosu brambor během Velkého irského hladomoru v letech 1844-1886. *Peronospora cactorum* (Lebert & Cohn) byla poprvé popsána J. Schrötem v roce 1870 jako příčina

hniloby na kaktusech *Cereus giganteus* a *Melocactus nigrotomentosus* v České republice. Tento organismus podobný houbám byl později převeden do výše zmíněného rodu *Phytophthora* (Risteski, a další, 2019).

Blackwellová (1943) avšak uvádí, že tento druh oomycety způsobující hnilobu kaktusů (*Peronospora cactorum*) byl poprvé představen Lebertem a Cohnem až v roce 1871. Následně de Bary v roce 1876 navrhl nový rod *Phytophthora* založený na *Peronospora infestans*. Po objevení dalších druhů z rodu *Phytophthora* H. A. de Bary (1881) je shromáždil společně s *P. cactorum* do souhrnného druhu *P. omnivora*. Nicméně J. Schröter (1886) rozpoznal původní specifický epiteton slova *cactorum* a *P. cactorum* zůstává dodnes (Blackwell, 1943). Následně byla celosvětově nalezena na více než 250 rostlinných druzích v nejméně 150 rodech (Hudler, 2013).

Od objevení tohoto patogenu vznikala v průběhu dějin mnohá alternativní označení, podle hostitelů, na kterých se objevoval: *Peronospora fagi* R. Hartig (1876), *Phytophthora. fagi* (R. Hartig) R. Hartig (1879), *Peronospora sempervivi* Schenk (1875), *Phytophthora paeoniae* D.C. Cooper & Ch. Porter 1928. V současné době jsou používána synonyma jako *Peronospora cactorum*, *Phloeophthora cactorum*, *Phytophthora fagi*, *Phytophthora omnivora*, *Nozemia cactorum*, *Nozemia fagi*, *Peronospora fagi* a *Phloeophthora cactorum* (Beránek, a další, 2021) (Kang, 2006).

Kožovitá hniloba jahod byla poprvé zjištěna v USA v roce 1924, ale nyní se vyskytuje celosvětově. Fytoftorová krčková hniloba jahodníku byla poprvé hlášena v Německu v roce 1952 (podle (Schafleitner, a další, 2013) to bylo již v roce 1950), poté ve Francii v roce 1960 a posléze byla zaznamenána v mnoha dalších zemích po celém světě, kde se pěstují jahody. Ve Finsku a dalších severních zemích způsobuje *P. cactorum* ztráty na výnosech formou hniloby kořenového krčku jahodových plantáží od roku 1990 (Hantula, a další, 2000).

Phytophthora cactorum spadá podle databáze Index Fungorum do následující taxonomické linie:

- impérium: Eukaryota – buněčné organismy,
- říše: Chromista (heterotrofní),
- oddělení: Oomycota,
- třída: Peronosporae,
- podtřída: Peronosporidae,
- řád: Peronosporales,
- čeleď: Peronosporaceae,
- rod: *Phytophthora*,
- druh: *cactorum* (Kirk, 2021).

Historicky byl rod *Phytophthora* umístěn do Pythiales s *Pythium* a příbuznými rody, ale novější fylogenetická analýza ukázala bližší příbuznost s plísněmi k Peronosporales. *P. cactorum* je umístěna v Clade 1a, nejvíce příbuzná *P. pseudotsugae* patogenu sazenic douglasky viz příloha 9 (Kang, 2006) (Agrios, 2005).

3.2.2 Diagnostické metody

První krok při implementaci vhodných strategií pro zvládnání chorob a vhodných kontrolních opatření vyžaduje jednoznačnou identifikaci (diagnostiku) organismu odpovědného za infekci na jahodníku. Bez diagnostiky by nemohla existovat procedura (řízení) ochrany rostlin. Diagnostický proces zahrnující rozpoznávání příznaků (spojených s chorobou) a znaků, které nejsou navenek pozorovatelné vyžaduje intuitivní úsudek i použití vědeckých metod. K diagnostice výskytu onemocnění se používá několik konvenčních technik. Mezi tyto techniky patří vizuální kontrola a rozpoznávání symptomů nebo izolace a zkoumání patogenů plodin pomocí mikroskopie. Tyto techniky jsou časově náročné a nemusí s jistotou detekovat latentní infekce. Pro rychlou diagnostiku bylo vyvinuty diagnostické metody jako imunotesty, metody založené na sondách nukleových kyselin a techniky založené na PCR (polymerázová řetězová reakce). Je důležité rozlišovat různé druhy houbových patogenů jahod, jelikož mnoho z nich má podobné příznaky. Po přesné identifikaci patogenu je nezbytné navrhnout nejlepší postup pro jeho potlačení. Mnoho patogenů podléhá zvláštní regulaci prostřednictvím karanténních programů napříč státy či lokálně. Nejlepší cestou vpřed pro identifikaci patogenů je použití rychlejších metod umožňujících detekovat choroby ještě dříve, než se příznaky objeví (Husaini, a další, 2016) (Vidhyasekaran, a další, 2004).

3.2.2.1 Izolace

Zdá se, že onemocnění kořenového krčku jahodníku je vyvoláno zřetelným patotypem *P. cactorum*, protože pouze izoláty z nemocných kořenových krčků jahodníku byly v inokulačních experimentech patogenními pro jahodník. *Phytophthora* spp. může být navazena z půdy, kde přetrvává řadu let nebo z vody, díky které se rozšiřuje. Mnoho technik navazování není druhově selektivních a k identifikaci druhů je zapotřebí například mikroskopických metod. Pro úspěšnou izolaci fytoftory ze vzorků půdy a vody byla popsána celá řada metod, včetně metod aranžování půdy na misky nebo návnad. Populace *Phytophthora* spp. mohou kolísat v závislosti na ročním období, proto je většinou nutné sbírat vzorky v různých ročních obdobích, aby bylo dosaženo přesného obrazu hustoty populace (Martin, a další, 2012).

P. cactorum (fytoftora) lze také izolovat z kořenové nebo stonkové tkáně infikovaných rostlin a kultivovat na několika selektivních médiích. Tyto média jsou citlivá na světlo, a proto by měla být udržována ve tmě. Selektivní média pro izolaci se obvykle sestávají z agaru kukuřičné mouky (CMA), bramborového-dextrózoového agaru nebo čeřeného agaru se šťávou V8 (cV8) doplněných kombinací antibiotik včetně pimarcinu, ampicilinu, rifampicinu, vankomycinu, nystatinu a fungicidů pentachlornitrobenzenu (PCNB) a hymexazolu. Selektivní aktivita těchto médií je způsobena hlavně pimarcinem nebo nystatinem, které jsou účinné proti většině hub z říše Eumycota. Důležitá pozornost by měla být věnována také kvalitě nebo typu materiálu vzorku, ze kterého je založen pokus o izolaci (kůra, list, půda nebo voda). Izolace *Phytophthora* spp. je například dosaženo z lézí (bez povrchové sterilizace) v situaci, když je infekce aktivní. Vzorky jsou odebrány z postupujícího okraje léze (Rivard, 2007) (Martin, a další, 2012) (Maas, 1998).

3.2.2.2 Symptomatická analýza

Některé patogeny produkují charakteristické viditelné příznaky, které lze snadno rozpoznat v terénu. Příznak je částečně specifická reakce rostliny na působení škodlivého činitele, který se klasifikuje např. podle časové posloupnosti, intenzity rozsahu, stálosti, polohy aj. Počáteční stadia mnoha chorob jsou nenápadná a

může být problematické provést rychlé vizuální hodnocení, dokud úroveň onemocnění nebude dostatečně vysoká. Dokonce ani v pokročilých stádiích vývoje příznaků, nelze některá onemocnění s jistotou rozpoznat. V těchto případech musí dojít k izolaci a kontrole v čisté kultuře a pozdější identifikaci pomocí mikroskopu. Někdy může být pro izolaci patogenů a indukci sporulace pro identifikaci zapotřebí selektivní médium (Vidhyasekaran, a další, 2004).

Projev příznaků *P. cactorum* způsobující fytoftorovou krčkovou hnilobu a kožovitou hnilobu jahodníku je většinou vyjádřen jako syndrom dané choroby viz kapitola 3.3.1 Příznaky kožovité hniloby jahod; 3.3.2 Příznaky fytoftorové krčkové hniloby jahod. V obou případech dochází k nekrotickým degeneracím a odumření buněk/pletiva a většinou k hypoplastickému zastavení nebo zpomalení tvorby diferenciace buněk a zastavení tvorby barviv (Vidhyasekaran, a další, 2004).

3.2.2.3 Rozlišovací znaky pro mikroskopickou identifikaci

Samotná Elizabeth Blackwell byla průkopnicí rané taxonomie rodu *Phytophthora* spp. Vyvinula ověřené a použitelné dichotomické klíče k druhům tohoto rodu, které se používají dodnes. Její pečlivá práce byla založena na důsledném pozorování morfologických charakteristik patogenu včetně sporangií, pohlavních reprodukčních orgánů, chlamydospór, hyfálních charakteristik aj. Rozměry a tvary zoosporangií a oogonií mohou být velmi variabilní a často se překrývají mezi druhy, což ztěžuje identifikaci na úrovni druhů. *P. cactorum* je druh snadno identifikovatelný na základě morfologických znaků, nicméně dva druhy lze zaměnit pouze na základě morfologických znaků. Jsou to *P. hedraiaandra* de Cock & Man in't Veld 2004 a *P. clandestina* P. A. Taylor, Pascoe & F. C. Greenh 1985 (Ristaino) (Blackwell, 1943).

Při absenci detekce sekvencí nukleových kyselin lze spolehlivě odlišit *P. cactorum* od jiných druhů *Phytophthora* spp. s podobnou morfologií díky pozorování a měření rozmnožovacích orgánů. Dotyčný izolát je homothalický. Oospory *P. cactorum* jsou sférické, plerotické, obvykle o průměru 24-30 μm a mají hladkou, dvouvrstvou, žlutohnědou stěnu. Antheridia jsou obvykle paragynální (13 \times 15(-21) μm), sférické nebo klubkovité a zároveň připojena k oogoniu poblíž oogoniální stopky. Hyalinní oogonia s hladkými stěnami s oosporami se často nacházejí v nemocné tkáni. Sporangie se mohou vyskytovat terminálně nebo laterálně, jsou bezbarvé nebo téměř bezbarvé, 50-60 μm dlouhé (některé jsou až 90 μm dlouhé) a 35-40 μm široké s papilami na vrcholu. Každé sporangium může obsahovat více než 50 zoospor. Tvary sporangií se velmi liší a mohou se pohybovat od široce elipsoidních, obpyriforních nebo po vejcovité až kulovité. Sporangie jsou často seskupeny a sporangiofory jsou obvykle jednoduché. Hyfy jsou štíhlé, často nepravidelně naběhlé a někdy rozvětvené v pravých úhlech. *P. cactorum* se snadno pěstuje na bramborovém-dextrózovém agaru, na kterém tvoří bílou volně matnou kolonii. *P. cactorum* také při vystavení stresovým faktorům produkuje chlamydospory, které mají průměrně 25-39,7 μm průměr. Hyfy jsou obvykle asi 6 μm široké, ale mohou být nepravidelně zduřelé viz příloha 18 (Hudler, 2013) (Rivard, 2007) (Kang, 2006) (Maas, 1998).

3.2.2.4 Molekulární metody diagnostiky

3.2.2.4.1 Imunodiagnostika

Imunodiagnostické testy poskytují rychlou metodu potvrzení viditelných příznaků a detekce patogenů, které nelze snadno identifikovat jinými metodami. Imunologické testy závisí na vývoji protilátek specifických pro konkrétní patogen. Takové molekuly, známé jako antigeny, stimulují imunitní systém organismu, což vede

k produkci specifických protilátek, z nichž každá se specificky rozpoznává a váže na svůj komplementární antigen. Úlohou imunotestu je odhalit přítomnost specifických komplexů mezi protilátkou a antigenem, které jsou pro patogen jedinečné. V zásadě jsou imunotesty založeny na skutečnosti, že protilátky reagují specificky s homologním antigenem. Reakci však není snadné odhalit. Pro využití této reakce v imunotestech bylo vyvinuto několik technik. Sérologická metoda ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay) je rychlá, spolehlivá a využitelná pro praxi. Stanovuje pouze látky specifické pro patogenní organismus nebo jeho metabolity. Komerčně dostupné testy ELISA pro detekci *Phytophthora* založené na protilátkách proti obecnému antigenu *Phytophthora* se ukázaly jako rychlé prostředky k identifikaci infikovaných rostlin, i když lze identifikovat pouze na úrovni rodu. Jelikož testy ELISA nejsou druhově specifické, musí být identita druhu potvrzena pomocí PCR izolace nebo kultivační destičky. Neschopnost detekovat antigeny může souviset s povahou hostitelské tkáně nebo druhu patogenu. Existuje rychlejší metoda testování na bázi protilátek Lateral Flow Device (LFD) pro detekci druhů *Phytophthora* ve vzorcích rostlinných tkání v terénu. V řadě pokusů se test ukázal jako specifický a citlivý na identifikaci *Phytophthora* sp. v nemocné tkáni. Experiment ke stanovení citlivosti detekce pomocí LFD ukázal, že dokáže detekovat infikovanou tkáň ve směsi sestávající z jedné části infikovaného materiálu a 99 dílů neinfikovaného materiálu (O'Brien, a další, 2009) (Vidhyasekaran, a další, 2004).

3.2.2.4.2 Metody založené na sondáži nukleové kyseliny

Pro diagnostiku chorob plodin se používají sondy DNA i RNA. Diagnostickou sondu nukleové kyseliny lze definovat jako nukleotidovou sekvenci značenou reportérovou molekulou, která je schopna identifikovat cílový patogen v testovaném vzorku selektivní hybridizací s komplementární sekvencí přítomnou v DNA mikroorganismu. Sondy nukleových kyselin jsou sekvence nukleových kyselin, které jsou značeny markerem a používají se k detekci komplementárních sekvencí nukleových kyselin ve vzorku. Sondy, které mohou být buď DNA nebo RNA, mají velikost od 15 do několika tisíc párů bazí (bp). Cílové sondy hybridů jsou vizualizovány pomocí autoradiografie, kolorimetrických testů nebo chemiluminiscence (Vidhyasekaran, a další, 2004).

Metodologie jako polymerázová řetězová reakce (PCR) poskytuje účinnou a rychlou techniku exponenciální amplifikace specifických sekvencí DNA pomocí syntézy DNA in vitro. Tři základní kroky k PCR zahrnují: (1.) rozložení cílové DNA, (2.) hybridizaci dvou oligonukleotidových primerů na denaturované řetězce DNA a (3.) prodloužení primeru prostřednictvím termostabilní DNA polymerázy. Nově syntetizované řetězce DNA slouží jako cíle pro následnou syntézu DNA, protože tyto tři kroky se opakují až 50krát. Specifičnost metody je odvozena od syntetických oligonukleotidových primerů, které se párují a definují každý konec cílové sekvence, která má být amplifikována (Vidhyasekaran, a další, 2004).

Mezi diagnostickými technikami převzala v posledních letech dominantní roli metodika založená na PCR, jelikož u symptomatických diagnostických metod musí být přítomnost *P. cactorum* potvrzena izolací patogenu z nemocných tkání, následovanou morfologickou a fyziologickou charakteristikou izolovaných mycelií. Všechny tyto techniky jsou časově náročné, pracné a velmi komplikované (zejména morfologická charakteristika). U mnoha druhů *Phytophthora* včetně *P. cactorum* je hlášena nedostatečná specifita primerů navržených v literatuře. Tyto primery mohou ve skutečnosti vést ke zkříženým reakcím s jinými druhy *Phytophthora* a s jinými velmi podobnými houbami, například s houbami skupin *Pythium* nebo *Peronospora*. Tento nedostatek specifity je přiřazován metodě použité ke konstrukci PCR primerů, které jsou rutinně

odvozeny z ITS oblastí ribozomálních RNA genů. Sekvence ITS u druhů *Phytophthora* nemusí být nejlepším zdrojem pro vývoj druhově specifických primerů PCR, protože mezidruhové rozdíly v této části sekvence jsou příliš malé. PCR prováděná s primery SCAR odvozenými ze sekvence pásu přibližně 450 bp RAPD (náhodná amplifikace polymorfní DNA), poskytla jediný diagnostický produkt amplifikace DNA, který snadno odlišil *P. cactorum* od dalších jedenácti druhů *Phytophthora*, tří druhů *Pythium*, jedenácti dalších rodů hub z DNA šesti hostitelských rostlin. PCR primery PC1/PC2 (viz příloha 10), navržené jako SCAR markery ze specifického náhodně amplifikovaného polymorfního fragmentu DNA k amplifikaci produktu PCR, byly označeny jako specifické, citlivé a robustní pro detekci *P. cactorum* v několika hostitelských rostlinách včetně jahod. Primery PC1 / PC2 vyvinuté v této práci byly testovány na čtrnácti různých izolátech *P. cactorum* a vždy poskytovaly amplifikaci (Causin, a další, 2005).

3.2.3 Hostitelské spektrum

P. cactorum je široce polyfágní a velmi variabilní druh, který napadá celou řadu kulturních i divoce rostoucích rostlin především z bývalé čeledě růžovitých. Obecně se jedná o byliny a dřeviny ze 154 rodů cévnatých rostlin z 54 čeledí (Beránek, a další, 2021). Podle (Rivard, 2007) může infikovat více než 200 druhů ve 160 rodech, včetně jahod a řady dřevnatých okrasných rostlin a ovocných plodin. Podle (Husaini, a další, 2016) *P. cactorum* byla označena jako původce infekce na více než 200 rostlinných druzích z více než 60 různých čeledí. Například do tohoto široce polyfágního hostitelského spektra spadají čeledě: *Aceraceae*, *Apocynaceae*, *Apiaceae*, *Araliaceae*, *Cactaceae*, *Cucurbitaceae*, *Cornaceae*, *Ebenaceae*, *Ericaceae*, *Fagaceae*, *Geraniaceae*, *Grossulariaceae*, *Hippocastanaceae*, *Juglandaceae*, *Lauraceae*, *Liliaceae*, *Oleaceae*, *Pinaceae*, *Proteaceae*, *Polygonaceae*, *Rutaceae*, *Rosaceae*, *Salicaceae*, *Solanaceae*, *Sterculiaceae* a *Violaceae* (Chitambar, 2017). Konkrétně se jedná o semenáčky listnáčů a jehličnanů, z okrasných a lesních dřevin velmi často buk lesní (*Fagus sylvatica*), méně další druhy jako lípa (*Tilia*), dub (*Quercus*), javor (*Acer*), modřín (*Larix*), douglaska (*Pseudotsuga*), jedle (*Abies*), smrk (*Picea*). Taktéž zahradní a okrasné rostliny (např. pěnišník *Rhododendron* sp.), včetně *Pelargonium peltatum*, *P. zonale*, *P. grandiflorum*. (Beránek, a další, 2021).

V souvislosti s touto diplomovou prací je významným hostitelským druhem také rod *Fragaria* (jahodník). Již bylo zmíněno, že jahodník není napadán kmeny *P. cactorum*, které napadají rostliny z výše uvedených rodů. Několik studií uvádí analýzy variability citlivosti jahod k *P. cactorum*, kdy výsledky inokulace provedené na diploidních druzích *Fragaria* neprokázaly žádný náznak toho, že by některý z těchto druhů byl rezistentnější nebo náchylnější k *P. cactorum*. Neprokázali se ani žádné systematické rozdíly vyplývající z geografického původu. U pěstovaných jahod *F. x ananassa* byla variabilita citlivosti genotypů nebo kultivarů uváděna hlavně ve studiích porovnávajících různé metody inokulace. Jedna velká studie ukázala, že rezistence mezi 31 testovanými genotypy se velmi lišila a zároveň poskytovala druhy s vysokou úrovní rezistence ideální pro další šlechtitelské programy. Rezistence vůči chorobám je primárním cílem všech hlavních šlechtitelských programů a v budoucnu bude ještě důležitější s rostoucí snahou o udržitelné zemědělství. Patogeny napadající jahodník či jahody mají v různých zemědělských oblastech různou úroveň důležitosti. Z tohoto důvodu se šlechtitelské programy zaměřují na vybrané patogeny v závislosti na jejich důležitosti v oblasti, kde se program provádí. Mnoho úspěšně vyšlechtěných kultivarů, však nevykazuje úplnou nebo specifickou odolnost vůči konkrétní nemoci. Šlechtění se více zaměřilo na získání kultivarů, které jsou spíše tolerantní nebo alespoň méně náchylné k více patogenům současně než k určitému patogenu. Příkladem odolných odrůd jsou: 'Korona', 'Elsanta', 'Pegasus', 'Honeoye', 'Darselect', 'Senga Sengana', 'Tenira' aj. (Beránek, a další, 2021). (Husaini, a další, 2016) (Schafleitner, a další, 2013)

3.2.4 Životní cyklus *P. cactorum* na jahodníku

Specifická epidemiologie patogena *P. cactorum* se může lišit podle plodiny, vůči níž projevuje patogenitu. Podobně jako u jiných *Phytophthora* spp. žije *P. cactorum* jako saprofyt v podestýlce a v půdě obsahující mrtvý organický materiál. Nejdůležitější propagulí tohoto patogenu jsou zoospory, které pocházejí z klíčících oospor a sporangíí. *P. cactorum* může přežít několik let hlavně jako oospory (sexuální výtrusy) v půdě a mumifikovaných plodech či napadeném pletivu jahodníku. Patogen může také přežít formou chlamydospor (silnostěnných nepohlavních výtrusů) v půdě v sadu, nebo jako mycelium v hostitelské tkáni. Sporangia se rozšiřují především vodou. Infekce *P. cactorum* se obvykle vyskytuje (šíří) během teplých a vlhkých period. Vyšší teploty podporují vývoj onemocnění a deficit vody projev vadnutí rostlin. V napadených pletivech se tvoří oospory. Zatímco oospory a chlamydospory tvoří primární inokulum, sporangie jsou hlavním zdrojem sekundárního inokula. Na jaře oospory po zvlhčení klíčí a na sporangioforech se diferencují zoosporangia. Pohyblivé zoospory se uvolňují ze sporangíí v nasyceném půdním profilu (volné vodě) a infikují vnímavé části rostlin nebo pronikají přes poranění (k infekci je ovlhčení nezbytné). Zoospora klíčící hyfou penetruje hostitele a rozvíjející se hyfy kolonizují pletiva. Vyvíjí se více mycelia a nakonec se vytvářejí oospory, které slouží jako klidové struktury, které mohou přežít několik let. Vývoj příznaků se může lišit v závislosti na druhu hostitele, ale obvykle je výsledkem příznivých podmínek prostředí. Nejčastěji se s příznaky poškození rostlin setkáváme v období největší potřeby vody, tj. mezi kvetením a sklizní. Náchylnější k napadení jsou frigo sazenice (Aglave, 2019) (Chitambar, 2017).

Zdrojem inokula může být propagule pocházející jak z napadných plodů, na kterých způsobuje *P. cactorum* kožovitou hnilobu jahod, tak z půdy, kde prodělal tento patogen životní cyklus na kořenech, respektive v kořenovém krčku. Jako většina druhů rodu *Phytophthora* se *P. cactorum* přenáší v půdě a vodou. Na neinfikovaná místa se šíří prostřednictvím: infikovaných rostlin, školkařského sadebního materiálu a sazenic nebo půdy; oteklou přebytečnou a zavlažovací vodou nebo dešťovou vodou; kontaminováním kultivačních strojů, prostřednictvím náradí a obuví, nebo rostlinnými zbytky obsahující oospory nebo chlamydospory kontaminující vzorky semen. Patogen není přímo přenosný osivem. Kromě toho může být zavlažovací voda z kanálů, řek a rybníků kontaminována *Phytophthora* spp. Při vysoké vlhkosti a větrných podmínkách mohou být sporangie přenášeny vzduchem, což hraje důležitou roli při šíření kožovité hniloby jahod (Chitambar, 2017) (Beránek, a další, 2021) (Rivard, 2007) (Aglave, 2019).

3.2.4.1 Životní cyklus *P. cactorum* způsobující kožovitou hnilobu jahod

P. cactorum přežije zimu ve formě oospor, které se tvoří v napadených mumifikovaných plodech. Tyto oospory mohou v půdě zůstat životaschopné po dlouhou dobu. Na jaře, když je půda dostatečně nasycená vodou, klíčí oospory a produkují sporangia. Uvnitř jednoho sporangia může být vyprodukováno až 50 zoospór. Ve volné vodě se zoospory obvykle tvoří ve sporangíích a uvolňují se do vody, ve které se pohybují (plavou) nebo se dostávají do kontaktu s povrchem plodů. Ve filmu volné vlhkosti zoospory klíčí a infikují nezralé nebo zralé plody. Ačkoli infekce vyžaduje volnou vodu, vysoký výskyt onemocnění může nastat již za 2 hodiny nebo za kratší čas za vlhka při teplotě 17–25 ° C. Optimální teplota pro infekci je 21 ° C. Ve volné vlhkosti (z rosy nebo deště) se na povrchu infikovaných plodů vytvářejí sporangia, počínaje asi 5 dní po infekci. Produkce sporangíí roste exponenciálně a je velmi ovlivněna teplotou. Nejpříznivější teploty pro produkci sporangíí jsou mezi 15 a 25°C. Optimální teplota je přibližně 20 °C, ale při 10 a 30 °C se nevytvářejí sporangia žádná.

Sporangia jsou rozptýlena na jiné povrchy plodů pomocí dopadajících, rozstříknutých kapek deště nebo zavlažováním z vrchu na list – tímto způsobem se také šíří fragmenty mycelia a zoospory patogena. Za vhodných podmínek se nemoc může šířit rychle. Zoospory se mohou uvolňovat v kalužích stojaté vody na poli, a pokud voda poté stéká po řádcích, šíří infekční propagule na plody, které kontaktuje. V infikovaných tkáních jahod se nakonec tvoří oospory. Napadené infikované plody zůstávají na poli. Vysychají, mumifikují a nakonec spadnou na zem. Z rozpadajícího mumifikovaného ovoce se uvolňují oospory do půdy, kde mohou přežít. Obrazně vyjádřený životní cyklus *P. cactorum* napadající plody jahodníku viz příloha 11 (Lind, a další, 2003) (Maas, 1998) (Ellis, a další, 2006).

3.2.4.2 Životní cyklus *P. cactorum* způsobující fytoftorovou krčkovou hnilobu jahodníku

Zdrojem inokula jsou oospory přetrvávající v půdě nebo v infikovaných rostlinách. Oospory produkují zoospory, které infikují rostliny jahod pronikající obvykle skrz poranění. Zoospory jsou vypuzeny ze sporangií za vhodných teplotních a vlhkostních podmínek a plavou pomocí svých bičíků směrem k hostiteli v reakci na kořenové exsudáty. Infekce nově vyrytých šlahounů nastává hlavně čerstvými ranami vzniklých při přesazení. Hlavní cesty nákazy jsou báze stolonů a poranění na oddenku. Frigo sazenice jsou zjevně obvykle infikovány ranami v oblasti kořenového krčku. Rostliny frigo poškozené příliš nízkou teplotou při skladování nebo silným mrazem před sklizní jsou obzvláště náchylné k infekci a mohou být infikovány bez poranění. U těchto rostlin dochází k vývoji fyziologického zhnědnutí kořenového krčku. Je pravděpodobné, že se rostliny mohou nakazit také v lůžku rašících stolonů. V tomto případě infekce obvykle zůstává latentní. Projev příznaků v roce výsadby je ovlivněn dobou výsadby. Výsadby jahodníku od začátku léta do července jsou ovlivněny patogenem více než založené plantáže v srpnu. V tomto období se symptomy stanou viditelnými 1-4 týdny po výsadbě. Na plantážích založených v září se příznaky obvykle neobjevují ve stejném roce, protože *P. actorum* přestává v říjnu nebo v listopadu reagovat při nízkých teplotách. Infekce kořenového krčku způsobená *P. cactorum* se však může projevit na jaře, zejména v období mezi kvetením a sklizní, v době velkého stresu a zvýšené náchylnosti rostlin. Klimatické a půdní podmínky stejně jako doba výsadby také určují, zda je poškození kořenového krčku jahod vážnější v roce výsadby nebo na jaře prvního roku vstupu do plodnosti. Ve druhém a následujícím produkčním období má nemoc zřídka hospodářský význam. Obrazně vyjádřený životní cyklus *P. cactorum* napadající kořenový krček jahodníku viz příloha 12 (Maas, 1998).

3.3 Charakteristika fytoftorové krčkové hniloby jahodníku

Charakterizujeme ji jako parazitický organismus podzemních částí suchozemských rostlin. Více než 60 % známých oomycet je popisováno jako rostlinné patogeny. Za vhodných podmínek prostředí se fytoftorová krčková hniloba jahodníku, kterou způsobuje patogen *P. cactorum*, může šířit velmi rychle. K infekci stačí vlhká perioda (volná voda na povrchu plodů) dlouhá dvě hodiny. Optimální teploty pro infekci jsou mezi 16 °C a 25 °C. Se zvyšující se délkou vlhkého období (zejména špatně odvodněné oblasti) se teplotní rozsah, při kterém může dojít k infekci, mnohem rozšiřuje. Vysoké teploty také podporují rozvoj nemocí, ale zdá se, že je nezbytný také vodní stres, protože hniloba kořenového krčku se vyskytuje hlavně v situaci vysoké potřeby vody například po přesazení, když je zvýšená transpirace, nebo mezi kvetením a sklizní. Denní doba kratší než 13 hodin rovněž podporuje rozvoj nemoci. Jednotlivé kultivary jahodníku se velmi liší v odolnosti vůči fytoftorové krčkové hnilobě jahodníku. Specifičnost podmínek pro rozvoj choroby pomáhá vysvětlit, proč infekce často zůstávají latentní, zejména u rostlin uchovávaných v chladu (frigo sadba). Patogenita *P. cactorum* izolované z napadených krčků jahodníku, však nevykazuje velkou variabilitu, zatímco izoláty fytoftorové krčkové hniloby se lišily od izolátů kožovité hniloby jahod (Aglave, 2019) (Maas, 1998).

3.3.1 Příznaky kožovité hniloby jahod

Kožovitá hniloba jahod je způsobena půdním patogenem *Phytophthora cactorum*. V mnoha oblastech je považována za chorobu nízkého ekonomického významu, jelikož se často vyskytuje jen sporadicky, ale pokud k infekci dojde, ztráty mohou být značné. Patogen kožovité hniloby jahod primárně napadá plody, ale může také infikovat květy. Nadměrné srážky během května, června a července mohou vést k vysokým ztrátám ovoce. Kromě přímých ztrát na výnosu ovoce jsou jedním z hlavních problémů pěstitelů kontaminované plody, které mají nepříjemnou chuť a vůni, což snižuje jejich kvalitu. Příznaky kožovité hniloby mohou být skoro neznatelné, na rozdíl od příznaků většiny ostatních hnilob ovoce. Napadené zralé plody s mírnou diskolorací mohou vypadat zdravě (bez příznaků infekce), a proto se snadno sbírají a konzumují společně s nenakaženými plody. Proto je v polních podmínkách úroveň tolerance vůči onemocnění kožovitou hnilobou velmi nízká. *P. cactorum* také způsobuje infekce hnilobu kořenového krčku a vadnutí jahodníku, které se mohou nebo nemusí vyskytovat současně s hnilobou plodů. Předpokládá se, že fytoftorová krčková hniloba jahodníku je způsobena odlišným patotypem *P. cactorum* (Aglave, 2019) (Maas, 1998) (Ellis, a další, 2006).

P. cactorum může infikovat plody jahod v kterékoliv fázi vývoje. U zelených plodů jsou postižené oblasti obvykle tmavě hnědé, ale mohou zůstat zelené s hnědým okrajem. Jak se hniloba šíří, celé plody zhnědnou, získávají drsnou strukturu a vypadají jako kožovité. Infekce plně zralého ovoce může způsobit jen malou změnu barvy od hnědé po tmavě fialovou. Napadené zralé plody jsou na dotek obvykle měkčí než zdravé plody, mají obvykle matnou barvu a nejsou lesklé. Pokud jsou napadené plody rozděleny, cévní tkáň ke každému semeni je znatelně ztmavena. V pozdějších stádiích hnití mají zralé plody tendenci být tvrdé a kožovité. Občas se za podmínek vysoké vlhkosti na povrchu infikovaného ovoce vytvoří jemný bílý povlak mycelia. Zelené i zralé plody nakonec uschnou a vytvoří tvrdé, scvrklé mumie. Nepříjemný zápach a chuť ovoce zasaženého kožovitou hnilobou jahod jsou diagnostickými příznaky onemocnění. Dokonce i zdravá tkáň u mírně shnilých plodů je hořká viz příloha 15, 16, 17 (Ellis, a další, 2006) (Aglave, 2019) (Maas, 1998) (Beránek, a další, 2021).

3.3.2 Příznaky fytoftorové krčkové hniloby jahodníku

Příznaky nemoci způsobené *P. cactorum* na jahodníku se liší podle stadia produkčního systému a ročního období viz příloha 13, 14. Brzy v sezóně mohou infikované rostliny již vykazovat zakrnění. Příznaky se obvykle objevují na začátku léta. Nejmladší listy se začínají šedozelenat až modrozelenat a často náhle vadnou. Vadnutí se rychle rozšíří na celou rostlinu, která se zhroutí a hyne obvykle během několika dní spojeno s hnilobou krčku. Při pokusu zvednout nemocnou rostlinu, dochází často k lámání v horním konci kořenového krčku, přičemž hlavní část kořenového krčku a kořenů zůstává v půdě. Podélné rozdělení odhalí víceméně rozsáhlou nekrózu. Pro onemocnění je charakteristické intenzivní hnědé zbarvení a případný rozpad vaskulární tkáně krčku. Dotčené rostliny se zhroutí buď úplně, nebo pouze z jedné strany, v závislosti na počtu napadených kořenových krčků. Ve většině případů se příznaky objevují nejprve v horní části koruny a šíří se bazipetálně nebo začínají od zbytku zanechaného pahýlu stolonu. Nově napadená tkáň je nejprve světle hnědá a nasáklá vodou. Později kořenový krček intenzivně a homogenně zhnědne. Tyto konkrétní příznaky snadno odlišují krčkovou hnilobu od hnědého zbarvení tkáně v důsledku jiných příčin. Zasažení kořenů je zřejmé až po odumření nadzemní části rostliny. V některých případech je hnilobný proces v rámci kořenového krčku zastaven, což vede buď k zotavení rostliny, nebo k více či méně výraznému zpomalení odumírání, zejména v závislosti na rozsahu zničení cévního systému. Zakrnění v růstu lze zaměnit s příznaky verticiliového vadnutí (*Verticillium* sp.) nebo černou kořenovou hnilobou (*Thielaviopsis* sp.), ale v těchto případech se pitvou kořenového krčku spolehlivě odhalí příčina nemoci. Je však obtížné spolehlivě odlišit nekrózu kořenového krčku způsobenou patogenem *P. cactorum* od nekrózy vyvolané *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds 1965 nebo jinými patogeny, zejména v pozdějších stádiích onemocnění. Obvykle má infikovaná tkáň krčku díky *Colletotrichum acutatum* tmavší skořicové zbarvení, které je v případě fytoftorové krčkové hniloby tmavší (Maas, 1998) (Beránek, a další, 2021) (Rivard, 2007) (Aglave, 2019) (Lind, a další, 2003)

3.4 Hospodářský význam

Za příznivých podmínek pro život může *P. cactorum* způsobit významné hynutí rostlin i přímé poškození plodů. Napadením trpí především starší porosty. Škody způsobené patogeny *Phytophthora* spp. ve světě představují ročně vysoké ekonomické ztráty pro zemědělský sektor. I když se nemoci způsobené *P. cactorum* obvykle vyskytují sporadicky, mohou potenciálně způsobit až 50% ztráty plodiny. Celkově může být obtížné posoudit poškození způsobené samotnou *P. cactorum*, protože na poškození kořenové soustavy a kořenové krčku hostitele se může podílet právě více druhů *Phytophthora*. Dále zamoření ovocných školek *P. cactorum* může mít negativní hospodářský dopad na fungování těchto firem, jelikož fytosanitární opatření zpomalují či zastaví produkci rostlinného materiálu (Beránek, a další, 2021) (Husaini, a další, 2016) (Ellis, a další, 2006).

3.5 Metody ochrany jahodníku proti *P. cactorum*

Kontrola chorob způsobených *Phytophthora* spp. je často obtížná vzhledem k vlastnostem uvolňovaných oospór nebo chlamydospór do půdy, které představují odolné trvalé struktury přenosné i vodou. Na metody používané v ochraně proti *P. cactorum* nahlížíme podle toho, jestli jde o preventivní a nepřímý charakter ochrany nebo zda se jedná o přímý typ ochrany kam spadají chemické, biologické a fyzikální metody ochrany rostlin (Husaini, a další, 2016).

Klíčem k efektivnímu zvládnutí chorob a účelnému využívání všech možností ochrany rostlin způsobených *P. cactorum* je systém integrované ochrany rostlin. Zejména v dnešní době je kladen důraz, aby se v posloupnosti ochranných zásahů začínalo nejdříve preventivními opatřeními. Dále monitorováním výskytu choroby přímo pravidelným vizuálním hodnocením zdravotního stavu výsadeb ke zjištění prvních příznaků napadení chorobami, nebo nepřímo sledováním vhodnosti podmínek pro infekci a šíření choroby pomocí automatických meteorologických stanic. Následně pokud je to možné implementací udržitelných biologických, fyzikálních nebo nechemických metod ochrany a na posledním místě použitím chemických metod. Integrovaný systém ochrany rostlin využívá všech metod v souladu s ekonomickými, ekologickými a toxikologickými požadavky pro udržení škodlivého organismu pod hranicí škodlivosti (Husaini, a další, 2016) (Kazda, a další, 2010).

Smyslem prognózy a signalizace chorob je s dostatečným předstihem stanovit riziko výskytu škodlivého organismu. Proti houbovým patogenům se často při signalizaci využívá metod na základě sledování dosavadního průběhu počasí a jeho krátkodobé předpovědi. K tomuto účelu existují systémy jako například Blitecast, který pro prognózu výskytu onemocnění zpracovává data na základě monitorování teploty, srážek a relativní vlhkosti. Cílem je na základě prognostických dat provádět přesné a cílené operace chemické ochrany rostlin, čímž se ochrana rostlin stává ekonomičtější a šetrnější k životnímu prostředí. (Kazda, a další, 2010).

Nepřímé metody ochrany mají spíše preventivní charakter a jejich cílem je zamezit vzniku choroby vytvářením nepříznivých životních podmínek pro vývoj patogenů. Nepřímé metody se dělí na agrotechnické, šlechtitelské a organizační (legislativní). Agrotechnické metody lze popsat jako dodržování správné pěstitelské praxe, která bývá unikátní pro každou pěstovanou kulturní rostlinu. Pomocí této metody prevence je snaha vytvořit co možná nejleideálnější podmínky pro růst a vývoj rostlin či naopak nepříznivé pro patogeny. Šlechtění rostlin je důmyslná metoda ochrany rostlin, jak zvítězit nad škodlivými organismy bez nutnosti přímých zásahů. Existují vyšlechtěné odrůdy, které disponují zvýšenou odolností či přímo rezistencí proti původcům chorob. Odolnost rostliny znamená, že patogen není schopen napadení (navázání vztahu) cílového organismu nebo rostlina lépe snáší abiotický stres, ale tyto vlastnosti odrůdy nemusí být trvalé. Občas se pěstují i odrůdy plodin, které mohou být napadeny například viry, ale neprojevuje se u nich žádné výraznější poškození či ztráty na výnosu, ovšem za cenu dalšího šíření viróz. Těchto vlastností lze dosáhnout také pomocí technologie genetické modifikace rostlin (cílená, umělá specifická mutace genomu rostliny), která ve světě nabývá na rozvoji a významu. Metody organizační představuje v České republice správní úřad rostlinolékařské péče Státní rostlinolékařská správa, která působí zejména v oblasti ochrany rostlin, ochraně proti zavlečení škodlivých či karanténích organismů, registrace přípravků na ochranu rostlin atd. Základní právní dokument je zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění zákona č. 131/2006 Sb. a zákona č. 249/2008 Sb. (Kazda, a další, 2010) (Hudec, a další, 2007).

Za přímé metody ochrany proti chorobám rostlin považujeme chemické, biologické, mechanické a fyzikální. Každá z těchto uvedených metod má své výhody i nevýhody, nicméně nejlepších výsledků většinou dosáhneme obvykle jejich kombinací. V rámci mechanických způsobů ochrany proti chorobám rostlin lze vytknout zejména metodu negativního výběru, kdy dochází k eradikaci napadených struktur či jedinců. Fyzikální metody jsou v podstatě netoxické způsoby kontroly nemocí rostlin, které jsou většinou založené na vysoké energetické náročnosti, a proto se v dnešní době tolik nepoužívají. Z toho nejznámější je dezinfekce půdy různými způsoby vysokou teplotou (Kazda, a další, 2010).

V biologické ochraně proti chorobám rostlin používáme různé bioagens k omezení populace určitých škodlivých patogenů. Tato metoda je založena na konkurenci, soutěživosti, antagonizmu, antibioze nebo parazitizmu mezi organismy (houbami). Aplikace je většinou preventivní (na základě pečlivé signalizace patogenů) a možná třemi způsoby: Introdukce bioagens jako nových užitečných organismů, podpora a udržování užitečných prospěšných organismů nebo umělé masové namnožení a implementace užitečných organismů. V ochraně proti *P. cactorum* je správné uvažovat směrem biopreparátů založených na bakteriálních buňkách nebo výtrusech mikroskopických hub, které působí buď jako přímí antagonisté *P. cactorum*, nebo stimulují růst a odolnost jahodníku. Biologicky aktivní látky jsou kategorií ležící na pomezí aplikace cílených chemických přípravků a biologické ochrany pomocí mikroorganismů. Jedná se však o látky – sekundární metabolity nebo produkty fermentace vzniklé působením živých organismů, rostlin nebo mikroorganismů. Skupina biologicky aktivních látek se dále rozděluje podle efektu na biostimulanty, fungicidy, insekticidy, aj. nebo podle typů látky na saponiny, esenciální oleje, alkaloidy, terpeny, fenoly a další. Rostliny často ve svých pletivech syntetizují sekundární metabolity, které je chrání před napadením patogeny, případně před okusem zvěří. Tyto přírodní látky mohou být toxické i pro samotnou rostlinu, proto bývají lokalizovány ve vakuolách, v siličných kanálcích a v dalších částech rostliny. Esenciální oleje jsou z chemického hlediska tvořeny směsí diterpenů, fenolů, monoterpenů a seskviterpenů zastoupených v různých poměrech. Přestože se esenciální oleje skládají z několika desítek komponent, většinou obsahují 1-3 látky, které dominují typicky různě pro každý rostlinný druh. Např. bazalka pravá (*Ocimum basilicum*) je tvořena až z 88 % z celkového zastoupení složek v oleji estragolem, máta (*Mentha piperita*) z 50–60 % mentolem a pomerančovník (*Citrus sinensis*) z 85 % limonenem. Tyto směsi mohou mít také významný fungicidní charakter (Bleša, a další, 2020) (Kazda, a další, 2010).

Chemické metody ochrany rostlin jsou v současné době nejnámější a nejpoužívanější způsobem ochrany proti všem skupinám škodlivých organismů. Zároveň stále dochází k ubývání povolených přípravků na ochranu rostlin z důvodu zákazu používání nejrůznějších účinných látek. Problém je o to závažnější z důvodu velmi nákladné registrace a vývoje nových přípravků, který trvá mnoho let, a proto přestávají vznikat nové alternativy těchto zakázaných přípravků. Společnosti spojené s výrobou chemických přípravků spíše investují do vývoje biotechnologií, biologických metod ochrany a zejména do vývoje geneticky modifikovaných rostlin, ale tento vývoj nestačí rychlosti ubývání chemických přípravků a hrozí nebezpečí, že nebude čím ošetřovat. Každopádně je to příležitost pro vznik nových alternativních metod ochrany rostlin jako jsou například použití esenciálních olejů, biologických metod ochrany aj. Předností chemické ochrany je snadno realizovatelný, rychlý způsob ochrany. Ovšem dlouhodobé používání těchto přípravků má řadu nevýhod: toxicita pro člověka a jiné organismy, nebezpečí negativního ovlivnění prakticky všech složek životního prostředí, vznik rezistence patogenů při opakovaném používání. V případě ochrany proti *P. cactorum* se jedná o kontaktní či systémové fungicidy aplikované mořením sadby, postřikem na povrch

rostliny nebo do půdy. Pro každou plodinu existuje seznam registrovaných přípravků na ochranu rostlin, ve kterém jsou závazně uvedeny podmínky pro používání registrovaných přípravků i pro jahodník (viz <http://eagri.cz/public/web/srs/uvodnik-ukzuz.html>). Mikroorganismy mají mimořádnou schopnost se přizpůsobovat měnícím se podmínkám prostředí. Výsledkem těchto přizpůsobení je i vznik odolnosti vůči působení pesticidů, tedy rezistence. V tomto případě ji lze charakterizovat jako dědičné přizpůsobení se patogenu fungicidní látce natolik, že již danu látkou není populace patogena ohrožena. Aby k tomu nedošlo, je zapotřebí dodržovat metody prevence vzniku rezistence a šíření rezistentních kmenů fytopatogenních hub neboli antirezistentní strategii. Základní preventivní opatření jsou: snaha zabránění vzniku infekce správnou pěstitelskou praxí, pravidelné střídání plodin, správná výživa rostlin, dodržování zásad správné aplikace fungicidů, používání širokého spektra fungicidů, vyloučit přípravky s prokázanou rezistencí, využívání jiných metod ochrany rostlin (ve smyslu integrované ochrany rostlin) aj (Kazda, a další, 2010).

3.5.1 Provádění ochranných opatření proti *P. cactorum*

3.5.1.1 Nepřímé metody ochrany

Prevence a hygiena jsou nesmírně důležité základní složky ochranných opatření proti *P. cactorum*, protože tento patogen se nejčastěji introdukován infikovaným množitelským materiálem (sazenice, řízky atd.). Bohužel se však *P. cactorum* často vyskytuje i ve školkách. Rostliny jahodníku skladované v chladu, které se obvykle používají pro nové výsadby jsou zvláště náchylné k fytoftorové krčkové hnilobě. V rámci preventivních ochranných zásahů by se měli používat jakékoliv postupy, které snižují riziko infekce a vytvářejí prostředí méně příznivé pro vývoj a šíření nemoci. Je důležité vyvarovat se výsadby jahod na rizikových v dolíku položených nebo zamokřených pozemcích, dbát na dostatečné odvodnění stanoviště, úpravu vodního režimu stanoviště, udržování dostatečné vrstvy slámy mezi plody a půdou, dodržování zásad střídání plodin, zkrácení doby trvání porostů, průběžné odstraňování a likvidace napadených rostlin a vysoko posazené hrůbky nebo vyvýšené záhony také snižují riziko šíření nemoci. Dále může být prospěšná správná výživa rostlin (nepřehnojování dusíkem), výběr stanoviště vzhledem k půdním vlastnostem s mírně kyselým pH aj. (to se odvíjí od nároků jahodníku na pěstování a jakékoliv extrémní odchylky a stres mohou přispívat k rozvoji nemoci), likvidace posklizňových zbytků, hudeň plevelů, volba odolných odrůd (nejúčinnější a neekologičtější způsob ochrany – stále se pěstuje mnoho náchylných odrůd) aj. metody. Jakýkoliv postup, který rychleji podporuje snižování ovlhčení plodů, je velmi prospěšný: například místo s dobrou cirkulací vzduchu vystavené slunečnímu záření (Toljamo, 2020) (Aglave, 2019) (Ellis, a další, 2006).

Důležité je také vybrat ověřené stanoviště bez výstkytu latentních propagulí *P. cactorum* ani jiných fytopatogenních druhů hub v půdě. V rámci střídání plodin není vhodné zakládat jahodové plantáže na pozemcích, kde se bezprostředně pěstovali náchylné druhy jiných rodů a čeledí rostlin k *P. cactorum* či *Verticillium* sp. Kleb 1913 i pět let zpátky. Fumigací lze docílit opětovné výsadby jahod, abychom mohli přeskočit doporučenou rotaci plodin, bezprostředně po sobě jdoucími sledy. Nicméně bez použití fumigace bychom měli obdělávat půdu a pěstovat necílové plodiny pro *P. cactorum* (*Verticillium*) minimálně po dobu dvou let. Kombinace střídání plodin a fumigace půdy je většinou dostatečným přístupem, který používá mnoho konvenčních pěstitelů. Pro ekologické pěstitelé (kteří nemohou používat fumigaci půdy) však samotné, dostatečně dlouhé střídání plodin často poskytuje přijatelnou kontrolu nad většinou chorob přenášených půdou. Výzkum a zkušenosti ukázaly, že mulčování nejlépe slámou je daleko lepší prevencí proti šíření hniloby než plastové folie, které naopak zvyšují rozptyl spor patogenů (Toljamo, 2020) (Aglave, 2019) (Ellis, a další, 2006).

Těsně před koncem vegetační doby je ideální porost zbavit starých listů a jiných zbytků rostlin nejlépe posekáním se sběrem, jelikož jde prevencí proti šíření inokula hnilob. Doplnková závlaha, pokud není kapková, by měla být načasována tak, aby listy a plody co nejrychleji oschly. Řízení pohybu osob a strojů je důležité v situaci, kdy může nastat jejich pohyb ze zamořených oblastí do nezamořených, kde by hrozilo rozšíření kontaminace. Při sklizni je zásadní odstarňovat napadené plody a nenechávat je ani přezrálé plody na poli (Toljamo, 2020) (Ellis, a další, 2006) (Aglave, 2019).

3.5.1.2 Fyzikální metody ochrany

Účinnost parního ošetření půdy a dalších nefumigantních alternativ aplikovaného před výsadbou rostlin poskytuje úroveň dezinfekce půdy a regulace plevelů podobně jako při aplikaci Methylromidu/chlorpikrinu, a proto lze tyto metody považovat za použitelnou náhradu za Methylbromid pro dezinfekci pěstebních ploch (Husaini, a další, 2016).

3.5.1.3 Biologická ochrana

Biologická metoda ochrany rostlin je ekologická strategie, která nabízí alternativu nebo doplněk k použití chemické ochrany rostlin. Používání biopesticidů je považováno za jednu z nejslibnějších metod racionálních a bezpečných postupů obhospodařování plodin, které byly vyvinuty na komerční úrovni pro několik chorob rostlin. Používání biologických metod pro kontrolu rostlinných patogenů bylo studováno již více než 70 let a jeví se jako proveditelná volba. Avšak je ještě dlouhá cesta k vývoji účinného systému produkce jahod založeného na použití metod biologické kontroly s výsledky podobnými těm, které byly získány při fumigaci půdy methylbromidem. K dosažení úspěšné kontroly těmito metodami je nutné mít rozsáhlé znalosti o tom, které patogeny se redukuje, jak přispívají k růstu a ničení polních výsadeb, jejich distribuci v produkčních oblastech a ročním období. Dále je nutné znát, kdy mají patogeny nejvýznamnější dopad na rostliny jahod, to, jak parametry prostředí ovlivňují poškození, vliv postupů pěstování plodin na závažnost poškození a to, jak mohou prostředky biologické kontroly uplatňovat jejich ochranné účinky na rostliny (Husaini, a další, 2016) (Agustí, a další, 2011)

V některých případech byla fytoftorová krčková hniloba potlačena vysazením sazenic do supresivní půdy, která obsahuje buď mikroorganismy antagonistické vůči *P. cactorum*, nebo anorganické látky toxické pro oomycety. Veškerý sadební materiál by neměl být napaden a pokud to jde, měly by být vysazovány pouze odolné odrůdy. Použití odolných kultivarů je zdaleka nejspolehlivějším způsobem, jak se vyhnout problémům s hnilobou kořenů a hnilobou. Biofumigace označuje agronomickou praxi založenou na začlenění čerstvé rostlinné hmoty a hnoje do půdy, která uvolní chemické látky známé jako isothiokyanáty, schopné potlačit půdní škůdce a nemoci. Zároveň jsou tyto chemické látky zodpovědné za ohřívání půdy, kdy dochází ke zlepšení její biologické činnosti. Tyto alelochemikálie uvolňované z poškozených tkání zástupců čeledi Brassicaceae a dalších menších čeledí mají schopnost ničit houbové a bakteriální patogeny (plus plevel). Tato metoda je ekologickou alternativou k fumigaci patogenů v půdě MeBr (Husaini, a další, 2016) (Agrios, 2005).

U jahodníku byly studovány dvě hlavní skupiny mikroorganismů jako potenciální bioagens proti houbovým patogenům: Rhizobakterie rodu *Pseudomonas* a *Streptomyces* spp. jako hlavní představitelé této skupiny a kmeny antagonistických hub rodu *Trichoderma* spp. (Husaini, a další, 2016)

3.5.1.3.1 Antagonistické rhizobakterie

Antagonistické rhizobakterie byly často předmětem výzkumu udržitelných systémů zemědělství kvůli jejich schopnosti potlačovat choroby přenášené půdou. Anandhakumar a Zeller (2008) provedli in vitro screening více než 100 rhizobakterií za účelem kontroly chorob rodu *Phytophthora*. Objevili tři bakterie různých rodů, a to *Raoultella terrigena* Drancourt et al. 2001 Izard et al., (1981), *Bacillus amyloliquefaciens* Priest et al., (1987) a *Pseudomonas fluorescens* Flügge, 1886, s inhibičními účinky na růst mycelia *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* Hickman, (1940) a *Phytophthora cactorum*. Z těchto tří druhů měla

Raoultella terrigena nejvyšší inhibiční aktivitu. Tyto bakteriální činidla lze aplikovat před setím, na sazenice, na rostlinné tkáňové kultury nebo formou závlivy. Za účelem vývoje biologického přípravku pro komerční produkci jahod založeného na použití chitinolytické rhizobakterie *Serratia plymuthica* Bizio, (1823), byl hodnocen potenciál kmene izolovaného z rhizosféry řepky olejně pro kontrolu verticiliového vadnutí a hniloby kořenů jahod způsobených rodem *Phytophthora*. Umělé naočkování pomocí *Serratia plymuthica* výrazně omezilo vadnutí a hnilobu kořenů jahodníku, a dokonce vedlo ke zvýšení počtu květů a plodů. (Anandhakumar, a další, 2008) (Husaini, a další, 2016).

Zajímavou volbou by mohly být kmeny *Pseudomonas fluorescens*, o nichž se uvádí, že potlačují půdní patogeny. Několik kmenů má atributy, díky nimž jsou vhodné jako bioagens proti *P. cactorum*, např. dobrá kolonizace rhizosféry, produkce širokého spektra bioaktivních metabolitů a agresivní kompetence vůči jiným mikroorganismům. *P. fluorescens* EPS817 a EPS894 byly vybrány z kolekce kmenů pro jejich vysokou účinnost při kontrole infekcí *P. cactorum* v in vitro a in vivo na různých rostlinných materiálech (listy jahod a rostliny v květináčích). Tyto kmeny mají odlišný původ, protože EPS817 byl izolován z kořenů třešně a EPS894 z ústí jableň. EPS894 byl účinný při biokontrolě *P. cactorum* na rostlinách jahod, zatímco EPS817 byl méně účinný (Agustí, a další, 2011).

Další potenciální přirození nepřátelé vůči *P. cactorum* mohou být bakterie *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia plymuthica* a *Enterobacter aerogenes* (2019).

3.5.1.3.2 Bakterie podporující růst rostlin

Další alternativou ochrany rostlin před patogeny je biologická ochrana pomocí některých bakterií podporujících růst rostlin. Tyto bakterie jsou prospěšné pro růst rostlin, výnos a kvalitu plodin. Do této skupiny bakterií patří zástupci rodů *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Rhizobium* a *Serratia*. Mechanismy, kterými zmíněné bakterie podporují růst rostlin, nejsou plně pochopeny, ale předpokládá se, že zahrnují: (1) schopnost produkovat rostlinné hormony, jako jsou auxiny, cytokininy a gibereliny a inhibovat produkci ethylenu; (2) asymbiotická fixace dusíku; (3) solubilizace anorganického fosfátu a mineralizace organického fosfátu, nebo jiných živin; (4) antagonismus proti fytopatogenním mikroorganismům pomocí produkce sideroforů, syntézou antibiotik, enzymů nebo fungicidních sloučenin a kompeticí se škodlivými mikroorganismy (Husaini, a další, 2016).

3.5.1.3.3 Antagonistické houbové organismy

Efektivní strategie pro kontrolu *Phytophthora* spp. u jahodníku je pomocí houbových organismů rodu *Gliocladium* a *Trichoderma* spp. Od 30. let 20. století je známo, že houbové organismy rodu *Trichoderma* spp. mají potenciál působit jako biologicky aktivní činidla proti chorobám rostlin. *Trichoderma* spp. mají antagonistickou schopnost interagovat paraziticky i symbioticky s různými substráty a živými organismy, včetně rostlin aj. V současné době je na světě registrováno více než 250 různých zemědělských produktů na bázi *Trichoderma*, které jsou prodávány a používány k ochraně a zlepšování výnosů zeleniny, okrasných rostlin a ovocných stromů. Pokud jde o způsoby působení zástupců rodu *Trichoderma*, bylo popsáno několik mechanismů, jako je mykoparazitismus, konkurence, použití enzymů a antibiόza. Bylo potvrzeno, že *Trichoderma* je schopná vylučovat různé toxiny silně inhibiční pro *Phytophthora* spp. (dva z nejdůležitějších

toxinů vylučovaných *Trichoderma virens* jsou gliotoxin a gliovirin) (Porras, a další, 2007) (Husaini, a další, 2016).

Velmi dobré účinnosti při snižování populace *P. cactorum* lze dosáhnout pomocí solarizace a *Trichoderma* spp. – samostatně nebo kombinovaně. *Trichoderma* spp. patří mezi mikroorganismy, které přežívají teploty vznikající při solarizaci. Solarizace byla prováděna během léta za použití čiré polyetylenové plachty o mocnosti 50 µm s nízkou hustotou. Připravené přípravky s *Trichoderma* spp. lze aplikovat přidáním do půdy 7 dní před výsadbou, nebo zálivkou po výsadbě či máčením kořenů před výsadbou. Solarizace snížila půdní populaci *P. cactorum* v prvním roce o 100 %, v druhém roce o 47 % a o 55 % v roce třetím ve srov. s neošetřenou kontrolou. Aplikace *Trichoderma* spp. snížily půdní populace *P. cactorum* i výskyt kožovité hniloby jahod o 76,6 % v prvním roce a o 33,8 % v druhém roce ve srovnání s neošetřenou kontrolou. Kombinace solarizace a preparátu s *Trichoderma* spp. každoročně nejvíce snižovaly populaci půdního patogenu *P. cactorum*, a to z 88,9 % v lednu 2001, z 97,6 % v roce 2002, z 99 % v roce 2003. Velmi slibný účinek *Trichoderma* spp. a solarizace proti *P. cactorum* naznačuje, že již existují alternativy k tradiční chemické ochraně rostlin. V České republice je vedeno několik přípravků založených právě na organismech rodu *Trichoderma* spp., které nejsou vedeny jako přípravky biologické ochrany (nemají registraci). Nicméně tyto výrobky jsou registrované jako hnojiva nebo jako podpůrné látky a lze je touto cestou použít proti regulaci *P. cactorum*. Příkladem je produkt TriKologic na bázi *Trichoderma harzianum* nebo produkt Gliorex obsahující konidie hub rodu *Clonostachys rosea* a *Trichoderma harzianum* (Porras, a další, 2007).

Dalším antagonistickým houbovým organismem z čeledi Chaetomiaceae je *Chaetomium cupreum* / *C. globosum*, u kterých byla prokázána patogenita vůči chorobám způsobených rodem *Phytophthora* (Nelson, 2004).

Houba *Gliocladium catenulatum* je účinnou látkou biofungicidního přípravku Primastop. Tento produkt se osvědčil proti půdním chorobám způsobených *Phytophthora* (Vidhyasekaran, a další, 2004).

Polyversum je mikrobiologický fungicidní preparát registrovaný v České republice a používaný k ochraně rostlin (i v ekologickém zemědělství) proti houbovým chorobám napadající především kořeny, kořenové krčky jahodníku. Účinnou složkou je mikroskopický houbový organismus (Oomyceta) *Pythium oligandrum*. Evidenční číslo přípravku je 4556-0 a konec platnosti registrace je 30.4. 2022. Tento přípravek je před použitím ve stavu smáčitelného prášku. Proti fytoftorové hnilobě jahodníku se aplikuje 0,1 kg/ha s ochrannou lhůtou danou odstupem mezi termínem aplikace a sklizní. Způsob aplikace přípravku je pozemní postřik, kdy dávka kapaliny se pohybuje od 300 do 1000 l/ha. Termín aplikace je ideální těsně před květem s neomezeným opakováním v intervalu 5-7 dní. Dále lze tento přípravek proti *P. cactorum* dávkovat jako 0,05% roztok s ochrannou lhůtou danou odstupem mezi termínem aplikace a sklizní. Aplikovat připravené činidlo lze máčením sazenic před výsadbou (počet ošetření 1 ×), nebo pásovou zálivkou po výsadbě (počet ošetření 1 ×). Druhov a odrůdová citlivost není známa. Před ošetřením se doporučuje ověřit citlivost na malém vzorku rostlin v daných podmínkách (Beránek, a další, 2021) (Vidhyasekaran, a další, 2004).

3.5.1.4 Chemická ochrana

Používání fungicidních přípravků se stalo nedílnou součástí metod pro snižování negativních vlivů fytopatogenních organismů na výnos a kvalitu pěstovaných plodin. Tradičně byly *Phytophthora* spp. regulovány předplodinovou fumigací půdy, nebo aplikací fungicidů (ošetřením semen, ošetřením půdy,

ponožováním sazenic, postřiky nebo kapkovou závlahou) a kombinací těchto dvou způsobů ochrany. Fumigace půdy může celkově snížit množství inokula patogena v půdě, ale nemusí jej zcela eradikovat a používání fungicidů vedlo k vývoji rezistentních kmenů. U rostlin v květináčích, sklenících nebo záhonech by měla být půda a nádoby sterilizovány. Pro omezení fytoftorové krčkové hniloby jahodníku u vysoce citlivých kultivarů jahodníku není zcela účinné žádné opatření pro tlumení choroby, kromě kombinovaných metod. Dále závisí na napadení rostlin, zda jsou výsadby náchylných jedinců v půdách bez přítomnosti patogena, nebo v půdách, které jsou lehké a s dobrou drenáží atd. (Husaini, a další, 2016) (Agrios, 2005).

Jakmile *P. cactorum* osídí pole s jahodníkem, je obtížné ji z půdy vymýt, protože vytváří v odumřelém rostlinném materiálu klidové oospory, které mohou v poli přežít mnoho let. Chemickou ochranu aplikací fungicidů je třeba provést v raných fázích infekce, avšak nejlépe preventivně ideálně na základě prognózy tlaku choroby. Fumigace se provádí před výsadbou rostlin na pozemek. Za posledních 50 let se ochrana proti půdním patogenům jahodníku ve většině regionů světa prováděla dezinfekcí půdy methylbromidem (MeBr) a chloropikrinem (CP), a to jednotlivě nebo ve směsi. Fumigace pomocí MeBr a CP obvykle zabíjí celé nebo většinu množství inokula patogenu v hloubkách 60-90 cm půdy. V současné době, na již zakázaný methylbromid neexistuje jediný alternativní fumigant, který by měl stejně široké využití a stejnou míru účinnosti. Některé z alternativních fumigantů k MeBr zahrnovaly metam sodný a 1,3-dichlorpropen (1,3-D), ale žádný z nich úplně nenahradil MeBr. Fumiganty 1,3-D a CP v kombinaci s methylisothiokyanátem se ukázaly jako nejslibnější alternativy k MeBr jako fumiganty. Studie s experimentálními fumiganty methyljodidem a propargylbromidem ukázali, že tyto sloučeniny jako fumiganty mají vyšší reaktivitu než MeBr. Předplodinová fumigace 1,3-D:CP (61:35), samotným CP nebo dazometem (3,5-Dimethyl-1,3,5-thiadiazinane-2-thione) vedla k významnému snížení (inokula) choroby podobně jako účinky MeBr:CP. Mezitím metam sodný a metam draselný pouze redukovaly *P. cactorum* pouze na nižší výskyt onemocnění. Ethandinitril neboli dikyan je, vzhledem k jeho toxickým vlastnostem a schopnosti efektivně se rozkládat v životním prostředí, používán jako náhradní fumigační přípravek za Methylbromid například v Austrálii (Husaini, a další, 2016) (Cal, a další, 2005) (Aglave, 2019) (Havelková, 2017).

Pro chemickou kontrolu choroby se doporučuje fosetyl Al, metalaxyl, etridiazol a dimethomorph. Ošetření řízků/sazenic jahodníku s holými kořeny namáčením do fosetyl-Al před výsadbou a následnou aplikací postřiku lze kontrolovat FHKJ. Dále byl testován potenciál elicitorů, acibenzolar-S-methylu a chitosanu. Zatímco elicitory poskytovali ochranu srovnatelnou s fosetyl-Al, žádné z těchto ošetření nedokázalo této nemoci úplně zabránit. Metalaxyl byl také používán nicméně začal mít problém s rezistencí (Rivard, 2007) (Toljamo, 2020) (Vidhyasekaran, a další, 2004).

3.5.2 Kožovitá hniloba jahod

Kontrola kožovité hniloby jahod vyžaduje program, který integruje různé postupy správné pěstitelské praxe a v případě potřeby použití účinných fungicidů.

3.5.2.1 Preventivní opatření

Patogen *P. cactorum* způsobující kožovitou hnilobu jahod napadá primárně plody, ale může infikovat také květy. Mezi klíčové preventivní opatření patří udržování dostatečné vrstvy slámy mezi plodem a půdou, odstraňování infikovaných plodů, mulčování, kapková zálaha, výběr dobře odvodněných (drenážovaných) míst pro výsadbu a vyhýbání se těžkým půdám, které jsou často zamokřené (nasycené vodou). Vyhýbání se pracovním operacím, které vedou k tvorbě vyježděných kolejí mezi řadami a orientace řad k usnadnění odtoku povrchové vody. Sláma je velmi prospěšná pro prevenci kožovité hniloby jahod, a to alespoň ze tří důvodů: brání plodu v kontaktu s půdou, kde může houba přežít; poskytuje bariéru mezi plody a stojatou vodou; snižuje stříkání vodních kapiček na porosty nesoucích sporangie. Další preventivní opatření viz kapitola 3.5.1 Provádění ochranných opatření. Kulturní (preventivní) ochranné postupy jsou často dostatečné pro účinnou kontrolu hniloby, ale někdy jsou fungicidní ochranná opatření nutnou záležitostí, zejména ve vlhkých letech (Maas, 1998) (Aglave, 2019).

3.5.2.2 Nechemické metody ochrany

V teplejších oblastech se prokázalo, že solarizace půdy je účinná metoda při potlačování půdních patogenů a plevelů. Jedná se o jedinečnou strategii řízení ochrany kožovité hniloby jahod. Solarizace se provádí po vytvoření hrůbků a může být účinná pouze za ideálních povětrnostních podmínek (30-45 dní horkého počasí, které pod fólií indukují teploty půdy nejméně 50 °C v hloubce do 5 cm). Účinnost solarizace lze zvýšit zapravením zbytků brukvovitých plodin do půdy, zejména brokolice nebo hořčice (nebo po aplikaci fumigantu metam-sodium (40 l/ha). Solarizace je brána spíše jako preventivní kurativní metoda podobně jako propařování půdy (viz 3.5.1.2 Fyzikální metody ochrany) (Aglave, 2019).

3.5.2.3 Chemická ochrana rostlin

Kožovitá hniloba jahod není zdaleka jedinou hnilobou těchto plodů v jahodových sadech. Podmínky prostředí, které podporují vývoj kožovité hniloby jahod, jsou příznivé také pro další nemoci projevující se jako hniloba ovoce. Zejména plíseň šedá je velmi častá a mnohdy ji lze nalézt na stejné rostlině s plody infikovanými *P. cactorum*. Bohužel nejběžnější a nejúčinnější fungicidy proti plísni šedé (benomyl, thiofanát-methyl, vinclozolin a iprodion aj.) nejsou účinné proti kožovité hnilobě jahod. Většina fungicidů, které jsou v současné době k dispozici pro použití na jahodách, je obecně neúčinná pro kontrolu kožovité hniloby jahod. Ve skutečnosti lze výskyt kožovité hniloby výrazně zvýšit, pokud se tyto fungicidy používají samostatně k potlačení jiných nemocí. Captan a thiram jsou širokospektrální kontaktní fungicidy registrované proti plísni šedé v USA a zároveň poskytují určitou kontrolu nad kožovitou hnilobou, ale nejsou proti ní vysoce účinné, pokud dojde k epidemii. Ridomil Gold EC s účinnou látkou metalaxyl je účinný systémový fungicid proti kožovité hnilobě jahod a lze jej aplikovat na jaře po rozmrznutí půdy a před prvním růstem (ohrožen rezistencí). Tato časná aplikace se doporučuje především pro kontrolu červené hniloby kořenů jahodníku, ale

má pozitivní výsledky i při ochraně proti *P. cactorum*. Druhá aplikace se doporučuje speciálně proti kožovité hnilobě jahod a lze ji provést během vegetačního období během násady plodů. Aliette 80 WG s účinnou látkou fosetyl-AL by měl poskytovat dobrou ochranu jak proti červené hnilobě kořenů jahodníku, tak kožovité hnilobě jahod. Může být aplikován od zahájení květu přes sklizeň v sedmidenním až 14denním plánu a nemá žádné omezení před sklizní. Přípravky Abound (azoxystrobin), Cabrio (pyraclostrobin), and Pristine (pyraclostrobin plus boscalid) jsou strobiluriny velmi účinné při kontrole kožovité hniloby jahod, pokud se aplikují podle ochranného plánu ačkoli kožovitá hniloba jahod není uvedena na štítku těchto přípravků viz příloha 19. Přestože jsou výše zmíněné fungicidy více či méně účinné proti kožovité hnilobě jahod, měl by se klást důraz na integraci preventivních ochranných postupů viz kapitola 3.5.2.1 Preventivní opatření (Aglave, 2019) (Ellis, a další, 2006).

V České republice nejsou registrované žádné přípravky na ochranu proti kožovité hnilobě jahod, nicméně přípravky proti *P. cactorum* způsobující fytoftorovou krčkovou hnilobu jahodníku by potenciálně měli být účinné (viz kapitola 3.5.3.2 Chemická ochrana).

3.5.2.4 Biologické metody ochrany

Několik produktů obsahujících kyselinu fosforitou (neboli fosfit nebo fosfonát) se prodává jako doplňky výživy a rostlinné kondicionéry (Agri-Fos, ProPhyt a Phostrol). Tyto produkty lze použít v ochraně proti kožovité hnilobě jahod. Obsahují v podstatě stejnou účinnou látku, která je ve fungicidu Aliette.

V České republice je registrován jediný biopreparát Polyversum s účinnou látkou *Pythium oligandrum* M1 na ochranu proti *P. cactorum* způsobující fytoftorovou krčkovou hnilobu jahodníku viz kapitola 3.5.1.3.3., který lze použít i proti kožovité hnilobě jahod. Další metody biologické ochrany viz kapitola 3.5.1.3 Biologická ochrana.

Využití esenciálních olejů jako alternativních metod ochrany rostlin je přibliženo v kapitole 3.6 Esenciální oleje.

3.5.3 Fytoftorová krčková hniloba jahodníku

Choroby kořenů a kořenových krčků jsou obecně regulovány používáním zdravého sadebního materiálu ze školek a fumigací půdy. V rámci tendence snižování používání pesticidů je kladen důraz na vývoj a aplikaci alternativních způsobů zvládnutí tlumení chorob kořenů a kořenových krčků. Osvědčenou regulací fytoftorové krčkové hniloby jahod je vysazování rezistentních odrůd, zajištění odpovídajícího drenážního a odtokového systému pro vodu, vyhnutí se výsadbě v nízko položených, vlhkých špatně odvětraných oblastech. Důležité je také vyvarovat se zamořených půd. Doporučené je provádět pravidelné testování půd na přítomnost inokula. Další metody správné pěstitelské praxe pro kontrolu *P. cactorum* viz kapitoly 3.5.2.1 a 3.5.1. Aplikujte vhodné fungicidy namočením nebo postřikem.

3.5.3.1 Nechemické metody ochrany

Viz kapitola 3.5.2.2 Nechemické metody ochrany.

3.5.3.2 Chemická ochrana

Chemické přípravky se používají k potlačení nebo eradikaci *P. cactorum* v pěstebních školkách, vodě a půdě. Aplikovat by se měli vhodné fungicidy namočením nebo postřikem. Pro kontrolu fytoftorové krčkové hniloby jahodníku (FHKKJ) se při produkci ovoce pěstitelé spoléhají na fumigaci půdy (která poskytuje pouze částečnou kontrolu), použití sadby bez chorob a ochranné fungicidní ošetření. Mnoho současných problémů s FHKKJ v produkci jahod je spojeno s výsadbou rostlin bez příznaků infekce nebo velmi náchylných odrůd. Nemoc se poté projevuje v pozdější fázi vegetativního růstu jahodníku, obvykle při zahájení produkce plodů. (Maas, 1998) (Pscheidt, 2004) (Berrie, 2011).

Účinnou metodou pro rychlou dezinfekci nářadí, stolů nebo květináčů ve sklenících jsou produkty na bázi peroxidu, kvartérních amoniových sloučeninách anebo chlornanu sodného. Povrchy musí být zbaveny zeminy a zbytků rostlin, jelikož se tyto látky rychle navazují na organické látky. Na dezinfekci zavlažovací vody se používá například síran měďnatý, nebo instalace systémů na dezinfekci pomocí plynného chloru, chlornanu sodného a ozonu, nicméně s proměnlivou účinností. Další účinnou metodou ochrany proti *P. cactorum* je fumigace půdy pomocí methylbromidu s nebo bez chloropikrinu. Jde o příliš nákladný způsob pro samostatnou kontrolu *P. cactorum* a v dnešní době není používán, jelikož poškozují ozonovou vrstvu. Mezi další účinné půdní fumiganty patří metam sodný a produkty dazometu (neohrožují ozonovou vrstvu), které se v půdě rozpadají na isothiokyanáty. Metam sodný lze aplikovat zavlažovací vodou (více viz kapitola 3.5.1.4 Chemická ochrana) (Berrie, 2011) (Pscheidt, 2004).

U kontaktních fungicidů je aplikace zejména preventivní dříve, než dojde k inokulaci hostitele patogenem. Sloučeniny na bázi mědi, jako je bordeauxská směs, hydroxid měďnatý, oxid měďnatý, zásaditý síran měďnatý, oxychlorid měďnatý a uhličitán měďnato-amonný. Dále ethylenbis-dithiokarbamátové fungicidy, chlorothalonil, organické sloučeniny cínu, jako je TPTH (poněkud fytotoxické) a etridiazol (především jako půdní zálivka) (Berrie, 2011) (Pscheidt, 2004).

Mezi fungicidy, které jsou přijímány a transportovány v rostlinných tkáních, patří fenylamid, fosfonáty, kyselina skořicová a chinonové inhibiční skupiny (Qol). Fenylamidová skupina: pohyb pouze xylemem (zahrnuje metalaxyl, oxadixyl a mefenoxam), aplikace do půdy nebo média. Nejlepší je aplikace na jaře těsně před nebo když dojde k časnému růstu kořenů. Když se snažíte potlačit onemocnění listů (nadzemních orgánů

obecně), musí být aplikováno na listy. I když se chemikálie aplikovaná kořenem přesune nahoru do listů, nebude mít dostatečně vysokou koncentraci k dosažení kontroly nemoci. Fosfonátová skupina: pohyb xylem i floém a zahrnuje fosetyl-Al a kyselinu fosforitou. Rostlina absorbuje tyto chemikálie kořeny, a poté je přesune do dalších částí (rychle degradují půdní mikroorganismy). Fenylamidové a fosfonátové fungicidy nezabírají proti *Phytophthora* spp. Mohou zabránit pouze usazení organismu dřívě, než se dostane do rostliny a dalšímu růstu, pokud je organismus již uvnitř rostliny. Chemická skupina kyseliny skořicové, dimethomorf, má podobné vlastnosti, jaké byly popsány pro fenylamidovou skupinu. Také se pohybuje od kořenů k výhonkům, ale celkově je méně efektivní. Některé z fungicidů ve skupině QoI mají aktivitu na *Phytophthora* a na mnoho hub. I když jsou tyto fungicidy systémové, v rostlinných tkáních se tolik nepohybují. Způsob působení každé z těchto skupin je tak specifický, že mnoho druhů *Phytophthora* si na ně vyvinulo rezistenci (Berrie, 2011) (Pscheidt, 2004).

V jedné studii rostliny jahodníku "Malling Pearl" naočkované *P. cactorum* byly ošetřené přípravky uvedenými viz příloha 21 aplikované prosycením substrátu bezprostředně po výsadbě a dva týdny po výsadbě. Procento rostlin infikovaných FHKKJ v červenci a září je znázorněno v příloze 20. V obou případech hodnocení bylo procento infikovaných rostlin významně sníženo ošetřením přípravky Revus, Ranman, Fenomenal, Aliette, Paraat a Farmfos 10 L aplikovaných postřikem nebo zálivkou (byly stejně efektivní jako standardy Aliette a Paraat). Ošetření stimulačním přípravkem HDC F10 5 L bylo významné při hodnocení v červenci, ale ne v září. HDC F10 (10 l) mělo v červenci nejnižší skóre FHKKJ, ale významně se nelišilo od ostatních ošetření snižujících FHKKJ. Biologické přípravky Serenade i Prestop snížily FHKKJ ve srovnání s neošetřenou kontrolou, ale rozdílly nebyly významné. Všechny ostatní hodnocené fungicidy a chemické látky byly neúčinné (Berrie, 2011) (Pscheidt, 2004).

Existuje mnoho dalších účinných látek, které vykazují inhybiční efekt na oomycety – o nich není v této práci zmínka. V České republice je podle rostlinolékařského portálu registrováno několik přípravků na ochranu rostlin (více info na portálu eAGRI-registr přípravků na ochranu rostlin dostupné online: <http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/>). S účinnou látkou Fosetyl-Al je to přípravek Aliette 80 WG (evidenční číslo 3511-11) od firmy Bayer AG. Dávkování je nastaveno jako 0,25% roztok formou máčení rostlin (při výsadbě) nebo jako 1% roztok aplikovaný pásovou zálivkou v šířce pásu 20 cm v porostu (po zakořenění nebo na podzim). Povolený počet aplikací je 1 × za rok. V tuto chvíli je platnost registrace stanovena do 30.4.2021. Dalším přípravkem je Delan 700 WDG od firmy BASF SE s účinnou látkou Dithianon (evidenční číslo 4182-4). Aplikuje se 0,07% (dávka 200-1000 l/ha) roztok formou postřiku nebo rosením, maximálně 6 aplikací v plodině s odstupem minimálně 7 dnů. Konec registrace je zatím stanoven na 31.5.2022. Proti prázdným plísním je dále registrován přípravek Flowbrix (evid. číslo 4605-0) s účinnou látkou oxichlorid měďnatý (použitelný v ekorežimu). Dávkuje se 2,3-2,7 l/ha formou postřiku maximálně 3 × za vegetaci. Ochranná lhůta není stanovena a konec platnosti registrace je v tuto chvíli stanoven na 1.1. 2023. Přípravek VitiSan (evid. číslo 5476-0) s účinnou látkou Hydrogenuhličitan sodný (použitelný v EKO režimu) patří mezi další možnosti ochrany proti oomycetám. Dávkování je 5 kg/ha od 03 BBCH do 93 BBCH s ochrannou lhůtou 1 den (dávka vody 500-1000 l/ha). Aplikuje se postřikem nebo rosením 8 × za rok po 7-10 dnech. Konec platnosti přípravku je nastaven na 31.8.2022. Posledním registrovaným přípravkem je Previcur Energy (evid. číslo 4785-0) s účinnou látkou Fosetyl (310 g/l), propamokarb (530 g/l) od firmy Bayer AG. Mísitelnost je 2,5 l/ha s ochrannou lhůtou 1 den. Přípravek se aplikuje postřikem nebo rosením v průběhu vegetačního období maximálně 2 × po 14 dnech. Konec platnosti registrace přípravku je 30.4.2022 (Beránek, a další, 2021).

3.5.3.3 Biologické metody ochrany

V České republice je registrován jediný biopreparát Polyversum s účinnou látkou *Pythium oligandrum* M1 na ochranu proti *P. cactorum* způsobující fytoftorovou krčkovou hnilobu jahodníku viz kapitola 3.5.1.3.3. Další metody biologické ochrany viz kapitola 3.5.1.3 Biologická ochrana.

Vzhledem k nízkému počtu registrovaných chemických či jiných přípravků a stále většímu tlaku na snižování používání syntetických chemických variát, představuje využití esenciálních olejů možnou alternativu stávajících metod ochrany rostlin (viz kapitola 3.6 Esenciální oleje).

3.6 Esenciální oleje

Tato kapitola popisuje alternativní možnosti ochrany proti *P. cactorum* na jahodníku a je zároveň pokračováním k metodám biologické ochrany. Esenciální oleje neboli éterické oleje se nacházejí v sekrečních buňkách, epidermálních buňkách nebo žláznatých trichomech. Svou charakteristikou to jsou přirozené těkavé sekundární metabolity aromatických rostlin mnoha funkcí. Tyto oleje zajišťují rostlinám ochrannou funkci proti fytopatogenním organismům a živočichům. Mohou mít také funkci atraktantů nebo repeletní funkci pro hmyz či sloužit ke komunikaci s okolními rostlinami. Lze je získat z nejrůznějších rostlinných orgánů jako: pupeny, květy, semena, plody, kořeny i kůra nebo stonky rostlin. Jde o velmi složité přírodní směsi složené z 20 až 60 komponentů. Většinou obsahují 2 až 3 hlavní složky, které zaujímají velký podíl oproti stopovému množství ostatních látek. Procentické zastoupení jednotlivých složek ve směsi, která tvoří daný olej je velice variabilní. To může být způsobeno řadou faktorů: klimatickými podmínkami, půdními podmínkami, geografickou polohou, genetickou výbavou, stářím a vývojovou fází rostliny, typem extrakce aj. Esenciální oleje jsou v praxi využívány pro jejich přirozené antibakteriální, antimykotickou a insekticidní schopnost. V současnosti je popsáno kolem 3000 éterických olejů, z toho 300 se komerčně zpracovává. Mají všestranné využití ve všech možných odvětvích průmyslu, kosmeticky, potravinářství, aromaterapie aj. Pro zemědělství představují různou formou alternativu za syntetické pesticidy. Účinnost esenciálních olejů nespočívá vbiologickém účinku, např. v cytotoxicitě, ale spíše se týká konkrétního složení esenciálního oleje. Složení oleje určuje, do jakého místa či organely v buňce se esence dostane. V důsledku výskytu pak probíhá různý typ radikálové reakce, což ovlivňuje i produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) (Vašátková, 2015) (Prusky, a další, 2014) (Bakkali, a další, 2008).

Kvalita éterických olejů závisí na několika fyzikálních parametrech, včetně měrné hmotnosti, optické rotace, indexu lomu, rozpustnosti v různých organických rozpouštědlech, hodnoty zmydelnění, stupně esterifikace a obsahu fenolu. Bylo publikováno několik článků o účinnosti éterických olejů na hubové patogeny. Data nicméně ukazují významné odchylky i u stejných esencí. Tyto odchylky lze zohlednit, pokud vezmeme v úvahu všechny faktory, které mohou ovlivnit chemické složení, včetně povětrnostních podmínek, sezónních a zeměpisných podmínek, doby sklizně a destilačních technik u aromatických rostlin. Obtížně alternativních metod ochrany dosáhnout stejných výsledků se syntetickými fungicidy lze překonat integrovanou ochranou rostlin. Například použití kmene *Bacillus amyloliquefaciens* a éterických olejů z tymiánu a citronové trávy přineslo zajímavé výsledky proti patogenům, jako je *B. cinerea*, *P. expansum* a *R. stolonifer* na broskvích (Prusky, a další, 2014).

Účinnost éterických olejů by měla být zvažována v kontextu složení olejů. Monoterpeny, seskviterpeny nebo některé fenolové sloučeniny (thymol, karvakrol, eugenol) jsou hlavní složky rostlinných éterických olejů, které se vyznačují silnou inhibiční aktivitou proti rostlinným houbovým patogenům. Vyšší koncentrace hlavní složky nutně neznamená lepší inhibiční vlastnosti. Například je prokázán synergismus mezi karvakrolem a jeho prekurzorem p-cymenem. Ukázalo se, že p-cymen je sice velmi slabá antibakteriální složka, ale je schopna narušit strukturu bakteriální buněčné membrány. Takto zajistí snadný vstup karvakrolu do protoplastu, který buňku zničí. Karvakrol také spolupůsobí s thymolem (Rota et al., 2008). (Vašátková, 2015)

Přípravky na bázi esenciálních olejů mohou být aplikovány postřikem nebo máčením kořenů nebo fumigací. Jejich účinnost při kontrole houbových patogenů je často způsobena synergii různých chemických složek. Pro zvýšení jejich účinnosti mohou být éterické oleje použity také společně s dalšími kontrolními

metodami v rámci integrované ochrany rostlin. Antimikrobiální aktivita oleje z citronové trávy je způsobena přítomností alkaloidů, taninů a srdečních glykosidů. Byla prokázána fungicidní aktivita karvakrolu v oleji tymiánu a oregana a p-anisaldehydu v anýzovém oleji proti různým posklizňovým chorobám. (Prusky, a další, 2014)

Extrakt ze *Syringa oblata* obsahuje hlavně eugenol a eugenol-acetát, které vykazují antifungální aktivitu proti *Phytophthora nicotianae* na tabáku. Eugenol měl silnou inhibiční schopnost proti *P. nicotianae* s hodnotami MIC 200 ug / ml (Changliang, a další, 2017).

Jednou z dalších rostlin, která má antimikrobiální aktivitu vůči fytopatogenům, byl éterický olej z *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* (kopytník). Hlavními složkami oleje byly methyleugenol (59,42%), eucarvon (24,10%), 5-allyl-1,2,3-trimethoxybenzen (5,72%) (GC-MS). Esenciální olej a nejhojnější složka methyleugenol, byly samostatně testovány na inhibici *Phytophthora cactorum*. Olej i methyleugenol silně inhibovaly růst *P. cactorum*. 50% inhibice růstu IC50 nastala při 0,073 µg / ml u oleje a samotného methyleugenolu byla IC50 při koncentraci 0,052 µg / ml (Yang, a další, 2010).

In vitro aktivita sloučenin éterického oleje *Origanum heracleoticum* L. byla testována proti *Phytophthora cactorum* metodou otrávených ploten za použití čtyř různých koncentrací. Procento inhibice však ne vždy korelovalo s koncentrací. Anisol byl obsažen z 1,93 % v esenciálním oleji a MIC byla 73,8 % při koncentraci 1000 µl / ml. Karvakrol byl obsažen z 1,04 % v esenci a MIC byla 65,9 % při koncentraci 1000 µl / ml. Eucalyptol se vyskytoval v esenci z 0,99 % a MIC byla 24,7 % při koncentraci 10 µl / ml. Linalool se vyskytuje v esenci z 0,55 % a jeho MIC byla 27,4 % při koncentraci 10 µl / ml. Ocymene byl obsažen z 0,5 % v oleji a MIC byla 40,9 % při koncentraci 1000 µl / ml (Salamone, a další, 2007).

3.6.1 Metody získávání olejů

Existují různé způsoby získávání esenciálních olejů. Lisování za studena je jakýkoli mechanický proces, z něhož se získává olej rozdrčením vstupní suroviny. Tento způsob se využívá především u semen nebo plodů. Další metodou je hydrodestilace, která se dělí na dva základní postupy: destilace v proudu vodní páry, nebo hydrodestilace přímo ve vroucí vodě podle Clevengera. Destilované sloučeniny mají hydrofobní povahu, a tudíž se snadno od sebe oddělí díky rozdílné hustotě. Jde o zdoluhavý proces, a proto byly vyvinuty nové technologie, které zkrátí celý proces, zvýšit výnos a kvalitu izolovaného oleje. Hydrodestilace za pomoci mikrovln je založena na působení mikrovln na vodu v rostlinných pletivech. V důsledku protržení buněčné stěny buňky se uvolní vodní emulze, z níž se voda začne odpařovat. Další variantou je extrakce pomocí kapalného nebo tuhého rozpouštědla. Cílové sloučeniny se vlivem rozpouštědla uvolní z rostliny a následně se oddělí odpařením rozpouštědla. Při extrakci éterických olejů je vhodné zvolit kapalný oxid uhličitý. Inovací v tomto směru je extrakce rozpouštědlem za pomoci mikrovln. Další alternativou všech výše popsaných metod je mikrovlnná hydrodifúze a gravitace, kdy dochází k uvolnění vnitrobuněčné tekutiny a na základě hydrodifúze a zemské gravitace se extrakt dostane mimo rostlinný materiál.

3.6.2 Hřebíčkový esenciální olej (*Eugenia caryophyllata* (L.) Merr. et L. M. Perry, 1939) HR

Výroba hřebíčkového esenciálního oleje probíhá hydrodestilací (hydrodestilací za pomoci mikrovln) poupat a kalichů rostliny *Eugenia caryophyllata*, ojedinele i z listů a stonků. Složky éterického oleje byly identifikovány plynovou chromatografií / hmotnostní spektrometrií (GC-MS) podle (Adams, 2007). Celkem

bylo identifikováno 98,69 % komponentů: α -Pinene 0,06 %, β -Pinene 0,03 %, β -PineneC 0,02 %, Chavicol 0,05 %, Eugenol 85,6 %, α -Copaene 0,04 %, β -Caryophyllene 8,75 %, α -Caryophyllene 2,6 %, α -Selinene 0,04 %, α -Muurolene 0,04 %, α -Bulnesene 0,05 %, α -Farnesene 0,06 %, δ -Cadinene 0,48 %, Caryophyllene oxide 0,82 %.

Účinnost éterického oleje *Eugenia caryophyllata* (syn. *Syzygium aromaticum*) byla testována na 20 izolátech *P. infestans* pomocí in vitro agarové metody otrávených ploten. Bylo zjištěno, že MIC se pohybuje mezi 0,25-0,4 μ l / ml a inhibice růstu mycelia (MGI) nastala při 1 μ l / ml éterického oleje v kultivačním médiu (Mazáková, a další, 2018).

Následující studie potvrdila antifungální aktivitu éterického oleje *Eugenia caryophyllata*. Eugenol je zodpovědný za antifungální účinek hřebíčkového oleje, ale přispět mohou také interaktivní účinky jiných sloučenin přítomných v menším množství. MIC a MFC esenciálního oleje se pohybovala mezi 0,1–2,5 μ l / ml u houbových organismů: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium fulvum*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Mucor mucedo*, *Phomopsis helianthi*, *Phoma magdonaldii*, *Trichphyton mentografites*. Největší odolnost byla zaznamenána u *Trichoderma viride* (MIC 2,5 μ l / ml), *Penicillium* (MIC 0,5 μ l / ml), and *Aspergillus ochraceus* (MIC 10 μ l / ml) (Dzamic, a další, 2009).

3.6.3 Skořicový esenciální olej (*Cinnamomum zeylanicum* Schaeff., 1760) CINO

Skořicový esenciální olej se získává hydrodestilací (aj.) z listů nebo kůry z rostliny *Cinnamomum zeylanicum*. Složky éterického oleje byly identifikovány plynovou chromatografií / hmotnostní spektrometrií (GC-MS) podle (Adams, 2007). Celkem bylo identifikováno 99,23 % komponentů: α -Pinene 1,01 %, Camphene 0,36 %, Benzaldehyde 0,19 %, β -Pinene 0,25 %, α -Phellandrene 0,29 %, p-Cymene 1,87 %, Limonene 0,86 %, Linalool 2,2 %, α -Terpineol 0,28 %, Estragole 0,29 %, trans-Cinnamaldehyde 1,47 %, Safrole 1,53 %, Eugenol 73,98 %, α -Copaene 0,73 %, Vanillin 0,31 %, β -Caryophyllene 2,84 %, trans-Cinnamyl acetate 1,91 %, α -Caryophyllene 0,55 %, Eugenyl acetate 3,04 %, Caryophyllene oxide 1,06 %, Benzyl benzoate 4,22 % (Klaudová, 2017) (Adams, 2007).

Podle jedné studie byla účinnost éterického oleje extrahovaného z *Cinnamomum zeylanicum* testována při aplikačních dávkách 100, 250, 500, 1 000 nebo 2 000 μ l / l na Petriho miskách, in vitro v PDA kultivačním médiu pro kontrolu hniloby ovoce. Výsledky ukázaly 100% snížení růstu mycelia u *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani* a *Phytophthora palmivora* po aplikaci skořicového oleje v koncentraci 1000 μ l / l. Jedna z hlavních složek cis-cinnamaldehyd byla v použitém esenciálním oleji obsažena z 59,1 % (Sarkhosh, a další, 2018).

Skořicový olej z rostliny *Cinnamomum zeylanicum* byl použit jako antifugální látka na ochranu banánů proti plísňovým chorobám způsobeným *Lasiodiplodia theobromae*, *C. musae* a *Fusarium proliferatum*. Testované oleje byly fungistatický (MLC) a fungicidní proti testovaným patogenům v rozmezí 0,03 - 0,11% (v / v) (Ranasinghe, a další, 2002).

3.6.4 Tymiánový esenciální olej (*Thymus vulgaris* L., 1753) TV

Tymiánový esenciální olej se získává hydrodestilací čerstvých květů a listů. Složky éterického oleje byly identifikovány plynovou chromatografií / hmotnostní spektrometrií (GC-MS) podle (Adams, 2007). Celkem

bylo identifikováno 99,59 % komponentů: α -Thujene 0,35 %, α -Pinene 1,27 %, Camphene 1,51, 1-Octen-3-ol 0,88 %, Myrcene 1,34 %, α -Terpinene 1,09 %, p-Cymene 16,4 %, Limonene 0,33 %, Eucalyptol 1,29 %, γ -Terpinene 5,74 %, Linalool 4,68 %, Camphor 1,87 %, Borneol 1,76 %, Terpinen-4-ol 1,78 %, α -Terpineol 0,23 %, Thymol methyl ether 0,58 %, Carvacrol methyl ether 0,92 %, Thymol 48,07 %, Carvacrol 2,75 %, Eugenol 0,23 %, β -Caryophyllene 5,91 %, δ -Cadinene 0,26 %, Caryophyllene oxide 0,33 %. Existují různé chemotypy tymiánu, které se liší mezi sebou ve složení sekundárních metabolitů. Mezi dominantní komponenty tymiánu patří: thymol, karvakrol, linalool, geraniol, α -terpineol (Adams, 2007) (Vašátková, 2015).

Tymián patří mezi byliny s nejvyšším antibakteriálním a fungicidním účinkem. S největší pravděpodobností je to nejvíce způsobeno právě obsahem thymolu a karvakrolu (aj.). Účinnost éterického oleje *Thymus vulgaris* byla testována na 20 izolátech *P. infestans* pomocí in vitro agarové metody otrávených ploten. Bylo zjištěno, že MIC se pohybuje mezi 0,25-0,4 μ l / ml a inhibice růstu mycelia (MGI) nastala při 1 μ l / ml éterického oleje v kultivačním médiu (Mazáková, a další, 2018).

Dalším experimentem na testování inhibičního efektu esenciálních olejů byl pokus s *Phytophthora capsici*. Izoláty patogena *P. capsici* v in vitro podmínkách byly na kontrole plně pokryty myceliem. Esenciální olej (EO) z *Thymus vulgaris* L. v koncentraci 0,1 μ g / ml významně potlačoval infekci *P. capsici*. Účinky EO při nižší koncentraci nebyly významné v prevenci infekce. Vliv éterického oleje z *Thymus vulgaris* na produkci oospór *P. capsici* na médiu V8 začínal při dávce 0,16 μ g / ml (se zvyšováním dávky se účinnost zvyšovala) (Bi, a další, 2012).

Podle jedné studie byla účinnost éterického oleje extrahovaného z *Thymus daenensis* testována při aplikačních dávkách 100, 250, 500, 1 000 nebo 2 000 μ l / l na Petriho miskách, in vitro v PDA kultivačním médiu pro kontrolu hniloby ovoce. Výsledky ukázaly 100% snížení růstu mycelia u *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Phytophthora palmivora* a *Botryosphaeria* sp. po aplikaci tymiánového oleje ve všech testovaných koncentracích. Jedna z hlavních složek thymol byla v použitém esenciálním oleji obsažena z 73,3 % (Sarkhosh, a další, 2018).

V jiné studii byla účinnost éterického oleje (EO) *Thymus vulgaris* L. hodnocena pro kontrolu růstu *Phytophthora drechsleri* v in vitro podmínkách na PDA médiu. Růst mycelia byl významně snížen zvyšováním koncentrace (EO). Výsledky ukázaly, že inhibice růstu mycelia (MGI) byla 100 % mezi 0,4-0,8% koncentrací EO (MIC byla při 0,4% koncentraci) a při 0,2% koncentraci byla inhibice růstu mycelia 79,38 % (Mohammadi, a další, 2015).

Podle (Kumar, a další, 2008) má tento esenciální olej natolik silný účinek, že předčí mnohé syntetické fungicidy. Esence úspěšně inhibovala růst mycelia u dalších patogenů patogenů: *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata*, *Botryodiplodia theobromae*.

3.6.5 Gerániový esenciální olej (*Pelargonium graveolens* L'Hér., 1789) PG

Esenciální olej Geránium se získává hydrodestilací ze 4 druhů: *P. graveolens*, *P. odoratissimum*, *P. capitatum* a *P. radens*. Složky éterického oleje byly identifikovány plynovou chromatografií / hmotnostní spektrometrií (GC-MS) (Adams, 2007). Celkem bylo identifikováno 99,37 % komponentů: α -Pinene 0,66 %, Linalool 5,22 %, cis-Rose oxide 1,57 %, trans-Rose oxide 0,60 %, Menthone 2,35 %, Isomenthone 6,34 %, Citronellol 32,56 %, Geraniol 14,92 %, Geranial 0,78 %, Citronellyl formate 8,86 %, Geranyl formate 3,59 %, α -Copaene 0,79 %, β -Bourbonene 2,26 %, β -Caryophyllene 1,81%, Citronellyl propionate 0,58 %, Geranyl

propionate 1,06 %, Germacrene D 1,47 %, δ -Cadinene 2,18 %, Citronellyl butyrate 0,64 %, Geraniol butyrate 1,36 %, Phenethyl tiglate 1,24 %, γ -Eudesmol 6,87 %, Geranyl tiglate 1,6 %. Procentuální složení jednotlivých komponentů se může lišit podle kvality použitého materiálu (Adams, 2007).

Výrazná antimikrobiální aktivita esence spočívá v jejím složení, především díky obsahu monoterpenů (linalool, citronellol, geraniol, a citronellyl-formate). Antifungální aktivita esence se osvědčila při ochraně před různými rody houbových organismů. Výborně inhibuje růst mycelia *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *B. cinerea* a *Alternaria alternata* (Badawy, a další, 2014) (Vašátková, 2015).

Fungicidní aktivita esenciálního oleje *Pelargonium graveolens* byla potvrzena na houbových organismech: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium fulvum*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Mucor mucedo*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Phomopsis helianthi*, *Phoma macdonaldii*, *Trichoderma viride*, *Trichophyton menthagrophytes*, *Candida albicans*. Minimální koncentrace inhibice růstu (MIC) a minimální fungicidní koncentrace (MFC) se pohybovala mezi 0,25-2,5 mg / ml esenciálního oleje v médiu. Nejvíce odolné byly houby *Mucor mucedo* a *Aspergillus* spp. Lze konstatovat, že éterický olej *P. graveolens* vykazoval vysokou antifungální aktivitu proti různým kmenům hub (Džamić, a další, 2014).

Účinnost éterického oleje *Pelargonium graveolens* byla testována na 20 izolátech *P. infestans* pomocí in vitro agarové metody otrávených ploten. Bylo zjištěno, že MIC se pohybuje mezi 0,6-0,8 μ l / ml a MGI nastala při 1 μ l / ml éterického oleje v kulturačním médiu (Mazáková, a další, 2018).

3.6.6 Citronelový esenciální olej (*Cymbopogon winterianus* (L.) Spreng.) CW

Citronelový esenciální olej se připravuje nejčastěji mechanickým lisováním zastudena. Setkáme se však i s olejem získaným parní destilací. Složky éterického oleje byly identifikovány plynovou chromatografií / hmotnostní spektrometrií (GC-MS) podle (Adams, 2007). Celkem bylo identifikováno 98,84 % komponentů: Limonene 3,77 %, Linalool 0,91 %, Isopulegol 1,56 %, β -Citronellal 34,17 %, Citronellol 11,8 %, Neral 0,21 %, Geraniol 18,51 %, Geranial 0,45 %, Citronellyl acetate 4 %, Eugenol 1,17 %, Geranyl acetate 4,52 %, β -Elemene 2,94 %, β -CaryophylleneC 0,26 %, γ -Muurolene 0,27 %, Germacrene D 2,22 %, α -Muurolene 0,68 %, γ -Cadinene 2,85 %, Elemol 4,3 %, Germacrene D-4-ol 0,85 %, γ -Eudesmol 0,33 %, tau-Muurolol 0,81 %, β -Eudesmol 0,33 %, α -Cadinol 1,14 % (Adams, 2007). Složky esenciálních olejů z rostlin rodu *Cymbopogon* se ukládají v leukoplastech listů. Během růstu rostliny se zvyšuje produkce obsah limonenu, β -Citronellalu a geraniolu, zatímco množství citronellyl-acetátu a geranyl-acetátu klesá (Vašátková, 2015).

Účinnost éterického oleje *Cymbopogon winterianus* byla testována na 20 izolátech *P. infestans* pomocí in vitro agarové metody otrávených ploten. Bylo zjištěno, že MIC se pohybuje při 1 μ l / ml a stejně tak MGI nastala při 1 μ l / ml éterického oleje v kulturačním médiu (Mazáková, a další, 2018).

Silnou fungicidní aktivitu ukázal esenciální olej z *C. winterianus* na houbové organismy použité v této studii byly: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium fulvum*, *Fusarium tricinctum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Mucor mucedo*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron*, *Trichoderma viride*, *Phomopsis helianthi*, *Phoma macdonaldii*, *Trichophyton menthagrophytes* and *Candida albicans*. MIC se pohybovala mezi 1–5 μ l / ml (kromě *T. viride*, kde byla MIC 10 μ l / ml). MFC (minimální fungicidní koncentrace) se pohybovala mezi 0,5-5 μ l / ml (kromě *T. viride*, kde

byla MFC 20 μl / ml). Nejvíce citlivé byly druhy *A. alternata*, *A. pullulans*, *C. cladosporioides*, *C. fulvum*, *T. menthagrophytes*, u kterých byla MIC do 1 μl / ml (Simic, a další, 2008).

3.6.7 Kafrový esenciální olej (*Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl, 1825) CINO

Esenciální olej z kafru se získává během procesu extrakce kafru ze dvou druhů kafrových stromů. První je Kafrovník lékařský, nesoucí vědecký název *Cinnamomum camphora*, ze kterého se získává klasický kafr (použit v této práci). Druhou odrůdou je kafrový strom z Bornea, který je vědecky známý jako *Dryobalanops camphora*. Složky éterického oleje byly identifikovány plynovou chromatografií / hmotnostní spektrometrií (GC-MS) podle (Zaizhi, a další, 2018). Celkem bylo identifikováno 99,69 % komponentů: (α -Thuiene), α -Pinene 2,46 %, Camphene 1,58 %, β -Sabinene 3,94 %, β -Pinene 1,39 %, α -Myrcene 1,2 %, α -Phellandrene 0,37 %, Carene 0,24 %, β -Cymene 0,39 %, Eucalyptol 15,45 %, α -Terpinolene 0,73 %, Camphor 66,10 %, α -Terpineol – nedetekován, Isobornyl acetate 1,38 %, β -Caryophyllene 0,83 %, α -Humulene 0,52 %, D-Germacrene – nedetekován, Selinene 0,44 %, β -Germacrene 2,67 %. Bezrozpouštědlová mikrovlnná asistovaná extrakce (SFME) se ukázala jako účinná alternativní metoda mezi ostatními metodami pro separaci éterických olejů z rostlinných materiálů (Zaizhi, a další, 2018).

Dva jednotlivé oleje z listů *Artemisia princeps* a semen *Cinnamomum camphora* a jejich směs (1: 1) vykazovaly podobnou antifungální aktivitu proti *Fusarium graminearum*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Gerlachia nivalis*, *Helminthosporium sativum* a *Rhizoctonia cerealis* v množství 50, 100 a 500 μl / ml. Vůči *Phytophthora capsici* v množství 50 a 100 μl / ml. Myceliální růst *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* byl 100% inhibován při 50 μl / ml. Toto pozorování naznačilo, že éterické oleje ze studovaných druhů by mohly být cenné pro vývoj nového přírodního fungicidu, který by potlačoval choroby pšenice přenášené v půdě ošetřením semen (Liu, a další, 2001).

Cinnamomum camphora (L.) Presl. je jedním z nejdůležitějších druhů tvrdého dřeva pocházejících z Číny, které má významnou antifungální aktivitu. Extrakty *C. camphora* byly testovány na odolnost vůči dvěma dřevokazným houbám. 50% koncentrace chloroformových extraktů účinná pro *Coriolus versicolor* byla 7,8 mg / ml. Methanolové extrakty s koncentrací 8 mg / ml měly nejlepší potlačující účinek na *Gloeophyllum trabeum* s 50% účinností při 0,3 mg / ml. (Li, a další, 2014)

4 Metodika

Praktická část této diplomové práce, vliv esenciálních olejů na napadení jahodníku *P. cactorum*, byla rozdělena na dvě části. První část experiment byla zaměřena na testování vlivu esenciálních olejů na *P. cactorum* v in vitro podmínkách v Petriho miskách. Druhá část experimentu byla zaměřena na vliv aplikace esenciálních olejů na *P. cactorum* v in vivo podmínkách v nádobovém testu. Toto testování bylo provedeno v letech 2020–2021 pod záštitou katedry ochrany rostlin České zemědělské univerzity v Praze, v profesionálně zařízené laboratorní místnosti a pod vedením pana doc. Ing. Miloslava Zouhara, Ph.D.

4.1 Vliv esenciálních olejů na *P. cactorum* v in vitro testu

Citlivost vůči esenciálním olejům byla testována na 10 izolátech patogenu *P. cactorum*, pocházejících z různých lokalit, které byly k dispozici na katedře ochrany rostlin. Izolace z rostlinného materiálu nebyla součástí této diplomové práce. Označení izolatů je vypsáno v následujícím seznamu:

- 17_45_1b
- 17_34_7
- 17_30_80
- 17_12_20
- 17_80_26
- 17_23_19
- 18_10_14a
- 19_28_10
- 17_4_12
- 17_15_10b

Pro tento test byly zvoleny esenciální oleje, které v minulých letech řešení projektu vykazovaly optimální účinnost, přičemž byly připraveny tři směsi na základě zkušeností řešitelského týmu. Byly tak kombinovány esenciální oleje vysokých a nízkých tónů tak, aby účinnost byla co nejdelší. Na směsích označených A (1) (hřebíček+skořice+tymián neboli HR+CINO+TV), B (2) (geranie, tymián neboli PG+TV), C (3) (skořice+citronela+kafr neboli CINO+CW+KAF) byl testován jejich účinek na 10 vybraných izolátech *P. cactorum* v pěti různých koncentracích (1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001%) viz Tabulka 1.

Tabulka 1 Směsi esenciálních olejů a jejich použité koncentrace v experimentu (Weigricht, 2021)

Účinná látka (směs esenc. olejů)	Koncentrace úl v % v roztoku média					
	K	1	2	3	4	5
A (HR+CINO+TV)	0	1	0,1	0,01	0,001	0,0001
B (PG+TV)	0	1	0,1	0,01	0,001	0,0001
C (CINO+CW+KAF)	0	1	0,1	0,01	0,001	0,0001

Experiment byl založen na principu otrávených ploten. Na přípravu V8 růstového média s modifikací přečištění pro účely testování citlivosti *P. cactorum* vůči esenciálním olejům bylo použito:

- analytická váha, váženky, lžička, magnetické míchadlo
- 500 ml Erlenmayerovy baňky, alobal, odměrný válec
- V8 juice s agarem v potřebném množství
- autokláv nebo Papinův hrnec
- centrifuga

Na přípravu 1 litru média s V8 juice bylo použito:

- 200 ml šťávy V8 (8 druhů zeleniny)
- 2 g CaCO₃
- 16 g agaru
- destilovaná voda 800 ml

V kádince bylo rozmícháno potřebné množství V8 juice s uhličitánem sodným (CaCO₃). Toto odměřené množství, v kádince překryté alobalem proti úniku, se s magnetickým míchadlem umístilo na magnetickou míchačku. Směs byla promíchána pod dobu 15-20 minut (do rozpuštění CaCO₃). V8 juice a CaCO₃ byly po jeho rozpuštění centrifugovány pro odstranění hrubých nečistot. Poté byla přidána destilovaná voda v množství dle objemu směsi šťávy V8 s CaCO₃ a opět byla dostatečně promíchána. Do 500 ml kuželovitých baněk bylo během míchání naváženo po 4 g agaru. Hotový roztok byl odměřen ve válci a poté rozdělen po 250 ml do každé baňky (snížení rizika vyublání) s předem připraveným agarem. Všechny baňky byly následně zakryty dvěma vrstvami alobalu a vloženy do autoklávu pro sterilizaci a iniciaci tuhnutí agaru pod dobu 20 minut při 121 °C (případně do Papinových hrnců po dvou baňkách po dobu 10 minut na plný výkon elektrického vařiče a dalších 10 minut na 50% výkon topného tělesa). Po ukončeném procesu sterilizace se baňky postupně vyjmuly z autoklávu, aby médium zchladlo na teplotu vhodnou pro rozlévání agaru. Do zchlazeného média byly přidány esenciální oleje ředěné v DMSO (dimethylsulfoxidu) v množství pro výše uvedenou cílovou koncentraci. Před samotným rozléváním agaru s přidaným množstvím esenciálních olejů, bylo vysterilizováno potřebné množství Petriho misek ve flow boxu pod UV-zářičem, a to po dobu 20 minut. Připravené růstové médium bylo nalito rovnoměrně po dně do Petriho misek o průměru 9 cm. Od každé koncentrace účinné látky (1-5) a typu účinné látky (A, B, C) bylo provedeno troje opakování, tzn. celkem 450 misek. U kontrolních variant byl rozléván samotný

agar, tj bez účinné látky. Pro každý typ izolátu byly připraveny 3 kontrolní misky, tj. celkem 30 misek. Následně byly misky pro přehlednost připraveny do jednotlivých sloupců dle koncentrací a typu účinné látky.

4.1.1 Přeočkování izolátů

Pro potřeby založení experimentu bylo před zahájením samotného testu nutno nejprve přeočkovat všech 10 zmíněných izolátů *P. cactorum*. Bylo připraveno dostatečné množství izolátů pro provedení experimentu. K tomu bylo použito kultivační médium bez přidání esenciálních olejů a následující zařízení:

- původní izoláty – 10 (k dispozici na katedře ochrany rostlin)
- Petriho misky (Ø 9 cm) s V8 juice agarem
- skalpel, korkovrt, kahan, ethanol
- flow box
- parafilm

Všechny popsané úkony byly provedeny ve sterilním prostředí flow boxu. Před začátkem práce bylo prostředí flow boxu dezinfikováno UV zářením po dobu 20 minut. Do předem připravených Petriho misek bylo rovnoměrně po dně rozlito kultivační médium V8 juice agarem bez esenciálních olejů (viz kapitola 4.1 4.1 Vliv esenciálních olejů na *P. cactorum* v in vitro testu). Z původního narostlého izolátu bylo pomocí korkovrtu vyseknuto mycelium o průměru 9 mm. Mycelium bylo odebíráno postupem od kraje misky (nejmladší část mycelia). Pomocí skalpelu byly jednotlivé výseky přeneseny na nově rozlité misky s kultivačním médiem. Korkovrt a skalpel byly po každém použití dezinfikovány nad plynovým kahanem. Mezi očkovaním jednotlivých izolátů byla pracovní plocha ošetřena 96% ethanolem. Naočkované misky byly označeny názvem izolátu, datem a následně utěsněny parafilmem. Izoláty byly následně inkubovány při laboratorní teplotě ve tmě. Tyto nově naočkované izoláty byly později použity při zakládání in vitro testu vlivu esenciálních olejů na *P. cactorum*.

4.1.2 Inokulace izolátů *P. cactorum* na otrávené plotny

Pro založení testu vlivu esenciálních olejů na vývoj *P. cactorum* in vitro byl použit následující materiál a zařízení:

- flow box
- misky s izoláty *P. cactorum*
- sterilní Petriho misky (Ø 9 cm)
- kultivační médium V8 juice agar
- plynový kahan
- korkovrt, skalpel, parafilm, nůžky

Veškeré pracovní procesy spojené s inokulací *P. cactorum* na otrávené plotny byly provedeny ve flow boxu. Po zatuhnutí kultivačního média byla na otrávené plotny a na kontrolní variatny nainokulována *P. cactorum* formou výseku mycelia o průměru 9 mm. Výseky mycelia byly pomocí skalpelu přeneseny na Petriho misky s médiem. Před začátkem a po

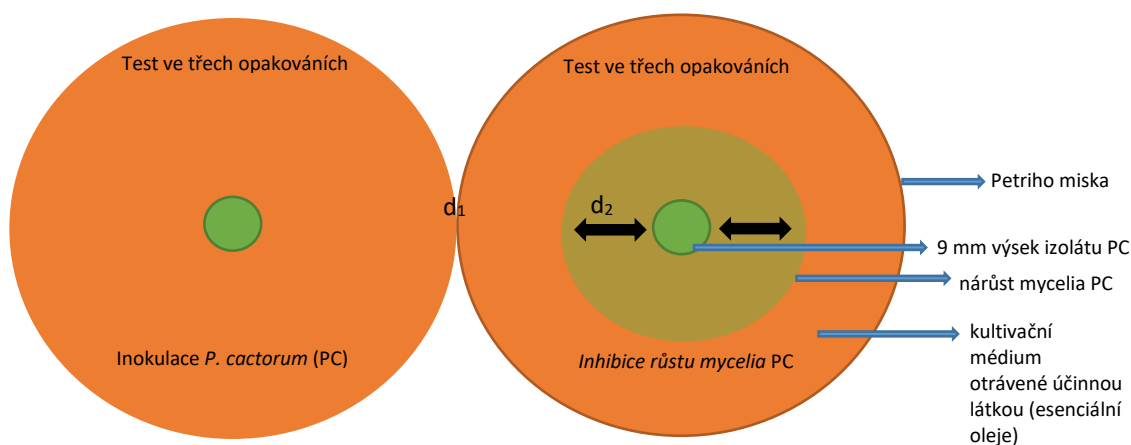
inokulaci jednotlivými izoláty bylo nářadí dezinfikováno nad kahanem a pracovní plocha ošetřena 96% ethanolem. Od každého izolátu *P. cactorum* bylo provedeno 45 inokulací do otrávených ploten (tzn. 3 opakování od každé koncentrace a typu účinné látky) a 3 inokulace do kontrolní varianty (bez účinné látky). Po inokulaci byly Petriho misky dvakrát po obvodu utěsněny parafilmem jako ochranné opatření před vnější kontaminací. Dále byly hotové misky označeny názvem izolátu, datem, variantou a koncentrací. Takto inokulované misky byly inkubovány při 23 °C po dobu 1 týdne.

4.1.3 Vyhodnocení výsledků

Po jednom týdnu inkubace byl experiment vyhodnocen tak, že byl pomocí digitálního měřítka změřen na dvou protilehlých místech nárůst mycelia. Pro měření růstu mycelia byl použit následující materiál a přístroje:

- digitální posuvné měřítko
- počítač (software Microsoft Excel)
- černá podložka

Prvním krokem pro vyhodnocení citlivosti testovaných izolátů bylo radiální měření inhibice růstu mycelia u jednotlivých izolátů, koncentrací, typů směsi esencí (úl.) a kontrolní varianty. Pomocí digitálního posuvného měřítka propojeného s počítačem bylo změřeno narostlé mycelium u každé misky. Naměřené hodnoty se po stisknutí tlačítka na měřítku propaly do programu Microsoft (MS) excel v milimetrech. Miska se položila na černou podložku (pro lepší viditelnost) a mycelium se měřilo ze spodu misky ze dvou na sebe kolmých stran. U jednoho typu izolátu pro jeden typ použité esence a její koncentrace (např. A1 pro 17_45_1b) bylo naměřeno 6 hodnot (3 opakování, 2 průměry) viz obr. č.1.



Obrázek 1 Příklad založení (vlevo) a hodnocení (vpravo) biologického in vitro testu na Petriho miskách (Weigrich, 2021)

Druhým krokem bylo použití získaných dat pro výpočet inhibice růstu *P. cactorum* oproti kontrole pomocí vzorce v %:

$$IR_1 = 100 - \left(\frac{d_1 * 100}{dk_1} \right)$$

$$IR_2 = 100 - \left(\frac{d_2 * 100}{dk_2} \right)$$

IR_1, IR_2 = inhibice růstu levá a pravá strana

d_1, d_2 = šířka mycelia otrávené plotny levá a pravá strana

dk_1, dk_2 = šířka mycelia kontrolní varianty levá a pravá strana

Výsledky měření s výpočtem procentuální inhibice růstu inokulovaných misek byly zaznamenány do tabulky. Dále byly vypočtené procentuální hodnoty podrobeny grafické analýze rozdílu inhibice růstu mycelia mezi esencemi, rozdílu inhibice růstu mycelia podle koncentrace a rozdílu inhibice růstu mezi jednotlivými izoláty. Hodnoty pro analýzu byly zprůměrovány vždy podle zkoumaného parametru. Například pro směs esencí A o koncentraci 1 byla z výsledků třech opakování vypočtena průměrná hodnota inhibice pro všechny izoláty.

Procentické hodnoty byly dále transformovány pomocí funkce ArcSin do tabulky MS excel tak, aby je bylo možné podrobit robustnímu statistickému hodnocení pomocí analýzy rozptylu doplněné Tukeyho testem. Získaná data jsou umístěna jako příloha na CD na poslední straně této diplomové práce.

4.2 Vliv aplikace esenciálních olejů na *P. cactorum* v in vivo podmínkách nádobového testu

Tento experiment probíhal v řízených podmínkách skleníku v roce 2020 pod záštitou katedry ochrany rostlin České zemědělské univerzity v Praze a pod vedením pana doc. Ing. Miloslava Zouhara, Ph.D. Hostitelskou rostlinou pro *P. cactorum* byly zvoleny tři odrůdy jahodníku: Wendy, Karmen a Sonáta, ve formě frigo sadby. Pro výsadbu rostlin byl zvolen substrát PProfi mix 3 pro výsadby od firmy Agro cs, který byl sterilizován teplotou 120 °C po dobu 20 minut. Testovány byly tři přípravky založené na esenciálních olejích: 1. přípravek měl účinnou látku tvořenou třemi esenciálními oleji z hřebíčku (HK), skořice (CINO) a tymiánu (TV) (A, 1), 2. přípravek byl založen na směsi dvou esenciálních olejů z geránie (PG) a tymiánu (TV) (B, 2) a 3. přípravek na směsi tří esenciálních olejů ze skořice (CINO), citronely (CW) a kafru (KAF) (C, 3). Pro porovnání účinku esenciálních olejů na *P. cactorum* a jejich vliv na zdravotní stav rostlin byly založeny tyto varianty: rostliny napadené *P. cactorum* + esenciální oleje, zdravé rostliny + esenciální oleje, rostliny napadené *P. cactorum* bez esenciálních olejů, zdravé rostliny bez esenciálních olejů a rostliny napadené *P. cactorum* a ošetřené jediným registrovaným přípravkem Alliete. Každá varianta byla založena v 5 opakování viz Tabulka 2. Celkem bylo hodnoceno 135 pěstebních nádob viz Tabulka 3.

Přípravky byly formulovány do biopolymeru a navázány na perlit, koncentrace esenciálního oleje byla 1 % ve formulaci (0,027 l formulace/0,1875 l experlitu). Formulace esenciálního oleje viz patent číslo dokumentu 308145 dostupné na <https://isdv.upv.cz/webapp/!resdb.pta.frm>. Týden odložený substrát byl nahrnkován do květináčů K8 (hrana 8 cm) a příslušně označen viz Tabulka 3. Nejprve byl smíchán substrát s perlitem (napuštěným formulovaným esenciálním olejem) a byly připraveny pěstební nádoby o objemu 500 ml. Druhý den byly inokulovány myceliem *P. cactorum* kultivovaném v tekutém médiu stejně jako v případě BCAs testu. Množství *P. cactorum* bylo přibližně 0,272 g sušiny mycelia na květináč. Květináče byly umístěny na obdélníkových podmiskách (aby se květináče nepomíchaly) na posuvných pěstebních stolech ve skleníku. Po jednom týdnu byly zasazeny rostliny. Rostliny byly pěstovány v řízených podmínkách skleníku po dobu 6 týdnů. Skleník byl vybaven automatickou regulací vlhkosti vzduchu, teploty vzduchu a regulací přistínění. Pro udržení teploty, aby nedošlo k přehřátí rostlin, musela být instalována doplňková klimatizace. Během této inkubace byla prováděna pravidelná zálivka i hnojení.

Tabulka 2 Založení nádobového pokusu pro testování účinnosti esenciálních olejů na kvantitativní znaky životaschopnosti jahodníku oproti kontrole v pěti opakováních (Weigrich, 2021)

	Nádoby s PC			Kontrola bez PC		
	Wendy+PC	Sonáta+PC	Karmen+PC	Wendy (W)	Sonáta (S)	Karmen (C)
A1 (HK+CINO+TV)	5	5	5	5	5	5
B2 (PG+TV)	5	5	5	5	5	5
C3 (CINO+CW)	5	5	5	5	5	5
Kontrola (K)	5	5	5	5	5	5
Kontrola Ch- Aliette	5	5	5			

Poznámka 1 *PC = *Phytophthora cactorum*

Tabulka 3 Přehled použitých variant pro porovnání účinku esenciálních olejů na *P. cactorum* a jejich vliv na zdravotní stav rostlin (Weigrich, 2021)

Esence	Označení
Hř+SK+TV+Phytophthora+Wendy	1F W
Hř+SK+TV+Phytophthora+Karmen	1F C
Hř+SK+TV+Phytophthora+Sonáta	1F S
TV+PG+Phytophthora+Wendy	2F W
TV+PG+Phytophthora+Karmen	2F C
TV+PG+Phytophthora+Sonáta	2F S
SK+KAF+CW+Phytophthora+Wendy	3F W
SK+KAF+CW+Phytophthora+Karmen	3F C
SK+KAF+CW+Phytophthora+Sonáta	3F S
Kontrola+Phytophthora+Wendy	KF W
Kontrola+Phytophthora+Karmen	KF C
Kontrola+Phytophthora+Sonáta	KF S
Alliete+Phytophthora+Wendy	KCh W
Alliete+Phytophthora+Karmen	KCh C
Alliete+Phytophthora+Sonáta	KCh S
Hř+SK+TV+Wendy	1K W
Hř+SK+TV+Karmen	1K C
Hř+SK+TV+Sonáta	1K S
TV+PG+Wendy	2K W
TV+PG+Karmen	2K C
TV+PG+Sonáta	2K S
SK+KAF+CW+Wendy	3K W
SK+KAF+CW+Karmen	3K C
SK+KAF+CW+Sonáta	3K S
Kontrola+Wendy	K W
Kontrola+Karmen	K C
Kontrola+Sonáta	K S

4.2.1 Vyhodnocení výsledků

Po 6 týdnech došlo k vyhodnocení pokusu. Květináče se sazenicemi byly před expedicí k promývání postupně fotograficky dokumentovány. Rostliny se fotily samostatně, jelikož byly opatřeny číslem viz příloha 22-24. Po fotodokumentaci byly přesunuty rostliny k promývání kořenů, aby se odstranil substrát z kořenové soustavy. Promývání proběhlo pod tekoucí vodou v umyvadle. Každá rostlina se po promytí balila zvlášť do popsaného igelitového pytlíku. Na

igelitovém obalu byla napsána varianta ošetření a číslo rostliny, aby se všechny fotografie rostlin mohli po jednotlivých operacích podle čísla propojit. Dále byla pořízena fotodokumentace celkového habitu rostlin a průřezu kořenového krčku s popisem varianty ošetření i čísla rostliny. V následném sledu byly stanoveny kvantitativní znaky: hmotnost a počet listů, hmotnost a počet plodů, hmotnost a počet květů, průměr a hmotnost kořenového krčku a délka a hmotnost kořenů. Získaná data byla následně zpracována v programu statistika formou parametrického testování pomocí Anovy. Grafický výstup byl zpracován v Microsoft excel. Získaná data z kvantitativního sběru dat ve formě tabulek jsou umístěna jako příloha na CD disku, který je vložený na poslední straně diplomové práce.

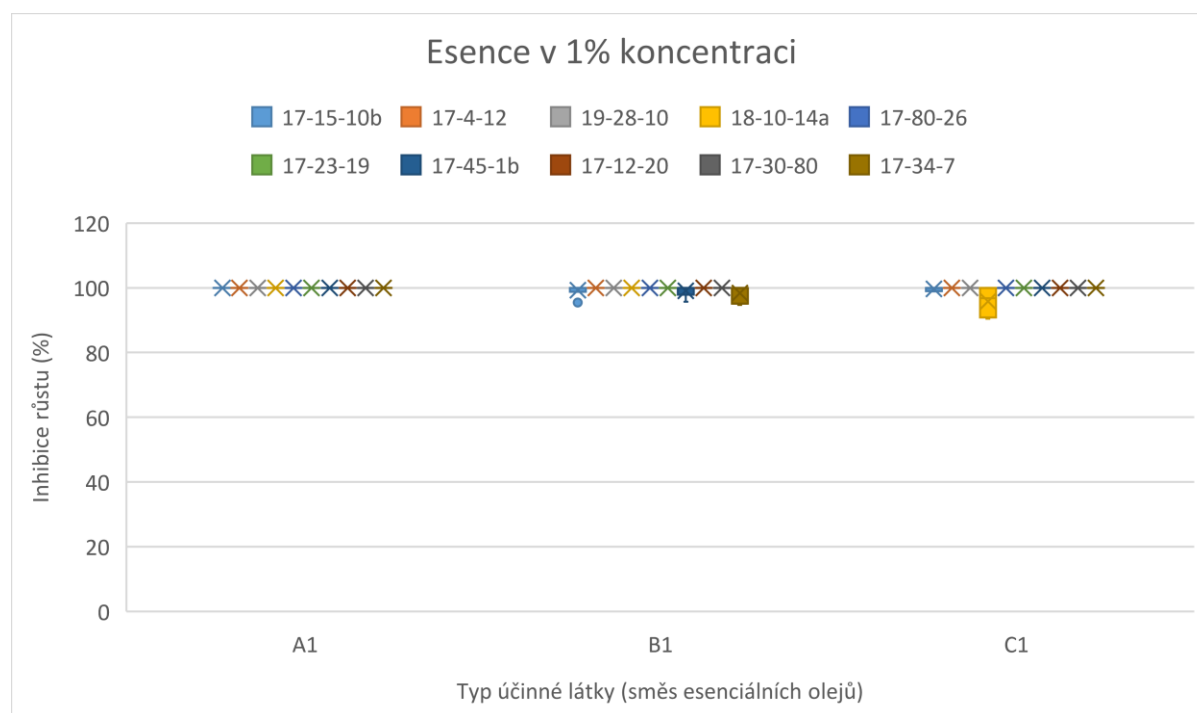
5 Výsledky

5.1 In vitro testy

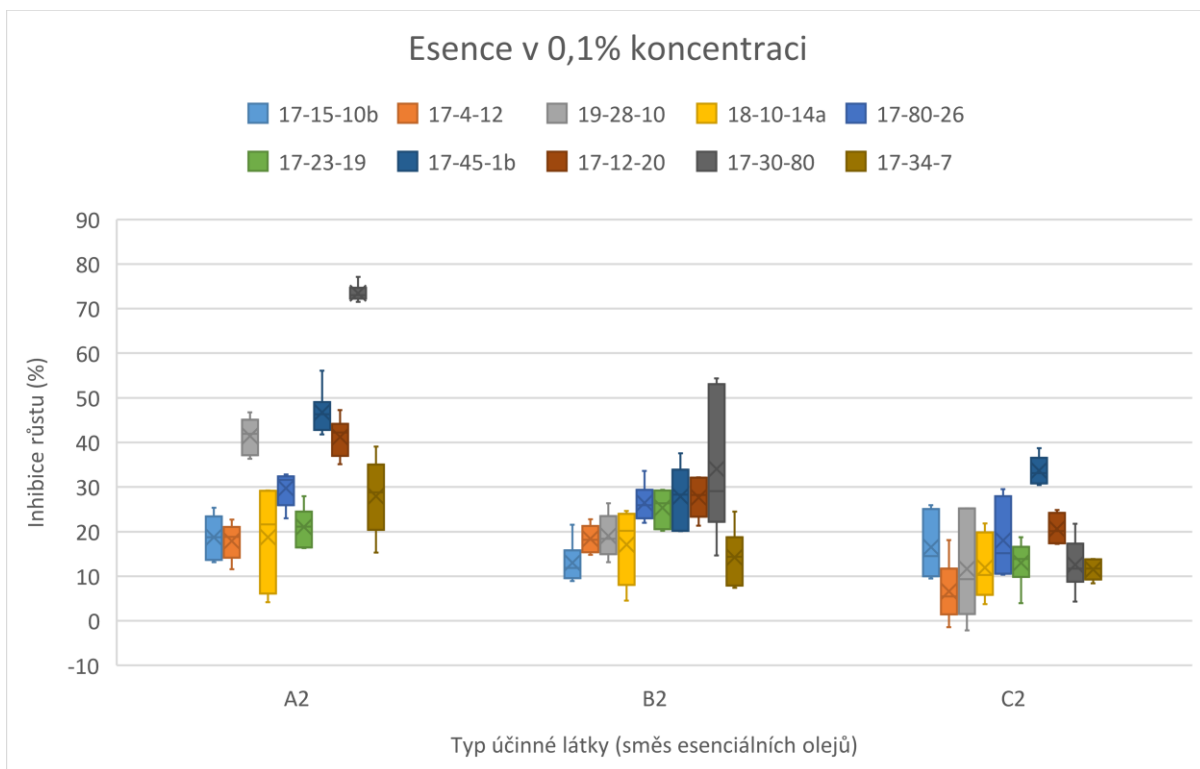
Jak bylo popsáno výše, testovaly se 3 účinné látky založené na směsi různých esencí o pěti různých koncentracích plus kontrola, ve třech opakováních viz Tabulka 1. Tento experiment proběhl na 10 izolátech *Phytophthora cactorum*. Ve výsledcích jsou uvedena zpracovaná data v tabulkovém či grafickém rozhraní podle výše uvedené metodiky. Zdrojová data potřebná pro vyhodnocení viz příloha CD (na konci diplomové práce).

Příprava otrávených ploten se obešla bez kontaminace a bylo připraveno celkem 450 misek včetně 30 misek kontrol (bez esence) pro založení testu vlivu esenciálních olejů na *P. cactorum* in vitro. Podařilo se namnožit dostatečné množství jednotlivých izolátů *P. cactorum* bez kontaminace. Podařilo se inokulovat všechny otrávené misky jednotlivými izoláty včetně kontrolních variant. Po týdenní inkubaci nedošlo k žádné kontaminaci inokulovaných misek a proběhlo měření mycelia digitálním posuvným měřítkem.

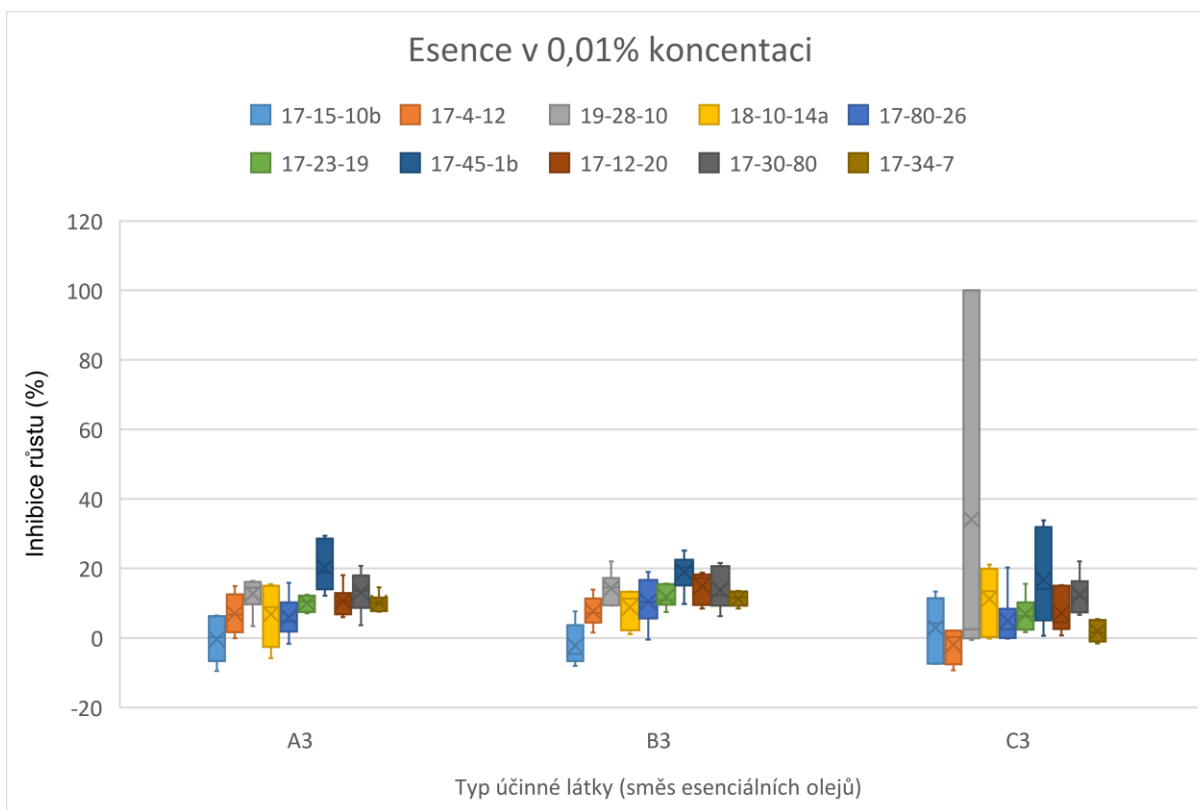
Z výsledků jednoznačně vyplývá, že při použití 1% koncentrace esence bylo dosaženo 100% inhibice růstu u všech tří směsí, u všech deseti izolátů *P. cactorum* viz graf 1, 6, 11, 13. Z grafů 2-5 vyplynulo, že u všech typů esencí od 0,1 až po 0,0001% koncentrace byla inhibice růstu mycelia nedostačující nebo minimální pro všechny izoláty *P. cactorum*. V inhibici růstu mycelia mezi 0,01 až 0,0001% koncentrací esencí nebyl významný rozdíl, jelikož nastala pouze v rozmezí 0–20 %. Dále z grafů 1–5 rovněž vyplynulo, že se projevil rozdíl v účinnosti jednotlivých směsí na různé izoláty.



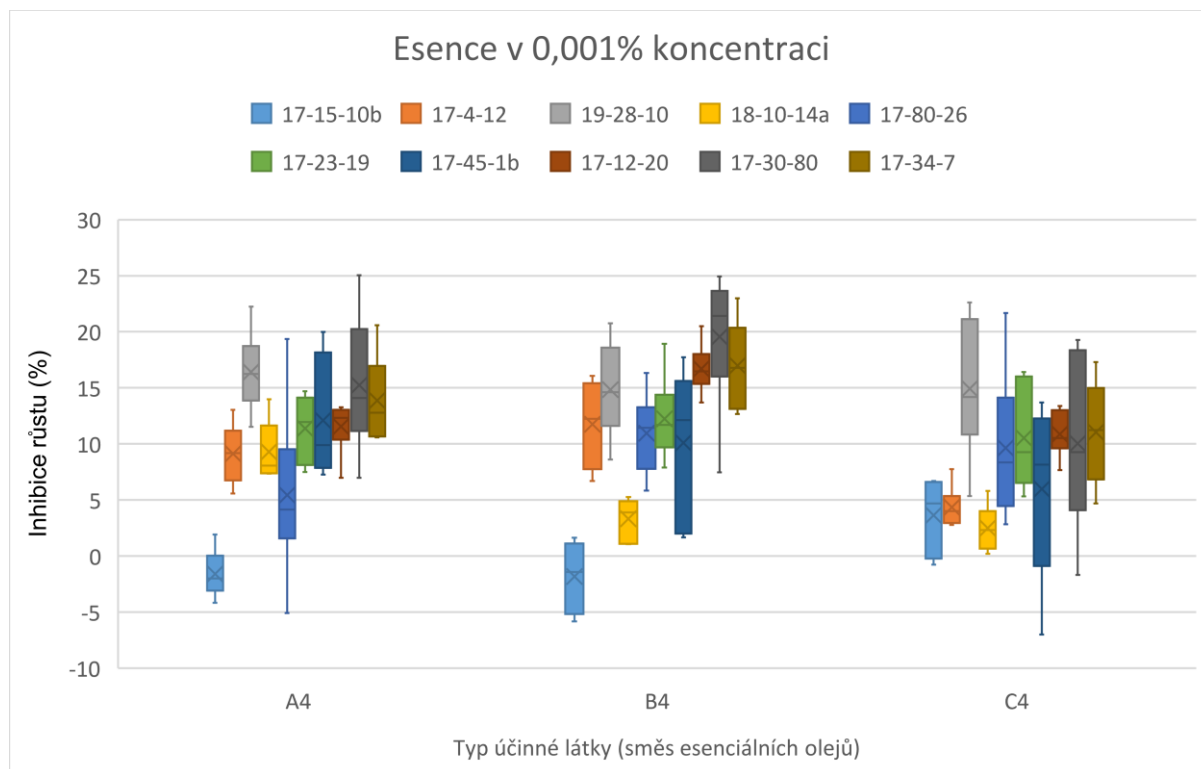
Graf 1 – Inhibice růstu mycelia pro všechny 3 typy směsí esencí v 1% koncentraci pro všech 10 izolátů (Weigrich, 2021).



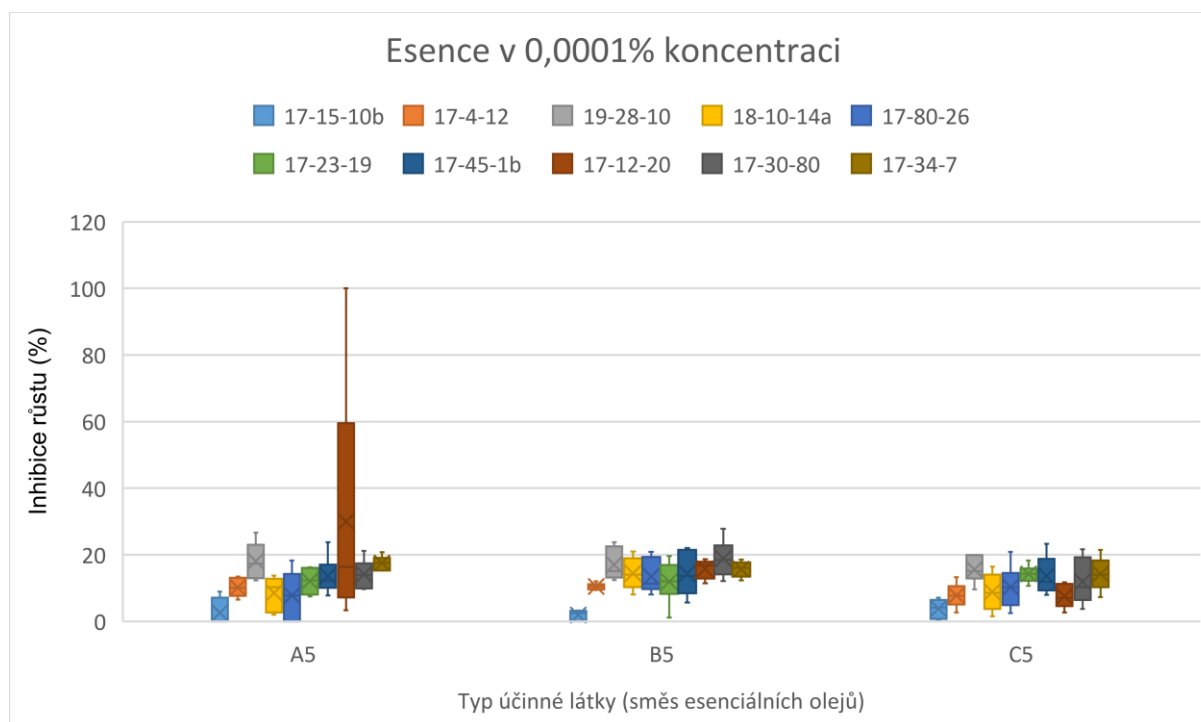
Graf 2 – Inhibice růstu mycelia pro všechny 3 typy směsí esencí v 0,1% koncentraci pro všech 10 izolátů (Weigricht, 2021).



Graf 3 – Inhibice růstu mycelia pro všechny 3 typy směsí esencí v 0,01% koncentraci pro všech 10 izolátů (Weigricht, 2021).

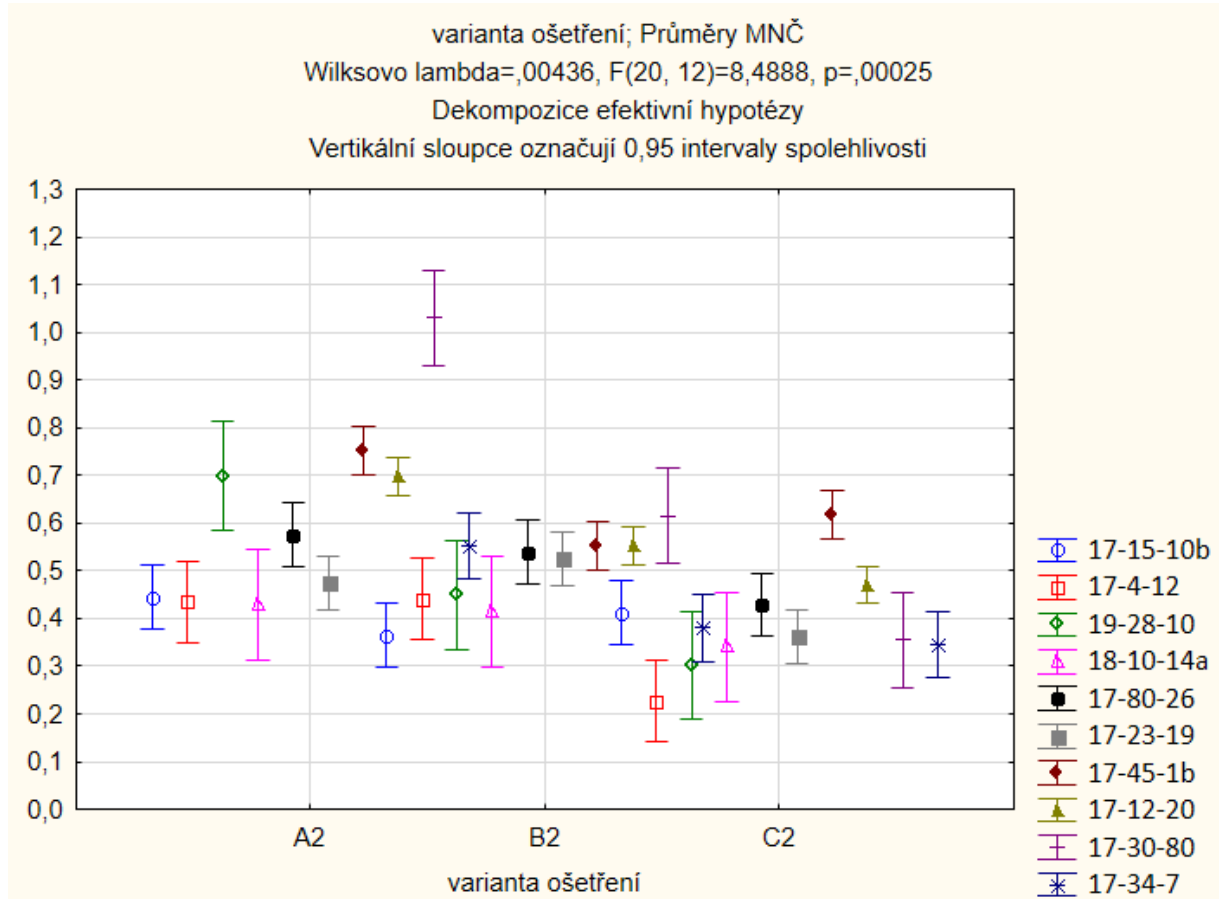


Graf 4 – Inhibice růstu mycelia pro všechny 3 typy směsí esenci v 0,001% koncentraci pro všech 10 izolátů (Weigricht, 2021).



Graf 5 - Inhibice růstu mycelia pro všechny 3 typy směsí esenci v 0,0001% koncentraci pro všech 10 izolátů (Weigricht, 2021).

Nad daty byla provedena statistická analýza formou jednofaktorové anovy viz graf 8. Následně pro nalezení statisticky významných rozdílů byla použita Tuckeyova metoda (T – metoda) viz. Tabulka 4–13. V případě 0,1% koncentrace (A2, B2, C2) byla účinnost na inhibici růstu výrazně nižší oproti 1% koncentraci, pohybovala se v rozmezí 15,6–33,7 %. V případě dvou izolátů nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi směsmi, ale v případě dalších 8 izolátů byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ve prospěch vyšší účinnosti směsné A a B.



Graf 6 Znárodnění inhibice růstu mycelia pro varinty A2, B2 a C2, pro všech 10 izolátů jednotlivě (Zouhar, 2021)

Tabulka 4 Tukeyův HSD test pro vybraný izolát pro A, B a C typ esence v 0,1% koncentraci (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná 17-4-12 (esence na miskách.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00959, sv = 15,000			
	varianta ošetření	{1} ,43463	{2} ,44161	{3} ,22682
1	A2		0,991724	0,006117
2	B2	0,991724		0,004799
3	C2	0,006117	0,004799	

Tabulka 5 Tukeyův HSD test pro vybraný izolát pro A,B a C typ esence v 0,1% koncentraci (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná 17-15-10b (esence na miskách.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00611, sv = 15,000			
	varianta ošetření	{1} ,44470	{2} ,36482	{3} ,41198
1	A2		0,213223	0,752895
2	B2	0,213223		0,561293
3	C2	0,752895	0,561293	

Tabulka 6 Tukeyův HSD test pro vybraný izolát pro A,B a C typ esence v 0,1% koncentraci (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná 19-28-10 (esence na miskách.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,01710, sv = 15,000			
	varianta ošetření	{1} ,69943	{2} ,44908	{3} ,30221
1	A2		0,012423	0,000411
2	B2	0,012423		0,160647
3	C2	0,000411	0,160647	

Tabulka 7 Tukeyův HSD test pro vybraný izolát pro A,B a C typ esence v 0,1% koncentraci (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná 18-10-14a (esence na miskách.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,01754, sv = 15,000			
	varianta ošetření	{1} ,42952	{2} ,41381	{3} ,34058
1	A2		0,977097	0,492197
2	B2	0,977097		0,613790
3	C2	0,492197	0,613790	

Tabulka 8 Tukeyův HSD test pro vybraný izolát pro A,B a C typ esence v 0,1% koncentraci (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná 17-80-26 (esence na miskách.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00577, sv = 15,000			
	varianta ošetření	{1} ,57563	{2} ,53924	{3} ,42973
1	A2		0,691095	0,012178
2	B2	0,691095		0,060589
3	C2	0,012178	0,060589	

Tabulka 9 Tukeyův HSD test pro vybraný izolát pro A,B a C typ esence v 0,1% koncentraci (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná 17-23-19 (esence na miskách.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00420, sv = 15,000			
	varianta ošetření	{1} ,47506	{2} ,52662	{3} ,36193
1	A2		0,376613	0,022029
2	B2	0,376613		0,001532
3	C2	0,022029	0,001532	

Tabulka 10 Tukeyův HSD test pro vybraný izolát pro A,B a C typ esence v 0,1% koncentraci (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná 17-45-1b (esence na miskách.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00338, sv = 15,000			
	varianta ošetření	{1} ,75251	{2} ,55326	{3} ,61898
1	A2		0,000236	0,003383
2	B2	0,000236		0,157256
3	C2	0,003383	0,157256	

Tabulka 11 Tukeyův HSD test pro vybraný izolát pro A,B a C typ esence v 0,1% koncentraci (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná 17-12-20 (esence na miskách.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00201, sv = 15,000			
	varianta ošetření	{1} ,69718	{2} ,55297	{3} ,47044
1	A2		0,000299	0,000178
2	B2	0,000299		0,015861
3	C2	0,000178	0,015861	

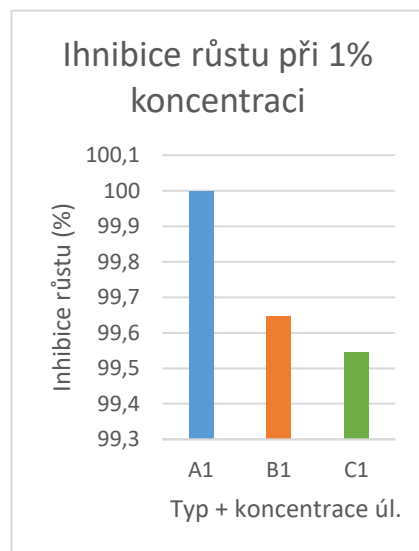
Tabulka 12 Tukeyův HSD test pro vybraný izolát pro A,B a C typ esence v 0,1% koncentraci (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná 17-30-80 (esence na miskách.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,01291, sv = 15,000			
	varianta ošetření	{1} 1,0301	{2} ,61526	{3} ,35448
1	A2		0,000203	0,000178
2	B2	0,000203		0,003404
3	C2	0,000178	0,003404	

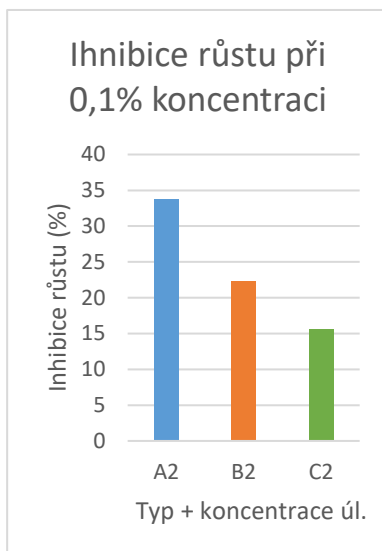
Tabulka 13 Tukeyův HSD test pro vybraný izolát pro A,B a C typ esence v 0,1% koncentraci (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná 17-34-7 (esence na miskách.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,00641, sv = 15,000			
	varianta ošetření	{1} ,55308	{2} ,37993	{3} ,34470
1	A2		0,005335	0,001266
2	B2	0,005335		0,731379
3	C2	0,001266	0,731379	

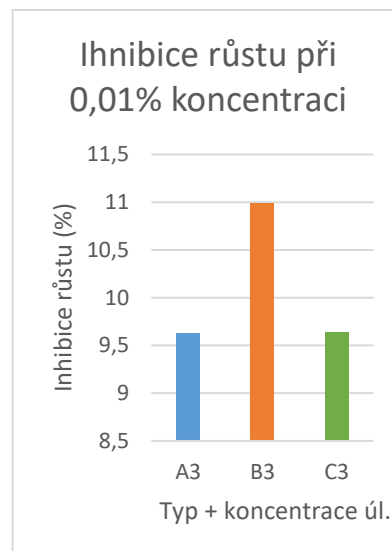
Z této analýzy vyplynulo při porovnání grafu 7 a 8, že nejlepší účinnost byla u směsi esencí (úl.) s označením A oproti B a C. Z grafů 9–11 naopak se ukázala zanedbatelná účinnost směsi esencí na inhibici růstu mycelia pro všech 10 typů izolátů. Celkově tato analýza vyznačila rozdíly mezi koncentracemi úl. napříč izoláty a typy úl. v inhibici růstu mycelia.



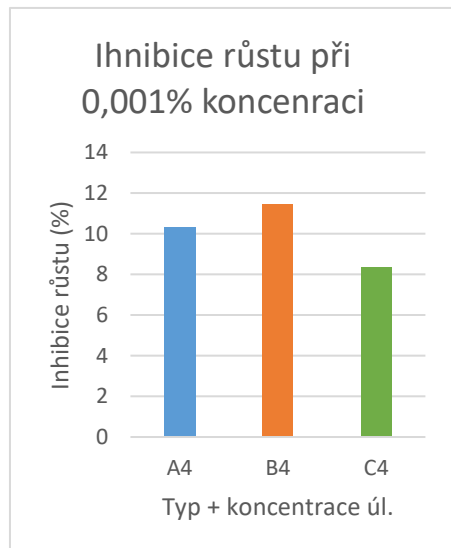
Graf 7 – Průměrná inhibice růstu mycelia pro všech 10 izolátů při 1% koncentraci úl. (Weigricht, 2021).



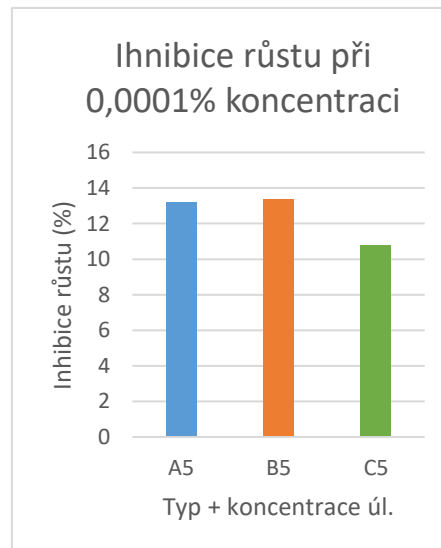
Graf 8 – Průměrná inhibice růstu mycelia pro všech 10 izolátů při 0,1% koncentraci úl. (Weigricht, 2021).



Graf 9 – Průměrná inhibice růstu mycelia pro všech 10 izolátů při 0,01% koncentraci úl. (Weigricht, 2021).

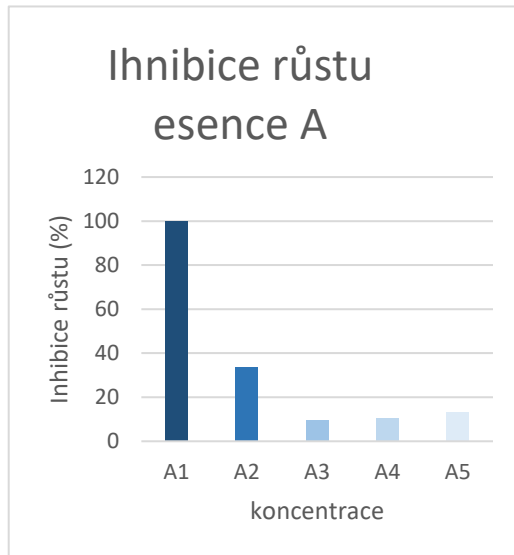


Graf 10 – Průměrná inhibice růstu mycelia pro všech 10 izolátů při 0,001% koncentraci úl. (Weigricht, 2021).

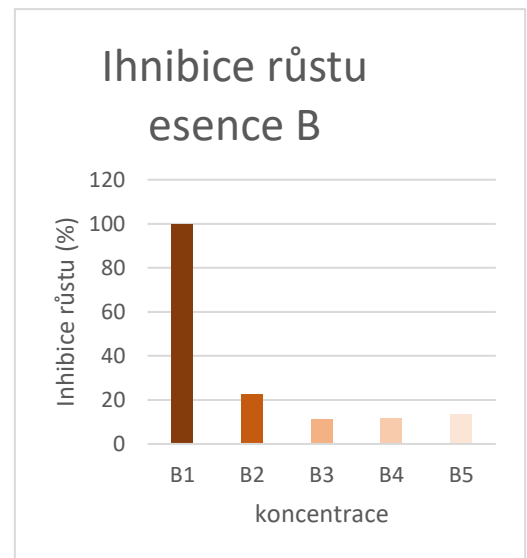


Graf 11 – Průměrná inhibice růstu mycelia pro všech 10 izolátů při 0,0001% koncentraci úl. (Weigricht, 2021).

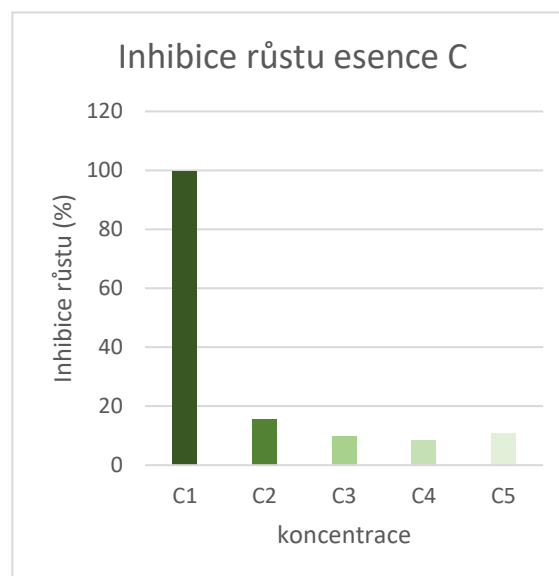
V této grafické (graf 12–14) analýze byla dokázána 100% inhibice růstu mycelia *P. cactorum* při 1% koncentraci pro všechny typy směsí esencí (úl.). Dále byla dokázána průměrně nejúčinnější inhibice růstu mycelia úl. A při 0,1% koncentraci napříč izoláty. Nakonec byla potvrzena stejně zanedbatelná inhibice růstu mycelia mezi 0,01–0,0001% koncentrací esencí A, B a C, průměrně napříč izoláty.



Graf 12 – Inhibice růstu esence A pro všech 5 koncentrací průměrně pro všech 10 izolátů (Weigrich, 2021)



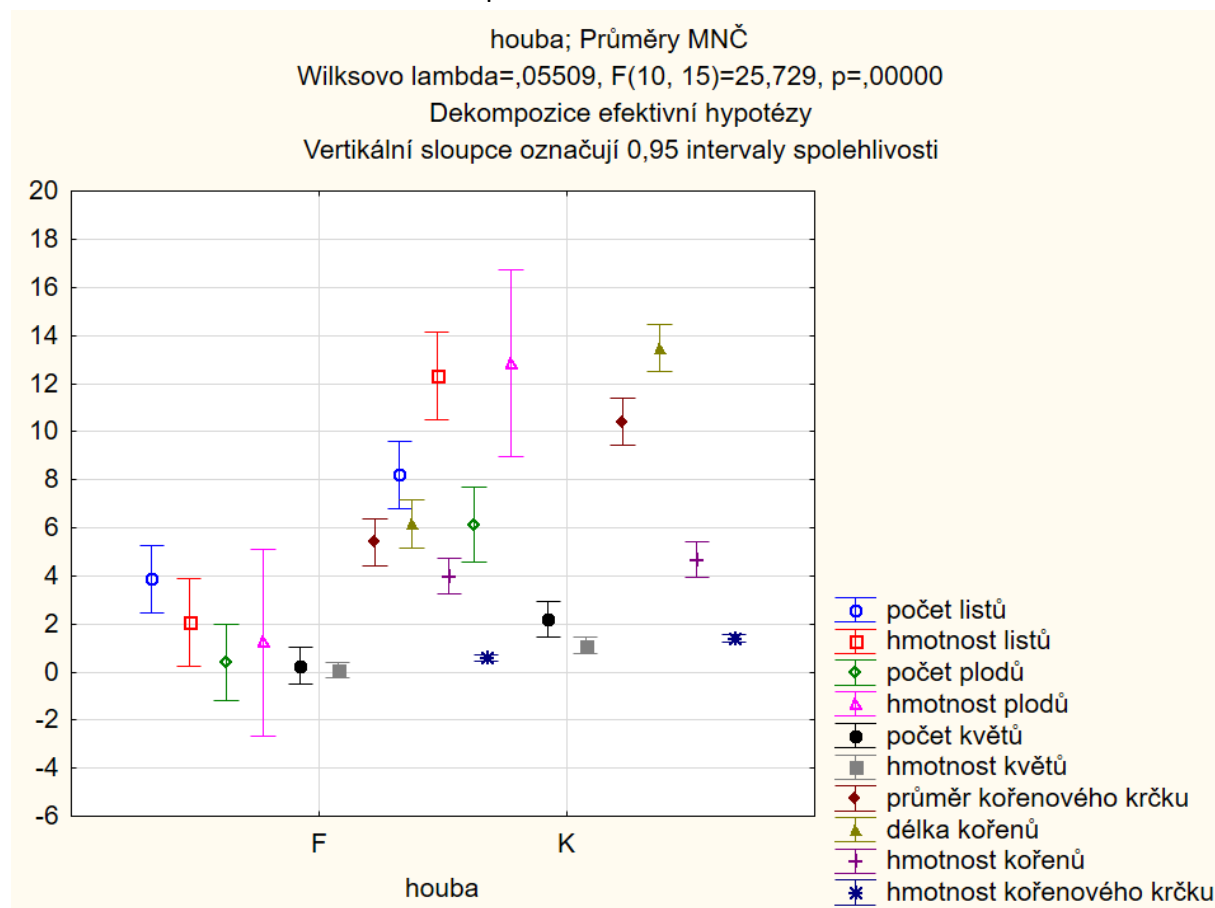
Graf 13 – Inhibice růstu esence B pro všech 5 koncentrací průměrně pro všech 10 izolátů (Weigrich, 2021)



Graf 14 – Inhibice růstu esence C pro všech 5 koncentrací průměrně pro všech 10 izolátů (Weigrich, 2021)

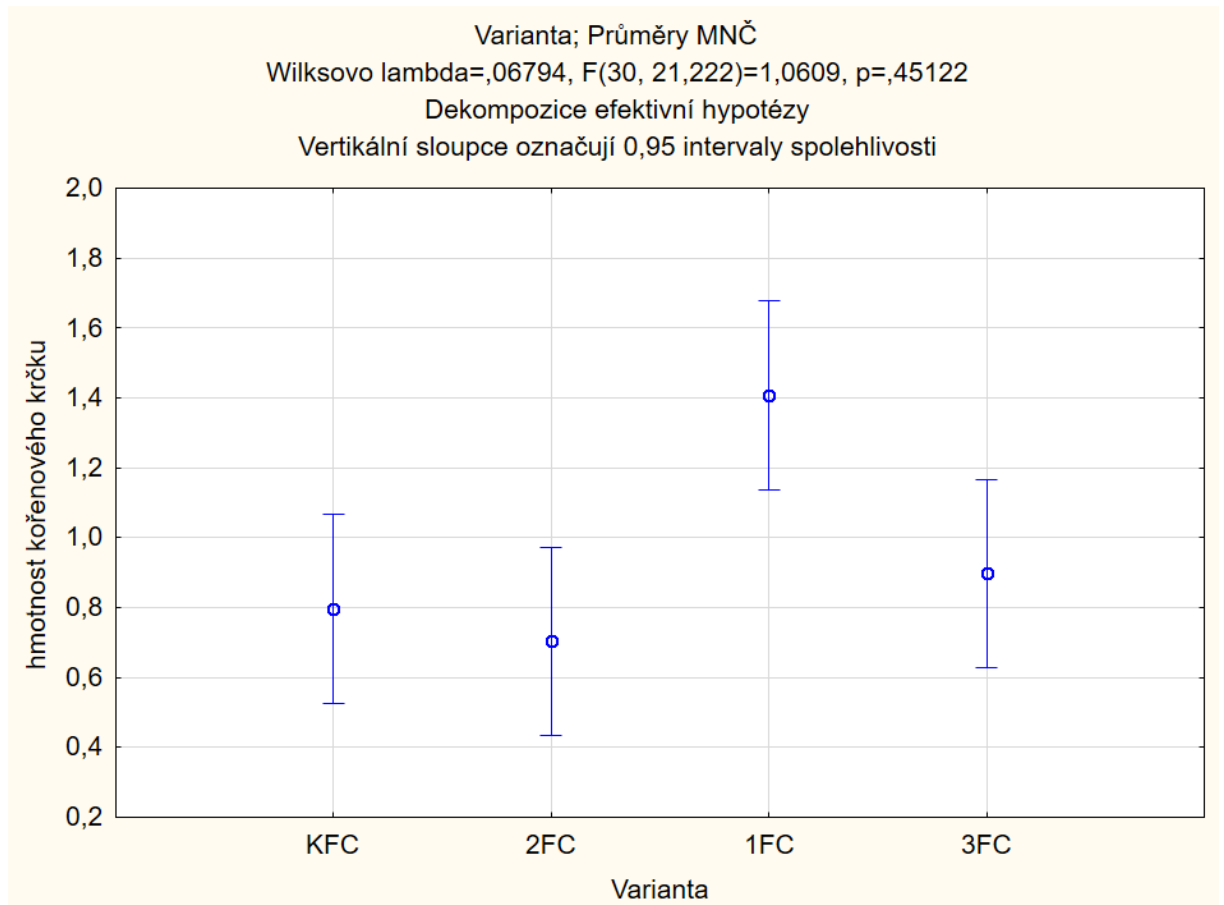
5.1.1 In vivo testy

Zdrojová data potřebná pro vyhodnocení viz příloha CD disk (na konci diplomové práce). Z dosažených výsledků vyplývá, že jednoznačně došlo k napadení rostlin *P. cactorum* v kontrolních variantách, protože ve většině parametrů jsou statisticky významné rozdíly mezi zdravou a inokulovanou rostlinou napříč odrůdami kromě hmotnosti kořenů.



Graf 15 Porovnání zdravých (kontroly) a inokulovaných variant rostlin bez ošetření přípravky

Dále byly sledovány jednotlivé odrůdy a jejich parametry v porovnání s neošetřenou inokulovanou kontrolou, v tomto případě byl zaznamenán statisticky významný rozdíl odrůdy Karmen v parametru hmotnost kořenového krčku, kde směs esenciálních olejů číslo jedna vykazuje nejvyšší účinnost. Další parametry nebyly ovlivněny.

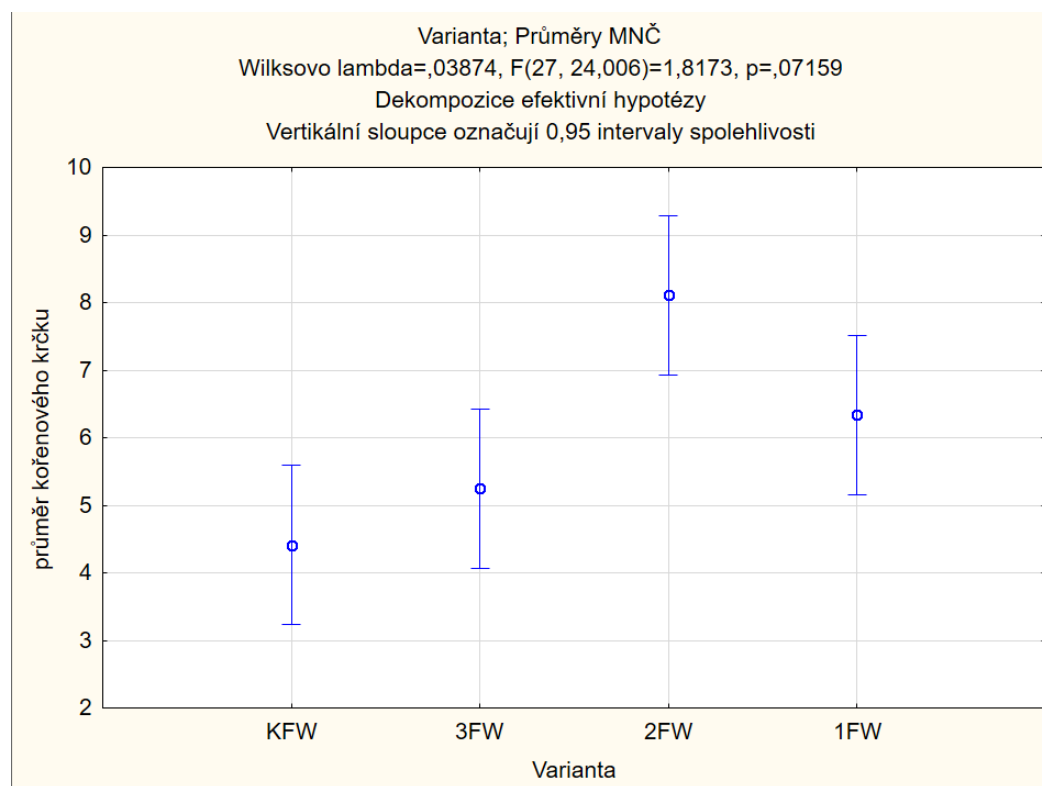


Graf 16 Výstup pro parametrické testování Anova

Tabulka 14 Tukeyův HSD test – hmotnost kořenového krčku u variant KFC, 2FC, 1FC, 3FC (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná hmotnost kořenového krčku (esence skleník.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,08101, sv = 16,000				
	Varianta	{1} ,79600	{2} ,70400	{3} 1,4080	{4} ,89800
1	KFC		0,955318	0,017394	0,940626
2	2FC	0,955318		0,006255	0,707619
3	1FC	0,017394	0,006255		0,052827
4	3FC	0,940626	0,707619	0,052827	

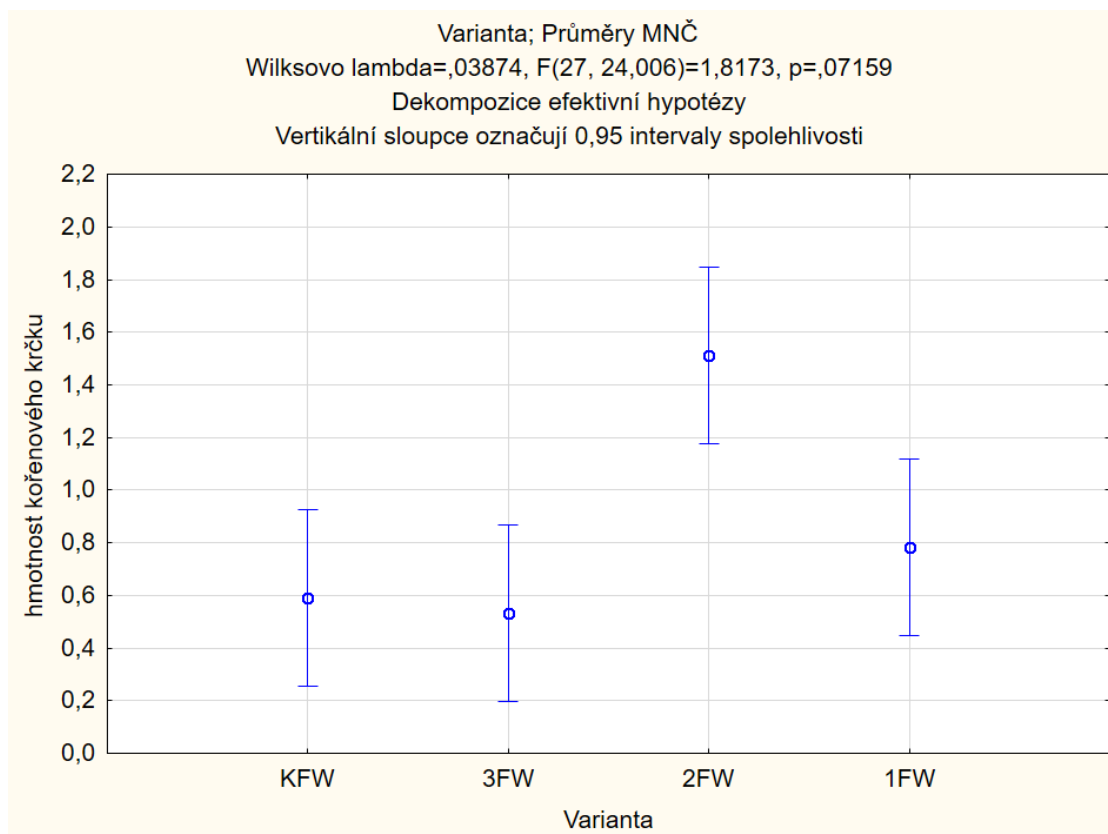
U odrůdy Sonáta nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly. V případě odrůdy Wendy byly sledovány statisticky významné rozdíly v parametrech průměr a hmotnost kořenového krčku ve prospěch ošetření směsí číslo 2.



Graf 17 Výstup pro parametrické testování Anova

Tabulka 15 Tukeyův HSD test – průměr kořenového krčku pro varianty KFW, 3FW, 2FW, 1FW (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná průměr kořenového krčku (esence skleník.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 1,5435, sv = 16,000				
	Varianta	{1} 4,4160	{2} 5,2480	{3} 8,1120	{4} 6,3380
1	KFW		0,718456	0,001363	0,108121
2	3FW	0,718456		0,010651	0,524733
3	2FW	0,001363	0,010651		0,150168
4	1FW	0,108121	0,524733	0,150168	

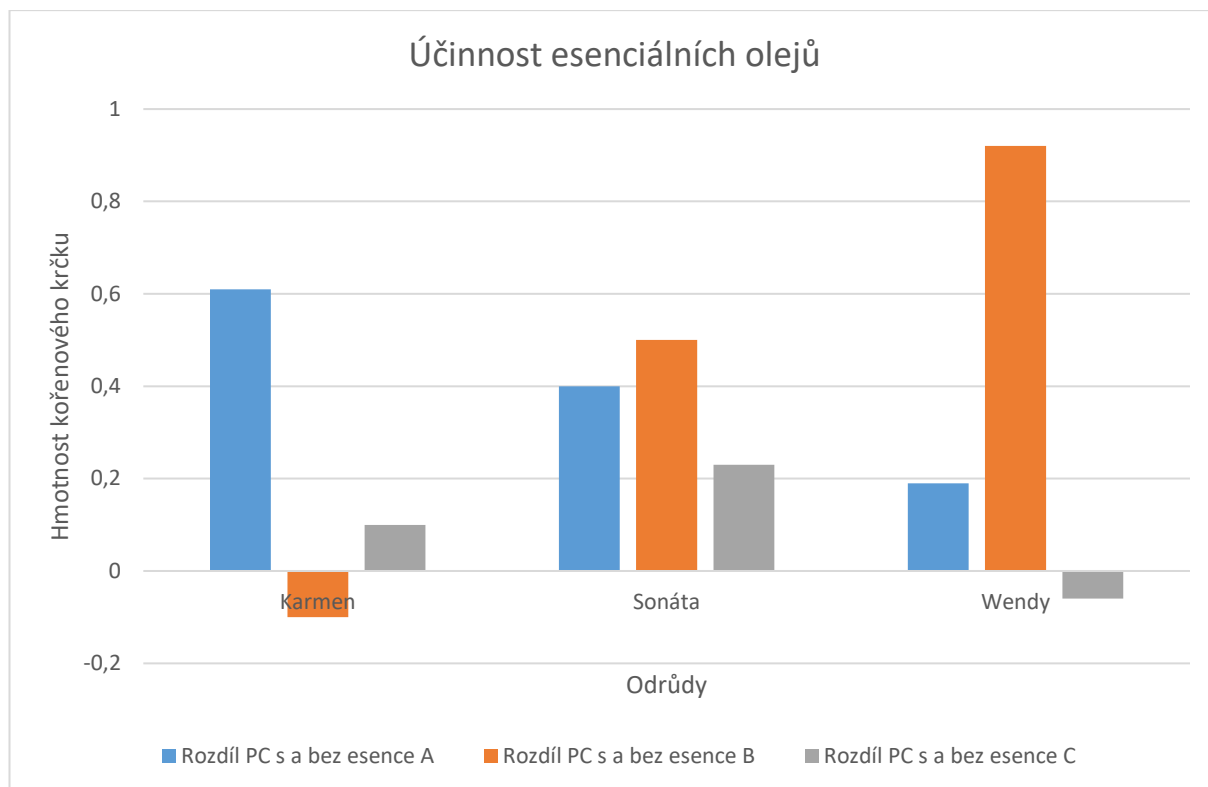


Graf 18 Výstup pro parametrické testování Anova

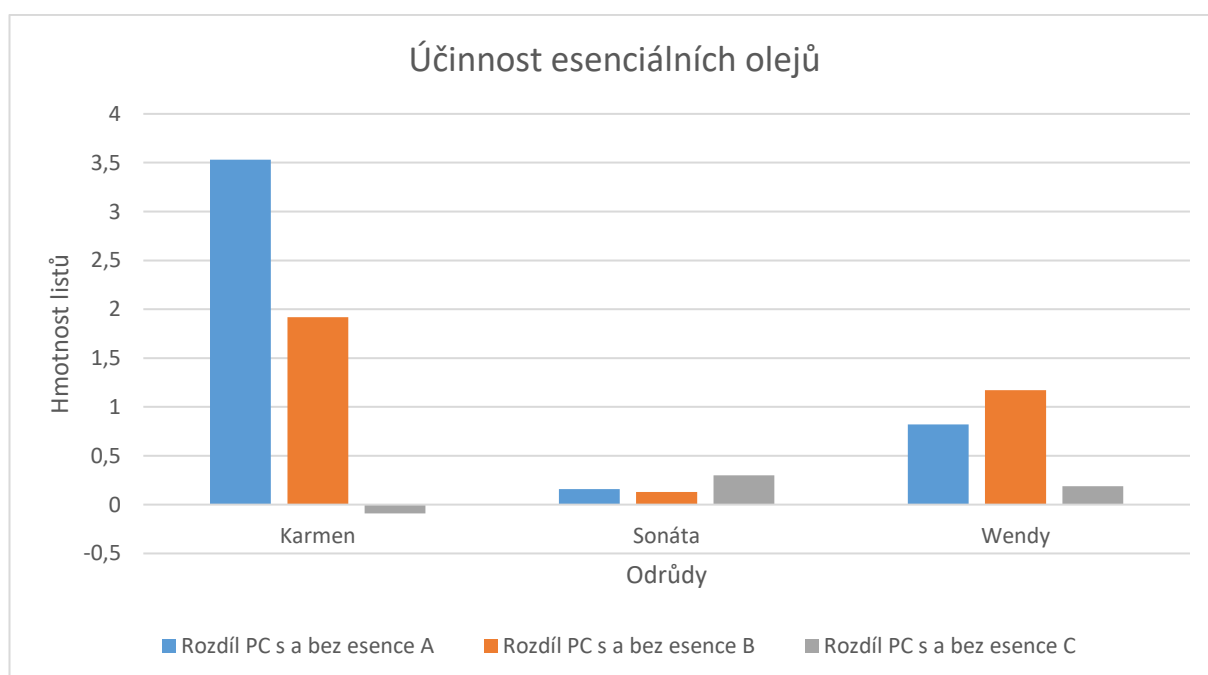
Tabulka 16 Tukeyův HSD test – hmotnost kořenového krčku pro varianty KFW, 1FW, 2FW, 3FW (Zouhar, 2021)

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná hmotnost kořenového krčku (esence skleník.sta) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,12508, sv = 16,000				
	Varianta	{1} ,59200	{2} ,53200	{3} 1,5120	{4} ,78200
1	KFW		0,993042	0,004183	0,830257
2	3FW	0,993042		0,002481	0,684371
3	2FW	0,004183	0,002481		0,022817
4	1FW	0,830257	0,684371	0,022817	

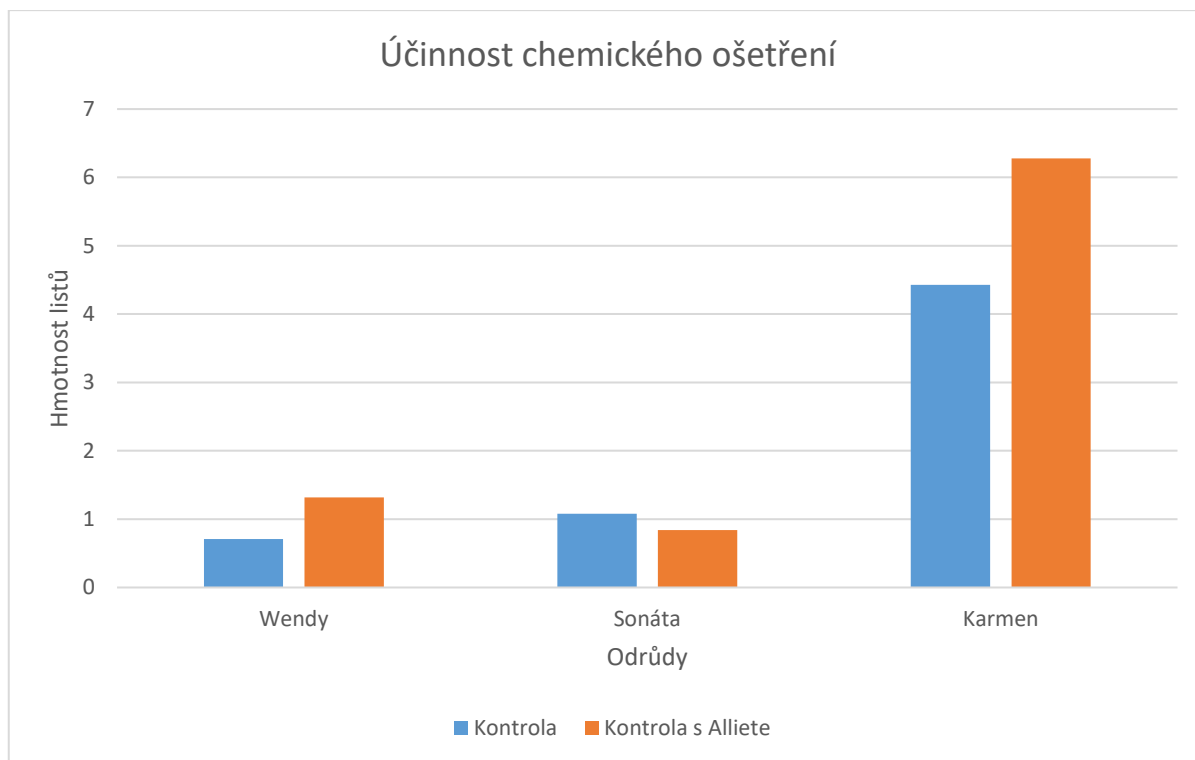
Stejně tak jako v in vitro testech i v in vivo testech se projevila vyšší účinnost směsí číslo 1 (A) a 2 (B), je také možné sledovat určitý trend v rozdílech mezi odrůdami, ale tento trend nejeví statisticky významné rozdíly. Studován byl také efekt fytotoxicity, kdy neinokulované rostliny byly ošetřeny esenciálními oleji. V tomto případě nebyly až na jednu výjimku pozorovány statisticky významné rozdíly ve všech deseti sledovaných parametrech.



Graf 19 Rozdíl hmotnosti kořenového krčku mezi kontrolou + *P. cactorum* (PC) a variantou esence + *P. cactorum* pro jednotlivé typy směsí esencí



Graf 20 Rozdíl hmotnosti listů mezi kontrolou + *P. cactorum* (PC) a variantou esence + *P. cactorum* pro jednotlivé typy směsí esencí



Graf 5 Rozdíl mezi hmotností listů mezi kontrolou + *P. cactorum* (PC) a variantou kontrola + Alliete + *P. cactorum*

6 Diskuze

Vzhledem k ubývajícím možnostem ošetřovat plochy s jahodníkem proti *Phytophthora cactorum* syntetickými, chemickými a toxickými přípravky (fungicidy) je třeba hledat nové směry ochranných opatření vůči tomuto patogenu. Mnoho účinných látek jako například Methyl bromid, velmi účinný fumigant, jsou již zakázány používat z hlediska rizika pro životní prostředí. Jiný problém představují účinné látky, u kterých byl prokázán vznik rezistence např. Metalaxyl. K tomu v České republice je registrováno 5 přípravků spadajících do kategorie chemické ochrany rostlin a 1 přípravek spadající do kategorie biologické ochrany rostlin. *Phytophthora cactorum* způsobuje na jahodníku fytoftorovou hnilobu kořenového krčku jahodníku nebo kožovitou hnilobu jahod. Jednou z velmi účinných metod ochrany proti zamoření pěstebních ploch tímto patogenem je prevence. Preventivní metody ochrany rostlin jsou nedílnou součástí integrované ochrany rostlin a v dnešní době bychom měli tyto metody spolu se správnou pěstitelskou praxí implementovat v co možná nejvyšší míře.

Podle různých studií se sekundární metabolity extrahované z aromatických rostlin jeví jako potenciální účinné látky v boji proti houbovým chorobám. Tyto složité přírodní směsi jsou složeny z 20 až 60 komponentů. Mezi hlavní složky esenciálních olejů, které se vyznačují silnou inhibiční aktivitou patří monoterpeny, seskviterpeny nebo některé fenolové sloučeniny (thymol, karvakrol, eugenol). Tyto komponenty se ve vysokém množství vyskytují v esenci z *Eugenia caryophyllata*, *Cinnamomum zeylanicum* a *Thymus vulgaris*. Toxicitu esenciálních olejů prokazují studie zmíněné v literární rešerši viz kapitola 3.6 Esenciální oleje. Je patrné, že se vědci při výběru esenciálního oleje proti různým patogenům orientují právě podle směsného složení esenciálních olejů. Například 50% inhibice růstu mycelia u *P. cactorum* nastala při 0,073 µg / ml esenciálního oleje z *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* (Yang, a další, 2010). Negativní vliv na životaschopnost *Phytophthora cactorum* se prokázal u esenciálního oleje (EO) z *Origanum heracleoticum* (Salamone, a další, 2007), dále také u *P. infestans* pomocí EO z *Eugenia caryophyllata*, *Thymus vulgaris*, *Pelargonium graveolens* a *Cymbopogon winterianus* (Mazáková, a další, 2018) aj.

V této diplomové práci byla v experimentu vlivu esenciálních olejů na *P. cactorum* v in vitro testu a vlivu aplikace esenciálních olejů na *P. cactorum* v in vivo podmínkách nádobového testu získána unikátní data o účinnosti vybraných směsí esenciálních olejů, o různých koncentracích na inhibici *P. cactorum*. Tyto výsledky jsou přeneseny do tabulek a grafů a názorně potvrzují inhibiční efekt na vývoj *P. cactorum* pro vybrané testy viz kapitola 5 Výsledky. Tímto testováním byly získány nové informace o účinnosti esenciálních olejů v ochraně jahodníku proti *P. cactorum* v in vitro a in vivo podmínkách a byl splněn cíl této diplomové práce. Dále bylo potvrzeno, že existují kombinace esenciálních olejů, které v in vitro podmínkách inhibují růst mycelia *P. cactorum* ze 100 %. Tato úspěšná inhibice růstu mycelia byla ve všech 3 případech typů účinné látky (A, B, a C) podmíněna 1% koncentrací pro všech 10 izolátů. V případě dvou izolátů 17_15_10b a 18_10_14a nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi směsmi pro 0,1% koncentraci (A2, B2, C2), ale v případě dalších 8 izolátů byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ve prospěch vyšší účinnosti směsí esencí A2 a B2. Statistická analýza potvrdila, že součinnost esenciálních olejů z *Eugenia caryophyllata*,

Cinnamomum zeylanicum a *Thymus vulgaris* dosáhla nejlepších výsledků mezi jednotlivými typy esencí. Podobně v in vivo podmínkách bylo potvrzeno, že existují kombinace esenciálních olejů, které mají pozitivní vliv na nárůst většího množství biomasy oproti infikované neošetřené kontrole napříč spektrem odrůd. Stejně tak jako v in vitro testech i v in vivo testech se projevila vyšší účinnost směsí číslo 1 (A) a 2 (B), je také možné sledovat určitý trend v rozdílech mezi odrůdami, ale tento trend nejeví statisticky významné rozdíly. Pozitivní efekt na nárůst hmotnosti a průměru kořenového krčku nastal po ošetření přípravkem 2 (B) u odrůdy Wendy oproti kontrole. Zároveň u variant ošetřených esenciálními oleji byl zaznamenán vyšší nárůst biomasy oproti ošetřeným variantám přípravkem Alliete.

Studován byl také efekt fytotoxicity, kdy neinokulované rostliny byly ošetřeny esenciálními oleji. V tomto případě nebyly až na jednu výjimku pozorovány statisticky významné rozdíly ve všech deseti sledovaných parametrech. Srovnání výsledků z in vitro a in vivo testování ukázalo, že i když účinnost esenciálních olejů na inhibici *P. cactorum* při 1% koncentraci v in vitro podmínkách je 100 %, v in vivo podmínkách k tomu tak nedošlo. Tento přechod z laboratorního do vnějšího prostředí je klíčový pro reálné používání těchto přípravků.

V dalším směřování výzkumu by se mělo zaměřit na více faktorů. Z hlediska výběru směsí esenciálních olejů se lze zaměřit na nové kombinace, které vycházejí z esencí použitých v této diplomové práci obohacené o esence, které vykazují taktéž fungicidní aktivitu (*Mentha piperita*, *Ocimum basilicum* nebo *Citrus sinensis*) (Bleša, a další, 2020). Dále se lze zaměřit na hledání konkrétnější hranice mezi 100% a nižší inhibicí růstu mycelia mezi 1-0,1% koncentracemi směsí esencí. Jak vyplývá z výsledků pro 1% koncentraci všech typů účinné látky, pro 10 izolátů byla účinnost inhibice 100%. Pro 0,1% koncentraci všech typů účinné látky, pro 10 izolátů byla účinnost inhibice mezi 15,6-33,7 %. Hranice inhibice růstu mycelia *P. cactorum* se nejspíš nachází mezi 1–0,1% koncentrací A, B, a C typů směsí esenciálních olejů (ú.l.). V případě experimentu vlivu aplikace esenciálních olejů na *P. cactorum* v in vivo podmínkách nádobového testu je za účelem získání více dat (pro lépe vypovídající výsledky statistických metod) potřeba provést více opakování než 5. Zajímavým směrem dalšího výzkumu negativního vlivu esenciálních olejů na životaschopnost *Phytophthora cactorum* v in vitro a in vivo podmínkách je kombinace esenciálních olejů s biologickými přípravky na ochranu rostlin. Nebo kombinace esenciálních olejů se stávajícími přípravky kategorie chemické ochrany rostlin. Velmi podstatné je zaměřit se na převedení výborné negativní účinnosti esenciálních olejů na životaschopnost *P. cactorum* v in vitro podmínkách do in vivo podmínek. Tato výzva vede k možnostem testování účinnosti preparátů v polních podmínkách ve vícetých opakovaných experimentech nebo zkoušení různých formulací směsí esenciálních olejů pro sledování trvání stálosti fungicidního účinku v in vivo podmínkách.

7 Závěr

- V této práci byly směsi esenciálních olejů směsí označených A (1) (hřebíček+skořice+tymián neboli HR+CINO+TV), B (2) (geranie, tymián neboli PG+TV), C (3) (skořice+citronela+kafr neboli CINO+CW+KAF) byl testován jejich účinek na 10 vybraných izolátech *P. cactorum* v pěti různých koncentracích (1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001%).
- Byla prokázána hypotéza negativního vlivu esenciálních olejů na životaschopnost *P. cactorum* v in vitro a in vivo podmínkách.
- Testováním vlivu esenciálních olejů na *P. cactorum* v in vitro testu byly získány nové informace o účinnosti esenciálních olejů v ochraně jahodníku proti *P. cactorum* v in vitro a in vivo podmínkách.
- Existují kombinace esenciálních olejů, které v in vitro podmínkách inhibují růst mycelia *P. cactorum* ze 100 %. Tato úspěšná inhibice růstu mycelia byla ve všech 3 případech typů účinné látky (A, B, a C) podmíněna 1% koncentrací pro všech 10 izolátů.
- V případě koncentrace 0,1% byla účinnost na inhibici v rozmezí 15,6-33,7 %, rovněž se projevil rozdíl v účinnosti jednotlivých směsí na různé izoláty.
- V případě koncentrace 0,01 % se inhibice růstu pohybovala v rozmezí 8,2-10,5 %. V případě koncentrací 0,001 % a 0,0001 % byla inhibice růstu stanovena napříč směsí na 7,2-13,5 %. V těchto dvou koncentracích lze sledovat ojedinělé případy, kdy jedna ze směsí vykazuje rozdíl od dalších dvou, a to na různých izolátech. Lze tedy konstatovat, že i velmi nízké koncentrace ovlivňují růst *P. cactorum*, a pro další testy by bylo vhodné použít zejména směsi A (1) a B (2).
- Existují kombinace esenciálních olejů, které mají pozitivní vliv na nárůst většího množství biomasy oproti infikované neošetřené kontrole napříč spektrem odrůd. V in vivo testech byla vyšší účinnost směsí číslo 1 (A) a 2 (B). Pozitivní efekt na nárůst hmotnosti a průměru kořenového krčku nastal po ošetření přípravkem 2 (B) u odrůdy Wendy oproti kontrole. Přípravek Alliete nejevil výraznější známky vyšší účinnosti v ochraně proti *P. cactorum*, než přípravky na bázi esencí.
- Jednoznačně došlo k napadení rostlin *P. cactorum* v kontrolních variantách, protože ve většině parametrů jsou statisticky významné rozdíly mezi zdravou a inokulovanou rostlinou napříč odrůdami kromě hmotnosti kořenů. V případě fytotoxicity nebyly až na jednu výjimku pozorovány statisticky významné rozdíly ve všech deseti sledovaných parametrech.
- Díky současnému omezování registrovaných syntetických, chemických přípravků na ochranu rostlin mají esenciální oleje potenciál jako biologické přípravky některé chemické nahradit. Jejich výhoda spočívá v přírodní povaze a obnovitelných zdrojích. Jejich výrazná antimikrobiální účinnost byla prokázána již v mnoha studiích i v této diplomové práci. Další výzkumy negativního působení esenciálních olejů proti

patogenům všech druhů jsou žádoucí a nevíhnutelné a mohou přinést pozoruhodné výsledky.

8 Literatura

- Adams, R. P. 2007.** *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. USA : Allured Publishing Corporation, 2007. Sv. fourth ed.
- Adaskaveg, Jim, a další. 2011.** *Efficacy and timing of fungicides, bactericides, and biologicals for deciduous tree fruit, nut, strawberry, and vine crops*. místo neznámé : UC Davis, Dept. of Plant Pathology; Statewide IPM Program; UC Kearney Agricultural Center, 2011.
- Aglave, Balaji. 2019.** *Handbook of Plant Disease - Identification and Management*. New York : Taylor & Francis Group, LLC, 2019. 978-1-138-58547-8.
- Agrios, George N. 2005.** *Plant pathology*. Department of Plant Pathology University of Florida : Elsevier academic press, 2005. 0-12-044565-4.
- Agustí, L., a další. 2011.** Biocontrol of root rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum* with a combination of two pseudomonas fluorescens strains. *Journal of Plant Pathology*. Edizioni ETS Pisa, 2011, Sv. 2, 93, stránky 363-372.
- Anandhakumar, J. a Zeller, W. 2008.** Biological control of red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) disease of strawberry with rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2008, 115, stránky 49-56.
- Badawy, M. E. a Abdelgaleil, S. A. 2014.** Composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Egyptian plants against plant pathogenic bacteria and fungi. *Industrial crops and products*. 2014, 52, stránky 776-782.
- Bakkali, F., a další. 2008.** Biological effect of essential oils - A review. *Science direct*. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46, stránky 446-475.
- Beránek, Jakub, a další. 2021.** *Phytophthora cactorum*. *Rostlinolékařský portál*. [Online] Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2021. [Citace: 13. únor 2021.] http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/#rlp|so|choroby.
- Berrie, A. M. 2011.** *Sustainable control of crown rot (Phytophthora cactorum) in strawberry*. místo neznámé : AHDB Horticulture, 2011. SF 099.
- Bi, Yang, a další. 2012.** Inhibitory effects of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. *Plant disease*. 2012, 96, stránky 797-803.
- Blackwell, Elizabeth. 1943.** The life history of *Phytophthora cactorum* (Leb. & Cohn) Schroet. *Transactions of the British Mycological Society*. Transactions, 8. duben 1943, Sv. 26, 1-2, stránky 71-89.
- Blažek, Jan, a další. 1998.** *Ovocnictví*. Praha : Český zahrádkářský svaz, 1998. 80-85362-33-3.
- Bleša, Dominik, a další. 2020.** *Agromanual.cz. Využití biologické ochrany v produkci rostlin*. [Online] 21. květen 2020. [Citace: 7. duben 2021.] <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/ochrana-obecne/vyuziti-biologicke-ochrany-v-produkci-rostlin>. 1801-4895.
- Buchtová, Irena. 2020; 2013; 2010; 2002.** *Situační a výhledová zpráva ovoce*. Praha : Ministerstvo zemědělství, 2020; 2013; 2010; 2002. 978-80-7434-576-0; 978-80-7434-116-8; 978-80-7084-906-4; 80-7084-225-3.
- Cal, A. De, a další. 2005.** Effect of chemical fumigation on soil fungal communities in Spanish strawberry nurseries. *Applied Soil Ecology*. 2005, 28, stránky 47-56.
- Causin, R., a další. 2005.** An improved method for the detection of *Phytophthora cactorum* (L.C.) Schröeter in infected plant tissues using scar markers. *Journal of Plant Pathology*. Edizioni ETS Pisa, 2005, Sv. 1, 87, stránky 25-35.

- Dzamic, A., a další. 2009.** Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009, 45, stránky 259-261.
- Džamić, Ana M., a další. 2014.** Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of *Pelargonium graveolens* essential oil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2014, Sv. Vol. 4, 03, stránky 001-005.
- Ellis, Michael A., a další. 2006.** *Midwest strawberry production guide*. místo neznámé : The Ohio State University, 2006. Bulletin 926.
- Evenhuis, B., a další. 2014.** Alternative methods to control *Phytophthora cactorum* in strawberry cultivated in soilless growing media. *Acta Horticulturae*. 2014, 1044, stránky 337-342.
- Hantula, Jarkko, a další. 2000.** Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron and silver birch. *Mycol. Res*. 2000, Sv. 9, 104, stránky 1062–1068.
- Harant, Miloš a Zacha, Vladimír. 1986.** *Jahody*. Praha : Státní zemědělské nakladatelství, 1986. 07-108-86.
- Havelková, Nikola. 2017.** Stanovení reziduí ve vybraných komoditách po ošetření fumiganty kyanovodíkem a dikyanem. *Diplomová práce*. Pardubice : Univerzita pardubice, 2017. C15580.
- Hudec, Kamil a Gutten, Ján. 2007.** *Encyklopedie chorob a škůdců - komplexní ochrana vaší zahrady*. Brno : Computer press, 2007. 978-80-251-1768-2.
- Hudler, Geroge W. 2013.** *Phytophthora cactorum*. *Forest Phytophthoras*. [Online] 2013. [Citace: 14. únor 2021.] <https://journals.oregondigital.org/index.php/ForestPhytophthora/article/view/3396/3166.2164-7232>.
- Husaini, Amjad M. a Neri, Davide. 2016.** *Strawberry growth, development and diseases*. United kingdom : CAB International, 2016. 978-1-78064-663-3.
- Changliang, Jing, a další. 2017.** In vitro and in vivo activities of eugenol against tobacco black shank caused by *Phytophthora nicotianae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2017, 142, stránky 148-154.
- Chitambar, John. 2017.** *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt. 1886. *Fungi, plant pathogens*. [Online] Pest Rating Proposals and Final Ratings, 25. srpen 2017. [Citace: 16. únor 2021.] <https://blogs.cdfa.ca.gov/Section3162/?p=4027>.
- Kang, Seogchan. 2006.** *Phytophthora cactorum*. *Phytophthora database*. [Online] Cyber-infrastructure for *Phytophthora*, 2006. [Citace: 12. únor 2021.] <http://www.phytophthoradb.org/species.php?a=dv&id=51237>.
- Kazda, Jan, Mikulka, Jan a Prokinová, Evženie. 2010.** *Encyklopedie ochrany rostlin - polní plodiny*. Praha : Profi press s.r.o., 2010. 978-80-86726-34-2.
- Kirk, Paul. 2021.** Index Fungorum. *Phytophthora cactorum*. [Online] Index Fungorum Partnership, 2021. [Citace: 21. březen 2021.] <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=199322>.
- Klaudová, Pavlína. 2017.** Éterický olej skořice. *Esenciální oleje a aromaterapie*. [Online] Biooo.cz Magazín, listopad 2017. [Citace: 6. duben 2021.] <https://magazin.biooo.cz/zdravi/esencialni-oleje/etericky-olej-skorice/>.
- Kumar, A., a další. 2008.** Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative food science & emerging technologies*. 2008, Sv. 4, 9, stránky 575-580.

- Lee.** Integrated management of strawberry disease.
- Li, Quan, a další. 2014.** Chemical composition and antifungal activity of extracts from the xylem of *Cinnamomum camphora*. *Bio resources*. 2014, Sv. 2, 9.
- Lind, K., a další. 2003.** *Organic fruit growing*. Cambridge : CAB International, 2003. 0-85199-640-X.
- Liu, C. H., a další. 2001.** Composition and antifungal activity of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora*. *International pest control*. 2001, Sv. 2, 43, stránky 72-74.
- Maas, J. L. 1998.** *Compendium of Strawberry Diseases*. Second edition. Beltsville : The American Phytopathological Society, 1998. 0-89053-194-9.
- Martin, Frank N., a další. 2012.** Identification and detection of Phytophthora: Reviewing our progress, Identifying our needs. *Plant Disease*. 2012, Sv. 96, 8.
- Mazáková, J., a další. 2018.** Sensitivity to Fungicides and Essential Oils in Czech Isolates of *Phytophthora infestans*. *Scientia agriculturae bohémica*. 2018, Sv. 2, 49, stránky 69-77.
- Mohammadi, A., Hashemi, M. a Hosseini, SM. 2015.** Comparison of antifungal activities of various essential oils on the *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of fruit decay. *Iranian journal of microbiology*. 2015, Sv. 1, 7, stránky 31-37.
- Nelson, Eric B. 2004.** Biological Control of Oomycetes and Fungal Pathogens. [autor knihy] Robert M. Goodman. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. New York : autor neznámý, 2004.
- Novák, Jan. 2013.** *Co rostlo u babičky na zahradě*. Praha : Euromedia Group k. s., 2013. 978-80-242-4018-3.
- O'Brien, Philip A., Williams, Nari a Hardy, Giles E. Stj. 2009.** Detecting *Phytophthora*. *Critical Reviews in Microbiology*. 2009, Sv. 3, 35, stránky 169-181.
- P. 2013.** Hřebíčkový esenciální olej (a všechno o něm). *DIFI blog Dify*. [Online] DIFI blog, 2013. [Citace: 6. duben 2021.] <https://dify.cz/hrebickovy-esencialni-olej-vsechno-nem/>.
- Pánek, M. a Tomšovský, M. 2017.** In vitro growth response of *Phytophthora cactorum*, *P. nicotianae* and *P. × pelgrandis* to antibiotics and fungicides. *Folia Microbiol.* 2017, 62, stránky 269-277.
- 2019.** *Phytophthora cactorum* (apple collar rot). *Centre for Agriculture and Bioscience International*. [Online] 20. Listopad 2019. [Citace: 16. duben 2021.] <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40953>.
- Porras, M., a další. 2007.** Reduction of *Phytophthora cactorum* in Strawberry Fields by *Trichoderma* spp. and Soil Solarization. *Plant Disease*. 2007, Sv. 91, 2, stránky 142-146.
- Prusky, Dov a Gullino, Maria Lodovica. 2014.** *Post-harvest Pathology; Plant Pathology in the 21st Century, Contributions to the 10th International Congress, ICPP 2013*. místo neznámé : Springer International Publishing Switzerland, 2014. Sv. 7. 978-3-319-07700-0.
- Pscheidt, J. W. 2004.** Diagnosis and Control of *Phytophthora* Diseases. *Pest Management Handbooks*. [Online] Oregon State University, 2004. [Citace: 13. Duben 2021.] <https://pnwhandbooks.org/plantdisease/pathogen-articles/common/oomycetes/diagnosis-control-phytophthora-diseases>.
- Ranasinghe, L., Jayawardena, B. a Abeywickrama, K. 2002.** Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology*. 2002, Sv. 3, 35, stránky 208-211.
- Ristaino, Jean Beagle.** *Phytophthora cactorum. Identification of Common Phytophthora Species*. [Online] North Carolina State University. [Citace: 14. únor 2021.]

http://hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB_2016/Phytophthora_CD_update/key/A%20Lucid%20Key%20to%20the%20Common%20Species%20of%20Phytophthora/Media/Html/Phytophthora_cactorum.htm.

Risteski, Mihajlo, a další. 2019. *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt as casual agent. *Mathematical and Biotechnical Sciences*. MASA, 2019, Sv. 40, 1, stránky 93-103.

Rivard, Cary. 2007. *Phytophthora cactorum*. *PP728 Pathogen Profiles*. [Online] NCSU Department of Plant Pathology, May 2007. [Citace: 13. únor 2021.] <https://projects.ncsu.edu/cals/course/pp728/cactorum/Pcactorum.html>.

Salamone, A., a další. 2007. *Inhibitory effects of the main compounds of oregano essential oil against some pathogenic fungi*. Germany : 15th International reinhardsbrunn symposium, 2007. 978-3-941261-02-0.

Sarkhosh, A., a další. 2018. In Vitro evaluation of eight plant essential oils for controlling Colletotrichum, Botryosphaeria, Fusarium and Phytophthora fruit rots of avocado, mango and papaya. *Plant protection Science*. 2018, 54, stránky 153-162.

Schafleitner, Sadia, a další. 2013. Genetic variation of resistance of the cultivated strawberry to crown rot caused by *Phytophthora cactorum*. *Journal of Berry Research*. 2013, 3, stránky 79-91.

Simic, A., a další. 2008. Essential Oil Composition of *Cymbopogon winterianus* and *Carum carvi* and their antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*. 2008, Sv. 46, 6, stránky 437-441.

Toljamo, Anna. 2020. *Fragaria – Phytophthora cactorum interactions*. Kuopio : University of Eastern Finland, 2020. 978-952-61-3665-3.

Vašátková, Jana. 2015. Antifungální účinek esenciálních olejů na vybrané původce houbových chorob zeleniny. *Diplomová práce*. Praha : Česká zemědělská univerzita v Praze, 2015.

Vidhyasekaran, P. a Basra, Amarjit S. 2004. *Concise Encyclopedia of Plant Pathology*. New York : Food Products Press a The Haworth Reference Press, 2004. 1-56022-943-8.

Weigricht, Ondřej. 2021. Praha : autor neznámý, 2021.

Yang, Dan, a další. 2010. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. *Crop Protection*. 2010, 29, stránky 295-299.

Zaizhi, Liu, a další. 2018. Optimization of solvent-free microwave assisted extraction of essential oil from *Cinnamomum camphora* leaves. *Science direct*. Industrial Crops & Products, 2018, 124, stránky 353-362.

Zouhar, Miloslav. 2021. Praha : autor neznámý, 2021.

9 Samostatné přílohy

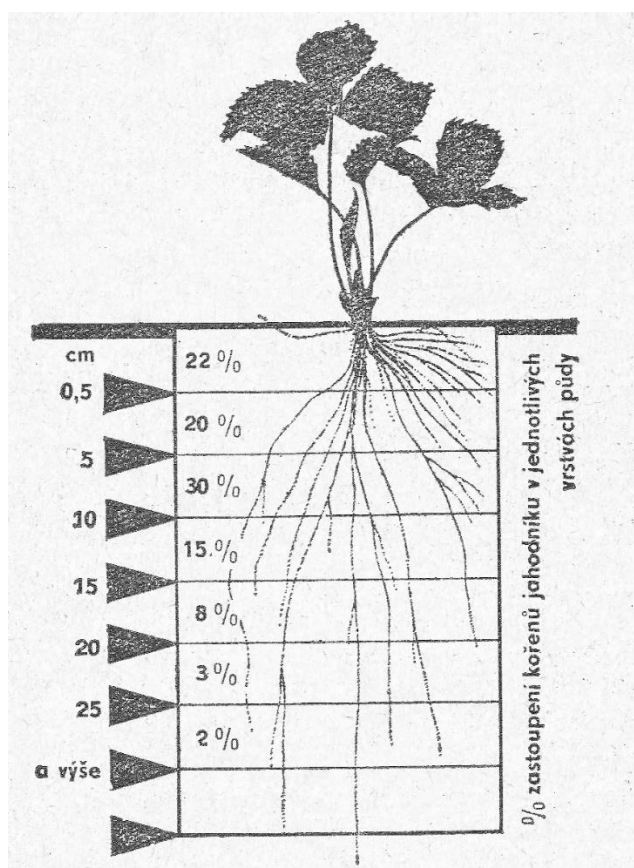
Příloha 1 Hlavní druhy rodu <i>Fragaria</i> a jejich ploidie (Husaini, a další, 2016)	II
Příloha 2 Hloubka kořenového systému jahodníku (Harant, a další, 1986)	II
Příloha 3 Rostlina jahodníku (Harant, a další, 1986)	III
Příloha 4 Celková sklizeň jahod v ČR v tunách (Buchtová, 2020; 2013; 2010; 2002)	IV
Příloha 5 Průměrné ceny zemědělských výrobců v ČR v Kč/t (Buchtová, 2020; 2013; 2010; 2002)	IV
Příloha 6 Spotřeba ovoce v ČR v hodnotě čerstvého podle jednotlivých druhů v kg/os. za rok (Buchtová, 2020; 2013; 2010; 2002)	IV
Příloha 7 Dovoz vybraných druhů ovoce do ČR v tunách (t) v letech 2013–2020 (Buchtová, 2020; 2013; 2010; 2002)	IV
Příloha 8 Celková plocha a produkce jahod v hlavních regionech v letech 2003 a 2013 (Husaini, a další, 2016)	V
Příloha 9 Taxonomický strom <i>Phytophthora cactorum</i> (umístění v Clade 1) (Kang, 2006)	VI
Příloha 10 Tabulka sekvencí a orientace PC primerů (<i>P. cactorum</i>) (Causin, a další, 2005)	VI
Příloha 11 Životní cyklus <i>P. cactorum</i> způsobující kožovitou hnilobu jahod	VII
Příloha 12 Životní cyklus <i>P. cactorum</i> způsobující fytoftorovou krčkovou hnilobu jahodníku	VII
Příloha 13 Příznaky fytoftorové krčkové hniloby jahodníku způsobené <i>P. cactorum</i> . Typický kolaps rostlin. (Aglave, 2019)	VIII
Příloha 14 Příznaky fytoftorové krčkové hniloby jahodníku způsobené <i>P. cactorum</i> (Aglave, 2019)	VIII
Příloha 15 Příznaky kožovité hniloby jahod způsobené <i>P. cactorum</i> na nezralých a zralých plodech jahod (Aglave, 2019)	IX
Příloha 16 Příznaky kožovité hniloby jahod způsobené <i>P. cactorum</i> na nezralých a zralých plodech jahod (Lee)	IX
Příloha 17 Příznaky kožovité hniloby jahod způsobené <i>P. cactorum</i> na nezralých a zralých plodech jahod (Lee)	IX
Příloha 18 Morfologie <i>P. cactorum</i> – spodní řada: sukovité mycelium a oospora v oogoniu s paraginálním antheridiem; vrchní řada: papilátové sporangie, prázdné sporangium a vyklíčené oospory produkující sporangie (Ristaino)	X
Příloha 19 Efekt fungicidních účinných látek proti kožovité hnilobě jahod	XI
Příloha 20 Procento rostlin infikovaných fytoftorovou hnilobou kořebového krčku jahodníku v červenci a září (světlé zelená září; tmavě zelená červenec)	XI
Příloha 21 Chemické a biologické fungicidní přípravky testované na jahodách v roce 2010 na kontrolu proti hnilobě kořenového krčku (<i>P. cactorum</i>)	XII
Příloha 22 Fotodokumentace in vivo nádobového pokusu s jahodníkem – práce s jahodníkem (Zouhar, 2021)	XIII
Příloha 23 Fotodokumentace in vivo nádobového pokusu s jahodníkem – systém sběru dat (Zouhar, 2021)	XIII
Příloha 24 Fotodokumentace in vivo nádobového pokusu s jahodníkem – založený pokus (Zouhar, 2021)	XIV

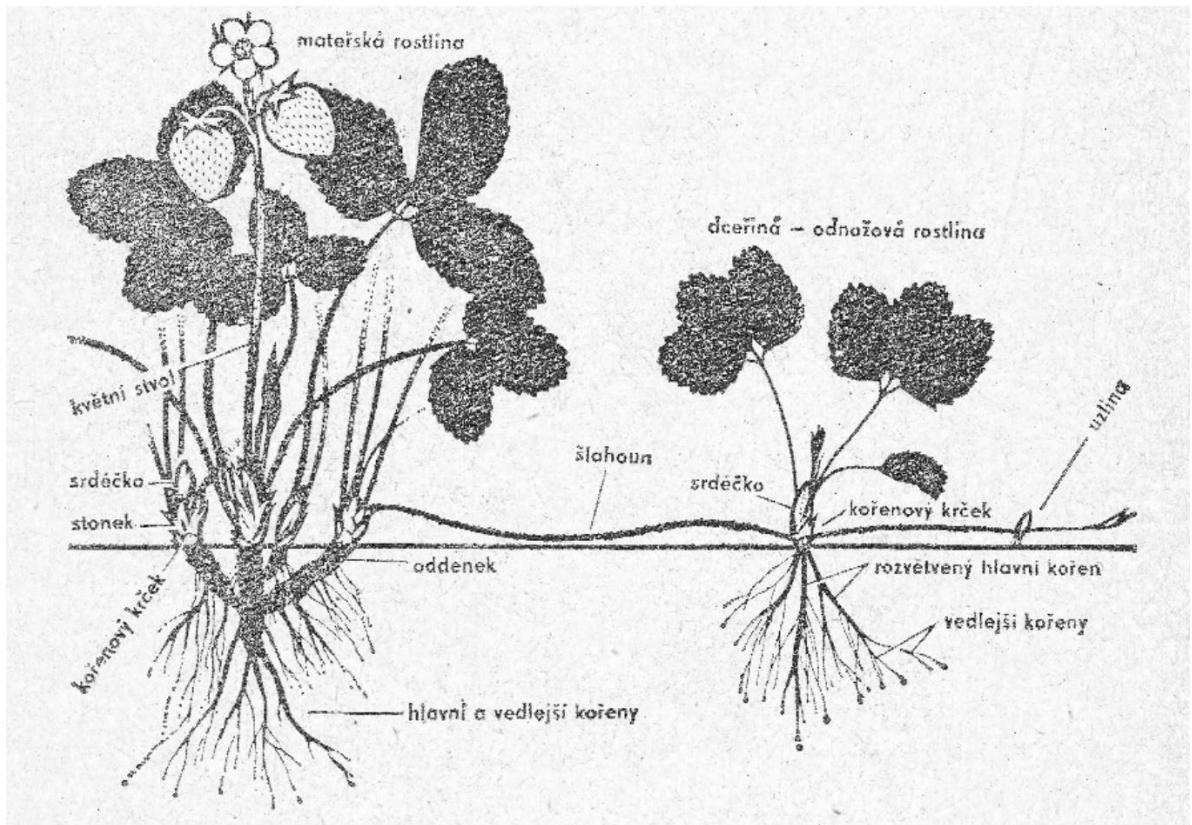
Příloha 1 Hlavní druhy rodu *Fragaria* a jejich ploidie (Husaini, a další, 2016).

Ploidie	Druh	Ploidie	Druh
Diploidní (2x) ^a	<i>F. vesca</i>	Tetraploidní (4x)	<i>F. corymbosa</i>
	<i>F. viridis</i>		<i>F. orientalis</i>
	<i>F. nilgerrensis</i>		<i>F. moupinensis</i>
	<i>F. daltoniana</i>	Penta a hexaploidní (5x a 6x)	<i>F. bringhurstii</i>
	<i>F. nubicola</i>		<i>F. moschata</i>
	<i>F. innumae</i>	Oktaploidní (8x)	<i>F. chiloensis</i>
	<i>F. yesoensis</i>		<i>F. virginiana</i>
	<i>F. mandschurica</i>		<i>F. iturupensis^b</i>
	<i>F. nipponica</i>	Dekaploidní (10x)	<i>F. × ananassa</i>
<i>F. gracilis</i>	<i>F. iturupensis^b</i>		
<i>F. pentaphylla</i>			

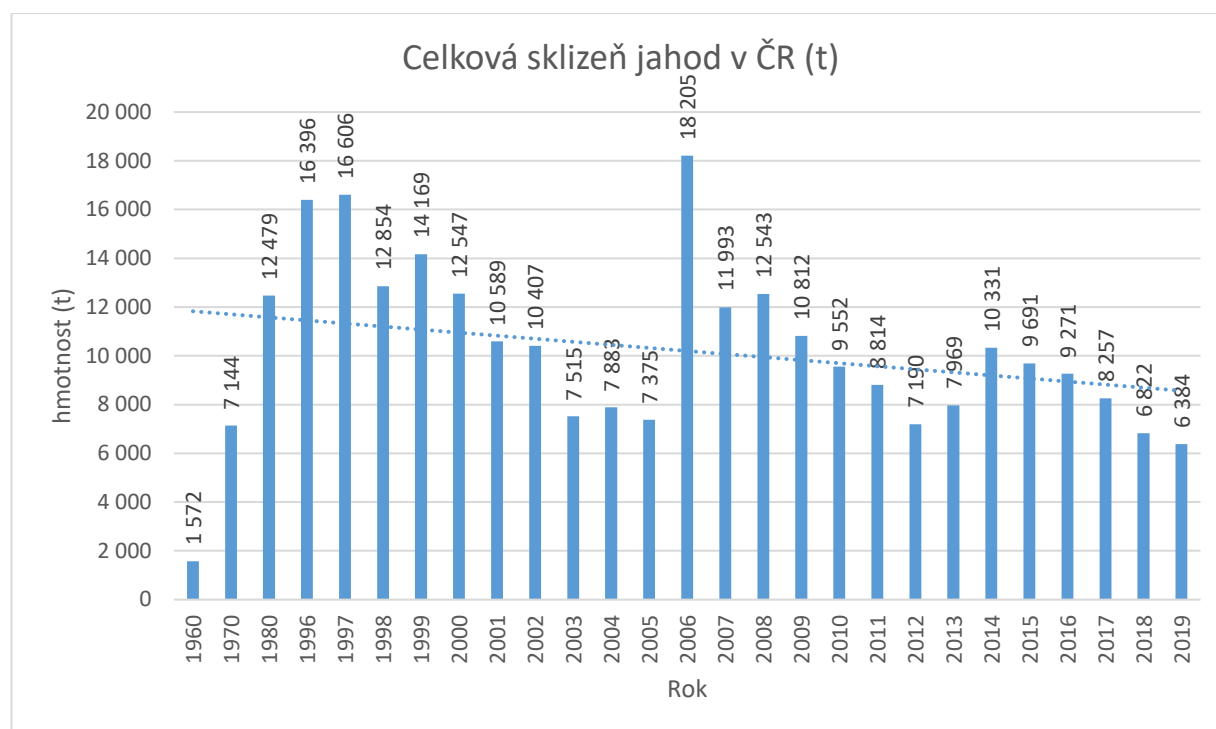
Poznámka: ^ax – základní číslo chromozomu v haploidním genomu ($x = 7$); ^b – ploidie *F. iturupensis* není zcela jasná.

Příloha 2 Hloubka kořenového systému jahodníku (Harant, a další, 1986)





Příloha 4 Celková sklizeň jahod v ČR v tunách (Buchtová, 2020; 2013; 2010; 2002)



Příloha 5 Průměrné ceny zemědělských výrobců v ČR v Kč/t (Buchtová, 2020; 2013; 2010; 2002)

Druh ovoce	2015	2016	2017	2018	2019	2020*
Jahody (Kč/t)	63 667,-	67 833,-	77 325,-	89 538,-	90 000,-	103 705,-

Poznámka: * průměr za období od 1. 1.–30. 9. 2020

Příloha 6 Spotřeba ovoce v ČR v hodnotě čerstvého podle jednotlivých druhů v kg/os. za rok (Buchtová, 2020; 2013; 2010; 2002)

Druh	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
jahody zahradní (kg/os.)	2,8	2,8	2,8	3,0	2,4	2,7	2,7	2,5	2,5	2,4	2,5

Příloha 7 Dovoz vybraných druhů ovoce do ČR v tunách (t) v letech 2013–2020 (Buchtová, 2020; 2013; 2010; 2002)

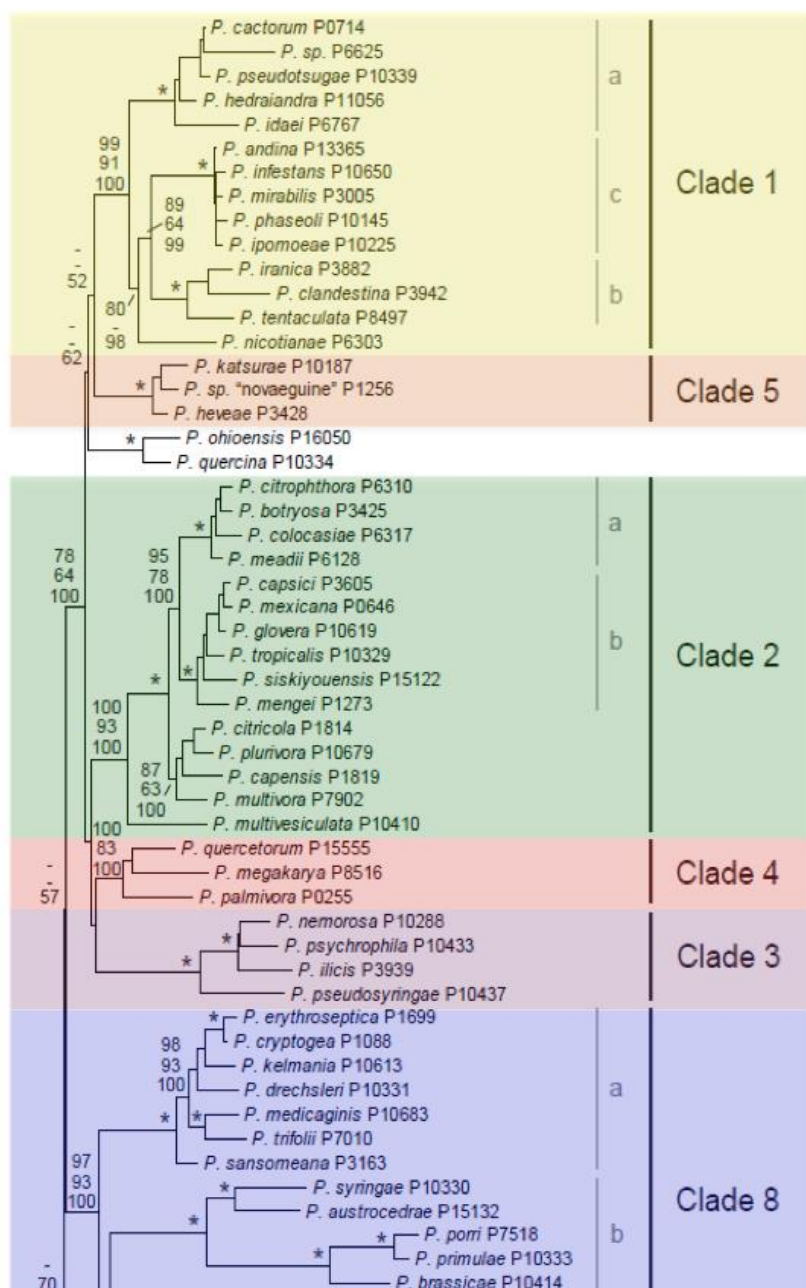
Komodita	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020*
jahody (t)	10 627	11 122	11 665	12 396	13 471	13 349	16 466	12 426

Poznámka: * údaje za období od 1. 1.–31. 8. 2020

Příloha 8 Celková plocha a produkce jahod v hlavních regionech v letech 2003 a 2013 (Husaini, a další, 2016)

Region	Produkce (t)		Plocha (ha)	
	2003	2013	2003	2013
Svět	5 041 331	7 739 622	320 990	361 662
Evropa	1 224 692	1 484 987	162 543	162 315
Asie	2 334 869	3 845 553	113 121	143 036
USA	977 945	1 360 869	19 587	23 549
Afrika	184 582	417 135	6 250	10 671

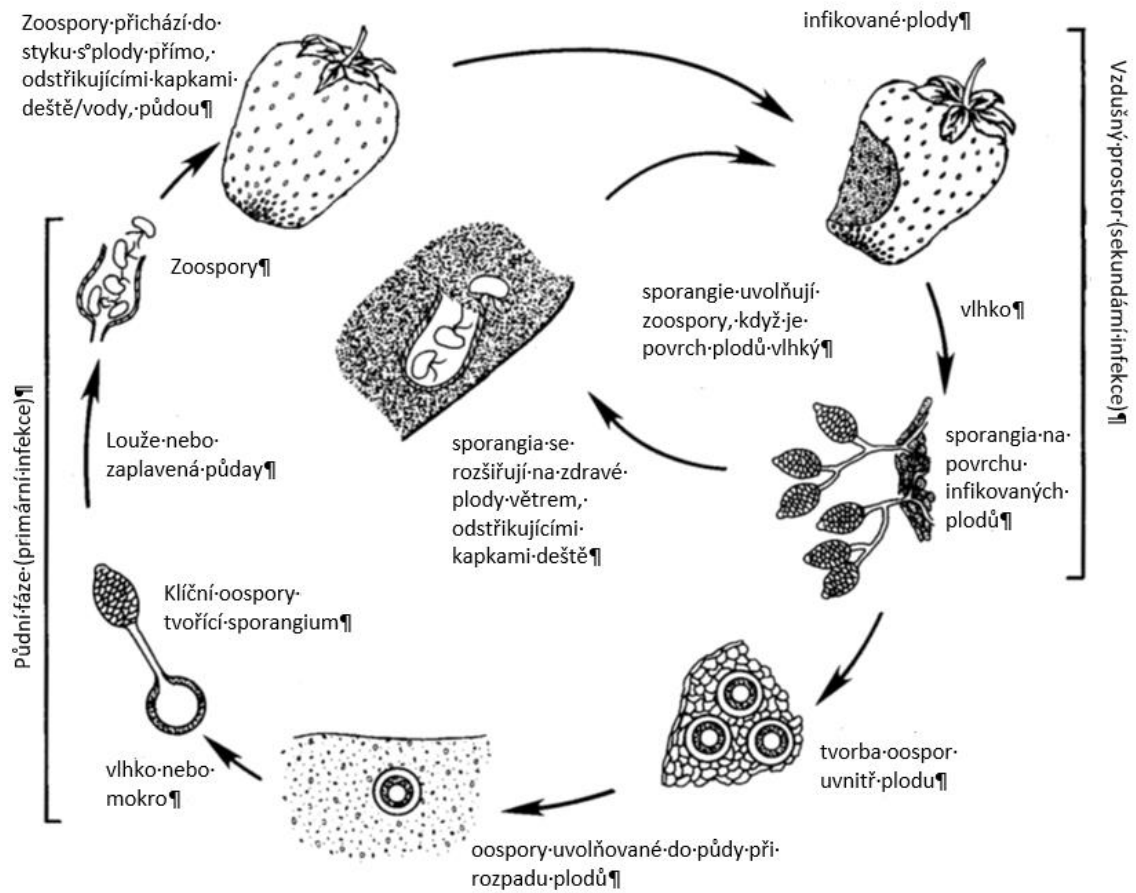
Příloha 9 Taxonomický strom *Phytophthora cactorum* (umístění v Clade 1) (Kang, 2006)



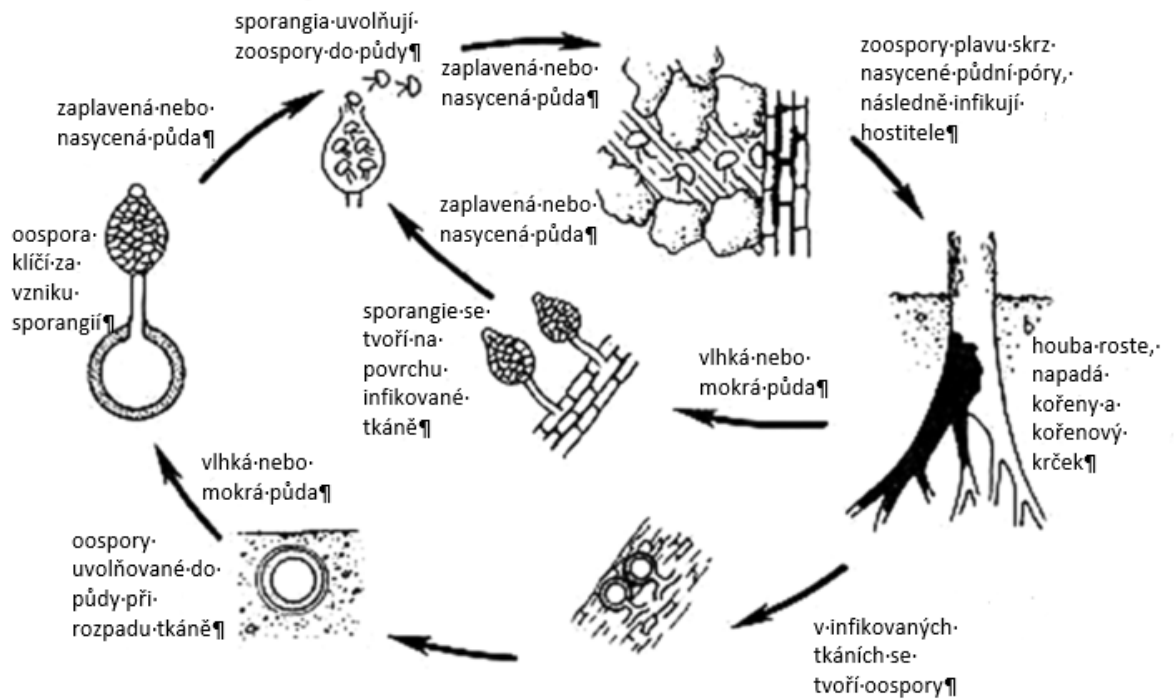
Příloha 10 Tabulka sekvencí a orientace PC primerů (*P. cactorum*) (Causin, a další, 2005)

Primer	Nucleotide Sequence	Orientation	Tm °C	% CG
PC1	5'GAAACGGGTGTTGATATCGGAC3'	forward	66	50
PC2	5'GTTTCGGGTGCTGCCAAAACT3'	reverse	66	50
PC3	5'GGATTCAGTATGTCGAAGTAGCT3'	reverse	66	43,5
PC4	5'GCGACTGGCTGCTGTTTTAAAC3'	forward	68	47,8
PC5	5'TCTCACATACATGTACCTGTAGC3'	reverse	66	43,5

Příloha 11 Životní cyklus *P. cactorum* způsobující kořovitou hnilobu jahod



Příloha 12 Životní cyklus *P. cactorum* způsobující fytoftorovou krčkovou hnilobu jahodníku



Příloha 13 Příznaky fytoftorové krčkové hniloby jahodníku způsobené *P. cactorum*. Typický kolaps rostlin. (Aglave, 2019).



Příloha 14 Příznaky fytoftorové krčkové hniloby jahodníku způsobené *P. cactorum* (Aglave, 2019)



Příloha 15 Příznaky kožovité hniloby jahod způsobené *P. cactorum* na nezralých a zralých plodech jahod (Aglave, 2019)



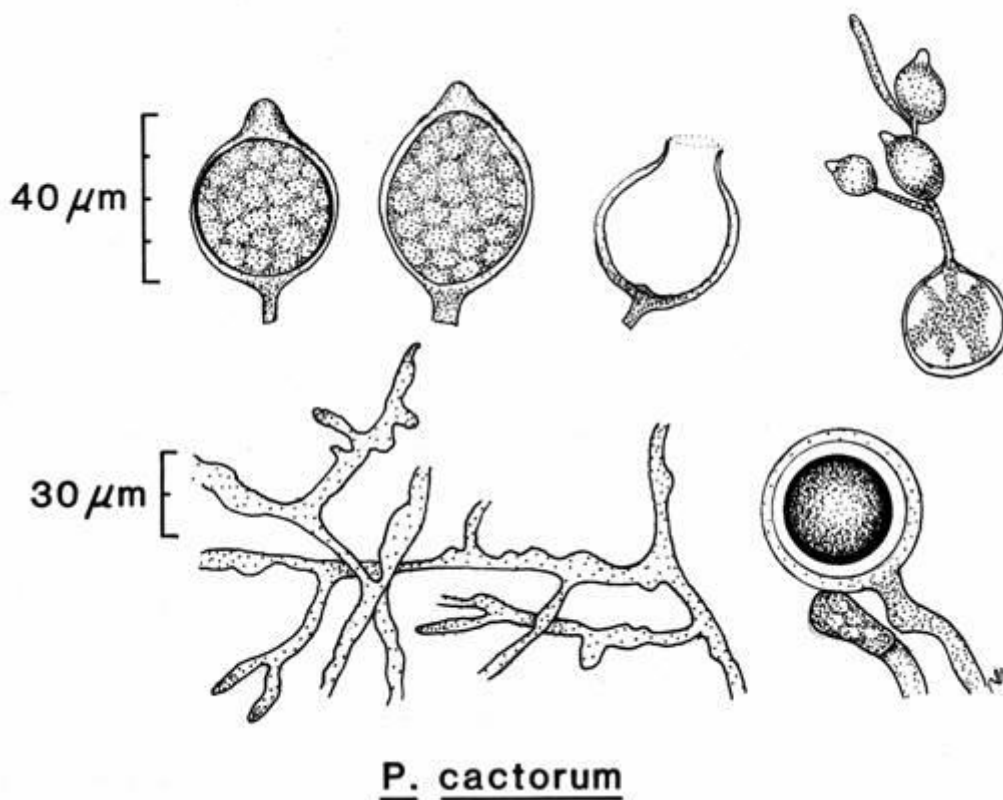
Příloha 16 Příznaky kožovité hniloby jahod způsobené *P. cactorum* na nezralých a zralých plodech jahod (Lee)



Příloha 17 Příznaky kožovité hniloby jahod způsobené *P. cactorum* na nezralých a zralých plodech jahod (Lee)



Příloha 18 Morfologie *P. cactorum* – spodní řada: sukovité mycelium a oospora v oogoniu s paraginálním antheridiem; vrchní řada: papilátové sporangie, prázdné sporanium a vyklíčené oospory produkující sporangie (Ristaino)



Effect of Fungicides on Control of Strawberry Leather Rot

Treatment and Rate (a.i./ha)	Leather Rot (%) ^a	Marketable Fruit (%) ^b	Total No. of Fruits	Total Yield (kg) ^c	Percent Disease Control
Pyraclostrobin (0.20 kg)	0.5 a ^d	96.8 a	1080 a	10.8 a	99
Azoxystrobin (0.28 kg)	0.4 a	97.8 a	1054 a	10.9 a	99
Phosphorous acid (2.35 kg)	0.8 a	96.8 a	1065 a	10.4 a	98
Mefenoxam (0.56 kg)	0.3 a	97.9 a	1080 a	9.6 a	99
Untreated control	58.1 b	35.9 b	1144 a	7.7 b	–

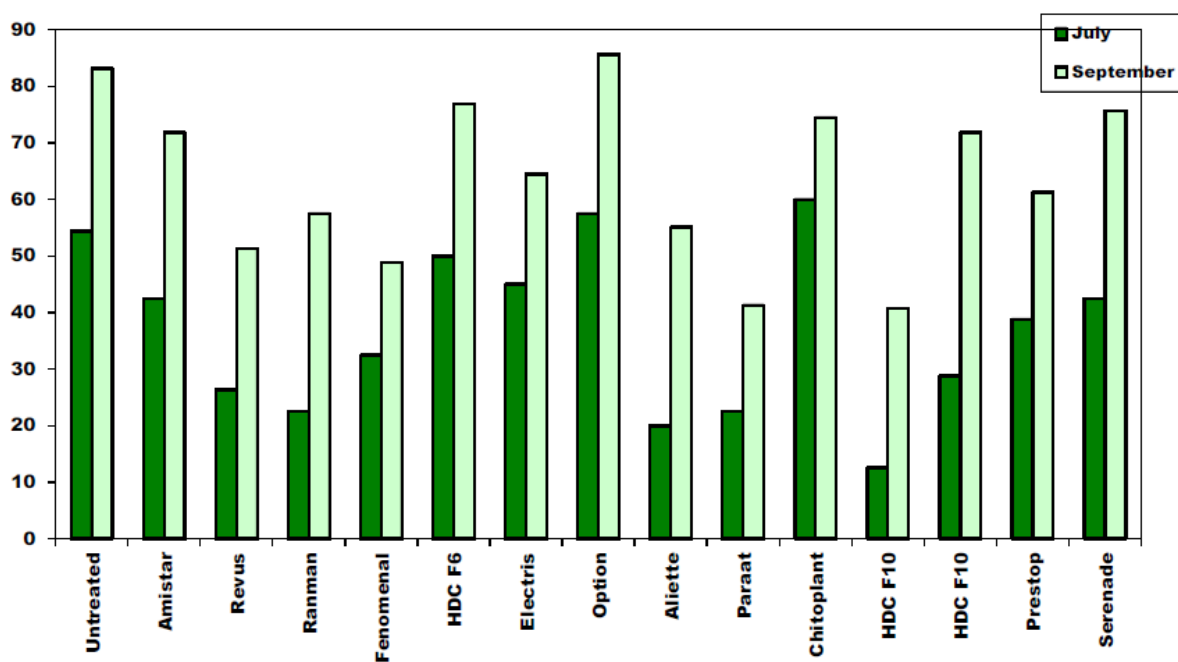
^a Mean percentage of *Phytophthora cactorum*-infected fruit from three harvest dates (June 3, 7, and 10).

^b Mean percentage of marketable fruit from the above three harvest dates.

^c Total yield from the above three harvest dates for 3 m of crop row per replication.

^d For percentages, the analysis was based on the angular transformation. Numbers followed by the same letter within columns do not differ significantly according to Duncan's modified (Bayesian) LSD test ($P = 0.05$).

Příloha 20 Procento rostlin infikovaných *Fytophthorou hnilobou kořebvého krčku jahodníku* v červenci a září (světlé zelená září; tmavě zelená červenec) (Berrie, 2011)



Příloha 21 Chemické a biologické fungicidní přípravky testované na jahodách v roce 2010 na kontrolu proti hnilobě kořenového krčku (*P. cactorum*). (Berrie, 2011)

Product	Active ingredient	Product type	Product rate per litre	Application method
Untreated	-	-	-	-
Amistar	azoxystrobin	Fungicide	0.5 ml	Drench soon after planting
Revus	mandipropamid	Fungicide	0.3 ml	Drench soon after planting
Ranman A	cyazofamid	Fungicide	0.1 ml	Drench soon after planting
Fenomenal	fosetyl-AI + fenamidone	Fungicide	0.75 g/L	100 ml of diluent per plant 2 weeks after planting
Experimental 1	HDC F6	Fungicide	1.6 g/l	Foliar spray to new growth at 1000L/ha
Untreated	-	-	-	-
Electris	zoxamide + mancozeb	Fungicide	0.9 g	Drench soon after planting
Option	cymoxanil	Fungicide	0.075g	Drench soon after planting
Aliette	fosetyl-AI	Fungicide	3.75g	Foliar spray to new growth at 1000L/ha
Paraat	dimethomorph	Fungicide	1g	Drench soon after planting
Chitoplant	chitosan	Plant resistance stimulator	1g	Foliar spray to new growth at 1000L/ha
Experimental 2	HDC F10	Plant resistance stimulator	10 ml	Foliar spray to new growth at 1000L/ha
Experimental 3	HDC F10	Plant resistance stimulator	5 ml	Foliar spray to new growth at 1000L/ha
Prestop	<i>Gliocladium catenulatum</i>	Biocontrol agent	5 g/L 50 ml / plant	Drench 100ml/plant at planting and repeated 4 weeks later
Serenade	<i>Bacillus subtilis</i>	Biocontrol agent	4 ml/L 50ml / plant	Drench 100ml/plant at planting and repeated 4 weeks later

Příloha 22 Fotodokumentace in vivo nádobového pokusu s jahodníkem – práce s jahodníkem (Zouhar, 2021)



Příloha 23 Fotodokumentace in vivo nádobového pokusu s jahodníkem – systém sběru dat (Zouhar, 2021)



