

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zahradnictví**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Citlivost *Botrytis cinerea* k silicím**

**Diplomová práce**

**Karolína Němcová**

**Kvalita a zpracování zemědělských produktů**

**RNDr. David Novotný, Ph. D.**

**© 2023 ČZU v Praze**

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Citlivost *Botrytis cinerea* k silicím" jsem vypracovala 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 autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Davidu Novotnému, Ph. D. za odborné vedení mé práce, za jeho trpělivost, čas, cenné rady a připomínky. Velké poděkování patří mé rodině za poskytnutí zázemí a možnosti studovat.

# Citlivost *Botrytis cinerea* k silicím

## Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá antifungální aktivitou vybraných rostlinných silic proti kmenům *Botrytis cinerea* v *in vitro* a *in vivo* podmínkách.

Literární rešerše přináší základní informace potřebné k pochopení řešené problematiky. První část literární rešerše se skládá z uceleného přehledu o patogenu *B. cinerea*, jeho způsobu šíření v hostitelských rostlinách, šedé hnilobě (choroba kterou *B. cinerea* způsobuje) a ochraně rostlin před touto chorobou. Další část literární rešerše podává základní informace o rostlinných silicích, vč. jejich chemickém složení, a testování antifungální aktivity. Dále literární rešerše pojednává o hlávkovém zelí, jeho zemědělském významu a jeho nejvýznamnějších chorobách.

V *in vitro* experimentech byla zjišťována antifungální aktivita tymiánové, skořicové, hřebíčkové silice, silice z oregana a z citronové trávy vůči kmenům *B. cinerea*. Na základě výsledků z *in vitro* experimentů byly vybrány tři silice (tymiánová silice, silice z oregana a citronové trávy) k dalšímu studiu v *in vivo* experimentech. V rámci *in vivo* experimentů byly hodnoceny fungicidní vlastnosti silic vůči *B. cinerea* na skladovaném hlávkovém zelí. Největší antifungální aktivita byla zjištěna u silice z oregana. Ta inhibovala růst kolonií kmenů *B. cinerea* ve všech provedených experimentech. Tymiánová silice také účinně inhibovala růst. Silice z oregana a tymiánová silice by mohly být účinnými prostředky k regulaci negativního působení houby *B. cinerea* při skladování zemědělských produktů, které však vyžadují další experimenty ke zlepšení podmínek použití. Výsledky diplomové práce také ukazují rozdíly v citlivosti k jednotlivým silicím mezi jednotlivými kmeny *B. cinerea*.

**Klíčová slova:** šedá hniloba, ochrana skladovaných zemědělských produktů, fytopatogenní houby, biofungicidy, hlávkové zelí (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

# Sensitivity of *Botrytis cinerea* to essential oils

## Summary

The aim of this thesis was to recognize the antifungal activity of selected plant essential oils against *Botrytis cinerea* strains under *in vitro* and *in vivo* conditions.

The literature review provides basic information necessary to understand the problem. The first part of the literature review consists of a comprehensive overview of the pathogen *B. cinerea*, its methods of spreading in host plants, and the grey mold (the disease caused by *B. cinerea*) and plant protection against this disease. The next part of the literature review provides information on essential oils, including their chemical composition and testing for antifungal activity. The literature review also discusses cabbage, its agricultural importance and its most important diseases.

The antifungal activity of thyme, cinnamon, clove, oregano, and lemongrass essential oils against *B. cinerea* was investigated in *in vitro* experiments. Based on the results from the *in vitro* experiments, three essential oils (thyme, oregano, and lemongrass essential oil) were selected for further study in *in vivo* experiments. The *in vivo* experiments evaluated the fungicidal properties of essential oils against *B. cinerea* on stored cabbage. The greatest antifungal activity was found for oregano essential oil. It inhibited the growth of colonies of *B. cinerea* strains in all experiments performed. Thyme essential oil was also effective in growth inhibition. Thus, oregano essential oil and thyme essential oil could be an effective tool for controlling the fungus under crop storage conditions, but these require further experiments to improve the conditions of use. The results of the thesis also show differences in susceptibility to the different essential oils between different strains of *B. cinerea*.

**Keywords:** grey mold, protection of stored agricultural products, phytopathogenic fungi, biofungicides, cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Rod <i>Botrytis</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....</b>	<b>11</b>
3.2.1 Taxonomické zařazení .....	12
3.2.2 Životní cyklus .....	12
3.2.3 Sekundární metabolity .....	17
3.2.4 Šedá hniloba.....	21
3.2.5 Ochrana rostlin před patogenním působením <i>B. cinerea</i> .....	23
<b>3.3 Silice.....</b>	<b>24</b>
3.3.1 Chemické složení silic .....	24
3.3.1.1 Terpeny a terpenoidy .....	25
3.3.1.2 Další chemické sloučeniny .....	26
3.3.2 Antifungální aktivita silic .....	27
3.3.3 Metody testování antifungální aktivity silic .....	28
3.3.4 Vybrané druhy silic.....	29
3.3.4.1 Citronová tráva .....	29
3.3.4.2 Hřebíček .....	31
3.3.4.3 Oregano .....	31
3.3.4.4 Skořice.....	32
3.3.4.5 Tymián.....	33
<b>3.4 Zelí hlávkové.....</b>	<b>34</b>
3.4.1 Zemědělský význam .....	34
3.4.2 Vybrané choroby zelí.....	35
<b>4 Metodika .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Vliv přidavku esenciálních silic do kultivačního media na růst <i>B. cinerea</i> na agarovém kultivačním mediu.....</b>	<b>38</b>
4.1.1 Kmeny.....	38
4.1.2 Chemikálie.....	39
4.1.3 Stanovení vlivu v <i>in vitro</i> podmínkách.....	39
<b>4.2 Vliv odpařujících se esenciálních silic na růst <i>B. cinerea</i> na agarovém kultivačním mediu</b>	<b>39</b>
4.2.1 Kmeny.....	40
4.2.2 Chemikálie.....	40
4.2.3 Stanovení citlivosti v prostředí odpařujících se silic .....	40

<b>4.3</b>	<b>Vliv odpařujících silic na patogenní působení <i>B. cinerea</i> na hlávky zelí při skladování .....</b>	<b>41</b>
4.3.1	Kmeny.....	41
4.3.2	Chemikálie .....	41
4.3.3	Stanovení vlivu silic na hlávkách zelí.....	41
<b>4.4</b>	<b>Vliv odpařujících se silic na patogenní působení <i>B. cinerea</i> na listové disky z krouhárenského zelí při skladování silic .....</b>	<b>43</b>
4.4.1	Kmeny.....	43
4.4.2	Chemikálie .....	44
4.4.3	Stanovení vlivu silic v zavařovacích sklenicích .....	44
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Vliv přídavku esenciálních silic do kultivačního media na růst <i>B. cinerea</i> na agarovém kultivačním mediu.....</b>	<b>45</b>
<b>5.2</b>	<b>Vliv odpařujících se esenciálních silic na růst <i>B. cinerea</i> na agarovém kultivačním mediu<sup>49</sup></b>	
<b>5.3</b>	<b>Vliv odpařujících silic na patogenní působení <i>B. cinerea</i> na hlávky zelí při skladování .....</b>	<b>62</b>
<b>5.4</b>	<b>Vliv odpařujících se silic na patogenní působení <i>B. cinerea</i> na listové disky z krouhárenského zelí při skladování silic .....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>72</b>
<b>6.1</b>	<b>Antifungální aktivita silic .....</b>	<b>72</b>
6.1.1	<i>In vitro</i> experimenty.....	72
6.1.2	<i>In vivo</i> experimenty .....	74
<b>6.2</b>	<b>Fytotoxicita silic.....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>Seznam obrázků, grafů a tabulek.....</b>	<b>87</b>

# 1 Úvod

*Botrytis cinerea* je jedním z nejrozšířenějších a nejzávažnějších patogenů zeleniny. Tento patogen je původcem šedé hniloby, která je charakteristická vodnatou a měkkou hnilobou a bílou až šedavou barvou mycelia. Napadení plodin šedou hnilobou může být značným ekonomickým problémem, protože *B. cinerea* napadá velké množství plodin. Dalšími problémy může být znehodnocení plodin až úplná ztráta sklizně. Choroba se může tak šířit z odumřelých plodin a rostlinných zbytků, protože *B. cinerea* žije také saprofytickým způsobem života. *B. cinerea* představuje problém i během skladování plodin, protože šedá hniloba může snížit kvalitu skladovaných plodin a zkrátit tak jejich životnost. V současné době je cílem omezit používání chemických fungicidů a najít alternativní způsoby ochrany rostlin.

Alternativním způsobem ochrany rostlin může být využití rostlinných silic, které díky svému chemickému složení mohou být použity jako fungicidy přírodního původu. Chemické složení silicím dává antifungální, antibakteriální nebo insekticidní vlastnosti, díky kterému mohou působit na velké množství mikroorganismů. Tyto účinky mohou inhibovat růst a reprodukci houby *B. cinerea* a tím minimalizovat poškození plodin a jejich ztráty. Silice díky svému přírodnímu původu mohou být šetrnější variantou k životnímu prostředí, protože jsou lépe biologicky odbouratelné, tudíž nezanechají dlouhodobá toxická rezidua.

Hlávkové zelí (*Brassica oleracea* var. *capitata*) je zemědělsky významnou komoditou, protože je zdrojem potravy pro lidi i zvířata. Obsahuje významné látky pro lidskou výživu jako vitaminy, minerály, antioxidanty a vlákninu. Tato zelenina je také cílem mnoha chorob a škůdců, které snižují jakost zelí a způsobují ztráty na výnosech v relativně krátkém čase. K ochraně hlávkového zelí mohou být použity chemické fungicidy nebo silice, které mohou být aplikovány i preventivně pro zvýšení odolnosti rostlin proti chorobám.



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Rostlinné silice vykazují antifungální aktivitu proti růstu kmenů patogenní houby *Botrytis cinerea* a jsou využitelné jako alternativní látky v ochraně hlávkového zelí před tímto patogenem během skladování.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit citlivost kmenů houby *B. cinerea* k vybraným silicím v *in vitro* podmínkách a následně zhodnotit antifungální vlastnosti silic vybraných na základě výsledků z *in vitro* experimentů při vůči patogennímu působení kmenů houby *B. cinerea* vůči skladovanému zelí.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Rod *Botrytis*

Houby rodu *Botrytis* náleží mezi hospodářsky významné a často zkoumané organismy, přičemž tento rod byl popsán téměř před 300 lety (Garfinkel 2021). Tyto houby jsou polyfágní parazité, kteří jsou schopni žít jako saprofyté (živí se rozkládajícím se organickým materiálem), parazité nebo poloparazité. Někdy jsou schopni tyto typy chování střídát. Jako parazité produkují toxiny a enzymy, které degradují buněčné stěny hostitele. Ve stádiu saprofytů jsou schopni žít na odumřelé rostlinné tkáni, ale jinak jsou schopni žít na rostlině v jakémkoli stádiu vývoje (Aleu & Collado 2001). Zástupci rodu *Botrytis* jsou nejčastěji zaznamenávány na bobulích ovocných plodin, zelenině, okrasných rostlinách a některých polních plodinách. Vyskytují se v širokém spektru prostředí od polí přes skleníky až po sklady, kde mnohde způsobují významné ztráty (Carisse 2016).

Zástupci rodu *Botrytis* napadají své hostitele ve všech klimatických pásmech – od deštných pralesů přes poušť a arktickou tundru po mírné pásmo. Rod *Botrytis* obsahuje z hostitelského záběru několik specificky orientovaných druhů a jeden generalisticky orientovaný druh. Generalisticky orientovaným druhem je *Botrytis cinerea* Pers., která byla popsána u více než 1400 druhů rostlin, nicméně skutečné spektrum hostitelů bude pravděpodobně mnohem vyšší. Specificky orientované druhy napadají obvykle úzký záběr hostitelů nebo určitého hostitele, na nich působí virulentně. Při napadení tohoto rámce hostitelů může dojít zároveň i k infekci *B. cinerea* nebo ke koinfekci jednoho hostitele několika druhy *Botrytis* (Romanazzi & Feliziani 2014; Garfinkel 2021). Výčet nejvýznamnějších druhů rodu *Botrytis* je uveden v Tabulce 1 (Fillinger & Elad 2016).

Rod a druh	Nejběžnější hostitel
<i>Botrytis aclada</i>	Česnek ( <i>Allium</i> )
<i>Botrytis allii</i>	Česnek ( <i>Allium</i> )
<i>Botrytis byssoidea</i>	Česnek ( <i>Allium</i> )
<i>Botrytis caroliniana</i>	Ostružiník ( <i>Rubus</i> ), jahodník ( <i>Fragaria</i> )
<i>Botrytis cinerea</i>	Velké rozpětí rostlin
<i>Botrytis convoluta</i>	Kosatce ( <i>Iris</i> )
<i>Botrytis deweyae</i>	Denivka ( <i>Hemerocallis</i> )
<i>Botrytis elliptica</i>	Lilie ( <i>Lilium</i> )
<i>Botrytis fabae</i>	Vikev ( <i>Vicia</i> )
<i>Botrytis fabiopsis</i>	Vikev ( <i>Vicia</i> )
<i>Botrytis gladiolorum</i>	Mečík ( <i>Gladiolus</i> )
<i>Botrytis globosa</i>	Česnek ( <i>Allium</i> )
<i>Botrytis hyacinthi</i>	Hyacint ( <i>Hyacinthus</i> )
<i>Botrytis narcissicola</i>	Narcis ( <i>Narcissus</i> )
<i>Botrytis paeoniae</i>	Pivoňka ( <i>Paeonia</i> )
<i>Botrytis pelargonii</i>	Muškat ( <i>Pelargonium</i> )

<i>Botrytis polyblastis</i>	Narcis ( <i>Narcissus</i> )
<i>Botrytis porri</i>	Česnek ( <i>Allium</i> )
<i>Botrytis pseudocinerea</i>	Brukev ( <i>Brassica</i> ), jahodník ( <i>Fragaria</i> )
<i>Botrytis sinoallii</i>	Česnek ( <i>Allium</i> )
<i>Botrytis sinoviticola</i>	Réva ( <i>Vitis</i> )
<i>Botrytis sphaerosperma</i>	Česnek ( <i>Allium</i> )
<i>Botrytis squamosa</i>	Česnek ( <i>Allium</i> )
<i>Botrytis tulipae</i>	Tulipán ( <i>Tulipa</i> )
<i>Botrytis</i> sp. group S	Jahodník ( <i>Fragaria</i> ), réva ( <i>Vitis</i> )

Tabulka 1: Seznam druhů *Botrytis* nejvýznamnějších v zemědělství a zahradnictví (převzato z Fillinger & Elad 2016)

Zástupci rodu *Botrytis* způsobují u svých hostitelů různé choroby, tudíž je obtížné příznaky těchto chorob pouhým pohledem specifikovat a k dané chorobě přiřadit. Příznaky se projevují např. hnilobou květů, skvrnitostí listů nebo hnilobou kořenů a cibulí. Při izolaci v *in vitro* podmínkách je druhů možno morfologicky rozlišit, ale ve velkém množství případů je potřeba uchýlit se k molekulárním metodám. Identifikace patogenu je velmi důležitá pro volbu správné strategie v boji vůči chorobě, avšak postupy ochrany rostlin u některých druhů se podobají. Dále je po identifikaci patogenu důležité určit zdroje inokula sloužící k šíření houby (Garfinkel 2021).

### 3.2 *Botrytis cinerea* Pers.

*Botrytis cinerea* je aerobní patogen, který napadá více než 200 druhů různých rostlin po celém světě. Díky svému nektrotrofnímu způsobu života se *B. cinerea* stala důležitým modelem pro studium nektrotrofních hub na molekulární úrovni. Na trhu můžeme najít nepřeberné množství fungicidů k její redukci, ale řada z nich nemá vysokou účinnost díky její genetické plasticitě (Williamson et al. 2007). *Botrytis cinerea* má anaformní i teleomorfní stadium (dříve známé pod jménem *Botryotinia fuckeliana*) (Garfinkel 2021).

*B. cinerea* způsobuje chorobu zvanou šedá hniloba projevující se šedým nadýchaným myceliem, které je na povrchu napadených rostlinných tkání dobře viditelné a rozpoznatelné. Ztráty z výnosů se při napadení rostlin touto chorobou pohybují celosvětově kolem deseti miliard dolarů ročně. *B. cinerea* se v asexuálním stadiu šíří pomocí asexuálních spor, jež při styku s rostlinou klíčí za vzniku apresorií a pomocí tzv. penetration pegs pronikají skrze kutikulu do tkání. Houba produkuje enzymy a peroxid vodíku, kterými si pomáhá při průniku kutikulou a po průniku buněčnou stěnou z pektinu prorůstá. Buněčné stěny rostlin s nízkým obsahem pektinu jsou pro *B. cinerea* nevhodným substrátem, protože tato houba pro prorůstání skrze buněčné stěny produkuje pektinolytické enzymy, které se podílí na rozkladu pektinu. Dále produkuje celulózy a hemicelulózy, které rozkládají buněčné stěny a díky tomu houba získává živiny z buněčné stěny. Patogen produkuje velké množství sekundárních metabolitů, které nekrotizují rostlinné tkáně a pomáhají nekrotizaci pletiv hostitele. Po průniku *B. cinerea* do hostitele se v rostlinných pletivech tvoří primární léze a dochází k oxidaci prostředí nahromaděním radikálů, jež ústí v buněčnou smrt. Takto naprogramovaná buněčná smrt je pro nekrotrofy jako *B. cinerea* výhodná, protože prostředí se stává odolné vůči biotrofním

patogenů. Produkce malých molekul RNA způsobuje umlčování některých genů a tím dochází k potlačení imunitní reakce. Ochrana rostlin před *B. cinerea* tkví v použití kombinace fungicidů, odstranění napadeného a odumřelého rostlinného materiálu, snižováním vlhkosti během skladování a ve sklenicích. Nechemická ochrana pomocí antagonistických mikroorganismů při napadení květů a plodů se také jeví jako účinná (Boddy 2016).

### 3.2.1 Taxonomické zařazení

*B. cinerea* v dnešní době náleží do následujících taxonomických skupin (Rizvi & Raman 2017; Cheung et al. 2020):

- Doména: eukaryota
- Říše: *Fungi* (houby)
- Kmen: *Ascomycota* (vřeckovýtrusé)
- Podkmen: *Pezizomycotina*
- Třída: *Leotiomycetes* (voskovičkoplodé)
- Řád: *Helotiales* (voskovičkotvaré)
- Čeleď: *Sclerotiniaceae* (hlízenkovité)
- Rod: *Botrytis*

### 3.2.2 Životní cyklus

*B. cinerea* může žít dvěma způsoby – patogenně a saprofyticky. Přes zimu přežívá *B. cinerea* saprofyticky na širokém a různorodém spektru hostitelů a substrátů. Na vinicích po celém světě bylo objeveno několik zdrojů přezimujícího inokula v nekrotických pletivech révy vinné (Elmer & Reglinski 2006).

Životní cyklus *Botrytis* se skládá z několika fází – vegetativní somatické fáze, stadium mycelia, konidie, sklerocia a v kterých případech mikrokonidie (spermacia) (Beever & Weeds 2007). Teleomorfní stadium je výsledkem oplození zralého sklerocia mikrokonidiemi za vzniku apothecia, kde dochází tvorbě pohlavních askospor. *B. cinerea* se však rozmnožuje převážně nepohlavními konidiemi (mitospory) (Jackson 2014; Garfinkel 2021).

Konidie (makrokonidie) jsou myceliem produkovány při nepohlavním rozmnožování (Beever & Weeds 2007). Jsou na vzpřímených hyfách tzv. konidioforech (Jackson 2014). Konidiofory s konidiemi ukazuje Obrázek 1. Tvorba konidií se řídí přesně definovaným denním cyklem – iniciace, produkce a šíření. Tento cyklus je ovlivněn kolísáním teploty a vlhkostí. Rychlé snížení vlhkosti a zvýšení teploty způsobí zkroucení a vyschnutí konidioforů, což zapříčiní uvolnění konidií do vzduchu. (Williamson et al. 2007) Spory přežívají poměrně krátkou dobu a jejich životnost závisí na vlhkosti, teplotě, mikrobiální aktivitě a slunečním záření (Fillinger & Elad 2016). Konidie se dobře rozšiřují prouděním vzduchu a pomocí srážek. Šíření konidií kapkami deště je pro samotné konidie žádoucí, protože vyžadují vysokou vzdušnou vlhkost (Shaw et al. 2016) Tvorba konidií je stimulována určitými vlnovými délkami světla, ale někdy mohou sporulovat i ve tmě.



Obrázek 1: Konidiofor s konidiami (převzato z Giorbelidze et al. 2019)

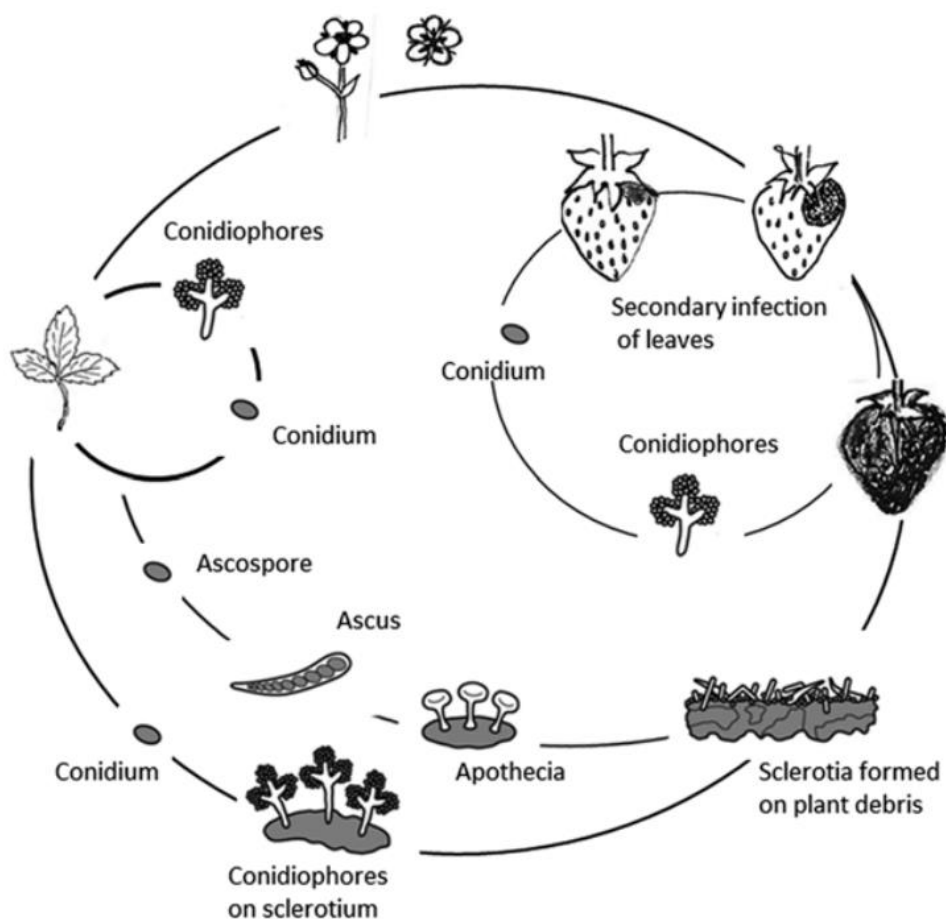
Sklerocium je klidové stadium vyvíjející se v nekrotických tkání hostitele a je také důležitým mechanismem přežití *B. cinerea*. Sklerocium je houbou produkováno během přezimování, tudíž je odolné vůči nepříznivým podmínkám prostředí. Během příznivých podmínek na jaře se sklerocium probouzí a klíčí. V tomto období produkuje konidiofory a s konidiami, což velmi pravděpodobně způsobuje napadení rostlin na začátku vegetačního období. *B. cinerea* také produkuje mikrokonodie ze stárnoucích mycelií figurující v pohlavním rozmnožování houby, a tudíž ke vzniku apothecií. Buněčná stěna obsahuje melanické pigmenty a medulární (dřeňové) hyfy, které obklopuje kontinuální matrice z  $\beta$ -glukanů. Vnitrobuněčnými rezervoáry živin jsou polyfosfáty, glykogen, lipidy a proteiny. Tvrdý povrch sklerocia obaluje vnitřní mycelium, které chrání před vysycháním, UV zářením nebo mikrobiálním napadením. Mycelium přežívá v odumřelých tkáních hostitele, ale i v semenech sloužící jako primární inokulum. Odumřelé listy, květy a plody vytrvalých plodin obsahující velké množství mycelia a bývají umístěny ve vyšších patrech plodin, odkud mohou lépe šířit konidie a iniciovat infekci (Williamson et al. 2007; Fillinger & Elad 2016). Tvorba sklerocií je obecně nejvíce spojována s působením v rostlinných tkáních, ale byl však prokázán vektorový vztah mezi muškou *Drosophila melanogaster* a *B. cinerea*. Konidie ze sklerocia „vyklíčily“ v hmyzím předžaludku, dále se přetransformovaly v mycelia a diferencovaly v mikrosklerocia. Mikrosklerocia mohou v mušce přežít a dále být hmyzem rozšiřována během celého jejího života. *Drosophila melanogaster* by mohla mít velký význam v zachování inokula *B. cinerea*, jelikož dospělci této mušky přezimují (Louis et al. 1996).

Apothecium je stadium vznikající ze sklerocia pohlavní cestou. Pohlavní cyklus zahrnuje spermatizaci sklerocia mikrokonidiami za vzniku apothecií a askospor. (Williamson et al. 2007). Expanduje do apikální a miskovité mnohobuněčné plodnice hyalinního až žlutohnědého zbarvení. Apothecium se většinou tvoří za časného jara, kdy ještě chladno a

vlhko, a půda je pokryta rozkládajícími se rostlinami. Vzácná pozorování mohou být částečně vysvětlena bledou barvou a malou velikostí tohoto stadia (Jackson 2014). Iniciace apothecií nebyla dosud důkladně prozkoumána a produkce apothecií u většiny plodin napadených *B. cinerea* je vzácná (Williamson et al. 2007).

Zástupci rodu *Botrytis* mohou vytvářet dočasná odpočívající stadia, tzv. chlamydozspory. Chlamydozspory najdeme ve stárnoucích kulturách a také ve stromatických částech hub, které jsou ve spojení se sklerocií a znečištěny jinými organismy. Vznikají přeměnou vegetativní myceliární části na terminální buňky a uvolňují se rozpadem hyf (Elad et al. 2004). Chlamydozspory mohou přežít velmi suchá a nepříznivá období několik měsíců. Za příznivých podmínek „klíčí“ a produkují mikrokonidie nebo hyfy (Fillinger & Elad 2016). Mechanismus infekce

Pro *B. cinerea* jsou důležitými infekčními vstupy květy hostitele, kde může napadat různé orgány květu v závislosti na hostiteli. Mechanismus napadení květu ukazuje Obrázek 2. Infekce květu černého rybízu se šíří skrze květní orgány, které jsou napadeny přes plodolisty nebo pestík. U hrušky nebo révy vinné však pestík nemusí být klíčovým místem průniku inokula. U hrušky jsou místem průniku tyčinky, zatímco u révy vinné infikují konidie květní lůžko a méně také bliznu. Konidie některých druhů hub *Botrytis* mohou pronikat přímo skrze nepoškozené tkáně nebo skrze přirozeně se vyskytující otvory (např. průduchy). Tento způsob infekce je typický pro druhy napadající listy jako nektrotrofní *B. squamosa*, který proniká např. do listů cibule skrze průduchy nebo kutikulu, kde tvoří léze na starých listech. Dále je také *B. cinerea* schopna pronikat skrze listy fazolu, švestkovými nebo nektarinkovými plody napřímo. V neposlední řadě konidie zástupců rodu *Botrytis* včetně *B. cinerea* pronikají do hostitele skrze poraněná pletiva, kde po průniku zůstávají v klidovém stádiu různě dlouho dobu, dokud nezačnou napadená pletiva orgánů hnit (Carisse 2016).



Obrázek 2: Životní cyklus *Botrytis* při napadení květu (převzato z Carisse 2016)

Mechanismus šíření houby začíná ulpěním konidie na povrchu hostitele. Konidie jsou přenášeny pohybem vzduchu a mohou urazit velké vzdálenosti, než ulpí na svém hostiteli. Po uchycení na povrchu konidie začne klíčit a vytvoří tzv. germ tube, které se změní v apresorium a dochází k penetraci tkání hostitele. Buňky pod povrchem vnější tkáně jsou nekrotizovány a dochází k tvorbě primárních lézí. V této fázi šíření může mít houba období klidu, ve kterém je její růst omezen. Období klidu je specifické u hostitelů náchylných v infekcích během kvetení. V určité, stadiu se začne houba rozrůstat do dalších pletiv. Dále dochází ke sporulaci a tvorbě inokula potřebné k dalšímu šíření. Za optimálních podmínek celý proces trvá 3-4 dny v závislosti na typu tkání hostitele. *B. cinerea* napadá velké rozpětí hostitelů, tudíž ne všechny níže popsané procesy jsou zahrnuty u každého mechanismu šíření této houby (Kan 2005).

Pro vypuknutí infekce je klíčové inokulum, protože jeho zdroje a množství významně ovlivňují nástup a průběh infekce, rychlost rozvoje a také ztráty na výnosech. Inokulum u hub rodu *Botrytis* lze rozdělit na primární a sekundární. Primární inokulum je to, které přežilo zimní období nebo mimo období sklizně a je schopné vyvolat infekci, zatímco sekundární inokulum zahrnuje dokončený první cyklus vývoje konidií (Carisse 2016). Konidie jsou u *B. cinerea* klíčovým zdrojem infekce a jsou ve velkých množstvích produkovány v nekrotizovaných tkáních hostitele. Při vysoké vlhkosti je klíčení konidií vyvoláno kombinací fyzikálních a chemických signálů. K tvorbě konidií dochází během zvýšené vlhkosti ovzduší a při vyšší vlhkosti nekrotizujících pletiv. Například u hroznů révy vinné dochází k tvorbě konidií při teplotách 10-30 °C a vlhkosti řádků po dobu nejméně tří hodin, zatímco u jahodníku je optimální teplota 18

°C na vlhkých mrtvých listech. Při průniku do pletiv hostitele dochází k tvorbě jednobuněčných apresorií, které nejsou morfologicky odlišeny a jsou oddělené dělicí přepážkou od zárodečné trubice. Schopnost apresorií *B. cinerea* se šířit může být přisuzována membránově se šířícímu regulačnímu proteinu tetraspaninu Pls1. Samotná apresoria usnadňují penetraci chemicky nebo mechanicky skrze rostlinné kutikuly a buněčné stěny (Dean et al. 2014; Carisse 2016). Dále existují další způsoby šíření infekce penetrační cestou pomocí vícebuněčných apresorií, tzv. infection cushions (Choquer et al. 2021). Nicméně ty jsou málo diferenciovány, tudíž je jejich průnik skrze neporušenou tkáň hostitele omezený a je tedy potřeba působení lytických enzymů nebo chitinsyntázových izoenzymů kvůli stabilitě buněčných stěn. Při průniku dochází k nekrotizaci tkání v důsledku produkce toxinů, které jsou významné v postupném usmrcování hostitele. Produkovanými toxiny jsou botrydial, deriváty kyseliny botcinové nebo peroxid vodíku (Dean et al. 2014).

Průnik do hostitele může být aktivního nebo pasivního charakteru. *B. cinerea* může infikovat poškozené místo kutikuly nebo místo, kde už jiná infekce probíhala, dále skrze průduchy nebo pronikat skrze neporušená pletiva. Přímý průnik skrze neporušená pletiva hostitele probíhá skrze kutikulu, která se skládá z kutinu, polyesteru hydroxylovaných a epoxidovaných C16-C18 mastných kyselin a vosku. K průniku nejspíše dochází působením lytických enzymů rozkládajících kutin – kutináza a lipáza. Proti kutináze byly vytvořeny monoklonální protilátky, které byly před inokulací aplikovány na květy gerber a došlo tedy ke snížení počtu vzniklých lézí. Dále byl vytvořen gen nahrazující gen kódující tvorbu kutinázy. Vzniklý mutant byl stejně virulentní jako jeho identická divoká forma na květech gerbery nebo plodech rajčat. Lze tedy vyvodit závěr, že samotná kutináza není k průniku kutikulou nezbytná. Lipáza je indukovatelná kutinem jablek nebo složkami kutikuly hroznů révy vinné. Tento enzym má odlišné kinetické vlastnosti než kutináza. Kdyby byly proti lipáze použity polyklonální protilátky před inokulací, germ tubes by nemohly kutikulu penetrovat. Tvorba mutanta neprodukcujícího tuto lipázu a stanovení jeho virulence může pomoci se stanovením nezbytnosti enzymu k penetraci do kutikuly hostitele (Kan 2005).

Po penetraci jsou buňky hostitele usmrceny dříve, než je napadnou hyfy samotné houby. Penetrací *B. cinerea* do buňky dochází ke kondenzaci jádra a poškození buněčných membrán, což v okolí hyf vyvolá programovanou buněčnou smrt. Programovaná buněčná smrt se jeví jako nezbytná pro úspěšné šíření infekce. *B. cinerea* produkuje proteiny nebo nízkomolekulární látky, které mohou mít přímý nebo nepřímý vliv na fytotoxickou aktivitu. Mezi tyto látky řadíme toxiny, kyselina šťavelová nebo reaktivní formy kyslíku. Mezi fytotoxické látky řadíme např. botcinolid nebo botrydial, což je tricyklický seskviterpen. Botrydial se v hostitelských pletivech hromadí ve fyziologicky významném množství a je tak důležitým faktorem při šíření infekce. *B. cinerea* produkuje kyselinu šťavelovou jak v *in vitro* podmínkách, tak v rostlinných hostitelích. Kyselina šťavelová může s vápníkem svého hostitele tvořit oxalátové krystaly a jeví se spíše jako kofaktorem šíření infekce než primárním fytotoxinem. Dále může stimulovat degradaci pektinu. Za reaktivní formy kyslíku považujeme superoxid, hydroxylový radikál a peroxid vodíku (Kan 2005). Rostlina reaguje na přítomnost reaktivních forem kyslíku programovanou buněčnou smrtí, která však může zvyšovat odolnost hostitele vůči patogenům, ale také podporovat virulenci houby (Rossi et al. 2017).



### 3.2.3 Sekundární metabolity

Vláknité houby jakoby *B. cinerea* produkují bioaktivní sloučeniny sekundárního metabolismu, kterým je důležité věnovat ze zemědělského a zdravotního hlediska pozornost. Mykotoxiny, jež patří mezi sekundární metabolity, mají vliv na růst a vývoj houby. Tyto sloučeniny většinou řadíme do skupin sloučenin jako terpeny, polyketidy, neribozomální peptidy, prenylované deriváty tryptofanu nebo jako směsi mezi těmito čtyřmi hlavními skupinami. U většiny sekundárních metabolitů produkovaných *B. cinerea* není dosud znám jejich biologický význam, ale je známa schopnost této houby produkovat pigmenty chránící houbu před UV zářením. Dalšími bioaktivními látkami jsou sloučeniny pomáhající přežít houbě v konkurenci s dalšími organismy, které mohou působit jako faktory virulence u rostlinných a živočišných hostitelů. Produkce sekundárních metabolitů může houbě lépe pomoci se adaptovat na daný substrát (Collado & Viaud 2016).

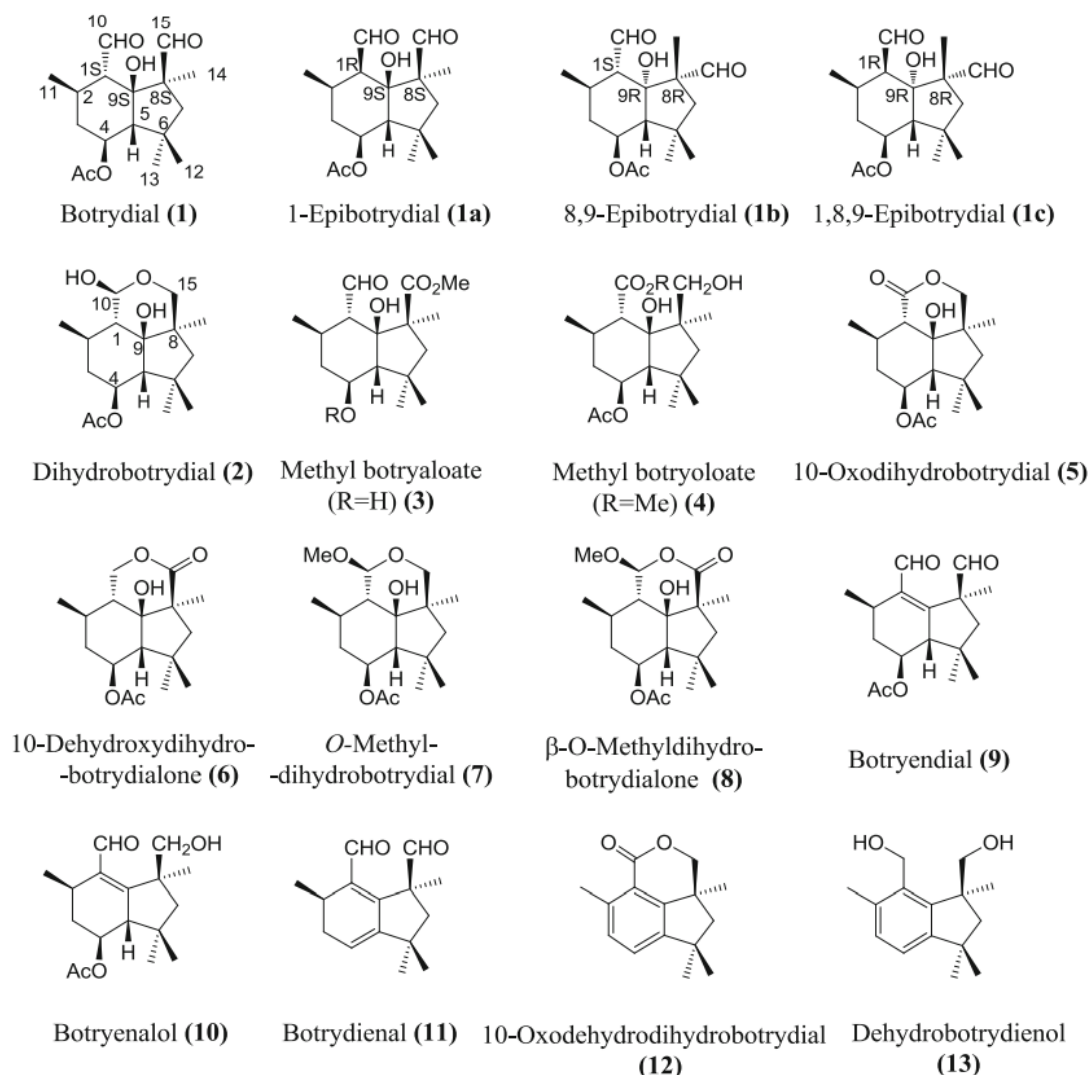
Dosud bylo identifikováno 44 genů kódující produkci enzymů (tzv. key enzymů; KE), které zodpovídají za biosyntézu sekundárních metabolitů. Mezi tyto enzymy řadíme terpenové syntázy, polyketidové syntázy (PKS), neribosomální peptidové syntázy (NRPS), hybridy PKS-NRPS a dimethylallyltryptofansyntázy (DMATS). Počet těchto genů vypovídá o schopnosti *B. cinerea* produkovat více než 40 druhů sloučenin. Rozsah produkce sekundárních metabolitů musí být pro *B. cinerea* specifický, neboť méně než polovina KE je podobná s KE houbou druhu *Sclerotinia sclerotiorum*. Tato houba je blízké příbuzná *B. cinerea* a působí obdobně nekrotrofně a polyfágně (Amselem et al. 2011). Zatím nebylo možné identifikovat určité geny zodpovědné za biosyntézu jednotlivých sekundárních metabolitů. Některé fylogenetické studie odhalily, že jen několik KE jsou mezi houbami široce rozšířeny. Mezi ně patří PKS zodpovídající za biosyntézu melaninu nebo NRPS zodpovídající za biosyntézu sideroforů. Mimo jiné genom *B. cinerea* obsahuje ještě další klastr genů řídicí, kterému je přisuzována zodpovědnost za produkci paxilinu. Tato skutečnost naznačuje, že dále může docházet k biosyntéze indol-diterpenů, které působí toxicky při ochraně houby před hmyzem (Collado & Viaud 2016).

*B. cinerea* produkuje dva typy sekundárních metabolitů působících fyto toxicky - seskviterpeny botryanového typu a polyketidy. Mezi terpeny můžeme zařadit kyselinu abcisovou, botrydial nebo dihydrobotrydial, zatímco mezi polyketidy řadíme kyselinu botcinovou, botcinerovou, botcininy (cyklické formy), cinbotolidy A a B nebo botrylakton. Výše zmíněné sekundární metabolity způsobují chlorózu buněk a jejich následný kolaps (Ripardo-filho et al. 2023). Nejviditelnějším sekundárním metabolitem *B. cinerea* způsobující šedou hnilobu je melanin, který dává typickou barvu této infekci. Tato sloučenina také chrání konidie a sklerocia této houby před UV zářením (Doss et al. 2003). Ve stresových podmínkách, jako je intenzivní osvětlení může mít mycelium oranžové zbarvení, což může způsobovat produkce karotenoidů. Karotenoidy jsou pigmenty, které jsou u rostlin a hub často produkovány na ochranu před oxidačním stresem. Při sekvenování genomu byly identifikovány klastry genů kódující enzymy, které se podílejí na biosyntéze karotenoidních enzymů – fytoendehydrogenázu a fytoensyntázu (Collado & Viaud 2016).

Botrydial je jedním z hlavních metabolitů *B. cinerea*, který je hlavním původcem příznaky infekce. Biosyntetický genový klastr botrydialu se skládá ze sedmi genů - Bcbot1 až Bcbot7. Bcbo2 kóduje produkci seskviterpenové cyklázy, Bcbot5 acetyltransferázu a Bcbot1,

Bcbot3 a Bcbot4 kódují produkci tří dalších enzymů, které jsou specifické pro sekundární metabolismus vláknitých hub. Bcbot6 kóduje transkripční faktor  $Zn(II)_2Cys_6$  a Bcbot7 dehydrogenázu. Gen Bcbot2 kóduje enzym seskviterpencyklázu, která má na starost cyklizaci farnesyldifosfátu (FDP) v biosyntéze botrydialu. Přeměna FDP na tricyklický alkohol presilphiperfolan-8-ol (PSP) nebo probotryan-9 $\beta$ -ol prokazuje biochemickou funkci tohoto genu. Dále jsou do procesu zapojeny enzymy acyltransferáza a tři cytochrom P450 monooxygenázy kódované geny Bcbot 1, 3 a 4. Gen Bcbot5 kóduje enzym zodpovídající za přenos acetylové skupiny do probotryanů v závěrečné fázi biosyntézy. Transkripční faktor  $Zn(II)_2Cys_6$  zodpovídá za regulaci celého toxinového klastru genů a dehydrogenáza se podílí na přeměně botrydialu na dihydrobotrytial. Bcbot6 je tedy významným regulátorem syntézy botrydialu a hraje významnou roli i v životním cyklu *B. cinerea* (Ripardo-filho et al. 2023).

Vznik botrydialu a jeho různých derivátů závisí na podmínkách prostředí, při kterých houba roste (např. pH). Biochemické studie ukazují detailní informace o biosyntéze botrydialu a jeho deriváty z FDP. Běžně se vyskytují sloučeniny s různým oxidačním stupněm na desátém a patnáctém uhlíku. Velké množství karboxylových kyselin byly izolovány jako jejich methylestery nebo laktony. Podrobným zkoumáním fermentace a dehydratací bylo izolováno velké množství dalších derivátů. Dehydrogenací např. botryendialu vznikají aromatické sloučeniny. Výčet některých významnějších derivátů botrydialu ukazuje Obrázek 3. Díky botrydialu a kyselině botcinové je *B. cinerea* schopná napadat velké množství buněk rostlin a tím také využít pro svou výživu jejich mrtvá pletiva. Koncentrace botrydialu okolo 100 ppm způsobí, že ho houba přemění pro ni na méně toxické sloučeniny jako je např. dihydrobotrydial. Toxicita botrydialu a jeho derivátů není jen vůči rostlinám a byla prokázána vůči lidským buňkám (Collado & Viaud 2016).



Obrázek 3: Botrydial a jeho deriváty (převzato z Carisse 2016)

Kyselina abscisová je běžným rostlinným hormonem, který se podílí na biologických procesech jako dormance nebo stres a imunitě rostlin. Tuto sloučeninu může také produkovat malé množství hub včetně *B. cinerea*. V *in vitro* podmínkách *B. cinerea* produkuje velmi malá až zanedbatelná množství kyseliny abscisové. Pro získání průmyslových kmenů k produkci kyseliny abscisové k agronomickým účelům byla provedena genetické úpravy. Výsledkem byly „vylepšené“ kmeny jako např. ATCC 58025, které mají narušenou schopnost tvorby konidií a sklerocií, ale ve fermentorech produkují více než 6 g/l kyseliny abscisové. Biosyntéza kyseliny abscisové vychází z cyklizace FDP a následné oxidace. Byl identifikován genový klastr (Bcaba1 až Bcaba4) zodpovídající za následné oxidační kroky, ale ani jeden z příslušných genů nekóduje enzym seskviterpencyklázu cyklizující FDP (Izquierdo-Bueno et al. 2018). Suárez et al. 2022 resekvenovali genom kmene *B. cinerea* B05.10, přičemž byly objeveny nové geny podílející se na sekundárním metabolismu této houby. Jedním z těch to genů je i Bcstc7, který kóduje biosyntézu seskviterpencyklázy. Dále bylo identifikováno 5 genů kódujících seskviterpencyklázu kompletním sekvenováním kmene ATCC 58025 produkujícího kyselinu abscisovou. Také byl objeven gen Bcstc5/Bcaba5 nacházející se na chromosomu 1 u kmene

B05.10 kóduje, který kóduje produkci seskviterpencyklázu. Tento enzym cyklí FDP na 2Z,4E- $\alpha$ -ionyliden-etan. Na základě této skutečnosti se zdá, že genový klastř kódující biosyntézu kyseliny abscisové se skládá z pěti genů (Ripardo-filho et al. 2023). Dosud není důkaz, že kyselina abscisová produkovaná *B. cinerea* ovlivňuje interakce mezi touto houbou a jejími hostiteli (Viaud et al. 2016).

Další významnou skupinou toxických sloučenin představují vysoce hydroxylované nonalaktonové polyketidy – botcinolidy. Biosyntéza kyseliny botcinové a botcininů vyžaduje působení dvou enzymů PKS, které jsou kódovány geny Bcboa6 a Bcboa9. Během studií exprese 20 různých genů při sekvenování genomu kmene B05.10 právě jen tyto dva geny vykazovaly vyšší roveň exprese. Dále bylo zjištěno, že tyto dva geny kódují produkci kyseliny botcinové a její deriváty společně. Byla navržena i existence genového klastř kódující biosyntézu kyseliny botcinové u *B. cinerea*, který je tvořen sedmnácti geny (Bcboa1 až Bcboa17). Další studie zjistily skutečnost, že gen BcBoa13 a transkripční faktor Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> hrají důležitou roli v expresi ostatních genů Bcboa1 až Bcboa12 a produkci kyseliny botcinové (Ripardo-filho et al. 2023). Botcininy a botrylaktony jsou příbuzné polyketidy sdílející identickou strukturu mezi prvním a osmým uhlíkem. Botrylaktony jsou skupinou látek, které mají laktonový skelet se dvěma oxiranovými můstky (Collado & Viaud 2016).

Melaniny jsou z chemického hlediska velmi rozmanitou skupinou látek zahrnující polymerní amorfní sloučeniny různých struktur. Velké množství vřeckovýtusých hub produkuje 1, 8-dihydroxynaftalenové (DHN) melaniny, které jsou houbami syntetizovány polyketidovými enzymy (Zhou et al. 2022). DHN-Melanin dihydroxynaftalenového (DHN) typu je pigmentem produkovaným druhem *B. cinerea* (Chamilos & Carvalho 2020). Tento pigment dává šedé hnilobě typické šedé zbarvení, dále šedě zbarvuje konidie a sklerotia. DHN-melanin je mezi houbami nejprodukovanějším polyketidem a je také významným KE. Geneticky je biosyntéza DHN-melaninu pravděpodobně kódována geny Bcpcs12 a Bcpcs13. Gen Bcpcs13 tvoří klastř se dvěma dalšími geny, které kódují biosyntézu dalších dvou enzymů podílejících na syntéze melaninu - scytalondehydratázu (Bcscd1) a hydroxynaftalenemreduktázu (Bcbrn2) (Collado & Viaud 2016). Syntéza melaninu vychází z acetátu, který je pomocí PKS přeměněn na 1,3,6,8-tetrahydroxynaftalen (T4HN) nebo 2-acetyl-1,3,6,8-tetrahydroxynaftalen (AT4HN), který je také následně pomocí yellowish-greenhydrolázou 1 (YGH1) přeměněn na T4HN. T4HN je dále posupně pomocí enzymů redukován a dehydratován na různé meziprodukty jako scytalon, 1, 3, 8-trihydroxynaftalenu (T3HN) nebo monomer DHN. Monomery DHN jsou lakázou polymerizovány oxidačními reakcemi na DHN-melanin (Zhou et al. 2022). Jak bylo výše zmíněno, melanin chrání houbu před UV zářením a je také součástí buněčných stěn houby, čímž se podílí na vzniku a udržení houbové struktury (Collado & Viaud 2016).

Bikaverin je červený pigment, který produkuje jen velmi malé množství kmenů *B. cinerea*. Tento pigment byl dříve popsán jen u houby *Fusarium fujikori* a jejích příbuzných druhů (Collado & Viaud 2016). Bikaverin je z chemického hlediska polyketidem s tetracyklickou benzoxantonovou strukturou, která vzniká činností specifické PKS první třídy a následným působením enzymů monooxygenázy a *O*-methyltransferázy (Limón et al. 2010). Horizontálním přenosem genů z hub rodu *Fusarium* získala *B. cinerea* klastř šesti genů (bik1-6) potřebných pro biosyntézu bikaverinu. Tento genový klastř se u různých druhů *Botrytis* rozpadá na sobě nezávislými mutacemi nebo delecemi. Právě většina kmenů *B. cinerea* přichází

o schopnost produkovat bikaverin díky ztrátě genu *bik1* kódující produkci enzymu PKS a mutací ve dvou dalších genech. Dosud nebylo objeveno, proč jen velmi malému množství hub zůstává tato schopnost. Jedním z důvodů může být dodatečná ochrana mycelia před UV zářením u těchto druhů hub. Bikaverin se také chová toxicky k prvokům, hlísticím, oomycetám a vřecovýtrosým houbám (Collado & Viaud 2016). Tento mykotoxin může při kontaminaci zemědělských produktů přinést člověku závažné zdravotní problémy, ale dosud neexistují nějaké konkrétní zprávy o jeho negativním účinku na lidské zdraví z kontaminovaných produktů (Limón et al. 2010).

### 3.2.4 Šedá hniloba

Šedá hniloba je choroba způsobující vyznačující se předsklizňovou a posklizňovou hnilobou různých druhů rostlin, po celém světě. Příčinou vzniku této choroby je houba *B. cinerea* a vyznačuje se měkkou a vodnatou hnilobou (Zoffoli & Latorre 2011).

Napadení zemědělských plodin houbou *B. cinerea* má různé symptomy, které se špatně zobecňují na určité rostlinné orgány nebo pletiva. Objevují se měkké hniloby, které se vyznačují nasáknutím vodou a rozpadem parenchymatických pletiv. Poté dochází k rychlé tvorbě velkého množství konidií, což je nejtypičtějším symptomem infekce listů a měkkých plodů. Plody mající silnější dužinu vykazují vodou nasáklá šedavá pletiva až při rozkrojení. Infekce u spousty druhů ovoce a zeleniny začíná napadením květu a tato infekce se dále šíří jako měkká hniloba postihující vyvíjející se plody (cukety, okurky, francouzské fazole, jahody nebo jablka). Na okvětních lístcích se symptomy objevují postupně – od malých skvrnek po rozvinutou měkkou hnilobu. K největšímu šíření infekce ve skleníku pěstovaných rajčat dochází při řezném nebo jiném poškození stonku, kde se může infekce šířit celým stonkem. Měkká hniloba zralých plodů rajčat se objevuje hlavně po sklizni. U nezralých rajčat se může objevit skvrnitost, která je znakem účinné obrany hostitele a která způsobuje, že také rajčata jsou neprodejná. Přenos infekce napadenými semeny byla zaznamenána u více než padesáti hostitelů, např. u lnu, slunečnice nebo salátu (Williamson et al. 2007).

Šedá hniloba brukvovitých je významným problémem zejména při skladování bílého zelí, neboť způsobuje velké skladovací ztráty. Prvními příznaky napadení je výskyt hnědých skvrn na listech a stoncích, posléze jsou napadena pletiva měkkou hnilobou, až dochází k odumření tkáně a deformaci rostliny nebo jejímu celkovému odumření. Patogen přežívá na rostlinných zbytcích na poli a v půdě ve stadiu sklerocia. Optimální podmínky pro šíření infekce je teplota v rozmezí 10-20 °C, vlhký povrch pletiv a vysoká vzdušná vlhkost. Ochrana plodin tkví ve sklizni nepřežralých plodin, minimalizaci poškození plodin při sklizni, skladování plodin v suchém prostředí a sklízet před příchodem mrazů (Kocourek et al. 2022).

Šedá hniloba salátu patří do souboru onemocnění s obecným názvem podehnívání salátu, které mohou způsobovat i jiné patogenní organismy např. *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* a *S. minor*. Symptomy onemocnění jsou hnědnutí a hniloba kořenového krčku, následné žloutnutí a vadnutí vnějších listů. Objevuje se typické šedě zbarvené mycelium, většinou doprovázené vzniklými sklerocii. *B. cinerea* přežívá v půdě ve stadiu sklerocii nebo na zbytcích na poli ve stadiu mycelia. Optimální podmínky pro rozvoj choroby je teplota okolo 20 °C a vysoká vzdušná vlhkost. Ochrana plodin tkví buď v prevenci střídání plodin, pěstování odolnějších odrůd, zamezení kolísání teplot, nepřehnojování dusíkem nebo včasná likvidace

napadených rostlin. Chemická ochrana rostlin může být provedena použitím fenhexamidu, boscalidu s pyraclostrobinem nebo iprodionem (Kocourek et al. 2022).

Šedá hniloba rajčat a paprik způsobuje vysoké ztráty uvedených plodin. Patogen napadá všechny nadzemní části rostliny a šíří se skrze stárnu a odumírající tkáň. Dochází k tvorbě vodnatých kruhových skvrn na poraněných listech a plodech, řapících a stoncích. Patogen může infikovat i květenství, neboť vadnoucí květy jsou choulostivé k napadení. Při napadení květenství může *B. cinerea* způsobit hniloby samotného květenství a přežít v něm nebo následně způsobovat hnilobu plodů. Na plodech se mohou buď objevit ohraničené bělavé kruhové prstýnky, které jsou pouze kosmetickou vadou, nebo se mohou vytvořit bělavé, světle hnědé až šedé kruhové léze kolem stopky (závažnější forma hniloby). Posléze dochází k nekrotizaci pletiv a výskytu šedého mycelia. Patogen může krátkodobě přežít ve formě konidií, ale ve formě sklerotí nebo mycelia může přežít v půdě několik let. Optimálními podmínkami rozvoje choroby jsou deštivé počasí, husté porosty nebo přehnojení dusíkem. Ochrana plodin tkví v použití fungicidů takovým způsobem, aby nedocházelo k vytvoření rezistence. Dále je možné pro ochranu použít UV záření v krátkodobých aplikacích na plodinu (Kocourek et al. 2022).

Botrytiová kališní hniloba jablek u náchylných odrůd jablek (např. Idared nebo Jonagold) způsobuje ve vlhkých podmínkách v před sklizňovém a sklizňovém období významné poškození plodů. Choroba se projevuje postupně se zvětšujícími červenými skvrnami u kalichu, které postupně hnědnou. Hniloba nejprve postupuje pár centimetrů pod povrch a napadená tkáň je měkká a vodnatá. Po čase zasychá a dužina kolem místa nekrotizuje. Před samotnou sklizní napadené plody odpadnou a u choulostivých odrůd se může infekce projevit i během skladování. K šíření infekce může docházet už po napadení květenství, dále se choroba šíří i na zrající plod a projevuje se i během skladování jablek. Optimální podmínky pro rozvoj choroby je kvetení v deštivém období u citlivých odrůd. Preventivním opatřením proti výskytu choroby je zajištění vzdušné, nehumidní koruny, nicméně u náchylných odrůd je i přesto třeba napadení očekávat. Chemickými prostředky k potlačení infekce jsou thiram, pyrimethanil nebo boscalid a ošetření se provádí ve fázi, kdy jsou vytvořena květenství (Kocourek et al. 2015).

Šedá hniloba jahod patří mezi nejvýznamnější chorobu jahodníku, kdy dochází k poškození plodů. Choroba napadá květenství jahodníku, tudíž rostlina nevytváří plody a dochází tak ke ztrátovým výnosům. Napadení můžeme pozorovat dále i na květech, řapících a listech. Nezralé plody během rozvoje infekce hnědnou a usychají, zatímco na zrajících a zralých plodech se objevuje měkká hniloba. Dále se objevuje šedostříbrný až tmavě šedý povlak s konidiemi. Napadený list má velké šedohnědé okrouhlé skvrny, které se postupně rozšiřují. Protáhle skvrny se objevují na stoncích a řapících, zatímco infikovaná květenství hnědnou a odumírají. Patogen přežívá v odumřelých nekrotizovaných pletivech jako saprofyt nebo jako patogen ve formě mycelia v infikovaných zelených rostlinách. Optimální podmínky pro rozvoj choroby jsou vlhký povrch listů, vysoká vzdušná vlhkost a teploty kolem 20 °C. Houba se rozšiřuje v deštivém počasí už od dubna a k dalšímu šíření dochází během dozrávání plodů. Ochrana rostlin z preventivního hlediska tkví v pěstování umožňující vzdušnost a rychlé osychání rostlin. Dále je dobré vyvarovat se pěstování náchylných odrůd. Chemická ochrana tkví v použití přípravků jako pyrimethanil, boscalid, fenhexamid nebo cyprodinil a provádět postřik již na počátcích rozvoje květenství. Střídání přípravků s rozdílným mechanismem účinku může zabránit vytvoření rezistence (Kocourek et al. 2015).

### 3.2.5 Ochrana rostlin před patogenním působením *B. cinerea*

K rozvoji infekce *B. cinerea* dochází obvykle před sklizní plodin a může se objevit během skladování. Preventivní aplikace fungicidů proti šedé hnilobě se doporučuje a spočívá v polní aplikaci během vegetačního cyklu plodin. U stolních hroznů jsou fungicidy aplikovány na konci kvetoucí fáze, na samotné hrozny v průběhu zrání a na hrozny nejpozději tři týdny před sklizní. Na jahodník se fungicidy aplikují v období kvetení v několika opakujících se cyklech a v závislosti na podmínkách prostředí.

Syntetické fungicidy používané na ochranu před *B. cinerea* můžeme rozdělit do několika skupin podle biochemického účinku – ovlivňující funkci dýchání, funkci mikrotubulů, osmoregulaci, biosyntézu methioninu nebo sterolu. Anilinopyrimidy, kam patří cyprodinil, mepanipyrim nebo pyrimethanil, inhibují biosyntézu methioninů a hydrolytických látek. Boskalid náleží do skupiny pyridin-karboxamidů a který u houby inhibuje sukcinátdehydrogenázu. Dochází k inhibici syntéz buněčných membrán, růstu mycelia a klíčení spor a sporulaci. Podobným účinkem působí i fluopyram, který náleží do skupiny pyridinyl-ethyl-benzamidový fungicid. Fenhexamid a fenpyrazamin náleží do skupiny hydroxyanilidů a narušují syntézu ergosterolu a sterolů. Imidazoly, triazoly, morfolin a další fungicidy jsou dalšími skupinami sloučenin inhibujících syntézu sterolů a jsou běžně používané v konvenčním zemědělství. Syntéza sterolů je nezbytná k tvorbě buněčných membrán a růstu mycelia. Iprodion patří do skupiny dikarboxymidiů a zabraňuje klíčení spor a růstu mycelia inhibicí syntézy DNA a RNA. V souvislosti s ochranou plodin proti *B. cinerea* došlo k rozvoji rezistence houby vůči fungicidům. Použití některých z nich bylo omezeno nebo zakázáno v souvislosti boje proti rezistenci (Romanazzi & Feliziani 2014). Dalším problémem spojeným s používáním syntetických fungicidů je účinek chemikálií a jejich reziduí na lidské zdraví. Tento fakt vede k požadavku na snižování expozice dané chemikálie na lidi a životní prostředí (Romanazzi & Droby 2016).

V návaznosti na problematiku škodlivosti chemikálií a jejich reziduí nebo používání v organickém zemědělství dochází k vývoji a použití alternativních a šetrnějších technologií s cílem zachování kvality a prodloužení skladovatelnosti plodin. Tyto technologie lze rozdělit do čtyř skupin – microbial bicontrol agents (BCA), antimikrobiální látky přírodního původu, dezinfekční a fyzikální prostředky. BCA jsou mikrobiální antagonisté, mezi které patří kvasinky a různé bakterie. Ti se přirozeně vyskytují na povrchu plodin a inhibují tak rozvoj posklizňových patogenů. Častým cílem BCA je regulace negativního působení *B. cinerea*. Mezi BCA vykazujícími účinností vůči *B. cinerea* patří např. kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia angusta*, *Wickerhasmomyces anomalus* nebo bakterie *Pseudomonas syringae* nebo *Bacillus subtilis*. Výše uvedené mikroorganismy jsou součástí komerčních produktů pro regulaci *B. cinerea*, jejichž výsledky použití vypadají slibně. Registrace nových produktů je však velmi nákladná, a proto je počet registrovaných BCA na ochranu rostlin nízký. Nicméně společnosti vyrábějící syntetické fungicidy mají zájem také ve svém portfoliu výrobků nabízet i BCA (Romanazzi & Feliziani 2014; Romanazzi & Droby 2016).

Dezinfekční prostředky se používají ke sterilizaci povrchu ovoce především při balení ovoce po sklizni. Mezi tyto sloučeniny patří ethanol, kyselina octová nebo elektrolyzovaná oxidační voda. Kyselina octová a ethanol se projevují jako účinné fumiganty při preventivní aplikaci proti hnití stolních hroznů, zatímco elektrolyzovaná oxidační voda působí účinně

v balírnách, kde se snižovala kontaminaci plodin konidii patogenů, zejména *B. cinerea*. Fyzikálními prostředky je míněno použití UV-C záření, ozónu, CA/MA, hypobarické nebo hyperbarické ošetření. Výhodou těchto prostředků je vyvarování se přímého kontaktu s plodinou (Romanazzi & Droby 2016).

V ochraně rostlin mají významné využití i silice z rostlin, různé těkavé organické sloučeniny nebo materiál organického původu. Během laboratorních pokusů se významně jevíly v regulaci infekce způsobené *B. cinerea* těkavé sloučeniny jako acetaldehyd, benzaldehyd, benzylalkohol, methylsalicylát, lipoxygenázy, glukosinoláty nebo isothiokyanáty. Jejich účinnost je však třeba otestovat ve velkých a komerčních postupech, ve kterých je třeba ještě najít správné koncentrace působící proti patogenům a nepoškozujícím lidské zdraví a životní prostředí (Romanazzi & Droby 2016). Silice jsou produkovány aromatickými rostlinami a jsou směsí široké škály těkavých sloučenin a jejich sekundárních metabolitů. Spousta těchto sloučenin má vysokou biologickou aktivitu a jsou velmi významné v ochraně rostlin díky svým antibakteriálním, antimykotickým (vč. fungicidním), antioxidačním, insekticidním, nematocidním a herbicidním účinkům (Antunes & Cavaco 2010; Raveau et al. 2020).

### 3.3 Silice

Termín silice je podle Mezinárodní organizací pro standardizaci (ISO) definován jako produkt rostlinného původu získaný destilací vodou nebo vodní párou, mechanicky nebo suchou destilací z oplodí citrusů. Silice se skládají z vysoce těkavých látek sekundárních metabolitů rostlin a lipofilních látek, které lze fyzicky získat z různých částí rostlin nebo různých rostlinných pletiv (Turek & Stintzing 2013). Do dnešní doby bylo identifikováno více než tři tisíce různých silic (Raveau et al. 2020).

Silice jsou mnoho staletí společností využívány pro své fungicidní, virucidní, baktericidní, antiparazitární nebo insekticidní účinky v lékařské, kosmetické a farmaceutické praxi a také v zemědělství a potravinářském průmyslu (Bakkali et al. 2008). Silice mají velký význam v ochraně rostlin proti různým škůdcům a patogenům a zprostředkovávají interakci rostlin s okolním prostředím. Mají schopnost odpuzovat nežádoucí hmyz nebo naopak určitý hmyz přitahovat za účelem rozptýlení pylu nebo semen (Nazzaro et al. 2013). Více než 300 druhů silic je komerčně využíváno v kosmetice, aromatických přípravcích nebo potravinářském průmyslu (Raveau et al. 2020).

#### 3.3.1 Chemické složení silic

Velké množství rostlin obsahuje silice, které mají široké spektrum biologických a farmakologických vlastností (de Martino et al. 2009). Rostlinné silice jsou většinou těkavé kapaliny čirého a barevného charakteru. Jsou rozpustné v lipidech a organických rozpouštědlech s nižší hustotou než voda (Nazzaro et al. 2013). Chemickou analýzou můžeme v jednotlivých silicích identifikovat až 400 různých sloučenin, v některých případech i více pokud máme k dispozici vhodné a dostatečně citlivé detekční metody (de Groot & Schmidt 2016). Z chemického hlediska můžeme sloučeniny obsažené v silicích rozdělit do dvou skupin – těkavé a netěkavé. Těkavá část tvoří 90-95 % silice a nejčastěji obsahuje terpeny, terpenoidy



a kyslíkaté deriváty. Netěkavá část zabírá zbylou část a nejčastěji obsahuje mastné kyseliny, uhlovodíky, steroly, vosky, flavonoidy a karotenoidy (Hanif et al. 2019). Chemické složení silic se druhově liší, dále se liší dle země původu, výrobce nebo roku výroby. Faktory ovlivňující chemické složení jsou:

- druh a typ výskytu rostliny (pěstované nebo planě rostoucí rostliny),
- prostředí (podnebí, půdní podmínky a výživa rostlin),
- sklizeň, predestilace (předběžná úprava biomasy a podmínky skladování),
- způsob produkce (komerční olej nebo laboratorně vyrobený olej),
- destilace
- další parametry (podmínky a doba skladování, stáří silice, oxidace a působení ultrafialového záření) (de Groot & Schmidt 2016).

### 3.3.1.1 Terpeny a terpenoidy

Terpeny mají uhlíkatý řetězec, který je možné pomocí enzymů cykláz přetransformovat do cyklických struktur. Tím vznikají monocyklické nebo bicyklické struktury. Terpeny jsou syntetizovány v cytoplazmě rostlinných buněk z izoprenových jednotek. Syntéza probíhá přes kyselinu mevalonovou z acetyl-CoA (Caballero et al. 2003). Terpenoidy jsou odvozené od terpenů s jednou nebo více funkční skupinou (alkoholovou, aldehydovou, ketonovou nebo karboxylovou). Dosud bylo popsáno více jak 30 000 terpenů, které se dělí do skupin dle počtu izoprenových jednotek na monoterpeny ( $C_{10}H_{16}$ ) a seskviterpeny ( $C_{15}H_{24}$ ). Dále se mohou vyskytovat např. diterpeny ( $C_{20}H_{32}$ ), triterpeny ( $C_{30}H_{48}$ ) nebo tetraterpeny, které obsahují osm izoprenových jednotek (Bayala B et al. 2014). Sloučeniny, které náleží mezi terpeny, jsou *p*-cymen, limonen, terpinen, sabinen a pinen (Hyldgaard et al. 2012).

Monoterpeny se nacházejí v silicích různých rostlin, kde se podílejí na aroma a chuti dané rostliny. Mají acyklickou, mono nebo bicyklickou strukturu a jsou syntetizovány z geranylpyrofosfátu monoterpensyntásami. Geranylpyrofosfát je důležitým substrátem pro syntézu farnesylpyrofosfátu a geranyl-geranylpyrofosfátu, které jsou důležitými složkami v metabolismu buněk u živočichů, rostlin i kvasinek (Loza-Tavera 1999). Monoterpeny jsou uloženy v trichomech listů a žlázách rostlin. Rostliny obsahují monoterpeny k obraně proti býložravcům a patogenům. Nejen, že tyto toxické terpeny způsobují značný diskomfort při požití, ale zároveň působí i na mitochondriální enzymy. Obsah monoterpenů v listech závisí na konkrétní rostlině a podmínkách prostředí (např. teplota má obecně vliv na rychlost evaporace). Monoterpeny jsou sekundárními metabolity rostlin, které zprostředkovávají reakce rostlin na různé stresové faktory. Jedle velká (*Abies grandis*) utěšňuje místo poranění tvrdnoucí směsí složenou z pryskyřice, monoterpenů a seskviterpenů. Mořská červená řasa (*Ochtodes secundiramea*) produkuje acyklický monoterpen myrcen, který má cytotoxické účinky, tudíž živočichové se konzumaci této řasy vyhýbají (Chern et al. 2013). Mezi důležité monoterpeny patří geraniol, thymol, myrtenal, pinen, kafr, borneol a jejich deriváty (Zielińska-Błajet & Feder-Kubis 2020).

Terpenoidy (též isoprenoidy) patří mezi terpeny, které prochází enzymatickou modifikací přidáním molekul kyslíku a přesunem nebo odstraněním methylových skupin (Hyldgaard et al. 2012). Klasifikace terpenoidů se odvíjí od počtu uhlíků a struktury. Struktura terpenoidů vychází z isoprenu (2-methylbuta-1,3-dien). Lineárně uspořádané izoprenové jednotky se cyklí

a dochází tedy k přeskupení celého uhlíkového skeletu dle izoprenového pravidla. Klasifikaci terpenoidů ukazuje Tabulka 2 (Ludwiczuk et al. 2017). Mezi známé terpenoidy patří thymol, karvacrol, linalool, linalylacetát, citronellal, piperiton, mentol a geraniol. Terpenoidy vykazují antimikrobiální aktivitu, která souvisí s jejich funkčními skupinami. Hydroxylové skupiny fenolických terpenoidů a přítomnost delokalizovaných elektronů jsou základem pro antimikrobiální působení. Antimikrobiální aktivita derivátů karvakrolu je mnohem nižší než u samotného karvakrolu. Tento fakt vysvětluje skutečnost, že karvakrol obsahuje hydroxylovou skupinu a u derivátu dochází k výměně této funkční skupiny např. za methyletherovou skupinu. Tato náhrada ovlivňuje antimikrobiální aktivitu, hydrofobnost a interakci molekul s membránami. Samotná hydroxylová skupina však není nezbytná pro antimikrobiální aktivitu karvakrolu (Hyldgaard et al. 2012).

Název	Počet isoprenových jednotek	Počet uhlíků	Sumární vzorec
Hemiterpenoidy	1	5	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>
Monoterpenoidy	2	10	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
Sesquiterpenoidy	3	15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Diterpenoidy	4	20	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>
Sesterpenoidy	5	25	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub>
Triterpenoidy	6	30	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>
Karotenoidy	8	40	C <sub>40</sub> H <sub>64</sub>
Polyterpenoidy	Více jak 8	Více jak 40	(C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ) <sub>n</sub>

Tabulka 2: Klasifikace terpenoidů (převzato z Ludwiczuk et al. 2017)

### 3.3.1.2 Další chemické sloučeniny

Aromatické sloučeniny silic jsou fenylypropanové deriváty, které se v silicích vyskytují v menším množství než terpeny a můžeme je rozdělit do dvou skupin podle způsobu připojení na benzenové jádro. Jedním způsobem je připojení substituentu přímo na benzenové jádro a druhým substituce v postranním řetězci (Bayala B et al. 2014). Aromatické sloučeniny působí obdobně jako monoterpenoidy a seskviterpenoidy. Obsahují velké množství navázaných sloučenin jako alkoholy (skořicový alkohol), aldehydy (cinnamaldehyd), fenoly (chavicol a eugenol), methoxy sloučeniny (methyleugenol, elemicin, estragol nebo anetol) a methylen-dioxy deriváty (safrol, myristin, apiol) (Eslahi et al. 2017).

Alkoholy jsou skupinou látek baktericidní, antiseptické a antivirové povahy. Přirozeně se vyskytují volně nebo v kombinaci s estery nebo terpeny. Monoterpeny obsahující hydroxylovou skupinu se nazývají monoterpenoly. Při kontaktu s kůží působí alkoholy silic netoxicky. Mezi alkoholy rostlinných silic řadíme linalool v levanduli, nerol ve chmelu nebo geraniol v růži a pelargonii (Hanif et al. 2019).

Aldehydy silic mají protizánětlivé, antifungální antiseptické, baktericidní, antivirové, sedativní a dezinfekční účinky. Tato skupina sloučenin významně působí proti kvasinkám rodu *Candida* a mnoha dalším. Mezi aldehydy silic řadíme citral v citronu, citronellal v meduňce, citrusovém eukalyptu nebo citronové trávě (Hanif et al. 2019).

Esterům silic přisuzujeme zklidňující a antimikrobiální účinky díky ve struktuře navázanému alkoholu. V lékařském odvětví působí estery silic jako sedativa a antimykotika podporující v lidském organismu rovnovážný stav. Methylsalicylát je ester odvozený od kyseliny benzoové a je hlavní složkou silice z libavky. Mezi další estery silic řadíme linalylacetát v levanduli, bergamotu, geranylformiát v pelargonii, benzylbezoát nebo benzylizobutyrát (Hüsni et al. 2007; Hanif et al. 2019).

Ketony jsou skupinou sloučenin vykazující proliferační, protikatarální, vulnerativní a expektorační vlastnosti. V medicíně jsou ketony silic považovány za zdraví prospěšné sloučeniny, protože podporují hojení ran a tvorbu jizev. Ketony jsou sloučeniny spíše toxické povahy. Nejtoxičtějším ketonem je thujon, který se nachází v silicích ze šalvěže, pelyňku nebo tůje. Dalšími toxickými ketony jsou pinokamfon v yzopu a pulegon v penízovce. Některými netoxickými ketony jsou fenchon v silic z fenýklu, jasmon v silici jasmínu, menton a karvon v silici máty peprné (Hanif et al. 2019).

Laktony jsou cyklické látky esterové struktury, které byly odvozeny od kyseliny mléčné. Jsou běžnými komponenty rostlinných silic a dalších těkavých sloučenin rostlin. Laktony obsahují heterocyklicky vázaný kyslík vedle karbonylové funkční skupiny většinou v pěti a vícečetném cyklu. Laktony s pěti uhlíky nazýváme  $\gamma$ -laktony a laktony obsahující šest uhlíků nazýváme  $\delta$ -laktony. Některými zástupci  $\gamma$ -laktonů jsou  $\gamma$ -valerolakton,  $\gamma$ -dekalakton s broskvovou vůní, whiskey lakton (3-methyl-4-oktanolid) nebo sotolon (3-hydroxy-4,5-dimethyl-2-furanon). Některými zástupci  $\delta$ -laktonů jsou  $\delta$ -dekalakton obsažený v ovoci, sýrech a mléčných výrobcích s kokosovým nebo broskvovým aroma, jasmolakton nebo 2-decen-5-olid. Kumarin se v naturální podobě vyskytuje krystalicky ve fazolu tonka nebo senu a je zodpovědný za sladké, kořeněné, rostlinné aroma. Dihydrokumarin je typický pro své sladké, bylinné aroma. Dále je kumarin spolu s bergaptenem, skopoletinem a umbelliferonem v silicích rostlin z čeledi miříkovité (*Apiaceae*), hluchavkovité (*Lamiaceae*) nebo hvězdicovité (*Asteraceae*). Nepetalaktony můžeme najít v rostlinách z rodu *Nepeta* (Hüsni et al. 2007).

### 3.3.2 Antifungální aktivita silic

Silice jsou považovány za jedny z nejučinnějších látek přírodního původu k útlumu a inhibici růstu hub. Při napadení substrátu houbu dochází k syntéze a produkci sloučenin napadající tkáň substrátu, mikrobiálních komunikačních signálů a rozvoji biofilmů. Průběh infekce závisí na množství inokula, virulenci daného kmene houby, na odolnosti a imunologickém stavu napadeného hostitele. Variabilita cílů působení silic a jejich komponent je různá, ale nejdůležitější místa působení jsou membrány a cytoplazmy buněk mikroorganismů. Silice mohou měnit i morfologii buněk mikroorganismů a díky svým antifungálním vlastnostem mohou být používány k potlačení hub na napadených plodinách nebo potravinách, zachování kvality a bezpečnosti potravin nebo prodloužení jejich trvanlivosti. Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and drug administration; FDA) klasifikuje silice jako bezpečné. Jako sloučeniny přírodního původu jsou lidmi lépe přijímány než sloučeniny syntetického původu. Antifungální vlastnosti silic jsou s největší pravděpodobností způsobeny terpeny. Terpeny jsou sloučeniny, které díky své lipofilní povaze mají schopnost narušit buněčnou stěnu hub, způsobit autolýzu buňky hub, inhibovat sporulaci

a klíčení hub. Jednotlivé komponenty určitých druhů silic použité ke kontrole hub nemají takovou účinnost jako při použití celých silic, kde všechny komponenty působí synergicky (Nazzaro et al. 2013).

Mechanismus antifungální aktivity silic není dosud přesně vysvětlen. Je však známo, že antifungální aktivitu silic ovlivňuje struktura a funkční skupiny jednotlivých sloučenin silic nebo schopnosti molekul sloučenin v silicích procházet skrze buněčnou stěnu a proniknout tak fosfolipidovou dvojvrstvou (Grande-Tovar et al. 2018). Cytotoxická povaha silic tkví ve schopnosti narušit buněčnou stěnu hub a koagulovat cytoplasmu, což způsobí poškození buněčných organel a uvolňování různých druhů makromolekul. Ty pak mohou díky lipofilní povaze silic migrovat skrze buněčnou stěnu a poškozenou cytoplasmatickou membránou, kde dochází k dalším narušením vrstev polysacharidů, mastných kyselin a fosfolipidů. Nakonec se buněčné membrány hub stanou snadno propustnými. Změnou fluidity plasmatické membrány dochází k úniku elektrolytů nebo buněčného obsahu, což ovlivňuje metabolismu bílkovin. Hydrofobní povaha silic může mít vliv na prostupnost membrán pro kationty  $H^+$  a  $K^+$ , což způsobuje změnu toku protonů, ovlivňuje chemické složení buněk nebo jejich aktivitu a mění buněčné pH. Změna permeability buněčných membrán vede k narušení osmotického tlaku nebo narušení buněčných organel, úniku cytoplasmy a ATP. Depolarizací mitochondrií silicemi dochází ke snížení membránového potenciálu vlivem na protonovou pumpu, jež má vliv na  $Ca^{2+}$  a další iontové kanály. Permeabilizace mitochondriálních membrán brání drahám cytochromu c, která vede k apoptóze nebo nekróze buněk a postupně tak k jejich smrti (Basak & Guha 2018; Mani-López et al. 2021). Silice interagují s ergosterolem, který je důležitou chemickou sloučeninou pro zachování integrity buněk, životaschopnosti nebo funkce a normálního růstu hub. Silice z tymiánu, koriandru nebo máty peprné se váží na ergosterol a tím inhibují růst buněk. Tímto způsobem dochází ke změně fluidity a propustnosti membrán. Zajímavým způsobem účinku se jeví interakce fenolových sloučenin silic s proteiny obsažených v cytoplasmatické membráně (poriny). Poriny se tak mohou vysrážet, což může vést k úniku elektrolytů a buněčného obsahu a způsobit tak rozpad buňky. Antifungální aktivita silic se také může jevit poškozením mitochondrií buněk hub. Silice narušují energetický metabolismus inhibicí enzymů jako mitochondriální ATPasy, malátdehydrogenázy a sukcinátdehydrogenázy. Nízký obsah ATP nepřímo inhibuje aktivitu ATPasy plasmatické membrány, což vede ke snížení kyselosti prostředí a následné buněčné smrti. Silice mohou dále narušit mitochondriální membránový potenciál změnou toku elektronů přes elektronový transportní kanál. Následkem tohoto jevu dochází k produkci kyslíkových radikálů, které oxidují a poškozují lipidy, proteiny a DNA. Vysoká koncentrace kyslíkových radikálů je jednou z hlavních biochemických znaků apoptózy. Za vznik a vysokou koncentraci kyslíkových radikálů mohou zodpovídat terpeny silic (Grande-Tovar et al. 2018).

### 3.3.3 Metody testování antifungální aktivity silic

Rychlý a snadno proveditelný je diskový nebo jamkový difuzní test často používaný jako kvantifikační metoda. Tento druh testu zkoumá citlivost mikroorganismu k dané látce. Provádí se zaočkováním příslušného mikroorganismu na Petriho misku s agarovým živným médiem, kde je na filtrační papír nebo do agarového živného media vyražené malé jamky

aplikováno malé množství látky. Vzniká tak zóna omezeného mikrobiálního růstu díky probíhající difuzi silice do agarového živného média, která se následně změní. Výhodami tohoto testu jsou menší náročnost provedení a aplikace malého množství silice. Některé studie říkají, že tento test poskytuje dobrou indikaci antimikrobiální aktivity. Nicméně rozdílná metodologie laboratoří nemusí přinášet srovnatelné výsledky (Hammer & Carson 2011).

Antifungální aktivitu silic měříme také na agarovém živném médiu v Petriho miskách, kde hodnotíme růst kolonií hub v čase, nebo inkubací testovaného materiálu v tekutém kultivačním médiu – diluční metoda v bujonu (Delespaul et al. 2000). Nejčastějším způsobem vpravení silice do agarového živného média je její rozptýlení v samotném médiu. Nejdříve je potřeba silici rozpustit ve vhodném rozpouštědlu nebo použít vhodný emulgátor. Samotná voda není dostatečné rozpouštědlo, protože silice jsou s ní špatně mísitelné. Ideálním rozpouštědlem je např. ethanol. Rozpouštědla nebo emulgátory mohou ovlivňovat nebo přímo působit na samotné mikroorganismy a jejich aktivitu. Mikroorganismy mohou být dále do agarového živného média naočkovány před jeho ztuhnutím nebo zaočkovány na povrch už ztuhlého agarového živného média (Benjlali et al. 1986; Remmal et al. 1993). Po naočkování a inkubaci se pozoruje růst kolonií nebo velikost inhibiční zóny. Díky metodě zaočkování na agarovém živném médiu můžeme určit minimální inhibiční koncentraci (Minimum inhibitory concentration; MIC), kterou definujeme jako nejnižší množství silice potřebné k inhibici viditelného růstu pozorovaného mikroorganismu. Pokud mikroorganismy kultivujeme diluční metodou v bujonu, kde vzorkujeme z každého ředění silice, definujeme minimální baktericidní koncentraci (Minimum bactericidal concentration; MBC) nebo minimální fungicidní koncentraci (Minimum fungicidal concentration; MFC). Tyto parametry nám vypovídají o minimální koncentraci silice potřebné k usmrcení 99,9 % buněk původního inokula bakterií nebo hub (Hammer & Carson 2011).

Klouček et al. 2012 vyvinuli rychlou screeningovou metodu pro hodnocení antimikrobiálních vlastností silic v odpařující se fázi. K experimentu byly využity čtyřdílné Petriho misky o průměru 90 mm a disky filtračního papíru o průměru 85 mm, které byly napuštěny silicí. Metoda spočívá v nalití agaru do všech dílů spodní části, a i do víčka. Po zaočkování příslušným mikroorganismem je do misky vložen disk z filtračního papíru napuštěného příslušnou silicí a vše je pak utěsněno uzavřením spodní části misky víčkem se zatuhlým agarem. Testovali antimikrobiální aktivitu 69 různých silic proti několika druhům bakterií a hub. 39 silic inhibovalo růst kolonií alespoň jednoho z mikroorganismů a některé ze silic dokonce všechny mikroorganismy. Tímto způsobem vyvinuli screeningovou metodu pro testování antimikrobiální aktivity silic v odpařující se fázi při velkém množství vzorků modifikací již vyvinutých metod.

### **3.3.4 Vybrané druhy silic**

#### **3.3.4.1 Citronová tráva**

Silice z citronové trávy (dále LEO; lemongrass essential oil) patří mezi nejdůležitější produkované silice na světě (Abdulazeez et al. 2015). 90 % celkového objemu LEO na světě pochází z indického státu Kerala. *Cymbopogon* (Voňatka) je rod vytrvalých vysokých trav, který zahrnuje asi 55 druhů. Tyto trávy pocházejí z tropických a semitropických oblastí Asie,

také se pěstují v Jižní a Střední Americe, Africe a dalších tropických zemích (Abdulazeez et al. 2015). Citronová tráva neboli *Cymbopogon citratus*, (voňatka citronová), je rostlina náležející do čeledi *Poaceae* (lipnicovité). Rostlina má dobře větvený kořenový systém, který pomáhá proti erozi půdy a v zadržování vody (Skaria et al. 2006). V tradiční a ajurvédské medicíně se silice používá ke zmírnění horečky, nachlazení nebo k léčbě kožních vyrážek, modřin a ran (Oyedele et al. 2002). LEO získáváme z listů citronové trávy extrakcí rozpouštědlem nebo parní destilací (Faheem et al. 2022). Společností je citronová tráva pěstována více již mnoho let pro své prospěšné vlastnosti a lékařské účely po celém světě. V lidovém léčitelství byla používána zejména k léčbě kašle, malárie, oftalmie, zápalu plic nebo různým onemocnění. Dále bylo studium prokázáno, že citronová tráva má antioxidační, antiseptické, baktericidní, fungicidní nebo sedativní účinky (Naik et al. 2010)

LEO je hlavním zdrojem monoterpenaldehydu citralu (3,7-dimethyl-2,6-oktadienal), který tvoří 75-85 % této silice. Citral je racemická směs dvou isomerů – gernaiolu (citral a) a neralu (citral b) a dává silici aroma citronu. Samotná syntéza citralu z geraniolu v citronové trávě je způsobena účinkem geranioldehydrogenasy. Geraniol zase vzniká odstraněním pyrofosfátu z geranyldifosfátu působením geraniolsyntasy nebo fosfatasy (Gupta & Ganjewala 2015). Citral z přírodních zdrojů se využívá k výrobě vitamínu A, avšak produkce silice z hlediska komerčního významu klesla díky výrobě syntetického citralu (Abdulazeez et al. 2015). Citral se dále využívá k výrobě iononu a betakarotenu (Tzortzakakis & Economakis 2007). LEO dále v malém množství obsahuje geraniol, geranylacetát nebo myrcen (Silva et al. 2008)

Netoxický mechanismus účinku, bezpečnost pro lidské zdraví a životní prostředí jsou hlavní přednosti připisované LEO. LEO je také potravinářskou přídatnou látkou, která je podle Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and drug administration; FDA) obecně uznána jako bezpečná a je také registrována a kontrolována Evropskou agenturou pro chemické látky (European Chemical Agency; ECHA). V thajské a vietnamské kuchyni se používá jako dochucovadlo jídel, různých alkoholických a nealkoholických nápojů, mražených a mléčných dezertů, cukrovinek, želatinu, pudingů, masa a masných výrobků, ryb, vín nebo omáček. (Skaria et al. 2006; Abdulazeez et al. 2015). V potravinách LEO zachovává senzorycké vlastnosti, inhibuje mikrobiální aktivitu, zachovává kvalitu a prodlužuje trvanlivost (Faheem et al. 2022).

Studie zabývající se antifungální aktivitou LEO proti posklizňovým fytopatogenním houbám zjistila, že tato silice významně ovlivňuje rozvoj kolonií vybraných posklizňových hub. Do experimentu byly zahrnuty houby jako *Colletotrichum coccodes*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Rhizopus stolonifer* a *Aspergillus niger*. Výsledkem studie je, že silice z citronové trávy o koncentraci 25 ppm inhibovala o 70 % produkci spor v porovnání se kontrolou. Nejvyšší koncentrace silice 500 ppm sporulaci velmi zpomalila. Byla také snížena klíčivost spor *C. coccodes*, *B. cinerea*, *C. herbarum* a *R. stolonifer*, a zároveň byla zvýšena klíčivost spor v koncentraci 100 ppm u *A. niger*. Podle této studie může být LEO použita proti k omezení šíření patogenů ve skladovací nebo přepravní atmosféře jako alternativa potravinového konzervantu (Tzortzakakis & Economakis 2007).

### 3.3.4.2 Hřebíček

Silice z hřebíčku (dále CEO; Clove essential oil) je jednou z nejvíce používaných silic pro léčbu různých zdravotních neduhů nebo jako přírodní konzervant (Hussain et al. 2017). V tradiční medicíně se CEO používá jako analgetikum, aseptikum nebo v péči o zuby a také proti bakteriím způsobujícím zubní kaz nebo paradontózu (Chaieb et al. 2007). Dále se používá v kosmetickém, parfémovém nebo potravinářském průmyslu (Haro-González et al. 2021). Jako přírodní aditivum je silice využívána díky svým antimikrobiálním účinkům a aroma, které může potravině dodat pro konzumenta jistý říz (Karutnaratne & Pamunuwa 2017) Hřebíček neboli *Syzygium aromaticum* (hřebíčkovec kořený) je rostlina pěstovaná nejvíce na Madagaskaru, Srí Lance, Indonésii a Číně. Náleží do čeledi *Myrtaceae*, která zahrnuje více než 130 rodů na 3000 druhů (Haro-González et al. 2021). Hřebíček je nejvíce pěstován na pobřežích v nadmořské výšce do 200 m. n. m.. Hlavním způsobem získání CEO je parní destilace zelených částí rostliny. Silice získaná z určité části rostliny má odlišné vlastnosti. Jakost a množství CEO jsou ovlivněny převážně odrudou, posklizňovým ošetřením, předúpravou před destilací, destilací a modifikacemi po destilaci (Nurdjannah & Bermawie 2012). Jako přírodní aditivum je silice využívána díky svým antimikrobiálním účinkům a aroma (Karutnaratne & Pamunuwa 2017)

CEO obsahuje významné množství fenolových sloučenin – flavonoidů, hydroxybenzoových kyselin hydroxyskořicových kyselin a hydroxyfenylpropanu (Cortés-Rojas et al. 2014). Nejvýznamnějšími a nejvíce zastoupenými sloučeninami jsou eugenol (minimálně 50 %), eugenylacetát,  $\beta$ -karyofylen nebo  $\alpha$ -humulen tvoří mezi 10-40 % z celkového podílu silice (Chaieb et al. 2007; Haro-González et al. 2021). Poupata hřebíčku obsahují malé množství fenolových sloučenin, jako jsou methylamylketon, kaempferol, kyselina gallotanová,  $\alpha$ -humulen,  $\beta$ -humulen, methylsalicylát, kyselina kratogolová a benzaldehyd, které dávají hřebíčku jeho typické aroma (Hussain et al. 2017).

Studie z roku 2015 zkoumala v *in vitro* a v *in vivo* podmínkách antifungální aktivitu silic z hřebíčku a hořčice v evaporační fázi proti *B. cinerea* způsobující šedou hnilobu u jahod. Minimální inhibiční koncentrace v *in vitro* i v *in vivo* podmínkách byla u CEO 92,56  $\mu$ l/l vzduchu a u silice z hořčice 15,42  $\mu$ l/l vzduchu. V synergii obou silic byla minimální inhibiční koncentrace CEO 15,42  $\mu$ l/l vzduchu a hořčice 1,93  $\mu$ l/l vzduchu v *in vitro* podmínkách, zatímco v *in vivo* podmínkách u CEO 11,57  $\mu$ l/l vzduchu a u hořčice 1,93  $\mu$ l/l vzduchu. Kooperace obou výše zmíněných silic měla dále velký vliv na většinu pozorovaných kombinací koncentrací. Závěr této studie říká, že obě testované silice jsou významnými činiteli s antifungálními účinky a účinně inhibují růst a rozšiřování *B. cinerea* (Aguilar-González et al. 2015)

### 3.3.4.3 Oregano

Silice z oregana (dále OEO; oregano essential oil) je významná a široce používaná pro své antimikrobiální, antifungální a antivirové účinky. Druhy rostlin produkující OEO jsou *Origanum dictamnus*, *Origanum hirtum*, *Origanum onites*, *Origanum vulgare* (Leyva-López et al. 2017). V tradiční medicíně je OEO velmi oblíbený pro své vlastnosti s pozitivním účinkem na lidské zdraví a používá se při léčbě dýchacích cest jako astma nebo bronchitida, dále při léčbě gastrointestinálních obtíží, cukrovce nebo menstruačním problémům (Veenstra &

Johnson 2019). OEO se také řadí mezi silice, kteří působí účinně proti patogenům, které způsobují infekce a intoxikace z jídla (Singh et al. 2022).

Karvakrol (2-methyl-5-(propan-2-yl)fenol) a thymol (2-isopropyl-5-methylfenol) jsou fenolické látky, které tvoří největší část OEO (přibližně 75-85 %). Mají antimikrobiální a antioxidační účinky, které jsou připisovány jejich lipofilnímu charakteru. Působení karvakrolu a thymolu způsobuje expanzi membrán narušením membránových proteinů, tím se zvyšuje propustnost a mění se mechanismy transportu iontů. Jako antioxidy zpomalují oxidaci lipidů vychytáváním volných radikálů, a kromě a dále jsou zodpovědní za charakteristické aroma a chuť (Rodriguez-Garcia et al. 2016). Při působení obou látek dochází k narušení vnější membrány gramnegativních bakterií uvolněním lipopolysacharidů a ke zvýšení permeability cytoplazmatické membrány pro ATP. Dochází ke snížení syntézy ATP, ale ke zrychlení hydrolýzy ATP (Juven et al. 1994).

Studie zabývající se účinky 17 různými druhy silic, včetně OEO, vůči *B. cinerea*. Hlavní složky silic byly pak dále identifikovány pomocí GC-MS. OEO vykazoval velmi silné antifungální účinky v koncentraci 0,5 mg/ml. GC-MS identifikovala jako nejvíce zastoupené komponenty OEO karvakrol,  $\beta$ -karyofylen a thymol. Karvakrol a thymol inhibovaly klíčení spor v koncentraci 300  $\mu$ g/ml a míra inhibice byla 80,03 %. Poškození mycelia bylo zkoumáno rastrovacím elektronovým mikroskopem (Scanning electron microscope; SEM). Mycelium ošetřené substancí karvakrolu a thymolu o koncentraci 40  $\mu$ g/ml způsobilo zvýšení permeability membrán zkoumaných buněk nebo poškození mitochondriálních membrán. V *in vivo* podmínkách měla koncentrace 1000  $\mu$ g/ml karvakrolu nejlepší antifungální účinky na šedou hnilobu rajčete (míra inhibice 77,98 %). Studie tvrdí, že karvakrol a thymol mají velký potenciál v praxi jako přírodní fungicidy nebo jako hlavní složky komerčních fungicidů při prevenci a boji proti chorobám způsobených *B. cinerea* (Hou et al. 2020).

#### 3.3.4.4 Skořice

Skořice patří mezi běžná koření používaných v mnoha kuchyních po celém světě již několik staletí (Haddi et al. 2017). Skořicovou silici (dále CnEO; cinnamon essential oil) získáváme z kůry a listů stálezeleného stromu rodu *Cinnamomum* (skořicovník), který náleží do čeledi *Lauraceae* (vavřínovité). Tato čeleď obsahuje 250 druhů stromů hojně rozšířených v jihovýchodní Asii, Číně a Austrálii. Nejvýznamnějšími zástupci z pohledu získávání CnEO jsou skořicovník cejlonský (*Cinnamomum zeylanicum*), skořicovník čínský (*Cinnamomum cassia*) a kafrovník lékařský (*Cinnamomum camphora*), který je také znám pod jménem skořicovník kafrovník. CnEO získaný z listů je levnější než silice získaná z kůry a je využívána také jako koření (Cardoso-Ugarte et al. 2016). CnEO získáváme pestrou škálou technik. Jednou z takových technik je destilace, která je jednou z nejrozšířenějších, nejstarších a nejjednodušších technik k získání CnEO. Hydrodestilací získáváme CnEO ze skořicové kůry nebo listů působením vodní páry jako rozpouštědla, která při bodu varu působí na molekuly CnEO. Významnými metodami v extrakci CnEO jsou superkritická fluidní extrakce, ultrazvuková a mikrovlnná extrakce. Ultrazvukovou a mikrovlnnou extrakci používáme především pro malé a laboratorní analýzy (Haddi et al. 2017). CnEO je hojně používána v několika odvětvích - farmaceutickém, cukrářském průmyslu, výrobě parfémů a alternativním



lékařství. Dále je využívána v potravinářském průmyslu v podobě koření, potravinářské přísady nebo konzervantu (Cardoso-Ugarte et al. 2016).

CnEO je těkavá, hydrofobní, mírně viskózní kapalina nažloutlé barvy mající charakteristickou sladkou, kořeněnou, dřevitou vůni. (Stevens & Allred 2022) Fenolové a těkavé látky obsažené v CnEO zodpovídají za charakteristickou chuť a vůni. Obsahově velkou část CnEO tvoří monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny a jejich kyslíkaté formy. Biologicky aktivními látkami jsou cinnamaldehyd, cinnamyl-acetát, eugenol a linalool, kteří mají antioxidační, baktericidní a antifungální účinky. Dalšími důležitými sloučeninami CnEO jsou kafr, karyofylen, *trans- $\alpha$ -bergamoten*, karyofylenoxid, geraniol, bornylacetát,  $\alpha$ -kubeben,  $\gamma$ -elemen,  $\alpha$ -kopaen a guaiol (Cardoso-Ugarte et al. 2016). Cinnamaldehyd (3-fenylprop-2-enal) je v rostlině syntetizován šikimátovou dráhou z prekursoru fenylalaninu. V rostlinách můžeme najít jak *cis*, tak *trans* formu, ale v kůře skořicovníku se vyskytuje nejvíce jako *trans* isomer. Cinnamaldehyd zaujímá 50-90 % z chemického složení, ale jeho obsah se odvíjí od druhu a částí rostliny, ze které byla silice získána. Zodpovídá také převážně za sladké a kořeněné aroma silice, na kterém se podílejí i další sloučeniny. Eugenol (4-allyl-2-methoxyfenol) je derivát guajakolu vzniklý substitucí allylového řetězce. Vzniká také šikimátovou dráhou z prekursorů fenylalaninu stejně jako cinnamaldehyd. Eugenol je hlavní složkou CnEO získaného z listů, zatímco CnEO z kůry obsahuje přibližně 2-13 % eugenolu z chemického složení. *Trans*-karyofylen (neboli  $\beta$ -karyofylen) patří mezi seskviterpeny a v rostlinách vzniká mevalonátovou dráhou z prekursorových molekul acetyl-COA. V objemu CnEO zaujímá podíl menší než 10 %. *Trans*-karyofylen má bicyklickou strukturu a typické sladké aroma (Stevens & Allred 2022).

Studie zabývající se vlivem skořicové silice na mikrobiální kažení čerstvé zeleniny zkoumala v *in vitro* podmínkách antifungální účinností proti několika vybraným patogenům včetně *B. cinerea*. Skořicová silice byla používána v několika koncentracích v rozmezí 25-500 ppm. Aplikace snížila růst kolonií a produkci spor při koncentraci 25 ppm o 63 %. Při nejvyšší koncentraci (500 ppm) byla téměř inhibovaná sporulace patogenu *B. cinerea*. U plodů papriky a rajčat byla *B. cinerea* inokulována do vyseknuté rány a během 3 dní expozice výparů skořicové silice byla sledována u akcelerace růstu papriky, zatímco u rajčat nebyl pozorován žádný rozdíl. V případě vystavení rajčat výparům silice o koncentraci 500 ppm po dobu 3 dnů a následné naočkování patogenem *B. cinerea* růst lézí snížilo. Výsledky studie naznačují inovativnost a užitečnost použití skořicové silice jako alternativu k použití syntetických fungicidů nebo jiných technik při skladování nebo balení potravin (Tzortzakis 2009).

### 3.3.4.5 Tymián

Tymiánovou silici (dále TEO, thyme essential oil) získáváme z rostliny tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*), která je velmi významnou aromatickou bylinou používanou zejména pro léčebné účely a kulinární přípravu jídel. Tymián obecný náleží do čeledi *Lamiaceae* a samotný rod *Thymus* obsahuje přibližně 100 druhů rostlin, které v čerstvém stavu obsahují nejvíce antioxidantů ze všech bylin. Působí tak proti gastroenterickým a bronchopulmonální onemocněním (Dauqan & Abdullah 2017; Almanea et al. 2019). Stonek rostlin je vzpřímený a postupem času dřevnatí. Rostliny se v přírodě vyskytují jako gynodvoudomé (existují jednak hermafroditi, tak i samičí jedinci). Listy tymiánu a TEO z nich

se přidávají do potravin ke zvýraznění chuti, vůně a konzervaci. TEO se v alternativní medicíně využívá pro své antiseptické, antivirové a antimikrobiální účinky. TEO je vysoce účinný proti patogenním mikroorganismům z potravin jako jsou bakterie *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes* (Mandal & DebMandal 2016).

TEO je směs velkého množství chemických sloučenin, ale nejdůležitějšími skupinami chemických látek jsou monoterpeny, monoterpenové alkoholy, derivátů fenolu, ketonů, aldehydů, etherů a esterů. Biologicky významnými sloučeninami jsou fenolové monoterpeny thymol a karvakrol (Kowalczyk et al. 2020). Existuje minimálně 6 chemotypů TEO, které mají různé složení. Thymol-type silice, kde obsahově převládá thymol, jediné vyhovuje definici TEO v Evropském lékopisu (Dauqan & Abdullah 2017). Obě sloučeniny působí synergicky a vynikají svými antimikrobiálními a antioxidačními vlastnostmi, které prodlužují trvanlivost potravin a působí toxicky proti velkému množství mikroorganismů. Literatura uvádí, že thymol a karvakrol mají protizánětlivé účinky a působí hepatoprotektivně (Mandal & DebMandal 2016).

Shabnum & Wagay (2011) se zabývali složením silice z tymiánu obecného volně rostoucího v severní Itálii a jejím využití. Složení bylo zjištěno pomocí analytické techniky GC-MS, která identifikovala více než 30 konstituentů. Mezi nejvíce zastoupenými sloučeninami GC-MS určila thymol,  $\gamma$ -terpinen,  $\rho$ -cymen, linalool, 4-allylphenol, myrcen,  $\alpha$ -pinen, eugenol, karvakrol a  $\alpha$ -thujen. Všechny tyto sloučeniny byly testovány na antioxidační aktivitu aldehydovým nebo karboxylovým testem. Eugenol, karvakrol, thymol a 4-allylphenol vykazovaly silné antioxidační účinky. Studie dále zkoumala antifungální aktivitu komponentů vůči několika skládkovým patogenům.  $\rho$ -cymen, linalool, terpinen-4-ol a thymol vykazovaly antifungální aktivitu proti houbám *B. cinerea* a *Rhizopus stolonifer*, které jsou patogeny jahodníku (*Fragaria ananassa*). Působení silice v koncentraci 200 ppm snížilo kolonie *B. cinerea* a výskyt měkké hniloby způsobené druhem *R. stolonifer* o více než 70 % po 14 dnech skladování.

## 3.4 Zelí hlávkové

### 3.4.1 Zemědělský význam

Zelí hlávkové (*Brassica oleracea* var. *capitata*) je formou brukve zelné (*Brassica oleracea*) a náleží mezi košťálovou zeleninu a do čeledi brukvovité (*Brassicaceae*). Můžeme ji v rámci pěstování nalézt na všech světadílech, kde má také široké využití. Produkce zelí hlávkového se v České republice pohybuje okolo 50 000 tun při průměrném výnosu 40 tun/ha. Zelí hlávkové obsahuje velké množství zdraví prospěšných látek – vitaminů, minerálních (Ca, Mg, P, S) a biologicky aktivních látek. Mezi biologicky aktivní látky patří estery kyseliny sinapové a malonové nebo glukosidy. Červeně zbarvené zelí je nutričně významnější, neboť obsahuje anthokyany, což jsou červená barviva, která mají významné antioxidační účinky. Dále se zelí připisují antirevmatické účinky díky sirtým sloučeninám, protivředové účinky díky vitamínu U nebo antioxidační a pročišťovací účinky (zejména kysané zelí). Zelí hlávkové je také bohatým zdrojem vlákniny, díky které může zelí působit v prevenci vzniku aterosklerózy,

onemocněních srdce a cév nebo v dietách při léčbě cukrovky a obezity (Malý 2003; Petříková et al. 2012).

Dvouletý životní cyklus zelí začíná tvorbou košťálu, na kterém se nacházejí hladké listy buď zelené nebo červenofialové barvy (Petříková et al. 2012). Košťál rozlišujeme na vnější nebo vnitřní a dále podle jeho zasazení do hlávky – nízký, střední nebo vysoký. Rané odrůdy mají obvykle nižší vnější košťál, zatímco pozdní a polopozdní odrůdy mají zpravidla střední až vyšší vnější košťál (Malý 2003). Vnější košťál je důležitý pro stabilitu rostliny. K tvorbě hlávky dochází zkracováním internodií směrem k vrcholu, a tudíž přerůstáním výše postavených listů níže postavenými listy (Petříková et al. 2012). Hlávka je výsledkem pupenu obklopeného zavinutými listy, jež pupen schovávají a jsou k sobě přilehlé na těсно. Tvar a utváření hlávky jsou charakteristické odrůdové rysy a je kulovitý, plochý, balónovitý a kuželovitý s mnoha přechodnými tvary. U raných odrůd nalezneme špičatý tvar hlávek, zatímco ploché hlávky se vyznačují hrubostí listů. Soudržnost a pevnost hlávky závisí na stupni vyzrállosti a výšce vnějšího košťálu (Malý 2003). Ve druhém vegetačním roce vytváří zelí rozvětvené lodyhy a žluté květy, které se časem mění plody. Rostlina je cizosprašná a plodem je šešule, která obsahuje kulovitá semena tmavé barvy (Petříková et al. 2012).

Zelí hlávkové je velmi rozšířenou zeleninou, zejména v mírném evropském pásmu, kde je konzumováno především v čerstvém stavu nebo v kysané formě. Má široké portfolio využití v nejen ve výživě, ale je i dobře a dlouhodobě skladovatelné, dobře skladovatelné nebo celkem snadné pěstitelské postupy. V České republice jsou pěstovány dvě varianty zelí hlávkového – albo (zelí bílé) a rubra (zelí červené), nicméně oblíbenější variantou je zelí bílé a zelí červené má zejména uplatnění v kuchyni při přípravě salátů. Bílou variantu zelí hlávkového rozlišujeme na rané odrůdy s hlávkami o hmotnosti kolem 500 g, které se vyznačují vyšším množstvím sacharidů nebo nižším množstvím sušiny a nevhodností ke skladování. Podmínky na našich polích umožňují uskutečnit sklizně raných odrůd v rozmezí od druhé půlky května a první poloviny června, kdy jejich vegetační doba trvá 100-140 dní. Letní odrůdy, jejichž hmotnost hlávek se pohybuje v rozmezí 1000-1400 g, se špatně skladují, tudíž jsou určeny k přímému zpracování a sklízí se od konce června do začátku září. Polopozdní a pozdní odrůdy určené ke krouhárenskému zpracování mají hmotnost hlávky tři a více kilogramů a vyznačují se vyšším obsahem sacharidů, horší skladovatelností a vysokými výnosy. Dále polopozdní a pozdní odrůdy určené ke skladování mají hmotnost hlávek 1500-3000 g, dobu vegetace 150-200 dní a jsou určeny k dlouhodobému skladování. Vyznačují se nižším obsahem sacharidů, vyšším množstvím sušiny a vlákniny. Díky nižšímu obsahu sacharidů nejsou tolik vhodné k výrobě kysaného zelí. Červené odrůdy zelí se vyznačují vyšším množstvím sacharidů, nižším množstvím vláknin a horší. Šlechtitelé a zpracovatelé preferují produkci zelí s pevnou hlávkou a nízkým vnitřním košťálem z důvodu vyšší výtěžnosti a menšího množství odpadu (Malý 2003).

### 3.4.2 Vybrané choroby zelí

Choroby zelí v tomto přehledu jsou způsobeny patogenními houbami, které se většinou šíří z napadeného rostlinného materiálu nebo zamořené půdy. Způsoby přenosu jsou různé a patří mezi ně přenosy větrem, vodou (deštěm, zavlažovací nebo podzemní vodou), hmyzem, lidmi (na oděvu nebo obuvi) nebo např. zemědělskou technikou. Mezi závažné choroby patří

nádorovitost kořenů brukvovitých, plíseň brukvovitých, alternáriová skvrnitost brukvovitých, fómová hniloba brukvovitých, rhizoktóniová hniloba nebo padání klíčnicích rostlin (Petříková et al. 2012; Sharma et al. 2018).

Nádorovitost kořenů brukvovitých je nejzávažnější chorobou všech brukvovitých rostlin a známe i pod názvy boulovitost, hlenka nebo plasmodiόza. Původcem choroby je *Plasmodiophora brassicae*, která způsobuje na kořenech rostlin nádory omezující příjem vody a živin rostlinou. Rostlina v důsledku toho uvadá, zakrňuje a odumírá. Z infekční a nekrotické tkáně nádorů se infekce dostává pomocí odolných spor do půdy. Ochrana proti chorobě je obtížná, protože tento houbám podobný mikroorganismus se velmi snadno šíří, tudíž je nutné provést velké množství opatřujících postupů. Pozemky s ještě nekontaminovanou půdou je třeba chránit před kontaminací spory. *P. brassicae* se může šířit napadenou sadbou, kontaminovanou závlivkou a povrchovou vodou, kontaminovaným kompostem nebo chlěvskou mrvou, nářadím, stroji, obuví nebo půdními navážkami. Na pozemcích kontaminovaných *P. brassicae* je vhodné nepěstovat po dobu několika let brukvovité, průběžně regulovat brukvovité plevely a udržovat pH půdy na neutrální úrovni. Ke snížení kontaminace půdy také přispívá dusíkaté vápno nebo výsev ředkve olejné. Dalšími opatřeními je vysazování zdravé sadby, a odolné odrůdy (Petříková et al. 2012).

Plíseň brukvovitých je choroba napadající všechny rostliny z čeledi brukvovité (*Brassicaceae*), kterou způsobuje *Hyaloperonospora parasitica*. Rostliny jsou napadány po celou dobu vegetace. Největší škody jsou u mladých sazenic, kdy dochází k objevu infekce v období vzcházení a v době tvorby pravých listů, tudíž malé rostliny mají silně zabrzděný růst. Existuje zde však i trend významného poškození porostů zejména zelí hlávkového a květáku v období několik týdnů před sklizní. Typickými projevy infekce plísně brukvovitých jsou:

- žlutozelené skvrny na mladších listech, zasychání nekrotických pletiv, šedobílý povlak,
- mladé infikované rostliny jsou deformované a umírají,
- během kvetení starší listy skvrnité, po čase odumírají,
- napadení děložnicích a starších listů, kterým časem zežloutnou a odumírají,
- u zelí hlávkového možnost průniku infekce do hlávek, kde dochází k mokré hnilobě,
- při systémové infekci dochází ke zbrzdění růstu, barevným změnám, zasychání a odumírání pletiv.

Z preventivních opatření je důležité střídání plodin, likvidace posklizňových zbytků, likvidace brukvovitých plevelů, vysévání zdravého osiva. Pro pěstování přísady se doporučuje dezinfekce substrátu, nepřehušťovat výsevy a výsadbu brukvovité zeleniny (košťálovin) a dostatečně větrat pařeniště a fóliovníky. Chemická ochrana se používá u semenářských porostů (Kocourek et al. 2022).

Alternáriová skvrnitost brukvovitých způsobuje podobné škody jako plíseň brukvovitých a jejími původci jsou *Alternaria brassicicola* a *A. brassicae*. Preventivní ochrana spočívá v likvidaci infikovaných posklizňových zbytků, střídání plodin, vysévání zdravého a mořeného osiva a vysazování zdravé přísady, rovnoměrné výživě, vhodném způsobu zavlažování a likvidaci plevelů. Chemická ochrana se používá jen v porostech na semeno před odkvetením rostlin a po něm (Petříková et al. 2012; Kocourek et al. 2022). Fómová hniloba brukvovitých je choroba, jejímž původcem je *Leptosphaeria maculans*, působí suchou nebo slizovitou hnilobou. Choroba napadá jak semenné porosty, tak šešule rostlin. Podobnou chorobou,

kteřá způsobuje zaškrcování a černání kořen, hnilobu košťálů a hlávek, je rhizoktóniová hniloba. Původcem choroby je *Rhizoctonia solani* a vhodným opatřením proti výskytu těchto chorob je moření osiva, likvidace zbytků z půdy, dodržení osevního postupu a izolace od řepky ozimé (Petříková et al. 2012; Kocourek et al. 2016). Padání klíčnicích rostlin se vyskytuje u všech druhů zeleniny a má mnoho původců, nejčastěji to jsou např. *Phytophthora spp.*, *Pythium spp.*, *Fusarium spp.*, *Leptosphaeria maculans* a *Rhizoctonia solani*. Choroba způsobuje vodnatění a postupné černání kořene mladých rostlin, jež se zužuje a dochází tak k destabilizaci rostlin v půdě a úplnému odumření. Patogeny jsou šířeny infikovanými semeny nebo sadbou a přežívají v půdě nebo na zbytcích biomasy na poli. V rámci ochrana proti chorobě je potřeba zamezit výraznému kolísání vlhkosti půdy. Je také možné využívat přípravky na ošetření sadby (Petříková et al. 2012; Kocourek et al. 2022).

## 4 Metodika

Citlivost kmenů *B. cinerea* vůči vybraným druhům silic byla testována v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. V *in vitro* podmínkách byla citlivost testována přidavkem silic do agarů a podrobováním kmenů prostředí odpařujících se silic v Petriho miskách, zatímco *in vivo* experimenty zahrnovaly aplikaci kmenů na zelné hlávky a disky ze zelných listů v prostředí odpařujících se silic. Na základě výsledků z *in vitro* experimentů byly vybrány silice k dalším *in vivo* experimentům.

### 4.1 Vliv přidavku esenciálních silic do kultivačního media na růst *B. cinerea* na agarovém kultivačním mediu

Stanovení citlivosti *B. cinerea* k jednotlivým silicím v *in vitro* podmínkách probíhalo celkem se 6 kmeny a v rámci jednoho cyklu vždy s jedním kmenem a pěti silicemi. Zjišťování antifungálního účinku silic na kmen *B. cinerea* bylo provedeno v 90 mm Petriho miskách s 2% malt extrakt agarem s přidavkem vybrané silice o určité koncentraci. Byl hodnocen vliv 5 koncentrací od každé silice, a to 250, 125, 83,33, 62,5 a 31,25  $\mu\text{l/l}$ . Kontrolní variantou byl 2% malt extrakt agarem bez přidavku silice. Každá varianta byla v 10 opakováních. Stanovení antifungálního účinku bylo hodnoceno na základě poměru růstu mycelia na kultivačním mediu se silicí oproti kontrolní variantě (kultivačním mediu bez silice).

#### 4.1.1 Kmeny

Použité kmeny *B. cinerea* pocházely z Kolekce kultur mikroorganismů VÚRV Sbírký zemědělsky významných hub (akronym VURV-F) z Výzkumného ústavu rostlinné výroby. Byly použity následující kmeny:

- VURV-F 506
- VURV-F 537
- VURV-F 538
- VURV-F 539
- VURV-F 578
- VURV-F 921

VURV-F 506, 537, 538, 578 jsou kmeny izolované ze zelných hlávek, zatímco kmen VURV-F 539 byl izolován z mrkve obecné a kmen VURV-F z bulvy řepy cukrovky.

#### 4.1.2 Chemikálie

K experimentu byly použity tyto chemikálie:

- silice ze Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA),
  - skořicová
  - tymiánová
  - z citronové trávy
  - hřebíčková
- silice z oregana z Düllberg Konzentra GmbH & Co. KG (Hamburg, Německo),
- dimethylsulfoxid (DMSO) z VWR International (Radnor, PA, USA),
- agar z Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Německo) a
- malt extrakt z VWR International (Radnor, PA, USA).

#### 4.1.3 Stanovení vlivu v *in vitro* podmínkách

Nejprve byly připraveny startovní kultury hub, což byly kultury kmenů hub rostoucích na Petriho miskách s MA2 agarem a kultivovány při teplotě 20 °C po dobu tří dnů. Dalším krokem tohoto experimentu byla příprava kultivačního MA2 media. Pro pokus byl použit 2% malt extrakt agar o složení 20 g agaru, 20 g, malt extraktu, 1000 ml vody. Sterilizace probíhala při teplotě 110 °C po dobu 20 minut. Hodnocené koncentrace silic byly získány smícháním koncentrované silice s DMSO následujícím způsobem:

- 250 µl/l; 600 µl silice + 1800 µl DMSO – odebrání 300 µl ze směsi
- 125 µl/l; 300 µl výchozí směsi + 300 µl DMSO – odebrání 300 µl z výchozí směsi
- 83,33 µl/l; 300 µl výchozí směsi + 600 µl DMSO – odebrání 300 µl z výchozí směsi
- 62,5 µl/l; 300 µl výchozí směsi + 900 µl DMSO – odebrání 300 µl z výchozí směsi
- 31,25 µl/l; 300 µl výchozí směsi + 2100 µl DMSO

Získané koncentrace silic byly po 300 µl přidány do vysterylizovaného 2% malt extrakt agar při teplotě okolo 50°C. Agarové medium bylo nalito do 90 mm Petriho misky. Hodnocené kmeny *B. cinerea* byly jednobodově zaočkovány bločkem s 3 dny starou kulturou rostoucí v Petriho misky s MA2 do Petriho misky s MA2 s vybranou koncentrací a kultivovány při 20 °C ve tmě v termostatu. Velikosti narostlých kolonií byly měřeny po 4 dnech od zaočkování.

Antifungální aktivita silic vůči kmenům *B. cinerea* byla vyhodnocena po 4 dnech kultivace. Byla změřena velikost kolonií a ze získaných dat byla vypočítána míra inhibice silice ve všech koncentracích.

#### 4.2 Vliv odpařujících se esenciálních silic na růst *B. cinerea* na agarovém kultivačním médiu

Stanovení citlivosti *B. cinerea* k jednotlivým silicím v prostředí odpařujících silic probíhalo u 4 kmenů s 5 silicemi. Ke zjištění antifungálního účinku silic proti *B. cinerea* byly použity 90 mm Petriho misky rozdělené na 4 díly s 2% malt extrakt agarem s přidavkem vybrané silice o určité koncentraci. Byl hodnocen vliv 6 koncentrací od každé silice, a to v koncentracích 500, 250, 125, 83,33, 62,5 a 31,25 µl/l kombinované s kontrolou bez přidavku silice s ethylacetátem, kde každá koncentrace silice byla připravena v 6 opakováních ke každému kmeni (celkem 210 misek). Stanovení antifungálního účinku bylo hodnoceno na

základě poměru růstu mycelia na kultivačním mediu ovlivněného silicí oproti kontrolní variantě (kultivačním mediu bez ovlivnění silicí).

#### 4.2.1 Kmeny

Použité kmeny *B. cinerea* pocházely z Kolekce kultur mikroorganismů VÚRV Sbírký zemědělsky významných hub (akronym VURV-F) z Výzkumného ústavu rostlinné výroby. Byly použity kmeny VURV-F 506, 537, 538 a 578 izolované ze zelných hlávek.

#### 4.2.2 Chemikálie

K experimentu byly použity tyto chemikálie:

- silice ze Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA),
  - skořicová
  - tymiánová
  - z citronové trávy
  - hřebíčková
- silice z oregana z Düllberg Konzentra GmbH & Co. KG (Hamburg, Německo),
- ethylacetát z Lach-Ner s. r. o (Neratovice, Česká republika) a
- agar z Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Německo) malt extrakt z VWR International (Radnor, PA, USA).

#### 4.2.3 Stanovení citlivosti v prostředí odpařujících se silic

Nejprve byly připraveny startovní kultury hub, což byly kultury kmenů hub rostoucích na Petriho miskách s MA2 agarem a kultivovány při teplotě 20 °C po dobu tří dnů. Dalším krokem tohoto experimentu byla příprava kultivačního MA2 media (složení a příprava viz výše). Zchlazený agar byl nalit do každého dílku spodní části 4-dílné 90 mm Petriho misky a také na víčko této Petriho misky. Hodnocené kmeny *B. cinerea* byly zaočkovány bločkem s 3 dny starou kulturou rostoucí v Petriho misky s MA2 do každé části 4-dílné Petriho misky s MA2 s vybranou koncentrací a kultivovány při 20 °C ve tmě v termostatu. Požadované koncentrace silic byly získány smícháním koncentrovaného silice s ethylacetátem. Do zaočkované 4-dílné Petriho misky byl vložen filtrační papír, na který byla aplikována silice s 350 µl ethylacetátu a ze kterého se před vložením nechal odpařit ethylacetát. V kontrolní variantě bylo na filtrační papír nanášeno pouze 350 µl ethylacetátu. Misky byly přiklopeny a uzavřeny víčky s MA2 agarem a kultivovány ve tmě při 20 °C. Velikosti narostlých kolonií byly odečítány 3. 5. a 7. den od zaočkování.

Druhá část práce zahrnovala hodnocení antifungální aktivity silic proti růstu kolonií kmenů *B. cinerea* v prostředí odpařujících se silic. Růst kolonií jednotlivých kmenů byl měřen 3., 5., a 7. den od zaočkování. Ze získaných dat vypočítána míra inhibice silice ve všech koncentracích. Získaná data byla také různým způsobem porovnána pomocí programu STATISTICA. Pokud data pocházela z normálního rozdělení, byla použita parametrická jednofaktorová ANOVA ke zjištění rozdílu mezi porovnávanými daty s následným post hoc Scheffého testem ke zjištění, které skupiny dat se mezi sebou liší. V případě neparametrických testů ke zjištění rozdílu mezi porovnávanými skupinami dat byl použit Kruskal-Wallisův test



s následným post hoc test vícenásobného porovnání p hodnot ke zjištění signifikantních rozdílů mezi skupinami dat. Ve všech případech byla zvolena hladina významnosti 0,05.

### **4.3 Vliv odpařujících silic na patogenní působení *B. cinerea* na hlávky zelí při skladování**

Zjištění vlivu odpařujících se silic na růst vybraných kmenů *B. cinerea* bylo provedeno u 3 silic vybraných na základě v předchozích experimentech zjištěné jejich schopnosti inhibovat růst mycelia. Experiment byl uskutečněn s celými hlávkami zelí v alobalem uzavřených skleněných nádobách o velikosti 55 x 32 x 18 cm, kde se silice odpařovaly a působily tak na poraněné a zaočkované hlávky zelí. Vybranými silicemi byly silice z tymiánu, citronové trávy a oregana. Aplikovaná koncentrace všech tří silic byly 62,5 ul/1. Celkem bylo použito 240 hlávek zelí odrůdy Foxma v 80 skleněných nádobách, kde každá varianta byly v 5 opakováních (= 5 skleněných nádob) a v každém opakování byly 3 hlávky. Pět skleněných nádob pouze s aplikací ethylacetátu byly kontrolou. Stanovení antifungálního účinku bylo hodnoceno na základě poměru růstu mycelia na hlávkách zelí v nádobách s odpařující se silicí oproti kontrolní variantě (hlávky zelí v nádobách bez odpařující se silice).

#### **4.3.1 Kmeny**

Použité kmeny *B. cinerea* pocházely z Kolekce kultur mikroorganismů VÚRV Sbírkou zemědělsky významných hub (akronym VURV-F) z Výzkumného ústavu rostlinné výroby. Byly použity kmeny VURV-F 506, 537, 538 a 578 izolované ze zelných hlávek.

#### **4.3.2 Chemikálie**

K experimentu byly použity tyto chemikálie:

- silice ze Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA),
  - tymiánová
  - z citronové trávy
- silice z oregana z Düllberg Konzentra GmbH & Co. KG (Hamburg, Německo) a
- ethylacetát z Lach-Ner s. r. o (Neratovice, Česká republika).

#### **4.3.3 Stanovení vlivu silic na hlávkách zelí**

Příprava experimentu započala vložení zvlhčeného filtračního papíru na dno skleněných nádob spolu s ethanolem vydezinfikovanými Petriho miskami, na které byly umístěny hlávky zelí. Svrchní listy hlávek byly poraněny a zaočkovány 100 µl suspenze jednotlivých kmenů a destilované vody. Množství mycelia pro přípravu jednotlivých suspenzí bylo pro jednotnost stanoveno spektrofotometricky. Skleněné nádoby se zaočkovaným zelím byly z vrchu zakryty filtračním papírem se stanoveným množstvím dané silice a ethylacetátu. U kontrolních nádob byly zakryty filtračním papírem s ethylacetátem. Následně byly skleněné nádoby uzavřeny hliníkovou fólií a inkubovány při teplotě 10 °C po dobu 1,5 měsíce. Přípravu experimentu ukazuje Obrázek 4 a Obrázek 5.

Růst kolonií na povrchu zelných hlávek byl hodnocen 3-krát v průběhu experimentu a to po 4 týdnech, 5 týdnech a 6 týdnech od zaočkování (dále první, druhé a třetí hodnocení), kdy byl také experiment ukončen. První dvě měření byly nárůsty na zelných hlávkách hodnoceny vizuálně hodnoceny bez jejich otevření pokusných boxů z důvodu zachování atmosféry v těchto boxech. Byly použity následující stupně míry napadení:

- 0 - žádný kolonie na hlávce
- 1 - velmi malá kolonie okolo místa zaočkování (do 10% průměru velikosti hlávky)
- 2 - větší kolonie okolo místa zaočkování (do 25% průměru velikosti hlávky)
- 3 - kolonie na velkém podílu hlávky (do 50% průměru velikosti hlávky)
- 4 - kolonie téměř celý vrchním povrchu hlávky (do 90% průměru velikosti hlávky)
- 5 - kolonie na téměř celém vrchním povrchu hlávky (90-100% průměru velikosti hlávky)

Při třetím hodnocení byly změřeny velikosti vyrostlých kolonií. Ze získaných dat byla vypočítána míra inhibice silice z poměru velikosti narostlých kolonií a velikosti hlávek ošetřených a neošetřených silicemi. Získaná data byla také různým způsobem porovnána pomocí programu STATISTICA. Pokud data pocházela z normálního rozdělení, byla použita parametrická jednofaktorová ANOVA ke zjištění rozdílu mezi porovnávanými daty s následným post hoc Scheffého testem ke zjištění, které skupiny dat se mezi sebou liší. V případě neparametrických testů ke zjištění rozdílů mezi porovnávanými skupinami dat byla použita Kruskal-Wallisova ANOVA s následným post hoc testem vícenásobného porovnání p hodnot ke zjištění signifikantních rozdílů mezi skupinami dat. Ve všech případech byla zvolena hladina významnosti 0,05.



Obrázek 4: Příprava experimentu s hlávkami v prostředí odpařujících se silic.



Obrázek 5: Hliníková folie s hlávkami zabraňuje úniku silic

#### 4.4 Vliv odpařujících se silic na patogenní působení *B. cinerea* na listové disky z krouhárenského zelí při skladování silic

Stanovení vlivu probíhalo vystavením poraněných a infikovaných listů krouhárenského zelí (odrůda Krautkaiser) jejich působení v alobalem uzavřených skleněných nádobách o objemu 0,7 litru. Použité silice (tymiánová, oreganová a silice z citronové trávy) byly vybrány na základě výsledků z experimentů popsanych v kapitole 4.1 a 4.2. Koncentrace aplikovaných silic 31,25  $\mu\text{l/l}$  a 62,5  $\mu\text{l/l}$ . Celkem bylo třeba připravit 140 skleněných nádob, kdy každá sklenice obsahovala jeden listový disk zelí o průměru 60 mm. Každá varianta měla pět opakování a kontrolou byly skleněné nádoby s filtračním papírem na něž byl aplikován pouze v ethylacetát.

##### 4.4.1 Kmeny

Použité kmeny *B. cinerea* pocházely z Kolekce kultur mikroorganismů VÚRV Sbírký zemědělsky významných hub (akronym VURV-F) z Výzkumného ústavu rostlinné výroby. Byly použity kmeny VURV-F 506, 537, 538 a 578 izolované ze zelných hlávek.

#### 4.4.2 Chemikálie

K experimentu byly použity tyto chemikálie:

- silice ze Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA),
  - tymiánová
  - z citronové trávy
- silice z oregana z Düllberg Konzentra GmbH & Co. KG (Hamburg, Německo) a
- ethylacetát z Lach-Ner s. r. o (Neratovice, Česká republika).

#### 4.4.3 Stanovení vlivu silic v zavařovacích sklenicích

Ze svrchních listů hlávek krouhárenského zelí byl vyříznut pravidelný kruhový disk o průměru 65 mm, jež byl vložen do každé zavařovací sklenice na ethanolem vydezinfikovanou Petriho misku umístěnou na sterilní vodou zvlhčeným filtračním papírem. Vrtákem o průměru 10 mm byl poraněn každý disk a zaočkován 50  $\mu$ l vodní suspenzí mycelia jednotlivých kmenů. Koncentrace mycelia v suspenzi bylo pro jednotnost stanoveno spektrofotometricky. Na hrdlo skleněné nádoby byl umístěn filtrační papír nasáknutý požadovanou koncentrací silice a sklenice byla uzavřena hliníkovou folií. Požadované koncentrace silic byly získány smícháním čisté silice s ethylacetátem. Kontrolní varianty byly s filtračním papírem, na nějž byl aplikován pouze ethylacetát. Všechny zavařovací sklenice byly uloženy do chladicího boxu při teplotě 8 °C po dobu 19 dní. Poté byly narostlé kolonie hub změřeny a získaná data vyhodnocena. Průběh experimentu je ukazuje Obrázek 6.



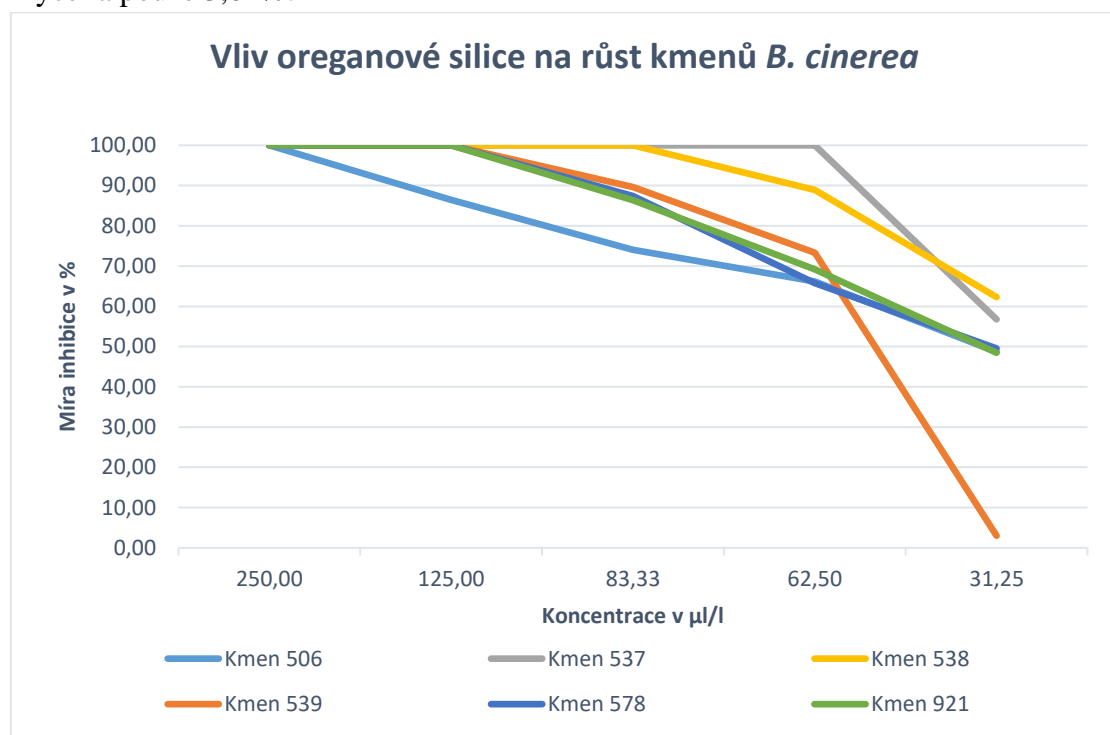
Obrázek 6: Příprava experimentu s disky ze zelených listů zaočkovánými kmenem 537 v prostředí odpařujících se silic v koncentracích 31,25  $\mu$ l/l a kontrolní variantou

## 5 Výsledky

### 5.1 Vliv přidavku esenciálních silic do kultivačního media na růst *B. cinerea* na agarovém kultivačním mediu

#### Silice z oregana

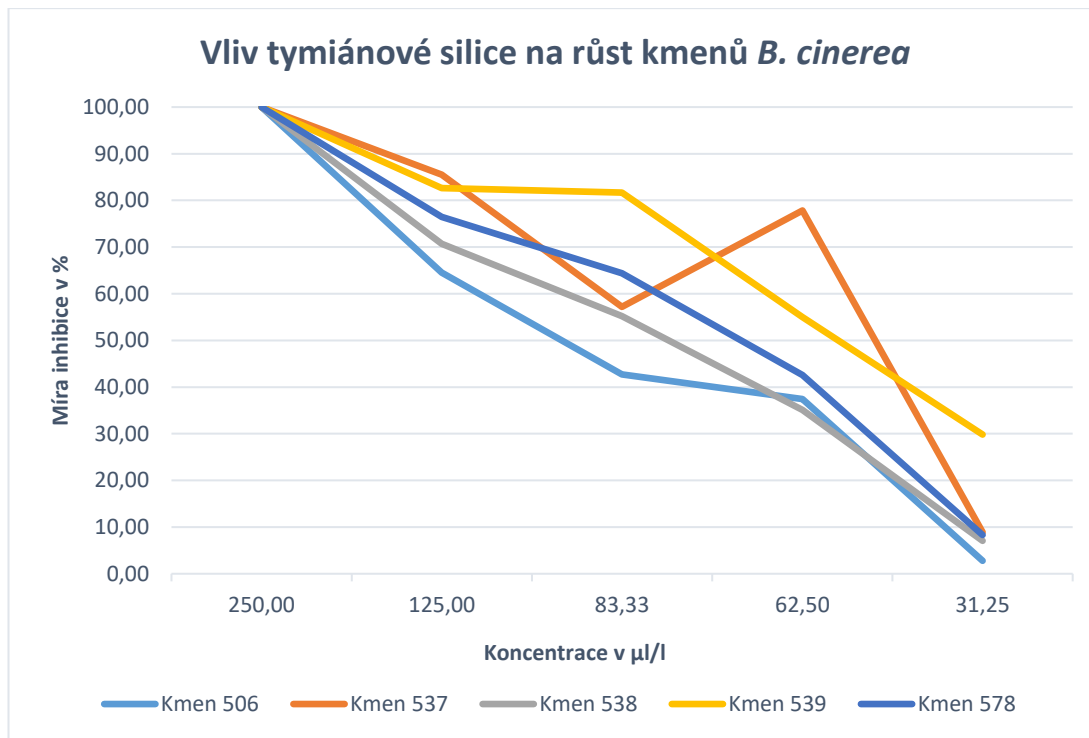
Z Grafu 1 je viditelné, že silice z oregana vykazovala velmi silnou antifungální aktivitu. Téměř u všech kmenů byla zaznamenána míra inhibice 100 % v koncentracích 250 a 125  $\mu\text{l/l}$  a míra inhibice přes 80 % v koncentraci 83,33  $\mu\text{l/l}$ . Nejsilnější vliv na růst mycelia měla na kmen 537, kde byl nárůst mycelia zpozorován až při koncentraci 31,25  $\mu\text{l/l}$ . Na kmen 539 silice působila nejméně, kde v koncentraci 31,25  $\mu\text{l/l}$  dosahovala tato silice inhibičního účinku na růst mycelia pouze 3,01%.



Graf 1: Vliv oreganové silice na růst kmenů *B. cinerea*

#### Tymiánová silice

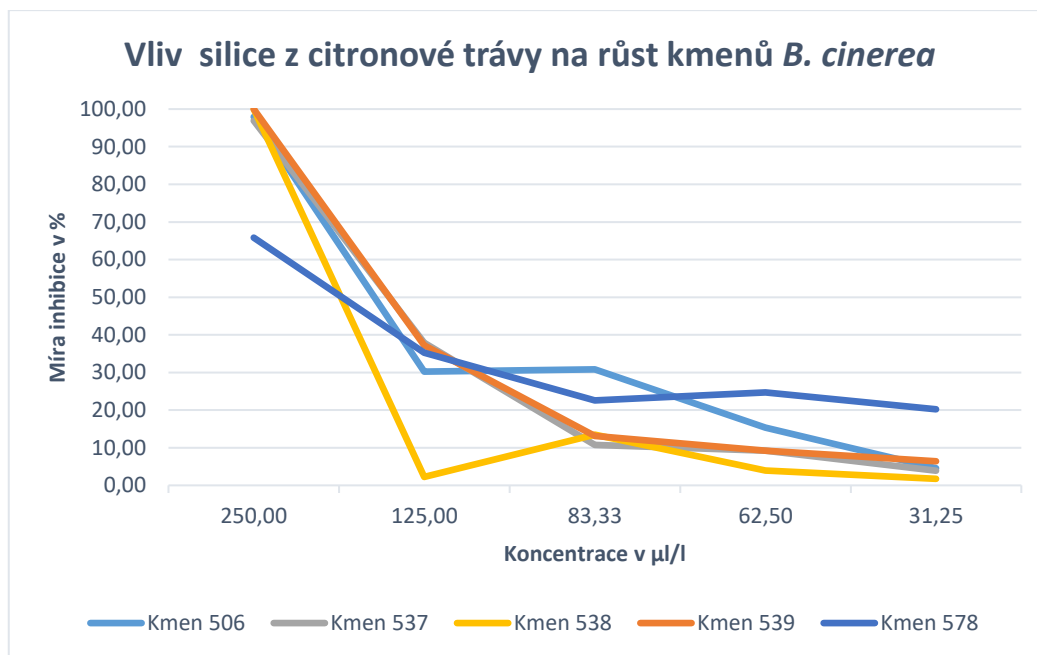
Další silicí se silnou antifungální aktivitou byla tymiánová silice. Graf 2 ukazuje vliv na jednotlivé kmeny v různých koncentracích. Nejvíce inhibovala kmen 539, u kterého byl i v nejmenší hodnocené koncentraci 31,25  $\mu\text{l/l}$  vypočtena míra inhibice 29,83 %. U ostatních kmenů se v této koncentraci pohybovala míra inhibice v rozmezí 2,78-8,91 %. Nejmenší vliv na růst mycelia měla silice na kmen 506, u kterého silice sice vykazovala v nejvyšší koncentraci 100 % míru inhibice, ale nejnižší míru inhibice vykazovala i u dalších koncentrací a u nejnižší koncentrace pouze 2,78 %. Růst mycelia byl pozorován u všech kmenů v koncentraci 125  $\mu\text{l/l}$ . U kmene 537 byl zpozorován větší účinek silice v koncentraci 62,5  $\mu\text{l/l}$  než v 83,33  $\mu\text{l/l}$ .



Graf 2: Vliv tymiánové silice na růst kmenů *B. cinerea*

### Silice z citronové trávy

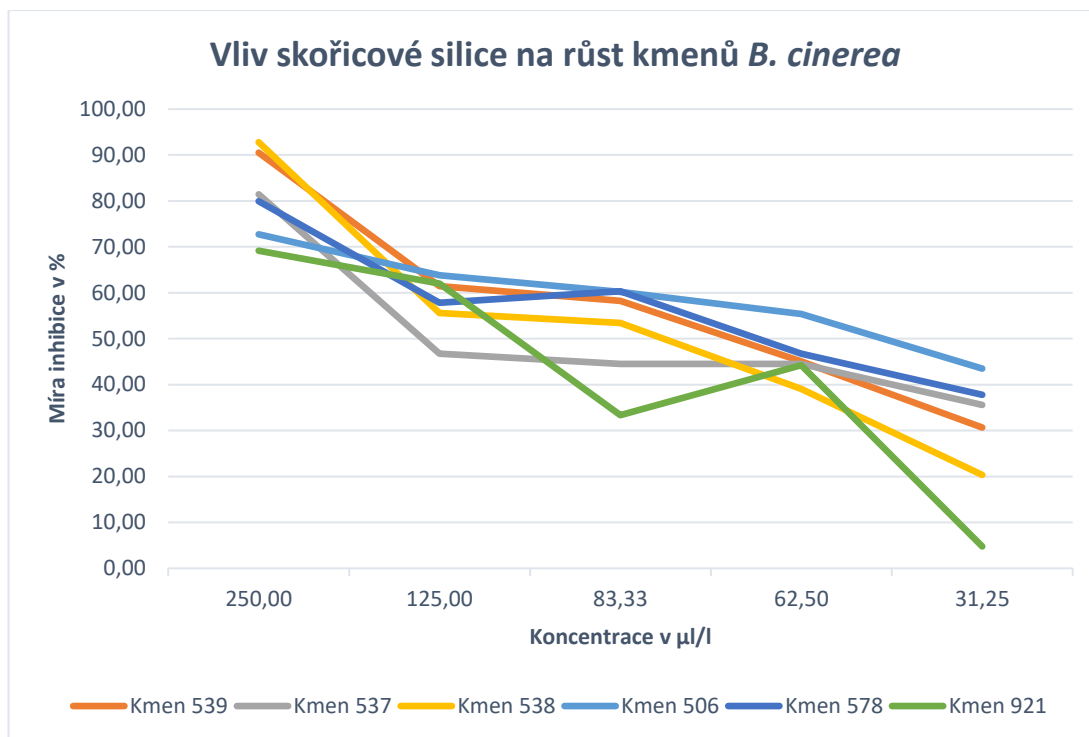
Silice citronové trávy vykazovala oproti tymiánové a oreganové silici slabší antifungální aktivitu, což ukazuje Graf 3. V koncentraci 250 µl/l byla 100 % inhibice u kmenů 538 a 539, zatímco u kmenů 506 a 537 byl růst mycelia inhibován z 97,94 % a 96,91 %. Ve stejné koncentraci silice nejméně inhibovala kmen 578 a to z 65,83 %. Viditelný růst mycelia byl u všech kmenů zpozorován v koncentraci 125 µl/l. U kmenů 506 a 538 byl zpozorován větší účinek silice v koncentraci 83,33 µl/l než v 125 µl/l.



Graf 3: Vliv silice z citronové trávy na růst kmenů *B. cinerea*

### **Skořicová silice**

Skořicová silice patřila k silicím se slabším antifungálním účinkem. Antifungální aktivitu silice je možné vidět na Grafu 4. V koncentraci 250 µl/l silice nepůsobila 100 % inhibičně jako u výše zmíněných silic, tudíž bylo možné pozorovat růst mycelií. V této koncentraci silice nejvíce inhibovala růst kmenům 538 a 539, zatímco nejmenší inhibice byla pozorována u kmenů 921 a 578. Největší inhibiční aktivitu silice vykazovala proti růstu mycelia u kmene 506, zatímco u kmene 921 byla schopnost inhibice nejmenší. Schopnost inhibovat růst mycelia u kmene 921 v koncentraci 31,25 µl/l byla pouhých 4,77 % a byl pozorován větší účinek silice v koncentraci 62,5 µl/l než v 83,33 µl/l. Větší inhibiční účinek silice v koncentraci 83,33 µl/l než 125 µl/l byl zaznamenán u kmenů 506 a 538, zatímco u kmene 578 byl zaznamenán větší inhibiční účinek v koncentraci 62,5 µl/l než 83,33 µl/l.

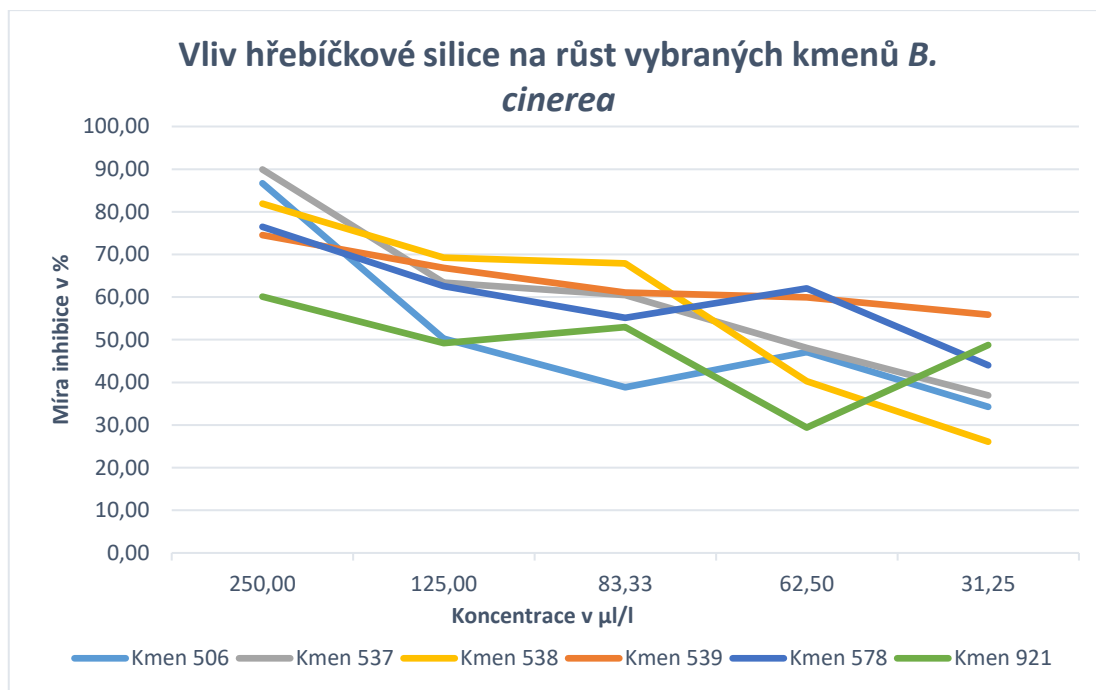


Graf 4: Vliv skořicové silice na růst kmenů *B. cinerea*

### Hřebíčková silice

Hřebíčková silice vykazovala slabší antifungální aktivitu, viz. Graf 5. V nejvyšší koncentraci (250 µl/l) silice neinhibovala růst mycelia ze 100 % žádného ze zkoumaných kmenů. V této koncentraci silice inhibovala z 89,92 % viditelný růst mycelia u kmene 537 a u kmene 506 z 86,69 %. Kmen 921 byl v této koncentraci inhibován jen z 60,1 %, zatímco v koncentraci 31,25 µl/l z 48,74 %. Nejvíce inhibovaným kmenem se ukázal kmen 539, zatímco nejméně kmen 921. U kmene 506 a 578 byl zpozorován větší účinek silice v koncentraci 62,5 µl/l než 83,33 µl/l, zatímco u kmene 921 v koncentraci 83,33 µl/l než 125 µl/l a 31,25 µl/l než 62,5 µl/l.



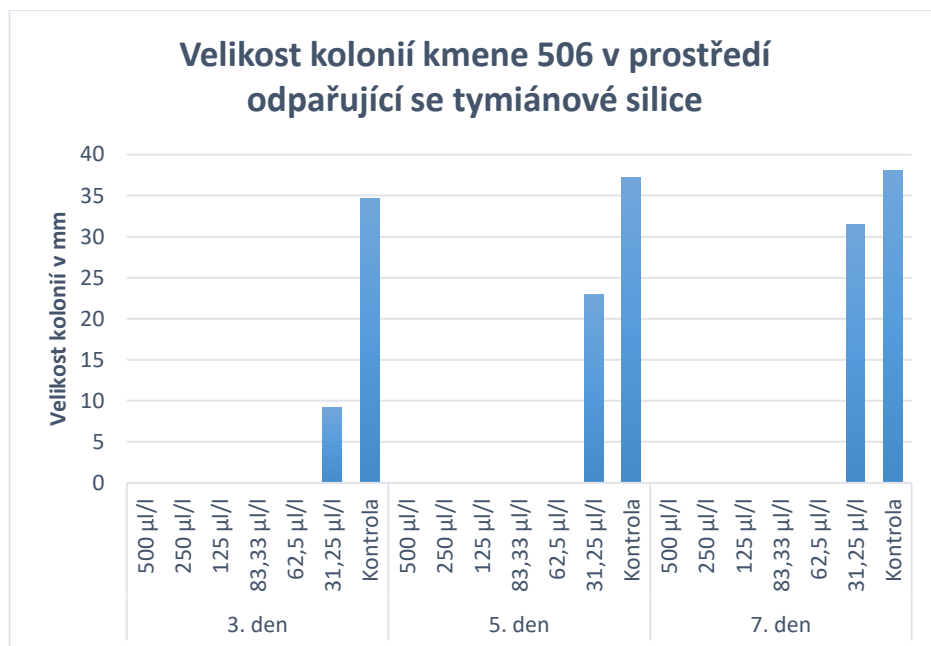


Graf 5: Vliv hřebíčkové silice na růst vybraných kmenů *B. cinerea*

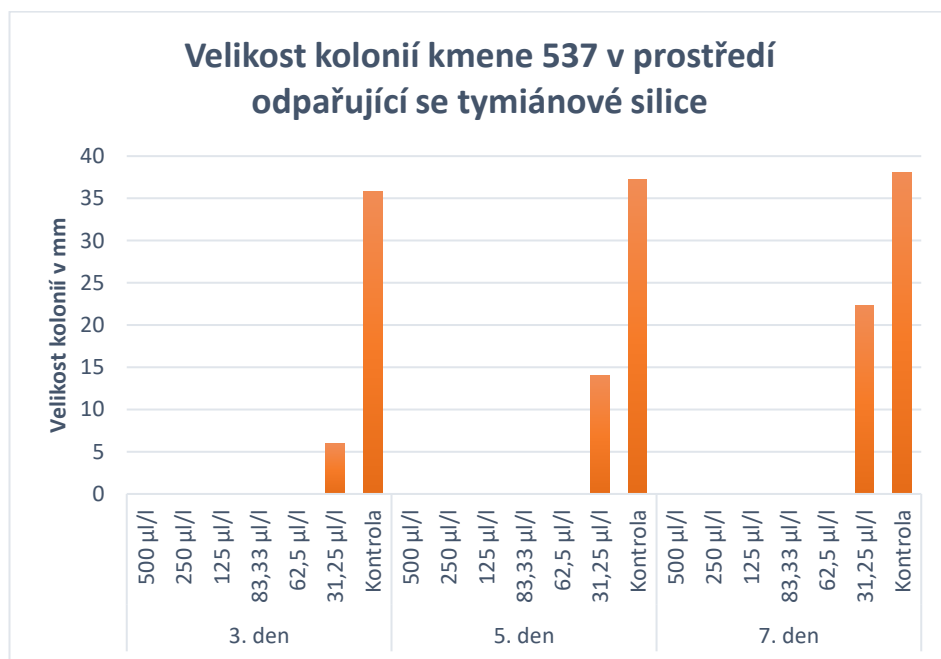
## 5.2 Vliv odpařujících se esenciálních silic na růst *B. cinerea* na agarovém kultivačním médiu

### Tymiánová silice

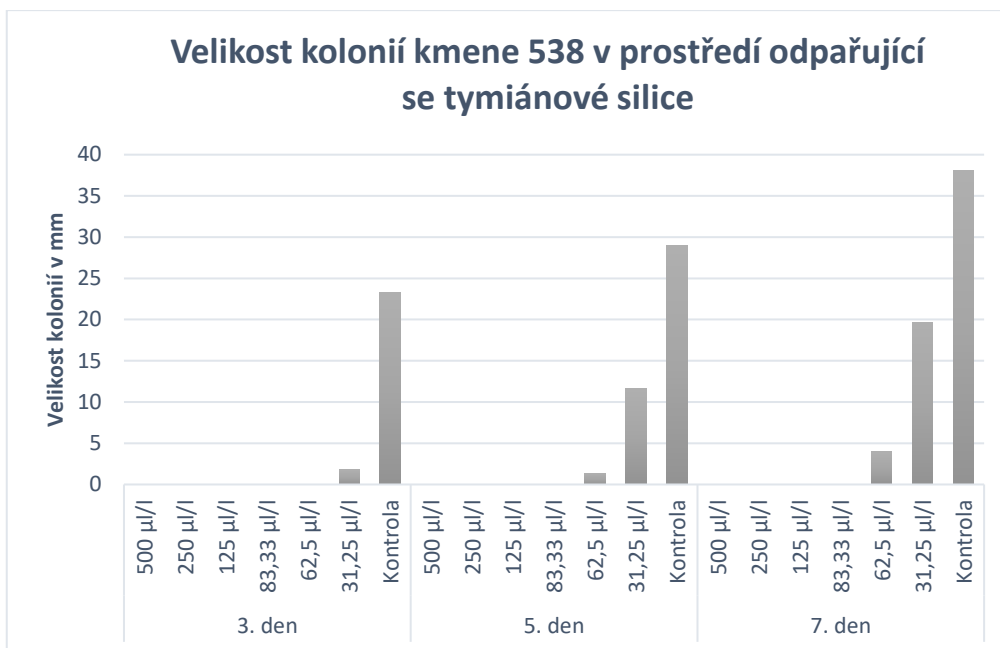
Tymiánová silice patřila k silicím se silnější antifungální aktivitou, viz. Graf 6-9. V průběhu všech třech měření byl zaznamenán u všech kmenů nárůst kolonií především až v prostředí silice o koncentraci 32,5 µl/l. Pouze u kmene 578 byl zjištěn růst kolonií v koncentracích silice 83,33 µl/l a 62,5 µl/l. Rozdíl v nárůstu kolonií byl zjištěn 3. den od zaočkování u kontrol mezi kmeny 506 a 537 a 537 a 538, 5. den od zaočkování u kmenů 506 a 538, 537 a 538 a také 538 a 578. 7. den od zaočkování nebyl zaznamenán významný rozdíl zřejmě z důvodu, že kolonie dorostly okraje misky a nebylo možné rozdíl zhodnotit.



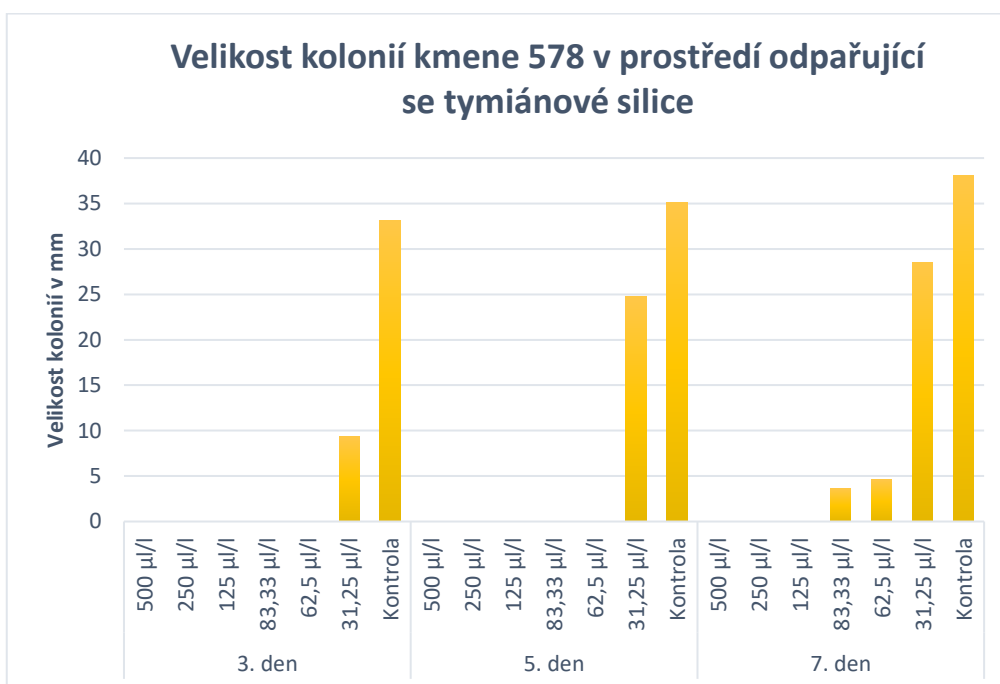
Graf 6: Velikost kolonií kmene 506 v prostředí odpařující se tymiánové silice



Graf 7: Velikost kolonií kmene 537 v prostředí odpařující se tymiánové silice



Graf 8: Velikost kolonií kmene 538 v prostředí odpařující se tymiánové silice



Graf 9: Velikost kolonií kmene 578 v prostředí odpařující se tymiánové silice

Graf 10 ukazuje vliv jednotlivých koncentrací odpařující se tymiánové silice na hodnocené kmeny *B. cinerea*. Při koncentracích 500, 250, 125, 83,33 a 62,5 µl/l byla zaznamenána 100% schopnost inhibovat růst kolonií u všech kmenů. V koncentraci 31,25 µl/l byl nejméně inhibován kmen 506, zatímco nejvíce kmen 538.

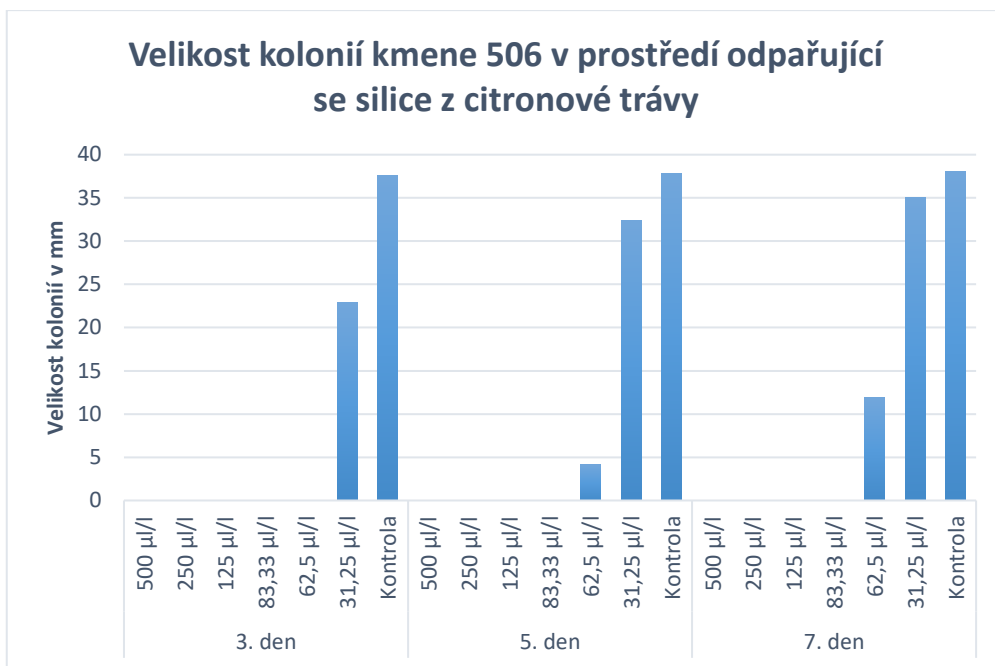


Graf 10: Vliv tymiánové silice na všechny kmeny *B. cinerea* 7. den po zaočkování

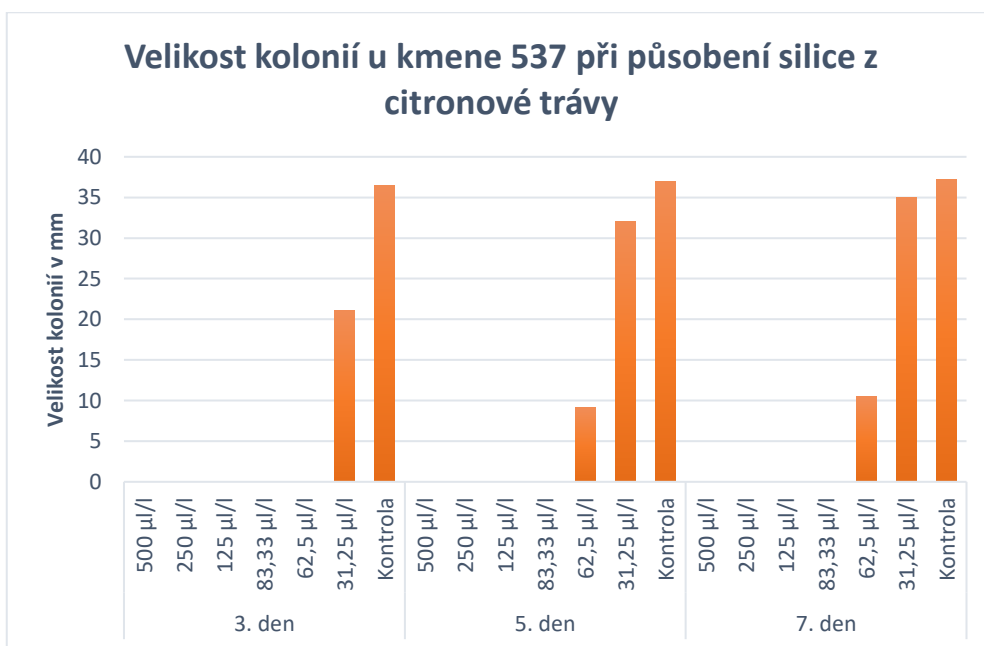
### Silice z citronové trávy

Růst kolonií kmenů *B. cinerea* byl v prostředí odpařující silice z citronové trávy ve větší míře omezen, viz Graf 11-14. Růst kolonií byl 3. den od zaočkování zaznamenán pouze v koncentraci 31,25 µl/l u všech kmenů, 5. den od zaočkování byl další výskyt kolonií zjištěn při koncentraci 62,5 µl/l u kmenů 506 a 537 a podobně byl zaznamenána 7. den od zaočkování u všech pozorovaných kmenů. U kmenů 538 a 578 byl zaznamenán 7. den měření od zaočkování také větší růst kolonie při koncentraci 31,25 µl/l než u kontrolních variant.

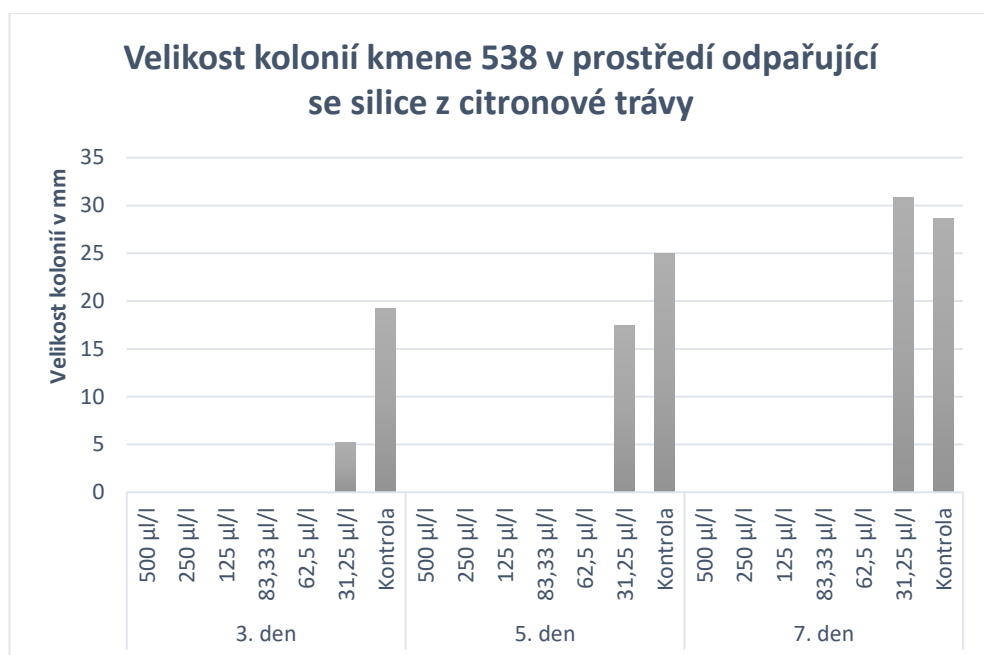
Signifikantní rozdíl ve velikosti kolonií 3. den od zaočkování při koncentraci 31,25 µl/l byl zjištěn mezi kmeny 506 a 538, 506 a 578, 537 a 538 nebo 537 a 578, zatímco 5. den a 7. den od zaočkování nebyly nalezeny významné rozdíly v koncentraci 62,5 µl/l (u kmenů 506 537) a 31,25 µl/l mezi žádnými kmeny.



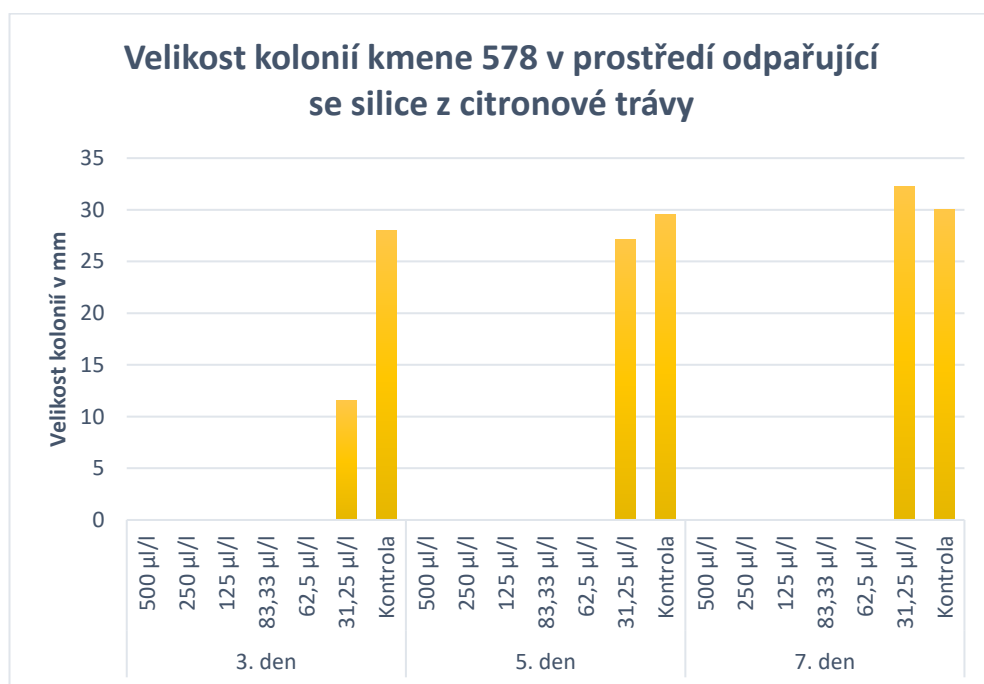
Graf 11: Velikost kolonií kmene 506 v prostředí odpařující se silice z citronové trávy



Graf 12: Velikost kolonií kmene 537 v prostředí odpařující se silice z citronové trávy

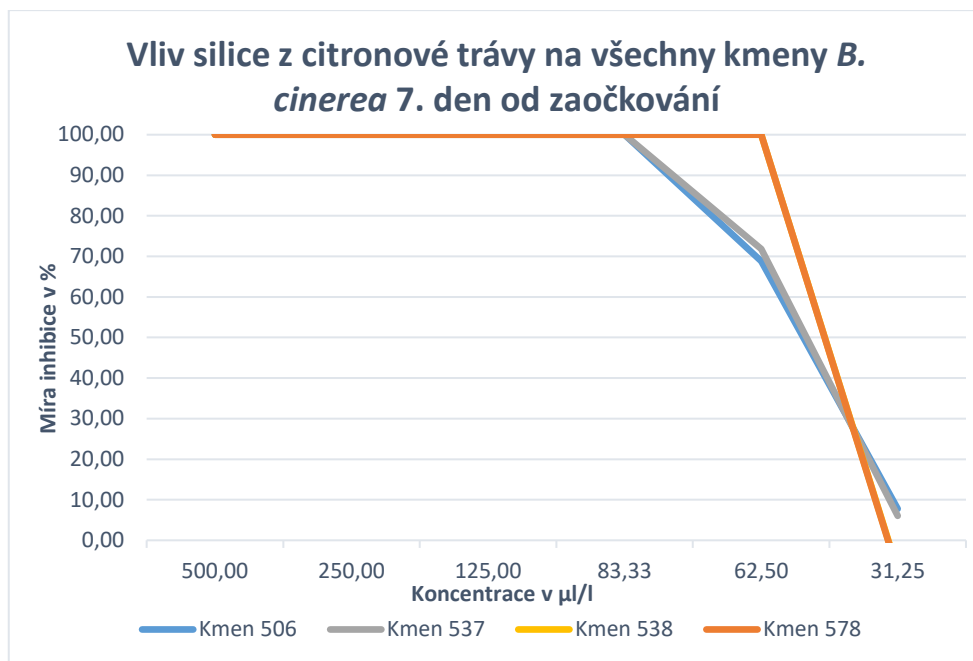


Graf 13: Velikost kolonií kmene 538 v prostředí odpařující se silice z citronové trávy



Graf 14: Velikost kolonií kmene 578 v prostředí odpařující se silice z citronové trávy

Antifungální aktivitu silice z citronové trávy ukazuje Graf 15. Silice inhibovala růst kolonií u všech kmenů ze 100 % při koncentracích od 500 µl/l do 83,33 µl/l a u kmene 578 také při koncentraci v 62,5 µl/l. Největší míru inhibice vykazovala silice v koncentraci 31,25 µl/l u kmene 506, zatímco u kmenů 538 a 578 byla zjištěna záporná míra inhibice. U těchto kmenů došlo k většímu růstu kolonií u variant s koncentrací 31,25 µl/l než u kontrolních variant.

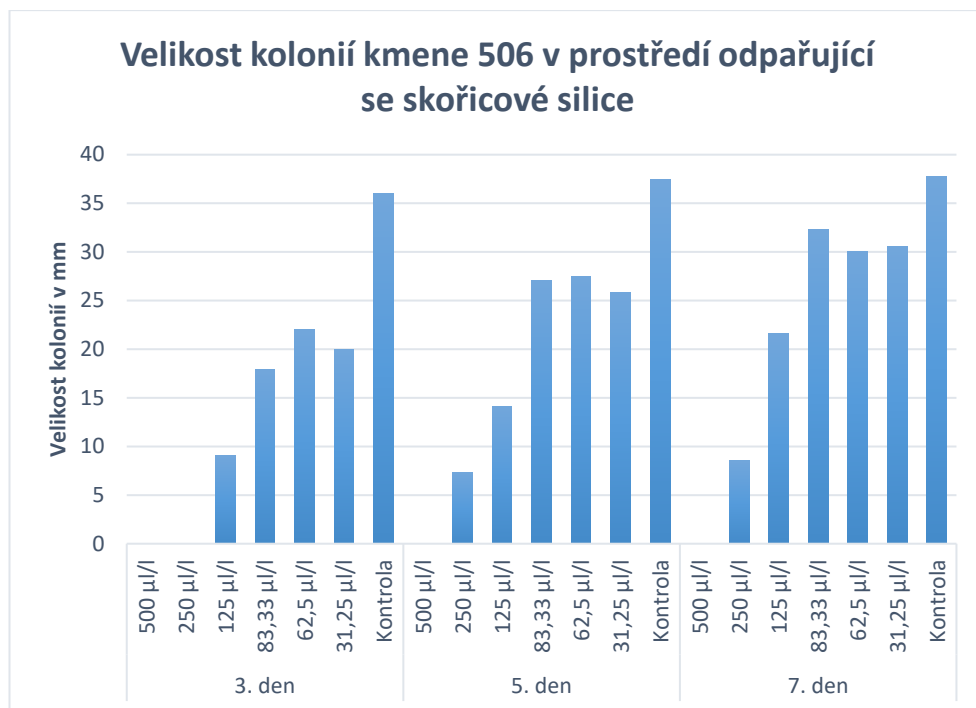


Graf 15: Vliv silice z citronové trávy na všechny kmeny *B. cinerea* 7. den od zaočkování

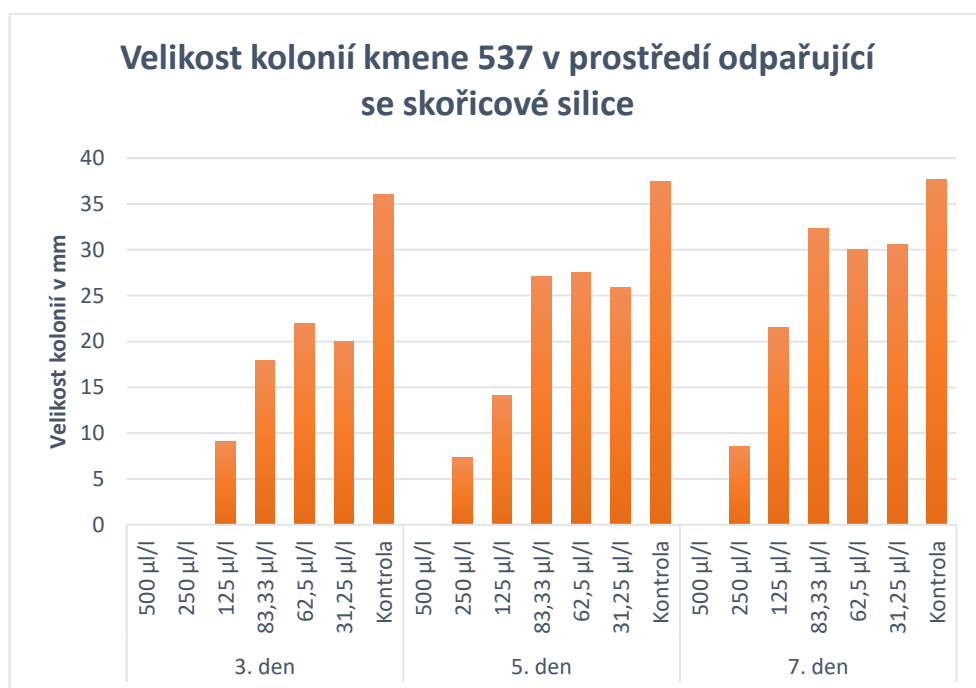
### **Skořicová silice**

Skořicová silice patřila k silicím se slabší antifungální aktivitou, viz Graf 16-19. Růst kolonií u kmenů v prostředí odpařující se skořicové silice byl 3. den od zaočkování zaznamenán při koncentracích 125 µl/l a nižších a 5. den od zaočkování byl zjištěn růst většiny kmenů při koncentraci 250 µl/l. 7. den od zaočkování byl výskyt růstu stejný jako předešlý den měření a koncentrace 500 µl/l byla jediná, při které nebyl zaznamenán růst kolonií. U kmenů 506 a 537 byl 3. den od zaočkování zjištěn větší růst kolonií při koncentraci 62,5 µl/l než 31,25 µl/l a obdobná situace byla zaznamenána i 5. den od zaočkování. 7. den od zaočkování byla zjištěna opačná situace, tedy větší růst kolonií při koncentraci 31,25 µl/l než 62,5 µl/l. U všech kmenů byl 7. den od zaočkování také zjištěn větší růst kolonií při koncentraci 83,33 µl/l než 62,5 µl/l.

Byl prokázán signifikantní rozdíl ve velikosti kolonií zaznamenaných u všech kmenů 3. den zaočkování u variant s koncentrací 125 µl/l, ale nelze s přesností říci mezi kterými kmeny. U kmenů 506 a 538 byl také 3. den od zaočkování prokázán významný rozdíl ve velikosti kolonií při koncentraci 83,33 µl/l a 62,5 µl/l a stejný den byl zjištěn významný rozdíl mezi kmeny 537 a 538. 5. den od zaočkování byl zaznamenán signifikantní rozdíl ve velikosti kolonií pouze při koncentraci 83,33 µl/l mezi kmeny 506 a 538, 537 a 538 a 7. den se všechny kmeny ve všech variantách pozorovaných koncentrací signifikantně nelišily.

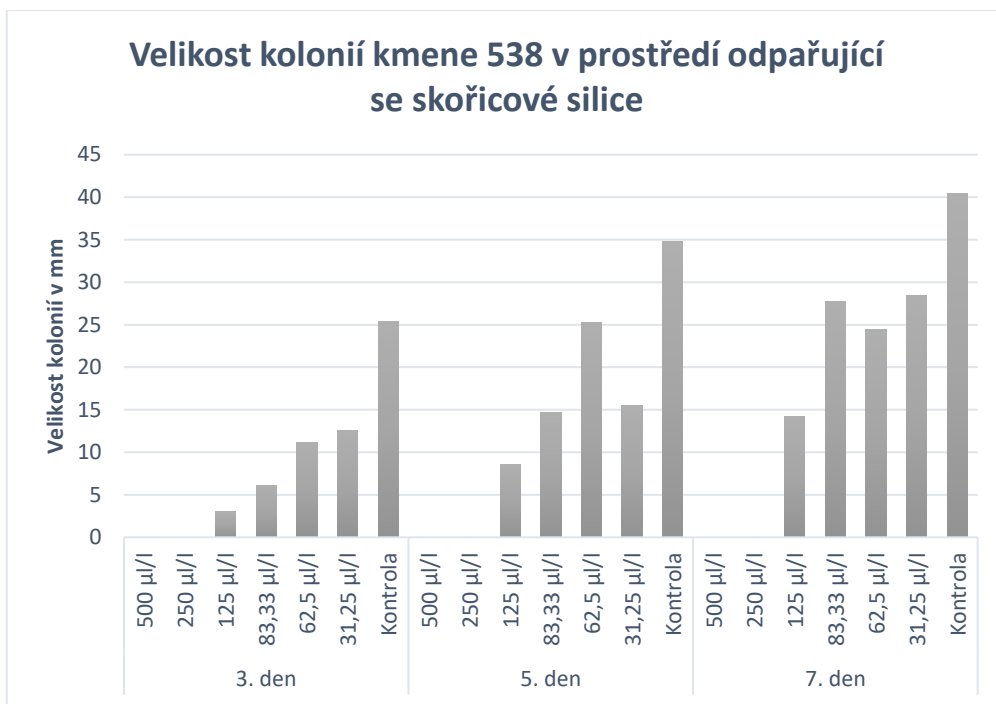


Graf 16: Velikost kolonií kmene 506 v prostředí odpařující se skořicové silice

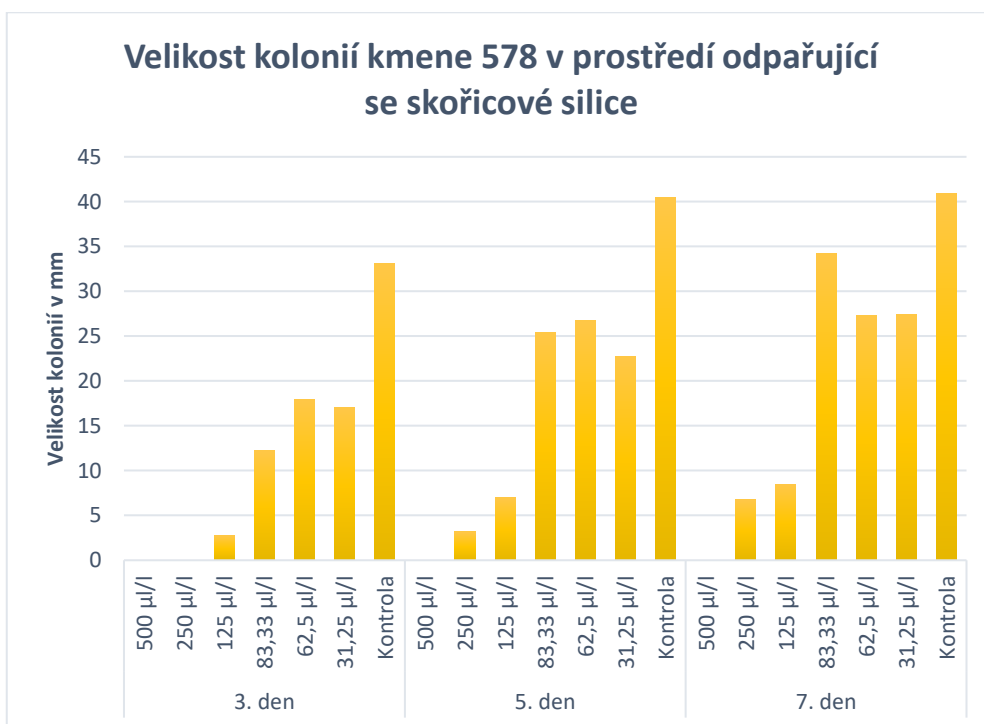


Graf 17: Velikost kolonií kmene 537 v prostředí odpařující se skořicové silice



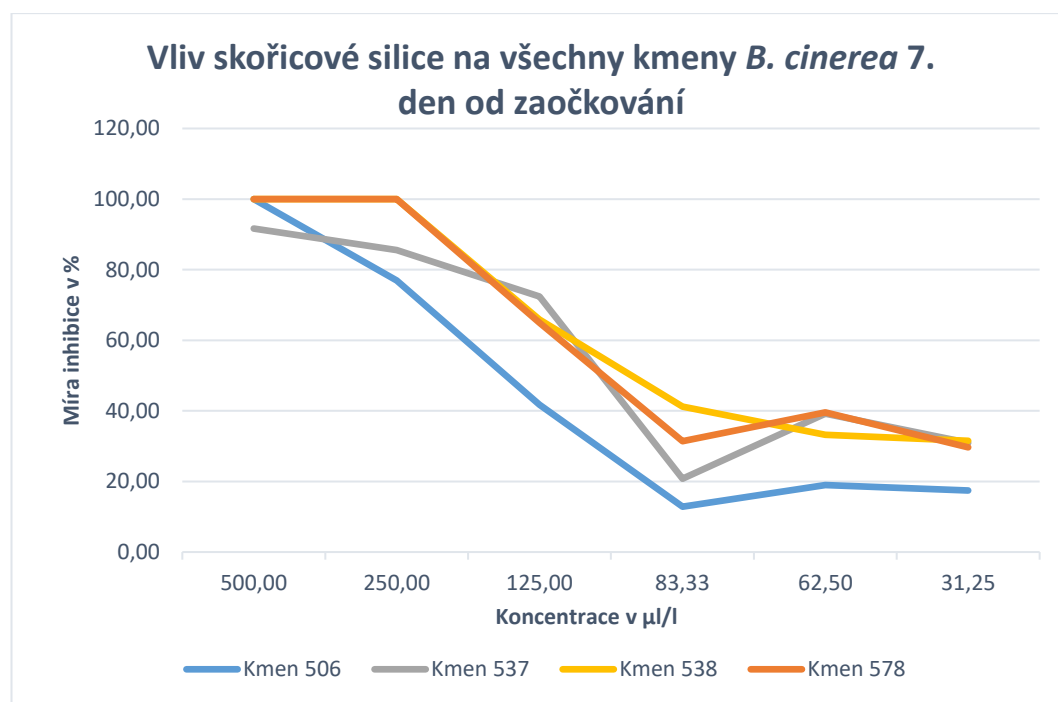


Graf 18: Velikost kolonií kmene 538 v prostředí odpařující se skořicové silice



Graf 19: Velikost kolonií kmene 578 v prostředí odpařující se skořicové silice

Antifungální aktivita skořicové silice ukazuje Graf 20. Při koncentraci 500 µl/l dosahovala téměř u všech kmenů míra inhibice 100 % a u kmene 537 dosahovala 91,65 %. U kmene 506 silice vykazovala téměř ve všech koncentracích nejmenší schopnost inhibovat růst kolonie a při koncentraci 31,25 µl/l dosahovala tato schopnost míry pouze 17,4 %. Největší schopnost inhibice můžeme v této koncentraci pozorovat u kmene 538. U kmenů 506, 537 a 578 byla zaznamenána vyšší míra inhibice růstu kolonií při koncentraci 62,5 µl/l než 83,33 µl/l.

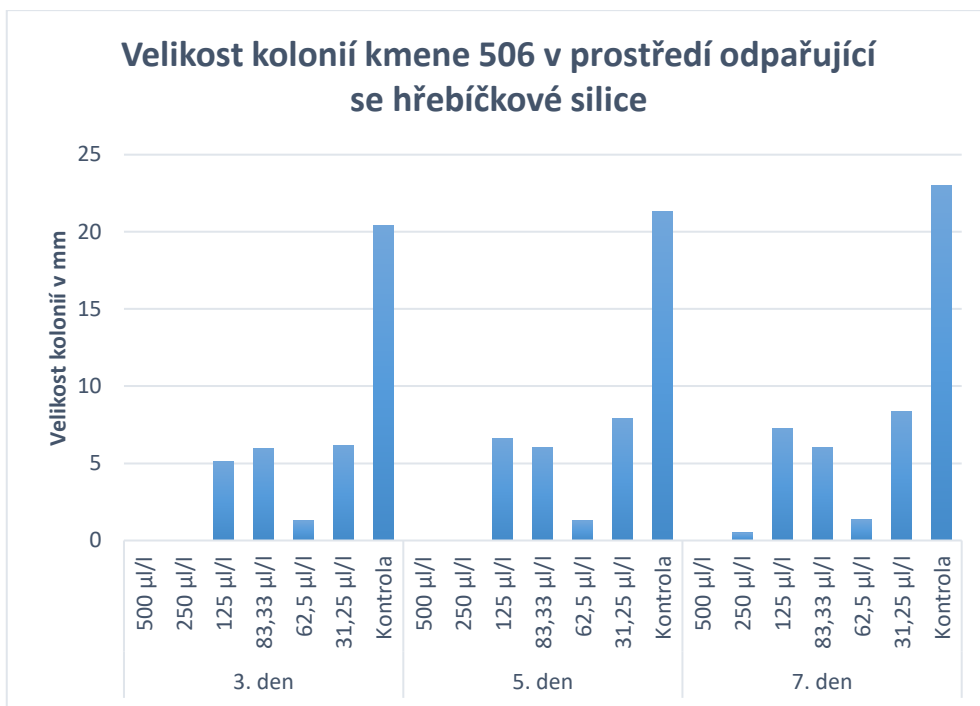


Graf 20: Vliv skořicové silice na všechny kmeny *B. cinerea* 7. den od zaočkování

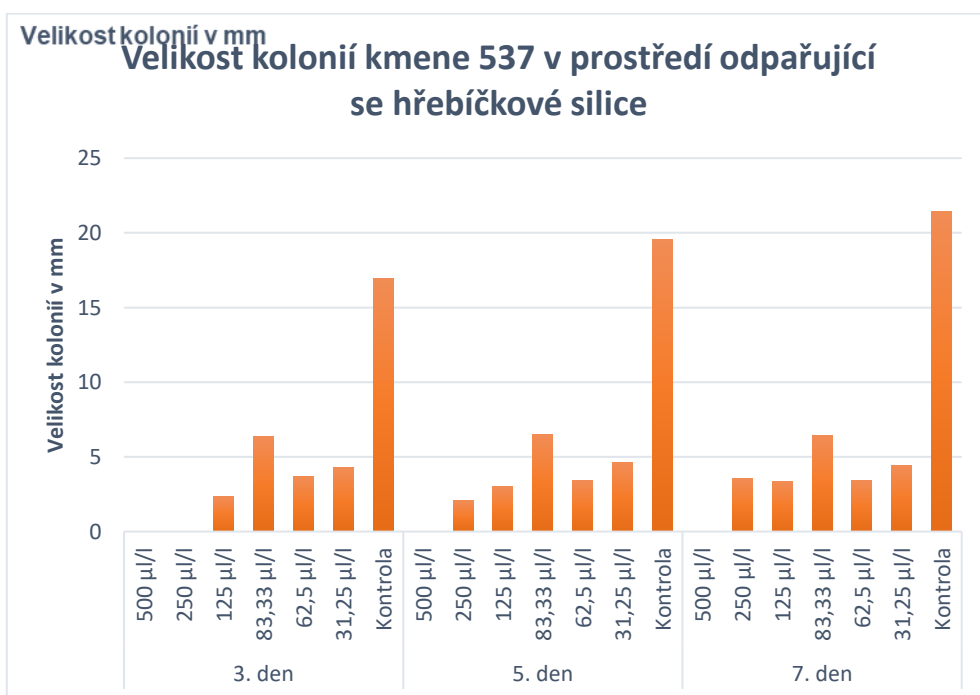
### Hřebíčková silice

Hřebíčková silice také patřila k silicím se slabou antifungální aktivitou, viz. Graf 21-24. 3. den od zaočkování byl viditelný růst kolonií v koncentraci 125 µl/l téměř u všech kmenů a 5. den od zaočkování byl zjištěn růst kolonií při koncentraci 250 µl/l u kmene 537. U kmenů 506 a 578 byl zaznamenán viditelný růst kolonií ve stejné koncentraci až 7. den zaočkování. Růst kolonií ve všech koncentracích u kmene 538 nebyl detekován v žádný den měření a kontrolní varianta měla velmi slabý růst. 3. a 5. den od zaočkování byl viditelně větší růst kolonií při koncentraci 125 µl/l než 83,33 µl/l u kmenů 506, 537 a 578. U kmenů 537 a 578 byl zjištěn 7. den po zaočkování větší růst kolonií při koncentraci 83,33 µl/l, zatímco u kmene 506 byla obdobná situace s viditelně větším růstem kolonií při koncentraci 125 µl/l.

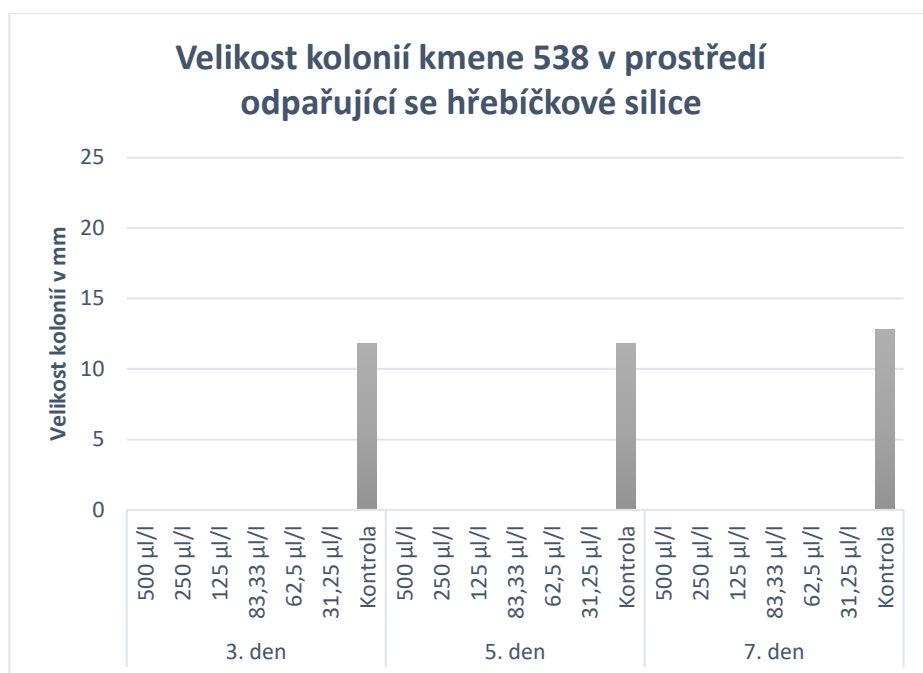
V růstu kolonií zaznamenaných u všech kmenů 3. den zaočkování u variant při koncentraci 125 µl/l byl prokázán signifikantní rozdíl, ale nelze s přesností říci mezi kterými kmeny. Dále 3. den od zaočkování byl zjištěn významný rozdíl v růstu kolonií při koncentraci 83,33 µl/l mezi kmeny 538 a 578 a při koncentraci 31,25 µl/l u kmenů 506 a 538 stejně jako 5. den po zaočkování. Ve stejný den měření byl prokázán při koncentraci 125 µl/l signifikantní rozdíl v růstu kolonií mezi kmeny 506 a 538, 538 a 578. Při koncentraci 83,33 µl/l byl 5. a 7. den od zaočkování zjištěn významný rozdíl mezi kmeny 506 a 538, 537 a 538, 538 a 578. 7. den od zaočkování byl zjištěn významný rozdíl v růstu kolonií u kmenů 506 a 538.



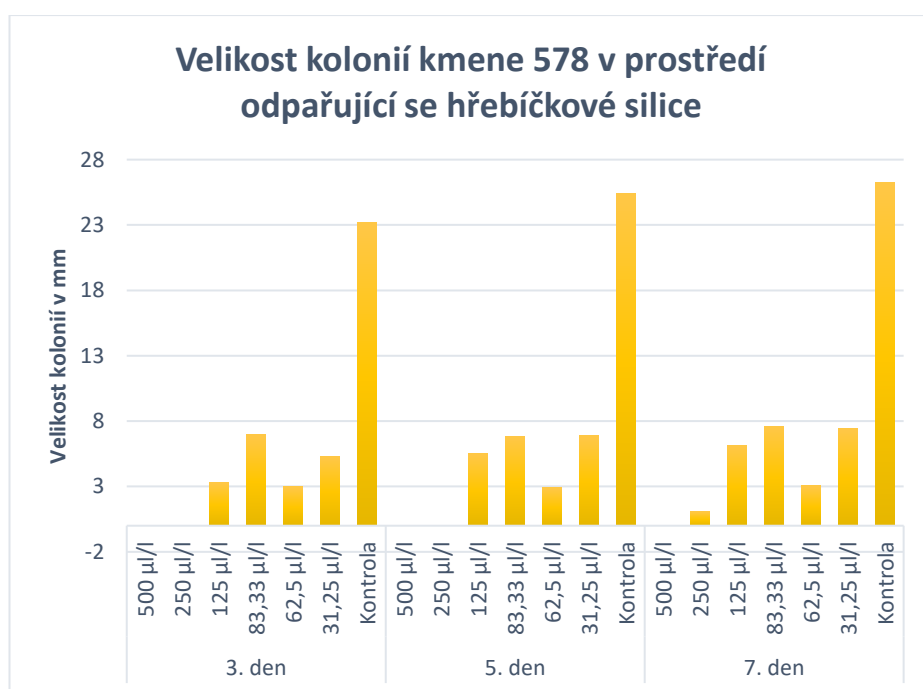
Graf 21: Velikost kolonií kmene 506 v prostředí odpařující se hřebíčkové silice



Graf 22: Velikost kolonií kmene 537 v prostředí odpařující se hřebíčkové silice

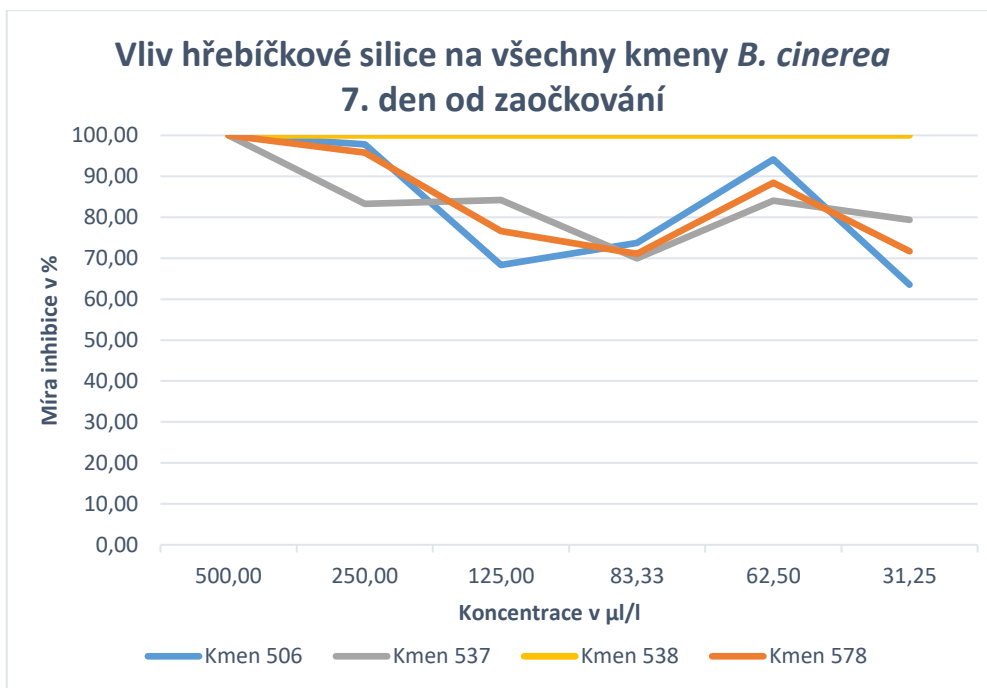


Graf 23: Velikost kolonií kmene 538 v prostředí odpařující se hřebíčkové silice



Graf 24: Velikost kolonií kmene 578 v prostředí odpařující se hřebíčkové silice

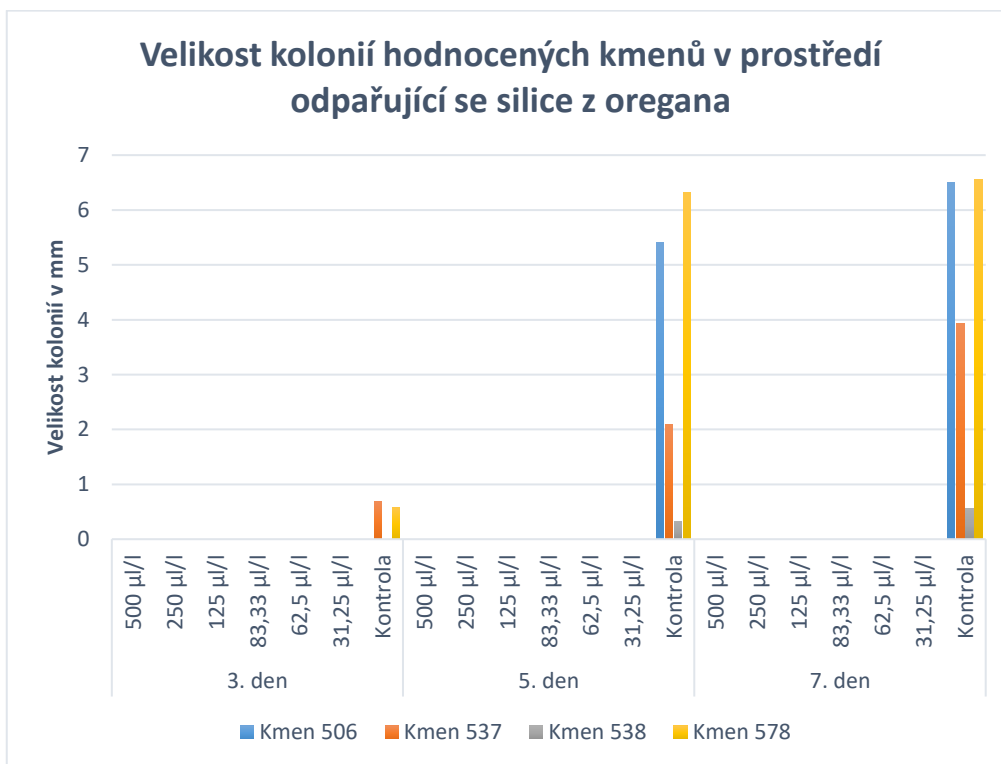
Antifungální aktivitu hřebíčkové silice ukazuje Graf 25 a je z něj vidět schopnost silice inhibovat růst kolonií všech kmenů. Konstantní křivka u kmene 538 se 100% mírou inhibice znamená žádný nárůst kolonií ve všech testovaných koncentracích. Při koncentraci 500 µl/l dosahovala u všech kmenů míra inhibice 100 %. U kmene 506 byla zaznamenána větší schopnost inhibice při koncentraci 83,33 µl/l než 125 µl/l a u všech kmenů dále můžeme pozorovat obdobný jev při koncentracích 62,5 µl/l než 83,33 µl/l.



Graf 25: Vliv hřebíčkové silice na všechny kmeny *B. cinerea* 7. den od zaočkování

### Silice z oregana

V prostředí odpařující se silice z oregana nedošlo k jedinému nárůstu kolonií u pozorovaných kmenů při všech testovaných koncentracích silice. Graf 26 ukazuje také minimální růst kolonií u kontrolních variant. Největší růst kolonie u kontrolních variant byl zaznamenán u kmenů 506 a 578, zatímco minimální viditelný růst byl zjištěn u kmene 538.



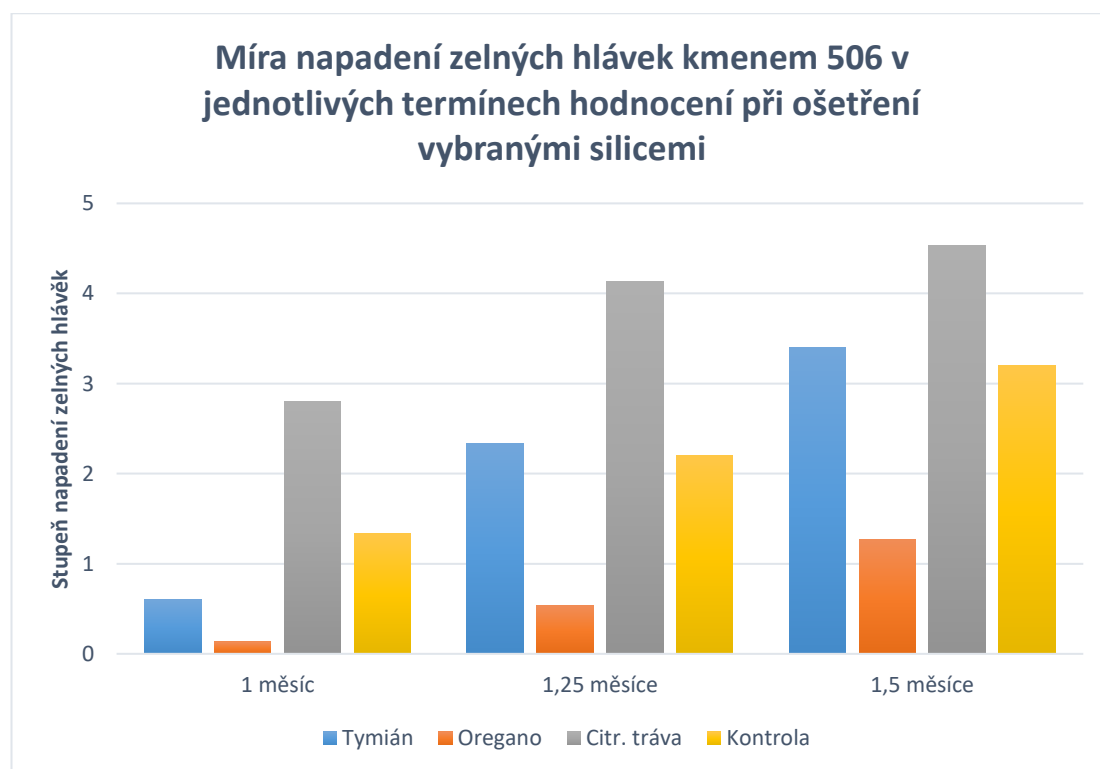
Graf 26: Velikost kolonií hodnocených kmenů v prostředí odpařující se silice z oregana

### 5.3 Vliv odpařujících silic na patogenní působení *B. cinerea* na hlávky zelí při skladování

#### Kmen 506

Průměrná míra napadení zelných hlávek kmenem 506 u tymiánové silice 4., 5. a 6. týden od zaočkování byly 1, 2,33 a 3,4. Průměrná míra napadení zelných hlávek u silice z oregana byly 4., 5. a 6. týden od zaočkování byly 0,13, 0,53 a 1,27. Průměrná míra napadení zelných hlávek u silice z citronové trávy byly 1,33, 2,2 a 3,2. Nejméně inhibující silicí na růst kolonií kmene 506 na zelných hlávkách během všech hodnocení byla silice z citronové trávy, zatímco oreganová silice potlačovala růst kolonií nejvíce. Při všech hodnoceních je z Graf 27 zřetelné, že velikost kolonií v prostředí silice z citronové trávy je větší než u kontrolních variant. V testování signifikantnosti rozdílů mezi variantami se silicí z citronové trávy a kontrolních variant ve všech dnech hodnocení pomocí Kruskal-Wallisovy ANOVY s následným post hoc testem vícenásobného porovnání p hodnot byl zjištěn pouze u druhého hodnocení.

U variant v prostředí odpařující se tymiánové silice nebo silice z citronové trávy byl zjištěn významný rozdíl mezi všemi hodnoceními velikosti kolonií na zelných hlávkách, zatímco v prostředí odpařující se oreganové silice a u kontrolních variant byl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi prvním a posledním hodnocením neboli 4 a 5 týdnů od zaočkování. První hodnocení se ve vlivu na růst kolonií se nejvíce lišily tymiánová silice a silice z oregana od silice z citronové trávy. Při druhém termínu hodnocení se velikost kolonií signifikantně odlišovala při ošetření silicí z citronové trávy od kontrolních variant a při posledním hodnocení byly rozdíly při ošetření silicí z oregana a silicí z citronové trávy.

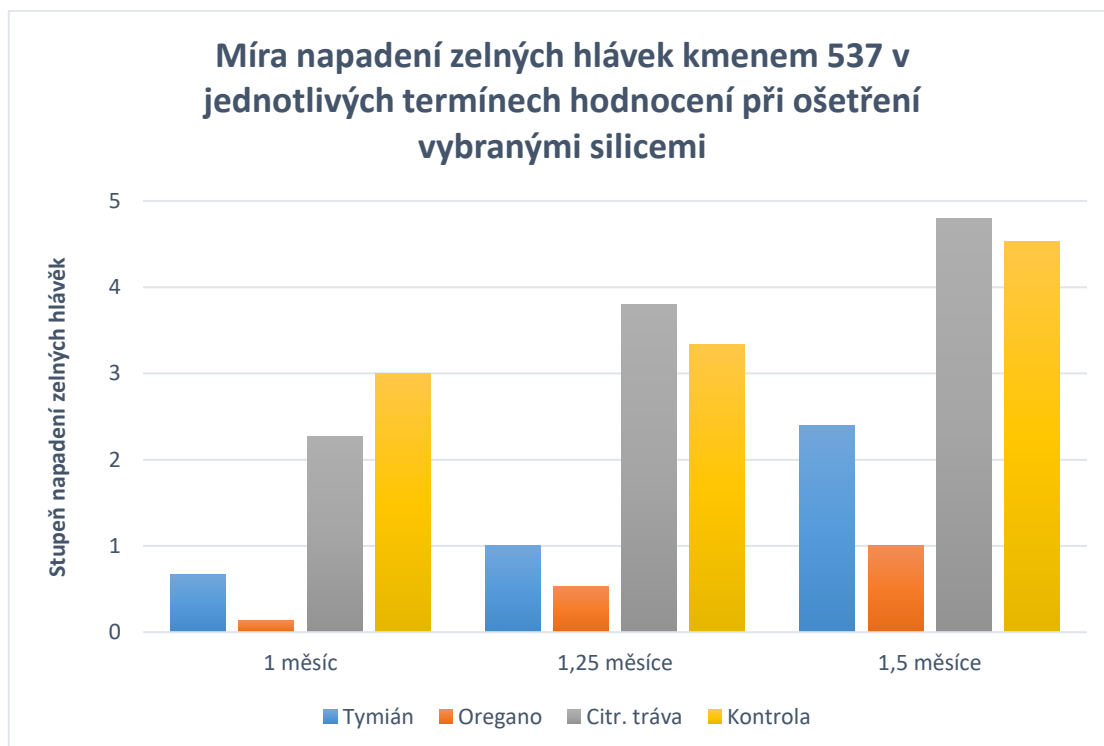


Graf 27: Míra napadení zelných hlávek kmenem 506 v jednotlivých termínech hodnocení při ošetření vybranými silicemi

## Kmen 537

Průměrná míra napadení zelných hlávek kmenem 537 u tymiánové silice 4., 5. a 6. týden od zaočkování byly 0,67, 1 a 2,4. Průměrná míra napadení zelných hlávek u silice z oregana byly 4., 5. a 6. týden od zaočkování 0,13, 0,53 a 1. Průměrná míra napadení zelných hlávek u silice z citronové trávy byly 2,27, 3,8 a 4,53. Silicí inhibující nejméně růst kolonií kmene 537 na zelných hlávkách během všech hodnocení byla silice z citronové trávy, zatímco oreganová silice potlačovala růst kolonií nejvíce. Při všech hodnoceních je z Grafu 28 patrné, že větší velikost kolonií v prostředí silice z citronové trávy byla zaznamenána při druhém a třetím měření než u kontrolních variant. Obrázek 7 ukazuje zelné hlávky inokulované kmenem 537 6 týdnů od zaočkování.

Pomocí Kruskal-Wallisovy ANOVY s následným post hoc testem vícenásobného porovnání p hodnot byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi variantami se silicí z citronové trávy a kontrolními variantami. U hlávek v prostředí odpařující se tymiánové silice nebo silice z oregana nebyl zjištěn významný rozdíl mezi všemi hodnoceními velikosti kolonií na zelných hlávkách, zatímco v prostředí odpařující se silice z citronové trávy byl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi všemi hodnoceními. Při prvním hodnocení se mezi sebou nejvíce lišily varianty ošetřené silicí z citronové trávy od silice z oregana a kontrolní varianty od variant ošetřené tymiánovou silicí nebo silicí z oregana. Při druhém a posledním hodnocení se signifikantně odlišovaly varianty ošetřené silicí z citronové trávy nebo kontrolní varianta od variant ošetřené silicí z oregana nebo tymiánovou silicí.



Graf 28: Míra napadení zelných hlávek kmenem 537 v jednotlivých termínech hodnocení při ošetření vybranými silicemi



Obrázek 7: Hlávky zelí inokulované kmenem 537 v kontrolní variantě 6 týdnů od zaočkování

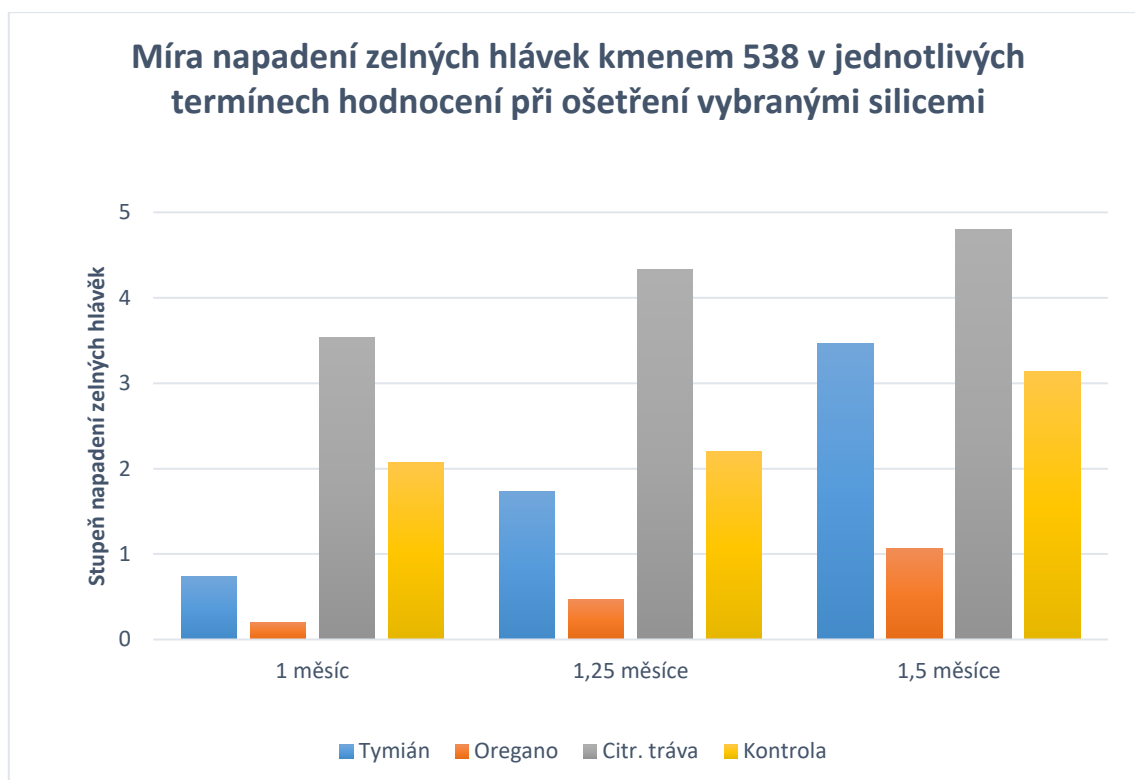
### **Kmen 538**

Průměrná míra napadení zelných hlávek kmenem 538 u tymiánové silice 4., 5. a 6. týden od zaočkování byly 0,73, 1,73 a 3,47. Průměrná míra napadení zelných hlávek u silice z oregana byly 4., 5. a 6. týden od zaočkování 0,2, 0,47 a 1,07. Průměrná míra napadení zelných hlávek u silice z citronové trávy byly 3,53, 4,33 a 4,8. Silicí inhibující nejméně růst kolonií kmene 537 na zelných hlávkách během všech hodnocení byla silice z citronové trávy, zatímco oreganová silice potlačovala růst kolonií nejvíce. Při všech hodnoceních je z Grafu 29 patrné, že větší velikost kolonií v prostředí silice z citronové trávy byla zaznamenána při druhém a třetím měření než u kontrolních variant. Obrázek 8 ukazuje hlávky zelí inokulované kmenem 538 ve variantě s odpařující se tymiánové silice 6 týdnů od zaočkování. Obrázek 9 ukazuje napadené zelné hlávky kmenem 538 v prostředí odpařující se silice z oregana 6 týdnů od zaočkování. Obrázek 10 ukazuje napadené zelné hlávky kmenem 538 v kontrolní variantě 6 týdnů od zaočkování.

Pomocí Kruskal-Wallisovy ANOVY s následným post hoc testem vícenásobného porovnání p hodnot byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi variantami se silicí z citronové trávy a kontrolními variantami. U hlávek v prostředí odpařující se tymiánové silice nebo silice z oregana nebyl zjištěn významný rozdíl mezi všemi hodnoceními velikosti kolonií na zelných hlávkách, zatímco v prostředí odpařující se silice z citronové trávy byl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi všemi hodnoceními. Při prvním hodnocení se mezi sebou nejvíce lišily varinaty ošetřené silicí z citronové trávy od silice z oregana a kontrolní varianty od variant ošetřených tymiánovou silicí nebo silicí z oregana. Při druhém a posledním hodnocení se



signifikantně odlišovaly varianty ošetřené silicí z citronové trávy nebo kontrolní varianta od variant ošetřených silicí z oregana nebo tymiánovou silicí.



Graf 29: Míra napadení zelných hlávek kmenem 538 v jednotlivých termínech hodnocení při ošetření vybranými silicemi



Obrázek 8: Hlávky zelí inokulované kmenem 538 ve variantě s odpařující se tymiánové silice 6 týdnů od zaočkování



Obrázek 9: Napadené hlávky zelí kmenem 538 v prostředí odpařující silice z oregana 6 týdnů od zaočkování



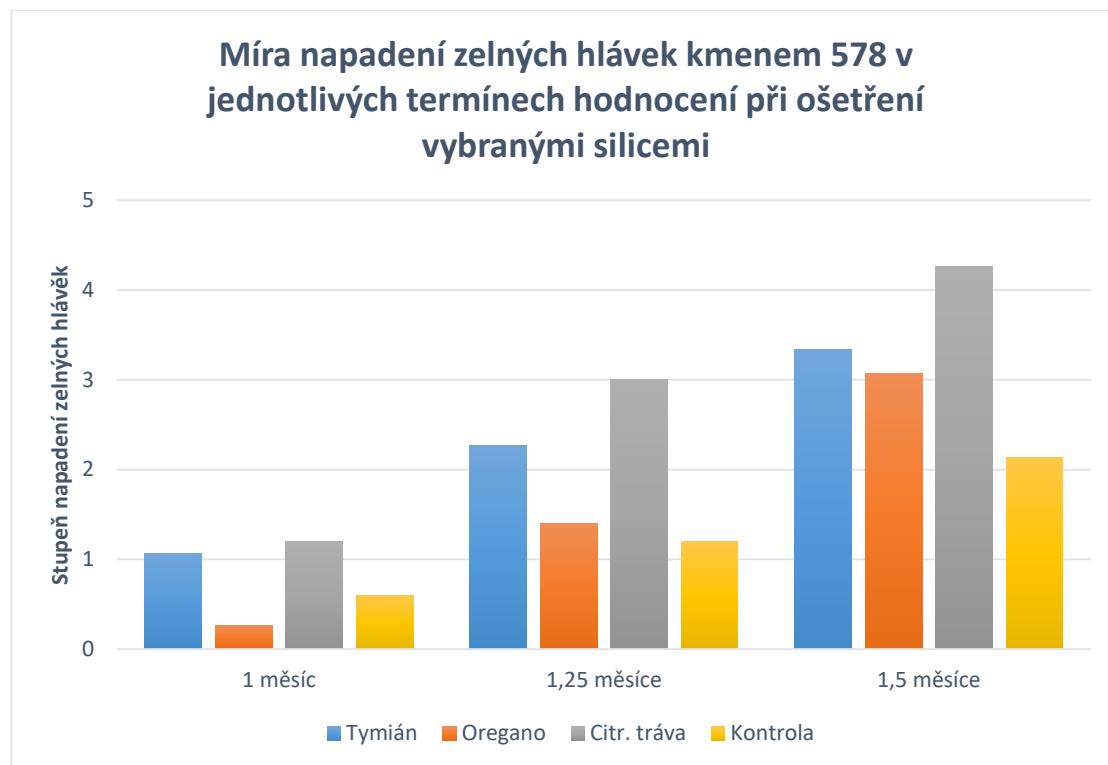
Obrázek 10: Hlávky zelí inokulované kmenem 538 v kontrolní variantě 6 týdnů od zaočkování. U hlávky vpravo pravděpodobně nedošlo k uchycení kmene a rozvoji infekce

### **Kmen 578**

Průměrná míra napadení zelných hlávek kmenem 538 u tymiánové silice 4., 5. a 6. týden od zaočkování byly 1,07, 2,27 a 3,33. Průměrná míra napadení zelných hlávek u silice z oregana byly 4., 5. a 6. týden od zaočkování 0,27, 1,4 a 3,07. Průměrná míra napadení zelných hlávek u silice z citronové trávy byly 1,2, 3 a 4,27. Silicí nejméně inhibující růst kolonií kmene 578 na zelných hlávkách během všech hodnocení byla silice z citronové trávy, zatímco oreganová silice potlačovala růst kolonií nejvíce. Při všech hodnoceních je z Grafu 30 patrné, že zřetelně větší velikost kolonií na hlávkách v prostředí silice z citronové trávy byl zaznamenán při druhém a třetím měření než u kontrolních variant. Velikost kolonií u kontrolních variant byla celkem malá, protože v posledním termínu hodnocení napadení hlávky dosáhlo průměrné hodnoty 2,13. Obrázek 11 ukazuje napadené zelné hlávky kmenem 538 v prostředí odpařující se silice z citronové trávy 6 týdnů od zaočkování.

Pomocí Kruskal-Wallisovy ANOVY s následným post hoc testem vícenásobného porovnání p hodnot byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi variantami se silicí z citronové trávy a kontrolními variantami. V prostředí odpařující se silice z oregana a byla zjištěna významná odlišnost prvního a druhého od posledního hodnocení velikosti kolonií na zelných hlávkách. U hlávek v prostředí odpařující se silice z citronové trávy byla zaznamenána signifikantní odlišnost prvního hodnocení od druhého a třetího hodnocení. U hlávek v prostředí odpařující se tymiánové silice byl zjištěn významný rozdíl mezi prvním a posledním hodnocením. U kontrolních variant nebyl zjištěn významný rozdíl mezi prvním a posledním hodnocením. První hodnocení se ve vlivu na růst kolonií nejvíce lišily silice oreganová silice od tymiánové silice a silice z citronové trávy. Při druhém a posledním hodnocení se ve vlivu na růst kolonií

signifikantně lišily hlávky ošetřené silice z oregana od citronové trávy a silice z citronové trávy od kontrolních variant.

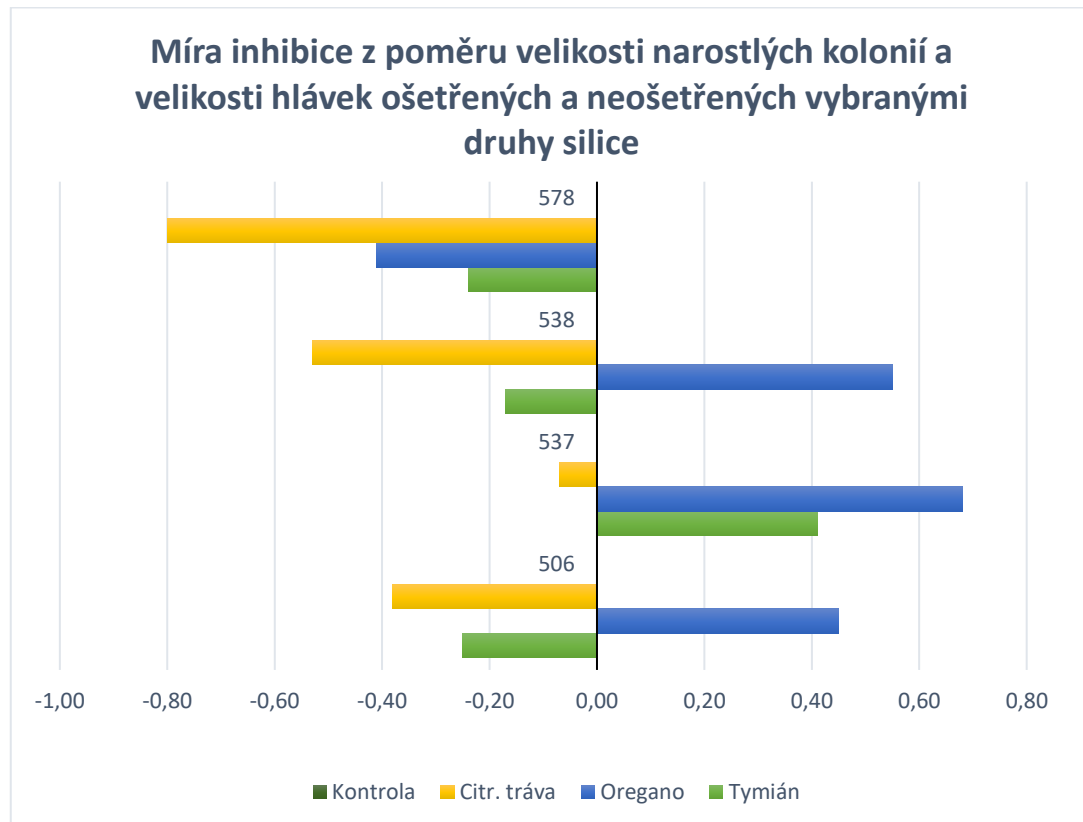


Graf 30: Míra napadení zelných hlávek kmenem 578 v jednotlivých termínech hodnocení při ošetření vybranými silicemi



Obrázek 11: Hlávky zelí inokulované kmenem 538 ve variantě s odpařující se silicí z citronové trávy 6 týdnů od zaočkování

Graf 31 ukazuje vliv odpařujících se silic na růst kolonií jednotlivých kmenů na zelných hlávkách. Graf přesněji ukazuje míru inhibice vypočítanou na základě poměru velikosti narostlých kolonií a velikosti hlávek ošetřených a neošetřených silicemi. Největší schopnost inhibice měla silice z oregana. Dále graf znázorňuje i negativní schopnost inhibice silice, zejména u silice z citronové trávy a tymiánové silice.



Graf 31: Míra inhibice z poměru velikosti narostlých kolonií a velikosti hlávek ošetřených a neošetřených vybranými druhy silice

#### 5.4 Vliv odpařujících se silic na patogenní působení *B. cinerea* na listové disky z krouhárenského zelí při skladování silic

Během experimentu byl zaznamenán růst mycelia pouze v kontrolních variantách. v ostatních variantách se silicemi nebyl pozorován žádný růst mycelia v žádné z obou hodnocených koncentrací 31,25  $\mu\text{l/l}$  a 62,5  $\mu\text{l/l}$ . Graf 32 ukazuje růst kolonií na discích ze zelných listů při působení vybraných silic 19. den od založení experimentu. Obrázek 12-13 ukazují kolonie *B. cinerea* na listových discích v kontrolních variantách po 19. dnech od založení experimentu.



Graf 32: Růst kolonií na discích ze zelných listů při působení vybraných silic 19. den od založení experimentu



Obrázek 12: Kolonie *B. cinerea* (kmen 537 – vlevo; kmen 578 - vpravo) na listových discích v kontrolních variantách po 19. dnech od založení experimentu



Obrázek 13: Kolonie *B. cinerea* (kmen 538 – vlevo; kmen 506 - vpravo) na listových discích v kontrolních variantách po 19. dnech od založení experimentu

## 6 Diskuze

Diplomová práce se zabývala studiem citlivosti kmenů *B. cinerea* vůči vybraným rostlinným silicím v *in vitro* a *in vivo* podmínkách na skladovaném hlávkovém zelí. V *in vitro* podmínkách byla citlivost zjišťována jednak při přidání silic do agarového živného media v Petriho miskách a také v prostředí odpařujících se silic v Petriho miskách, zatímco *in vivo* experimenty zahrnovaly aplikaci kmenů na zelné hlávky a disky ze zelných listů v prostředí odpařujících se silic. Kmeny *B. cinerea* pocházely ze Kolekce kultur mikroorganismů VÚRV Sběrka zemědělsky významných hub ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby.

Kontrola a ochrana rostlin proti infekcím způsobených *B. cinerea* je předmětem zkoumání v ochraně rostlin, protože způsobují infekce ve všech technologických stadiích rostlin. Syntetické fungicidy jsou standardním řešením, jak tuto problematiku řešit. Od použití syntetických fungicidů se ustupuje především z důvodu ochrany životního prostředí a zdraví člověka. Hlavním důvodem zkoumání je, jejich nižší toxicita silic vůči prostředí a lidskému zdraví (Tripathi et al. 2008).

### 6.1 Antifungální aktivita silic

Výsledky této diplomové práce ukazují, že schopnost jednotlivých silic inhibovat růst kolonií se liší u jednotlivých kmenů *B. cinerea*. Na základě výsledků z *in vitro* experimentů byly vybrány silice k dalšímu testování v *in vivo* experimentech. V *in vitro* i *in vivo* podmínkách byla neúčinnější silice z oregana. *In vivo* experimenty naznačují, že silice měly v simulovaném skladovacím experimentu fungicidní vliv na růst kolonií kmenů *B. cinerea*.

#### 6.1.1 *In vitro* experimenty

Metoda hodnocení citlivosti kmenů *B. cinerea* při rozpuštění silic do agarového živného média je účinnou a běžně používanou metodou. Ze statistického testování dat ( $p=0,05$ ) jsou patrné rozdíly v testovaných koncentracích (250, 125, 83,33, 62,5 a 31,25  $\mu\text{l/l}$ ) v rámci určitého kmene a určité silice a také při vzájemném porovnání všech kmenů v určitých koncentracích v rámci určité silice. Byla zjištěna účinnost silic k potlačení růstu kolonií všech kmenů. Nejsilněji působící silicí se ukázala silice z oregana, která úplně inhibovala růst kolonií téměř všech kmenů i v koncentraci 125  $\mu\text{l/l}$  a byl zjištěn omezený růst při koncentraci 83,33  $\mu\text{l/l}$ . Almasaudi et al. 2022 také referují ve svém experimentu s *B. cinerea* na Petriho miskách o silném účinku silice z oregana. Autoři této studie však uvádějí efektivní inhibiční schopnost této silice v o poznání větších koncentracích, tj. 800  $\mu\text{l/l}$  a 1000  $\mu\text{l/l}$  a při koncentracích 400 a 600  $\mu\text{l/l}$  prokazatelné potlačování růstu kolonií. Další účinně působící silicí proti růstu kolonií *B. cinerea* byla tymiánová silice, jež v koncentraci 250  $\mu\text{l/l}$  ukázala úplnou inhibiční schopnost. Vitoratos et al. 2013 ve svém experimentu s *B. cinerea* a dalšími druhy hub na Petriho miskách uvádějí významnou inhibiční schopnost tymiánové silice už v koncentraci 130  $\mu\text{l/l}$  (přepočtených 0,13  $\mu\text{l/ml}$ ).

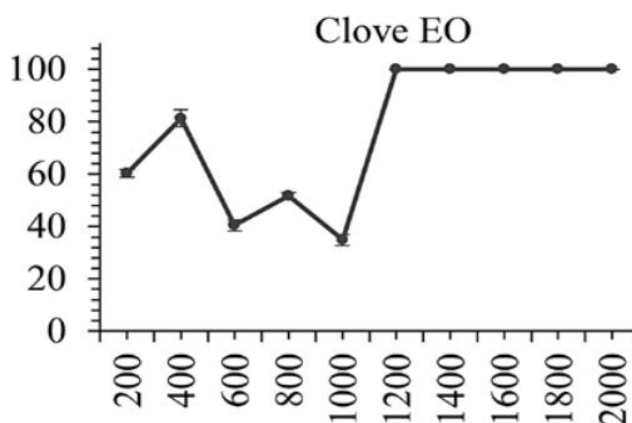
Silice z citronové trávy vykazovala slabší antifungální aktivitu než výše zmíněné silice, ale stále potlačující růst kolonií. V koncentraci 250  $\mu\text{l/l}$  bylo zaznamenáno u některých kmenů významné potlačení růstu kolonií. Kamsu et al. 2019 ve své studii uvádějí, že silice z citronové trávy měla významné fungicidní účinky ve větší koncentraci 500  $\mu\text{l/l}$ . Tento rozdíl může být



zapříčiněn odlišností mezi druhy zkoumaných hub (*B. cinerea* x *Colletotrichum musae*, *Fusarium incarnatum* and *F. verticillioides*).

Skořicová a hřebíčková silice vykazovaly podobné antifungální účinky proti růstu kolonií *B. cinerea*. Vliv na růst kolonií u všech zkoumaných kmenů byl zřejmý ve všech koncentracích a významnou antifungální aktivitu bylo možné sledovat v koncentraci 250  $\mu\text{l/l}$ . Z výsledků experimentu vyplývají určité antifungální účinky u obou silic, ale tyto účinky se lišily mezi jednotlivými kmeny a koncentracemi silic. Výše zmíněná studie Almasaudi et al. 2022 uvádí supresivní vlastnosti skořicové silice v koncentracích 400 a 600  $\mu\text{l/l}$  a nejlepší koncentrace potřebné k inhibici růstu 800  $\mu\text{l/l}$  a 1000  $\mu\text{l/l}$ . Jedná se poměrně vyšší koncentrace oproti koncentracím testovaných v předložené práci. Šernaitě et al. 2020 uvádějí ve svém diskovém experimentu s *B. cinerea* z jahodníku fungicidní vlastnosti hřebíčkové silice v koncentracích 200-1000  $\mu\text{l/l}$  a 100% potlačení růstu v koncentracích nad 1200  $\mu\text{l/l}$ . Opět se jedná o mnohem vyšší koncentrace oproti koncentracím testovaných v našem experimentu.

Během experimentu bylo možné pozorovat větší růst kolonií ve větších koloniích než u menších koncentrací. Tento jev se v našem experimentu objevil téměř u všech silic kromě silice z oregana. Šernaitě et al. 2020 se ve svém experimentu setkali s obdobným jevem v koncentracích mezi 600  $\mu\text{l/l}$  a 1000  $\mu\text{l/l}$  (Graf 33). Bohužel však neuvádějí možné důvody tohoto jevu. Důvody tohoto chování v našem experimentu mohou být větší stimulace růstu kolonií při vyšších koncentracích, složení silice a vliv jejích složek na růst kolonií, odlišnost mezi zkoumanými kmeny hub a jejich specifické požadavky na růstové podmínky nebo také nedostatečné proudění vzduchu v termostatu během kultivace.



Graf 33: Účinnost hřebíčkové silice v různých koncentracích na růst kolonií *B. cinerea* (převzato z Šernaitě et al. 2020)

Antifungální působení silic na růst kmenů *B. cinerea* v prostředí odpařujících se silic bylo účinnější než v případě silic rozpuštěných v agaru. Je nutné podotknout, že jednotlivé kmeny reagovaly na určité koncentrace (500, 250, 125, 83,33, 62,5 a 31,25  $\mu\text{l/l}$ ) silice rozdílně. Příkladem je růst kolonií u kmenů 506, 537 a 538 u silice z oregana byl zaznamenán až v koncentraci 31,25  $\mu\text{l/l}$ , zatímco u kmene 578 byl zaznamenán růst kolonií v koncentraci 62,5  $\mu\text{l/l}$ . Výše zmíněná silice z oregana projevila největší schopnost inhibovat růst kolonií a v závěsu byly velmi účinnými silicemi tymiánová a silice z citronové trávy, které inhibovaly

růst kolonií v koncentraci 31,25  $\mu\text{l/l}$  a 62,5  $\mu\text{l/l}$  po celou dobu měření. Obdobných výsledků dosáhl i experiment Štrelková et al. 2021, Ti testovali citlivost u posklizňových patogenů (*Aspergillus flavus* Link, *Aspergillus niger* Tiegh. *Penicillium ochrochloron* Biourge, *Fusarium sporotrichioides* Sherb. a *Neocosmospora solani* (Mart.)) k v prostředí odpařujících se silic v koncentracích 250, 125 a 62,5  $\mu\text{l/l}$ . Uvádějí, že v jejich 17 dní dlouhém experimentu první dvě koncentrace silic vykazovaly úplnou schopnost inhibice, zatímco koncentrace 62,5  $\mu\text{l/l}$  tymiánové silice, silice z oregana a citronové trávy růst kolonií významně inhibovala. Tato rozdílnost může být vysvětlena rozdílností použitých druhů hub k experimentu.

Plynná fáze skořicová silice patřila opět k těm méně účinným, protože viditelný růst kolonií byl zaznamenán už 5. den od zaočkování v koncentraci 250  $\mu\text{l/l}$  u kmenů 506 a 537. S tímto poznatkem jsou v rozporu výsledky práce Klouček et al. 2012, kteří zjišťovali citlivost vybraných druhů bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*) a hub (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*) k silicím v plynné fázi. Experiment probíhal obdobným způsobem jako v předložené práci v odpařujícím se prostředí silic. V experimentu označili skořicovou silici za jednu z neúčinnějších už ve velmi nízkých koncentracích 31,25  $\mu\text{l/l}$  a 62,5  $\mu\text{l/l}$ . Tato rozdílnost může být vysvětlena rozdílností použitých druhů mikroorganismů k experimentu. Hřebíčková silice ukázala slabou antifungální aktivitu, jelikož viditelný růst kolonií byl zaznamenán u kmene 537 5. den od zaočkování v koncentraci 250  $\mu\text{l/l}$ . Výše zmíněný experiment Štrelková et al. 2021 potvrdil také slabý účinek hřebíčkové silice v koncentraci 62,5  $\mu\text{l/l}$ , ale vyšších koncentracích růst kolonií plně inhibovala. V rámci testování antifungální aktivity hřebíčkové silice nebyl zaznamenán jediný růst kolonií v žádné z testovaných koncentrací. Tato skutečnost může být důsledkem velkého množství kondenzované vody v použitých Petriho miskách nebo horší vitality startovací kultury houby.

### 6.1.2 *In vivo* experimenty

Při testování antifungální aktivity silic proti růstu kolonií kmenů *B. cinerea* v koncentraci 62,5  $\mu\text{l/l}$  na zelí byla prokázána schopnost inhibovat růst těchto hub. Při působení jednotlivých silic na jednotlivé kmene ve všech termínech hodnocení byl ve většině případů prokázán významný rozdíl. Při porovnání účinků všech silic s kontrolou v rámci jednoho kmene v určitých dnech hodnocení byl zjištěn signifikantní rozdíl. Ze statistického testování dat ( $p=0,05$ ) jsou patrné rozdíly v působení silic na jednotlivé kmene. Negativní účinek silic na růst kolonií potvrzují ve svém experimentu Bishop & Reagan 1998, kteří testovali antifungální účinky tea tree silice proti *B. cinerea* na discích z listů z holandského bílého zelí (*Brassica oleracea* var. *capitata*) ve srovnání s komerčně používanými fungicidy. Disky byly ponořeny do roztoků tea tree silice s Tweenem 80 a ethanolem v koncentracích 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 a 3,2 %, které byly kultivovány 7 dní na Petriho miskách. Koncentrace 1,6 % a 3,2 % roztoku tea tree silice měly významný negativní vliv na růst kolonií *B. cinerea* a jejich účinek byl srovnatelný i s účinkem fungicidů.

Silice z oregana vykazovala nejsilnější antifungální aktivitu ze všech testovaných silic u všech kmenů ve všech dnech hodnocení. U kmene 578 byl při posledním hodnocení zaznamenán téměř vyrovnaný účinek jako u tymiánové silice. Důvodem může být vyprchání silic v důsledku dlouhého trvání experimentu. Soylu et al. 2010 provedli *in vitro* a *in vivo* studii,

ve které se mimo jiné zabývali účinkem silice z oregana na rajčatech infikovaných *B. cinerea* v prostředí skleníku. Testovaná rajčata byla den před inokulací postříkaná roztoky silic v koncentracích 25, 50, 75, a 100 mg/l a kultivována 10 dní. S narůstající koncentrací silice byl růst kolonií více potlačen. Významný vliv na růst kolonií měla silice v koncentraci 75 mg/l. Studie shledává užití silice z oregana účinné v *in vivo* podmínkách na rajčatech ve skleníku. Podmínky experimentu se sice od experimentu v předložené práci lišily, ale účinek oreganové silice je z obou experimentů zřejmý.

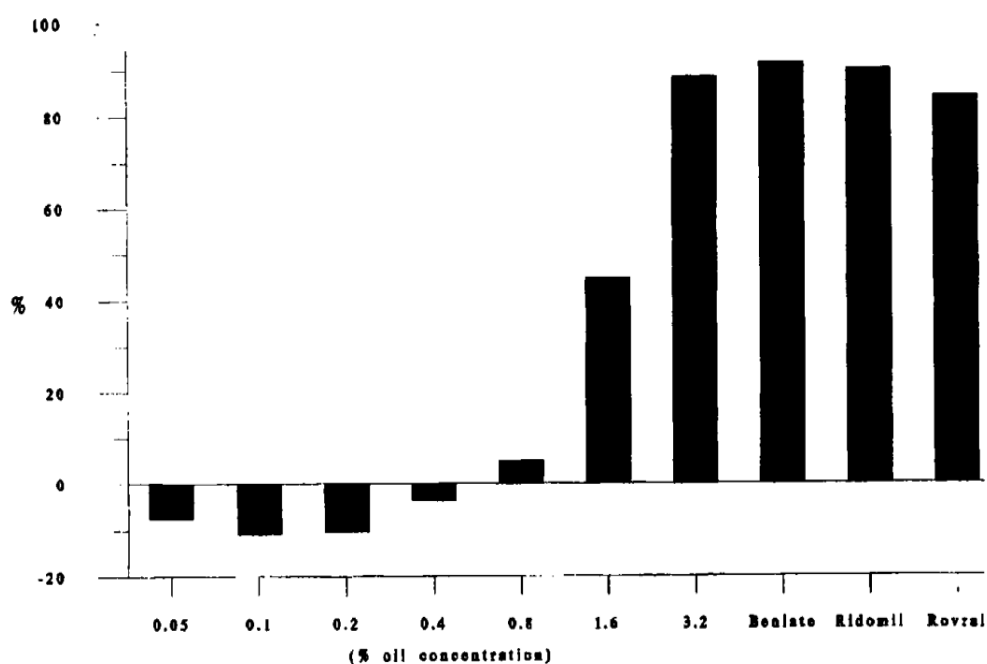
Tymiánová silice vykazovala také fungicidní účinky proti růstu kolonií kmenů *B. cinerea*. Účinek tymiánové silice v *in vivo* podmínkách dokládá studie Jahani et al. 2020 zkoumající mimo jiné účinek tymiánové silice vůči *Aspergillus niger in vivo* na granátovém jablku (*Punica granatum*). Granátová jablka byla postříkána suspenzí *A. niger* a destilované vody a po 2 hodinách uzavřena do uzavíratelných pytlíků, kam byla stříknuta silice v koncentracích 0, 200, 400, 600, a 800  $\mu$ l/l. Experiment probíhal po dobu 10 dní. Studie uvádí, že v koncentraci 800  $\mu$ l/l tymiánové silice byl zaznamenán nejnižší úbytek hmotnosti granátových jablek, ale nezmiňuje, ve které koncentraci tymiánová silice inhibovala růst kolonií. Závěr studie však shledává tymiánovou silici jako potenciální biofungicid a alternativu k syntetickým fungicidům. V případě experimentu v předložené práci byly simulovány skladovací podmínky u bílého zelí při ošetření silicemi, kde tymiánová silice určitou fungicidní aktivitu vykazovala. Nicméně je nezbytné udělat další *in vivo* experimenty na bílém zelí a také na dalších ovocných nebo zeleninových substrátech k lepšímu porozumění chování silic k určitým typům patogenních hub ve skladovacích podmínkách.

Silice z citronové trávy vykazovala nejslabší fungicidní účinky proti růstu kolonií *B. cinerea* na zelí v odpařující se fázi. U všech kmenů v posledním termínu hodnocení byl zaznamenán vyšší růst kolonií než u kontrolních variant. Může se jednat o fytotoxický účinek. Bohužel dosud nebyly provedeny *in vivo* studie související s ošetřením plodin kontaktním způsobem nebo v prostředí odpařujících se silice z citronové trávy po zaočkování určitými druhy patogenních hub. Je tedy žádoucí provést další experimenty se silicí z citronové trávy za obdobných podmínek s jinými koncentracemi silice. V případě experimentu v předložené práci byly simulovány skladovací podmínky u bílého zelí při ošetření touto silicí a očekávány případné projevy inhibičních vlastností silic.

Dalším způsobem zjišťování antifungální aktivity silic byl měření nárůstu kolonií kmenů *B. cinerea* na discích zelných listů v prostředí plynných fází silic v koncentracích 31,25  $\mu$ l/l a 62,5  $\mu$ l/l v zavařovacích sklenicích. Měření proběhlo po 19 dnech od založení experimentu. Během kultivační doby byl zaznamenán růst mycelia pouze na kontrolních variantách. Z tohoto hlediska experiment naznačuje fungicidních vlastností silic, protože růst kolonií na zelných discích ovlivněných silicemi byl menší než u kontrolních variant. Pro ověření výsledků by bylo užitečné experiment zopakovat, ale je třeba zvážit jiné podmínky experimentu.

## 6.2 Fytotoxicita silic

Během skladovacího pokusu s poraněnými hlávkami zelí v prostředí odpařujících se silic pravděpodobně došlo k fytotoxicitě použitých silic vůči pletivům skladovaných hlávek zelí. Werrie et al. 2020 definují fytotoxicitu jako negativní dopad chemikálií na růst, fyziologické pochody a rostlinné tkáně. Sharifi-Rad et al. 2017 uvádí, že silice jsou v rostlinách produkovány žláznatými trichomy a dalšími sekrečními strukturami, jež se vyskytují zejména na povrchu rostlinných orgánů. Poté jsou uloženy ve žlázách rostlin. To je pravděpodobně důvodem, proč silice nezpůsobí matečné rostlině toxikózu. Případ fytotoxicity uvádí i výše zmíněná studie Bishop & Reagan 1998 v nižších koncentracích tea tree silice, viz Graf 34.



Graf 34: Růst *B. cinerea* na *Brassica oleracea* ovlivněný působením tea tree silice a fungicidů s negativní mírou inhibice, které je přisuzován fytochemický účinek (převzato z Bishop & Reagan 1998)

Poonpaiboonpipat et al. 2013 zkoumali fytotoxické účinky této silice a její vliv na fyziologické mechanismy ježatky kuří nohy (*Echinochloa crus-galli*). Silice v této studii v *in vitro* podmínkách zpomalila klíčivost semen ježatky kuří nohy na Petriho miskách v koncentracích 1, 2, 4 a 8  $\mu\text{l/l}$ . Dále byly semenáčkům 7. den od začátku experimentu změřeny výhonky a kořínky. U koncentrací 1 a 2  $\mu\text{l/l}$  nebyly zaznamenány významné rozdíly na délku výhonků a kořínků. Při vyšších koncentracích se zkrátila semenáčkům délka výhonků a kořínků. Při jedné z dalších částí experimentu 6 hodin po aplikaci silice z citronové trávy byl zjištěn snížený obsah chlorofylu a, b a karotenoidů, tudíž tento fakt vypovídá o negativním vlivu silice na fotosyntetický metabolismus rostliny.

Plotto et al. 2003 se zabývali ochranou rajčat (*Lycopersicon esculentum*) proti posklizňovým chorobám pomocí rostlinných silic. Jedním ze způsobu testování antifungální aktivity silic, včetně silice z citronové trávy, bylo ponořením rajčat několikrát do vody s emulgovanou silicí polysorbátem v určitých poměrech o koncentracích 0, 100, 500, 1 000, 5 000 a 10 000 mg/l. Objevil se zde případ fytotoxicity silic v koncentraci 10 000 mg/l a z nich

byla nejtoxičtější silice z citronové trávy. Jako jeden z možných důvod fytoxicity uvádějí vysokou koncentraci silice působící toxicky v místě poranění rajčat a tím ulehčení vstupu spor do tkání.

Fytoxicita je z hlediska výskytu komplexním problémem, kterou ovlivňuje mnoho různých faktorů jako citlivost plodiny na danou silice, chemické složení silice a její obsahové množství hlavních komponentů nebo způsob aplikace silice. Z těchto důvodů může nastat fytoxicický účinek i při nižších koncentracích silice. Pro minimalizaci fytoxicického účinku je dobré provést další experimenty, díky kterým se zjistí přesně podmínky pro minimalizaci následků fytoxicického působení.

## 7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zhodnocení antifungální aktivity vybraných rostlinných silic proti kmenům *Botrytis cinerea* v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. V *in vitro* experimentech byla zjišťována antifungální aktivita tymiánové, skořicové, hřebíčkové silice, silice z oregana a z citronové trávy. Na základě výsledků z *in vitro* experimentů byly vybrány silice k dalšímu studiu v *in vivo* experimentech – tymiánová silice, silice z oregana a citronové trávy. V rámci *in vivo* experimentů byly hodnoceny fungicidní vlastnosti silic na skladovaném hlávkovém zelí.

Výsledky diplomové práce poukazují na antifungální aktivitu silic, která byla největší u silice z oregana. Ta inhibovala růst kolonií kmenů *B. cinerea* ve všech provedených experimentech. U skladovaných zelných hlávek 6 týdnů po inokulaci byl zaznamenán malý růst testovaných kmenů *B. cinerea*. Tymiánová silice také účinně inhibovala růst. Účinky tymiánové silice dokládají i některé studie, o které se obecné tvrzení o účinnosti této silice opírá. Silice z oregana a tymiánová silice tedy mohou být účinným prostředkem k regulaci výskytu houby ve skladovacích podmínkách plodin, které však vyžadují další experimenty ke zlepšení podmínek použití.

Hypotéza o antifungálních vlastnostech rostlinných silic vůči patogenu *B. cinerea* byla potvrzena. Výsledky diplomové práce mimo jiné ukazují rozdílnost mezi jednotlivými silicemi v antifungálním působení na kmeny *B. cinerea* a pravděpodobný výskyt fytotoxicity vůči skladovaným zelným hlávkám. Pro minimalizaci výskytu fytotoxicity je dobré provést další experimenty, díky kterým se zjistí přesně podmínky pro minimalizaci následků fytotoxického působení.

Tato diplomová práce může být dobrým podkladem pro další výzkum využití fungicidních vlastností silic při skladování dalších plodin a výsledky mohou být využity v praxi. Dále by mohla přispět k další experimentální práci v oblasti vývoje alternativních postupů při ochraně rostlin bez použití syntetických fungicidů.

## 8 Literatura

- Abdulazeez MA, Abdullahi AS, James BD. 2015. Lemongrass (*Cymbopogon* spp.) Oils. Pages 509-516 in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, Cambridge MA.
- Aguilar-González AE, Palou E, López-Malo A. 2015. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **32**:181–185.
- Aleu J, Collado IG. 2001. Biotransformations by *Botrytis* species. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **13**:77–93.
- Almanea A, El-Aziz GSA, Ahmed MMM. 2019. The Potential Gastrointestinal Health Benefits of *Thymus Vulgaris* Essential Oil: A Review. *Biomedical and Pharmacology Journal* **12**:1793–1799.
- Almasaudi NM, Al-Qurashi AD, Elsayed MI, Abo-Elyousr KAM. 2022. Essential oils of oregano and cinnamon as an alternative method for control of gray mold disease of table grapes caused by *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Pathology* **104**:317–328.
- Amselem J et al. 2011. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics* (e1002230) DOI: 10.1371/journal.pgen.1002230.
- Antunes MDC, Cavaco AM. 2010. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal* **25**:351–366.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**:446–475.
- Basak S, Guha P. 2018. A review on antifungal activity and mode of action of essential oils and their delivery as nano-sized oil droplets in food system. *Journal of Food Science and Technology* **55**:4701–4710.
- Bayala B, Bassole IH, Scifo R, Gnoula C, Morel L, Lobaccaro JM SJ. 2014. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *American Journal of Cancer Research* **4**:591–607.
- Beever RE, Weeds PL. 2007. Taxonomy and Genetic Variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. Pages 29–52 in *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Benjilali B, Tantaoui-Elaraki A, Ismaili-Alaoui M, Ayadi A. 1986. Methode D'Etude Des Proprietes Antiseptiques Des Huiles Essentielles Par Contact Direct En Milieu Gelose. *Plantes Medicinales et Phytotherapie* **20**:155–167.

- Bishop CD, Reagan J. 1998. Control of the Storage Pathogen *Botrytis cinerea* on Dutch White Cabbage ( *Brassica oleracea* var. *capitata* ) by the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Essential Oil Research* **10**:57–60.
- Boddy L. 2016. Pathogens of Autotrophs. Pages 245–292 in *The Fungi*. Academic Press, Cambridge MA.
- Caballero B, Trugo LC, Finglas PM. 2003. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, Cambridge MA.
- Cardoso-Ugarte GA, López-Malo A, Sosa-Morales ME. 2016. Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Essential Oils. Pages 339–347 *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, Cambridge MA.
- Carisse O. 2016. Epidemiology and Aerobiology of *Botrytis* spp. Pages in 127–148 *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, Cham.
- Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi A ben, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research* **21**:501–506.
- Chamilos G, Carvalho A. 2020. *Aspergillus fumigatus* DHN-Melanin. Pages 17–28 in *The Fungal Cell Wall . Current Topics in Microbiology and Immunology.*, Springer Verlag, Berlín.
- Chern LY, Shukor MY, Muse R. 2013. Monoterpenes in Plants- a mini review. *Asian Journal of Plant Biology* **1**:15–19.
- Cheung N, Tian L, Liu X, Li X. 2020. The Destructive Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*— Insights from Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens* **9**:923.
- Choquer M et al. 2021. The infection cushion of *Botrytis cinerea*: a fungal ‘weapon’ of plant-biomass destruction. *Environmental Microbiology* **23**:2293–2314.
- Collado IG, Viaud M. 2016. Secondary Metabolism in *Botrytis cinerea*: Combining Genomic and Metabolomic Approaches. Pages 291–313 *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, Cham.
- Cortés-Rojas DF, de Souza CRF, Oliveira WP. 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **4**:90–96.
- Dauqan EMA, Abdullah A. 2017. Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* **5**:17–22.
- de Bona da Silva C, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EES. 2008. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* **12**: 63-66.



- de Groot AC, Schmidt E. 2016. Essential Oils, Part III: Chemical Composition. *Dermatitis* **27**:161–169.
- de Martino L, de Feo V, Nazzaro F. 2009. Chemical Composition and in Vitro Antimicrobial and Mutagenic Activities of Seven Lamiaceae Essential Oils. *Molecules* **14**:4213–4230.
- Dean RA, Lichens-Park A, Kole C. 2014. The genome of *Botrytis cinerea*, a ubiquitous broad host range necrotroph. Pages 19-44 in *Genomics of Plant-Associated Fungi and Oomycetes: Dicot Pathogens*. Springer Verlag, Berlin.
- Delespaul Q, de Billerbeck VG, Roques CG, Michel G, Marquier-Viñuales C, Bessière J-M. 2000. The Antifungal Activity of Essential Oils as Determined by Different Screening Methods. *Journal of Essential Oil Research* **12**:256–266.
- Doss RP, Deisenhofer J, Krug von Nidda H-A, Soeldner AH, McGuire RP. 2003. Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* **63**:687–691.
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N. 2004. *Botrytis: Biology, Pathology and control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Elmer PAG, Reglinski T. 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* **55**:155–177.
- Eslahi H, Fahimi N, Sardarian AR. 2017. Chemical Composition of Essential Oils. Pages 119–171 in *Essential Oils in Food Processing*. John Wiley & Sons Ltd., Hoboken NJ.
- Faheem F, Liu ZW, Rabail R, Haq I-U, Gul M, Bryła M, Roszko M, Kieliszek M, Din A, Aadil RM. 2022. Uncovering the Industrial Potentials of Lemongrass Essential Oil as a Food Preservative: A Review. *Antioxidants* **11**:720.
- Fillinger S, Elad Y. 2016. *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Page (Fillinger S, Elad Y, editors). Springer International Publishing, Cham.
- Garfinkel AR. 2021. The History of *Botrytis* Taxonomy, the Rise of Phylogenetics, and Implications for Species Recognition. *Phytopathology*® **111**:437–454.
- Giorbelidze MA, Bokeria NR, Dadegashvili AD, Gvritish-vili ES, Zubadalashvili MG, Datukishvili NTs. 2019. The materials on citrus mycobiota research. *Annals of Agrarian Science* **17**:324–329.
- Grande-Tovar CD, Chaves-Lopez C, Serio A, Rossi C, Paparella A. 2018. Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involved in fruit decay and mechanisms of action. *Trends in Food Science & Technology* **78**:61–71.
- Gupta AK, Ganjewala D. 2015. A study on biosynthesis of “citral” in lemongrass (*C. flexuosus*) cv. Suvarna. *Acta Physiologiae Plantarum* **37**:240.

- Haddi K, Faroni LRA, Oliveira EE. 2017. Cinnamon oil. Pages 117–150 in *Green Pesticides Handbook: Essential Oils for Pest Control*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton FL.
- Hammer KA, Carson CF. 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils. Pages 255–306 in *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. John Wiley & Sons Ltd., Hoboken NJ.
- Hanif MA, Nisar S, Khan GS, Mushtaq Z, Zubair M. 2019. Essential Oils. Pages 3–17 in *Essential Oil Research*. Springer International Publishing, Cham.
- Haro-González JN, Castillo-Herrera GA, Martínez-Velázquez M, Espinosa-Andrews H. 2021. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. *Molecules* **26**:6387.
- Hou H, Zhang X, Zhao T, Zhou L. 2020. Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. *PeerJ* (e9626) DOI: 10.7717/peerj.9626.
- Hüsnü K, Başer C, Demirci F. 2007. Chemistry of Essential Oils. Pages 43–86 in *Flavours and Fragrances*. Springer Verlag, Berlin.
- Hussain S, Rahman R, Mushtaq A, el Zerey-Belaskri A. 2017. Clove: A review of a precious species with multiple uses. *Ijcbcs* **11**:129–133.
- Hyltdgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology* **3**: 1-24.
- Izquierdo-Bueno I et al. 2018. Biosynthesis of abscisic acid in fungi: identification of a sesquiterpene cyclase as the key enzyme in *Botrytis cinerea*. *Environmental Microbiology* **20**:2469–2482.
- Jackson RS. 2014. *Botrytis*. Pages 288–296 in *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Cambridge MA.
- Jahani M, Pira M, Aminifard MH. 2020. Antifungal effects of essential oils against *Aspergillus niger* in vitro and in vivo on pomegranate (*Punica granatum*) fruits. *Scientia Horticulturae* **264**:109188.
- Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* **76**:626–631.
- Kamsu NP, Tchinda SE, Tchameni NS, Jazet DPM, Madjouko MA, Youassi Youassi O, Sameza ML, Tchoumboungang F, Menut C. 2019. Antifungal activities of essential oils of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) on crown rot pathogens of banana. *Indian Phytopathology* **72**:131–137.
- Kan JAL van. 2005. Infection Strategies of *Botrytis cinerea*. *Acta Horticulturae* **660**:77–90.

- Karutnaratne DN, Pamunuwa G. 2017. Food Additives. Page (Karunaratne DN, Pamunuwa G, editors). IntechOpen, Rijeka.
- Klouček P, Šmíd J, Fraňková A, Kokoška L, Valterová I, Pavela R. 2012. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International* **47**:161–165.
- Kocourek F et al. 2015. *Integrovaná ochrana ovocných plodin*. Profi Press, Praha.
- Kocourek F et al. 2022. *Integrovaná ochrana rostlin*. Profi Press, Praha.
- Kocourek F, Koudela M, Jursík M, Rod J, Holý K, Kovaříková K. 2016. Technologie pěstování a ochrany zelí, květáku, cibule, salátu a mrkve při ekologickém pěstování zeleniny. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha.
- Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. 2020. Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules* **25**:4125.
- Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva E, Vazquez-Olivo G, Heredia J. 2017. Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules* **22**:989.
- Limón MC, Rodríguez-Ortiz R, Avalos J. 2010. Bikaverin production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**:21–29.
- Louis C, Girard M, Kuhl G, Lopez-Ferber M. 1996. Persistence of *Botrytis cinerea* in Its Vector *Drosophila melanogaster*. *Phytopathology* **86**:934.
- Loza-Tavera H. 1999. Monoterpenes in Essential Oils. Biosynthesis and properties. Pages 49–62 in *Chemicals via Higher Plant Bioengineering. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Ludwiczuk A, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI. 2017. Terpenoids. Pages 233–266 in *Pharmacognosy*. Academic Press, Cambridge MA.
- Malý I. 2003. *Pěstujeme květák, zelí a další košťálové zeleniny*. Grada Publishing, a.s., Praha.
- Mandal S, DebMandal M. 2016. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Oils. Pages 825–834 in *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, Cambridge MA.
- Mani-López E, Cortés-Zavaleta O, López-Malo A. 2021. A review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi. *SN Applied Sciences* **3**:44.
- Naik MI, Fomda BA, Jaykumar E, Bhat JA. 2010. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **3**:535–538.
- Nazzaro F, Fratianni F, de Martino L, Coppola R, de Feo V. 2013a. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* **6**:1451–1474.

- Nurdjannah N, Bermawie N. 2012. Cloves. Pages 197–215 in Handbook of Herbs and Spices. Academic Press, Cambridge MA.
- Oyedele AO, Gbolade AA, Sosan MB, Adewoyin FB, Soyelu OL, Orafidiya OO. 2002. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from Lemongrass oil. *Phytomedicine* **9**:259–262.
- Petříková K, Hlušek J, a kolektiv. 2012. Zelenina. Profi Press, Praha.
- Plotto A, Roberts DD, Roberts RG. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon Esculentum*). *Acta Horticulturae* **628**:737–745.
- Poonpaiboonpipat T, Pagnakorn U, Suvunnamek U, Teerarak M, Charoenying P, Laosinwattana C. 2013. Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Industrial Crops and Products* **41**:403–407.
- Raveau R, Fontaine J, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2020. Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. *Foods* **9**:365.
- Remmal A, Bouchikhi T, Rhayour K, Ettayebi M, Tantaoui-Elaraki A. 1993. Improved Method for the Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils in Agar Medium. *Journal of Essential Oil Research* **5**:179–184.
- Ripardo-filho HS, Ruíz VC, Suárez I, Moraga J, Aleu J, Collado IG. 2023. From Genes to Molecules , Secondary Metabolism in *Botrytis cinerea* : New Insights into Anamorphic and Teleomorphic Stages. *Plants* **12**:1–31.
- Rizvi S, Raman A. 2017. *Botrytis cinerea* (Helotiales Sclerotiniaceae)-induced changes in *Vitis vinifera* (Vitales Vitaceae) leaves influence the oviposition behaviour and life history of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera Tortricidae). *Ethology Ecology & Evolution* **29**:574–588.
- Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza BA, Ortega-Ramirez LA, Leyva JM, Siddiqui MW, Cruz-Valenzuela MR, Gonzalez-Aguilar GA, Ayala-Zavala JF. 2016. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **56**:1717–1727.
- Romanazzi G, Droby S. 2016. Control Strategies for Postharvest Grey Mould on Fruit Crops. Pages 217–228 in *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, Cham.
- Romanazzi G, Feliziani E. 2014. *Botrytis cinerea* (Gray Mold). Page Postharvest Decay: Control Strategies. Academic Press, Cambridge MA.
- Rossi FR, Krapp AR, Bisaro F, Maiale SJ, Pieckenstain FL, Carrillo N. 2017. Reactive oxygen species generated in chloroplasts contribute to tobacco leaf infection by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal* **92**:761–773.

- Šernaitė L, Rasiukevičiūtė N, Dambrauskienė E, Viškelis P, Valiuškaitė A. 2020. Biocontrol of strawberry pathogen *Botrytis cinerea* using plant extracts and essential oils. *Zemdirbyste* **107**:147–152.
- Sharifi-Rad J et al. 2017. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules* **22**:70.
- Sharma A, Rathore IJ, Ali A, Injila Qadri I, Mazahir Hussain S, Tashi Angmo I, Rathore J, Qadri I, Angmo T. 2018. Major diseases and pathogen ecology of cabbage. *The Pharma Innovation Journal* **7**:574–578.
- Shaw MW, Emmanuel CJ, Emilda D, Terhem RB, Shafia A, Tsamaidi D, Emblow M, van Kan JAL. 2016. Analysis of Cryptic, Systemic *Botrytis* Infections in Symptomless Hosts. *Frontiers in Plant Science* **7**:1-14.
- Singh S, Chaurasia PK, Bharati SL. 2022. Functional roles of Essential oils as an effective alternative of synthetic food preservatives: A review. *Journal of Food Processing and Preservation* **46**:1-15.
- Skaria BP, Joy PP, Mathew S, Mathew G. 2006. Lemongrass. Pages 400–419 in *Handbook of Herbs and Spices*. Academic Press, Cambridge MA.
- Soylu EM, Kurt Ş, Soylu S. 2010. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology* **143**:183–189.
- Stevens N, Allred K. 2022. Antidiabetic Potential of Volatile Cinnamon Oil: A Review and Exploration of Mechanisms Using In Silico Molecular Docking Simulations. *Molecules* **27**:853.
- Štrelková T, Nemes B, Kovács A, Novotný D, Božik M, Klouček P. 2021. Inhibition of Fungal Strains Isolated from Cereal Grains via Vapor Phase of Essential Oils. *Molecules* **26**:1313.
- Suárez I, Pinedo C, Aleu J, Durán-Patrón R, Macías-Sánchez AJ, Hernández-Galán R, Collado IG. 2022. The complemented mutant  $\Delta Bcstc7$ , in the STC7 of *Botrytis cinerea* led to the characterization of 11,12,13-tri-nor-eremophilinols derivatives. *Phytochemistry* **193**:113003.
- Tripathi P, Dubey NK, Shukla AK. 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**:39–46.
- Turek C, Stintzing FC. 2013. Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**:40–53.
- Tzortzakis NG. 2009. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **10**:97–102.

- Tzortzakis NG, Economakis CD. 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **8**:253–258.
- Veenstra JP, Johnson JJ. 2019. Oregano (*Origanum Vulgare*) Extract for Food Preservation and Improving Gastrointestinal Health. *International Journal of Nutrition* **3**:43–52.
- Viaud M, Schumacher J, Porquier A, Simon A. 2016. Regulation of Secondary Metabolism in the Gray Mold Fungus *Botrytis Cinerea*. Pages 201-215 in *Host - Pathogen Interaction: Microbial Metabolism, Pathogenicity and Antiinfectives*. John Wiley & Sons Ltd., Hoboken NJ.
- Vitoratos A, Bilalis D, Karkanis A, Efthimiadou A. 2013. Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **41**:86.
- Werrie P-Y, Durenne B, Delaplace P, Fauconnier M-L. 2020. Phytotoxicity of Essential Oils: Opportunities and Constraints for the Development of Biopesticides. A Review. *Foods* **9**:1291.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JAL. 2007a. *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8**:561–580.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JAL. 2007b. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* **8**:561–580.
- Zhou Y, Song J, Wang Y, Yang L, Wu M, Li G, Zhang J. 2022. Biological characterization of the melanin biosynthesis gene *Bcsd1* in the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology* **160**:103693.
- Zielińska-Błajet M, Feder-Kubis J. 2020. Monoterpenes and Their Derivatives—Recent Development in Biological and Medical Applications. *International Journal of Molecular Sciences* **21**:7078.
- Zoffoli JP, Latorre BA. 2011. Table grape (*Vitis vinifera* L.). Pages 179–214 in *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Academic Press, Cambridge MA.

## 9 Seznam obrázků, grafů a tabulek

Tabulka 1: Seznam druhů <i>Botrytis</i> nejvýznamnějších v zemědělství a zahradnictví (převzato z Fillinger & Elad 2016).....	11
Tabulka 2: Klasifikace terpenoidů (převzato z Ludwiczuk et al. 2017).....	26
Obrázek 1: Konidiofor s konidii (převzato z Giorbelidze et al. 2019) .....	13
Obrázek 2: Životní cyklus <i>Botrytis</i> při napadení květu (převzato z Carisse 2016) .....	15
Obrázek 3: Botrydial a jeho deriváty (převzato z Carisse 2016).....	19
Obrázek 4: Příprava experimentu s hlávkami v prostředí odpařujících se silic.....	42
Obrázek 5: Hliníková folie s hlávkami zabraňuje úniku silic.....	43
Obrázek 6: Příprava experimentu s disky ze zelných listů zaočkovanými kmenem 537 v prostředí odpařujících se silic v koncentracích 31,25 µl/l a kontrolní variantou.....	44
Obrázek 7: Hlávky zelí inokulované kmenem 537 v kontrolní variantě 6 týdnů od zaočkování .....	64
Obrázek 8: Hlávky zelí inokulované kmenem 538 ve variantě s odpařující se tymiánové silice 6 týdnů od zaočkování .....	66
Obrázek 9: Napadené hlávky zelí kmenem 538 v prostředí odpařující silice z oregana 6 týdnů od zaočkování .....	66
Obrázek 10: Hlávky zelí inokulované kmenem 538 v kontrolní variantě 6 týdnů od zaočkování. U hlávky vpravo pravděpodobně nedošlo k uchycení kmene a rozvoji infekce .....	67
Obrázek 11: Hlávky zelí inokulované kmenem 538 ve variantě s odpařující se silicí z citronové trávy 6 týdnů od zaočkování.....	68
Obrázek 12: Kolonie <i>B. cinerea</i> (kmen 537 – vlevo; kmen 578 - vpravo) na listových discích v kontrolních variantách po 19. dnech od založení experimentu .....	70
Obrázek 13: Kolonie <i>B. cinerea</i> (kmen 538 – vlevo; kmen 506 - vpravo) na listových discích v kontrolních variantách po 19. dnech od založení experimentu .....	71
Graf 1: Vliv oreganové silice na růst kmenů <i>B. cinerea</i> .....	45
Graf 2: Vliv tymiánové silice na růst kmenů <i>B. cinerea</i> .....	46
Graf 3: Vliv silice z citronové trávy na růst kmenů <i>B. cinerea</i> .....	47
Graf 4: Vliv skořicové silice na růst kmenů <i>B. cinerea</i> .....	48
Graf 5: Vliv hřebíčkové silice na růst vybraných kmenů <i>B. cinerea</i> .....	49
Graf 6: Velikost kolonií kmene 506 v prostředí odpařující se tymiánové silice .....	50
Graf 7: Velikost kolonií kmene 537 v prostředí odpařující se tymiánové silice .....	50
Graf 8: Velikost kolonií kmene 538 v prostředí odpařující se tymiánové silice .....	51
Graf 9: Velikost kolonií kmene 578 v prostředí odpařující se tymiánové silice .....	51
Graf 10: Vliv tymiánové silice na všechny kmeny <i>B. cinerea</i> 7. den po zaočkování .....	52
Graf 11: Velikost kolonií kmene 506 v prostředí odpařující se silice z citronové trávy .....	53
Graf 12: Velikost kolonií kmene 537 v prostředí odpařující se silice z citronové trávy .....	53
Graf 13: Velikost kolonií kmene 538 v prostředí odpařující se silice z citronové trávy .....	54
Graf 14: Velikost kolonií kmene 578 v prostředí odpařující se silice z citronové trávy .....	54
Graf 15: Vliv silice z citronové trávy na všechny kmeny <i>B. cinerea</i> 7. den od zaočkování ....	55
Graf 16: Velikost kolonií kmene 506 v prostředí odpařující se skořicové silice.....	56
Graf 17: Velikost kolonií kmene 537 v prostředí odpařující se skořicové silice.....	56
Graf 18: Velikost kolonií kmene 538 v prostředí odpařující se skořicové silice.....	57
Graf 19: Velikost kolonií kmene 578 v prostředí odpařující se skořicové silice.....	57
Graf 20: Vliv skořicové silice na všechny kmeny <i>B. cinerea</i> 7. den od zaočkování.....	58
Graf 21: Velikost kolonií kmene 506 v prostředí odpařující se hřebíčkové silice .....	59

Graf 22: Velikost kolonií kmene 537 v prostředí odpařující se hřebíčkové silice .....	59
Graf 23: Velikost kolonií kmene 538 v prostředí odpařující se hřebíčkové silice .....	60
Graf 24: Velikost kolonií kmene 578 v prostředí odpařující se hřebíčkové silice .....	60
Graf 25: Vliv hřebíčkové silice na všechny kmeny <i>B. cinerea</i> 7. den od zaočkování .....	61
Graf 26: Velikost kolonií hodnocených kmenů v prostředí odpařující se silice z oregana .....	61
Graf 27: Míra napadení zelných hlávek kmenem 506 v jednotlivých termínech hodnocení při ošetření vybranými silicemi.....	62
Graf 28: Míra napadení zelných hlávek kmenem 537 v jednotlivých termínech hodnocení při ošetření vybranými silicemi.....	63
Graf 29: Míra napadení zelných hlávek kmenem 538 v jednotlivých termínech hodnocení při ošetření vybranými silicemi.....	65
Graf 30: Míra napadení zelných hlávek kmenem 578 v jednotlivých termínech hodnocení při ošetření vybranými silicemi.....	68
Graf 31: Míra inhibice z poměru velikosti narostlých kolonií a velikosti hlávek ošetřených a neošetřených vybranými druhy silice .....	69
Graf 32: Růst kolonií na discích ze zelných listů při působení vybraných silic 19. den od založení experimentu.....	70
Graf 33: Účinnost hřebíčkové silice v různých koncentracích na růst kolonií <i>B. cinerea</i> (převzato z Šernaitė et al. 2020) .....	73
Graf 34: Růst <i>B. cinerea</i> na <i>Brassica oleracea</i> ovlivněný působením tea tree silice a fungicidů s negativní mírou inhibice, které je přisuzován fytochemický účinek (převzato z Bishop & Reagan 1998).....	76