

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Inhibiční účinek vybraných látek a organismů na růst
patogena *Cercospora beticola*
Diplomová práce**

**Bc. Anna Janatová Špůrová
Rostlinolékařství (SANIM)**

Ing. Jana Mazáková, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Inhibiční účinek vybraných látek a organismů na růst patogena *Cercospora beticola*" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí této diplomové práce Ing. Janě Mazákové, PhD. za ochotu, trpělivost, odborné vedení a v neposlední řadě za její cenné rady a připomínky. Zároveň bych ráda poděkovala mému manželovi Pavlovi a zbytku rodiny za podporu a pochopení při psaní této diplomové práce.

Inhibiční účinek vybraných látek a organismů na růst patogena *Cercospora beticola*

Souhrn

Cukrová řepa (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) je významnou zemědělskou plodinou České republiky. Mezi její nejzávažnější onemocnění se řadí cercosporová listová skvrnitost způsobená patogenem *Cercospora beticola*, která negativně ovlivňuje výnos i skladovatelnost cukrové řepy. Ochranu proti tomuto patogenu může komplikovat vznik rezistence, respektive selekce kmenů v populacích patogena rezistentních vůči fungicidům, proto je žádoucí v rámci dodržování antirezistentní strategie kombinovat přípravky s různým mechanismem účinku.

Tato diplomová práce byla zaměřena na testování inhibičního účinku různých skupin přípravků u izolátů patogena *C. beticola* pocházejících z různých lokalit. Bylo získáno celkem 10 izolátů patogena z 10 různých lokalit a testovány byly tři fungicidní přípravky, čtyři antagonistické organismy a tři esenciální oleje. Výsledky naznačují riziko vzniku rezistence vůči fungicidům a zároveň ukazují, že některé bakterie a esenciální oleje mají potenciál být účinnými alternativami k fungicidům při ochraně proti původci cercosporové listové skvrnitosti *C. beticola*. Diplomová práce přináší informace pro další výzkum a vývoj nových přípravků proti patogenu *C. beticola* a může být použita k informování pěstitelů o dalších možnostech ochrany cukrové řepy proti původci cercosporové listové skvrnitosti.

Klíčová slova: *Cercospora beticola*, řepa cukrová, chemická ochrana, biologická ochrana, antagonismus

Inhibitory effect of selected substances and organisms on growth of *Cercospora beticola*

Summary

Sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) is an important agricultural crop of the Czech Republic. Cercospora leaf spot, caused by the pathogen *Cercospora beticola*, is one of its most serious diseases which negatively affects the yield and storage of sugar beet. Protection against this pathogen can be complicated by the emergence of fungicide resistance in the *C. beticola* populations, and it is, therefore, desirable to combine products in the context of an anti-resistance strategy with a different mode of action.

This thesis is focused on testing the inhibitory effect of different groups of products on isolates of the pathogen *C. beticola* from different localities. A total of 10 pathogen isolates from 10 different locations were collected, on which the effects of three fungicidal products, four antagonistic organisms, and three essential oils were tested. Results indicate a risk of fungicide resistance and also show that some bacteria and essential oils have the potential to be effective alternatives to fungicides in the control of Cercospora leaf spot. The thesis provides information for further research and development of new products against the pathogen *C. beticola* and can be used to inform growers about other options for protection against the Cercospora leaf spot.

Keywords: *Cercospora beticola*, sugar beet, chemical control, biological control, antagonism

Obsah

| | |
|--|----|
| 1 Úvod..... | 7 |
| 2 Vědecká hypotéza a cíle práce..... | 8 |
| 3 Literární rešerše..... | 9 |
| 3.1 Cukrová řepa a její význam..... | 9 |
| 3.2 Cercosporová listová skvrnitost řepy..... | 11 |
| 3.2.1 Taxonomie a životní cyklus patogena..... | 11 |
| 3.2.2 Prognóza a signalizace patogena..... | 13 |
| 3.2.3 Příznaky choroby a diagnostika..... | 14 |
| 3.2.4 Toxiny produkované patogenem..... | 15 |
| 3.3 Metody ochrany proti <i>Cercospora beticola</i> | 17 |
| 3.3.1 Nepřímé metody..... | 17 |
| 3.3.2 Přímé metody..... | 18 |
| 3.3.2.1 Chemické metody ochrany..... | 18 |
| 3.3.2.2 Biologické metody ochrany..... | 23 |
| 4 Materiál a metody..... | 28 |
| 4.1 Vzorky..... | 28 |
| 4.2 Izolace a následné přeočkování <i>Cercospora beticola</i> | 28 |
| 4.2.1 Chemikálie a biologický materiál..... | 28 |
| 4.2.2 Pracovní postup izolace..... | 28 |
| 4.3 Biologické testy..... | 29 |
| 4.3.1 Chemikálie a biologický materiál..... | 29 |
| 4.3.2 Citlivost vůči vybraným účinným látkám a fungicidům..... | 29 |
| 4.3.3 Citlivost <i>Cercospora beticola</i> vůči vybraným esenciálním olejům..... | 30 |
| 4.3.4 Inhibice růstu <i>Cercospora beticola</i> vybranými BCA..... | 31 |
| 4.4 Vyhodnocování výsledků..... | 32 |
| 5 Výsledky..... | 33 |
| 5.1 Fungicidy..... | 33 |
| 5.2 BCA..... | 38 |
| 5.3 Esenciální oleje..... | 41 |
| 6 Diskuze..... | 47 |
| 7 Závěr..... | 51 |
| 8 Literatura..... | 52 |
| 9 Seznam obrázků a tabulek..... | 57 |

1 Úvod

Cukrová řepa (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) je významnou zemědělskou plodinou sloužící k výrobě cukru, pitného i energetického lihu, krmiv, hnojiv, ale i obnovitelné energie (Kolář 2022). Výnos cukrové řepy je ovlivněn velikostí listové růžice, čistým výkonem asimilace na jednotku listové plochy, délkou fotosyntetické činnosti a schopností rostliny ukládat asimiláty do bulvy (Pulkrábek et al. 2007).

Cerkosporová listová skvrnitost řepy, způsobená patogenem *Cercospora beticola* se řadí mezi jednu z nejzávažnějších chorob cukrové řepy (Weiland & Koch 2004). Mezi charakteristické příznaky této choroby patří na listech náhodně rozmístěné skvrny s červenofialovými okraji a světle hnědým středem (Hallau et al. 2018). Tyto skvrny mohou splývat v nekrotické celky a napadené listy pak odumírají (M. Harveson 2013). Kromě snížení výnosu cukrové řepy, ovlivňuje cercosporová listová skvrnitost i skladovatelnost bulev. K ochraně proti původci této choroby jsou v dnešní době k dispozici metody chemické, biologické, mechanické a fyzikální, přičemž na jejich kombinaci spočívá tzv. integrovaná ochrana rostlin (Sharma et al. 2013).

Jedním z nejzávažnějších problémů moderního zemědělství je vznik rezistence v populaci patogenů proti fungicidům (Deising et al. 2008), která ovlivňuje pěstitelé, poradce, ale i chemický průmysl produkující přípravky na ochranu rostlin. Bez jejího úspěšného zvládnutí může v budoucnu docházet ke sníženému výnosu i kvalitě pěstovaných plodin (Leadbeater 2014). Je proto žádoucí dodržovat pravidla antirezistentní strategie ochrany rostlin (Bittner 2021). Alternativní možností k použití chemické ochrany rostlin může být použití některých bioagens nebo esenciálních olejů.

Tato práce studuje inhibiční účinek různých skupin látek (přípravky na ochranu rostlin, esenciální oleje, antagonistické organismy) na růst mycelia izolátů *C. beticola* získaných z různých lokalit pěstování cukrové řepy.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

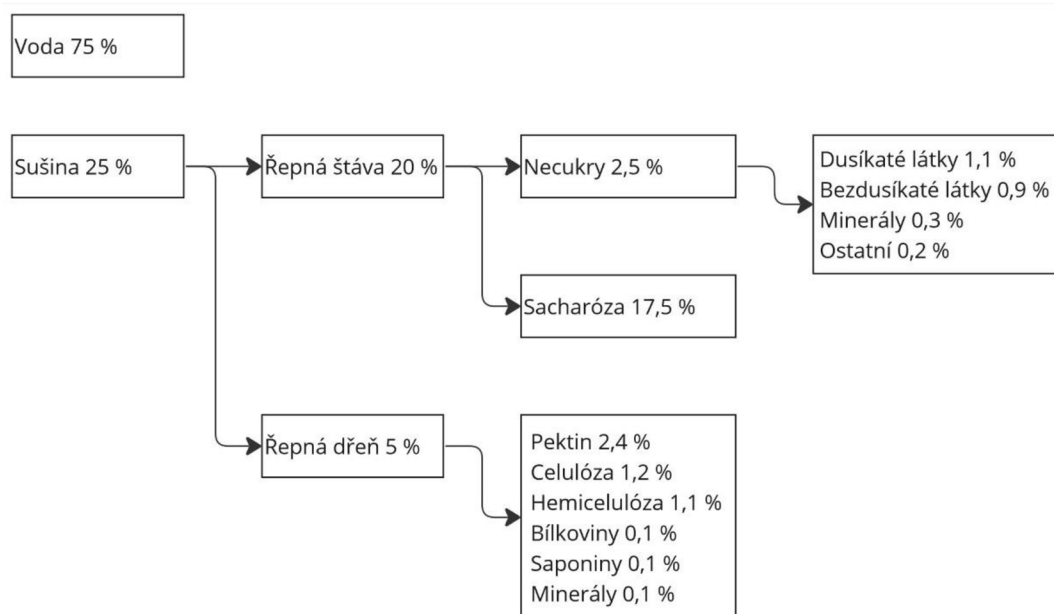
Hypotéza této diplomové práce je založena na tvrzení, že různé fungicidní látky, látky rostlinného původu a antagonistické organismy se vyznačují různým inhibičním účinkem na růst původce cercospororové listové skvrnitosti řepy *Cercospora beticola*. Cílem této práce je tedy testovat inhibiční účinek vybraných fungicidních látek, látek rostlinného původu a antagonistických organismů u izolátů *C. beticola* získaných z různých lokalit pěstování cukrové řepy.

3 Literární rešerše

3.1 Cukrová řepa a její význam

Cukrová řepa (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) náleží do čeledi *Amaranthaceae* a řádu *Caryophyllales*. Byla domestikována poměrně pozdě – a to v druhé polovině 18. století. Šlechtění vedlo k vytvoření rostlin s dvouletým reprodukčním cyklem a kvetením jen po jarovizaci (Zicari et al. 2019). Přibližně jedna pětina světové produkce cukru se vyrábí z cukrové řepy.

Bulva cukrové řepy se skládá ze 3 částí – hlavy (epikotyl), krku (hypokotyl) a kořene (radix). Hlava je 2–3 cm vysoká nadzemní část s listy, kterých může být až okolo třiceti (starší listy postupně odumírají). Tvar listu bývá oválný až trojúhelníkovitý, s nerovnoměrným a drsným povrchem. Největší z nich mohou být 45 a více cm dlouhé. Sacharóza je nejprve syntetizována právě v listech, poté putuje floémem do buněk parenchymu kořene (Asadi 2005). Nepřetržitě šlechtění za posledních 200 let způsobilo nárůst obsahu cukrů z 8 na 18 a více procent (Rangel et al. 2020). Dnešní cukrová řepa má velmi vysoký podíl pektinu, hemicelulózy, rozpustných cukrů, a naopak poměrně nízký podíl ligninu. Složení (viz Obrázek 1) se může samozřejmě měnit vlivem různých faktorů, jako je například průběh sklizně a posklizňových operací, stanoviště nebo zdravotní stav rostliny (Zicari et al. 2019).



Obrázek 1 Složení cukrové řepy. Upraveno podle Asadi (2005)

Zatímco hlavní celosvětový zdroj sacharózy – cukrová třtina roste spíše v oblastech tropického klimatu, cukrová řepa je plodinou mírného pásu (Rangel et al. 2020). Osivo klíčí a vzchází již při nízkých teplotách (4–5 °C), nicméně ideální teplota se pohybuje okolo 10 °C. Dospělé rostliny snášejí mírné mrazy, ale delší vystavení teplotám nižším než 4 °C vede k narušení fyziologických procesů buněk a jejich odumírání (Kaffka & Grantz 2014). V České

republiky se cukrová řepa vysévá pomocí přesných secích strojů od 20. března do 15. dubna (Pulkrábek et al. 2007). Za vhodných podmínek (vhodná teplota a vlhkost půdy) se semenáček začne vynořovat z půdy asi po 5–10 dnech. Křlový kořen roste rychle a jeho délka může dosáhnout až 30 cm než vyraší první pravý list (Kaffka & Grantz 2014). V období vzcházení je nutné sledovat výskyt chorob a škůdců v porostu. Růst kořene probíhá až po vytvoření dostatečně velkého fotosyntetického aparátu (konec července až polovina září). Poté roste kořen pomaleji a intenzivně se do něj ukládá sušina a roste cukernatost. V poslední dekádě července dosáhne cukrová řepa ve svém obsahu přibližně na čtvrtinu cukru, třetinu hmotnosti kořene a devět desetin hmotnosti chrástu. V srpnu a září, popřípadě první v polovině října, přirůstá intenzivně cukernatost, přičemž měsíční přírůstek může činit 0,5–2,5 %. Výnos je ovlivňován velikostí listové růžice, čistým výkonem asimilace na jednotku listové plochy, délkou fotosyntetické činnosti a schopností rostliny ukládat asimiláty do bulvy (Pulkrábek et al. 2007).

Mezi významné škůdce cukrové řepy patří maločlenec čárkovitý, dřepčik řepný, dřepčik rdesnový a květílka řepná, kteří škodí zejména v období vzcházení a prvních růstových fázích. Ochrana provádí zejména mořením osiva a aplikací insekticidů. Sáním na listech a přenosem virových žloutenek škodí mšice maková a broskvoňová. V mnoha oblastech na našem území narůstají problémy s larvami kovaříků – drátovci (Pulkrábek et al. 2007). Mezi jednu z nejničivějších chorob řadíme cercosporovou listovou skvrnitost řepy. Další závažnou chorobou je virová rizomanie řepy, která je stejně jako cercosporová listová skvrnitost rozšířena po celém světě. Cukrová řepa napadená původcem rizomanie (Beet necrotic yellow vein virus) má poškozené kořeny, což vede k problémům při jejím skladování i zpracování (Asadi 2005).

Mezi hlavní světové producenty cukrové řepy patřily v roce 2019 Spojené státy americké, Francie, Německo a Rusko (Rangel et al. 2020). V České republice byla v roce 2022 pěstována cukrová řepa na celkem 58 283 hektarech a průměrný výnos činil 69,64 t/ha (Český statistický úřad 2023). V roce 2020 bylo v ČR celkem osm cukrovarských závodů: Dobruška, České Meziříčí, Hrušovany nad Jevišovkou, Opava-Vávrovice, Prosenice, Litovel, Vrbátky a Zvoleněves (Ministerstvo zemědělství 2020). Cukrová řepa neslouží v dnešní době jen k výrobě cukru, ale i pitného nebo energetického lihu, krmiva, hnojiv a obnovitelné energie (Kolář 2022).

3.2 Cercosporová listová skvrnitost řepy

Cercosporová listová skvrnitost řepy způsobená patogenem *Cercospora beticola* je jedna z nejdestruktivnějších listových chorob cukrové řepy. První zmínka o této chorobě se objevila v roce 1876, kdy o ní informoval mykolog Pier Andrea Saccardo. Její původce napadá rod *Beta* a několik dalších druhů z čeledi *Amaranthaceae* včetně rodu *Spinacea*, *Artiplex* nebo *Amaranthus* (Weiland & Koch 2004). Epidemie cercosporové listové skvrnitosti řepy způsobily obrovské ekonomické ztráty po celém světě. Za zmínku stojí například epidemie v jižním Německu v osmdesátých a devadesátých letech minulého století. Dále ve Spojených státech amerických dokonce došlo v roce 1998 ke ztrátám vyčíslených na 113 milionů amerických dolarů. Napadené rostliny bývají také náchylnější k původcům skládkových chorob (Rangel et al. 2020).

3.2.1 Taxonomie a životní cyklus patogena

V Tabulce 1 je uvedeno taxonomické zařazení patogena *Cercospora beticola* tak, jak ho udává Národní centrum pro biotechnologické informace (NCBI). Říše *Fungi* zahrnuje jednobuněčné nebo vláknité organismy, jejichž buněčná stěna je tvořena převážně chitinem a β -glukanem. Do ní náležící oddělení *Ascomycota* zahrnuje přibližně 60 % všech známých hub. Většina druhů se rozmnožuje pohlavně i nepohlavně. Jedinci tvoří ve vřecku (asku) spory zvané askospory. Tělo hub je tvořeno hyfami – houbovými vlákny (Kazda et al. 2010).

Tabulka 1 Taxonomické zařazení patogena. Převzato z: The National Center for Biotechnology Information (2022)

| Taxonomická jednotka | Název |
|----------------------|---|
| Doména | <i>Eukaryota</i> |
| Říše | <i>Fungi</i> |
| Podříše | <i>Dikarya</i> |
| Oddělení | <i>Ascomycota</i> |
| Podkmen | <i>Pezizomycotina</i> |
| Třída | <i>Dothideomycetes</i> |
| Podtřída | <i>Dothideomycetidae</i> |
| Řád | <i>Mycosphaerellales</i> |
| Čeleď | <i>Mycosphaerellaceae</i> |
| Rod | <i>Cercospora</i> |
| Druh | <i>Cercospora beticola</i> Saccardo, 1876 |

Houba *C. beticola* je schopna za příznivých podmínek dokončit vícero nepohlavních cyklů za jedno vegetační období (Bolton et al. 2012b). Mezi obdobími pěstování cukrové řepy přežívá primárně jako pseudostromata nebo hyfy na rostlinných zbytcích. Pseudostromata mohou zůstat na rostlinných zbytcích až 2 roky a jsou považovány za zdroj primární infekce (Rangel et al. 2020). Toto potvrdila studie Khan et al. (2008), kdy byly infikované listy uloženy do půdy v hloubkách 0, 10 a 20 cm a pozorovány po dobu 10, 22 a 34 měsíců. Inokulum na povrchu půdy přežilo nejdéle (22 měsíců), zbytek pak jen 10 měsíců (Khan et al. 2008). Zdrojem infekce mohou být i jiné hostitelské rostliny, na nichž patogen také přežívá ve formě

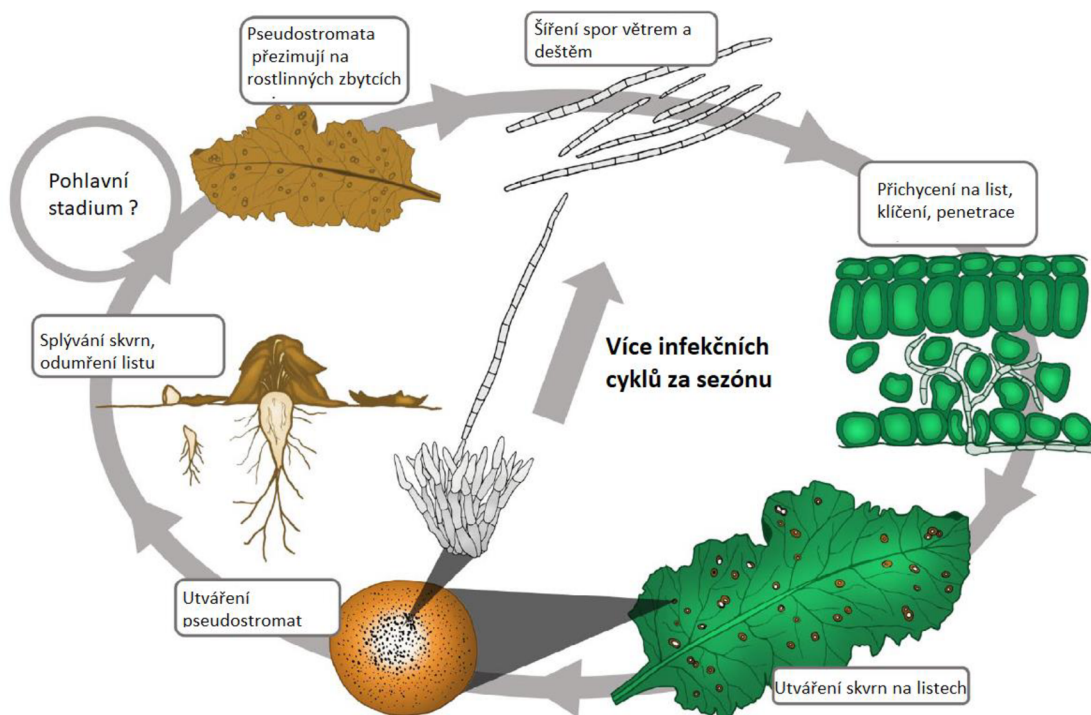
pseudostromat, potenciálně i infikované osivo. V porostu je pak patogen roznášen ve formě konidií větrem a deštěm, případně infekci mohou šířit také stroje, které přišly do kontaktu s infikovaným rostlinným materiálem. Pohlavní stadium patogena se pravděpodobně nevyskytuje nebo nebylo nalezeno (Rangel et al. 2020). Nicméně studie Bolton et al. (2012) naznačuje, že *C. beticola* vykazuje potenciál pro pohlavní rozmnožování.

Aby došlo k reprodukci, musí se nejprve z pseudostromat vytvořit konidiofory, které pak na jaře produkují konidie. Tomu může předcházet vegetativní růst mycelia. Jednotlivé struktury a grafické zobrazení životního cyklu je ilustrováno na Obrázku 2. Transmisní elektronová mikroskopie ukázala shluky 10 až 20 konidioforů, které se často objevují na obou stranách listů a jsou produkovány subepidermálními a substomatálními pseudostromaty. Pseudostromata jsou tři až šest buněk hluboké a osm až deset buněk široké útvary. Konidiofory se skládají z jedné nebo dvou buněk a jsou melanizované. Konidie jsou jehlovitého tvaru, bezbarvé s několika septy. Minimální teplota pro jejich utváření je 15 °C, relativní vlhkost musí být 60% nebo vyšší (Rangel et al. 2020).

Poté jsou konidie rozšiřovány větrem, deštěm, závlahou, ale i hmyzem primárně na spodní stranu listu. Tam se vyskytuje více stomat než na horní straně listu a příležitost pro invazi parenchymu elongační hyfou je tedy maximalizována (Weiland & Koch 2004).

Konidie na povrchu listu počne za vhodných podmínek klíčit klíčící hyfou, která se prodlužuje a roste směrem ke stomatům. (Solel et Minz, 1971; Weiland et Koch, 2004). Za podmínky vhodné ke klíčení se považuje vysoká relativní vlhkost (až okolo 100 %) a teploty okolo 25 °C. Na konci klíčící hyfy se vytváří apresorium, které přilne k povrchu průduchu a infekční hyfa vyrůstající z apresoria pak může následně přes stomata penetrovat do hostitele a intracelulárně se šířit v mezofylu. V této biotrofní části invaze a kolonizace hostitele zatím nejsou viditelné žádné příznaky. Poté přejde patogen do nekrotické fáze a začne produkovat fytotoxiny. Ty společně s degradující aktivitou enzymů, které patogen také produkuje vedou k nekrotizaci buněk. Dochází k projevu symptomů (Rangel et al. 2020).

V lézích se počnou formovat pseudostromata, která produkují nové konidie. Ty jsou opět roznášena větrem, vodou a hmyzem. Začíná nový infekční cyklus (Rangel et al. 2020). Patogen je během vegetačního období řepy polycyklický a jeden cyklus sporulace trvá v závislosti na polních podmínkách obvykle 12 dní (Khan et al. 2009).



Obrázek 2 Životní cyklus *Cercospora beticola*. Převzato a upraveno z Rangel et al. (2020)

3.2.2 Prognóza a signalizace patogena

Modely prognózy a signalizace spočívají ve sledování příznaků a intenzity napadení na listech cukrové řepy (Bittner 2021). Můžeme je rozdělit do dvou kategorií – 1. modely založené na osobní prohlídce porostu a 2. modely založené na sledování vybraných povětrnostních prvků významných pro rozvoj a šíření patogena (Spitzer et al. 2011). V České republice se stále využívá model první kategorie pro ošetření podle **prahů hospodářské škodlivosti (PHŠ)**, který se používá i v Rakousku a Německu. Je hodnoceno sto listů odebraných z porostu řepy cukrové (to znamená, že napadení na úrovni 1 % je 1 list s nejméně jednou skvrnou). Hodnocení začíná již od zapojení řádků (přibližně od poloviny června). Pokud je dosaženo příslušného prahu škodlivosti (viz Tabulka 2), porost řepy by měl být fungicidně ošetřen.

Tabulka 2 Práh škodlivosti *Cercospora beticola*. Převzato z Bittner (2021)

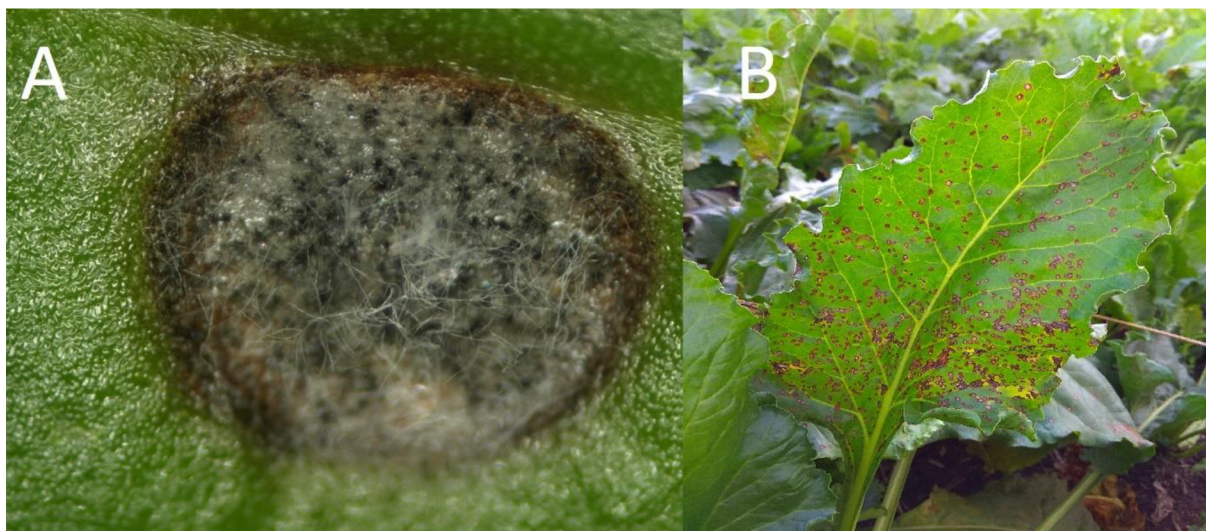
| Termín | Procento napadení |
|----------|--------------------|
| do 31.6 | 1 % (jen Rakousko) |
| do 31.7. | 5 % |
| do 15.8. | 15 % |
| po 15.8. | 45 % |

Výskyt *C. beticola* a termín ošetření je z velké části závislý na stáří rostlinných pletiv listů a měla by být tedy věnována zvýšená pozornost porostům řepy cukrové po zapojení řádků. Pak se totiž mohou objevovat první viditelné příznaky (Bittner 2021).

Dalším modelem využívaným v ČR je **metoda DIK/DIV (denní infekční koeficient/daily infection value)** původem ze Spojených států amerických (Spitzer et al. 2011). Fungicidní zásah je plánován podle prvního výskytu patogena a splnění definovaných podmínek pro šíření patogena (Bittner 2021). DIK tedy závisí na infekčním potenciálu patogena v průběhu uplynulých 48 hodin a je vyjádřen číslem od 0 do 14, které je založeno na denním infekčním koeficientu. Ten vychází z počtu hodin v průběhu dne, kdy byla vzdušná vlhkost vyšší než 90 % a z průměrné teploty během těchto hodin (Spitzer et al. 2011). Pokud je součet DIK za dva po sobě jdoucí dny méně než 6, je pravděpodobnost rizika infekce nízká. Hodnota součtu DIK rovna 6 je mezní, a hodnota mezi 7 a 14 značí podmínky příznivé pro infekci (Windels et al. 1998). Další prognostický model původem z Francie od firem Cristal Union a Syngenta pracuje s daty o aktuální teplotě, životním cyklu patogena a agronomickými riziky (závlaha, agrotechnika, osevnické postupy, odrůda). Modulace pak závisí přímo na pěstitelském regionu nebo jednotlivých pěstitelích. O nutnosti ošetření jsou pěstitelé informováni přes mobilní aplikaci (Bittner 2021).

3.2.3 Příznaky choroby a diagnostika

Mezi charakteristické příznaky cercosporové listové skvrnitosti patří náhodně rozprostřené skvrny na listech (Weiland & Koch 2004). Skvrny jsou v průměru 0,2–0,5 cm velké, ohraničené červenofialovými okraji (viz Obrázek 3) (Hallau et al. 2018). Intenzita červenofialového zbarvení závisí na odrůdě cukrové řepy a množství akumulovaného betacyaninu v listech (Skaracis et al. 2010). Střed těchto skvrn je vybarven do světle hněda. Za vlhkého počasí jsou viditelná pseudostromata, která produkují konidiofory (Hallau et al. 2018). Léze se mohou tvořit také na řapících (Skaracis et al. 2010). Od dalších listových chorob vyskytujících se na cukrové řepě (způsobených původci *Ramularia beticola*, *Alternaria alternata*, *Phoma betae* *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*) se cercosporová listová skvrnitost odlišuje menší velikostí a tvarem skvrn a výskytem pseudostromat. Silně napadené listy žloutnou a skvrny mohou postupně splývat a tvořit větší nekrotické celky (viz Obrázek 3). Takto infikované listy pak odumírají a napadené rostliny mohou být rozpoznatelné již z dálky. Rostliny zasažené infekcí jsou často nerovnoměrně rozptýleny po poli, nejvíce se vyskytují v plochách, kde je vyšší vlhkost (M. Harveson 2013).



Obrázek 3 A: Makroskopický pohled na pseudostrómata patogena *Cercospora beticola* B: Infikované listy. Fotografie byly poskytnuty Katedrou ochrany rostlin ČZU.

Při diagnostice je nutné včas rozlišit skvrny způsobené *C. beticola* a *Ramularia beticola*, které si mohou být podobné. Mezi diagnostické metody používané v praxi patří zejména: klasická mikroskopie a identifikace spor, izolace a kultivace na živných půdách nebo metody PCR (polymerázová řetězová reakce), pomocí kterých můžeme identifikovat patogena na ještě bezpříznakových listech řepy cukrové. V současné době existují i přenosné testovací sady pro kvantitativní PCR, které lze využít i v terénu. Diagnostika je tedy možná přímo v polních podmínkách na ještě bezpříznakových rostlinách (Bittner 2021). S vývojem a dostupností mobilních telefonů se nabízí možnost detekce *C. beticola* pomocí chytrých telefonů. Tuto možnost zkoumali Hallau et al. (2018), kdy se pokusili pomocí chytrých telefonů detekovat šest nejčastějších chorob řepy cukrové v Německu s využitím algoritmu založeného na souboru fotografií pořízených zařízením. Úspěšnost rozlišení vybraných šesti chorob včetně cercosporové listové skvrnitosti byla 82 % (Hallau et al. 2018). V budoucnu by tedy pravděpodobně bylo možné použití i alternativních metod diagnostiky.

3.2.4 Toxiny produkované patogenem

Cercospora beticola je hemibiotrofní organismus. V počáteční fázi infekce a kolonizace rostlinného pletiva se chová jako biotrof, což se projeví latentní, bezpříznakovou fází, kde invazní hyfy vrůstají do hostitelské rostliny. Poté pokračuje fází nekrotrofickou, kdy patogen produkuje toxiny určené k usmrcení buněk a uvolnění živin (Rangel et al. 2020).

Cercosporin je světlem aktivovaný, hostitelsky nescifický toxin produkovaný většinou druhů rodu *Cercospora*. Někteří zástupci tohoto rodu ho nejsou schopni syntetizovat, nicméně neztrácejí tím vlastnost patogenity a virulence (Rangel et al. 2020). Tento toxin byl poprvé získán roku 1957 z *Cercospora kikuchii*, jeho fotodynamické vlastnosti byly ale popsány až v sedmdesátých letech (Daub & Ehrenschaft 2000). Řadí se do skupiny perylenechinonů, fotosenzitizérů, látek, které vyžadují pro svou toxicitu světlo a pomocí aktivních forem kyslíku poškozují buňky. Fotosenzitizéry absorbují světelnou energii a poté

jsou přetvořeny do energeticky aktivního stavu, který reaguje s molekulárním kyslíkem a vytváří aktivní formy kyslíku. Ty poté působí změny v makromolekulách společných pro všechny buňky, jako jsou například lipidy, bílkoviny nebo aminokyseliny (Daub & Ehrenshaft 2000).

Beticoliny jsou skupina hostitelsky nespecifických fyto toxinů, z nichž dvacet látek produkuje právě *C. beticola* (Rangel et al. 2020). Všechny mají podobnou strukturu – polycyklickou kostru lišící se konfigurační izomerií (*ortho* – nebo *para*-). Beticoliny způsobují v rostlinách dramatický pokles rozpustných látek jakými jsou například aminokyseliny a betacyanin. U hrachu a kukuřice působí beticoliny inhibicí ATP-dependentního transportu vodíkových iontů (Goudet et al. 2000).

3.3 Metody ochrany proti *Cercospora beticola*

Metody v boji proti škodlivým organismům můžeme rozlišit na přímé a nepřímé. Nepřímé metody se vyznačují preventivním charakterem, jejich cílem je vytvořit nepříznivé podmínky pro původce chorob nebo škůdce. Mezi metody nepřímé řadíme metody agrotechnické, šlechtitelské a organizační. Naopak přímé metody si kladou za cíl původce chorob nebo škůdce zahubit. Metody přímé zahrnují metody chemické, biologické, mechanické a fyzikální (Kazda et al. 2010). Tyto kategorie je možné následně kombinovat do strategií integrované ochrany rostlin (Sharma et al. 2013). Při absenci ochranných opatření proti *C. beticola* v oblastech s vysokým výskytem se ztráty výnosů pohybují mezi 25 a 50 % (Karaoglanidis & Bardas 2006).

3.3.1 Nepřímé metody

Ackermann (2013) uvádí, že současné agrotechnické postupy pěstování řepy cukrové k rozvoji choroby spíše napomáhají. Kultivace může snížit množství přezimujícího inokula (M. Harveson 2013). Je tedy nutné neponechávat rostlinné zbytky na povrchu pole, nýbrž je zapravit do půdy. Měla by být volena taková agrotechnika, která umožní urychlit rozklad těchto zbytků (Bittner 2021).

Také je třeba pěstovat řepu cukrovou na stejném nebo blízkém pozemku teprve až po několika letech (Ackermann 2013). Abychom minimalizovali pravděpodobnost šíření spor do nového porostu, je třeba dodržet odstup alespoň 90 metrů od loňského silně infikovaného porostu, zvláště pokud se jedná o náchylnou odrůdu (M. Harveson 2013). Ideální odstup v osevním sledu pro řepu cukrovou je minimálně 4 roky, nejlépe 5 a více (Bittner 2021). Nejvhodnějšími předplodinami mohou být ozimé obilniny. Naprosto nevhodné předplodiny jsou jetel, vojtěška a kukuřice, z důvodu zhoršené vzcházejivosti kvůli nerozloženým zbytkům a zhoršené jakosti řepy z důvodu pozdního čerpání dusíku (Pulkrábek et al. 2007). Dalším aspektem může být volba odrůd s vyšší úrovní odolnosti, kdy může být vývoj patogena zpožděn až o dva týdny (Bittner 2021).

Prevencí může být i zařazování nehostitelských rostlin (řepka, mák, brambory, luskoviny, oves) do osevního postupu (Ackermann 2013). Skaracis et al. (2010) uvádějí, že v rámci správné zemědělské praxe by mělo docházet i k redukci hostitelských plevelů. Kromě toho lze vytvořit méně příznivé podmínky pro patogena omezením nadměrného rozvoje listové růžice, což můžeme ovlivnit úpravou hnojení dusíkem a zásobování vodou v porostu.

Odrůdy cukrové řepy s rezistencí k původci cercosporové listové skvrnitosti jsou nyní rozšířené ve všech zemích světa, kde se patogen *C. beticola* pravidelně vyskytuje. Největší efekt při použití těchto odrůd nastává při vážných epidemiích onemocnění cercosporovou listovou skvrnitostí. Při těchto podmínkách je výtěžek cukru i čistota šťávy výrazně zvýšena u rezistentních odrůd ve srovnání s odrůdami náchylnými při absenci použití fungicidů. V pozdních stadiích závažné epidemie ale není rezistence hostitele dostatečná. Dochází

k vážnému poškození starých listů a růstu listů nových – důsledkem je snížený výtěžek cukru. Rezistentní odrůdy mají ale při menší míře napadení porostu menší výnosy než ty náchylné. Resistance k patogenu *C. beticola* je polygenní a kvantitativní, přesné číslo genů přispívající k rezistenci není však známo. Histologické studie interakcí patogena a hostitele objevily různé obranné reakce rostliny po invazi patogena. Spekuluje se o zapojení některých proteinů souvisejících s patogenezí – chitináz a glukonáz. Také některé nízkomolekulární látky jako například tyramin a fytoalexiny byly asociovány s obranou proti *C. beticola*. S nástupem molekulárních markerů se objevila nová možnost pro genetické lokalizace genů zapojených do obranných mechanismů a následné uplatnění v genetickém výzkumu (tzv. „molekulární šlechtění“). Lokusy kvantitativních znaků (QTL) jsou účinným nástrojem pro mapování polygenně založených dědičných rezistencí a odhalení počtu a polohy genů rezistence v hostitelské rostlině (Weiland & Koch 2004).

3.3.2 Přímé metody

3.3.2.1 Chemické metody ochrany

Chemická ochrana a její načasování je v boji proti patogenu *C. beticola* zásadní. V současné době je ve světě registrováno dostatečné množství ochranných a systémových fungicidů. Ty mohou pěstitelé v různých částech světa používat k potlačení této choroby. Chemické skupiny ve světě dostupných fungicidů zahrnují kontaktní dithiokarbamáty, nitrily a fentinové deriváty, benzimidazoly se systémovým a kurativním účinkem, systémové inhibitory ergosterolu s ochranným a kurativním účinkem a chinonové vnější inhibitory s ochranným, kurativním a eradikativním účinkem. Kontaktní fungicidy by měly být aplikovány před výskytem prvních příznaků, aby inhibovaly klíčení konidií. Systémové fungicidy ale působí i v případě, že je choroba na rostlině a v porostu již přítomna. V závislosti na prostředí a úrovni rezistence použité odrůdy může být nutné použít až sedm postřiků za sezónu. Zahájením aplikace fungicidů hned při prvním výskytu příznaků choroby a pokračováním v chemickém ošetření podle podmínek prostředí, průběhu choroby a ekonomických prahů lze snížit počet nutných chemických aplikací a zároveň ochrana plodin proti patogenu zůstává stále poměrně účinná (Skaracis et al. 2010).

Pozemní aplikace fungicidů je nutná s dostatečným množstvím vody (minimálně 300 l/ha), případně s použitím smáčedla. Je nevhodné aplikovat fungicidy za vysokých teplot a intenzivního slunečního záření, doporučují se spíše časně ranní aplikace. Časový odstup mezi jednotlivými aplikacemi závisí na klimatických podmínkách pro šíření patogena v porostu. Udává se ale, že by neměl být delší než 3 týdny s ohledem na typ použitého fungicidu (Bittner 2021).

Aktuální seznam v České republice registrovaných přípravků proti původci cercosporové listové skvrnitosti můžeme vidět v Tabulce 3. Fungicidní látky, které je možné použít, jsou nejčastěji na bázi strobilurinů nebo jejich kombinace s azoly, popřípadě azoly v kombinaci s benzimidazoly. Kvůli nárůstu výskytu populací *C. beticola* rezistentních vůči

strobilurinům a některým dalším účinným látkám je žádoucí dodržovat zásady antirezistentní strategie ochrany (Bittner 2021). Vzhledem k tomu, že vývoj nových fungicidů vyžaduje velké finanční investice a dlouhé časové období výzkumu, je nutné dbát na to, aby nedošlo ke vzniku rezistence vůči fungicidům v populacích patogena. To platí zejména proto, že fungicidy s novými mechanismy účinku se objevují zřídka – během několika let se vůči nim může objevit rezistence v populacích patogenů (Deising et al. 2008).

Azoxystrobin a trifloxystrobin, tzv. **strobiluriny** patří mezi QoI fungicidy (Quinone outside Inhibitors). Jejich mechanismus účinku spočívá v inhibici přenosu elektronu v komplexu cytochromu bc1 (complex III) v mitochondriálním transportním řetězci (Oliver & Hewitt 2014). Tím narušují produkci ATP, což způsobuje u citlivých hub energetický deficit (Shrestha et al. 2020). Nejcitlivějším vývojovým stadiem hub k QoI je klíčení spor. Sloučeniny patřící do této skupiny obecně působí systémově a mohou zajistit dlouhodobou ochranu před původci chorob (Oliver & Hewitt 2014). Působí proti širokému spektru patogenů z různých taxonomických skupin (Tian et al. 2021). Teprve dva roky po uvedení strobilurinů na trh byla pozorována rezistence u některých izolátů padlí travního (*Blumeria graminis*), které obsahovaly mutaci v genu cytochromu b (Oliver & Hewitt 2014).

Fenpropidin náleží do skupiny aminů (SBI Class II). Mechanismus účinku je inhibice $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ izomerázy a Δ^{14} reduktázy tudíž inhibice biosyntézy ergosterolu (Zhao et al. 2012). Jejich spektrum účinnosti proti původcům houbových chorob je značně omezené a nejčastěji se používají proti padlí (Oliver & Hewitt 2014).

Triazoly (difenokonazol, tetrakonazol, mefentriflukonazol, cyprokonazol) patří mezi DMI fungicidy, látky inhibující demetylaci (Demethylation Inhibitors, SBI Class I) Triazoly se vyznačují heterocyklem obsahující dusík s doprovodnou lipofilní skupinou. Tato skupina obsahuje více než 25 chemických látek s různým použitím, jako je například moření osiva nebo listová aplikace (Oliver & Hewitt 2014). Inhibují biosyntézu sterolů, které jsou nutné k udržení integrity buněčných membrán. Pokud se aplikují jako kurativní ošetření, je nutné je provést v rané fázi infekce. Jakmile dojde k produkci spor na napadené rostlině, nejsou triazoly účinné. Jsou snadno přijímány listy, ve kterých jsou pohyblivé v xylému. Vzhledem k velmi specifickému místu účinku se vůči těmto látkám může tvořit v populacích patogenů rezistence (Rouabhi 2010).

Fluoropyram náleží do skupiny SDHI (Succinate-dehydrogenase Inhibitors) inhibitorů sukcinát-dehydrogenázy (Oliver & Hewitt 2014). V roce 2022 bylo dle Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) na seznamu 12 různých chemických skupin sloučenin. Tyto látky mají specifický způsob účinku – v mitochondriích se pevně vážou na místa vázající ubichinon v komplexu sukcinátdehydrogenázy. To vede k zablokování přístupu k substrátu a následnému zabránění oxidaci sukcinátu na fumarát a redukcii

ubichinonu na chinon. Dochází k snížené produkci energie a zastavení růstu hub (Sang et al. 2018).

Síran měďnatý byl poprvé použit jako fungicid k ochraně proti *Tilletia grisea*. Měďnatý kationt se snadno hromadí v citlivých houbách. Tvoří komplexy s enzymy a zapříčiňuje celkové narušení metabolismu buněk. Přípravky s obsahem mědi musí být rozpustné ve vodě, aby se předešlo fytotoxicitě. Musí být aplikovány poměrně často, musí být dosaženo dostatečné pokrytí nutné k ochraně rostliny. **Síra** inhibuje respiraci, narušuje proteiny a vytváří cheláty s těžkými kovy. Za vlhkého a teplého počasí nad 35 °C může být fytotoxická (Oliver & Hewitt 2014).

Tabulka 3 Registrované přípravky proti původci cerkosporové listové skvrnitosti v České republice (ke dni 12.11.2022)
(Ministerstvo zemědělství 2022)

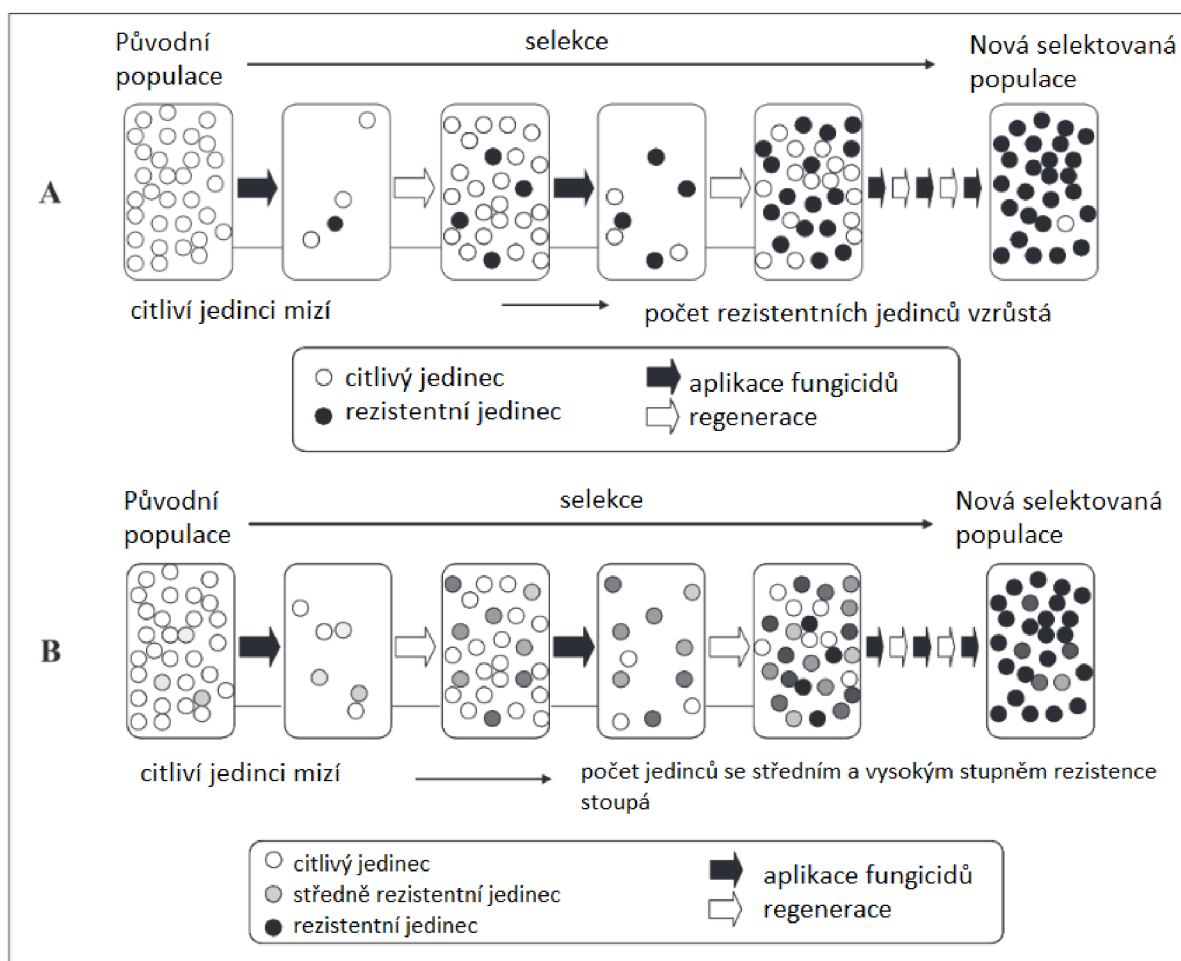
| Název přípravku | Účinná látka |
|-----------------|---------------------------------------|
| Amistar | Azoxystrobin |
| Amistar 250 SC | Azoxystrobin |
| Amistar Gold | Azoxystrobin, Difenokonazol |
| BAGANI | Tetrakonazol |
| Belanty | Mefentriflukonazol |
| Cerkato | Tetrakonazol |
| Dafne 250 EC | Difenokonazol |
| Eminent 125 ME | Tetrakonazol |
| Ila 250 EC | Difenokonazol |
| JAMOTO | Tetrakonazol |
| Mirador UNI | Azoxystrobin, Difenokonazol |
| Mirador Xtra | Azoxystrobin, Cyprokonazol |
| Propulse | Fluopyram, Prothiokonazol |
| Score 250 EC | Difenokonazol |
| Serenade ASO | <i>Bacillus subtilis</i> kmen QST 713 |
| Sfera 535 SC | Cyprokonazol, Trifloxystrobin |
| Spyrale | Difenokonazol, Fenpropidin |
| Tern 750 EC | Fenpropidin |
| Yankee | Síra, Síran měďnatý |
| Yukon | Síra, Síran měďnatý |

3.3.2.1.1 Rezistence vůči fungicidům

Vznik rezistence proti fungicidům v populacích původců houbových chorob je jeden z nejdůležitějších problémů moderního zemědělství a v posledních desetiletích se po celém světě objevilo velké množství případů (Deising et al. 2008). Rezistenci k fungicidům můžeme definovat jako výsledek adaptace houbového patogena k fungicidu díky dědičné genetické změně, která vede k výskytu a rozšíření mutantů se níženou citlivostí k fungicidu v populaci patogena (Leadbeater 2014). Je to schopnost organismů přežívat dávky pesticidů, které dříve usmrtily většinu populace. Může vzniknout vůči jedné anebo skupině látek současně (Kazda et al. 2010). Ovlivňuje pěstitele, poradce i chemický průmysl produkující přípravky na ochranu rostlin. Bez úspěšného zvládnutí rezistence může v budoucnu docházet k sníženému výnosu a kvalitě polních plodin (Leadbeater 2014). Mechanismy zapříčínující vznik rezistence mohou být různé, rozlišujeme kvalitativní rezistenci a kvantitativní rezistenci (Deising et al. 2008).

Kvalitativní rezistence (viz Obrázek 4) je založena na mutacích, které mohou být vneseny UV zářením. Toto má význam zejména u větrem přenášených spor bez pigmentace. Pokud je gen kódující cílový protein mutován tak, že dojde k záměně aminokyseliny nutné k vazbě fungicidu, k inhibici cílového proteinu již nedochází. Ošetření fungicidem tak selhává. I přesto, že mohou být použity velmi vysoké koncentrace fungicidů, rezistentní jedinci nejsou ovlivněni a ošetření přežijí. Několik jedinců divokého typu, přirozeně se vyskytujících (bez zmíněné mutace), může také přežít ošetření. Další aplikace stejného fungicidu poté neustále selektují jedince s mutací a jedinci divokého typu zmizí. Během selekce můžeme pozorovat jen úplnou citlivost nebo úplnou odolnost. Fenotypy se střední odolností se nevyskytují. Rychlost procesu selekce závisí na biologii patogena a počtu aplikací fungicidů. Tato rezistence založená na mutacích je dědičná a potomstvo se dokáže vyvíjet i v přítomnosti konkrétního fungicidu (Deising et al. 2008).

Ke **kvantitativní rezistenci** (viz Obrázek 4) vůči fungicidům může vést několik různých mechanismů, ale nejčastěji je tento typ rezistence způsoben udržováním nízké koncentrace fungicidu. Mechanismy udržující intracelulární koncentrace fungicidů pod kritickou hranicí zahrnují syntézu efluxních transportérů, které vylučují molekuly účinné látky do extracelulárního prostoru buněk a modifikace plazmatických membrán způsobující sníženou propustnost fungicidů nebo syntézu enzymů, které degradují molekuly fungicidů. Obecně se populace patogenů skládají z jedinců s více či méně výraznou úrovní tolerance vůči fungicidům. Při ošetření fungicidy tolerantní jedinci pravděpodobně přežijí, a navíc subletální fungicidní stres bude podporovat syntézu již zmíněných efluxních transportérů nebo enzymů degradujících účinné látky (Deising et al. 2008).



Obrázek 4 Vývoj rezistence k fungicidům je selekční proces, přičemž selekčním činitelem je fungicid. Kvalitativní rezistence (A), kvantitativní rezistence (B). Převzato a upraveno z Deising et al. (2008)

Pro udržení ideální úrovně ochrany pomocí fungicidů je důležité sledovat citlivost populace patogenů a jejich změny na citlivost vůči fungicidům (Secor et al. 2010). U fakultativních patogenů můžeme při diagnostice rezistence využít metodu otrávených ploten – kultivaci organismu na umělé živné půdě s přidáním určitého fungicidu v různých koncentracích. U fakultativních i obligátních patogenů můžeme využít metod molekulárně biologických (Kazda et al. 2010). I přesto, že rezistenci lze často prokázat v laboratorních podmínkách, nemusí to nutně znamenat snížení ochrany v polních podmínkách (Leadbeater 2014). Je tedy nutné doplnit laboratorní metody skleníkovými a polními pokusy. Pokud je potvrzena rezistence vůči určitému fungicidu, je nutné vyloučit fungicidní přípravky vůči kterým byla rezistence zjištěna, nepěstovat plodiny opakovaně po sobě, využívat co nejširší spektrum přípravků a v neposlední řadě opakovaně testovat přítomnost rezistentních kmenů patogena (Kazda et al. 2010).

Cercospora beticola je vysoce rizikový patogen z hlediska vývoje rezistence vůči fungicidům zvláště kvůli své polycyklické povaze, bujné sporulaci a vysoké genetické variabilitě. U QoI fungicidů bylo zjištěno, že s rezistencí vůči QoI u *C. beticola* souvisí bodová mutace, která způsobuje záměnu aminokyseliny glycinu za alanin v poloze 143 (G143A) v cytochromu b (Shrestha et al. 2020). Méně častá je substituce fenylalaninu za leucin

(F129L) nebo glycinu za arginin (G137R) (Piszczek et al. 2017). Mutace F129L a G137R jsou spojeny se střední úrovní rezistence – populace patogenů s touto mutací jsou stále kontrolovatelné pomocí QoI fungicidů (Birla et al. 2012). U DMI fungicidů je rezistence spojena se třemi mechanismy – substitucí aminokyselin v cytochrom P450-dependentní C-14- α -demetyláze (gen Cyp51), nadměrnou expresí Cyp51 a zvýšeným vyplavováním fungicidu z buňky (Shrestha et al. 2020). Změna aminokyselin v cílovém proteinu vede ke snížení vazební schopnosti a ke snížené citlivosti cílového organismu. Nadměrná exprese cílového proteinu také vede k celkovému snížení citlivosti vůči DMI fungicidům. Aktivní vyplavování fungicidu z buňky pomocí efluxních pump zapříčiňuje ztrátu účinnosti v polních podmínkách. Žádný z těchto mechanismů ale nezpůsobuje úplnou ztrátu účinnosti proti DMI fungicidům. Resistence vůči této třídě fungicidů se řadí mezi kvantitativní (Muellender et al. 2021).

3.3.2.2 Biologické metody ochrany

Biologická ochrana je definována jako použití žijících organismů za účelem snížení populační hustoty nebo vlivu určitého škodlivého organismu (Eilenberg 2007). Závisí na znalosti biologických interakcí, stupni ekosystému, organismu, buněčné i molekulární úrovni. Řízení biologické ochrany rostlin je často složitější ve srovnání s fyzikálními a chemickými metodami ochrany (Sharma et al. 2013).

Použití tzv. bioagens (BCA, biological control agents) může sloužit jako alternativní možnost k použití chemické ochrany rostlin. Biologická ochrana s použitím mikroorganismů proti rostlinným patogenům je z dlouhodobého hlediska vhodnou alternativou k pesticidům. Použití pesticidů je často nákladné a může mít škodlivý účinek na člověka. Také může působit nepříznivě na užitečné půdní organismy (Arzanlou et al. 2016). Narayanasamy (2013) uvádí, že BCA můžeme dělit na biotické a abiotické agens.

Jako **biotické** BCA můžeme chápat například různé viry, houby nebo bakterie, které mají inhibiční efekt na patogeny prostřednictvím různých mechanismů účinku (Narayanasamy 2013). BCA účinkují například na základě mykoparazitismu, produkce hydrolytických enzymů a antibiotických látek, kompetice o živiny a životní prostor nebo navození indukované rezistence hostitele (Arzanlou et al. 2016). Přehled mezidruhových antagonistických vztahů s příklady je uveden v Tabulce 4.

Tabulka 4 Mezidruhové antagonistické vztahy vedoucí k biologické kontrole fytopatogenů. Převzato z Pal et Gardener (2006)

| Typ | Mechanismus | Příklady |
|--|--|--|
| Přímý antagonismus | Hyperparazitismus | Lytické/některé nelytické mykoviry <i>Trichoderma virens</i> |
| Smišený (mixed-path) antagonismus | Antibiotika Lytické enzymy | Cyklické lipopeptidy Chitinázy Glukanázy Proteázy |
| Nepřímý antagonismus | Neregulované odpadní produkty Fyzikální/chemická interference Kompetice Indukovaná rezistence | Amoniak Oxid uhličitý Blokace půdních pórů Okupace fyzických nik Spotřeba exudátů Fytohormonálně mediovaná Kontakt s buněčnými stěnami hub |

Abiotické BCA jsou odvozené z různých zdrojů organického i anorganického původu. Můžeme je aplikovat do půdy, na rostliny nebo jako mořidlo za účelem snížení výskytu a závažnosti původců chorob. Organické doplňky jako kompost, zelené hnojení aj., mohou obsahovat antagonistické organismy nebo mohou jejich vývoj podporovat. Rostlinné extrakty a sekundární metabolity (například esenciální oleje) ukázaly vysoký potenciál v potlačení původců chorob a některé jsou dostupné i jako komerční produkty (Narayanasamy 2013).

3.3.2.2.1 Bakteriální BCA

Druhy rodu *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Paenibacillus* mají inhibiční efekt na široké spektrum fytopatogenních hub za užití různých mechanismů. Například při opakovaných aplikacích *Bacillus mycoides* ve skleníkových a polních podmínkách bylo pozorováno znatelné snížení příznaků cercosporové listové skvrnitosti (Arzanlou et al. 2016). Ve studii Esh et al. (2011) bylo zkoumáno sedm izolátů *Bacillus subtilis* a *Bacillus pumilus* jako bioagens proti původci cercosporové listové skvrnitosti. Při skleníkových pokusech bylo zaznamenáno snížení závažnosti onemocnění o 73,33–80 % (*B. subtilis*) a 80–83 % (*B. pumilus*). Obsah sacharózy byl pak u ošetřených rostlin vyšší než u neošetřené kontroly. Studie naznačuje, že *B. subtilis* a *B. pumilus* indukují v rostlině rezistenci. Při polních pokusech pak došlo ke snížení závažnosti onemocnění o 56,18–81,27 % (*B. subtilis*) a 62,55–81,27 % (*B. pumilus*). Starovic

et al. (2021) zkoumali antagonistickou aktivitu *Pseudomonas chloropsis* proti patogenu *C. beticola*. Všechny testované kmeny *P. chloropsis* prokázaly antagonistickou aktivitu a jeden z nich (E65) dosáhl nejvyššího procenta inhibice (75,8 %).

Paenibacillus spp. jsou fakultativně aerobní, endosporulující a grampozitivní bakterie (Narayanasamy 2013). Tyto bakterie byly izolovány z různých prostředí – většina z nich byla nalezena v půdě, často asociována s kořeny rostlin. Tyto rhizobakterie podporují růst rostlin a mohou být využity v zemědělství. Produkují kyselinu indol-3-octovou a další auxinové fytohormony, dokáží přeměňovat nepřijatelné formy fosforu v přijatelné a některé druhy dokonce dokáží fixovat atmosférický dusík. Jedna z nejdůležitějších vlastností druhů rodu *Paenibacillus* je schopnost biologické kontroly patogenů. Mohou neutralizovat rozmanitou skladbu fytopatogenů i hmyzích herbivorů. Některé druhy rodu *Paenibacillus* jsou tolerantní k některým fungicidům a insekticidům, a proto se nabízí možnost společné aplikace. Způsobují v rostlině také takzvanou indukovanou systémovou rezistenci (ISR) – obranný mechanismus v rostlinných pletivech, které jsou prostorově vzdáleny od induktoru. Rostlina je poté hypersenzitivní k potenciálním hrozbám a její obranné mechanismy jsou rychlejší a silnější. Mnoho druhů rodu *Paenibacillus* konkuruje s dalšími mikroorganismy za pomoci produkce antimikrobiálních látek. Ty zahrnují různé peptidy, enzymy (glukanázy, chitinázy, celulózy a proteázy) a těkavé organické látky (benzeny, aldehydy, ketony, benzaldehyd, fenol aj.). Hydrolytické enzymy produkované rodem *Paenibacillus* mohou narušit buněčnou stěnu hub. Některé druhy jsou dokonce původci chorob včel a jiných bezobratlých (Grady et al. 2016).

Rod *Bacillus* zahrnuje velkou skupinu grampozitivních, endosporulujících, fakultativně anaerobních nebo aerobních bakterií. Tyto bakterie mohou obývat velké množství různých ekologických nik – jsou přítomny v půdě, ovzduší, v rhizosféře rostlin, ale i v trávicím traktu zvířat. Z biotechnologického hlediska je jednou z nejdůležitějších vlastností druhů rodu *Bacillus* produkce mnoha sekundárních metabolitů. Například genom kmenů *Bacillus subtilis* obsahuje 4–5 % genů pro syntézu sekundárních metabolitů a až 24 strukturálně odlišných antimikrobiálních látek (Fira et al. 2018). Některé druhy *Bacillus* spp. mohou, pomocí fixace dusíku, solubilizace fosfátu nebo produkce fytohormonů, podporovat růst rostlin. Většina druhů rodu *Bacillus*, které jsou použitelné jako BCA, jsou izolovány právě z rhizosféry. Bakterie rodu *Bacillus* často kolonizují kořeny různých jednoděložných i dvouděložných rostlin, kde sekretují antimikrobiální látky. Také byla prokázána antagonistická aktivita proti většině významným houbovým patogenům rostlin (*Botrytis cinerea*, *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Blumeria graminis*, *Zymoseptoria tritici* aj.). Antagonismus proti *Oomycota* byl také pozorován (Anckaert et al. 2021). Některé druhy rodu *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* aj.) mohou vyvolat indukovanou systémovou rezistenci (Santoyo et al. 2012).

Pseudomonas je rod nesporulujících, gramnegativních bakterií (Santoyo et al. 2012). Využití bakterií rodu *Pseudomonas* je možné v biotechnologiích, bioremediaci, biologické

ochraně nebo při podpoře růstu rostlin (Höfte 2021). Podobně jako bakterie *Bacillus* spp. se bakterie tohoto rodu nacházejí ve všech možných prostředích včetně rhizosféry. Vyznačují se rychlou reprodukcí a tudíž i dobrou kolonizací rhizosféry (zvláště v případě nízkého zásobení prostředí živinami) (Santoyo et al. 2012). Někteří jedinci rodu *Pseudomonas* mohou být tedy využiti ke kontrole půdou přenosných patogenů (Höfte 2021). Mají schopnost produkovat různorodé sekundární metabolity jako antibiotika, polysacharidy nebo siderofory (Santoyo et al. 2012). Kromě kompetice o živiny a prostor a antibiocy se vyznačují jedinci rodu *Pseudomonas* schopností aktivovat indukovanou systémovou rezistenci. Nejčastější zástupci rodu *Pseudomonas*, kteří jsou potenciálně využitelní v ochraně rostlin jsou: *P. aureofaciens*, *P. chloraphis*, *P. fluorescens* a *P. putida* (Mcspadden Gardener 2007).

3.3.2.2.2 Esenciální oleje

V současné době je z důvodu ochrany životního prostředí žádoucí hledat k současným fungicidům alternativní přípravky. Těmi mohou být například různé esenciální oleje (Fatouh et al. 2011). Právě léčivé rostliny, které tyto oleje obsahují, jsou bohatým zdrojem různých biologicky aktivních látek s antimikrobiálními účinky, pro které byly po léta využívány v tradiční medicíně. Také esenciální oleje mají baktericidní, fungicidní a virocidní vlastnosti. Toto je podloženo nespočtem dat ze studií testující inhibiční efekt esenciálních olejů vůči velkému množství fytopatogenů (Starovic et al. 2021).

Starovic et al. (2021) ve své práci zkoumali antifungální účinky esenciálních olejů z *Echinophora tenuifolia*, dobromysli (*Origanum vulgare*), bazalky (*Ocimum basilicum*) a myrty (*Myrtus communis*) proti patogenu *C. beticola*. Všechny tyto oleje vykazaly antifungální aktivitu, přičemž nejsilnější ji prokázal esenciální olej z oregana. Dále například Fatouh et al. (2011) testovali jednotlivé složky esenciálních olejů z citrusů – nerol, methylanthranilát a citral. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při koncentraci citralu a methylanthranilátu 5,0 ml/l, kdy došlo ke zvýšení výnosů řepy cukrové až o 11,5 a 10,5 %. Kromě inhibice patogenu *C. beticola* došlo zároveň i k inhibici *Alternaria tenuis* způsobující alternariovou skvrnitost řepy. Fatouh et al. (2011) tedy doporučují použití těchto složek esenciálních olejů jako ekologickou alternativu pro ochranu proti *Cercospora* a *Alternaria*.

Thymus vulgaris L. (tymián červený) je kvetoucí rostlina náležící do čeledi *Lamiaceae*, rodu *Thymus*. Původně pochází z jižní Evropy a vyznačuje se malými silně aromatickými stálezelenými listy a růžovými až fialovými květy. Po staletí byl kvůli svému antimikrobiálnímu a protizánětlivému účinku využíván v lidovém lékařství. Z chemického hlediska je typický svým chemickým polymorfismem – je známo 6 chemotypů esenciálních olejů *T. vulgaris*: geraniol, linalool, α -terpineol, tujanol-4, thymol a carvacrol. Ve většině rostlin je obsažen jen jeden chemotyp, v některých mohou být nalezeny dva až tři. Kvůli jeho antimikrobiálním vlastnostem mohou být esenciální oleje z *T. vulgaris* použity proti bakteriím, kvasinkám, ale i vláknitým houbám (Galovičová et al., 2021). Muthukumar et al.

(2020) udávají, že *T. vulgaris* dokáže inhibovat patogeny *Penicillium italicum*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum lycopersici* a *Pythium* sp.

Thymus serpyllum L. (mateřídouška úzkolistá) je také důležitým zdrojem chemických látek s antioxidačním a antimikrobiálním účinkem (Wesołowska et al. 2015). Je to aromatická kvetoucí rostlina obsahující velké množství esenciálních olejů bohatých na polyfenolické látky. Pochází z oblasti Středozevního moře, typicky se vyskytuje ve vyšších nadmořských výškách. Extrakty z této rostliny mají antimikrobiální, antifungální a insekticidní účinky. Esenciální oleje *T. serpyllum* inhibují růst a vývoj mikroorganismů, zvláště gramnegativní bakterie a kvasinky. Také prokazuje inhibiční aktivitu proti organismům tvořící biofilm (Galovičová et al., 2021)

Origanum vulgare L. (dobromysl obecná) obdobně jako předchozí dvě rostliny náleží do čeledi *Lamiaceae*. V humánní medicíně je používána pro své protirakovinotvorné, protizánětlivé, antioxidační a antimikrobiální účinky. Může být využita i v ochraně rostlin, kde inhibuje růst a vývoj mikroorganismů. Esenciální oleje této rostliny prokázaly antibakteriální a antifungální účinek proti patogenům *Sarcina lutea*, *Candida albicans* nebo *Alternaria* spp. (Chrapačien et al. 2021).

4 Materiál a metody

4.1 Vzorky

K experimentální části bylo poříto celkem 10 vzorků listů cukrové řepy z různých lokalit:

| Izolát | Obec | Kraj |
|---------|----------------|------------------|
| Cb B5 | Krnsko | Středočeský |
| Cb C4 | Bílsko u Hořic | Královeshradecký |
| Cb D2 | Mochov | Středočeský |
| Cb E5 | Sloveč | Středočeský |
| Cb F6 | Lány | Pardubický |
| Cb 1/3 | Chýšť | Pardubický |
| Cb 2/4 | Osičky | Královeshradecký |
| Cb 17/1 | Velké Hoštice | Moravskoslezský |
| Cb 23/3 | Kravaře | Moravskoslezský |
| Cb 29/3 | Bolatice | Moravskoslezský |

4.2 Izolace a následné přeočkování *Cercospora beticola*

4.2.1 Chemikálie a biologický materiál

K izolaci a následnému přeočkování byly použity následující chemikálie a biologický materiál: listy z výše uvedených lokalit s příznaky cercosporové listové skvrnitosti, bramborovo-dextrózový agar PDA (HiMedia Laboratories, Einhausen, Německo), antibiotikum chloramfenikol, dezinfekční prostředek SAVO (Unilever ČR, Praha, Česká republika), destilovaná voda, ethanol.

4.2.2 Pracovní postup izolace

Nejprve byly skvrny na listech odděleny i s částí zdravého pletiva od zbytku listu nůžkami. Poté byly skvrny povrchově sterilizovány v 20% SAVO a třikrát promyty sterilní destilovanou vodou, z důvodu snížení rizika kontaminace nežádoucími mikroorganismy. Skvrny byly jemně osušeny od zbytků vody sterilním filtračním papírem nebo vzduchem proudícím ve flow boxu. Pro podpoření sporulace patogena na povrchu skvrn, byly listy vloženy svrchní pokožkou vzhůru do vlhké komůrky, kterou představovala skleněná Petriho miska (průměr 9 cm) s třemi vrstvami navlhčeného filtračního papíru. Inkubace při teplotě 20 až 24 °C a světelném režimu den/noc podpořila sporulaci patogena do dvou dnů od založení vlhké komůrky a umožnila přenos jeho konidií na PDA agar. Izolaci patogena bylo nutné provést co nejdříve, protože skvrny spolu s patogenem byly následně porůstány saprofytickými organismy. PDA agar byl připraven dle návodu výrobce (39 g agaru v litru

destilované vody), sterilizován při teplotě 121 °C, po jeho zchlazení cca na teplotu 50 °C byl k agaru přidán chloramfenikol (100 µl/ml) pro zabránění bakteriální kontaminace a agar byl rozlit do plastových Petriho misek o průměru 6 cm. Z každého vzorku byly pomocí sterilní jehly přeneseny konidie na agar na tři místa na povrchu agaru – tři vpichy, aby byla zvýšena úspěšnost izolace. Zhruba po jednom týdnu inkubace (20 až 24 °C, tma), bylo rozrůstající se mycelium izolátů přeočkováno na nový PDA agar a izoláty namnoženy v dostatečném množství pro použití v biologických testech.

4.3 Biologické testy

Ke zjištění citlivosti patogena *C. beticola* vůči vybraným fungicidům a esenciálním olejům, byl vybrán test citlivosti na otrávených plotnách. Test spočíval v naočkování patogenu do agaru s obsahem vybrané chemické látky. Dále byly testovány 4 vybrané bioagens, které byly naočkovány do misky spolu společně s patogenem.

4.3.1 Chemikálie a biologický materiál

Pro biologické testy byly použity následující chemikálie a biologický materiál: **izoláty** *C. beticola* na Petriho miskách (průměr 9 cm), *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus chitinolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, bramborovo-dextrózový agar (PDA) (HiMedia Laboratories, Einhausen, Německo), destilovaná voda, ethanol, Tween 20 (Sigma Aldrich, Kenilworth, USA), **esenciální oleje**: *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* (Saloos naturcosmetic, Břeclav, Česká republika), **přípravky na ochranu rostlin** (viz Tabulka 5): Amistar Gold (Syngenta Crop Protection AG, Basel, Švýcarsko), Eminent 125 ME (Isagro, Segrate-Milano, Itálie) Propulse (Bayer S.A.S, Lyon, Francie).

Tabulka 5 Přípravky na ochranu rostlin a jejich účinné látky

| Název přípravku | účinná látka | množství ú.l. |
|-----------------|----------------|---------------|
| Amistar Gold | azoxystrobin | 125 g/l |
| | difenokonazol | 125 g/l |
| Eminent 125 ME | tetrakonazol | 125 g/l |
| Propulse | fluopyram | 125 g/l |
| | prothiokonazol | 125 g/l |

4.3.2 Citlivost vůči vybraným účinným látkám a fungicidům

Byly testovány celkem tři fungicidní přípravky (Eminent 125 ME, Amistar Gold, Propulse). Nejprve byl dle návodu od výrobce (39 g agaru v litru destilované vody) namíchán, a sterilizován bramborovo-dextrózový agar. Pro každý přípravek byla určena ředící řada, čehož bylo dosaženo ředěním látek příslušným rozpouštědlem (sterilní destilovaná voda) a

následným ředěním agarem. Každá varianta měla tři opakování. Celkem bylo vytvořeno 6 variant o koncentracích účinných látek [$\mu\text{g}/\text{ml}$]: 1000, 100, 10, 1, 0,1 a 0. Po přidání fungicidu do zchlazeného agaru byl agar nalit do Petriho misek, vystaven UV záření a nechal se zatuhnout. Poté byly sterilním korkovrtem (ožehnutým v plameni kahanu) na agaru v Petriho miskách s jednotlivými izoláty vyříznuty disky o průměru 9 mm, které byly následně skalpelem přeneseny na otrávené plotny. Takto naočkované Petriho misky (viz Obrázek 5) byly poté zafixovány termostabilní folií Parafilm M a inkubovány 2 týdny při teplotě 20 °C ve tmě. Poté bylo provedeno vyhodnocení.



Obrázek 5 Vpravo: Petriho miska připravená k inokulaci. Vlevo: Petriho miska s izolátem *Cercospora beticola*

4.3.3 Citlivost *Cercospora beticola* vůči vybraným esenciálním olejům

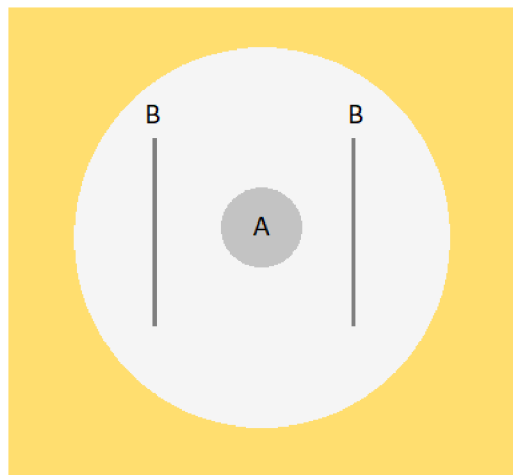
Byly testovány celkem 3 esenciální oleje z rostlin *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare*, které byly vybrány na základě výsledků pocházejících z testování dalších patogenů rostlin. Postup pro přípravu agaru byl obdobný jako při přípravě agaru na testování citlivosti k účinným látkám/fungicidům. Opět byla stanovena ředící řada o šesti variantách [$\mu\text{g}/\text{l}$]: 1000, 800, 600, 400, 200 a 0. Jako emulgační činidlo byl přidáván Tween 20 (viz Tabulka 6). Jednotlivé varianty bylo nutné před přidáním do agaru řádně zhomogenizovat za pomoci robustní třepačky. Po ztuhnutí agaru se složkou esenciálních olejů bylo provedeno naočkování z izolátů. Z narostlého mycelia izolátů byly opět vyříznuty korkovrtem disky o průměru 9 mm a ty skalpelem přeneseny na připravené plotny. Naočkované Petriho misky byly opatřeny termostabilní folií Parafilm M a inkubovány při teplotě 20 °C. Po 2 týdnech bylo provedeno vyhodnocení.

Tabulka 6 Koncentrace esenciálních olejů v agaru, varianty

| Koncentrace [$\mu\text{l/l}$] | na 500 ml agaru | | |
|---------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| | EO [μl] | Tween [μl] | ddH ₂ O [μl] |
| 1000 | 500 | 500 | 0 |
| 800 | 400 | 500 | 100 |
| 600 | 300 | 500 | 200 |
| 400 | 200 | 500 | 300 |
| 200 | 100 | 500 | 400 |
| 0 | 0 | 500 | 500 |

4.3.4 Inhibice růstu *Cercospora beticola* vybranými BCA

Pro testování byly vybrány čtyři BCA: *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus chitinolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*. Nejprve byl připraven (dle návodu výrobce 39 g agaru na 1 l destilované vody) a sterilizován bramborovo-dextrózový agar. Ten byl poté přelit do Petriho misek o průměru 9 cm, vystaven UV světlu a ponechán zatuhnout. Poté byl terčík z izolátu *C. beticola* přemístěn na povrch agaru (viz výše, postup obdobný) a následně byla rozetřena vybraná bakterie dvěma liniemi rovnoběžně po straně terčíku (viz Obrázek 6).

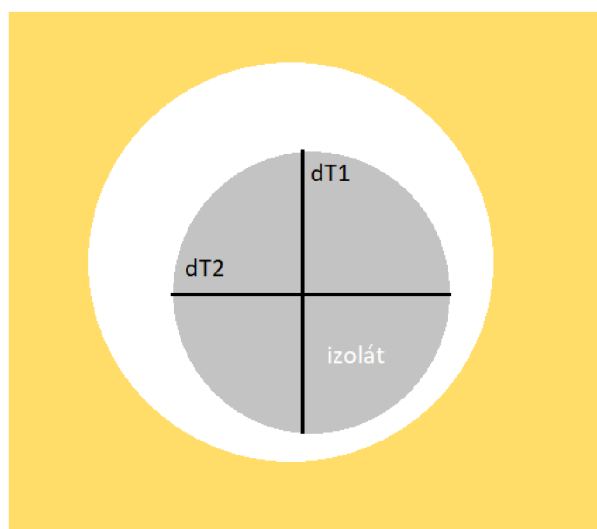


Obrázek 6 Schéma naočkované Petriho misky vybranými BCA: A - terčík pocházející z izolátu *C. beticola*, B - testovaná bakterie

Naočkované Petriho misky byly zafixovány folií Parafilm M. Takto připravené Petriho misky byly inkubovány dnem vzhůru při teplotě 20 °C po dobu 2 týdnů.

4.4 Vyhodnocování výsledků

Vyhodnocení všech provedených pokusů spočívalo ve změření průměru narostlého mycelia testovaného izolátu na variantě s vybranou chemickou látkou/bakterií a na kontrolní variantě. Tento průměr byl na každé misce měřen dvakrát, do kříže (viz Obrázek 7), a k měření bylo využito elektronického posuvného měřidla.



Obrázek 7 Schéma vyhodnocování pokusu. dT1 – průměr mycelia testovaného izolátu 1, dT2 – průměr mycelia testovaného izolátu 2

Na základě těchto rozměrů byl spočítán za použití softwaru MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) tzv. index inhibice růstu mycelia (MGI – mycelial growth inhibition).

$$MGI(\%) = 100 - \left(\frac{dT}{dC} \times 100 \right)$$

dT = průměr mycelia (mm) testovaného izolátu na variantě s látkou

dC = průměr mycelia (mm) testovaného izolátu na kontrolní variantě

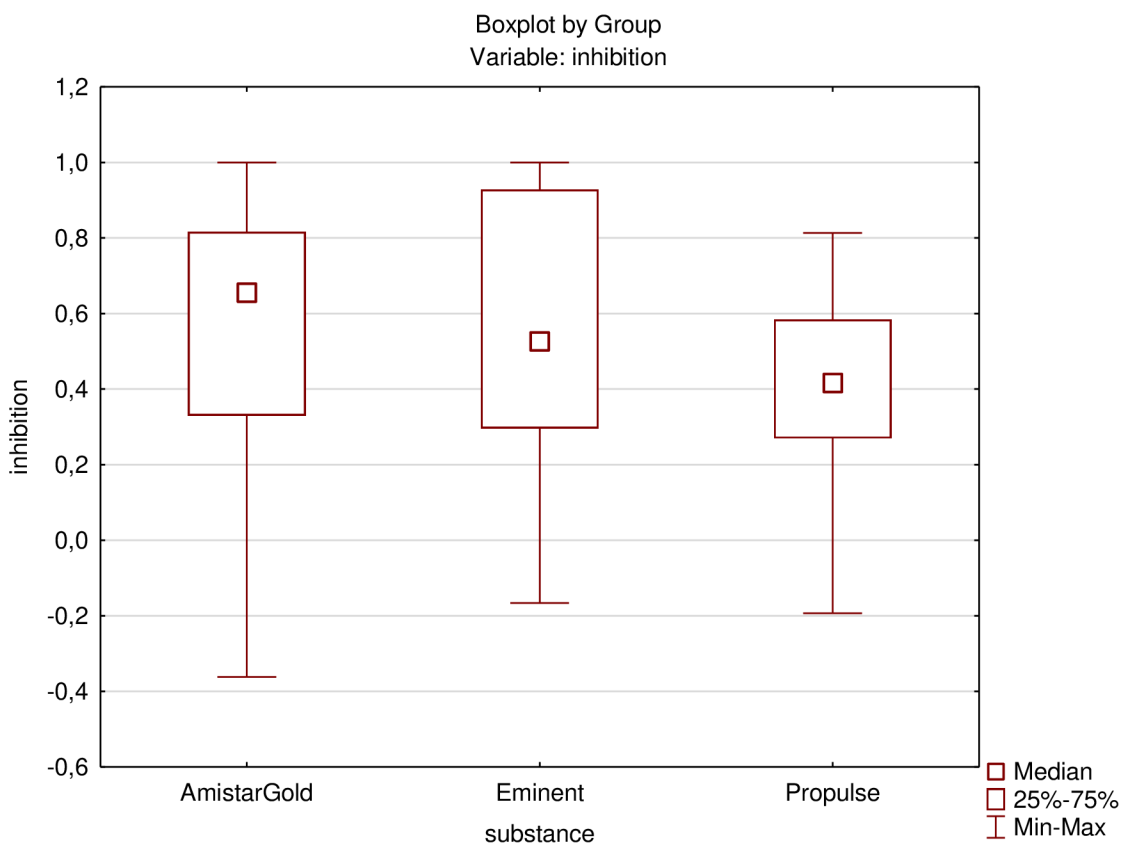
Pro každou skupinu byly porovnány inhibice růstu mycelia (MGI) jednotlivých látek a pro určení statistické signifikance rozdílů byl proveden neparametrický Kruskal-Wallisův test. Následně jsme provedli post hoc test vícenásobného porovnání z' hodnot (Multiple Comparisons z' values) abychom určili, které dvojice látek vykazují signifikantní rozdíl. Také byl vytvořen krabicový graf distribuce hodnot inhibic růstu a jejich mediánu pro každou skupinu látek. Stejný postup byl proveden i pro jednotlivé izoláty. Dále byla pro fungicidní přípravky a esenciální oleje vypočítána hodnota EC₅₀ (efektivní koncentrace fungicidní látky inhibující růst mycelia z 50 %) a hodnota MIC (minimální koncentrace fungicidní látky inhibující růst mycelia ze 100 %).

5 Výsledky

V rámci biologických testů byly testovány 3 různé skupiny látek – fungicidní přípravky, esenciální oleje a antagonistické bakterie a sledován jejich inhibiční účinek na růst mycelia izolátů patogena *C. beticola*.

5.1 Fungicidy

Na základě získaných výsledků byla porovnávána inhibice růstu mycelia mezi třemi fungicidy – Propulse (účinná látka fluopyram v kombinaci s prothiokonazolem), Eminent 125 ME (ú.l. tetrakonazol) a Amistar Gold (ú.l. azoxystrobin v kombinaci s difenokonazolem). Průměrnou inhibici růstu mycelia můžeme vidět pro každý fungicid v Tabulkách 7–9. Distribuce hodnot inhibicí růstu mycelia způsobených jednotlivými přípravky a jejich mediánů jsou znázorněny v krabicovém grafu na Obrázku 8, který byl vytvořen v programu Statistica 12 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA) Z grafu je patrné, že nejvyšší hodnota mediánu byla zjištěna u fungicidu Amistar Gold.



Obrázek 8 Krabicový graf distribuce hodnot inhibicí růstu mycelia patogena *C. beticola* a jejich mediánu u vybraných fungicidů

Tabulka 7 Eminent 125 ME – průměrná inhibice růstu mycelia testovaných izolátů *C. beticola*

| koncentrace ú.l. µg/ml | Průměrná inhibice růstu mycelia izolátů % | | | | | | | | | |
|---------------------------|---|---------|---------|--------|--------|--------|---------|-------|--------|--------|
| | Cb B5 | Cb 23/3 | Cb 17/1 | Cb F6 | Cb 1/3 | Cb 2/4 | Cb 29/3 | Cb D2 | Cb C4 | Cb E5 |
| 1000 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 93,38 | 100,00 | 100,00 |
| 100 | 85,31 | 94,68 | 89,48 | 80,30 | 84,90 | 67,28 | 100,00 | 57,20 | 92,83 | 79,43 |
| 10 | 49,95 | 63,10 | 65,92 | 29,20 | 48,57 | 36,55 | 61,85 | 25,83 | 64,05 | 51,69 |
| 1 | 34,19 | 31,81 | 46,02 | 22,75 | 30,54 | 27,47 | 42,61 | 19,89 | 37,12 | 31,90 |
| 0,1 | 12,68 | 7,30 | 28,81 | 18,54 | 12,72 | 23,46 | 38,41 | 12,46 | 23,83 | 31,32 |

Tabulka 8 Propulse – průměrná inhibice růstu mycelia testovaných izolátů *C. beticola*

| koncentrac e ú.l. µg/ml | Průměrná inhibice růstu mycelia izolátů % | | | | | | | | | |
|----------------------------|---|---------|---------|-------|--------|--------|---------|-------|-------|-------|
| | Cb B5 | Cb 23/3 | Cb 17/1 | Cb F6 | Cb 1/3 | Cb 2/4 | Cb 29/3 | Cb D2 | Cb C4 | Cb E5 |
| 1000 | 62,63 | 69,80 | 68,75 | 67,97 | 68,06 | 64,87 | 67,10 | 62,92 | 68,43 | 75,39 |
| 100 | 49,22 | 59,59 | 54,09 | 45,09 | 53,12 | 49,72 | 55,97 | 39,01 | 57,79 | 57,43 |
| 10 | 48,34 | 44,98 | 36,71 | 37,93 | 42,64 | 28,70 | 44,76 | 32,98 | 35,87 | 44,12 |
| 1 | 18,09 | 33,40 | 35,67 | 6,01 | 23,66 | 19,51 | 28,70 | 35,50 | 26,58 | 57,37 |
| 0,1 | 13,25 | 9,67 | 8,62 | 25,63 | 22,43 | 41,93 | 38,56 | 5,02 | -6,35 | 16,20 |

Tabulka 9 Amistar Gold – průměrná inhibice růstu mycelia testovaných izolátů *C. beticola*

| koncentrace ú.l. µg/ml | Průměrná inhibice růstu mycelia izolátů % | | | | | | | | | |
|---------------------------|---|---------|---------|-------|--------|--------|---------|-------|-------|-------|
| | Cb B5 | Cb 23/3 | Cb 17/1 | Cb F6 | Cb 1/3 | Cb 2/4 | Cb 29/3 | Cb D2 | Cb C4 | Cb E5 |
| 1000 | 73,16 | 70,31 | 100,00 | 74,06 | 91,78 | 53,40 | 70,16 | 56,44 | 71,40 | 47,34 |
| 100 | 57,95 | 67,12 | 69,20 | 60,60 | 69,01 | 47,85 | 65,05 | 52,99 | 70,31 | 39,11 |
| 10 | 48,53 | 60,83 | 63,17 | 46,29 | 61,30 | 36,16 | 65,17 | 29,93 | 67,96 | 21,48 |
| 1 | 14,49 | 40,45 | 37,80 | 19,69 | 45,87 | 18,75 | 53,97 | 17,07 | 60,03 | 4,32 |
| 0,1 | -3,93 | 29,98 | 8,55 | 12,45 | 28,87 | 24,85 | 36,62 | 7,58 | 46,16 | -9,55 |

V programu Statistica 12 byl z důvodu nenormálního rozdělení dat proveden neparametrický Kruskal-Wallisův test. Byla testována hypotéza, zda jsou mediány inhibicí růstu mycelia u všech skupin (fungicidů) stejné. V případě, že byla p-hodnota menší než 0,05, nulová hypotéza byla zamítnuta. V konkrétním případě porovnávání výše uvedených fungicidů byla p-hodnota 0,0000, což značí, že existuje signifikantní rozdíl mezi inhibicí růstu mycelia patogena *C. beticola* jednotlivými fungicidy. Dále byl proveden post hoc test vícenásobného porovnání z' hodnot (Multiple Comparisons z' values), který slouží k posouzení významnosti rozdílů mezi skupinami (viz Tabulka 10).

Tabulka 10 Vícenásobné porovnání z' hodnot (Multiple Comparisons z' values) - fungicidy

| Depend.: inhibition | Multiple Comparisons z' values; inhibition Independent (grouping) variable: substance Kruskal-Wallis test: H (2, N= 900) =62,66003 p =,0000 | | |
|------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------|
| | Amistar Gold R:507,51 | Eminent 125 ME R:489,94 | Propulse R:354,06 |
| Amistar Gold | | 0,827798 | 7,229687 |
| Eminent 125 ME | 0,827798 | | 6,401889 |
| Propulse | 7,229687 | 6,401889 | |

Multiple Comparison z' values test vyhodnotil, že existuje statisticky významný rozdíl mezi dvojicí fungicidů Eminent 125 ME a Propulse a dále mezi Propulse a Amistar Gold. Účinky

fungicidů Eminent 125 ME a Amistar Gold jsou statisticky signifikantně odlišné od účinku přípravku Propulse.

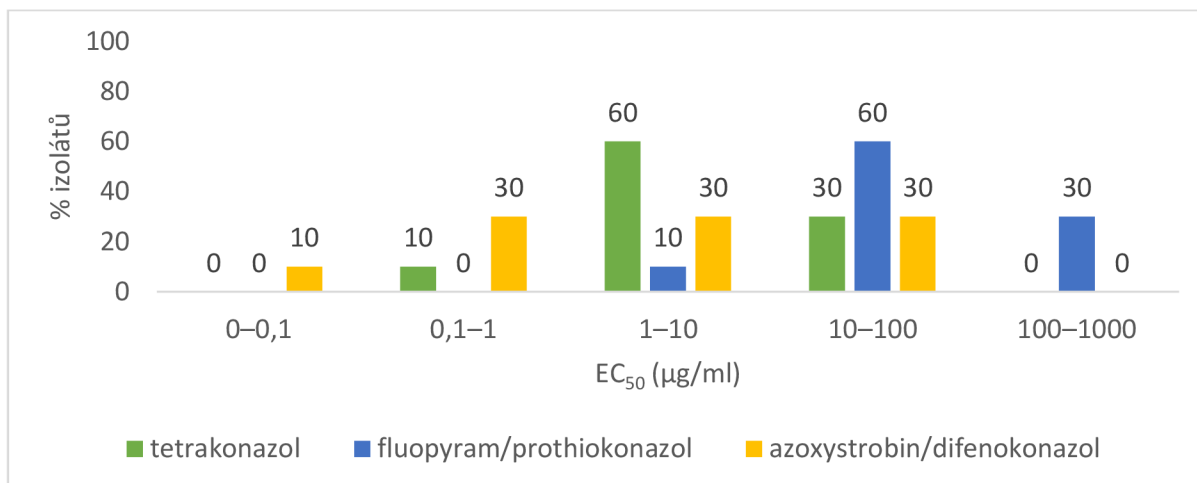
V programu GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Boston, USA) byly pro všechny účinné látky vybraných fungicidů nebo jejich kombinace v případě vícesložkových přípravků spočítány hodnoty EC₅₀, které jsou znázorněny spolu s hodnotami MIC v Tabulce 11. Nižší hodnoty EC₅₀ značí, že daný kmen je na danou látku citlivější. Nejcitlivější izoláty na účinnou látku tetrakonazol (Eminent 125 ME) jsou Cb 17/1, Cb 29/3 a Cb C4 s hodnotami EC₅₀ pod 3 µg/ml. Nižší citlivost k této látce vykazují pak izoláty Cb F6 a Cb D2 s hodnotami EC₅₀ nad 16 a 40 µg/ml. Nejnížší citlivost ke kombinaci účinných látek fluopyram/prothiokonazol (Propulse) vykazovaly izoláty Cb E5 a Cb 29/3, které dosahovaly hodnot EC₅₀ 9,372 a 24,03 µg/ml. Izoláty s nejvyšší EC₅₀ u této kombinace byly Cb D2 a Cb 2/4, kdy jejich hodnoty dosahovaly EC₅₀ 182,5 a 141,5 µg/ml. V případě kombinace účinných látek azoxystrobin/difenokonazol (Amistar Gold) byly izoláty Cb 29/3 a Cb C4 s hodnotami 0,1039 a 0,01907 µg/ml nejcitlivější. Nejméně citlivé byly pak izoláty Cb 2/4 a Cb D2 s hodnotami EC₅₀ 19,59 a 28,87 µg/ml. Hodnoty MIC se u tetrakonazolu (Eminent 125 ME) pohybovaly nejčastěji v rozmezí 100–1000 µg/ml, výjimkami byly MIC izolátů Cb 29/3 (10–100 µg/ml) a Cb D2 (nad 1000 µg/ml). U kombinace účinných látek fluopyram/prothiokonazol (Propulse) byly hodnoty MIC u všech izolátů vyšší než 1000 µg/ml. U kombinace účinných látek azoxystrobin/difenokonazol (Amistar Gold) převažovala MIC v hodnotách nad 1000 µg/ml (6 izolátů).

Tabulka 11 Přehled hodnot EC₅₀ a MIC účinných látek vybraných fungicidů pro jednotlivé izoláty *C. beticola*

| název izolátu | Tetrakonazol (Eminent 125 ME) | | fluopyram/prothiokonazol (Propulse) | | azoxystrobin/difenokonazol (Amistar Gold) | |
|----------------|-------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|---|-------------|
| | EC ₅₀ (µg/ml) | MIC (µg/ml) | EC ₅₀ (µg/ml) | MIC (µg/ml) | EC ₅₀ (µg/ml) | MIC (µg/ml) |
| Cb B5 | 5,355 | 100–1000 | 81,48 | nad 1000 | 4,622 | 100–1000 |
| Cb 23/3 | 3,593 | 100–1000 | 27,83 | nad 1000 | 0,6551 | nad 1000 |
| Cb 17/1 | 1,275 | 100–1000 | 49,91 | nad 1000 | 1,329 | 100–1000 |
| Cb F6 | 16,87 | 100–1000 | 118,7 | nad 1000 | 6,914 | 100–1000 |
| Cb 1/3 | 6,366 | 100–1000 | 49,15 | nad 1000 | 0,4648 | 100–1000 |
| Cb 2/4 | 12,96 | 100–1000 | 141,5 | nad 1000 | 19,59 | nad 1000 |
| Cb 29/3 | 0,9854 | 10–100 | 24,03 | nad 1000 | 0,1039 | nad 1000 |
| Cb D2 | 41,45 | nad 1000 | 182,5 | nad 1000 | 28,87 | nad 1000 |
| Cb C4 | 2,167 | 100–1000 | 38 | nad 1000 | 0,01907 | nad 1000 |
| Cb E5 | 3,797 | 100–1000 | 9,372 | nad 1000 | 53,2 | nad 1000 |

V programu MS Excel byl poté vytvořen sloupcový graf (viz Obrázek 9), který zobrazuje procentuální zastoupení izolátů *C. beticola* v závislosti na intervalu koncentrací EC₅₀ pro vybrané kombinace účinných látek/účinné látky. U tetrakonazolu (Eminent 125 ME) můžeme pozorovat, že nejvyšší procento izolátů (60 %) mělo hodnoty EC₅₀ v intervalu koncentrací 1–

10 µg/ml. U kombinace fluopyram/prothiokonazol (Propulse) mělo nejvyšší procento izolátů (60 %) stanoveny hodnoty EC₅₀ v intervalu koncentrací 10–100 µg/ml. Nejvyšší hodnoty EC₅₀ byly zjištěny u kombinace účinných látek fluopyram/prothiokonazol (Propulse), kdy u 30 % izolátů byly zjištěny hodnoty EC₅₀ v intervalu koncentrací 100–1000 µg/ml.

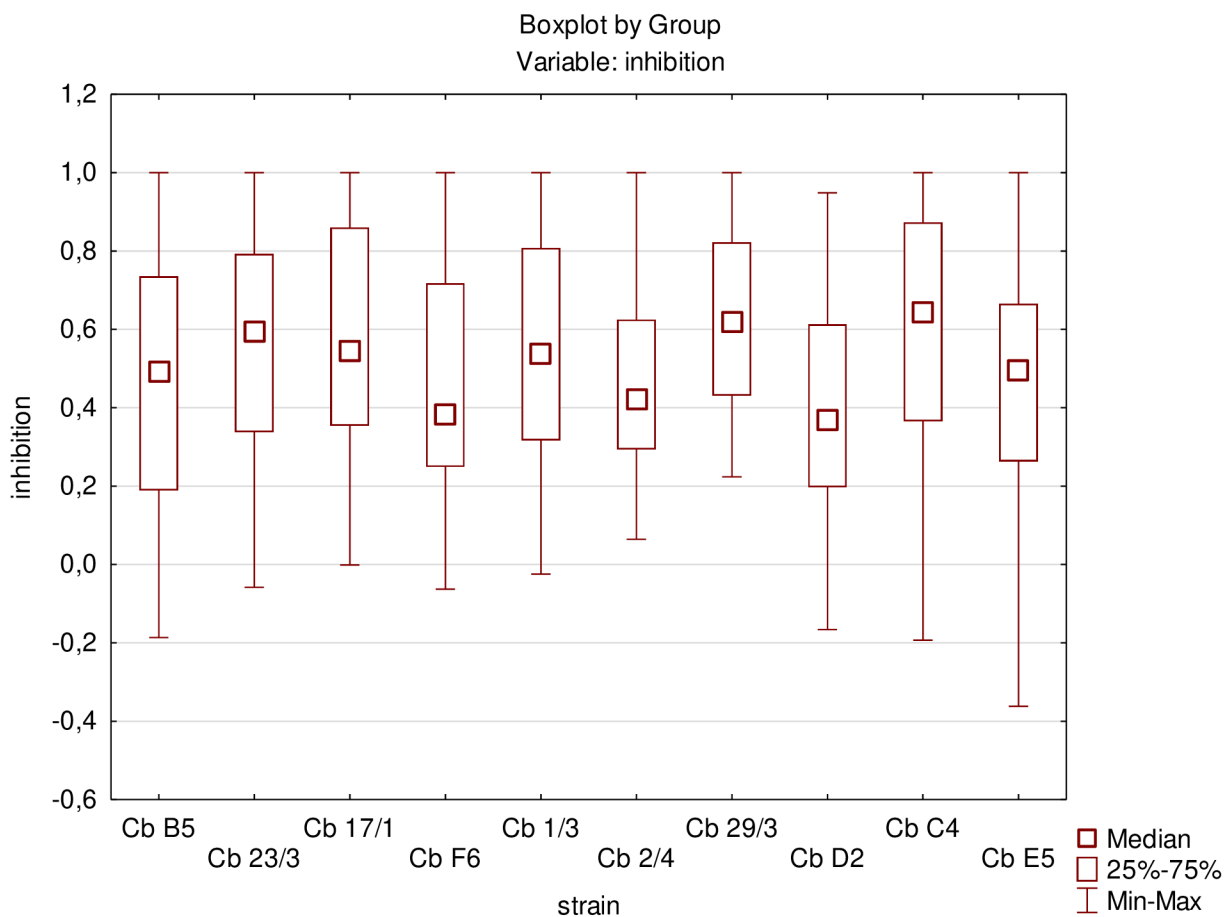


Obrázek 9 Grafické znázornění počtu izolátů *C. beticola* v jednotlivých intervalech koncentrací EC₅₀ u vybraných fungicidů

Byl proveden neparametrický Kruskal-Wallisův test pro jednotlivé izoláty a jejich inhibiční fungicidy. P-hodnota se rovnala 0,0000, alespoň mezi dvěma izoláty byly nalezeny signifikantní rozdíly a nulová hypotéza byla tedy zavržena. Dále byl proto proveden post hoc test vícenásobné porovnání z' hodnot (Multiple Comparisons z' values), jehož výsledky jsou uvedeny v Tabulce 12. Z tabulky je patrné, že nejvyšší z' hodnota je mezi dvojicemi izolátů Cb 29/3 a D2 a Cb D2 a Cb C4. Distribuce hodnot inhibiční růstu mycelia u jednotlivých izolátů při testování inhibičního účinku fungicidů je graficky znázorněna na Obrázku 10.

Tabulka 12 Vícenásobné porovnání z' hodnot (Multiple Comparisons z' values) – inhibice jednotlivých izolátů *C. beticola* fungicidy

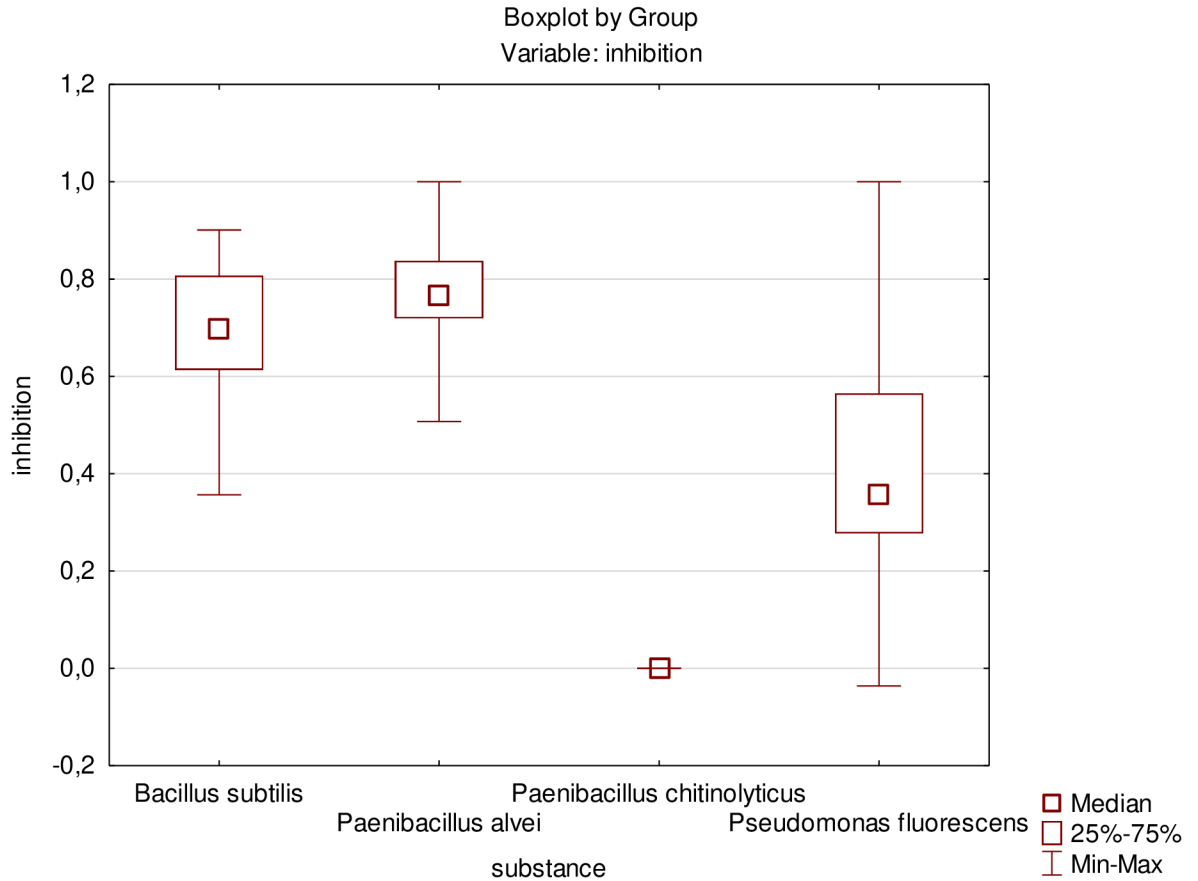
| Depend.: inhibition | Multiple Comparisons z' values; Independent (grouping) variable: strain Kruskal-Wallis test: H (9, N= 900) =55,34738 p =,0000 | | | | | | | | | |
|------------------------|--|---------------------|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Cb B5 R:420,97 | Cb 23/3 R:490,01 | Cb 17/1 R:498,84 | Cb F6 R:394,62 | Cb 1/3 R:481,82 | Cb 2/4 R:393,96 | Cb 29/3 R:550,30 | Cb D2 R:342,43 | Cb C4 R:526,61 | Cb E5 R:405,43 |
| Cb B5 | | 1,78173 | 2,009679 | 0,679833 | 1,570411 | 0,697037 | 3,337519 | 2,026596 | 2,726214 | 0,400846 |
| Cb 23/3 | 1,78173 | | 0,227949 | 2,461563 | 0,211319 | 2,478767 | 1,555788 | 3,808327 | 0,944483 | 2,182577 |
| Cb 17/1 | 2,009679 | 0,227949 | | 2,689512 | 0,439268 | 2,706716 | 1,327839 | 4,036276 | 0,716534 | 2,410526 |
| Cb F6 | 0,679833 | 2,461563 | 2,689512 | | 2,250245 | 0,017204 | 4,017352 | 1,346763 | 3,406047 | 0,278987 |
| Cb 1/3 | 1,570411 | 0,211319 | 0,439268 | 2,250245 | | 2,267448 | 1,767107 | 3,597008 | 1,155802 | 1,971258 |
| Cb 2/4 | 0,697037 | 2,478767 | 2,706716 | 0,017204 | 2,267448 | | 4,034555 | 1,32956 | 3,42325 | 0,29619 |
| Cb 29/3 | 3,337519 | 1,555788 | 1,327839 | 4,017352 | 1,767107 | 4,034555 | | 5,364115 | 0,611305 | 3,738365 |
| Cb D2 | 2,026596 | 3,808327 | 4,036276 | 1,346763 | 3,597008 | 1,32956 | 5,364115 | | 4,75281 | 1,62575 |
| Cb C4 | 2,726214 | 0,944483 | 0,716534 | 3,406047 | 1,155802 | 3,42325 | 0,611305 | 4,75281 | | 3,12706 |
| Cb E5 | 0,400846 | 2,182577 | 2,410526 | 0,278987 | 1,971258 | 0,29619 | 3,738365 | 1,62575 | 3,12706 | |



Obrázek 10 Krabicový graf distribuce hodnot inhibicí růstu mycelia u jednotlivých izolátů *C. beticola* a jejich mediánu – působení fungicidů

5.2 BCA

Na základě zjištěných hodnot růstu mycelia vybraných izolátů *C. beticola* byly porovnávány účinky čtyř BCA: *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus chitinolyticus*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas fluorescens*. Opět byly vypočítány hodnoty průměrných inhibicí růstu mycelia, které můžeme vidět v Tabulce 13. Distribuce hodnot inhibicí růstu mycelia izolátů *C. beticola* jednotlivými BCA a jejich mediánů jsou znázorněny v krabicovém grafu na Obrázku 11.



Obrázek 11 Krabicový graf distribuce hodnot inhibicí růstu mycelia patogena *C. beticola* a jejich mediánu u vybraných BCA

I v případě BCA nebyla získaná data normálně rozdělena, a proto byl proveden neparametrický Kruskal-Wallisův test. Ten ukázal, že existují signifikantní rozdíly mezi inhibicí růstu mycelia izolátů *C. beticola* způsobenou některými BCA. P-hodnota 0,000 značí, že pravděpodobnost, že by byly tyto rozdíly mezi skupinami (BCA) náhodné je velmi nízká.

Tabulka 13 BCA – průměrná inhibice růstu mycelia testovaných izolátů *C. beticola*

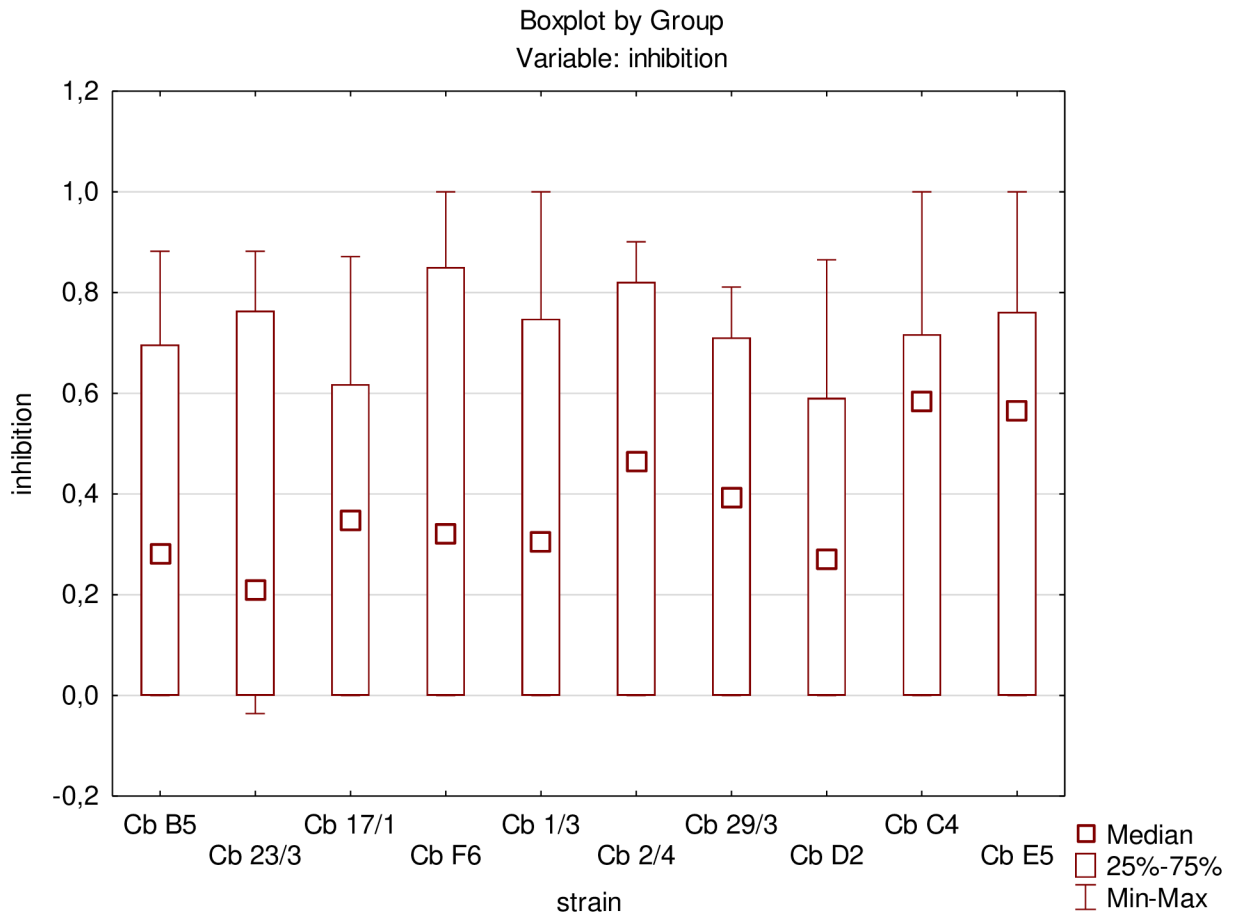
| BCA | Průměrná inhibice růstu mycelia izolátů % | | | | | | | | | |
|--|---|---------|---------|-------|--------|--------|---------|-------|-------|-------|
| | Cb B5 | Cb 23/3 | Cb 17/1 | Cb F6 | Cb 1/3 | Cb 2/4 | Cb 29/3 | Cb D2 | Cb C4 | Cb E5 |
| <i>Paenibacillus alvei</i> | 81,97 | 72,41 | 75,04 | 77,50 | 73,48 | 79,82 | 72,86 | 74,36 | 79,67 | 89,30 |
| <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 65,65 | 83,76 | 55,58 | 84,41 | 74,30 | 84,05 | 70,92 | 55,38 | 57,55 | 71,56 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 26,59 | 19,46 | 37,37 | 52,00 | 48,93 | 43,70 | 48,23 | 30,18 | 78,59 | 54,75 |

Post hoc test vícenásobného porovnání z' hodnot (Multiple Comparisons z' values), jehož výsledky můžeme vidět v Tabulce 14, v případě porovnávaných BCA ukázal, které skupiny jsou od sebe významně odlišné. *P. chitinolyticus* se statisticky odlišuje v inhibici růstu mycelia vybraných izolátů od účinků způsobených *B. subtilis* a *P. fluorescens*, stejně jako *B. subtilis* se statisticky signifikantně liší od *P. fluorescens*. Dále jsou signifikantní rozdíly mezi inhibičními účinky způsobenými *P. alvei* a *P. chitinolyticus*, *P. alvei* a *P. fluorescens*, *P. chitinolyticus* a *P. fluorescens* a *P. fluorescens* a *B. subtilis*.

Tabulka 14 Vícenásobné porovnání z' hodnot (Multiple Comparisons z' values) – BCA

| Depend.: inhibition | Multiple Comparisons z' values Independent (grouping) variable: substance Kruskal–Wallis test: H (3, N= 300) =252,5008 p =0,000 | | | |
|-------------------------------------|--|--|---|--|
| | <i>Bacillus subtilis</i> R:221,17 | <i>Paenibacillus alvei</i> R:243,18 | <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> R:61,500 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> R:165,15 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | | 1,39014 | 11,64102 | 3,536915 |
| <i>Paenibacillus alvei</i> | 1,39014 | | 13,24622 | 4,927056 |
| <i>Paenibacillus chitinolyticus</i> | 11,64102 | 13,24622 | | 7,556941 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 3,53692 | 4,92706 | 7,55694 | |

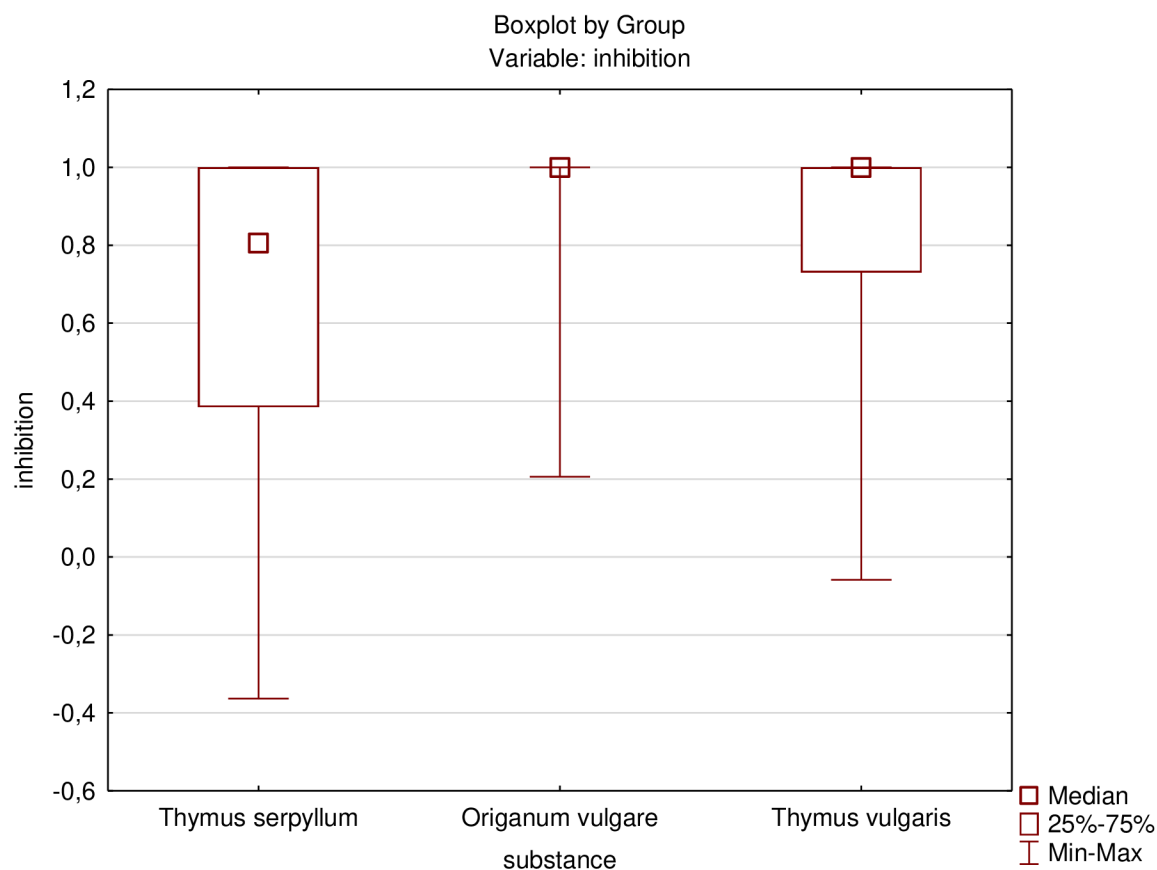
Kruskal-Wallisův test inhibice růstu mycelia vztahený na jednotlivé izoláty *C. beticola* neprokázal žádné signifikantní rozdíly, pravděpodobně z důvodu vysoké variance hodnot. P-hodnota se rovnala 0,9032 a proto nebylo možné zamítnout nulovou hypotézu. Distribuce hodnot inhibicí růstu mycelia u jednotlivých izolátů zapříčinění jednotlivými BCA je graficky znázorněna na Obrázku 12.



Obrázek 12 Krabicový graf distribuce hodnot inhibicí růstu mycelia u jednotlivých izolátů *C. beticola* a jejich mediánu–působení BCA

5.3 Esenciální oleje

Statisticky porovnávány byly inhibice růstu mycelia izolátů *C. beticola* způsobené celkem třemi esenciálními oleji: *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare*. Hodnoty průměrné inhibice růstu mycelia izolátů patogena vybranými esenciálními oleji jsou zobrazeny v Tabulkách 15–17. Distribuce hodnot inhibicí růstu mycelia jednotlivých izolátů esenciálními oleji a jejich mediánů jsou znázorněny v krabicovém grafu na Obrázku 13.



Obrázek 13 Krabicový graf distribuce hodnot inhibicí růstu mycelia izolátů *C. beticola* a jejich mediánu u vybraných esenciálních olejů

Tabulka 15 *Thymus vulgaris* – průměrná inhibice růstu mycelia izolátů *C. beticola*

| koncentrace μl/l | Průměrná inhibice růstu mycelia izolátů % | | | | | | | | | |
|---------------------|---|---------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
| | Cb B5 | Cb 23/3 | Cb 17/1 | Cb F6 | Cb 1/3 | Cb 2/4 | Cb 29/3 | Cb D2 | Cb C4 | Cb E5 |
| 1000 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| 800 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| 600 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 89,93 | 100,00 | 100,00 |
| 400 | 81,84 | 100,00 | 100,00 | 74,49 | 77,90 | 100,00 | 94,32 | 54,38 | 71,01 | 100,00 |
| 200 | 47,31 | 44,20 | 57,89 | 35,64 | 45,10 | 18,77 | 20,18 | 14,78 | 49,22 | 38,42 |

Tabulka 16 *Thymus serpyllum* – průměrná Inhibice růstu mycelia izolátů *C. beticola*

| koncentrace μl/l | Průměrná inhibice růstu mycelia izolátů % | | | | | | | | | |
|---------------------|---|---------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
| | Cb B5 | Cb 23/3 | Cb 17/1 | Cb F6 | Cb 1/3 | Cb 2/4 | Cb 29/3 | Cb D2 | Cb C4 | Cb E5 |
| 1000 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| 800 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| 600 | 74,11 | 55,05 | 80,99 | 100,00 | 66,68 | 44,97 | 100,00 | 92,08 | 100,00 | 77,10 |
| 400 | 61,40 | 36,87 | 18,67 | 29,94 | 51,82 | 36,33 | 65,22 | 54,09 | 23,41 | 61,19 |
| 200 | 33,58 | 39,97 | 14,05 | 9,51 | 30,51 | 7,71 | 39,37 | 36,40 | 9,67 | -25,65 |

Tabulka 17 *Origanum vulgare* – průměrná Inhibice růstu mycelia izolátů *C. beticola*

| koncentrace μl/l | Průměrná inhibice růstu mycelia izolátů % | | | | | | | | | |
|---------------------|---|---------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
| | Cb B5 | Cb 23/3 | Cb 17/1 | Cb F6 | Cb 1/3 | Cb 2/4 | Cb 29/3 | Cb D2 | Cb C4 | Cb E5 |
| 1000 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| 800 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| 600 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| 400 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| 200 | 85,99 | 94,17 | 98,12 | 89,28 | 84,84 | 77,43 | 89,96 | 85,55 | 56,76 | 88,11 |

Z důvodu nenormálního rozdělení dat byl proveden neparametrický Kruskal-Wallisův test. Jeho výsledná p-hodnota se rovnala 0,000, to tedy znamená, že existuje statisticky významný rozdíl mezi alespoň jednou dvojicí skupin (esenciálních olejů). To potvrdily výsledky post hoc

testu vícenásobného porovnání z' hodnot (Multiple Comparison z' values), kdy byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi všemi porovnávanými esenciálními oleji (viz Tabulka 18). Všechny tři skupiny esenciálních olejů (*Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare*) se v inhibici růstu mycelia liší.

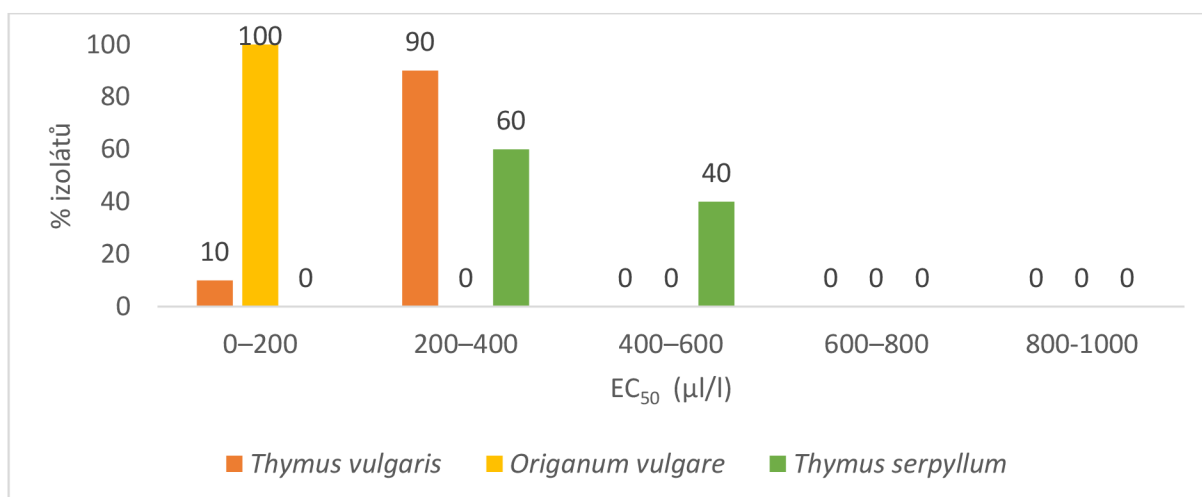
Tabulka 18 Vícenásobné porovnání z' hodnot (Multiple Comparisons z' values) – esenciální oleje

| Depend.: inhibition | Multiple Comparisons z' values; Independent (grouping) variable: substance Kruskal–Wallis test: H (2, N= 900) =111,1622 p =0,000 | | |
|-------------------------|---|-------------------------------------|------------------------------------|
| | <i>Thymus serpyllum</i> R:352,89 | <i>Origanum vulgare</i> R:541,43 | <i>Thymus vulgaris</i> R:457,18 |
| <i>Thymus serpyllum</i> | | 8,882927 | 4,913549 |
| <i>Origanum vulgare</i> | 8,882927 | | 3,969378 |
| <i>Thymus vulgaris</i> | 4,913549 | 3,969378 | |

V programu GraphPad Prism 8.0.1 byly pro vybrané esenciální oleje vypočteny hodnoty EC₅₀, které jsou uvedeny spolu s hodnotami MIC v Tabulce 19. Nejcitlivějšími izoláty k *T. vulgaris* byly izoláty Cb 17/1 (EC₅₀ 198,1 µl/l) a Cb B5 (EC₅₀ 201,4 µl/l), k *O. vulgare* pak izoláty Cb 23/3 (EC₅₀ 145,8 µl/l) a Cb 17/1 (EC₅₀ 146,7 µl/l). K esenciálnímu oleji *T. serpyllum* byly nejcitlivější izoláty Cb 29/3 (EC₅₀ 251,9 µl/l) a Cb D2 (EC₅₀ 295,6 µl/l). Naopak nejméně citlivé k *T. vulgaris* byly izoláty Cb 29/3 (EC₅₀ 251 µl/l) a Cb D2 (EC₅₀ 364,6 µl/l), k *O. vulgare* pak izoláty Cb 2/4 (EC₅₀ 192,3 µl/l) a Cb C4 (EC₅₀ 197,9 µl/l). Nejméně citlivý izolát k *T. serpyllum* byl Cb 2/4 s hodnotou EC₅₀ 514,6 µl/l. Zatímco hodnoty MIC u *O. vulgare* jsou u všech izolátů stejné (200–400 µl/l), u zbývajících dvou esenciálních olejů se liší. Sloupcový graf, který zobrazuje procentuální zastoupení izolátů *C. beticola* v závislosti na intervalu koncentrací EC₅₀ pro vybrané esenciální oleje je zobrazen na Obrázku 14. Z něj vyplývá, že nejnižší hodnoty EC₅₀ byly zjištěny u esenciálního oleje *O. vulgare* (100 % izolátů v intervalu 0–200 µl/l). Naopak nejvyšší hodnoty EC₅₀ byly stanoveny u *T. serpyllum* (40 % izolátů v intervalu 400–600 µl/l).

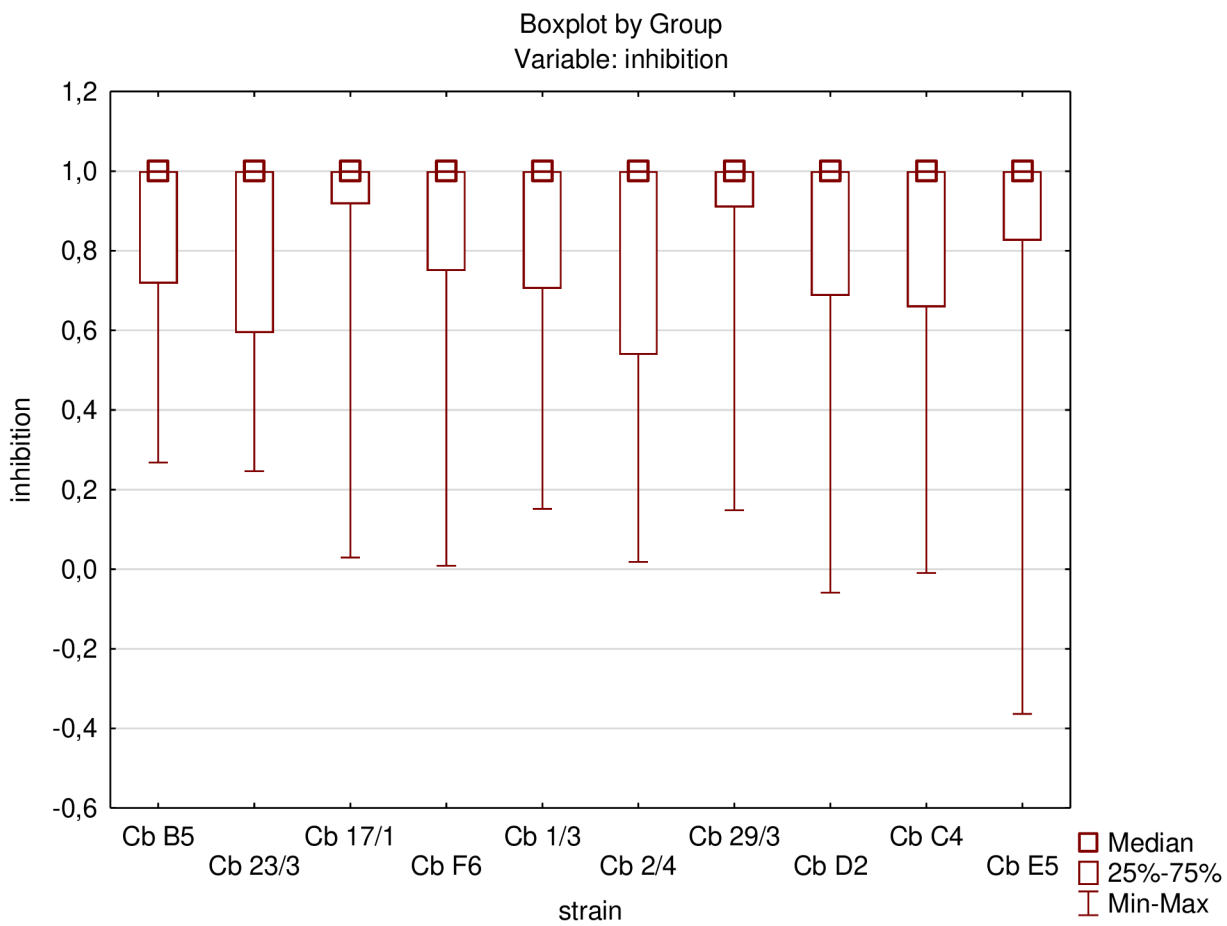
Tabulka 19 Přehled hodnot EC₅₀ a MIC esenciálních olejů pro jednotlivé izoláty *C. beticola*

| izolát | <i>Thymus vulgaris</i> | | <i>Origanum vulgare</i> | | <i>Thymus serpyllum</i> | |
|----------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|
| | EC ₅₀ (μl/l) | MIC (μl/l) | EC ₅₀ (μl/l) | MIC (μl/l) | EC ₅₀ (μl/l) | MIC (μl/l) |
| Cb B5 | 210,2 | 400–600 | 188,30 | 200–400 | 296,70 | 600–800 |
| Cb 23/3 | 201,4 | 200–400 | 145,80 | 200–400 | 373,20 | 600–800 |
| Cb 17/1 | 198,1 | 200–400 | 146,70 | 200–400 | 489,30 | 600–800 |
| Cb F6 | 249,9 | 400–600 | 159,30 | 200–400 | 409,50 | 400–600 |
| Cb 1/3 | 219,3 | 400–600 | 189,00 | 200–400 | 343,10 | 600–800 |
| Cb 2/4 | 208,6 | 200–400 | 192,30 | 200–400 | 514,60 | 600–800 |
| Cb 29/3 | 251 | 400–600 | 185,90 | 200–400 | 251,90 | 400–600 |
| Cb D2 | 364,6 | 600–800 | 188,60 | 200–400 | 295,60 | 600–800 |
| Cb C4 | 212,2 | 400–600 | 197,90 | 200–400 | 410,80 | 400–600 |
| Cb E5 | 202,8 | 200–400 | 160,90 | 200–400 | 352,80 | 600–800 |



Obrázek 14 Grafické znázornění počtu izolátů *C. beticola* v jednotlivých intervalech koncentrací EC₅₀ u testovaných esenciálních olejů

Dále byl proveden Kruskal-Wallisův test zaměřený na inhibici růstu mycelia jednotlivých izolátů při způsobenou esenciálními oleji. Výsledná p-hodnota se rovnala 0,8462, mezi vzorky tedy nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl. Vliv testovaných esenciálních olejů (distribuce hodnot) na inhibici růstu mycelia u jednotlivých izolátů je graficky znázorněna na Obrázku 15.



Obrázek 15 Krabicový graf distribuce hodnot inhibicí růstu mycelia u jednotlivých izolátů *C. beticola* a jejich mediánu–působení esenciálních olejů

6 Diskuze

V této diplomové práci byl testován inhibiční účinek vybraných fungicidních látek, esenciálních olejů a antagonistických organismů na růst mycelia izolátů *Cercospora beticola* pocházejících z různých lokalit České republiky.

Otestovány byly celkem tři **přípravky na ochranu rostlin**: Amistar Gold (kombinace ú.l. azoxystrobin/difenokonazol), Eminent 125 ME (ú.l. tetrakonazol) a Propulse (kombinace ú.l. fluopyram/prothiokonazol) v různých koncentracích účinných látek. Nejvyšší hodnotu mediánu inhibice růstu mycelia u jednotlivých izolátů vykazoval přípravek Amistar Gold, o něco hůře inhiboval podle mediánu růstu mycelia přípravek Eminent 125 ME a nejhůře přípravek Propulse. Výsledky Kruskal-Wallisova testu ukazují, že existuje signifikantní rozdíl mezi inhibicí růstu *C. beticola* různými přípravky. Dále bylo zjištěno, že účinky fungicidů Eminent 125 ME a Amistar Gold jsou statisticky významně odlišné od účinku fungicidu Propulse.

V rámci testování účinnosti uvedených fungicidů byly stanoveny také hodnoty EC_{50} a MIC. EC_{50} udává koncentraci fungicidu, při které je inhibován růst mycelia z 50 %, zatímco MIC udává nejnižší koncentraci, která inhibuje růst mycelia ze 100 %. Výsledky testování napovídají, že některé izoláty jsou na určité fungicidy citlivější. Hodnoty MIC se ukázaly být znatelně vyšší, než hodnoty EC_{50} a nejčastěji se pohybovaly v rozmezí 100–1000 $\mu\text{g/ml}$ a více. V intervalu EC_{50} 100–1000 $\mu\text{g/ml}$ se u kombinace účinných látek fluopyram/prothiokonazol (Propulse) pohybovalo celkem 30 % izolátů. U tetrakonazolu (Eminent 125 ME) se koncentrace EC_{50} u většiny izolátů (60 %) pohybovala v rozmezí 1–10 $\mu\text{g/ml}$. Nejcitlivější izoláty (dle jejich hodnoty EC_{50}) na tetrakonazol (Eminent 125 ME) byly Cb 17/1, Cb 29/3 a Cb C4, nejméně citlivé pak Cb F6 a Cb D2. Nejvyšší citlivost ke kombinaci účinných látek fluopyram/prothiokonazol (Propulse) pak vykazovaly izoláty Cb E5 a Cb 29/3, méně citlivé byly pak izoláty Cb D2 a 2/4. Nejcitlivější na kombinaci účinných látek azoxystrobin/difenokonazol (Amistar Gold) byly izoláty Cb 29/3 a Cb C4, nejméně citlivé byly pak izoláty Cb 2/4 a Cb D2.

Doporučená dávka účinné látky tetrakonazol fungicidu Eminent 125 ME při aplikaci na pole činí 100 g/ha, což odpovídá průměrné koncentraci účinné látky 205,56 $\mu\text{g/ml}$. Při této koncentraci by bylo možné inhibovat růst mycelia z 50 % u všech testovaných izolátů *in vitro* podmínkách. S jistotou však lze říci, že inhibovat růst mycelia (*in vitro*) ze 100 % by při této koncentraci bylo možné jen u izolátu Cb 29/3. U fungicidu Propulse je doporučena aplikační dávka 150 g/ha, což odpovídá průměrné koncentraci ú.l. fluopyram/prothiokonazol 150 g/ha, což odpovídá průměrné koncentraci kombinace účinných látek 541,67 $\mu\text{g/ml}$. Při této koncentraci by byl inhibován růst mycelia z 50 % u všech testovaných izolátů, ze 100 % u žádného. Doporučená průměrná koncentrace ú.l. azoxystrobin/difenokonazol u přípravku Amistar Gold činí 125 g/ha, průměrná koncentrace kombinace účinných látek fungicidu 431,39 $\mu\text{g/ml}$ by opět stačila k inhibici růstu mycelia z 50 % u všech testovaných izolátů. Vzhledem k tomu, že u některých izolátů je hodnota MIC stanovena na 100–1000 $\mu\text{g/ml}$, nelze s jistotou říci, že by došlo k jejich inhibici ze 100 %. Tyto výsledky mohou znamenat, že

existuje riziko vzniku rezistence vůči testovaným fungicidům. Rezistenci *C. beticola* ke skupině DMI fungicidů, do které patří tetrakonazol, difenokonazol i prothiokonazol, popisovali ve své práci Bolton et al. (2012), kdy sledovali účinnost DMI fungicidů proti *C. beticola* v Minnesotě (USA) v letech 1997–1998 a 2007–2010. V letech 1997–1998 byla EC₅₀ pro tetrakonazol nižší než 0,01 µg/ml, v roce 2010 již nebyl nalezen žádný izolát v tomto rozmezí EC₅₀. Dále Pethybridge et al. (2020) zkoumali dynamiku rezistence vůči strobilurinům, skupině fungicidů do které patří azoxystrobin, v populaci *C. beticola*. Rezistence k azoxystrobinu byla zjištěna ve všech případech vzorků získaných z polí z let 2015 a 2016, a dále na šesti z deseti polí v roce 2017. V našich podmínkách rezistenci vůči strobilurinům potvrzuje například Bittner (2021). Udává, že je proto nutné dodržovat antirezistentní strategii ochrany, kdy je vhodná kombinace stávajících strobilurinů a triazolů s kontaktně působícími anorganickými látkami jako jsou například oxychlorid mědi, případně měď v kombinaci se sírou. Muellender et al. (2021) zkoumali citlivost *C. beticola* k DMI fungicidům a provedli sekvenaci genu cytochrom P450-dependentní C-14- α -demetylázy (CYP51) u izolátů z několika evropských zemí, včetně České republiky. V případě vzorků z České republiky, byly nalezeny změny aminokyselin v sekvenci CYP51 Y464S, L144F, a kombinace L144F s 1309T. Tyto mutace se nevyskytují jen u *C. beticola*, ale i u jiných fytopatogenních hub vykazující sníženou citlivost k DMI fungicidům. Je tedy možné, že v testovaných izolátech se tyto mutace nacházejí, a proto některé vzorky vykazují sníženou citlivost na DMI fungicidy (například izolát Cb F6 na účinnou látku tetrakonazol). Také Kumar et al. (2021) zjistili u izolátů rezistentních k DMI (propikonazol, epoxikonazol a prochloraz) bodovou mutaci Y464S a nadměrnou expresi cílového genu CYP51.

Pro porovnání inhibicí růstu mycelia jednotlivých izolátů za působení fungicidů byl proveden Kruskal-Wallisův neparametrický test. Ten prokázal, že alespoň mezi dvěma izoláty existuje signifikantní rozdíl. Bylo zjištěno, že se například liší izoláty Cb 29/3 a Cb F6, kdy Cb 29/3 byl jeden z nejcitlivějších na tetrakonazol (Eminent 125 ME) a Cb F6 jeden z nejméně citlivých (viz výše). Pokud porovnáme mediány inhibice růstu mycelia jednotlivých vzorků, zjistíme, že nejvyšší hodnotu mediánu měly dva izoláty – Cb 29/3 a Cb C4, které byly zároveň oba nejcitlivější na kombinaci účinných látek azoxystrobin/difenokonazol (Amistar Gold) i účinnou látku tetrakonazol (Eminent 125 ME).

Další testovanou skupinou byly **antagonistické organismy**, konkrétněji *Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus chitinolyticus*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas fluorescens*. *Paenibacillus chitinolyticus* vykazuje ve všech vzorcích nulovou inhibici růstu mycelia, po očkování nedošlo k jeho nárůstu na agaru. To mohlo zapříčinit hned několik faktorů – koncentrace bakterií mohla být příliš nízká a bakterie tak byly po agaru rozptýleny nedostatečně nebo mohlo být vybráno živné medium, které nemuselo *P. chitinolyticus* vyhovovat obsahem živin nebo pH.

Nejvyšší hodnotu mediánu inhibice růstu mycelia vykazuje *P. alvei*, nejnižší hodnotu pak *P. fluorescens*. U bakterie *P. alvei* jako možnosti BCA proti původci cerkosporové listové skvrnitosti jsem nenalezla žádné výzkumy. V této práci je dokázáno, že *P. alvei* v *in vitro* podmínkách inhibuje růst mycelia patogena *C. beticola*. Je však třeba dále testovat inhibiční účinky této bakterie na více izolátech a poté v polních podmínkách. V odborné literatuře

zabývající se *P. alvei* jako BCA se tato bakterie často používá proti půdou přenosným patogenům, například: *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, původci fusariového vadnutí melounu (Charalambous et al. 2013), *Verticillium dahliae*, původci verticiliového vadnutí olivovníku (Markakis et al. 2016) nebo *Rhizoctonia solani* a *Sclerotinia sclerotiorum*, původci rizoktoniové a sklerotiniové hniloby salátu (Fatouros et al. 2018). Je tedy otázkou, zda a do jaké míry by byla bakterie *P. alvei* schopna inhibovat růst mycelia *C. beticola* při foliární aplikaci. *B. subtilis* byl již testován jako bioagens proti cerkosporové listové skvrnitosti v práci Esh et al. (2011), kde při skleníkových i polních pokusech došlo ke snížení závažnosti onemocnění díky této bakterii. I na základě výsledků této diplomové práce by bylo možné doporučit *B. subtilis* jako bioagens proti *C. beticola*. Bakterie vykázala v *in vitro* podmínkách průměrnou inhibici mycelia patogena mezi 72–89 %. *P. fluorescens* vykazovala nejmenší medián inhibice růstu mycelia. Průměrná inhibice růstu mycelia izolátů, kterou tato bakterie způsobila, byla v rozmezí 26–78 %. Hegde et Jagdish (2011) ve své práci *in vitro* testovali použití *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*, *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas fluorescens* proti *C. beticola* na palaku (*Beta vulgaris* var. *bengalensis* Hort). Nejvyšší hodnoty inhibice zaznamenali při použití houby *T. harzianum*, jedny z nejnižších pak při použití *P. fluorescens*. Výzkum Hegde et Jagdish (2011) je tedy v souladu s výsledky této diplomové práce.

Obdobně jako u fungicidů byl proveden Kruskal-Wallisův test, který prokázal, že mezi alespoň některými BCA existují statisticky významné rozdíly. Post hoc test určil, že signifikantní rozdíly existují mezi všemi BCA kromě dvojice *B. subtilis* a *P. alvei*.

Nakonec bylo provedeno porovnání inhibicí růstu mycelia jednotlivých izolátů vlivem působení BCA. Kruskal-Wallisův test ale neprokázal žádné signifikantní rozdíly. Toto bylo pravděpodobně způsobeno vysokou variací hodnot.

Poslední testovanou skupinou byly **esenciální oleje** z těchto rostlin: *Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* v různých koncentracích. Nejvyšší hodnotu mediánu inhibice růstu mycelia vykazovaly dva oleje, a to *O. vulgare* a *T. vulgaris*, přičemž alespoň 75 % hodnot inhibice růstu mycelia *O. vulgare* se rovnalo inhibici 100 %. Kruskal-Wallisův test zjistil mezi skupinami statisticky signifikantní rozdíly. Post hoc test poté dokázal, že mezi všemi testovanými esenciálními oleji jsou významné rozdíly.

Byly stanoveny hodnoty EC₅₀ a MIC, obdobně jako u skupin přípravků na ochranu rostlin. Jednoznačně nejnižší hodnoty EC₅₀ byly stanoveny u esenciálního oleje *O. vulgare*, 100 % izolátů mělo hodnoty EC₅₀ v rozmezí 0–200 µl/l. Nejvyšší hodnoty EC₅₀ byly zjištěny u esenciálního oleje *T. serpyllum*, kdy se hodnoty EC₅₀ u 40 % vzorků pohybovaly v intervalu 400–600 µl/l. Nejcitlivějšími izoláty k *T. vulgaris* jsou Cb 17/1 a Cb B5, nejméně citlivé pak 29/3 a Cb D2. K *O. vulgare* pak byly nejcitlivější izoláty Cb 23/3 a Cb 17/1, nejméně citlivé pak 2/4 a Cb C4. Mezi nejcitlivější k *T. serpyllum* patřily izoláty Cb 29/3 a Cb D2, ty nejméně citlivé byly pak Cb 2/4 a Cb 17/1. Pereira et al. (2011) studovali vliv některých esenciálních olejů na patogena *Cercospora coffeicola*. Zkoumali různé esenciální oleje, včetně *T. vulgaris*. Zaznamenali inhibici klíčení konidií i růstu mycelia, nicméně se *T. vulgaris* neumístil jako nejslibnější esenciální olej při kontrole patogena *C. coffeicola*. Další výzkum, který provedli

Centeno et al. (2010) potvrdil fungicidní účinky esenciálního oleje z *T. vulgaris*, a to při použití proti patogenu *Aspergillus flavus*. Esenciální olej z *T. vulgaris* použitý při nízkých koncentracích byl vyhodnocen jako potenciální látka využitelná v biologické ochraně rostlin. V práci od Starovic et al. (2021) je uvedeno, že esenciální olej z *O. vulgare*, vykazoval z testovaných olejů (*Echinophora tenuifolia*, *Ocimum basilicum* a *Myrtus communis*) nejvyšší antifungální aktivitu proti *C. beticola*. Tyto závěry jsou v souladu s výsledky výzkumu popsaného v této práci.

Je pozoruhodné, že izolát 17/1 byl zároveň jeden z nejcitlivějších k *T. vulgaris*, ale zároveň nejméně citlivý k *T. serpyllum*. Tento izolát byl zároveň jeden z nejcitlivějších na tetrakonazol (Eminent 125 ME). Nejméně citlivý k *T. vulgaris* byl izolát Cb 29/3, který byl ale zároveň jeden z nejcitlivějších ke všem testovaným fungicidům. Izolát Cb D2 patřil mezi nejcitlivější k *T. serpyllum*, ale byl nejméně citlivý k tetrakonazolu (Eminent 125 ME). Dále izolát Cb C4, který patřil mezi nejcitlivější na kombinaci účinných látek azoxystrobin/difenokonazol ve fungicidu Amistar Gold, byl nejméně citlivý k *O. vulgare*. Tyto závěry považuji za velmi zajímavé a myslím, že by měly být dále prostudovány.

Nakonec byly porovnány inhibice růstu mycelia jednotlivých izolátů za vyvolané působení esenciálních olejů pomocí Kruskal-Wallisova testu. Ten ale prokázal, že mezi vzorky nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl. Mediány inhibice růstu mycelia všech izolátů se rovnají 100 %. V příštích pokusech bych doporučila testovat podrobněji jen rozmezí koncentrací 0–600 µl/l, kdy došlo k inhibici růstu mycelia z 50 % a v mnoha případech i 100 % růstu mycelia. Pak by bylo možné lépe porovnat účinek jednotlivých esenciálních olejů.

7 Závěr

- V rámci této práce bylo získáno 10 izolátů patogena *Cercospora beticola* z 10 různých lokalit. Na těchto izolátech byl poté testován inhibiční účinek různých skupin přípravků. Jednalo se o celkem tři fungicidní přípravky (Eminent 125 ME, Propulse, Amistar Gold), čtyři antagonistické organismy (*Paenibacillus alvei*, *Paenibacillus chitinolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*) a tři esenciální oleje (*Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare*).
- Výsledky této diplomové práce naznačují, že existuje riziko vzniku rezistence v populaci patogena vůči testovaným fungicidům. Jako nejméně účinný se ukázal přípravek Propulse (fluopyram/prothiokonazol), nejvíce účinný pak Amistar Gold (azoxystrobin/difenokonazol).
- V rámci této práce byl prokázán inhibiční účinek bakterie *P. alvei* na růst mycelia izolátů *C. beticola* v *in vitro* podmínkách. Tyto vlastnosti *P. alvei* je však třeba dále pečlivě studovat na větším množství izolátů a později i v polních podmínkách. Nejnižší medián inhibice růstu mycelia izolátů *C. beticola* byl zjištěn při aplikaci bakterie *P. fluorescens*.
- U testovaných esenciálních olejů byly naměřeny nejnižší hodnoty EC₅₀ u esenciálního oleje z *O. vulgare*, nejvyšší hodnoty EC₅₀ u *T. serpyllum*.
- Byla potvrzena hypotéza, že různé fungicidní látky, látky rostlinného původu a různé antagonistické organismy se vyznačují různým inhibičním účinkem na růst patogena *C. beticola*.
- Tato práce ukazuje, že některé fungicidy jsou účinnější než jiné, upozorňuje na riziko vzniku rezistence vůči fungicidům. Dále uvádí, že některé bakterie a esenciální oleje mají potenciál být účinnými alternativami k fungicidům při ochraně proti patogenu *C. beticola*. Tato diplomová práce může být podkladem pro další výzkum a vývoj nových přípravků proti patogenu *C. beticola*. Dále může sloužit k informování pěstitelů o dalších možnostech ochrany proti *C. beticola*.

8 Literatura

- Ackermann P. 2013. Metodická příručka integrované ochrany rostlin proti chorobám, škůdcům a plevelům – Polní plodiny. Česká společnost rostlinolékařská, Praha.
- Anckaert A, Arias AA, Hoff G, Calonnes-Salmon M, Declerck S, Ongena M. 2021. The use of *Bacillus* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases. Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge.
- Arzanlou M, Mousavi S, Bakhshi M, Khakvar R, Bandehagh A. 2016. Inhibitory effects of antagonistic bacteria inhabiting the rhizosphere of the sugarbeet plants, on *Cercospora beticola* Sacc., the causal agent of *Cercospora* leaf spot disease on sugarbeet. *Journal of Plant Protection Research* **56**:6–14.
- Asadi M. 2005. Beet-Sugar Handbook. Page Beet-Sugar Handbook. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Birla K, Rivera-Varas V, Secor GA, Khan MFR, Bolton MD. 2012. Characterization of cytochrome b from European field isolates of *Cercospora beticola* with quinone outside inhibitor resistance. *European Journal of Plant Pathology* **134**:475–488.
- Bittner V. 2021. *Cercospora beticola* na cukrovce - co je nového. *Agromanuál* **6**:36–38.
- Bolton MD, Rivera-Varas V, Del LE, Mendoza R. 2012a. Efficacy of Variable Tetraconazole Rates Against *Cercospora beticola* Isolates with Differing In Vitro Sensitivities to DMI Fungicides. *Plant Disease* **96**:1749–1756.
- Bolton MD, Secor GA, Rivera V, Weiland JJ, Rudolph K, Birla K, Rengifo J, Campbell LG. 2012b. Evaluation of the potential for sexual reproduction in field populations of *Cercospora beticola* from USA. *Fungal Biology* **116**:511–521.
- Centeno S, Calvo MA, Adelantado C, Figueroa S. 2010. Antifungal activity of extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **13**:452–455.
- Český statistický úřad. 2023. Vývoj ploch, hektarových výnosů a sklizní zemědělských plodin. Available from: <https://www.czso.cz/csu/czso/definitivni-udaje-o-sklizni-zemedelskych-plodin-2022>
- Charalambous A, Tjamos SE, Domazakis E, Paplomatas EJ. 2013. Incorporation into the transplant soil plug of the plant protective agent *Paenibacillus alvei* strain K165 confers protection to melon against *Fusarium* wilt. *BioControl* **58**:685–692.
- N, Valiuškait A. 2021. Biocontrol of Carrot Disease-Causing Pathogens Using Essential Oils. *Plants* **10**.
- Daub ME, Ehrenschaft M. 2000. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. *Annual Review of Phytopathology* **38**:461–490.

- Deising HB, Reimann S, Pascholati F. 2008. MECHANISMS AND SIGNIFICANCE OF FUNGICIDE RESISTANCE. *Brazilian Journal of Microbiology* **39**:286–295.
- Eilenberg J. 2007. CONCEPTS AND VISIONS OF BIOLOGICAL CONTROL. Pages 1–11 *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Springer Netherlands.
- Esh A, Atia M, Tohamy M, Taghian S. 2011. SYSTEMIC RESISTANCE IN SUGAR BEET ELICIATED BY NON-PATHOGENIC, PHYLLOSPHERE-COLONIZING *Bacillus pumilus* AND *B. subtilis* AGAINST THE PATHOGEN *Cercospora beticola* Sacc. *Journal of Plant Protection and Pathology* **2**:67–83.
- Fatouh YO, Abd-El-Kareem F, Faten MA, El-Mohammedy RS. 2011. Effects of citrus essential oil compounds on management leaf spot disease on sugar beet plant under field condition. *International Journal of Agricultural Technology* **7**:1389–1396.
- Fatouros G, Gkizi D, Fragkogeorgi GA, Paplomatas EJ, Tjamos SE. 2018. Biological control of *Pythium*, *Rhizoctonia* and *Sclerotinia* in lettuce: association of the plant protective activity of the bacterium *Paenibacillus alvei* K165 with the induction of systemic resistance. *Plant Pathology* **67**:418–425.
- Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J, Stanković S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology* **285**:44–55.
- Galovičová L et al. 2021a. *Thymus vulgaris* Essential Oil and Its Biological Activity. *Plants* **10**:1958.
- Galovičová L et al. 2021b. *Thymus serpyllum* Essential Oil and Its Biological Activity as a Modern Food Preserver. *Plants* **10**.
- Goudet C, Milat ML, Sentenac H, Thibaud JB. 2000. Beticolins, nonpeptidic, polycyclic molecules produced by the phytopathogenic fungus *Cercospora beticola*, as a new family of ion channel-forming toxins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**:203–209.
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC. 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. *Microb Cell Fact* **15**:203.
- Hallau L et al. 2018. Automated identification of sugar beet diseases using smartphones. *Plant Pathology* **67**:399–410.
- Hegde YR, Jagdish J. 2011. Biological Management of Leaf Spot of Palak Caused by *Cercospora beticola* Sacc. *Research Journal of Agricultural Sciences* **2**:655–657.
- Höfte M. 2021. *The use of Pseudomonas spp. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases*. Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge.
- Kaffka SR, Grantz DA. 2014. Sugar Crops. Pages 240–260 *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Academic Press.

- Karaoglanidis GS, Bardas G. 2006. Control of benzimidazole- and DMI-resistant strains of *Cercospora beticola* with strobilurin fungicides. *Plant Disease* **90**:419–424.
- Kazda J, Mikulka J, Prokinová E. 2010. *Encyklopedie ochrany rostlin 1*. Profi Press s.r.o, Praha.
- Khan J, Del Rio LE, Nelson R, Rivera-Varas V, Secor GA, Khan MFR. 2008. Survival, dispersal, and primary infection site for *Cercospora beticola* in sugar beet. *Plant Disease* **92**:741–745.
- Khan J, Qi A, Khan MFR. 2009. Ecology and Epidemiology Fluctuations in Number of *Cercospora beticola* Conidia in Relationship to Environment and Disease Severity in Sugar Beet. *Physiology and Behavior* **99**:796–801.
- Kolář M. 2022. Aktuální situace v sektoru cukrovka – cukr. *Listy cukrovarnické a řepařské* **138**:246–249.
- Kumar R, Mazakova J, Ali A, Sur VP, Sen MK, Bolton MD, Manasova M, Rysanek P, Zouhar M. 2021. Characterization of the molecular mechanisms of resistance against DMI fungicides in *Cercospora beticola* populations from the Czech Republic. *Journal of Fungi* **7**:1062.
- Leadbeater AJ. 2014. *Plant Health Management: Fungicides and Antibiotics*. Pages 408–424 *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Academic Press.
- M. Harveson R. 2013. *Cercospora Leaf Spot of Sugar Beet*. NebGuide, University of Nebraska-Lincoln Extension.
- Markakis EA, Tjamos SE, Antoniou PP, Paplomatas EJ, Tjamos EC. 2016. Biological control of *Verticillium* wilt of olive by *Paenibacillus alvei*, strain K165. *BioControl* **61**:293–303.
- Mcspadden Gardener BB. 2007. The Nature and Application of Biocontrol Microbes III: *Pseudomonas* spp. Diversity and Ecology of Biocontrol *Pseudomonas* spp. in Agricultural Systems **97**:221.
- Ministerstvo zemědělství. 2020. Situační a výhledová zpráva - cukr, cukrová řepa. Available from https://eagri.cz/public/web/file/697813/CUKR_12_2020.pdf.
- Ministerstvo zemědělství. 2022. Registr přípravků na ochranu rostlin. Available from <https://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/DataKeStazeni.aspx>.
- Muellender MM, Mahlein AK, Stammler G, Varrelmann M. 2021. Evidence for the association of target-site resistance in *cyp51* with reduced DMI sensitivity in European *Cercospora beticola* field isolates. *Pest Management Science* **77**:1765–1774.
- Muthukumar A, Regunathan U, Suthin Raj T, Udhayakumar R, Reetha AK, Logeshwari R. 2020. PLANT ESSENTIAL OIL AS AN ECO-FRIENDLY BIOCIDES AGAINST PLANT PATHOGENIC FUNGI. Pages 124–133 *Eco-friendly Disease Management for Food Security*. JPS Scientific Publication, Tamil Nadu.

- Narayanasamy P. 2013. Biological management of diseases of crops: Volume 1: Characteristics of biological control agents. Springer, Dordrecht.
- Oliver RP, Hewitt HG. 2014. Fungicides in crop protection: Second edition. Page Fungicides in Crop Protection: Second Edition. CABI International.
- Pal KK, Gardener BM. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. Biological Control **2**:1117–1142.
- Pereira RB, Lucas GC, Perina FJ, Resende MLV de, Alves E. 2011. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. *Ciência e Agrotecnologia* **35**:115–123.
- Pethybridge SJ, Sharma S, Hansen ZACHARIAHR, Vaghefi N, Hanson LE, Kikkert JR. 2020. Improving fungicide-based management of *Cercospora* leaf spot in table beet in New York, USA. *Canadian Journal of Plant Pathology* **42**:353–366.
- Piszczek J, Pieczul K, Kiniec A. 2017. First report of G143A strobilurin resistance in *Cercospora beticola* in sugar beet (*Beta vulgaris*) in Poland. *Journal of Plant Diseases and Protection* 2017 125:1 **125**:99–101.
- Pulkrábek J, Urban J, Bečková L, Valenta J. 2007. Řepa cukrová Pěstitelský rádce Praha 2007, 1st edition. Kurent s.r.o, Praha. Available from <http://www.af.czu.cz>.
- Rangel LI, Spanner RE, Ebert MK, Pethybridge SJ, Stukenbrock EH, de Jonge R, Secor GA, Bolton MD. 2020. *Cercospora beticola*: The intoxicating lifestyle of the leaf spot pathogen of sugar beet. *Molecular Plant Pathology* **21**:1020–1041.
- Rouabhi R. 2010. Introduction and Toxicology of Fungicides. Page 550 Fungicides. IntechOpen.
- Sang H, Witte A, Jacobs JL, Chang HX, Wang J, Roth MG, Chilvers MI. 2018. Fluopyram sensitivity and functional characterization of *sdhb* in the *fusarium solani* species complex causing soybean sudden death syndrome. *Frontiers in Microbiology* **9**:1–12.
- Santoyo G, del Orozco-Mosqueda MC, Govindappa M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **22**:855–872.
- Secor GA, Khan MFR, Gudmestad NC. 2010. Monitoring Fungicide Sensitivity of *Cercospora beticola* of Sugar Beet for Disease Management Decisions. *Plant Disease* **94**:1272–1287.
- Sharma A, Diwevidi VD, Singh S, Kumar Pawar K, Jerman M, Singh LB, Singh S, Srivastawa D. 2013. Biological Control and its Important in Agriculture. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research* **4**:175–180.
- Shrestha S, Neubauer J, Spanner R, Natwick M, Rios J, Metz N, Secor GA, Bolton MD. 2020. Rapid Detection of *Cercospora beticola* in Sugar Beet and Mutations Associated with Fungicide Resistance Using LAMP or Probe-Based qPCR. *Plant Disease* **104**:1654–1661.

- Skaracis GN, Pavli OI, Biancardi E. 2010. Cercospora Leaf Spot Disease of Sugar Beet. Sugar Tech **12**:220–228.
- Solel Z, Minz G. 1971. Infection Process of Cercospora beticola in Sugarbeet in Relation to Susceptibility. Phytopathology **61**:463–466.
- Spitzer T, Klem K, Matušinský P, Kazda J, Agrotest fyto s. r. o., Česká zemědělská univerzita. 2011. Model predikce houby Cercospora beticola na cukrovce. LISTY CUKROVARNICKÉ a ŘEPAŘSKÉ **127**:170–173.
- Starovic M, Ristic D, Pavlovic S, Mozkan M, Josic D. 2021. Antifungal activity of plant essential oils and Pseudomonas chlororaphis strains against Cercospora beticola Sacc. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke **140**:9–19.
- The National Center for Biotechnology Information. 2022. Taxonomy browser (Cercospora beticola). Available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=122368&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle.
- Tian F, Lee SY, Woo SY, Choi HY, Park SB, Chun HS. 2021. Effect of plant-based compounds on the antifungal and antiaflatoxigenic efficiency of strobilurins against Aspergillus flavus. Journal of Hazardous Materials **415**:125663.
- Weiland J, Koch G. 2004. Sugarbeet leaf spot disease (Cercospora beticola Sacc.). Molecular Plant Pathology **5**:157–166.
- Wesołowska A, Grzeszczuk M, Jadczyk D, Nawrotek P, Struk M. 2015. Comparison of the chemical composition and antimicrobial activity of Thymus serpyllum essential oils. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca **43**:432–438.
- Windels CE, Lamey HA, Hilde D, Widner J, Knudsen T. 1998. A Cercospora leaf spot model for sugar beet: In practice by an industry. Plant Disease **82**:716–726.
- Zhao H, Xue J, Jiang N, Peng W, Liu F. 2012. Dissipation and residue of fenpropidin in wheat and soil under field conditions. Ecotoxicology and Environmental Safety **77**:52–56.
- Zicari S, Zhang R, Kaffka S. 2019. Sugar Beet. Pages 331–351 Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products. Academic Press.

9 Seznam obrázků a tabulek

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 Složení cukrové řepy..... | 9 |
| Obrázek 2 Životní cyklus <i>Cercospora beticola</i> | 13 |
| Obrázek 3 A: Makroskopický pohled na pseudostromata patogena <i>Cercospora beticola</i> B: Infikované listy | 15 |
| Obrázek 4 Vývoj rezistence k fungicidům je selekční proces, přičemž selekčním činitelem je fungicid. Kvalitativní rezistence (A), kvantitativní rezistence (B) | 22 |
| Obrázek 5 Vpravo: Petriho miska připravená k inokulaci. Vlevo: Petriho miska s izolátem <i>Cercospora beticola</i> | 30 |
| Obrázek 6 Schéma naočkované Petriho misky vybranými BCA: A - terčík pocházející z izolátu <i>C. beticola</i> , B - testovaná bakterie | 31 |
| Obrázek 7 Schéma vyhodnocování pokusu. dT1 – průměr mycelia testovného izolátu 1 , dT2 – průměr mycelia testovaného izolátu 2 | 32 |
| Obrázek 8 Krabicový graf distribuce hodnot a jejich mediánu inhibicí růstu mycelia u vybraných fungicidů..... | 33 |
| Obrázek 9 Grafické znázornění počtu izolátů v jednotlivých intervalech koncentrací EC ₅₀ u vybraných fungicidů..... | 37 |
| Obrázek 10 Krabicový graf distribuce hodnot a jejich mediánu inhibicí růstu mycelia u jednotlivých izolátů – působení fungicidů | 38 |
| Obrázek 11 Krabicový graf distribuce hodnot a jejich mediánu inhibicí růstu mycelia u vybraných BCA | 39 |
| Obrázek 12 Krabicový graf distribuce hodnot a jejich mediánu inhibicí růstu mycelia u jednotlivých izolátů – působení BCA | 41 |
| Obrázek 13 Krabicový graf distribuce hodnot a jejich mediánu inhibicí růstu mycelia u vybraných esenciálních olejů | 42 |
| Obrázek 14 Grafické znázornění počtu izolátů v jednotlivých intervalech koncentrací EC ₅₀ u testovaných esenciálních olejů..... | 45 |
| Obrázek 15 Krabicový graf distribuce hodnot a jejich mediánu inhibicí růstu mycelia u jednotlivých izolátů – působení esenciálních olejů | 46 |
| | |
| Tabulka 1 Taxonomické zařazení patogena..... | 11 |
| Tabulka 2 Práh škodlivosti <i>Cercospora beticola</i> | 13 |
| Tabulka 3 Registrované přípravky proti původci cercosporové listové skvrnitosti v České republice | 20 |
| Tabulka 4 Mezidruhové antagonistické vztahy vedoucí k biologické kontrole fytopatogenů. 24 | |
| Tabulka 5 Přípravky na ochranu rostlin a jejich účinné látky | 29 |
| Tabulka 6 Koncentrace esenciálních olejů v agaru, varianty..... | 31 |
| Tabulka 7 Eminent 125 ME – průměrná inhibice růstu mycelia..... | 34 |
| Tabulka 8 Propulse – průměrná inhibice růstu mycelia | 34 |

| | |
|--|----|
| Tabulka 9 Amistar Gold – průměrná inhibice růstu mycelia | 35 |
| Tabulka 10 Vícenásobné porovnání z' hodnot (Multiple Comparisons z' values) - fungicidy .. | 35 |
| Tabulka 11 Přehled hodnot EC ₅₀ a MIC účinných látek vybraných fungicidů pro jednotlivé izoláty..... | 36 |
| Tabulka 12 Vícenásobné porovnání z'hodnot (Multiple Comparisons z' values) – inhibice jednotlivých izolátů fungicidy | 37 |
| Tabulka 13 BCA – průměrná inhibice růstu mycelia | 39 |
| Tabulka 14 Vícenásobné porovnání z'hodnot (Multiple Comparisons z' values) – BCA | 40 |
| Tabulka 15 Thymus vulgaris – průměrná inhibice růstu mycelia izolátů C. beticola..... | 42 |
| Tabulka 16 Thymus serpyllum – průměrná Inhibice růstu mycelia izolátů C.beticola | 43 |
| Tabulka 17 Origanum vulgare – průměrná Inhibice růstu mycelia izolátů C. beticola | 43 |
| Tabulka 18 Vícenásobné porovnání z'hodnot (Multiple Comparisons z' values) – esenciální oleje | 44 |
| Tabulka 19 Přehled hodnot EC ₅₀ a MIC esenciálních olejů pro jednotlivé izoláty | 45 |