

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Vliv vybraných složek rostlinných silic na růst  
*Helminthosporium solani* Durier et Mont., 1849  
způsobující stříbřitost slupky bramboru**

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Marie Veselská</b>
Studijní program:	N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Ing. Martin Kmoch, Ph.D.</b>
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....

## Poděkování

„Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce Ing. Martinu Kmochovi, Ph.D. za odborné vedení práce, za jeho čas a cenné rady, trpělivost a ochotu při zpracování diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat kolegyním Mgr. Věře Loubové a Ivaně Zavadilové za podporu a cenné rady při vypracovávání diplomové práce. Diplomová práce byla vypracována v rámci projektu NAZV číslo QK21010083 s názvem „Ekologická ochrana konzumních brambor jako zdravé zeleniny proti vybraným půdním a semenným patogenům“.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Marie Veselská
Název práce	Vliv vybraných složek rostlinných silic na růst <i>Helminthosporium solani</i> Durier et Mont., 1849 způsobující stříbřitost slupky bramboru
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod
Vedoucí práce	Ing. Martin Kmoch, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

### Abstrakt

*Helminthosporium solani* Durier et Mont., 1849 je patogenní houba způsobující stříbřitost slupky bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Toto onemocnění se nejvíce šíří ve skladech a snižuje tržní hodnotu hlíz. Hlavním cílem experimentální části bylo zjistit vliv deseti vybraných složek esenciálních olejů (EO;  $\alpha$ -pinen, cinnamaldehyd, D-karvon, eukalyptol, karvakrol, L-linalool, L-mentol, L-menton, (R)-(+)-limonen a thymol) na růst *H. solani* v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. V *in vitro* testech inhibovaly všechny složky EO růst *H. solani*, ale jejich antifungální aktivita se významně lišila. Nejsilnější inhibiční účinek na růst mycelia měl cinnamaldehyd, karvakrol a thymol. Antifungální aktivita těchto tří složek EO byla potvrzena v *in vivo* experimentech. Složky EO byly aplikovány metodou fumigace a moření. Při metodě moření byly složky EO pro vyšší účinnost a stabilitu navázány na biopolymer. Použití obou metod poskytlo statisticky významné snížení intenzity infekce *H. solani*. Současně byla provedena úspěšná optimalizace detekce *H. solani* na hlízách bramboru pomocí Sybr Green real-time PCR a TaqMan real-time PCR.

Klíčová slova	<i>Solanum tuberosum</i> L, <i>Helminthosporium solani</i> , Stříbřitost slupky bramboru, Složky esenciálních olejů, Real-time PCR
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Marie Veselská
Title	Effect of selected components of essential oils on the growth of <i>Helminthosporium solani</i> Durier <i>et</i> Mont., 1849 causing silver scurf of potato
Type of thesis	Diploma
Department	Institut for potato research Havlíčkův Brod
Supervisor	Ing. Martin Kmoch, Ph.D.
The year of presentation	2024

### Abstract

*Helminthosporium solani* Durier *et* Mont., 1849 is a pathogenic fungus causing silver scurf of potato (*Solanum tuberosum* L.). This disease is most prevalent in storage and reduces the market value of the tubers. The main aim of the experimental part was to determine the effect of ten selected components of essential oils (EO;  $\alpha$ -pinene, cinnamaldehyde, D-carvone, eucalyptol, carvacrol, L-linalool, L-menthol, (R)-(+)-limonene and thymol) on the growth of *H. solani* under *in vitro* and *in vivo* conditions. In *in vitro* assays, all EO components inhibited the growth of *H. solani*, but their antifungal activity differed significantly. Cinnamaldehyde, carvacrol and thymol had the strongest inhibitory effect on mycelial growth. The antifungal activity of these three EO components was confirmed in *in vivo* experiments. The EO components were applied by fumigation and dressing method. In the dressing method, the EO components were bound to the biopolymer for higher efficiency and stability. The use of both methods provided a statistically significant reduction in the intensity of *H. solani* infection. Simultaneously, successful optimization of *H. solani* detection on potato tubers was performed using Sybr Green real-time PCR and TaqMan real-time PCR.

Keywords	<i>Solanum tuberosum</i> L, <i>Helminthosporium solani</i> , Silver scurf of potato, Components of essential oils, Real-time PCR
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Lilek Brambor (<i>Solanum tuberosum</i> L.)</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 <i>Helminthosporium solani</i> Durier et Mont., 1849</b> .....	<b>3</b>
2.2.1 Cyklus onemocnění a infekční proces.....	5
2.2.2 Ochrana bramboru proti <i>H. solani</i> .....	7
<b>2.3 Rostlinné silice</b> .....	<b>9</b>
2.3.1 Složení EO.....	10
2.3.2 Metody extrakce EO.....	11
2.3.3 Mechanismus působení EO na mikroorganismy.....	12
<b>2.4 Složky EO použité v diplomové práci</b> .....	<b>13</b>
2.4.1 Karvakrol.....	13
2.4.2 Thymol.....	15
2.4.3 Cinnamaldehyd.....	17
2.4.4 Karvon.....	18
2.4.5 Linalool.....	19
2.4.6 Mentol.....	21
2.4.7 Menton.....	22
2.4.8 Eukalyptol.....	23
2.4.9 Limonen.....	24
2.4.10 $\alpha$ -pinen.....	25
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Materiál</b> .....	<b>27</b>
3.1.1 <i>In vitro</i> testy antifungální aktivity složek EO.....	27
3.1.1.1 Použité chemikálie.....	27
3.1.1.2 Roztoky a média.....	27
3.1.1.3 Použité přístroje.....	28
3.1.1.4 Software pro zpracování výsledků.....	28
3.1.1.5 Biologický materiál.....	28
3.1.2 <i>In vivo</i> testy antifungální aktivity složek EO.....	28
3.1.2.1 Použité chemikálie.....	28
3.1.2.2 Použité přístroje.....	28

3.1.2.3 Software pro zpracování výsledků.....	28
3.1.2.4 Biologický materiál .....	28
3.1.3 Optimalizace detekce <i>H. solani</i> pomocí real-time PCR.....	29
3.1.3.1 Použité chemikálie.....	29
3.1.3.2 Použité přístroje.....	29
3.1.3.3 Biologický materiál .....	29
<b>3.2 Metody.....</b>	<b>30</b>
3.2.1 <i>In vitro</i> testy antifungální aktivity složek EO.....	30
3.2.1.1 Diskový difúzní test.....	30
3.2.2 <i>In vivo</i> testy antifungální aktivity složek EO.....	33
3.2.2.1 Fumigace hlíz složkami EO .....	33
3.2.2.2 Moření hlíz složkami EO .....	34
3.2.3 Optimalizace detekce <i>H. solani</i> pomocí real-time PCR.....	34
3.2.3.1 Izolace DNA.....	34
3.2.3.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty vyizolované DNA .....	36
3.2.3.3 Detekce <i>H. solani</i> pomocí real-time PCR.....	36
3.2.3.4 Detekce <i>H. solani</i> pomocí Sybr Green real-time PCR .....	37
3.2.3.5 Detekce <i>H. solani</i> pomocí TaqMan real-time PCR .....	38
<b>4 VÝSLEDKY.....</b>	<b>39</b>
4.1.1 <i>In vitro</i> testy antifungální aktivity složek EO.....	39
4.1.1.1 Diskový difúzní test.....	39
4.1.2 <i>In vivo</i> testy antifungální aktivity složek EO.....	47
4.1.2.1 Fumigace hlíz složkami EO .....	47
4.1.2.2 Moření hlíz složkami EO .....	48
4.1.3 Optimalizace detekce <i>H. solani</i> pomocí real-time PCR.....	49
4.1.3.1 Spektrofotometrické stanovení kvality a kvantity vyizolované DNA.....	49
4.1.3.2 Detekce <i>H. solani</i> pomocí Sybr Green real-time PCR .....	50
4.1.3.3 Detekce <i>H. solani</i> pomocí TaqMan real-time PCR .....	52
<b>5 DISKUSE .....</b>	<b>54</b>
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>56</b>
<b>7 LITERATURA .....</b>	<b>57</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>62</b>

## CÍLE PRÁCE

### Teoretická část:

- Vypracování literárního přehledu na základě studia literatury od našich a zahraničních autorů se zaměřením pozornosti na patogen *Helminthosporium solani* (biologie, význam, diagnostika, možnosti ochrany bramboru proti patogenu) a vybrané složky rostlinných silic (jejich charakteristika, rozdělení, využití z hlediska ochrany rostlin před patogeny).

### Experimentální část:

- Stanovení účinnosti vybraných složek rostlinných silic na růst *H. solani* pomocí experimentů *in vitro* a *in vivo*.
- Statistické vyhodnocení pokusů a porovnání účinnosti vybraných rostlinných silic na růst *H. solani*, zhodnocení jejich potenciálu pro ochranu bramboru proti patogenu.
- Optimalizace detekce *H. solani* pomocí real-time PCR.



## 1 ÚVOD

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) je jednoletá dvouděložná rostlina, která produkuje jedlé podzemní hlízy. Má vysoký nutriční index, krátkou vegetační dobu a vysoký výnos (Reddy *et al.*, 2018). Díky těmto vlastnostem je lilek brambor nejčastěji pěstovanou hlíznatou plodinou a čtvrtou nejdůležitější plodinou na světě (De Haan & Rodriguez, 2016). Může být napadán mnoha patogeny, které negativně ovlivňují výnos a kvalitu produkce. Jedním z nich je patogenní houba *Helminthosporium solani* Durier *et* Mont., 1849, která patří do kmene *Ascomycota*. *H. solani* má hemibiotrofní nebo nektrotrofní způsob života (Tiwari *et al.*, 2021). Způsobuje onemocnění stříbřitost (silver scurf) slupky bramboru, které nezpůsobuje ztráty na výnosu při sklizni, ale díky kosmetickým vadám hlíz negativně ovlivňuje prodejnost brambor. Cyklus onemocnění stříbřitosti slupky bramboru má polní a skladovací fázi (Errampalli *et al.*, 2001). K rozvoji onemocnění dochází nejčastěji ve skladovací fázi a přispívá k němu vysoká vlhkost a teploty v rozmezí 15–32 °C ve skladu (Heiny & McIntyre, 1983). Prvními příznaky tohoto onemocnění jsou hnědé až šedé léze na hlízách bramboru. Zralé léze jsou následně zbarveny do stříbrna. Změna barvy slupky hlíz bramboru je způsobena ztrátou pigmentu v důsledku vysychání buněk a ukládání suberinu (Errampalli *et al.*, 2001).

Závažnost onemocnění lze snížit ošetřením hlíz fungicidy. Ekologickou alternativou syntetických fungicidů jsou esenciální oleje (EO, silice, essential oils). EO jsou komplexní směsi bioaktivních sloučenin syntetizované rostlinami. Jsou to aromatické, těkavé, ve vodě nerozpustné látky, které mají nízkou teplotu varu a nízkou molekulovou hmotnost. EO obsahují 20 až 60 sloučenin. Z těchto sloučenin jsou dvě nebo tři hlavní složky ve vysoké koncentraci, oproti ostatním složkám. Některé složky se v EO mohou nacházet pouze ve stopovém množství (Bakkali *et al.*, 2008). EO a jejich složky mají antivirové, antimykotické, antiparazitární, insekticidní vlastnosti (Kalemba & Kunicka, 2003; Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008). Antimikrobiální účinek EO a složek EO závisí na jejich hydrofilním nebo lipofilním charakteru. Mechanismus působení EO a složek EO rovněž závisí na druhu mikroorganismu, konkrétně na struktuře jeho buněčné stěny (Kalemba & Kunicka, 2003). Působení EO a složek EO na houby se projevuje inhibicí sporulace nebo produkcí poškozených buněk (Swamy *et al.*, 2016). EO a jejich složky mají využití v mnoha průmyslech, například v potravinářském, farmaceutickém, kosmetickém a zemědělském (Kalemba & Kunicka, 2003; Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008).

V experimentální části diplomové práce byla pomocí *in vitro* testů zkoumána antifungální aktivita deseti složek EO ( $\alpha$ -pinen, cinnamaldehyd, D-karvon, eukalyptol, karvakrol, L-linalool, L-mentol, L-menton, (R)-(+)-limonen a thymol) proti patogenu *H. solani*. Následně byla antifungální aktivita nejúčinnějších složek EO (cinnamaldehyd, karvakrol a thymol) ověřena pomocí *in vivo* testů. Na závěr byla provedena optimalizace detekce *H. solani* pomocí Sybr Green real-time PCR a TaqMan real-time PCR.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Lilek Brambor (*Solanum tuberosum* L.)

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) je rostlina, která patří podle vědecké klasifikace do říše rostliny (*Plantae*), oddělení krytosemenné (*Magnoliopsida*), třídy pravé dvouděložné (*Asteranae*), řádu lilkotvaré (*Solanales*), čeledi lilkovité (*Solanaceae*) a rodu lilek (*Solanum*) (ITIS). Je to jednoletá, dvouděložná rostlina, která produkuje jedlé podzemní hlízy. Pěstuje se v mírných, subtropických a tropických podmínkách. Optimální teplota půdy pro pěstování brambor je mezi 16–19 °C. Optimálních výnosů je dosahováno při průměrných denních teplotách 18–20°C. Brambory vyžadují nepřetržitý přísun vody a dostatečné provzdušňování půdy (Reddy *et al.*, 2018). Jsou nejčastější pěstovanou hlíznatou plodinou a čtvrtou nejdůležitější užitkovou plodinou na světě po pšenici, rýži a kukuřici (De Haan & Rodriguez, 2016) a jsou široce rozšířenou zeleninou. Používají se také k výrobě zpracovaných potravin a v průmyslu pro výrobu škrobu a lihu (Reddy *et al.*, 2018).

Brambory jsou hlavní plodinou pro zajištění potravinové bezpečnosti, protože 74 % produkce brambor je v celosvětovém měřítku využito pro lidskou spotřebu. Vysoký nutriční index, krátká vegetační doba a vysoký výnos z nich činí hlavní zeleninu pro zajištění potravinové bezpečnosti v rozvojovém světě. Brambory zabírají celosvětově 19 milionů hektarů plochy s produkcí 378 milionů tun ročně (Tiwari *et al.*, 2021). V roce 2023 se v České republice brambory pěstovaly na ploše 27 020 ha. Z toho 20 947 ha v zemědělském sektoru a 6 073 ha v sektoru domácností. Na této ploše bylo za rok 2023 sklizeno celkem 703 078 tun brambor, z toho 39 366 tun raných brambor, 55 384 tun sadbových brambor a 608 328 tun ostatních brambor. V roce 2023 byla pro výrobu škrobu použita plocha brambor 5 054 ha s produkcí 151 088 tun. Průměrný výnos činil 29,89 t/ha a průměrná škrobnatost brambor byla 19,2 % (ČSÚ).

### 2.2 *Helminthosporium solani* Durier *et* Mont., 1849

*Helminthosporium solani* Durier *et* Mont., 1849 je houba, která podle fylogenetické klasifikace patří do kmene *Ascomycota*, třídy *Dothideomycetes*, řádu *Pleosporales* a čeledi *Massarinaceae*. *H. solani* má pouze anamorfní (nepohlavní) stádium, teleomorfní (pohlavní) stádium není známo. Má hemibiotrofní nebo nektrotrofní způsob života (Tiwari *et al.*, 2021).

Způsobuje onemocnění s názvem stříbřitost (silver scurf) slupky bramboru (obr. 1). Stříbřitost slupky bramboru je rozšířené onemocnění bramboru, které nezpůsobuje ztráty na výnosu při sklizni, ale díky kosmetickým vadám hlíz negativně ovlivňuje prodejnost brambor jak pro spotřební trh, tak pro sadbu. Vzhledem k rostoucí poptávce po mytých hlízách (vysoká vlhkost po mytí přispívá ke sporulaci *H. solani* na infikovaných hlízách) snižuje choroba tržní hodnotu hlíz. Způsobuje úbytek hmotnosti skladovaných hlíz v důsledku zvýšené ztráty vody, což má za následek nadměrnou ztrátu hmotnosti hlíz. Stříbřitost slupky bramboru může mít významný vliv na export, zejména sadbových hlíz, protože u certifikované sadby brambor je povolena pouze omezená infekce *H. solani*. Hranolky vyrobené z infikovaných hlíz mají často nepříjemně spálené okraje, protože hlízy s pokročilou infekcí stříbřítostí slupky bramboru mají silnější slupku, než neinfikované hlízy, která se před smažením mechanicky neodstarní (Errampalli *et al.*, 2001).



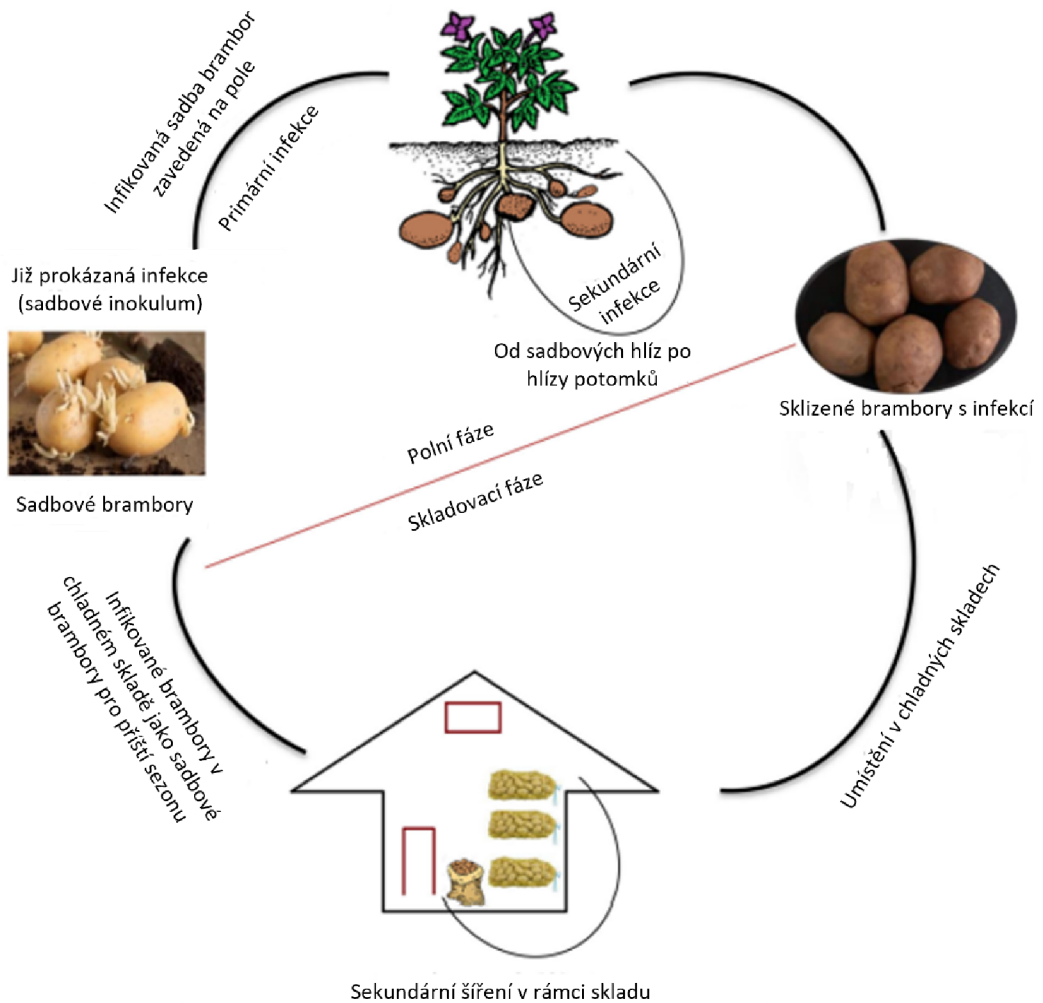
Obr. 1 Stříbřitost slupky bramboru na hlíze odrůdy „Belana“.

Houba *H. solani* tvoří tmavé mycelium, stromata a konidiofory s konidii. Hyfy jsou přítomny ve vrstvě felému, felodermu a kortikulární vrstvě (Heiny & McIntyre, 1983). Prvními příznaky stříbřitosti slupky bramboru jsou hnědé až šedé léze na hlízách, na kterých probíhá hojně sporulace. Zralé léze jsou zbarveny do stříbrna. Změna barvy je způsobena ztrátou pigmentu, vysycháním buněk a ukládáním suberinu. Mycelium proniká do epidermis přes lenticely anebo může napadat periderm, což způsobuje ztrátu pigmentace a vede ke vzniku stříbrných lézí (Errampalli *et al.*, 2001). Vysoká vlhkost a teploty v rozmezí 15–32 °C mají často za následek klíčení konidií vedoucí k infekci (Heiny & McIntyre, 1983). U kultivarů brambor s červenou slupkou může být pigmentace hlíz, způsobená patogenem *H. solani*, zcela zakryta (Errampalli *et al.*, 2001). Patogen nenapadá žádnou jinou část rostliny bramboru kromě hlíz (Avis *et al.*, 2010). Molekulární analýzy pomocí ribozomální DNA a vnitřní transkribované spacer sekvence, ukazují že nejbližší příbuzný *H. solani* je *Helminthosporium velutinum*, saprofyt na dřevě a *Saccharicola bicolor*, původce onemocnění cukrové třtiny (Olivier *et al.*, 2000). Kromě lilku bramboru (*S. tuberosum*) a lilku hlošinolitého (*Solanum elaeagnifolium*) nemá *H. solani* jiné rostlinné hostitele (Errampalli *et al.*, 2001).

Patogen *H. solani* může být detekován konvenčními nebo molekulárními technikami. Konvenční techniky zahrnují rozpoznání symptomů v polní nebo skladovací fázi, izolaci patogenu *H. solani* a jeho pozorování a určení pod mikroskopem. Do molekulárních technik řadíme detekční systémy na bázi nukleových kyselin. Tyto techniky mají mnoho výhod, a to rychlou detekci, vysokou specifitu a citlivost a patogena lze identifikovat jak z mycelia, tak z konidií. Nejčastěji se používají detekční systémy založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) (Errampalli *et al.*, 2001).

### **2.2.1 Cyklus onemocnění a infekční proces**

Cyklus onemocnění stříbřitosti slupky bramboru má dvě fáze, a to polní a skladovací (Obr. 2). Primárním zdrojem inokula *H. solani* jsou sadbové hlízy brambor infikované patogenem *H. solani* (Errampalli *et al.*, 2001).



Obr. 2 Cyklus onemocnění stříbřitosti slupky bramboru, způsobené *H. solani*, zobrazující polní a skladovací fázi. Upraveno z Tiwari *et al.* (2021).

Nedávná studie Inglis a Gundersen, (2019) poskytla mnoho fotografických důkazů o polycyklickém způsobu života potagena *H. solani*, který ukazuje mnohočetné sporulační cykly pod zemí. Jejich studie odhalila, že na sadbových hlízách pod zemí dochází k hojné sporulaci a k milionům konidii produkovaným v jednom životním cyklu. Vytvořené spory v půdě se mohou dostat do závlahové a dešťové vody, což může vést k další infekci a sporulaci na hlízách a kořenech. U infikovaných hlíz vykazujících při sklizni velmi mírné nebo žádné příznaky po umístění do skladů, může během týdne dojít k rozsáhlé infekci. Opakované sporulační cykly jsou zahájeny na povrchu infikovaných hlíz udržovaných při vysoké relativní vlhkosti (85–95 %). Vzniklé konidie jsou rozšiřovány ventilačním systémem a způsobují infekci zdravých hlíz. V důsledku

toho je během krátké doby infikována většina zdravých hlíz (Cunha & Rizzo, 2004). *H. solani* je považováno za patogena přenášeného hlízami. Může však přezimovat v půdě, ale není zcela jasné, jak konidie přetrvávají v půdě nebo na jiných hostitelích. V epidemiologii onemocnění stříbřitosti slupky bramboru nehraje žádnou nebo malou roli přežití patogenu *H. solani* v půdě (Tiwari *et al.*, 2021).

Heiny a McIntyre (1983) popsali pomocí světelné a rastrovací elektronové mikroskopie vývoj *H. solani* v peridermu hlízy brambory. U kultivarů Norchip prokázali, že infekční cyklus byl dokončen během sedmi až devíti dnů, přičemž penetrace peridermem byla pozorována dva dny po inokulaci. Martinez *et al.*, (2004) provedli další studii infekčního procesu *H. solani* na hlízách bramboru pomocí rastrovací a transmisní elektronové mikroskopie. V této studii k penetraci peridermem hlíz bramboru došlo mezi šestou a devátou hodinou po inokulaci *H. solani*. Také patogen nevytvářel žádné specializované struktury jako jsou apresoria, nebo zvětšení hyf. Naopak studie Heiny a McIntyre (1983) ukázala, že *H. solani* produkovalo apresoria během penetrace. Hyfy *H. solani* byly po devíti hodinách od inokulace pozorovány v mnoha buňkách peridermu a v kortexu, ačkoli nebyla patrná žádná masivní kolonizace hostitelských buněk. Lokalizace *H. solani* prokázala, že hyfy byly většinou intracelulární a nebyly obklopeny obalem. Konidiogeneze byla pozorována čtyři dny po inokulaci, čímž byl dokončen infekční cyklus (Martinez *et al.*, 2004). Podle pozorování popsána Heiny a McIntyre (1983) a Martinez *et al.*, (2004) mohou různé kmeny *H. solani* produkovat odlišné infekční struktury. Tato pozorování také naznačují, že čas potřebný k dokončení infekčního cyklu *H. solani* se liší podle kmene houby a kultivaru bramboru (Martinez *et al.*, 2004).

### **2.2.2 Ochrana bramboru proti *H. solani***

*H. solani* může být regulováno fungicidy. Nejúčinnějším fungicidem proti *H. solani* byl širokospektrální fungicid thiabendazol (TBZ), který patří do skupiny fungicidů benzimidazolů. TBZ se hojně používal od počátku 70. let 20. století k posklizňovému ošetření hlíz brambor. TBZ má nízkou toxicitu a má schopnost inhibovat *H. solani* po dobu několika měsíců bez vlivu na kvalitu nebo retenci reziduí (Errampalli *et al.*, 2001). TBZ stejně jako každý jiný benzimidazolový fungicid, inhibuje funkci mikrotubulů vazbou houbového  $\beta$ -tubulinového proteinu. Od roku 1977 se začala objevovat rezistence *H. solani* na fungicid TBZ. Odolnost *H. solani* na TBZ je způsobena bodovou mutací jedné báze v kodonu 198 z kyseliny glutamové (Glu; GAG) na glutamin

(Gln; CAG) nebo mutací jedné báze v kodonu 200 z fenylalaninu (Phe; TTC) na tyrosin (Tyr; TAC). Všechny rezistentní kmeny z Ruska, USA a Evropy mají stejné genetické pozadí a stejnou mutaci (Tiwari *et al.*, 2021). Další fungicidy, které se používají k omezování *H. solani* jsou imazalil, prochloraz, propikonazol, nebo tolylfluamid (Errampalli *et al.*, 2001).

Díky vzniku rezistencí *H. solani* na chemické fungicidy a k trendu snižování používání syntetických chemických fungicidů v zemědělství byly zkoumány ke kontrole stříbřitosti slupky bramboru různé chemické sloučeniny, jako jsou anorganické a organické soli nebo dezinfekční prostředky. Mezi organické a anorganické soli, které inhibují růst *H. solani*, patří sorbát draselný, propionát vápenatý, uhličitán sodný, uhličitán draselný a hydrogenuhličitán amonný (Olivier *et al.*, 1998).

Z dezinfekčních prostředků jsou účinnými biocidy chlor a oxid chloričitý, které jsou relativně bezpečné, levné a představují nízkou hrozbu pro lidské zdraví nebo životní prostředí. Chlor, oxid chloričitý a peroxid vodíku při posklizňovém ošetření brambor snižují výskyt a závažnost stříbřitosti slupky bramboru (Avis *et al.*, 2010).

Fungicidní sloučeniny s aktivní složkou nanočástice stříbra stabilizované amfoterním povrchově aktivním činidlem, rovněž zmírňují příznaky po napadení *H. solani*. Nanofungicidy mají širokospektrální aktivitu, ale jejich účinek na zdraví lidí a zvířat není doposud dobře prozkoumán (Tiwari *et al.*, 2021).

Biologická ochrana je atraktivní alternativa k chemickým látkám pro účinnou, spolehlivou a ekologicky bezpečnou kontrolu rostlinných patogenů. Houba *Acremonium strictum* (dříve *Cephalosporium*) dokázala významně snížit šíření *H. solani* ve skladu, ale nesnižovala výskyt na již infikovaných hlízách. *A. strictum* má schopnost snížit sporulaci, klíčení spor a růst mycelia *H. solani* (Rivera-Varas *et al.*, 2007). Bakterie *Aquaspirillum autotrophicum*, *Cellulomonas fimi* a *Pseudomonas putida* inhibují růst mycelia bez ovlivnění klíčení konidií. Naopak bakterie *Bacillus cereus*, *Kocuria rosea* a *Pseudomonas fluorescens* produkují antifungální metabolity (antibiózu) proti klíčení konidií, ale neinhibují růst mycelia. Bakterie *Streptomyces griseus*, *Pseudomonas chlororaphis* a *Alcaligenes piechaudii* inhibují růst mycelia i klíčení konidií. Antagonistické bakterie využívají produkci antifungálních metabolitů (antibióza) jako potenciální složku v biologické ochraně proti *H. solani* (Martinez *et al.*, 2006). Také některé houby izolované z půdy po pěstování brambor a z rhizosféry rostlin bramboru inhibují růst



*H. solani*. Jedná se například o *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma polysporum*, *Trichoderma harzianum* a *Trichoderma viride* (Kurzawińska, 2006).

Mezi komerčně dostupné biopesticidy, používané k potlačení stříbřitosti slupky, bramboru patří přípravek na bázi *Bacillus subtilis*. Tento přípravek snižuje výskyt i závažnost stříbřitosti slupky bramboru při nízkém množství inokula patogenu *H. solani* a oddaluje nástup onemocnění až po dobu pěti měsíců. V opačném případě biopesticid zmírňuje pouze příznaky choroby (Avis *et al.*, 2010).

V současné době je v České republice registrovaný pouze jeden přípravek na ochranu bramboru proti stříbřitosti slupky bramboru, a to přípravek Serenade ASO. Tento přípravek má jako účinnou látku kmen *B. subtilis* QST 713 (EAGRI).

Další možností zvládnutí choroby stříbřitosti slupky brambor je střídání různých plodin v osevním postupu. Například střídání brambor s hořčicí s vysokým obsahem glukosinolátů bylo účinné pro ochranu před *H. solani* a dalším patogenům přenášených půdou u brambor. Také tříleté střídání ječmene, jetele červeného a brambor prokázalo významné snížení výskytu stříbřitosti slupky bramboru (Tiwari *et al.*, 2021).

Účinnou ochranou hlíz bramboru před *H. solani* je využití EO ve skladech. Dobré fungicidní vlastnosti vykazoval EO z máty peprné (*Mentha piperita*) a tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*). EO z máty inhiboval růst *H. solani* při 160 ppm a EO z tymiánu při 80 ppm (Bång, 2007). Také složka EO L-karvon vykazoval fungicidní aktivitu proti *H. solani* (Errampalli *et al.*, 2001).

### **2.3 Rostlinné silice**

Esenciální oleje (EO, silice, essential oils) jsou aromatické, těkavé, ve vodě nerozpustné látky s nízkou teplotou varu. Jsou to komplexní směsi bioaktivních sloučenin o nízké molekulové hmotnosti, syntetizované rostlinami. Nacházejí se v listech, stoncích, trichomech, pupenech, semenech, plodech a květech (Bakkali *et al.*, 2008). Tyto sloučeniny jsou syntetizovány v cytoplazmě a plastidech rostlinných buněk přes kyselinu malonovou, kyselinu mevalonovou a methyl-D-erythrol-4-fosfát a ukládány v rostlinách v glandulárních trichomech, sekrečních dutinách, pryskyřičných kanálcích nebo epidermálních buňkách (Nazzaro *et al.*, 2013). Bylo identifikováno přes 3000 EO produkovaných rostlinami různých rodů z nichž přibližně 300 je považováno za komerčně důležité (Bakkali *et al.*, 2008)

EO a jejich složky vykazují antibakteriální, antivirové, antimykotické, antiparazitální, insekticidní, protizánětlivé, antioxidantní, protirakovinné, organoleptické, antimutagenní, vlastnosti. Používají se v aromaterapii a také v mnoha průmyslech, například v potravinářském, farmaceutickém, kosmetickém a zemědělském (Kalemba & Kunicka, 2003; Burt, 2004; Bakkali *et al.*, 2008).

EO jsou sekundární metabolity rostlin. To znamená, že nejsou přímo nezbytné pro základní procesy růstu a vývoje rostliny (Theis & Lerda, 2003). V přírodě můžou sloužit k ochraně rostlin před patogeny nebo býložravci. Také mají důležitou funkci při lákání opylujícího hmyzu nebo v komunikaci mezi rostlinami (Bakkali *et al.*, 2008).

Některé chemické a konzervační látky mají karcinogenní a teratogenní účinky a zanechávají rezidua. (Kalemba & Kunicka, 2003). Proto EO představují účinné alternativy nebo doplňky k syntetickým a chemickým látkám, například ve farmacii, potravinářství a zemědělství (Bakkali *et al.*, 2008).

### **2.3.1 Složení EO**

V jednotlivých EO lze identifikovat mezi 20 až 60 sloučeninami. Z těchto sloučenin jsou dvě nebo tři složky ve vysoké koncentraci oproti ostatním. Některé sloučeniny se mohou nacházet pouze ve stopovém množství. Biologická aktivita EO je obecně připisována jedné nebo dvěma z těchto hlavních sloučenin. Existuje také možnost, že biologická aktivita EO může být výsledkem několika složek, které působí synergicky a mají významný účinek (Bakkali *et al.*, 2008). Identifikace a kvantifikace sloučenin v EO umožňuje studium antimikrobiální aktivity jednotlivých složek a určit, zda existuje interakce s ostatními složkami EO (Burt, 2004).

Vlastnosti EO každého rostlinného druhu jsou spojeny se sekundárními metabolity produkovanými rostlinou, které zahrnují terpeny, fenyylpropanoidy, aldehydy, estery, alkoholy a ketony, jejichž bioaktivita se mění v závislosti na strukturní konfiguraci molekuly (Da Silva *et al.*, 2021). Tyto sekundární metabolity rozdělujeme na dvě hlavní skupiny. První skupinu tvoří terpeny a terpenoidy a druhou skupinu aromatické a alifatické složky. Všechny tyto sloučeniny se vyznačují nízkou molekulovou hmotností (Bakkali *et al.*, 2008).

Terpeny jsou organické sloučeniny složené z izoprenových jednotek, které jsou tvořeny opakujícími se fragmenty izoprenu (2-methylbuta-1,3-dien). Můžeme je rozdělit podle počtu izoprenových jednotek na několik skupin, a to na hemiterpeny, monoterpeny,

seskviterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny (McMurry, 2015). V EO jsou nejdůležitější monoterpeny a seskviterpeny (De Groot & Schmidt 2016). Monoterpeny jsou tvořeny ze dvou izoprenových jednotek a mohou se vyskytovat v lineární (acyklické), monocyklické nebo bicyklické formě (McMurry, 2015). Do monoterpenů patří například limonen, p-cymen,  $\gamma$ -terpinen, sabinen a  $\beta$ -myrcen (Da Silva *et al.*, 2021). Seskviterpeny jsou tvořeny ze tří izoprenových jednotek a mohou se vyskytovat v lineární (acyklické), monocyklické, bicyklické nebo tricyklické formě (McMurry, 2015). Nejdůležitější deriváty terpenů v EO jsou produkty oxidace, které vytvářejí podskupiny jako alkoholy, aldehydy, fenoly, ethery a ketony (De Groot & Schmidt 2016).

Terpenoidy vznikají enzymatickou modifikací terpenů a hydroxylové skupiny, které jsou zodpovědné za antimikrobiální účinky. Strukturní varianty terpenoidů a pozice hydroxylové skupiny mohou ovlivnit účinnost sloučeniny proti mikroorganismům. Mezi terpenoidy patří například karvakrol, thymol, mentol,  $\alpha$ -terpineol a geraniol (Gyawali & Ibrahim, 2014). Fenylypropanoidy jsou skupinou organických sloučenin syntetizovaných v rostlinách z fenylalaninu. Tvoří malou část EO, ale některé z jejich složek jako je eugenol, isoeugenol, safrol a cinnamaldehyd, mají vynikající antimikrobiální aktivitu (Bakkali *et al.*, 2008).

EO se získávají z rostlinného materiálu, a to například z plodů, květů, pupat, semen, listů, stonků a kořenů (Burt, 2004). Složení EO z různých částí stejné rostliny se může lišit. Například EO ze semen koriandru (*Coriandrum sativum* L.) má odlišné složení než EO z nezralých listů téže rostliny (Delaquis *et al.*, 2002). Většinou platí, že nejsilnější antimikrobiální aktivitu mají EO získané z rostlin sklizených během kvetení anebo bezprostředně po něm (McGimpsey *et al.*, 1994; Marino *et al.*, 1999).

Při antimikrobiálním působení složek EO má hlavní význam lipofilní charakter jejich uhlovodíkového skeletu a hydrofilní charakter jejich funkční skupiny. Aktivita složek EO je následující: fenoly > aldehydy > ketony > alkoholy > ethery > uhlovodíky (Kalemba & Kunicka, 2003).

### 2.3.2 Metody extrakce EO

Metody extrakce EO rozdělujeme na konvenční a alternativní. Konvenční extrakční metody jsou klasické metody založené na destilaci EO zahřátím. Jsou používány k získávání EO z olejnatých semen a léčivých nebo aromatických rostlin. Hlavními

konvenčními metodami jsou parní destilace, hydrodestilace, hydrodifúze a extrakce organickým rozpouštědlem (De Almeida-Couto *et al.*, 2022).

Alternativní extrakční metody mají oproti konvekčním metodám mnoho výhod, například zkrácení doby extrakce, snížení spotřeby energie, zvýšení výtěžnosti extrakce anebo zlepšení kvality EO. Hlavními alternativní metody extrakce EO jsou extrakce superkritickou tekutinou, subkritickými extrakčními kapalinami (H<sub>2</sub> a CO<sub>2</sub>), extrakce s podkritickým CO<sub>2</sub>, mikrovlnná extrakce, mikrovlnná extrakce bez rozpouštědel, mikrovlnná hydrodifúze a gravitace, mikrovlnná parní destilace a mikrovlnná parní difúze (Asbahani *et al.*, 2015).

Získaný extrakční produkt se může lišit v kvalitě, množství a složení EO v závislosti na klimatu, složení půd, typu rostlinného orgánu, ze kterého je extrahován a stáří a vegetativní fáze rostliny (Masotti *et al.*, 2003; Angioni *et al.*, 2006). Konstantní složení EO se nejlépe získá za stejných podmínek, a to při pěstování rostliny na stejné půdě, totožných klimatických podmínkách, extrakci ve stejném období a ze stejné části rostliny. Nejčastější metoda používaná k identifikaci a kvantifikaci sloučenin v EO je plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (Bakkali *et al.*, 2008).

Během procesu extrakce může dojít k oxidaci, hydrolyze a dalším chemickým reakcím chemických složek, které mohou mít za následek změny ve složení EO. V laboratorním měřítku je nejpoužívanější extrakce hydrodestilací v modifikovaném systému Clevenger. V komerční výrobě je nejběžnějším typem extrakce parní destilace. Extrakce rozpouštědlem je také široce používána, ale její použití v potravinářství je omezené kvůli vysokému množství požadovaného rozpouštědla a jeho toxicitě v procesu extrakce (Da Silva *et al.*, 2021).

### **2.3.3 Mechanismus působení EO na mikroorganismy**

Mechanismus působení EO na mikroorganismy je složitý proces a doposud nebyl plně popsán (Kalemba & Kunicka, 2003). Vzhledem k velkému počtu sloučenin přítomných v EO nelze antimikrobiální aktivitu připsat jednomu specifickému mechanismu (Burt, 2004). Obecně se udává, že antimikrobiální účinek EO závisí na jejich hydrofilním nebo lipofilním charakteru. Mechanismus působení také závisí na druhu mikroorganismů, především na struktuře buněčné stěny (grampozitivní a gramnegativní bakterie, houby) (Kalemba & Kunicka, 2003). Poškození strukturních a funkčních vlastností buněčné membrány se jeví jako nejdůležitější mechanismus působení EO proti mikroorganismům.

EO díky své hydrofobní povaze dokážou velmi dobře interagovat s buněčnou membránou a zabudovat se do buňky. Některé složky EO se po průniku do buňky vážou na hydrofobní proteinová místa a podporují změny v organizaci membrány, což má za následek zvýšení permeability buněčné membrány, ztrátu intracelulárního materiálu, inhibici vstřebávání živin a buněčnou lýzi (Da Silva *et al.*, 2021). Obecně se udává, že gramnegativní bakterie jsou odolnější vůči antimikrobiální aktivitě EO než grampozitivní bakterie kvůli rozdílům ve složení buněčné stěny. Buněčná stěna gramnegativních je složitější, skládá se z tenké vrstvy peptidoglykanu pokrytého vnější membránou z lipopolysacharidu s hydrofilním charakterem, který funguje jako selektivní permeabilní bariéra. Vnější membrána omezuje difúzi hydrofobních sloučenin z EO a zabraňuje hromadění bioaktivních sloučenin v buněčné membráně (Behbahani *et al.*, 2019). U grampozitivních bakterií je buněčná stěna tvořena z 90–95 % peptidoglykanem, který umožňuje EO pronikat buněčnou stěnou a působit na cytoplazmatickou membránu (Nazzaro *et al.*, 2013).

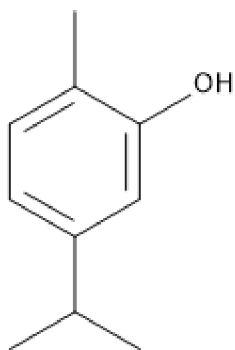
Působení EO na houby se projevuje inhibicí sporulace nebo produkcí poškozených buněk, což vede k nevratné koagulaci nebo denaturaci buněčných složek. EO jsou schopny pronikat a narušovat buněčnou stěnu hub a cytoplazmatické membrány prostřednictvím procesu permeabilizace, což může vést až k rozpadu mitochondriálních membrán. To je způsobeno změnami v toku elektronů uvnitř dráhy elektronového transportního systému. Změny v propustnosti plazmatické membrány mohou způsobit únik elektrolytů nebo buněčného obsahu. EO mohou narušit metabolismus bílkovin, nebo změnit koncentraci iontů vápníku, obsah proteinů, lipidů a nukleových kyselin v buňkách. Některé EO mohou narušit depolarizaci mitochondriálních membrán ovlivněním protonové pumpy a zásob ATP (adenosintrifosfátu), což způsobuje pokles membránového potenciálu. Permeabilizace vnitřních a vnějších mitochondriálních membrán může vést k buněčné apoptóze nebo nekróze vedoucí k buněčné smrti (Swamy *et al.*, 2016).

## **2.4 Složky EO použité v diplomové práci**

### **2.4.1 Karvakrol**

Karvakrol (5-isopropyl-2-methylfenol; Obr. 3) je přírodní monoterpenová fenolická složka mnoha EO, která se obvykle vyskytuje v rostlinách společně se svým izomerem thymolem. Je to vysoce lipofilní bezbarvá až nažloutlá kapalina se specifickým zápachem. Karvakrol je nerozpustný ve vodě, ale velmi dobře rozpustný v ethanolu, acetonu nebo v diethyletheru (Can Baser, 2008; Yadav & Kamble, 2009). Je součástí EO z mnoha

rostlin například z dobromysle obecné (*Origanum vulgare*), tymiánu (*T. vulgaris*, *Thymus glandulosus*), pepřovníku (*Lepidium flavum*), saturejky zahradní (*Satureja hortensis*), bergamotu (*Citrus aurantium* var. *bergamia* Loisel), a černuchy seté (*Nigella sativa*) (Maćzka *et al.*, 2023).



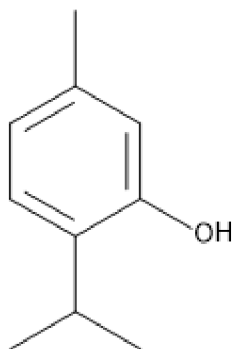
Obr. 3 Chemická struktura karvakrolu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw 2022.

Díky své vůni a antimikrobiálním účinkům na mnoho různých druhů bakterií a hub, se nejčastěji používá v potravinářství jako přírodní konzervant potravin (Salehi *et al.*, 2018). Karvakrol má také insekticidní účinky a může být použit jako přírodní repelent proti komárům, protože má mnohem větší účinnost než komerční přípravek, používaný jako repelent diethyltoluamid (deet; N,N-diethyl-m-methylbenzamid). Kromě toho také snižuje líhivost vajíček a vyvolává neplodnost u komárů (Park *et al.*, 2003). Dále se karvakrol používá také ve stomatologii (Xu *et al.*, 2006). Karvakrol má mnoho dalších biologických účinků, například antioxidantní, protizánětlivé, antibiofilmové, protirakovinné, analgetické nebo antidiabetické (Maćzka *et al.*, 2023)

V současné době je zkoumáno využití karvakrolu jako aktivní složky obalů, zejména pro skladování potravin. V potravinářství je karvakrol využíván v přípravcích s postupným uvolňováním, kde může omezit růst patogenních bakterií v potravinách a tím zpomalit proces jejich kažení. Dalším zajímavým využitím karvakrolu je při výkrmu drůbeže pro zachování senzorycké a nutriční kvality drůbežního masa inhibicí oxidace tkáňových lipidů. Díky antimikrobiálním vlastnostem karvakrolu a vznikajícím rezistencím bakterií na antibiotika se zkoumá účinnost karvakrolu jako náhrady, nebo doplnění antibiotik. Omezením použití karvakrolu je jeho těkavost, nestabilita a nízká rozpustnost ve vodě. Současné výzkumy se zabývají vyřešením těchto omezení s použitím specifických nosičů nebo formulací karvakrolu s postupným uvolňováním (Maćzka *et al.*, 2023).

#### **2.4.2 Thymol**

Thymol (2-isopropyl-5-methylfenol; Obr. 4) je přírodní monoterpenový fenol. Je to krystalická a bezbarvá sloučenina s charakteristickým zápachem. Má velmi nízkou rozpustnost ve vodě, ale je rozpustný v ethanolu a jiných organických rozpouštědlech. Thymol je také izomer s karvakrolem a je hlavní aktivní složkou EO extrahovaného z tymiánu (*T. vulgaris*). Thymol může být rovněž extrahován z dalších rostlin, například z bazalky (*Ocimum gratissimum*), drsnoplodíku moračovitého (*Trachyspermum ammi*), z různých druhů rodu dobromysl (*Origanum* L.) nebo saturejky (*Satureja* L.) (Escobar *et al.*, 2020).



Obr. 4 Chemická struktura thymolu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw 2022.

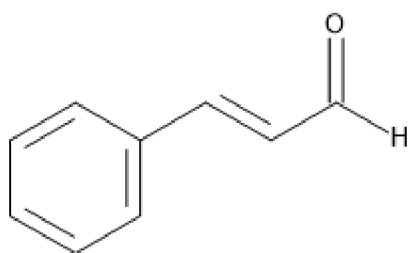
Thymol a thymiánový EO má hojně využitá ve zdravotnictví, a to zejména při léčbě horních cest dýchacích. Například v tradiční medicíně se používá jako expektorans, což je rostlinné léčivo, které podporuje uvolnění a odstranění hlenu z dýchací soustavy, a tedy podporuje vykašlávání (Kowalczyk *et al.*, 2020). Thymol má díky své antimikrobiální aktivitě hojně využití v potravinářství. Například jako přírodní konzervační prostředek, protože může inhibovat různé mikroorganismy, které kazí potraviny. Také prodlužuje trvanlivost potravin, aniž by ohrozil zdraví spotřebitele (Escobar *et al.*, 2020). Další využití má thymol jako krmná přísada pro ryby, zvyšující trávení, metabolismus a vstřebávání živin. Dále zlepšuje kvalitu rybiho masa, a snižuje peroxidaci lipidů v rybím mase (Alagawany *et al.*, 2020). Thymol má mnoho biologických vlastností, například antibakteriální, antifungální, antivirové, antiseptické, antioxidační, protizánětlivé, antibiofilmové a protinádorové (Kowalczyk *et al.*, 2020).

V současné době se oblasti výzkumu zabývají například výrobou biologicky rozložitelných obalů obsahující thymol a EO s thymolem, nebo kombinace hlavních složek EO jako antimikrobiálních látek (Escobar *et al.*, 2020). Díky mnoha polyfarmakologickým vlastnostem thymolu, se studuje jeho použití jako preventivní a terapeutické látky proti mnoha různým patogenům člověka (Nagoor Meeran *et al.*, 2017).



### 2.4.3 Cinnamaldehyd

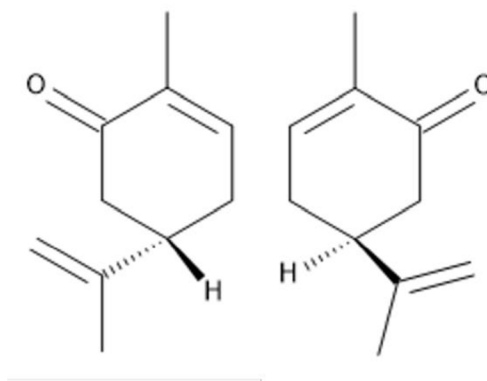
Cinnamaldehyd ((2E)-3-fenylprop-2-enal; Obr. 5) je přírodní aromatický aldehyd. Je to nažloutlá olejovitá kapalina s charakteristickou vůní skořice. Je téměř nerozpustný ve vodě, ale je dobře rozpustný v ethanolu. Cinnamaldehyd je důležitá bioaktivní složka vyskytující se v EO z rostlin rodu skořice (*Cinnamomum*) (Friedman, 2017). Cinnamaldehyd se používá v potravinářství jako příchut' a koření, dále v kosmetice a lékařství. Má mnoho biologických účinků jako jsou antibakteriální, antifungální, antidiabetické a protirakovinné (Friedman, 2017). EO ze skořice a jeho hlavní složka cinnamaldehyd vykazuje antimikrobiální účinky proti ústním patogenům a mohly by být prospěšné při prevenci zubního kazu (Yanakiev, 2020). Cinnamaldehyd má příznivé účinky v prevenci a léčbě diabetu (Zhu *et al.*, 2017).



Obr. 5 Chemická struktura cinnamaldehydu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw 2022.

#### 2.4.4 Karvon

Karvon (2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)cyklohex-2-enon; Obr. 6) je monocyklický monoterpenový keton, který se v přírodě vyskytuje enantiomerech a to jako L-karvon ((R)-karvon, (-)-karvon) a D-karvon ((S)-karvon, (+)-karvon) (Bouyahya *et al.*, 2021). Karvon je bezbarvá až nažloutlá kapalina, specifického zápachu, je nerozpustný ve vodě a dobře rozpustný v ethanolu. Enantiomery D-karvon a L-karvon mají odlišné aroma. D-karvon se nachází v EO například z kmínu kořeného (*Carum carvi*) nebo kopru vonného (*Anethum graveolens*). L-karvon se nachází v EO například v mátě klasnaté (*Mentha spicata*) (Morcia *et al.*, 2016).

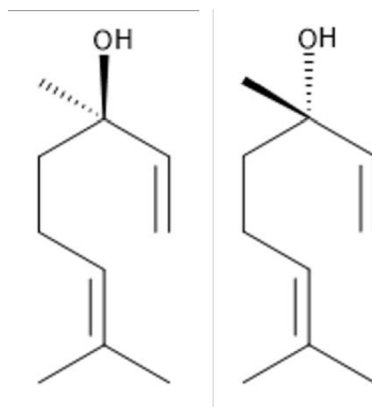


Obr. 6 Chemická struktura L-karvonu a D-karvonu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw 2022.

Karvon se díky své vůni používá v parfumerii, kosmetice nebo v aromaterapii. V potravinářství se používá jako dochucovadlo například v koření, cukrovinkách a nápojích (Morcia *et al.*, 2016). V zemědělství má karvon využití jako inhibitor klíčení brambor. K předčasnému naklíčení brambor dochází během skladování a je odpovědné za snížení prodejnosti brambor a za snížení hmotnosti hlíz důsledkem odpařování vody z povrchu klíčků. Karvon má srovnatelnou účinnost jako inhibitor klíčení (De Carvalho & Da Fonseca, 2006). Karvon má mnoho biologických účinků, například antimikrobiální, antiparazitární, antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné, neurologické a antidiabetické (Bouyahya *et al.*, 2021).

### **2.4.5 Linalool**

Linalool (3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol; Obr.7) je monoterpenový acyklický terciální alkohol, který se v přírodě vyskytuje ve dvou enantiomerech, jako L-linalool ((R)-linalool, (-)-linalool, licareol) a D-linalool ((S)-linalool, (+)-linalool, koriandrol). Oba enantiomery mají rozdílné vůně. L-linalool má dřevité levandulové aroma a D-linalool má sladké, květinové, bylinné aroma s citrusovými a ovocnými tony. Linalool může existovat v racemické formě (Aprotosoie *et al.*, 2014). Také je špatně rozpustný ve vodě, ale dobře rozpustný v ethanolu, má vysokou těkavost a nízkou stabilitu. Nachází se v EO z mnoha rostlin, například z levandule širokolisté (*Lavandula latifolia*), levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*), koriandru setého (*Coriandrum sativum* L.), bazalky pravé (*Ocimum basilicum* L.), anebo yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*) (Maćzka *et al.*, 2022).



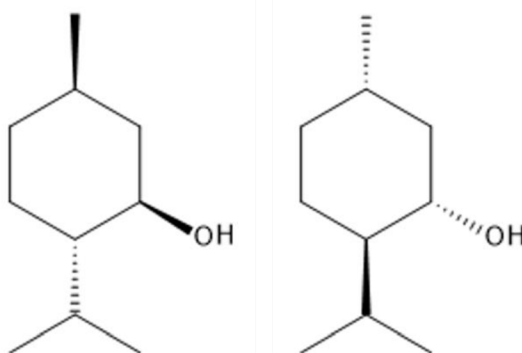
Obr. 7 Chemická struktura L-linaloolu a D-linaloolu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw 2022.

Linalool se díky své vůni hojně používá v parfumerii, kosmetických přípravcích jako jsou tělová mléka, šampony, sprchové gely, mýdla, krémy a antiperspiranty. Dále se přidává do čistících prostředků pro domácnost, výrobků pro péči o nábytek a vosků. Díky své vůni se také používá i v potravinářství jako vonné a ochucovací činidlo v nápojích a zpracovaných potravinách (Cal & Krzyzaniak, 2006). V posledních letech se linalool využívá v potravinářství jako aktivní obalová složka, například aplikací na potravinářské obaly a folie. Problémem linaloolu je jeho těkavost a vliv na obsah balení. Tento problém lze vyřešit zapouzdřením linaloolu do mikro- nebo nanoemulzí. Ve farmaceutickém průmyslu se používá jako prekurzor pro syntézu vitamínu E. Dále se používá k výrobě vitamínu A, farnesolu, ionoů a citronelolu. Další využití má linalool jako insekticid pro kontrolu ektoparazitů domácích zvířat. Především v kosmetickém průmyslu se používá syntetický linalool (Derbassi *et al.*, 2020). Linalool má mnoho biologických účinků, například antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné, sedativní, anxiolytické, analgetické, antikonvulzivní, kardioprotektivní, neuroprotektivní a především antimikrobiální (Mączka *et al.*, 2022).

V současné době se výzkum linaloolu soustředí na biotechnologické metody výroby pomocí geneticky transformovaných mikroorganismů. Bohužel je stále velkým problémem nestabilita konstruktů DNA dráhy a udržení plně funkční metabolické dráhy v mikroorganismech. Díky jeho antibakteriálním vlastnostem a vznikajícím rezistencím bakterií na antibiotika se výzkum zabývá možností použití v kombinaci s antibiotiky při terapiích, kde se současně s antibiotikem podává přírodní sloučeninou (Mączka *et al.*, 2022).

### 2.4.6 Mentol

Mentol (2-isopropyl-5-methylcyklohexanol; Obr.8) je monocyklický monoterpenový alkohol. Je to bílá pevná krystalická látka s jemnou chladivou mátovou vůní, špatně rozpustná ve vodě, ale dobře rozpustná v ethanolu. Vyskytuje se ve dvou enantiomerech a to L-mentol ((R)-mentol, (-)-mentol) a D-mentol ((S)-mentol, (+)-mentol). Hlavní formou mentolu v přírodě je forma L-mentol (Kamatou *et al.*, 2013). Mentol je hlavní složkou EO z máty peprné (*Mentha x piperita*) (Malekmohammad *et al.*, 2019) máty poleje (*Mentha pulegium*) (Domingues & Santos, 2019).

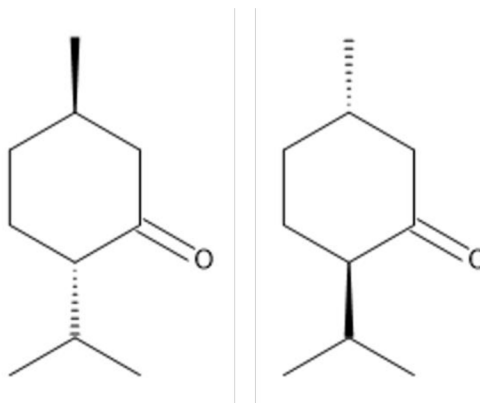


Obr. 8 Chemická struktura L-mentolu a D-mentolu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw 2022.

Mentol se používá díky svým vlastnostem v různých produktech, a to od cukrovinek, jako je čokoláda a žvýkačky až po výrobky pro péči o ústní dutinu, jakou jsou zubní pasty. Dále se využívá ve volně prodejných léčivých přípravcích pro své chladivé a biologické účinky. Mentol je součástí kosmetických přípravků, například mastí nebo balzámů. Přidává se také do cigaret. Mentol má mnoho biologických účinků, například antibakteriální, antifungální, antivirové, protisvědivé, chladivé, analgetické, protizánětlivé, protirakovinné, insekticidní a fumigantní (Kamatou *et al.*, 2013).

### 2.4.7 Menton

Menton (2-isopropyl-5-methylcyklohexanon; Obr. 9) je monocyklický monoterpenový keton. Je to bezbarvá kapalina s jemným zápachem máty peprné, špatně rozpustná ve vodě, ale dobře rozpustná v ethanolu. Menton se vyskytuje ve dvou enantiomerech a to L-menton ((R)-menton, (-)-menton) a D-menton ((S)-menton, (+)-menton). Je součástí EO z máty peprné (*M. x piperita*) (Malekmohammad *et al.*, 2019) a máty poleje (*M. pulegium*). Má silné pesticidní a antioxidační vlastnosti (Domingues & Santos, 2019).

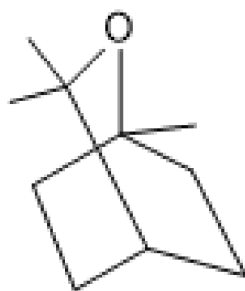


Obr. 9 Chemická struktura L-mentonu a D-mentonu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw 2022.

EO z máty obsahuje kromě mentonu také mentol, neomentol a iso-mentol. Tento EO má silné mátové aroma a chladivou mírně hořkou chuť. EO z máty má silné protizánětlivé, antibakteriální, antivirové, imunomodulační, protinádorové, neuroprotektivní a antioxidační vlastnosti. V současné době se EO z máty široce využívá pro gastrointestinální a dermatologická onemocnění, pooperační adjuvantní terapii, nutraceutika, kosmetický průmysl a další obory (Zhao *et al.*, 2022).

#### 2.4.8 Eukalyptol

Eukalyptol (1,8-cineol, 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyklo(2.2.2)oktan; Obr.10) je bicyklický terpenoid, který je součástí EO získávaných z různých rostlinných druhů. Je hlavní složkou EO získaných z listů eukalyptu, například *Eucalyptus smithii*, *E. globulus* Labill, *E. maidenii*, *E. bicostata*, *E. sideroxylon*, *E. cinerea* a *E. leucoxylon*. Eukalyptol je také důležitou složkou EO z jiných rostlin, například z čajovníku (*Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betche) Cheel), rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis* L.), šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*), pelyňku afrického (*Artemisia afra* Willd.), vavřínu vznešeného (*Laurus nobilis* L.) a levandule klasnaté (*Lavandula stoechas* L.) Eukalyptol je bezbarvá kapalina se specifickým aroma, nerozpustná ve vodě, ale rozpustná v ethanolu (Mączka *et al.*, 2021).



Obr. 10 Chemická struktura eukalyptu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw 2022

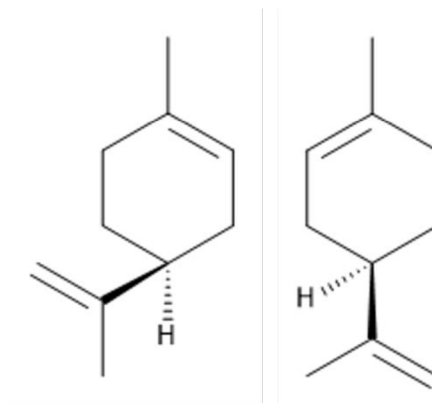
Díky svým vlastnostem se používá v parfumerii, kosmetice, potravinářství, zubních pastách a ústních vodách a v prostředcích pro domácnost (Mączka *et al.*, 2021). Pro své protizánětlivé, mukolytické, antiseptické a antimikrobiální účinky se používá jako složka mnoha léků používaných při různých onemocněních. Například při léčbě bronchitidy, sinusitidy, nebo rýmy. Eukalyptol a EO, které ho obsahují mají mnoho biologických účinků, například antibakteriální, antifungální, antivirové, protizánětlivé, mukolytické a antiseptické (Mączka *et al.*, 2021).

V současné době, kdy je čím dál častější rezistence bakterií na antibiotika, se výzkumy zaměřují na jejich nahrazení nebo doplnění. Eukalyptol má díky svým antibakteriálním vlastnostem potenciál nahradit nebo doplnit antibiotika v kombinovaných léčbách (Mączka *et al.*, 2021).

#### **2.4.9 Limonen**

Limonen (4-isopropenyl-1-methylcyklohexen; Obr. 11) je monocyklický monoterpen. Je to enantiomer a vyskytuje se ve dvou formách L-limonen ((R)-limonen, (-)-limonen a D-limonen ((S)-limonen, (+)-limonen). Dále se limonen může vyskytovat jako racemická směs dipenten. D-limonen je hlavní aktivní formou limonenu (Anandakumar *et al.*, 2021). Je to bezbarvá kapalina s citronovou vůní. Je mírně rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v ethanolu, benzenu nebo třeba v dimethylsulfoxidu. Limonen se také oxiduje při kontaktu se vzduchem a vytváří různé oxidační produkty jako je karvon, oxidy limonenu, karveol a hydroperoxydy limonenu. D-limonen se vyskytuje v EO z kůry citrusů (*Citrus* spp.), jako je citron, pomeranč, grapefruit, limetka a mandarinka (Gupta *et al.*, 2021). L-limonen se vyskytuje v EO z jehlic borovice (*Pinus*) nebo z máty klasné (*Mentha*) (Erasto & Viljoen, 2008)





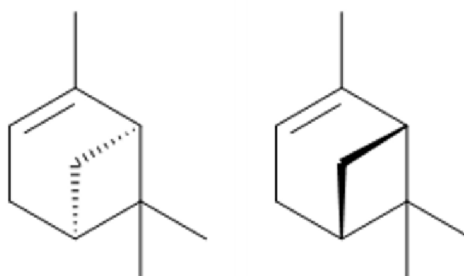
Obr. 11 Chemická struktura L-limonenu a D-limonenu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw 2022.

Limonen se díky svým vlastnostem používá v parfémtech, mýdlech, čistících prostředcích do domácností, v potravinách jako jsou zmrzliny, cukrovinky, žvýkačky, pudinky, a také v nápojích. Dále se používá v petrolejářském průmyslu jako rozpouštědlo a čistící látka. V transdermálních aplikacích léčiv se používá jako přísada ke zvýšení průniku účinné látky. Také se používá jako odmašťovací prostředek před lakováním průmyslových výrobků, nebo jako součást repelentů (Gupta *et al.*, 2021). Díky své bezpečnosti se používá jako výchozí materiál pro syntézu různých přírodních produktů. Má šestičlenný kruh, který lze snadno aromatizovat, což z něj činí vhodnou náhradu toxických aromatických meziproductů jako je benzen a toluen. Limonen je výchozí materiál například pro syntézu p-cymenu (Erasto & Viljoen, 2008). Má mnoho biologických účinků, například antibakteriální, antifungální, antivirové, antibiofilmové (Gupta *et al.*, 2021), antioxidační, protizánětlivé, protirakovinné, antidiabetické, antiglykační, antigenotoxický a gastroprotektivní (Anandakumar *et al.*, 2021).

#### 2.4.10 $\alpha$ -pinen

$\alpha$ -pinen (2,6,6-trimethylbicyklo(3.1.1)hept-2-en; Obr. 12) je bicyklický monoterpen. Je to bezbarvá kapalina s vůní borovice, nerozpustná vodě, ale rozpustná v ethanolu. U pinenu jsou popsány 3 izomery:  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\delta$ -pinen. Každý z těchto izomerů má enantiomerní formy. U  $\alpha$ -pinenu to jsou L- $\alpha$ -pinen ((R)- $\alpha$ -pinen, (-)- $\alpha$ -pinen) a D- $\alpha$ -pinen ((S)- $\alpha$ -pinen, (+)- $\alpha$ -pinen).  $\alpha$ -pinen je hlavním sekundárním metabolitem mnoha EO z jehličnanů, například z borovice lesní (*Pinus sylvestris* L), borovice limby (*Pinus cembra* L), borovice kleče (*Pinus mugo* TURRA) a borovice černé (*Pinus nigra*

J. F. ARNOLD). Dalšími rostlinnými zdroji obsahující  $\alpha$ -pinen jsou EO získané z pepře černého (*Piper nigrum*), jalovce (*Juniperus* spp.) a z konopí setého (*Cannabis sativa* L.) (Allenspach & Steuer, 2021). V průmyslu se  $\alpha$ -pinen používá při syntéze dalších sloučenin, jako je mentol, linalool, geraniol a citronel (Vespermann *et al.*, 2017).  $\alpha$ -pinen má mnoho biologických účinků, například antibakteriální, antifungální, protizánětlivé, antioxidační, neuroprotektivní, gastroprotektivní, protinádorové, insekticidní a nematocidní (Allenspach & Steuer, 2021).



Obr. 12 Chemická struktura L- $\alpha$ -pinenu a D- $\alpha$ -pinenu. Vytvořeno v programu BIOVIA Draw 2022.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 *In vitro* testy antifungální aktivity složek EO

##### 3.1.1.1 Použité chemikálie

D-Glukosa bezvodá (Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Česká republika)

Ethanol 96 %, p.a. (Ing. Petr Švec - PENTA s.r.o., Česká republika)

Sabouraud maltose agar (SMA; HiMedia, Indie)

TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, Německo)

$\alpha$ -pinen (98% čistota; Sigma-Aldrich, Německo)

cinnamaldehyd ( $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich, Německo)

D- karvon ( $\geq 96\%$ , Sigma-Aldrich, Německo)

eukalyptol ( $\geq 99\%$ ; Sigma-Aldrich, Německo)

karvakrol (99%, Sigma-Aldrich, Německo)

L-linalool ( $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich, Německo)

L-mentol ( $\geq 99\%$ ; Sigma-Aldrich, Německo)

L-menton ( $\geq 96\%$ ; Sigma-Aldrich, Německo)

(R)-(+)-limonen (97 %, Sigma-Aldrich, Německo)

thymol ( $\geq 98,5\%$ ; Sigma-Aldrich, Německo)

##### 3.1.1.2 Roztoky a média

###### SMA médium

- 65 g/l SMA média
- 20 g/l glukosa
- Doplnit vodou

###### Zásobní roztoky složek EO

- 100  $\mu$ l složky EO na 1 ml 96% ethanolu (1:10) + pár kapek smáčidla TWEEN 20 (0,01 % [v/v]).

### **3.1.1.3 Použité přístroje**

Autokláv (Biobase, 0T032; Čína)

Flowbox (Telstar MH-100; Španělsko)

Fotoaparát Olympus TG-6 (Olympus, Japonsko).

Laboratorní analytické váhy (Mettler AE 160)

Mikrovlnná trouba (ETA; Česká republika)

### **3.1.1.4 Software pro zpracování výsledků**

Program Statistica (TIBCO Software Inc, Velká Británie)

### **3.1.1.5 Biologický materiál**

*Helminthosporium solani* (CCM F-511; Česká sbírka mikroorganismů, Brno)

## **3.1.2 In vivo testy antifungální aktivity složek EO**

### **3.1.2.1 Použité chemikálie**

2% cinnamaldehyd navázaný na biopolymer dle patentu Matušinský *et al.* (2020)

2% karvakrol navázaný na biopolymer dle patentu Matušinský *et al.* (2020)

cinnamaldehyd ( $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich, Německo)

karvakrol (99%, Sigma-Aldrich, Německo)

thymol ( $\geq 98,5\%$ ; Sigma-Aldrich, Německo)

Destilovaná voda – příprava pomocí přístroje Demiwa 5 ros (WATEK s.r.o., Česká republika)

### **3.1.2.2 Použité přístroje**

Exsikátory (Super-Star-Desiccator, Sicco, Německo)

Fotoaparát Olympus TG-6 (Olympus, Japonsko).

### **3.1.2.3 Software pro zpracování výsledků**

Program ImageJ 1.53e (freeware, <https://imagej.net/software/imagej/>)

### **3.1.2.4 Biologický materiál**

*Solanum tuberosum* odrůda „Belana“ (Česká republika)

### **3.1.3 Optimalizace detekce *H. solani* pomocí real-time PCR**

#### **3.1.3.1 Použité chemikálie**

DNase/RNase Free dH<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich; Německo)

Ethanol 96 % (Sigma-Aldrich, Německo)

FastStart Universal Probe Master (ROX; Roche Diagnostics; Německo)

FastStart Universal SYBR Green Master (ROX; Roche Diagnostics; Německo)

GenElute<sup>TM</sup> Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich; Německo)

Forward primer HsTqF1 (Generi Biotech,s.r.o.; Česká republika)

Reverse primer HsTqR1 (Generi Biotech,s.r.o.; Česká republika)

TaqMan sonda HsTqP1 (Generi Biotech,s.r.o.; Česká republika)

RNase A Solution (Sigma Aldrich; Německo)

Tekutý dusík (Messer Technogas s. r. o., Česká republika)

#### **3.1.3.2 Použité přístroje**

Centrifuga (HETTICH EBA 12R; Německo)

Inkubátor pro suchou lázeň (Major Science; Tchaj-wan)

Minicentrifuga (Biosan Multi-Spin MSC-6000; Lotyšsko)

Spektrofotometr (Perkin Elmer MBA 2000; USA)

Termocykler Mx3005P<sup>TM</sup> (STRATAGENE; USA)

Vortex TK3S (Techno Kartell; Itálie)

#### **3.1.3.3 Biologický materiál**

*Helminthosporium solani* (CCM F-511; Česká sbírka mikroorganismů, Brno)

DNA vyizolovaná z *Rhizoctonia solani* (Čistá kultura z hlízy se sklerocii, odrůda „Red Anna“) – negativní kontrola

## 3.2 Metody

### 3.2.1 *In vitro* testy antifungální aktivity složek EO

#### 3.2.1.1 Diskový difúzní test

S houbou *Helminthosporium solani* bylo zacházeno ve sterilních podmínkách ve flowboxu. Antifungální aktivita jednotlivých složek EO byla hodnocena *in vitro* pomocí diskového difúzního testu. U testovaných složek EO byly připraveny zásobní roztoky a to zředěním 96% ethanolem (1:10) a přidáním několika kapek TWEEN 20 (0,01 % [v/v]). Takto připravené zásobní roztoky byly v příslušných objemech (tab. 1) přidány do sterilizovaného SMA média při teplotě v rozmezí 40–45 °C. Pro hodnocení účinnosti složek EO byly použity koncentrace 0, 100, 200, 400, 800 a 1600 ppm. Následně byly roztoky SMA důkladně promíchány a nality na Petriho misky o průměru 90 mm (20ml/miska). Inokulum bylo získáno ze tří týdnů starých kultur *H. solani*. Z těchto kultur byly pomocí sterilního korkovrtu vyříznuty 6 mm disky s inokulem *H. solani*, a přeneseny do středu připravených Petriho misek a následně utěsněny parafilmem. U každé koncentrace byly připraveny tři opakování a jako kontroly byly použity Petriho misky pouze s médiem SMA. Takto připravené Petriho misky byly inkubovány po dobu tří týdnů při teplotě 25 ± 1 °C.

Tab. 1 Objem (μl) zásobních roztoků α-pinenu, cinnamaldehydu, D-karvonu, eukalyptolu, karvakrolu, L-linaloolu, L-mentolu, L-mentonu, (R)-(+)-limonen a thymolu přidáných do SMA média pro koncentrace 100, 200, 400 800 a 1600 ppm.

	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>800</b>	<b>1600</b>
<b>α-pinén</b>	102	204	408	816	1633
<b>Cinnamaldehyd</b>	105	211	421	842	1684
<b>D- karvon</b>	104	208	417	833	1667
<b>Eukalyptol</b>	101	202	404	808	1616
<b>Karvakrol</b>	101	202	404	808	1616
<b>L-linalool</b>	101	202	404	808	1616
<b>L-mentol</b>	101	202	404	808	1616
<b>L-menton</b>	104	208	417	833	1667
<b>(R)-(+)-limonen</b>	103	206	412	825	1649
<b>Thymol</b>	102	203	406	812	1624

Následně byly změřeny průměry kolonií hub (cm) při různých koncentracích jednotlivých složek EO a byla stanovena inhibiční koncentrace (IC). IC se podle Albuquerque *et al.* (2006) vypočítá:  $IC = [(CFc - CFt) / CFc] \times 100$ , kde CFc je průměr kontrolní neošetřené houbové kolonie a CFt je průměr houbové kolonie ošetřené složkou EO. IC se udává v procentech. Také byla stanovena polovina maximální inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>). IC<sub>50</sub> je hodnota koncentrace vytvářející 50% inhibiční účinek. Podle Chang *et al.*, (2008) se IC<sub>50</sub> graficky odvozuje z dávkových křivek a z odezvy na základě měření s různými koncentracemi. Dále byl určen fungistatický a fungicidní účinek složky EO na *H. solani* a to hodnotami minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální fungicidní koncentrace (MFC). Podle Plodpai *et al.* (2013) se hodnoty MIC určují jako nejnižší koncentrace, při které složka EO zcela inhibuje růst houby po inkubaci. Podle Plodpai *et al.* (2013) se hodnoty MFC určují jako nejnižší koncentrace, při které nebyl zaznamenán žádný růst kolonií houby na čerstvém SMA médiu po subkultivaci. MFC bylo stanoveno přenesením inhibované houby *H. solani* na agarových discích (v Petriho miskách ošetřených koncentracemi složek EO vyššími než MIC) do čerstvého SMA média bez složek EO. Subkultivované *H. solani* bylo inkubováno tři týdny při teplotě  $25 \pm 1$  °C a následně bylo vyhodnoceno obnovení růstu *H. solani* a určena hodnota MFC.

Dále byly připraveny doplňkové koncentrace k jednotlivým složkám EO (tab.2–7). Tyto doplňkové koncentrace složek EO byly určeny podle jejich inhibičního účinku na růst *H. solani*. Také byla provedena kombinace nejúčinnějších složek EO (tab.8–9). Byl kombinován thymol s karvakrolem v koncentracích 12,5 ppm thymol s 37,5 ppm karvakrolem, 12,5 ppm karvakrolu s 37,5 ppm thymolem, 25 ppm thymol s 25 ppm karvakrolem a 50 ppm thymol s 50 ppm karvakrolem. Následně byl kombinován thymol s cinnamaldehydem a to v koncentracích 50 ppm thymolu s 50 ppm cinnamaldehydu, 25 ppm thymolu s 75 ppm cinnamaldehydu a 75 ppm thymolu s 25 ppm cinnamaldehydu. A jako poslední byla provedena kombinace karvakrolu a cinnamaldehydu a to v koncentracích 50 ppm karvakrolu s 50 ppm cinnamaldehydu, 25 ppm karvakrolu s 75 ppm cinnamaldehydu a 75 ppm karvakrolu s 25 ppm cinnamaldehydu.

Tab. 2 Objem ( $\mu\text{l}$ ) zásobního roztoku thymolu a karvakrolu přidaného do SMA média pro koncentrace 20, 40, 60, 80 a 100 ppm.

	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b>Thymol</b>	20	41	61	81	102
<b>Karvakrol</b>	20	40	61	81	101

Tab. 3 Objem ( $\mu\text{l}$ ) zásobního roztoku cinnamaldehydu přidaného do SMA média pro koncentrace 100, 120, 140, 160 a 180 ppm.

	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>140</b>	<b>160</b>	<b>180</b>
<b>Cinnamaldehyd</b>	105	126	147	168	190

Tab. 4 Objem ( $\mu\text{l}$ ) zásobního roztoku L-linaloolu, D-karvonu a L-mentolu přidaného do SMA média pro koncentrace 200, 300, 350, 400 a 450 ppm.

	<b>200</b>	<b>300</b>	<b>350</b>	<b>400</b>	<b>450</b>
<b>L-linalool</b>	202	303	354	404	455
<b>D-karvon</b>	208	313	365	417	469
<b>L-mentol</b>	202	303	354	404	455

Tab. 5 Objem ( $\mu\text{l}$ ) zásobního roztoku L-mentonu přidaného do SMA média pro koncentrace 400, 500, 600, 700 a 800 ppm.

	<b>400</b>	<b>500</b>	<b>600</b>	<b>700</b>	<b>800</b>
<b>L-menton</b>	417	521	625	729	833

Tab. 6 Objem ( $\mu\text{l}$ ) zásobního roztoku eukalyptolu přidaného do SMA média pro koncentrace 800, 1000, 1200, 1400 a 1600 ppm.

	<b>800</b>	<b>1000</b>	<b>1200</b>	<b>1400</b>	<b>1600</b>
<b>Eukalyptol</b>	808	1010	1212	1414	1616

Tab. 7 Objem ( $\mu\text{l}$ ) zásobního roztoku (R)-(+)-limonenu a  $\alpha$ -pinenu přidaného do SMA média pro koncentrace 3200, 4500, 5500, 6000 a 6400 ppm.

	<b>3200</b>	<b>4500</b>	<b>5500</b>	<b>6000</b>	<b>6400</b>
<b>(R)-(+)-limonen</b>	3299	4639	5670	6186	6598
<b><math>\alpha</math>-pinen</b>	3265	4592	5612	6122	6531



Tab. 8 Objem ( $\mu\text{l}$ ) zásobních roztoků thymolu a karvakrolu při kombinaci složek EO.

	<b>12,5</b>	<b>25</b>	<b>37,5</b>	<b>50</b>
<b>Thymol</b>	12,7	25,4	38,1	51,0
<b>Karvakrol</b>	12,6	25,3	37,9	51,0

Tab. 9 Objem ( $\mu\text{l}$ ) zásobních roztoků thymolu a karvakrolu a cinnamaldehydu při kombinaci složek EO.

	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>75</b>
<b>Thymol</b>	25,4	51,0	76,1
<b>Karvakrol</b>	25,3	51,0	75,8
<b>Cinnamaldehyd</b>	26,3	52,6	78,9

### 3.2.2 *In vivo* testy antifungální aktivity složek EO

#### 3.2.2.1 Fumigace hlíz složkami EO

Pomocí *in vivo* testu fumigace (vliv par složek EO) byla ověřena antifungální aktivita karvakrolu, thymolu a cinnamaldehydu. Tento experiment probíhal v exsikátorech s využitelným objemem 42 l a celkovým objemem 45 l. Do těchto exsikátorů byly umístěny plata na vajíčka, do kterých se následně vložila hlíza. Fumigační účinek na *H. solani* těchto tří složek EO byl prováděn na hlízách bramboru ( $n = 7$ ) o velikosti 35–45 mm odrůdy „Belana“. Jedná se o ranou konzumní odrůdu. Hlízy pro pokus byly zakoupeny v supermarketu. Vykazovaly mírné příznaky stříbřitosti slupky bramboru (přirozená infekce). Před aplikací složek EO byly pořízeny fotografie (Olympus TG-6). Do exsikátoru byly rovnoměrně rozleženy plata od vajíček, do kterých se následně umístili hlízy. Následně byly do exsikátoru umístěny Petriho misky s celulózou, na kterou bylo nanášeno 4,2 ml čisté složky EO. Thymol se nachází v krystalické formě, proto bylo požito 4,2 g ( $100 \text{ ml/m}^3$ ). Pro získání požadované vlhkosti byly plata a filtrační papír pod Petriho miskami navlhčen destilovanou vodou. Každá varianta byla provedena ve třech opakováních. V experimentu byla také zahrnuta kontrola bez aplikace složek EO. Experiment probíhal 60 dní při teplotě 10–15 °C a relativní vlhkosti 99 %. Po 60 dnech inkubace byly tyto hlízy znovu vyfoceny a experiment byl vyhodnocen. Intenzita infekce hlíz byla následně vyhodnocena pomocí programu ImageJ 1.53e. Účinnost thymolu, karvakrolu a cinnamaldehydu byla stanovena jako rozdíl v intenzitě infekce hlíz před a po jejich aplikaci.

### 3.2.2.2 Moření hlíz složkami EO

Pomocí *in vivo* testu moření hlíz složkami EO byl studován růst *H. solani*. Při tomto experimentu byly opět použity hlízy ( $n = 7$ ) odrůdy „Belana“ o velikosti 35–45 mm s mírnými příznaky stříbřitosti slupek bramboru (přirozená infekce). Pro tento pokus byl použit cinnamaldehyd a karvakrol. Tyto složky EO byly pro větší účinnost a stabilitu navázány na biopolymer dle patentu Matušinský *et al.* (2020). Podstatou patentu je, že vytvořený fungicidní prostředek obsahuje stabilní formu EO v podobě mikrokapiček EO (složek EO). Tyto mikrokapičky jsou uzavřeny v obalu tvořeném biopolymerem. Biopolymer obsahuje želatinu a chitosan v poměru 3:10. Ve sto mililitrech fungicidního přípravku je obsaženo 0,5–1,5 ml EO (složky EO), 9,5–8,5 ml řepkového oleje na ředění EO (složek EO), 0,2 ml polyethylenglykol sorbitanu monooleátu, 13,3 ml biopolymeru vytvářejícího obal mikrokapiček a 76,5 ml 0,5% hmotnostního roztoku trypolyfosfátu sodného. Hlízy bramboru byly na 2 sekundy ponořeny do 2% roztoku složek EO. Tyto hlízy byly umístěny na filtrační papír nasycený destilovanou vodou (150 ml) v uzavíratelných plastových boxech o objemu 30 l. Každá experimentální varianta byla provedena ve třech opakování a do experimentu byla zahrnuta kontrola neboli varianta bez ošetření složkami EO. Plastové boxy byly uzavřeny a umístěny do skladu při teplotě 10–15 °C a relativní vlhkosti 99 %. *In vivo* pokus probíhal 60 dní. Na začátku a na konci pokusu byly pořízeny fotografie pro následné stanovení rozsahu intenzity infekce hlíz (závažnost onemocnění). Rozsah infekce byl hodnocen pomocí programu ImageJ 1.53e. Účinnost použitých složek EO byla stanovena jako rozdíl v intenzitě infekce hlíz před a po jejich aplikaci.

### 3.2.3 Optimalizace detekce *H. solani* pomocí real-time PCR

#### 3.2.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA *H. solani* byla provedena pomocí kitu GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep. Nejprve byly odebrány vzorky ze slupky hlíz brambor (odrůda „Belana“) a z mycelia standardu *H. solani* (tab. 10). Tyto vzorky byly přeneseny do třetí misky nachlazené tekutým dusíkem a rozetřeny tloučkem, nachlazeným tekutým dusíkem, na jemný prášek. Homogenát byl přenesen do mikrozkušavky s 350 µl lyzačního roztoku (část A), 50 µl lyzačního roztoku (část B) a 1,5 µl RNase (40U). Směs byla důkladně promíchána na vortexu. Směs byla dále inkubována při 75 °C po dobu 30 minut, během inkubace byl pelet rozvolňován pomocí pipety a občasným převrácením. Po inkubaci bylo přidáno 130 µl srážecího roztoku, tato směs byla následně promíchána převrácením

mikrozkumavky a umístěna na led po dobu 5 minut. Následně byla směs centrifugována 5 minut při otáčkách  $16000 \times g$  pro vytvoření pelety zbytků buněk, proteinů a polysacharidů. Supernatant byl opatrně přelit do filtrační kolonky (GenElute filtration column) a následně byl centrifugován 1 minutu při otáčkách  $16000 \times g$ . Filtrační kolonka byla vyhozena a k filtrátu bylo přidáno 700  $\mu$ l vazebného roztoku a došlo k promíchání směsi otáčením mikrozkumavky. Dále byla připravena vazebná kolonka, a to vložením GenElute Miniprep Binding Column do mikrozkumavky, přidáním 500  $\mu$ l roztoku pro přípravu kolonky, centrifugací při otáčkách  $12\ 000 \times g$  po dobu 1 minuty a vylitím filtrátu. Polovina filtrátu s vazebným roztokem byla opatrně přepipetována na vazebnou kolonku a centrifugován při otáčkách  $16\ 000 \times g$  po dobu 1 minuty, filtrát byl následně vylit. Druhá polovina filtrátu s vazebným roztokem byla také opatrně přepipetována do stejné vazebné kolonky. Dále byla směs centrifugována při otáčkách  $16\ 000 \times g$  po dobu 1 minuty a filtrát byl opět vylit. Následně bylo přidáno 500  $\mu$ l promývací roztoku na kolonku. Promývací roztok byl připraven přidáním 96 % ethanolu do koncentráту promývací roztoku v poměru 1,03 (96 % ethanol):0,43 (koncentrát promývacího roztoku) na jeden vzorek. Tato směs byla centrifugována při otáčkách  $16\ 000 \times g$  po dobu 1 minuty a filtrát byl vylit. Na kolonku s navázanou DNA byl opět přidán promývací roztok a centrifugován při otáčkách  $16\ 000 \times g$  po dobu 3 minut, aby došlo k vysušení kolonky. Filtrát byl poté opatrně vylit, aby se nedostal do kontaktu s kolonkou, dále byl setřen filtrát na vnější straně kolonky. Poté byla kolonka s membránou přenesena do nové sterilní mikrozkumavky, ke které bylo následně přidáno 100  $\mu$ l předehřátého (65 °C) elučního pufu (Elution Solution) přímo na střed membrány a centrifugováno při otáčkách  $16\ 000 \times g$  po dobu 1 minuty. Kolonka s membránou byla vyhozena a vyizolovaná DNA byla uschována pro další použití.

Tab. 10 Vzorky pro izolaci DNA z *H. solani*

Vzorek	
Vzorek č. 1	Mycelium <i>H. solani</i> standart (CCM F-511)
Vzorek č. 2	Mycelium <i>H. solani</i> standart (CCM F-511)
Vzorek č. 3	<i>H. solani</i> z hlízy (odřůda „Belana“)
Vzorek č. 4	<i>H. solani</i> z hlízy (odřůda „Belana“)
Vzorek č. 5	<i>H. solani</i> z hlízy (odřůda „Belana“)

### 3.2.3.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty vyizolované DNA

Koncentrace a čistota vyizolované DNA *H. solani* byla stanovena pomocí spektrofotometru Perkin Elmer MBA 2000. Jako slepý vzorek byla použita DNase/RNase Free dH<sub>2</sub>O. Každý vzorek vyizolované DNA byl pro měření na spektrofotometru naředěn desetkrát. U každého vzorku byla změřena koncentrace vyizolované DNA *H. solani* a byl stanoven poměr A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> pro posouzení čistoty jednotlivých vzorků vyizolované DNA *H. solani*.

### 3.2.3.3 Detekce *H. solani* pomocí real-time PCR

Používané chemikálie a vzorky DNA byly rozmrazeny těsně před použitím a uchovávány na ledu při 0 °C. Před použitím byly promíchány zvortexováním a bylo s nimi manipulováno za sterilních podmínek. Primery a sonda byly naředěny na pracovní koncentraci 10 μM pomocí RNase-free dH<sub>2</sub>O. Sekvence použitých primerů (tab. 11) pro detekci *H. solani* pomocí Sybr Green a TaqMan real-time PCR byla převzata od Cullen *et al.* (2001). Sekvence sondy (tab. 12) pro TaqMan real-time PCR byla také převzata od Cullen *et al.* (2001).

Tab. 11 Sekvence primerů použitých při real-time PCR dle Cullen *et al.* (2001).

Primer	Sekvence primeru (5'-3')
HsTqF1	GTTTCAGCGGCCGCAAG
HsTqR1	TTCAGATACAAGGGTTTAAGGGATTC

Tab. 12 Sekvence sondy použitá při TaqMan real-time PCR dle Cullen *et al.* (2001).

Sonda	Sekvence sondy (5'-3')
HsTqP1	TCGGAACCCTCTGTCTACCTGTA CCACTTGTT

### 3.2.3.4 Detekce *H. solani* pomocí Sybr Green real-time PCR

Detekce *H. solani* byla provedena pomocí kitu FastStart Universal SYBR Green Master pro Sybr Green real-time PCR. Nejprve byl připraven reakční mix (tab. 13) pro Sybr Green real-time PCR. Tento reakční mix byl dále napipetován do jamky na destičku (96 jamek). K této reakční směsi bylo přidáno 2  $\mu$ l naředěné DNA hodnoceného vzorku. Také byl připraven slepý vzorek (NTC), kde bylo k premixu přidáno 2  $\mu$ l DNase/RNase Free dH<sub>2</sub>O. Následně byla připravena i negativní kontrola, kde bylo k premixu přidáno 2  $\mu$ l DNA *Rhizoctonia solani*. Nakonec byly nastaveny podmínky Sybr Green real-time PCR (tab. 14). Pro vzorek č. 2 byla připravena ředící řada. DNA *H. solani* z mycelia byla naředěna následovně: 1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>.

Tab. 13 Reakční mix pro jednu Sybr Green real-time PCR reakci (25  $\mu$ l).

Složka	Objem ( $\mu$ l)
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	12,5
Primer HsTqF1 (10 $\mu$ M)	0,75 (300 nM)
Primer HsTqR1 (10 $\mu$ M)	0,75 (300 nM)
PCR-grade dH <sub>2</sub> O	9,0
DNA (ng/ $\mu$ l)	2,0

Tab. 14 Program termocyklieru pro Sybr Green real-time PCR.

Krok	Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas
1. Počáteční denaturace	1	95	10 min
2. Denaturace		95	15 s
3. „Annealing“	40	60	60 s
4. Elongace		72	5 s
		95	30 s
5. Melting analýza	1	60	60 s
		95	30 s

### 3.2.3.5 Detekce *H. solani* pomocí TaqMan real-time PCR

Detekce *H. solani* byla provedena pomocí kitu FastStart Universal Probe Master pro TaqMan real-time PCR. Nejprve byl připraven reakční mix (tab. 15) pro TaqMan real-time PCR. Tento reakční mix byl dále napipetován do jamky na destičku (96 jamek). K této reakční směsi bylo přidáno 2  $\mu$ l naředěné DNA hodnoceného vzorku. Také byl připraven slepý vzorek (NTC), kde bylo místo DNA vzorku přidáno 2  $\mu$ l DNase/RNase Free dH<sub>2</sub>O. Následně byla připravena i negativní kontrola, kde bylo místo DNA vzorku přidáno 2  $\mu$ l DNA *R. solani*. Nakonec byly nastaveny podmínky TaqMan real-time PCR (tab. 16). Pro vzorek č. 2 byla připravena ředící řada. DNA *H. solani* z mycelia byla naředěna následovně: 1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>.

Tab. 15 Reakční mix pro jednu TaqMan real-time PCR reakci (25  $\mu$ l).

Složka	Objem ( $\mu$ l)
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	12,5
Primer HsTqF1 (10 $\mu$ M)	0,75 (300 nM)
Primer HsTqR1 (10 $\mu$ M)	0,75 (300 nM)
Sonda HsTqP1 (10 $\mu$ M)	0,5 (200 nM)
PCR-grade dH <sub>2</sub> O	6,75
DNA (ng/ $\mu$ l)	2,0

Tab. 16 Program termocyklieru pro TaqMan real-time PCR.

Krok	Počet cyklů	Teplota [°C]	Čas
1. Počáteční denaturace	1	95	15 min
2. Denaturace		95	15 s
3. „Annealing“	40	60	60 s
4. Elongace		72	10 s

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1.1 *In vitro* testy antifungální aktivity složek EO

#### 4.1.1.1 Diskový difúzní test

Pro jednotlivé složky EO byl změřen a určen průměr kultur *H. solani* ze tří nezávislých opakování (tab. 17). Dále byly vypočítány a stanoveny hodnoty IC, IC<sub>50</sub>, MIC a MFC (tab. 18). Z výsledků vyplývá, že všechny použité složky EO byly schopny inhibovat růst *H. solani*. Například při koncentraci 100 ppm složky EO inhibovaly růst *H. solani* v rozmezí od 3,1 % do 100 % (tab. 19). Nejvyšší inhibiční účinek na patogenní houbu *H. solani* byl pozorován u thymolu (obr. 13; tab. 20), karvakrolu (obr. 14; tab. 20) a cinnamaldehydu (obr. 15; tab. 21). Díky nejlepším inhibičním účinkům byly tyto tři složky EO vybrány pro další *in vivo* pokusy. Dále měl dobrý inhibiční účinek L-mentol (obr. 16; tab. 22) a D-karvon (obr. 17; tab. 22). Horší inhibiční účinek *H. solani* vykázal L-linalool (obr. 18; tab. 22), L-menton (obr. 19; tab. 23) a eukalyptol (obr. 20; tab. 24). Nejnižší inhibiční účinek na patogenní houbu *H. solani* byl pozorován u  $\alpha$ -pinenu (obr. 21; tab. 25) a (R)-(+)-limonenu (obr. 22; tab. 25). Kombinace thymolu a karvakrolu, thymolu a cinnamaldehydu, karvakrolu cinnamaldehydu (tab. 26) neměla synergický ani antagonistický účinek.

Tab. 17 Průměry kultur *H. solani* (cm) při koncentracích složek OE 0-100 ppm. Hodnoty jsou průměry ze třech opakování pro každou koncentraci složky EO.

	0	100	200	400	800	1600
$\alpha$ -pinen	4,43	4,10	3,77	3,63	3,13	2,00
Cinnamaldehyd	3,83	0,50	0	0	0	0
D- karvon	3,47	2,63	2,10	0	0	0
Eukalyptol	3,90	3,63	2,66	2,53	1,57	0
Karvakrol	4,00	0	0	0	0	0
L-linalool	3,63	2,13	1,83	0,27	0	0
L-mentol	1,73	1,07	0,63	0	0	0
L-menton	2,30	2,07	1,97	1,13	0	0
(R)-(+)-limonen	4,23	4,10	3,93	3,63	2,90	2,07
Thymol	2,83	0	0	0	0	0

Tab. 18 Antifungální aktivita složek EO: EO IC50, MIC a MFC (ppm).

	<b>IC50</b>	<b>MIC</b>	<b>MFC</b>
<b><math>\alpha</math>-pinen</b>	1600	3200	3400
<b>cinnamaldehyd</b>	60	120	120
<b>D- karvon</b>	175	350	350
<b>eukalyptol</b>	700	1400	1700
<b>karvakrol</b>	40	80	100
<b>L-linalool</b>	225	450	500
<b>L-mentol</b>	125	250	250
<b>L-menton</b>	300	600	600
<b>(R)-(+)-limonen</b>	1600	3200	3300
<b>thymol</b>	40	80	80

Tab. 19 Hodnoty IC pro každou koncentraci složky EO (ppm). Hodnoty IC jsou v procentech. Průměrné hodnoty ve sloupci sdílející stejný horní index se na základě Tukeyho HSD testu vzájemně významně neliší ( $p < 0,01$ ).

	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>800</b>	<b>1600</b>
<b><math>\alpha</math>-pinen</b>	0	7,4 <sup>cd</sup>	14,9 <sup>de</sup>	18,1 <sup>c</sup>	29,3 <sup>b</sup>	54,9 <sup>b</sup>
<b>cinnamaldehyd</b>	0	86,9 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
<b>D- karvon</b>	0	24,2 <sup>bc</sup>	39,5 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
<b>eukalyptol</b>	0	6,9 <sup>cd</sup>	31,8 <sup>cd</sup>	35,1 <sup>c</sup>	59,7 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
<b>karvakrol</b>	0	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
<b>L-linalool</b>	0	41,3 <sup>b</sup>	49,6 <sup>bc</sup>	92,6 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
<b>L-mentol</b>	0	38,2 <sup>b</sup>	63,6 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
<b>L-menton</b>	0	10 <sup>cd</sup>	14,3 <sup>de</sup>	50,9 <sup>bc</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
<b>(R)-(+)-limonen</b>	0	3,1 <sup>d</sup>	7,1 <sup>e</sup>	14,2 <sup>c</sup>	31,4 <sup>b</sup>	51,1 <sup>b</sup>
<b>thymol</b>	0	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

Tab. 20 Průměry kultur *H. solani* (cm). Hodnoty jsou průměry ze třech opakování pro koncentrace thymolu a karvakrolu (ppm).

	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>
<b>Thymol</b>	3,60	3,53	1,43	0,47	0	0
<b>Karvakrol</b>	3,50	3,37	2,50	1,10	0	0

Tab. 21 Průměry kultur *H. solani* (cm). Hodnoty jsou průměry ze třech opakování pro koncentrace cinnamaldehydu (ppm).

	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>140</b>	<b>160</b>	<b>180</b>
<b>Cinnamaldehyd</b>	3,80	0	0	0	0	0



Tab. 22 Průměry kultur *H. solani* (cm). Hodnoty jsou průměry ze třech opakování pro koncentrace L-linaloolu, D-karvonu a L-mentolu (ppm).

	<b>0</b>	<b>200</b>	<b>300</b>	<b>350</b>	<b>400</b>	<b>450</b>
<b>L-linalool</b>	4,36	3,83	2,10	1,00	0	0
<b>D-karvon</b>	3,80	2,10	1,47	0	0	0
<b>L-mentol</b>	3,93	0,63	0	0	0	0

Tab. 23 Průměry kultur *H. solani* (cm). Hodnoty jsou průměry ze třech opakování pro koncentrace L-mentonu (ppm).

	<b>0</b>	<b>400</b>	<b>500</b>	<b>600</b>	<b>700</b>	<b>800</b>
<b>L-menton</b>	3,83	2,22	0,53	0	0	0

Tab. 24 Průměry kultur *H. solani* (cm). Hodnoty jsou průměry ze třech opakování pro koncentrace eukalyptu (ppm).

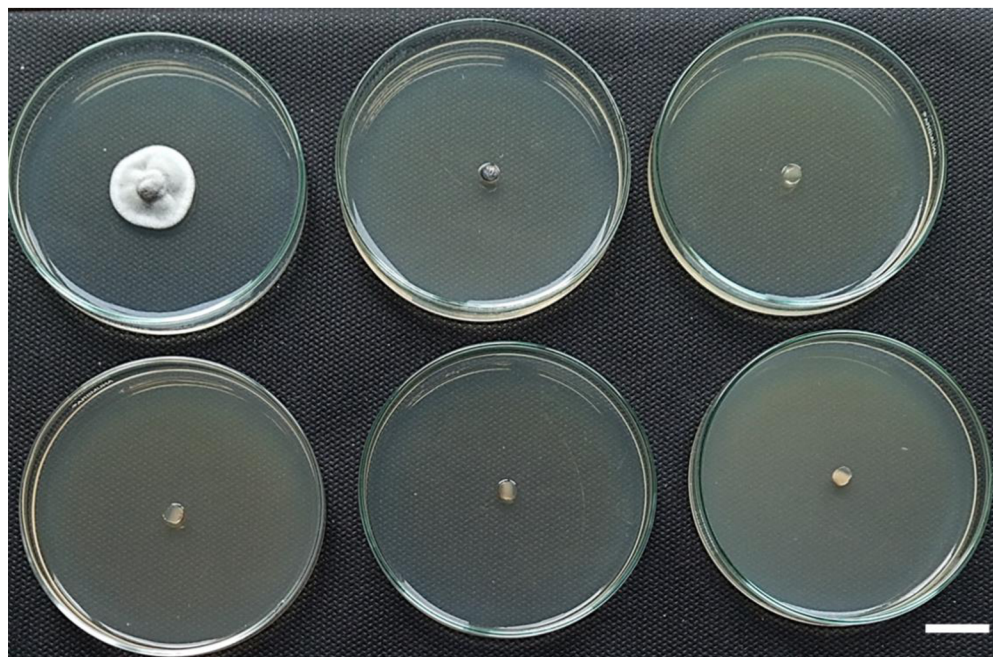
	<b>0</b>	<b>800</b>	<b>1000</b>	<b>1200</b>	<b>1400</b>	<b>1600</b>
<b>Eukalyptol</b>	3,83	1,60	0,73	0,50	0	0

Tab. 25 Průměry kultur *H. solani* (cm). Hodnoty jsou průměry ze třech opakování pro koncentrace (R)-(+)-limonen a  $\alpha$ -pinenu (ppm).

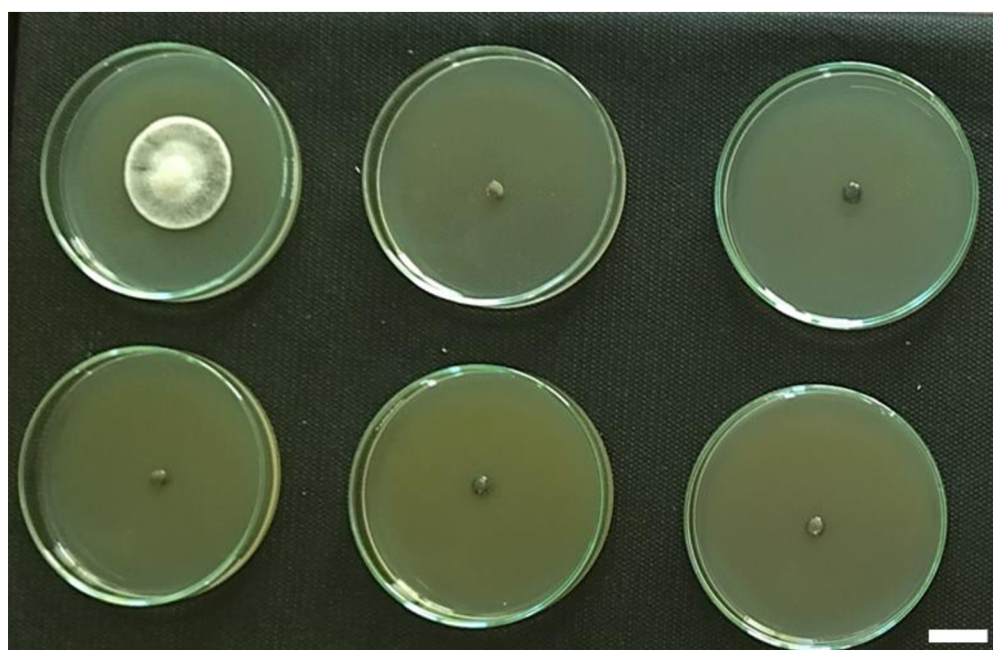
	<b>0</b>	<b>3200</b>	<b>4500</b>	<b>5500</b>	<b>6000</b>	<b>6400</b>
<b>(R)-(+)-limonen</b>	2,53	0	0	0	0	0
<b><math>\alpha</math>-pinen</b>	2,53	0	0	0	0	0

Tab. 26 Průměry kultur *H. solani* (cm). Hodnoty jsou průměry ze tří opakování pro každou kombinaci koncentrací složek EO (ppm).

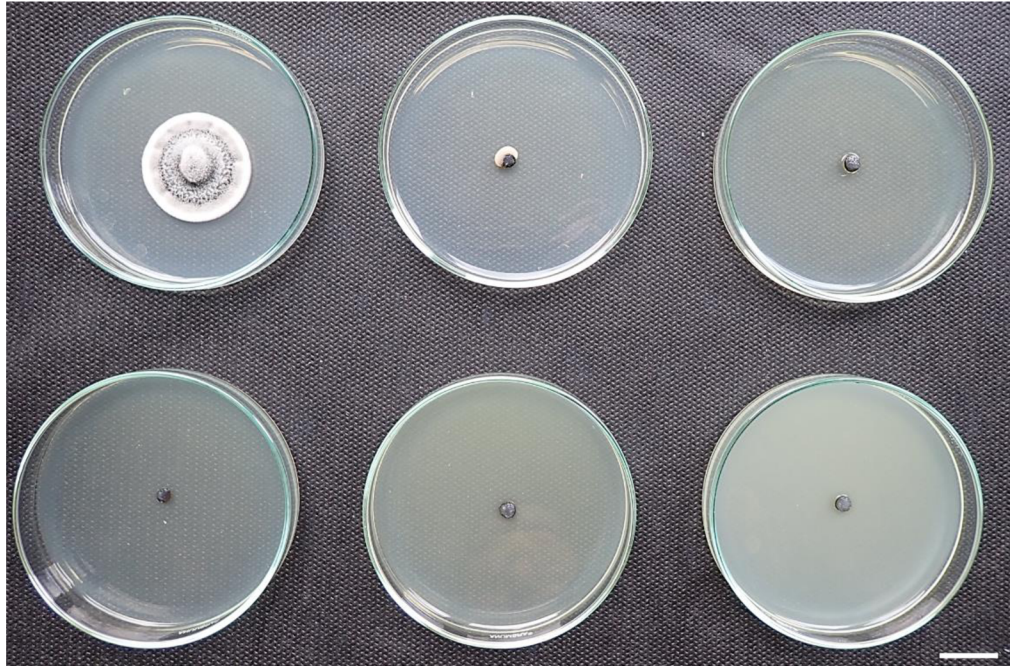
<b>Kombinace koncentrací složek EO</b>	<b>(cm)</b>
<b>12,5 thymol+ 37,5 karvakrol</b>	0,7
<b>37,5 thymol + 12,5 karvakrol</b>	1,5
<b>25 thymol + 25 karvakrol</b>	1,1
<b>50 thymol + 50 karvakrol</b>	0
<b>50 thymol + 50 cinnamaldehyd</b>	0
<b>25 thymol + 75 cinnamaldehyd</b>	0
<b>75 thymol + 25 cinnamaldehyd</b>	0
<b>50 karvakrol + 50 cinnamaldehyd</b>	0
<b>25 karvakrol + 75 cinnamaldehyd</b>	0
<b>75 karvakrol + 25 cinnamaldehyd</b>	0



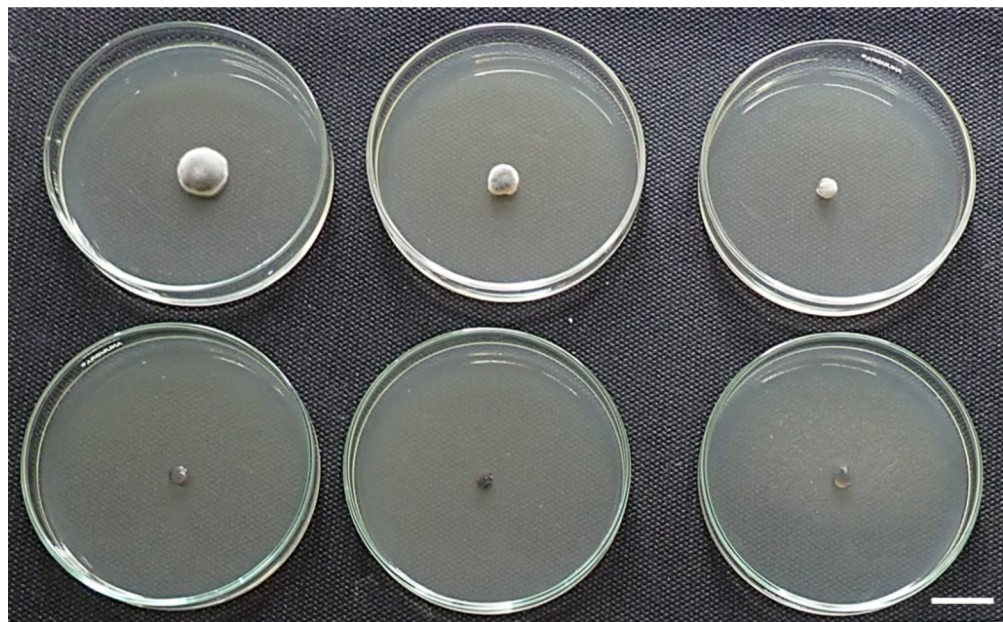
Obr. 13 *H. solani* na SMA médiu s přidavkem thymolu o koncentraci 0-100-200-400-800-1600 ppm. Měřítko je 2 cm.



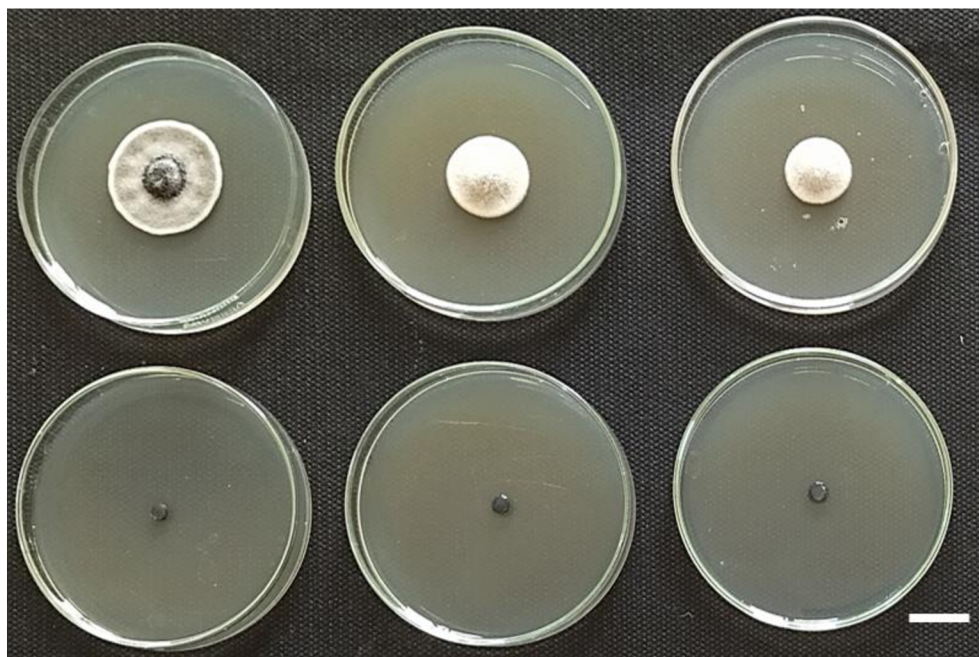
Obr. 14 *H. solani* na SMA médiu s přidavkem karvakrolu o koncentraci 0-100-200-400-800-1600 ppm. Měřítko je 2 cm.



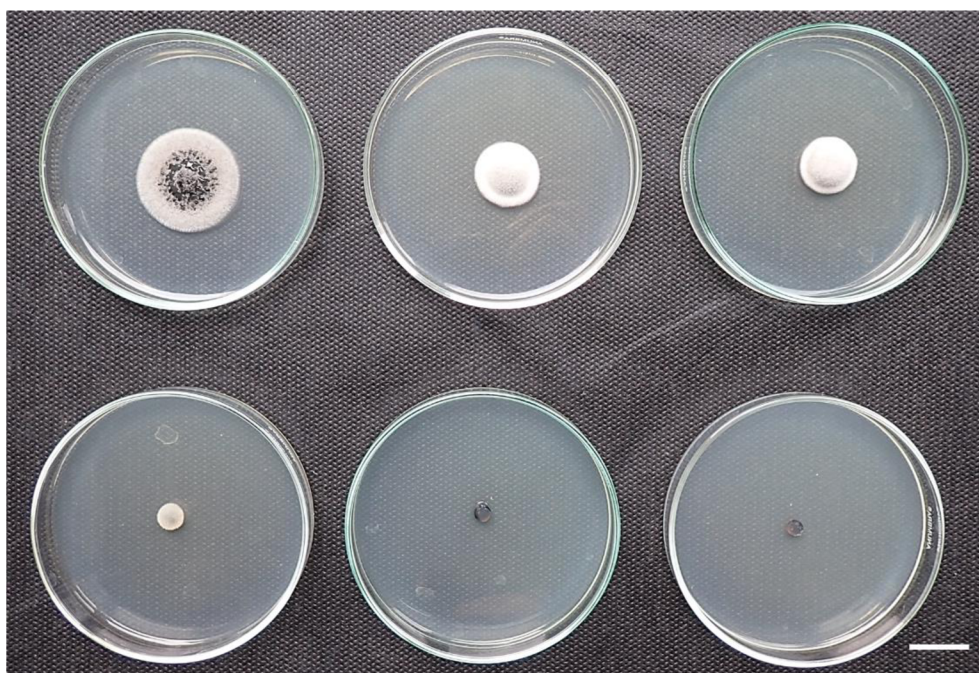
Obr. 15 *H. solani* na SMA médiu s přidavkem cinnamaldehydu o koncentraci 0-100-200-400-800-1600 ppm. Měřítka je 2 cm.



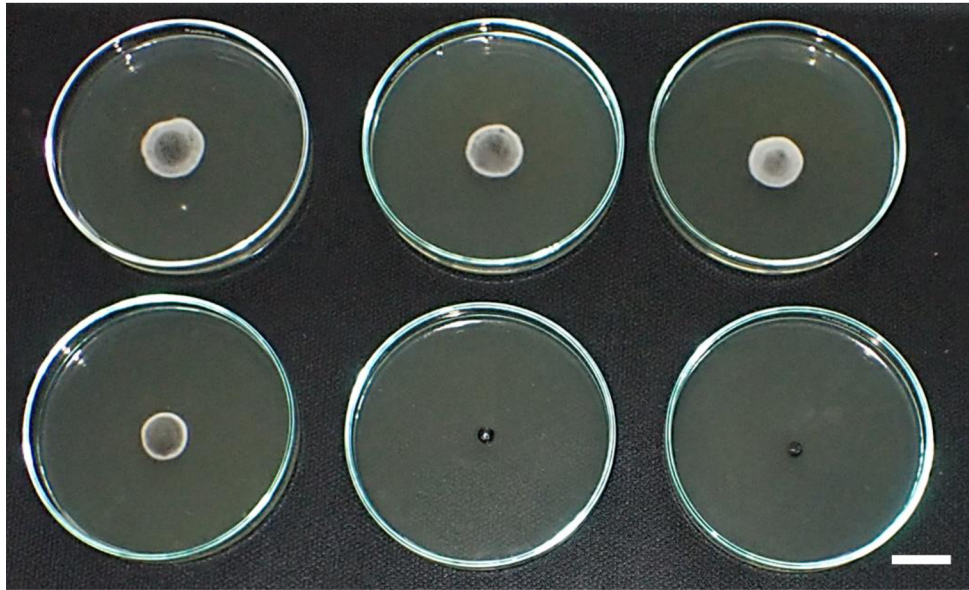
Obr. 16 *H. solani* na SMA médiu s přidavkem L-mentolu o koncentraci 0-100-200-400-800-1600 ppm. Měřítka je 2 cm.



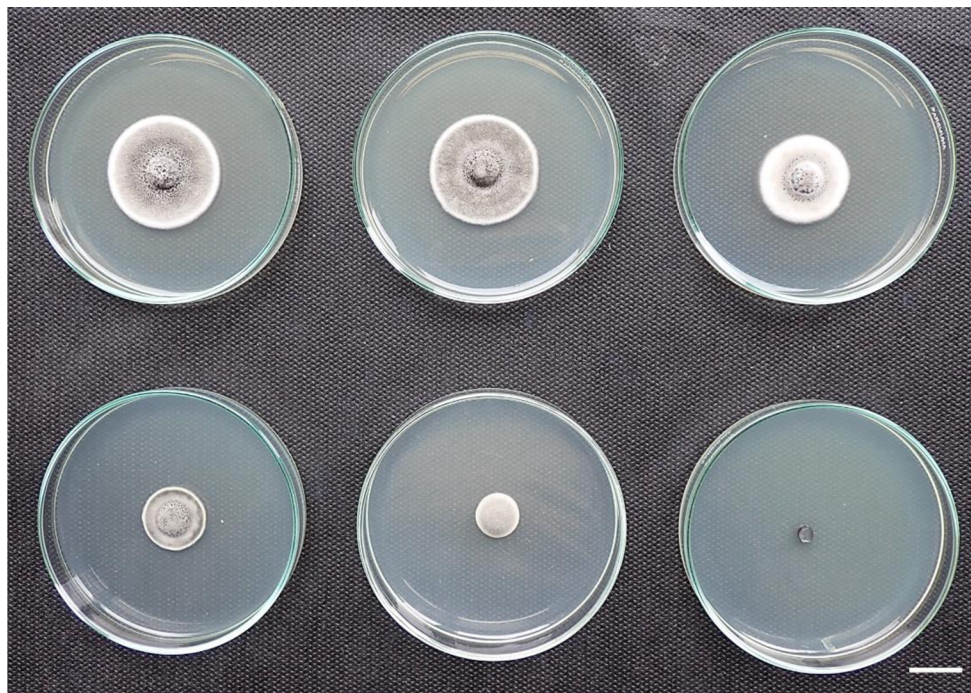
Obr. 17 *H. solani* na SMA médiu s přidavkem D-karvonu o koncentraci 0-100-200-400-800-1600 ppm. Měřitko je 2 cm.



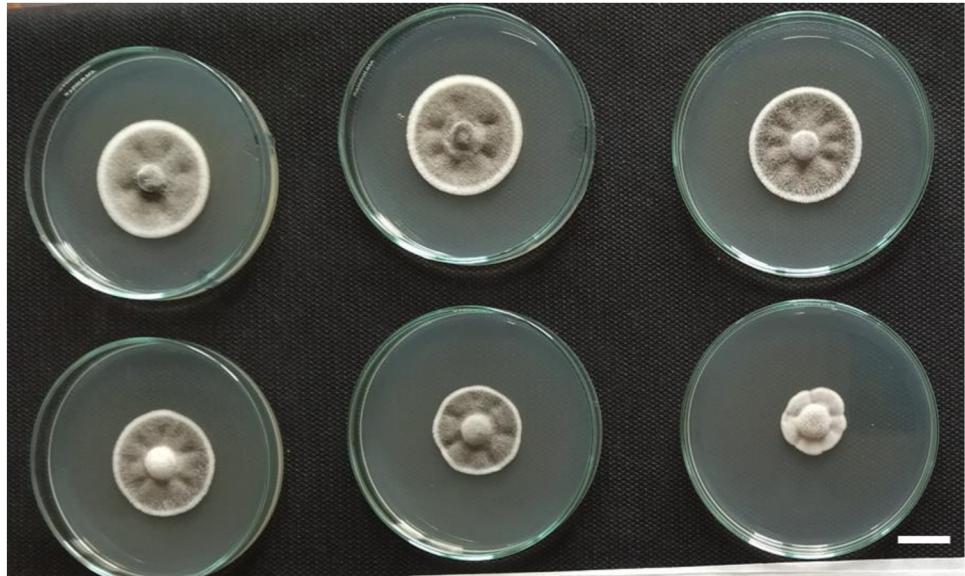
Obr. 18 *H. solani* na SMA médiu s přidavkem L-linaloolu o koncentraci 0-100-200-400-800-1600 ppm. Měřitko je 2 cm.



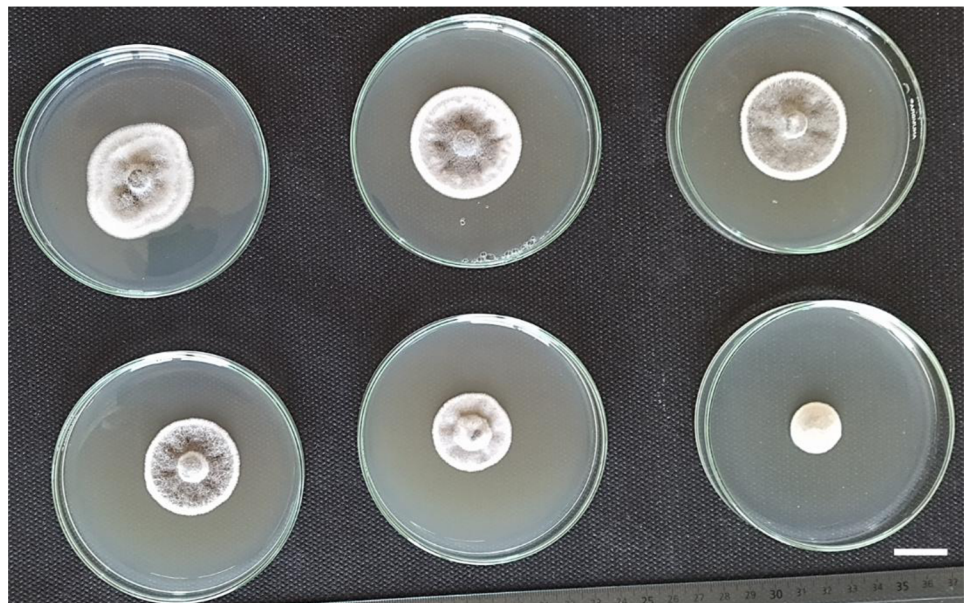
Obr. 19 *H. solani* na SMA médiu s přidavkem L-mentonu o koncentraci 0-100-200-400-800-1600 ppm. Měřitko je 2 cm.



Obr. 20 *H. solani* na SMA médiu s přidavkem eukalyptolu o koncentraci 0-100-200-400-800-1600 ppm. Měřitko je 2 cm.



Obr. 21 *H. solani* na SMA médiu s přidavkem  $\alpha$ -pinenu o koncentraci 0-100-200-400-800-1600 ppm. Měřítko je 2 cm.



Obr. 22 *H. solani* na SMA médiu s přidavkem (R)-(+)-limonenu o koncentraci 0-100-200-400-800-1600 ppm. Měřítko je 2 cm.

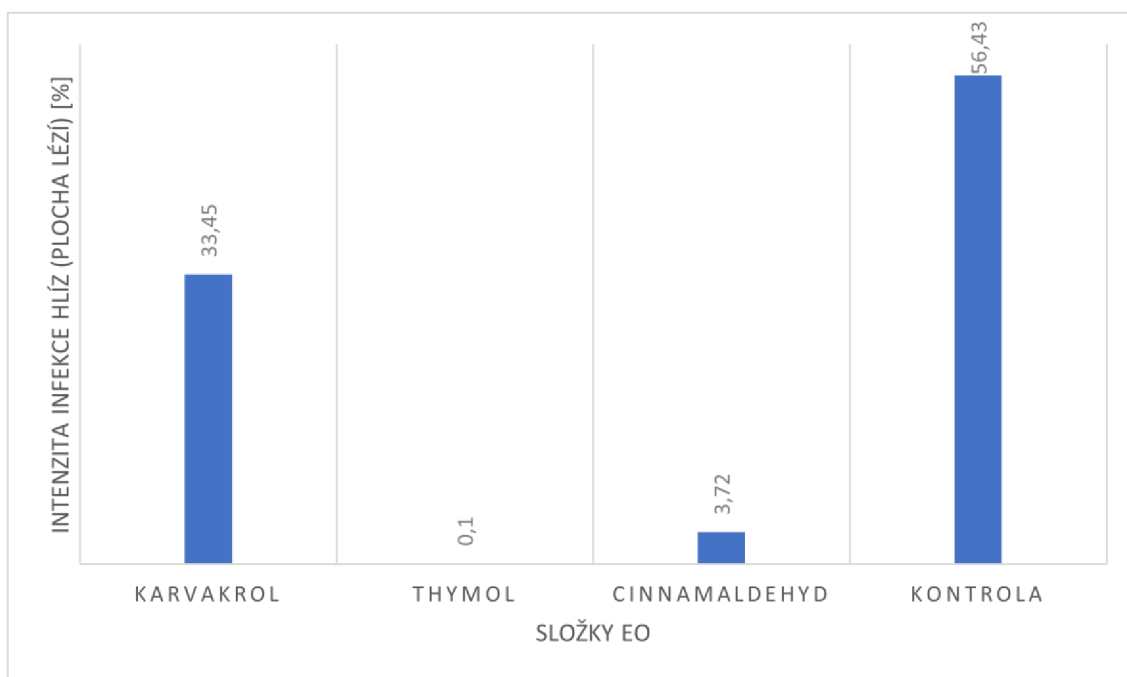
Statistické vyhodnocení jednotlivých složek EO bylo provedeno pomocí Tukeyho HSD testu v programu Statistica (tab. 19). Mezi jednotlivými složkami EO byly v antimykotické aktivitě zjištěny významné rozdíly. Statisticky významné rozdíly nebyly pozorovány mezi neúčinnějšími složkami EO a to thymolem, karvakrolem a cinnamaldehydem. Rovněž mezi složkami EO s nejnižším inhibičním účinkem nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly. Naopak mezi neúčinnější a nejméně účinnou složkou EO byl pozorován významný statistický rozdíl.

#### **4.1.2 *In vivo* testy antifungální aktivity složek EO**

Účinnost složek EO, které nejvíce inhibovali růst *H. solani* při *in vitro* experimentech, byla ověřena pomocí *in vivo* experimentů, a to konkrétně metodou fumigace hlíz složkami EO a moření hlíz složkami EO.

##### **4.1.2.1 Fumigace hlíz složkami EO**

Po fumigaci byla u hlíz bramboru pozorována významně nižší intenzita infekce *H. solani* ve srovnání s neošetřenými kontrolami pro všechny testované složky EO (obr. 23). Z těchto tří složek EO byl neúčinnější thymol u kterého byla účinnost 99,90 %. U cinnamaldehydu bylo pozorováno snížení intenzity infekce o 96,72 %. Nejnižší snížení intenzity infekce bylo zaznamenáno u karvakrolu a to o 66,55 %.

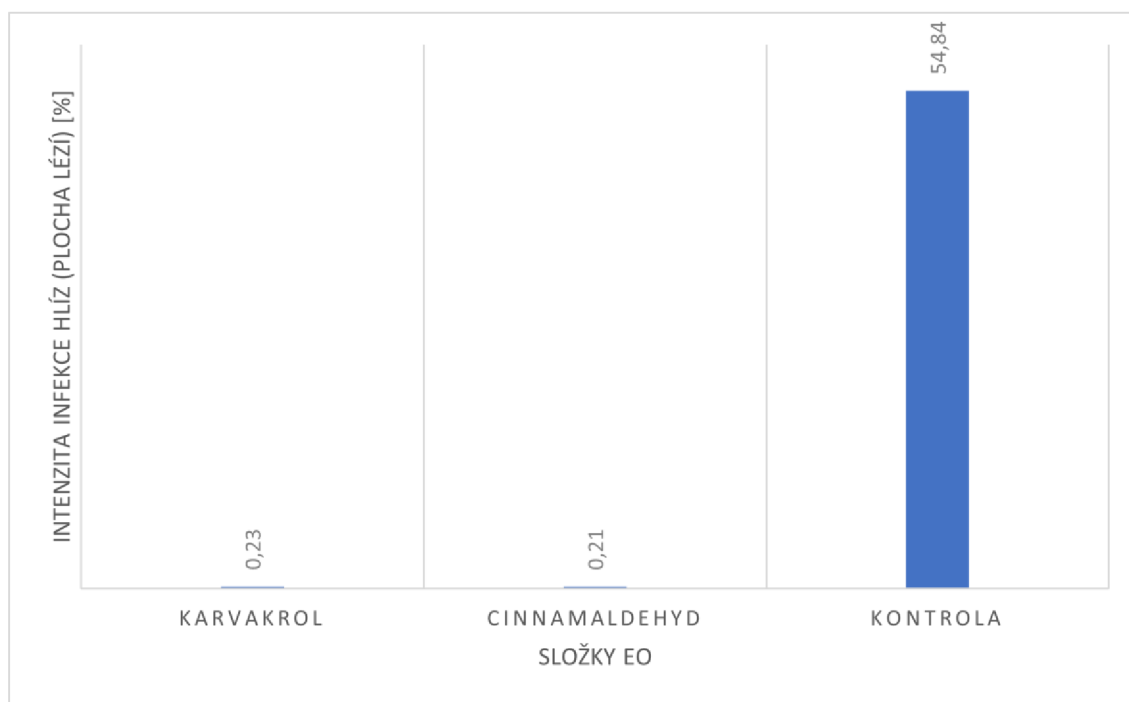


Obr. 23 Průměrná intenzita infekce hlíz (% plochy lézí) 60 dní po aplikaci karvakrolu, thymolu a cinnamaldehydu metodou fumigace hlíz. Všechna data jsou průměry ze tří replikací a každá replikace je reprezentována sedmi hlízy.

#### 4.1.2.2 Moření hlíz složkami EO

Po ošetření hlíz metodou moření hlíz byla pozorována významně nižší intenzita infekce *H. solani* ve srovnání s neošetřenými kontrolami pro cinnamaldehyd a karvakrol (obr. 24). Cinnamaldehyd a karvakrol měly srovnatelnou účinnost. U karvakrolu bylo pozorováno snížení intenzity infekce o 99,77 % a u cinnamaldehydu o 99,79 %. Metoda moření hlíz byla účinnější než metoda fumigace hlíz.





Obr. 24 Průměrná intenzita infekce hlíz (% plochy lézí) 60 dní po aplikaci karvakrolu, a cinnamaldehydu metodou moření hlíz. Všechna data jsou průměry ze tří replikací a každá replikace je reprezentována sedmi hlízy.

### 4.1.3 Optimalizace detekce *H. solani* pomocí real-time PCR

#### 4.1.3.1 Spektrofotometrické stanovení kvality a kvantity vyizolované DNA

U jednotlivých vzorků byla stanovena koncentrace a čistota vyizolované DNA. U čisté DNA by měla být hodnota poměru  $A_{260}/A_{280}$  1,7–1,9 (čím vyšší hodnota tím čistší DNA). Nižší hodnota poměru  $A_{260}/A_{280}$  než 1,7 znamená kontaminaci pravděpodobně proteiny. Hodnoty poměru  $A_{260}/A_{280}$  (tab. 27) ukazují, že vzorky č. 1–4 měli hodnotu o něco nižší než 1,7 což znamená že byly lehce kontaminovány. Nejčistší byl vzorek č. 5, který měl hodnotu poměru  $A_{260}/A_{280}$  1,72.

Tab. 27 Kvalita a kvantita vyizolované DNA *H. solani* pro jednotlivé vzorky.

Vzorek	c (ng/μl)	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>
1	19,00	1,41
2	26,67	1,62
3	20,00	1,57
4	29,83	1,48
5	33,16	1,72

#### 4.1.3.2 Detekce *H. solani* pomocí Sybr Green real-time PCR

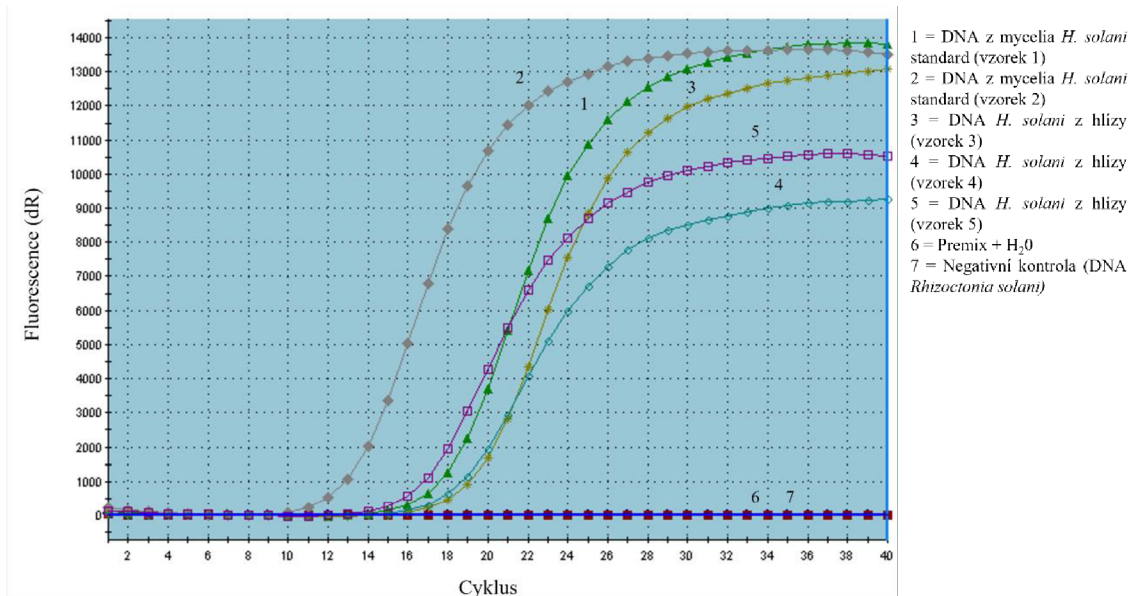
Optimalizace detekce *H. solani* pomocí Sybr Green real-time PCR byla vyhodnocena na základě hodnot Ct (Threshold cycle). U všech pěti vzorků byly hodnoty Ct (tab. 28) nižší než 35, a proto byly tyto vzorky považovány za pozitivní (obr. 25). Díky nejnižší hodnotě Ct (tab. 29) byl pro vytvoření ředící řady vybrán vzorek č. 2. U vzorku č. 2 při naředění 1:10<sup>6</sup> byla hodnota Ct nižší než 35 a takto naředěný vzorek byl považován za pozitivní (obr. 26).

Tab. 28 Hodnoty Ct pro Sybr Green a TaqMan real-time PCR pro jednotlivé vzorky.

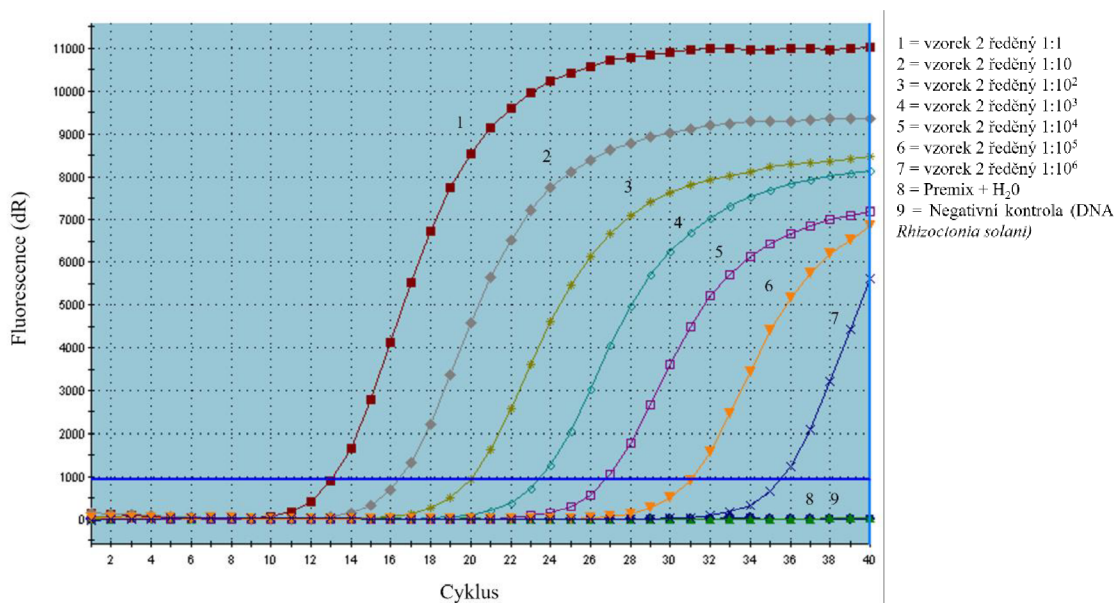
	Sybr Green real time PCR	TaqMan real-time PCR
Vzorek č. 1	18,43	21,00
Vzorek č. 2	13,65	15,58
Vzorek č. 3	20,02	22,7
Vzorek č. 4	19,67	21,24
Vzorek č. 5	17,69	19,44
Premix + H <sub>2</sub> O	No Ct	No Ct
Negativní kontrola	No Ct	No Ct

Tab. 29 Hodnoty Ct pro Sybr Green a TaqMan real-time PCR pro ředící řadu vzorku č. 2.

	Sybr Green real time PCR	TaqMan real-time PCR
Vzorek č. 2 1:1	13,05	16,03
Vzorek č. 2 1:10	16,39	19,9
Vzorek č. 2 1:10 <sup>2</sup>	19,98	22,83
Vzorek č. 2 1:10 <sup>3</sup>	23,41	27,79
Vzorek č. 2 1:10 <sup>4</sup>	26,73	32,84
Vzorek č. 2 1:10 <sup>5</sup>	31,03	36,32
Vzorek č. 2 1:10 <sup>6</sup>	33,07	38,28
Premix + H <sub>2</sub> O	No Ct	No Ct
Negativní kontrola	No Ct	No Ct



Obr. 25 Amplifikační křivky detekce *H. solani* pomocí Sybr Green real-time PCR pro vzorky č. 1-5.

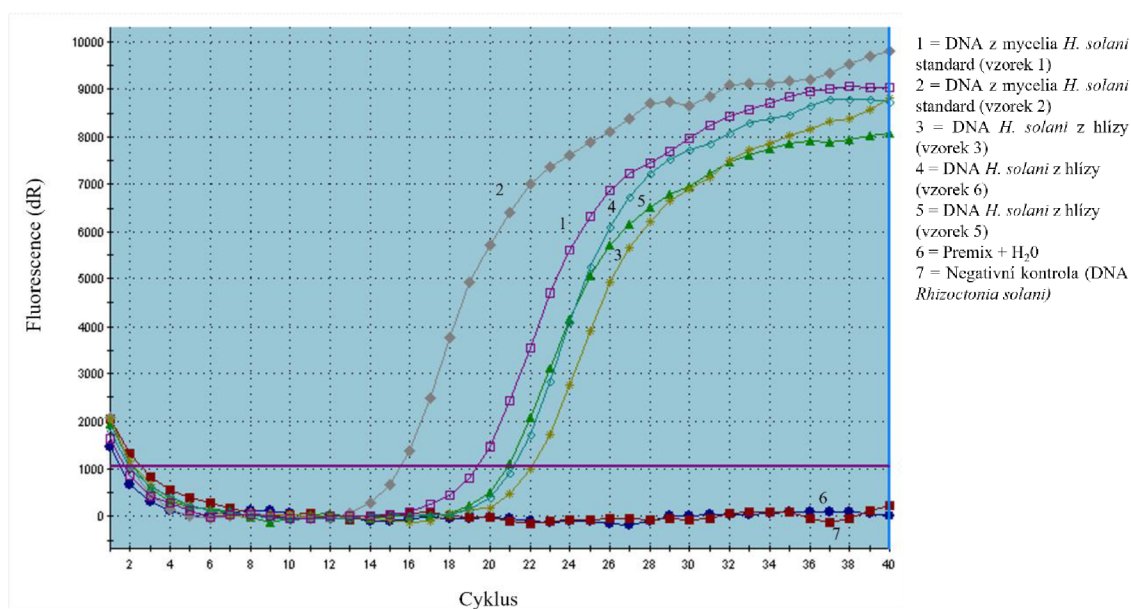


Obr. 26 Amplifikační křivky ředící řady detekce *H. solani* pomocí Sybr Green real-time PCR pro vzorek č. 2 (ředěný 1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>).

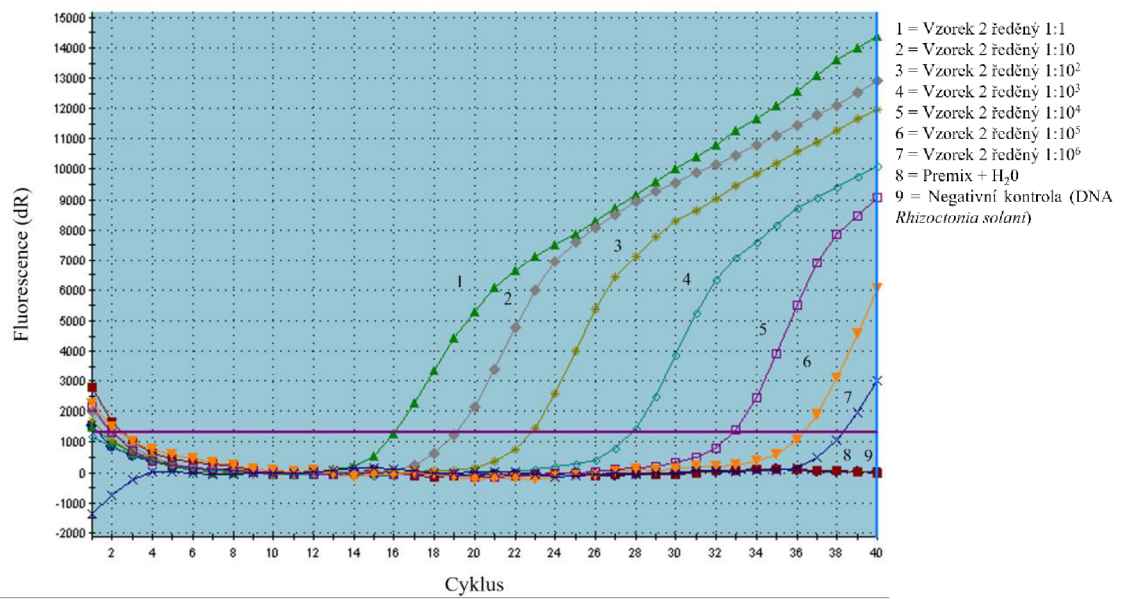
### 4.1.3.3 Detekce *H. solani* pomocí TaqMan real-time PCR

Optimalizace detekce *H. solani* pomocí TaqMan real-time PCR byla vyhodnocena na základě hodnot Ct. U všech vzorků byly hodnoty Ct (tab. 28) nižší než 35, a proto byly tyto vzorky považovány za pozitivní (obr. 27). Také u TaqMan real-time PCR měl vzorek č. 2 nejnižší hodnotu Ct, a proto byl vybrán k vytvoření ředící řady. U vzorku č. 2 při naředění 1:10<sup>5</sup> a 1:10<sup>6</sup> byla hodnota Ct (tab. 29) vyšší než 35 a proto takto naředěné vzorky nebyly považovány za pozitivní (obr. 28).

U metod Sybr Green a TaqMan real-time PCR byl patogen *H. solani* spolehlivě detekován ve všech testovaných vzorcích. Výsledky ředících řad dále prokázaly velmi vysokou citlivost obou metod.



Obr. 27 Amplifikační křivky detekce *H. solani* pomocí TaqMan real-time PCR pro vzorky č. 1-5.



Obr. 28 Amplifikační křivky ředící řady detekce *H. solani* pomocí TaqMan real-time PCR pro vzorek č. 2 (ředěný 1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>).

## 5 DISKUSE

V diplomové práci byla zjištěna antifungální aktivita deseti složek EO ( $\alpha$ -pinen, cinnamaldehyd, D-karvon, eukalyptol, karvakrol, L-linalool, L-mentol, L-menton, (R)-(+)-limonen a thymol) proti patogenu *H. solani* způsobující stříbřitost slupky bramboru pomocí *in vitro* a *in vivo* experimentů. Všechny hodnocené složky EO měly v *in vitro* experimentu inhibiční účinek proti *H. solani*. Antifungální aktivita u jednotlivých složek EO se významně lišila. Nejvyšší inhibiční účinek měl thymol, karvakrol a cinnamaldehyd, naopak nejnižší inhibiční účinek prokázal (R)-(+)-limonen a  $\alpha$ -pinen. Účinnost cinnamaldehydu, karvakrolu a thymolu byla potvrzena v *in vivo* experimentech, ve kterých byly hlízy bramboru ošetřeny metodou fumigace a moření. EO a složky EO jsou těkavé látky, proto byly pro použití při metodě moření hlíz, navázány na biopolymer dle patentu Matušinský *et al.* (2020). Začlenění složek EO na biopolymer ovlivňuje jejich fyzikálně–chemické vlastnosti, a to především zlepšení jejich antimikrobiálních a antioxidačních vlastností (Zubair *et al.*, 2022).

Kalemba a Kunicka (2003) uvádějí, že aktivita složek EO proti mikroorganismům závisí na jejich funkční skupině a to následovně: fenoly > aldehydy > ketony > alkoholy > ethery > uhlovodíky. Výsledky *in vitro* experimentu mé diplomové práce určující aktivitu složek EO proti patogenu *H. solani* odpovídají uvedenému pořadí. Výjimku tvoří L-mentol, který je alkohol, ale má vyšší účinnost než ketony D-karvon a L-menton. L-linalool je také alkohol s vyšší účinností než keton L-menton. Naopak se nedá z *in vitro* experimentu usuzovat, že alkoholy mají vyšší účinnost než ketony, protože D-karvon je keton a má vyšší účinnost než alkohol L-linalool.

Několik článků se zabývalo použitím EO nebo složek EO jako antifungálního činidla proti patogenu *H. solani* způsobující stříbřitost slupky bramboru. Hartmans *et al.* (1995) prokázal v *in vitro* a *in situ* experimentech antifungální aktivitu D-karvonu extrahovaného z kmínu (*C. carvi* L.) proti *H. solani*. Al-Mughrabi *et al.* (2013) pomocí *in vitro* experimentu také prokázal účinnost D-karvonu a L-mentonu proti *H. solani*. Kromě těchto dvou složek EO prokázal v *in vitro* podmínkách antifungální aktivitu EO z máty peprné (*M. x piperita*) a máty klasnaté (*M. spicata* L.). Sharma *et al.* (2015) zkoumal inhibiční účinek EO extrahovaných z *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara*, *Litsea cubeba* a *Piper mullesua* proti patogenu *H. solani* v *in vitro* podmínkách. Nejvyšší inhibiční účinky poskytly EO z *A. conyzoides* a *P. mullesua*. Tripathi *et al.* (2021) studoval také inhibiční účinek EO z *A. conyzoides*, *L. camara*, *L. cubeba* a *Piper mullesua*

proti *H. solani* v *in vitro* podmínkách. Nejvyšší antifungální aktivitu vykazovaly EO z *L. cubeba* a *P. mullesua*. Bång (2007) zkoumal vliv EO z mnoha rostlin na *H. solani* v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. Tyto EO inhibovaly růst *H. solani* za předpokladu, že koncentrace byly dostatečně vysoké a doba vystavení EO dostatečně dlouhá. V *in vitro* experimentu vykazoval nejvyšší antifungální aktivitu EO z tymiánu (*T. vulgaris*). V *in vivo* experimentu byl nejúčinnější pro kontrolu onemocnění stříbřitosti slupky bramboru EO z šalvěje obecné (*S. officinalis*).

Složky z EO, především cinnamaldehyd, karvakrol a thymol, by mohly být dobrou ekologickou alternativou k syntetickým fungicidům pro snížení infekce hlíz brambor *H. solani* během skladování. Během skladování dochází k nejvyššímu nárůstu infekce a dále pak konidie z infikovaných hlíz mohou být rozšiřovány ventilačním systémem na zdravé hlízy, které jim mohou být infikovány.

## 6 ZÁVĚR

Stříbřitost slupky bramboru, způsobená houbou *Helminthosporium solani* Durieu et Mont., (1849), je v poslední době důležitá skládková choroba bramboru (*Solanum tuberosum* L.) snižující především tržní hodnotu hlíz. V teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše na patogen *H. solani*. Byla shrnuta obecná charakterizace jeho biologie, významu, diagnostiky a možnosti ochrany brambor proti tomuto patogenu. Dále byla vytvořena literární rešerše na EO a složky EO, jejich rozdělení a využití z hlediska ochrany rostlin před patogeny.

V praktické části této diplomové práce byl zkoumán vliv deseti složek EO ( $\alpha$ -pinen, cinnamaldehyd, D-karvon, eukalyptol, karvakrol, L-linalool, L-mentol, L-menton, (R)-(+)-limonen a thymol) na růst patogena *H. solani*. Byly provedeny *in vitro* a *in vivo* testy antifungální aktivity složek EO. V *in vitro* experimentech antifungální aktivity složek EO prokázal diskový difúzní test nejvyšší antifungální aktivitu thymolu, karvakrolu a cinnamaldehydu. Nejnižší antifungální aktivitu měl  $\alpha$ -pinen a (R)-(+)-limonen. V *in vivo* testech antifungální aktivity složek EO byly použity dvě metody, a to fumigace hlíz a moření hlíz, kde byly složky EO pro vyšší účinnost a stabilitu navázány na biopolymer. Po ošetření hlíz všemi testovanými složkami EO bylo zjištěno vysoce průkazné snížení rozsahu infekce hlíz. U metody fumigace hlíz byl nejúčinnějším thymol. U metody moření hlíz byla účinnost karvakrolu a cinnamaldehydu stejná. Metoda moření hlíz byla účinnější než metoda fumigace hlíz. EO mohou představovat ekologickou alternativu ke snižování napadení hlíz *H. solani* brambor během skladování. Také byla úspěšně provedena optimalizace detekce *H. solani* pomocí Sybr Green real-time PCR a TaqMan real-time PCR. Výsledky ukázaly velmi vysokou citlivost použitých metod. *H. solani* bylo ve všech testovaných vzorcích spolehlivě detekováno oběma metodami.



## 7 LITERATURA

- Alagawany, M., Farag, M. R., Abdelnour, S. A., Elnesr, S. S. (2020). A review on the beneficial effect of thymol on health and production of fish. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 632-641. doi:10.1111/raq.12490
- Albuquerque, C. C. D., Camara, T. R., Mariano, R. D. L. R., Willadino, L., Marcelino Júnior, C., Ulisses, C. (2006). Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 527-535. doi:10.1590/S1516-89132006000500001
- Allenspach, M., Steuer, C. (2021).  $\alpha$ -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry*, 190, 112857. doi:10.1016/j.phytochem.2021.112857
- Al-Mughrabi, K. I., Coleman, W. K., Vikram, A., Poirier, R., Jayasuriya, K. E. (2013). Effectiveness of essential oils and their combinations with aluminum starch octenylsuccinate on potato storage pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(1), 23-31. doi:10.1080/0972060X.2013.764201
- Anandakumar, P., Kamaraj, S., Vanitha, M. K. (2021). D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. *Journal of food biochemistry*, 45(1), e13566. doi:10.1111/jfbc.13566
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P. (2006). Chemical Composition, Seasonal Variability, and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4364-4370. doi:10.1021/jf0603329
- Aprotosoiaie, A. C., Hăncianu, M., Costache, I. I., Miron, A. (2014). Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*, 29(4), 193-219. doi:10.1002/ffj.3197
- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. E., Hartmann, D., Jilale, A., Elaissari, A., et al. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220-243. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.069
- Avis, T. J., Martinez, C., Tweddell, R. J. (2010). Minireview/Minisynthèse Integrated management of potato silver scurf (*Helminthosporium solani*). *Canadian journal of plant pathology*, 32(3), 287-297. doi:10.1080/07060661.2010.508627
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Bång, U. (2007). Screening of natural plant volatiles to control the potato (*Solanum tuberosum*) pathogens *Helminthosporium solani*, *Fusarium solani*, *Phoma foveata* and *Rhizoctonia solani*. *Potato Research*, 50, 185-203. doi:10.1007/s11540-008-9044-y
- Behbahani, B. A., Noshad, M., Falah, F. (2019). Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial Pathogenesis*, 136, 103716. doi:10.1016/j.micpath.2019.103716
- Bouyahya, A., Mechchate, H., Benali, T., Ghchime, R., Charfi, S., Balahbib, A., Burkov, P., Shariati, M. A., Lorenzo, J. M., Omari, N. E. (2021). Health Benefits and Pharmacological Properties of Carvone. *Biomolecules*, 11(12), 1803. doi:10.3390/biom11121803
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Cal, K., Krzyzaniak, M. (2006). Stratum corneum absorption and retention of linalool and terpinen-4-ol applied as gel or oily solution in humans. *Journal of Dermatological Science*, 42(3), 265-267. doi:10.1016/j.jdermsci.2006.02.007

- Can Baser, K. (2008). Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3106–3119. doi:10.2174/138161208786404227
- Chang, H. T., Cheng, Y. H., Wu, C. L., Chang, S. T., Chang, T. T., Su, Y. C. (2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource technology*, 99(14), 6266-6270. doi:10.1016/j.biortech.2007.12.005
- Cullen, D. W., Lees, A. K., Toth, I. K., Duncan, J. M. (2001). Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 387-398. doi:10.1023/a:1011247826231
- Cunha, M. G., Rizzo, D. M. (2004). Occurrence and epidemiological aspects of potato silver scurf in California. *Horticultura Brasileira*, 22(4), 690-695. doi:10.1590/S0102-05362004000400005
- ČSÚ. <https://www.czso.cz/> (15. 3. 2024)
- Da Silva, B. D., Bernardes, P. C., Pinheiro, P. F., Fantuzzi, E., Roberto, C. D. (2021). Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, 176, 108463. doi:10.1016/j.meatsci.2021.10846
- De Almeida-Couto, J. M. F., Ressutte, J. B., Cardozo-Filho, L., Cabral, V. F. (2022). Current extraction methods and potential use of essential oils for quality and safety assurance of foods. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 94(2), e20191270. doi:10.1590/0001-3765202220191270
- De Carvalho, C. C. C. R., Da Fonseca, M. M. R. (2006). Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry*, 95(3), 413–422. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.00
- De Haan, S., Rodriguez, F. (2016). Potato origin and production. In *Advances in potato chemistry and technology* (pp. 1-32). *Academic Press*. doi:10.1016/b978-0-12-800002-1.00001-7
- De Groot, A. C., Schmidt, E. (2016). Essential Oils, Part III. *Dermatitis*, 27(4), 161–169. doi:10.1097/der.0000000000000193
- De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A., Silano, M. (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, 75(7-8), 801–804. doi:10.1016/j.fitote.2004.05.002
- Delaquis, P., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 101–109. doi:10.1016/s0168-1605(01)00734-6
- Derbassi, N. B.; Pedrosa, M. C.; Heleno, S. A.; Carcho, M.; Ferreira, I. C.; Barros, L. (2022). Plant volatiles: Using scented molecules as food additives. *Trends in Food Science & Technology*, 122, 97–103. doi:10.1016/j.tifs.2022.02.002
- Domingues, P. M., Santos, L. (2019). Essential oil of pennyroyal (*Mentha pulegium*): Composition and applications as alternatives to pesticides—New tendencies. *Industrial Crops and Products*, 139, 111534. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111534
- EAGRI. <https://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Vyhledavani.aspx> (24.4.2024)
- Erasto, P., Viljoen, A. M. (2008). Limonene-a review: biosynthetic, ecological and pharmacological relevance. *Natural Product Communications*, 3(7), doi:10.1177/1934578x0800300728
- Errampalli, D., Saunders, J. M., Holley, J. D. (2001). Emergence of silver scurf (*Helminthosporium solani*) as an economically important disease of potato. *Plant pathology*, 50(2), 141-153. doi:10.1046/j.1365-3059.2001.00555.x
- Escobar, A., Pérez, M., Romanelli, G., Blustein, G. (2020). Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*. 13(12), 9243-9269. doi:10.1016/j.arabjc.2020.11.009

- Friedman, M. (2017). Chemistry, antimicrobial mechanisms, and antibiotic activities of cinnamaldehyde against pathogenic bacteria in animal feeds and human foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(48), 10406-10423. doi:10.1021/acs.jafc.7b04344
- Gupta, A., Jeyakumar, E., Lawrence, R. (2021). Journey of limonene as an antimicrobial agent. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 15(3), 1094-1110. doi:10.22207/JPAM.15.3.01
- Gyawali, R., Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 46, 412-429. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.047
- Hartmans, K. J., Diepenhorst, P., Bakker, W., Gorris, L. G. M. (1995). The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. *Industrial Crops and Products*, 4(1), 3-13. doi:10.1016/0926-6690(95)00005-W
- Heiny, D. K., McIntyre, G. A. (1983). Helminthosporium solani Dur. & Mont. development on potato periderm. *American potato journal*, 60, 773-789. doi:10.1007/bf02856896
- Inglis, D., Gundersen, B. (2019). Silver scurf begins belowground on potatoes in Western Washington. ITIS. [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=505272#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=505272#null) (1.3.2024).
- Kalemba, D., Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829. doi:10.2174/0929867033457719
- Kamatou, G. P. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., Lawrence, B. M. (2013). Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, 96, 15-25. doi:10.1016/j.phytochem.2013.08.005
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., Fecka, I. (2020). Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules*, 25(18), 4125. doi:10.3390/molecules25184125
- Kurzawińska, H. (2006). An interaction of potato crop soil fungi population on fungi responsible for tuber superficial diseases. *Journal of Plant Protection Research*, 46(4).
- Mączka, W., Duda-Madej, A., Górný, A., Grabarczyk, M., Wińska, K. (2021). Can Eucalyptol Replace Antibiotics? *Molecules*, 26(16), 4933. doi:10.3390/molecules26164933
- Mączka, W., Duda-Madej, A., Grabarczyk, M., Wińska, K. (2022). Natural Compounds in the Battle against Microorganisms—Linalool. *Molecules*, 27(20), 6928. doi:10.3390/molecules27206928
- Mączka, W., Twardawska, M., Grabarczyk, M., Wińska, K. (2023). Carvacrol-A Natural Phenolic Compound with Antimicrobial Properties. *Antibiotics*, 12(5), 824. doi:10.3390/antibiotics12050824
- Malekmohammad, K., Rafieian-Kopaei, M., Sardari, S., Sewell, R. D. E. (2019). Toxicological effects of Mentha x piperita (peppermint): a review. *Toxin Reviews*, 40(4), 445-459. doi:10.1080/15569543.2019.1647545
- Marino, M., Bersani, C., Comi, G. (1999). Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Thymus vulgaris L. Measured Using a Bioimpedometric Method. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1017-1023. doi:10.4315/0362-028x-62.9.1017
- Martinez, C., Rioux, D., Tweddell, R. J. (2004). Ultrastructure of the infection process of potato tuber by Helminthosporium solani, causal agent of potato silver scurf. *Mycological research*, 108(7), 828-836. doi:10.1017/S0953756204000589
- Martinez, C., Avis, T. J., Simard, J. N., Labonté, J., Bélanger, R. R., Tweddell, R. J. (2006). The role of antibiosis in the antagonism of different bacteria towards Helminthosporium solani, the causal agent of potato silver scurf. *Phytoprotection*, 87(2), 69-75. doi:10.7202/013975ar

- Masotti, V., Juteau, F., Bessière, J. M., Viano, J. (2003). Seasonal and Phenological Variations of the Essential Oil from the Narrow Endemic Species *Artemisia molini* and Its Biological Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 7115–7121. doi:10.1021/jf034621y
- Matušinsky P., Maňasová M., Zouhar M. (Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž, CZ Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 6 - Suchbátka, CZ): Fungicidní prostředek na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, způsob jeho výroby a použití. CZ 308145, B6, 22. 01. 2020, 6 stran.
- McGimpsey, J. A., Douglas, M. H., Van Klink, J. W., Beauregard, D. A., Perry, N. B. (1994). Seasonal Variation in Essential Oil Yield and Composition from Naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour and Fragrance Journal*, 9(6), 347–352. doi:10.1002/ffj.2730090613
- McMurry, J. (2015). *Organická chemie*. (První vydání). Vutium, Brno, 1178 stran.
- Morcia, C., Tumino, G., Ghizzoni, R., Terzi, V. (2016). Carvone (*Mentha spicata* L.) Oils. Essential Oils in Food Preservation, *Flavor and Safety*, 309–316. doi:10.1016/b978-0-12-416641-7.00035-3
- Nagoor Meeran, M. F., Javed, H., Al Tae, H., Azimullah, S., Ojha, S. K. (2017). Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Frontiers in pharmacology*, 8, 380. doi:10.3389/fphar.2017.00380
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. doi:10.3390/ph6121451
- Olivier, C., Halseth, D. E., Mizubuti, E. S., Loria, R. (1998). Postharvest application of organic and inorganic salts for suppression of silver scurf on potato tubers. *Plant disease*, 82(2), 213–217. doi:10.1094/PDIS.1998.82.2.213
- Olivier, C., Berbee, M. L., Shoemaker, R. A., Loria, R. (2000). Molecular phylogenetic support from ribosomal DNA sequences for origin of *Helminthosporium* from *Leptosphaeria*-like loculoascomycete ancestors. *Mycologia*, 92(4), 736–746. doi:10.1080/00275514.2000.12061213
- Park, B. S., Choi, W. S., Kim, J. H., Kim, K. H., Lee, S. E. (2005). Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(1), 80–83. doi:10.2987/8756-971x(2005)21[80:mfttva]2.0.co;2
- Plodpai, P., Chuenchitt, S., Petcharat, V., Chakthong, S., Voravuthikunchai, S. P. (2013). Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. *Crop Protection*, 43, 65–71. doi:10.1016/j.cropro.2012.09.004
- Reddy, B. J., Mandal, R., Chakroborty, M., Hijam, L., Dutta, P. (2018). A review on potato (*Solanum tuberosum* L.) and its genetic diversity. *International Journal of Genetics*, 10 (2), 360–364. doi:10.9735/0975-2862.10.2.360-364
- Rivera-Varas, V. V., Freeman, T. A., Gudmestad, N. C., Secor, G. A. (2007). Mycoparasitism of *Helminthosporium solani* by *Acremonium strictum*. *Phytopathology*, 97(10), 1331–1337. doi:10.1094/PHYTO-97-10-1331
- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. del M., Segura-Carretero, A., Fathi, H., Nasrabadi, N. N., Kobarfard, F., Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*. 32(9), 1688–1706. doi:10.1002/ptr.6109
- Sharma, D., Yami, H., Sharma, D., Shukla, A. K. (2015). Antifungal activities of essential oils from four commonly used ethno-medicinal plants. *Asian Journal of Ethnopharmacology and Medicinal Foods*, 1(1), 25–31.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–21. doi:10.1155/2016/3012462

- Theis, N., Lerdau, M. (2003). The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S3), S93–S102. doi:10.1086/374190
- Tiwari, R. K., Kumar, R., Sharma, S., Naga, K. C., Subhash, S., Sagar, V. (2021). Continuous and emerging challenges of silver scurf disease in potato. *International Journal of Pest Management*, 68(1), 89-101. doi:10.1080/09670874.2020.1795302
- Tripathi, P., Yami, H., Shukla, A. (2021). Determination of Antifungal Activity against Phytopathogenic Fungi by Essential Oils Extracted from some Medicinal Plants. *Biopesticides International*, 17(2), 163–171.
- Vespermann, K. A. C., Paulino, B. N., Barcelos, M. C. S., Pessôa, M. G., Pastore, G. M., Molina, G. (2017). Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(5), 1805–1817. doi:10.1007/s00253-016-8066-7
- Xu, H., Delling, M., Jun, J. C., Clapham, D. E. (2006). Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature Neuroscience*, 9(5), 628–635. doi:10.1038/nn1692
- Yadav, G. D., Kamble, S. B. (2009). Synthesis of carvacrol by Friedel-Crafts alkylation of o-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(10), 1499–1508. doi:10.1002/jctb.2210
- Yanakiev, S. (2020). Effects of Cinnamon (*Cinnamomum* spp.) in Dentistry: A Review. *Molecules*, 25, 4184. doi:10.3390/molecules25184184
- Zhao, H., Ren, S., Yang, H., Tang, S., Guo, C., Liu, M., Tao, Q., Ming, T., Xu, H. (2022). Peppermint essential oil: Its phytochemistry, biological activity, pharmacological effect and application. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154, 113559. doi:10.1016/j.biopha.2022.113559
- Zhu, R., Liu, H., Liu, C., Wang, L., Ma, R., Chen, B., Li, L., Niu, J., Fu, M., Zhang, D., Gao, S. (2017). Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. *Pharmacological research*, 122, 78-89. doi:10.1016/j.phrs.2017.05.019
- Zubair, M., Shahzad, S., Hussain, A., Pradhan, R. A., Arshad, M., Ullah, A. (2022). Current trends in the utilization of essential oils for polysaccharide-and protein-derived food packaging materials. *Polymers*, 14(6), 1146. doi:10.3390/polym14061146

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ct	Threshold cycle
EO	esenciální oleje, silice
IC	inhibiční koncentrace
IC <sub>50</sub>	polovina maximální inhibiční koncentrace
MFC	minimální fungicidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
PCR	polymerázová řetězová reakce
SMA	Sabouraud maltose agar
TBZ	thiabendazol