

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra ochrany rostlin



Vliv esenciálních olejů na růst patogena *Phytophthora infestans*

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Jana Hanzlíková

Obor studia: Rostlinolékařství

Vedoucí práce: Ing. Jana Mazáková, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv esenciálních olejů na patogena *Phytophthora infestans*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. dubna 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janě Mazákové, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za její odborné rady, připomínky a za čas, který mi věnovala. Mé poděkování patří i Ing. Evě Zuskové za konzultace a pomoc při laboratorních pokusech.

Vliv esenciálních olejů na růst patogena *Phytophthora infestans*

Souhrn

Tato práce je zaměřena na posouzení účinku esenciálních olejů na růst mycelia patogena *Phytophthora infestans*, původce onemocnění plísně bramboru. Byly testovány esenciální oleje získané z rostlin *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus citriodora*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Litsea cubeba*, *Mentha spicata*, *Pelargonium graveolens*, *Pimpinella anisum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Syzygium aromaticum* a *Thymus vulgaris*.

V první části experimentu byl porovnáván průměrný inhibiční účinek olejů při 0,1% koncentraci. Esence, které ze 100 % neinhibovaly mycelium, byly z další části testování vyřazeny. U esencí, které zamezily růstu mycelia, byly vytvořeny koncentrační řady, na jejichž základě byly stanoveny minimální inhibiční koncentrace (MIC) esenciálních olejů. Nejlepších výsledků dosáhl olej získaný z *T. vulgaris*, u kterého byla MIC 0,04 %. Olej z *P. graveolens* inhiboval mycelium při 0,08% koncentraci. Minimální inhibiční koncentrace se u olejů získaných z rostlin *S. aromaticum* a *L. cubeba* různila v závislosti na izolátu patogena *P. infestans*. Nejméně se osvědčil olej extrahovaný z *C. winterianus* s MIC 0,1 %.

Na základě výsledků získaných z předchozí části testování byly provedeny detailnější koncentrační řady potřebné k přesnějšímu určení minimální inhibice mycelia u jednotlivých esencí. V této části experimentu se potvrdila nejvyšší účinnost u *T. vulgaris*. Optimálních výsledků dosáhl i olej získaný z rostliny *S. aromaticum*.

Součástí práce byla také determinace pohlavních typů patogena *P. infestans*. Podle výsledků byla pomocí molekulárně biologických testů potvrzena přítomnost obou pohlavních typů. Současný výskyt pohlavního typu A1 a A2 na stanovišti iniciuje výskyt odolných pohlavních oospor, u kterých může současně docházet k rezistenci vůči fungicidům.

Současným trendem je snižování chemických pesticidů, které zatěžují životní prostředí a ohrožují zdraví lidí a testují se nové alternativní látky na ochranu rostlin, což bylo také důvodem pro zvolení tématu diplomové práce.

Klíčová slova: *Phytophthora infestans*, esenciální oleje, patogen, ochrana rostlin, *Solanum tuberosum*

The effect of essential oils on growth of *Phytophthora infestans*

Summary

This diploma thesis is focused on assessment of the effect of essential oils on the mycelial growth of the pathogen *Phytophthora infestans*, the agent of potato mold. Essential oils which were tested were abstracted from plants *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus citriodora*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Litsea cubeba*, spearmint, *Pelargonium graveolens*, *Pimpinella anisum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Syzygium aromaticum* and *Thymus vulgaris*.

In the first part of the experiments were used oils at 0.1% concentration. Essences, which didn't inhibit the mycelium were excluded from other experiments. These essential oils, which prevented the growth of mycelium were tested in dilution series and from dilution series have been found the minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oils. Best results were achieved by essential oil derived from *T. vulgaris* in this case the MIC was 0,04%. Oil from *P. graveolens* inhibited mycelial growth at 0,08% concentration. Minimal inhibitory concentrations of oils derived from plants *S. aromaticum* and *L. cubeba* depended on the isolate of pathogen *P. infestans*. Minimal effect showed oil extracted from *C. winterianus* has got MIC 0,1%.

Based on results obtained from the first part of experiments the test were made more detailed concentration range. In this part of the experiment was confirmed the highest efficiency of *T. vulgaris*. Good results also achieved the essential oil extracted from plant *S. aromaticum*.

Part of the work was also determination sexual mating types of the pathogen *P. infestans*. By using molecular biological assays was confirmed the presence of both genital types. Occurrence of the both sexual types, A1 and A2, initiates the appearance of resistant oospores, which may have resistance to fungicides.

The current trend is to reduce chemical pesticides that pollute the environment and endanger human health and test new alternative substances for plant protection, that was also the reason for selecting the theme of this theses.

Keywords: *Phytophthora infestans*, essential oils, pathogen, plant protection, *Solanum tuberosum*

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Hypotéza a cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Obecná problematika pesticidních látek.....	10
3.2 Brambor hlíznatý = lilek brambor (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	11
3.2.1 Historie pěstování brambor.....	11
3.2.2 Obecné informace, význam a pěstování brambor.....	12
3.2.3 Nejvýznamnější choroby a škůdci brambor.....	14
3.3 <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary (1876)	16
3.3.1 Taxonomické zařazení <i>Phytophthora infestans</i>	16
3.3.2 Původ patogena <i>Phytophthora infestans</i>	16
3.3.3 Biologie patogena	17
3.3.4 Rozmnožování	17
3.3.5 Příznaky napadení a zdroj infekce	19
3.4 Metody ochrany proti <i>Phytophthora infestans</i>.....	20
3.4.1 Rezistentní šlechtění	20
3.4.2 Nechemické metody	21
3.4.3 Chemické metody	22
3.4.4 Prognóza a signalizace výskytu	23
3.5 Botanické pesticidy.....	24
3.5.1 Rozdělení botanických pesticidů	25
3.6 Esenciální oleje	25
3.6.1 Získávání esenciálních olejů	25
3.6.2 Mechanismus účinku	27
3.6.3 Biologický efekt esenciálních olejů	27
3.6.4 Vybrané druhy aromatických rostlin	28
4 Metodika	34
4.1 Sběr vzorků.....	34
4.2 Příprava média	34
4.3 Sporulace <i>P. infestans</i> na listu.....	34
4.4 Izolace patogena	34
4.5 Stanovení fungicidní aktivity esenciálních olejů	35
4.6 Stanovení MIC.....	36
4.7 Determinace pohlavních typů <i>P. infestans</i>	37

4.7.1	Izolace genomické DNA.....	37
4.7.2	PCR – polymerázová řetězová reakce	38
4.7.3	Gelová elektroforéza.....	39
4.7.4	Restrikční štěpení.....	40
5	Výsledky	41
5.1	Sběr vzorků a izolace patogena <i>Phytophthora infestans</i>	41
5.2	Stanovení aktivity esenciálních olejů.....	42
5.3	Stanovení minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů	43
5.4	Detailnější stanovení minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů.....	51
5.5	Determinace pohlavních typů patogena <i>P. infestans</i>	55
5.5.1	Potvrzení přítomnosti DNA fragmentů.....	55
5.5.2	Restrikční štěpení.....	56
6	Diskuze	58
7	Závěr.....	62
8	Seznam literatury	64
9	Seznam příloh	77
10	Přílohy	79

1 Úvod

Brambory patří mezi nejvýznamnější zemědělské komodity světa. Jejich pěstební plocha zaujímá celosvětově 19 miliónů hektarů. Díky své významné nutriční hodnotě si rychle prosadily důležité místo v obživě společnosti. Své postavení si získaly i jako krmivo hospodářských zvířat nebo průmyslová surovina pro výrobu škrobu a lihu. V 18. století dokonce ubránily obyvatele před ničivým hladomorem.

Tyto plodiny jsou však často napadány různými původci chorob, či škůdci, kteří znatelně ovlivňují výnos a kvalitu hlíz. Škody způsobené sáním a žírem natě škůdci se projevují ztrátou asimilační plochy. Saví škůdci navíc ovlivňují výnos a kvalitu hlíz přenosem virových chorob. Brambory jsou také často napadány různými původci bakteriálních a houbových chorob. Nejzávažnější houbovou chorobou je pravděpodobně plíseň bramboru způsobená patogenem *Phytophthora infestans*. Tento patogen napadá jak hlízy, tak nadzemní části rostlin a jeho výskyt je řízen zejména klimatickými podmínkami.

Zdrojem infekce je především samotná sadba, kde nejsou projevy na hlízách v prvních fázích příliš patrné. Dalším možným zdrojem nákazy jsou plevelné brambory, z nichž se patogen šíří pomocí sporangií do okolních pěstebních ploch. Při pohlavním rozmnožování tvoří patogen velice odolné oospory, které přetrvávají v půdě velmi dlouhou dobu a jsou také možným zdrojem infekce.

Od 1. 1. 2014 došlo ze strany Evropské unie k nařízení o povinnosti využívání integrované ochrany rostlin, která omezuje využívání chemických přípravků. Nejúčinnější ochranou proti patogenu *Phytophthora infestans* je však stále využívání fungicidů. Tyto pesticidní látky však mohou v hlízách zanechávat škodlivá rezidua, která mohou mít negativní vliv na lidské zdraví. V současné době je tak stále více uplatňován trend snížení používání těchto přípravků. Hledají se nová, alternativní řešení ochrany proti plísni bramboru. Jednou ze šetrných metod ochrany rostlin bramboru je využívání esenciálních olejů (EO).

V práci byl posuzován vliv éterických olejů, získaných z *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus citriodora*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Litsea cubeba*, *Mentha spicata*, *Pelargonium graveolens*, *Pimpinella anisum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Syzygium aromaticum* a *Thymus vulgaris* na inhibici mycelia *Phytophthora infestans*.

2 Hypotéza a cíl práce

Existují esenciální oleje, které mají inhibiční účinek na růst patogena *Phytophthora infestans* a jsou využitelné jako alternativní látky v ochraně hostitelských rostlin před tímto patogenem.

Cílem této diplomové práce bylo posouzení vlivu esenciálních olejů získaných z *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus citriodora*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Litsea cubeba*, *Mentha spicata*, *Pelargonium graveolens*, *Pimpinella anisum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Syzygium aromaticum* a *Thymus vulgaris* na růst mycelia patogena *Phytophthora infestans*. Vedlejším cílem práce byla determinace pohlavních typů patogena u izolátů, které byly použity pro testování účinku esenciálních olejů.

3 Literární rešerše

3.1 Obecná problematika pesticidních látek

Do dnešní podoby se zemědělství vyvíjelo téměř 10 000 let a prošlo od té doby dlouhým vývojem. První etapy zemědělství se specializovaly zejména na seti smíšených kultur, postupem času pak docházelo ke zlepšování agrotechnických postupů, ke střídání plodin a zdokonalila se i celková výživa a hnojení rostlin. Vzhledem ke zlepšujícím se zemědělským postupům zároveň rostla i potřeba ochránit rostliny před škodlivými organismy pomocí pesticidních přípravků (Isman, 2002).

Ve velkém začaly být využívány zejména chemické pesticidy, které prodělaly svůj velký boom za druhé světové války. Největší pozornost měly hlavně organochlorové pesticidy, z nichž nejznámější je pravděpodobně DDT (Snedeker, 2001).

V současné době se pěstování zemědělských komodit neobejde bez používání pesticidních látek. Pesticid můžeme chápat jako látku, nebo směs látek, která se využívá k ovlivnění životních procesů u živých organismů. Je známa celá řada pozitivního působení těchto látek, které má vliv zejména na regulaci škodlivých organismů (Vlček a Pohanka, 2011). Pesticidní látky však s sebou nesou i svá rizika. Negativně působí na necílové organismy, zatěžují životní prostředí a v neposlední řadě zanechávají v potravinách nebezpečná rezidua (Štefan a kol., 2012).

Ke kontaminaci potravin rezidui dochází buď přímou cestou, nebo cestou nepřímou, a to pomocí živočišných vektorů, kontaminací půdy, vzduchu, anebo vody. Je tedy důležité dodržovat určitá pravidla při aplikaci pesticidních látek a hlavně dodržovat jejich stanovenou dávku. Na základě správné manipulace s chemickými přípravky na ochranu rostlin by tedy nemělo docházet k překročení maximálního limitu reziduí (MLR) v potravinách. Vzorok, které jsou prokázány, jako nadlimitní, by měly být nahlášeny a mělo by následovat jejich vyřazení z oběhu (Pepperný, 2015).

Obecně se dá říci, že organismy, které jsou vystaveny syntetickým pesticidním látkám během prenatalního, nebo časně postnatalního vývoje života, mohou mít vážné zdravotní problémy. Účinky těchto látek mohou mít mnohdy trvalé následky. Bylo zjištěno, že mají vliv zejména na imunitní, endokrinní, ale i reprodukční systém (Colborn et al., 1993). Hayes (1967) dodává, že zdraví člověka může být po požití potravin se stopami reziduí ovlivněno buď

akutně, nebo chronicky. Akutní stav nastává okamžitě při pozření dané potraviny, stav chronický pak při dlouhodobějším přijímání škodlivého rezidua (Hayes, 1967).

Společnost stále více usiluje o snížení používání běžných pesticidů, které obsahují organofosfáty, karbamáty aj., a vytváří se tak nová příležitost pro alternativní přípravky na ochranu rostlin (Isman, 2000). Bajwa et. Sandhu (2014) ve svých pokusech zjistili, že téměř ve všech potravinách jsou přítomna rezidua, která se však dají snížit jejich vhodnou před- i posklizňovou manipulací.

3.2 Brambor hlíznatý = lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.)

3.2.1 Historie pěstování brambor

Původ pěstování brambor by se dal hledat v západní části jižní Ameriky. Pěstební oblast se táhla od dnešní Kolumbie až do Chile na rovinách velehor And. Tato oblast se dala rozdělit na dvě hlavní části. První z nich byla vysokohorská chladnější část Peru a Bolívie, druhá se pak nacházela v oblasti středního Chile, kde se podnebí přibližovalo spíše střední Evropě. Zde bychom tedy mohli pátrat po předcích brambor (Kutnár, 1963).

V první třetině 16. století se s nimi poprvé setkali na území dnešního Peru evropští mořeplavci. Brambory tímto okamžikem expandovaly do různých částí Evropy a daly tak evropské oblasti, která byla zvyklá jen na obilniny, zcela nový hospodářský rozměr. Zhruba kolem roku 1620 pronikly brambory i do českých zemí (Kutnár, 1963).

Od počátku 18. století přestaly být pěstovány pouze v zahradách pro vyšší vrstvy, ale rozšířily se také na pole a byly k dispozici i chudšímu obyvatelstvu. Kolem roku 1770 propukl ničivý hladomor a neúroda obilí. Tato situace podpořila vyšší pěstování brambor, které ochránilo obyvatele před bídou a smrtí. Rychle se zároveň šířily informace o jejich nárocích na stanoviště a o pěstování (Vokál a kol., 2013).

Na začátku 18. století dokonce vyvstaly myšlenky o výrobě mouky z brambor na pečení chleba. Zhruba v sedmdesátých letech 18. století začaly být ve velkém pěstovány jako krmivo pro dobytek. V roce 1781 dokonce Ignác Böhm prohlašoval, že je výhodné krmit krávy a prasata bramborami, že pak mají tučnější maso. Od konce 18. století se začaly bramborové hlízy používat také pro výrobu škrobu, lihu a sirupu. Již kolem poloviny 19. století zabíralo české bramborářství 6 % celkové obhospodařované plochy (Kutnár, 1963).

Základní pěstební úkony při pěstování brambor byly obyvatelstvu známy, postupně se však ještě zdokonalovaly. Na podzim se půda zpravidla zorala a na jaře se do rýh sázely hlízy.

Pole se pak průběžně okopávalo a půda byla přihnována k rostlinám. Velice se také osvědčilo sít po bramborách žito či pšenici (Kutnár, 1963). Jejich pěstování se stále více rozrůstalo, bylo velice oblíbené a ekonomicky značně výhodné. České bramborářství bylo schopné pokrýt potravinový trh ve městech a brambory byly dostupné i chudšímu obyvatelstvu (Vokál a kol., 2013).

Ke konci 18. století však postihla brambory první epidemie, která se projevovala krabacením listů a oslabováním trsů rostlin. Mylně si tehdejší obyvatelé mysleli, že se jedná o virovou chorobu. Do té doby nebyly totiž choroby ani škůdci brambor příliš rozšířeny. Další, avšak ničivější epidemie nastala roku 1840, kdy bramborářství postihla suchá a mokrá hniloba. Na hlízách se objevovaly „fleky“, kterým se však nekladl takový důraz. O dva roky později se ale projevila hniloba i s fatálními následky. Epidemie se rozšířila z kontinentu i do Anglie, Irska a Skotska. Celkové ztráty na výnosech se pohybovaly mezi 50–70 %. Mezi lety 1851–1853 nastala druhá vlna hniloby, která ohrozila celkovou situaci pěstování brambor a chovu skotu. V souvislosti s neúrodou docházelo k existenčním obavám chudšího obyvatelstva.

Jak dnes již víme, jednalo se o houbovou chorobu způsobenou patogenem *Phytophthora infestans*, která napadá hlízy, stonek i listy. Kvůli nedostatečné osvětě tehdejšího obyvatelstva, započalo zjišťování a shromažďování informací o původu této choroby a boji proti ní (Kutnár, 1963).

Čepl a kol. (2012) dodávají, že zhruba v roce 1992 bylo omezeno pěstování brambor jako krmiva a snížilo se i využívání brambor na výrobu škrobu a lihu.

3.2.2 Obecné informace, význam a pěstování brambor

Lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) patřící do čeledi *Solanaceae* je jednou ze základních potravin obyvatel světa (Novák, 2007). Výživově jsou brambory pro člověka velice přínosné a nesou v sobě vysoký zdroj energie (Čepl a kol., 2012). Hlízy jsou složeny z poměrně vysokého množství vody, které dosahuje až 82 %. Zbytek tvoří sušina, přičemž nejvyšší zastoupení má zásobní látka škrob. Mimo škrobu jsou v hlízách zastoupeny také sacharidy, dusíkaté látky, nepatrné množství tuků aj. (Vokál a kol., 2013). Při podrobnějším rozboru bramborové hlízy narazíme na přítomnost látek, které mají velice příznivou nutriční hodnotu. Můžeme mezi nimi jmenovat vlákninu, antioxidanty a různé prvky, jako je vápník a hořčík. Jsou zde však přítomny i látky s nepříznivým nutričním vlivem, mezi které patří těžké kovy, dusičnany a rezidua pesticidů (Čepl a kol., 2012). Žižka (2015) dodává, že v roce 2014 byly během testování na rezidua chemických látek nejvíce analyzovány účinné látky propamocarb a

chlorpropham. Dále bylo zjištěno, že ve všech testovaných hlízách byla potvrzena přítomnost dusičnanů (Žížka, 2015).

Celosvětově je pěstební plocha brambor odhadována na 19 milionů hektarů. Brambory jsou ve světě čtvrtou nejpěstovanější plodinou a jejich pěstování má příznivý vliv na půdní úrodnost. V současné době má jejich produkce stoupající charakter zejména v rozvojových zemích (Vokál a kol., 2013). V České republice byly brambory v roce 2016 pěstovány v rámci zemědělského sektoru na 23 414 ha (Český statistický úřad, 2016).

Základem správného pěstování brambor je výběr vhodného pozemku. Obecně se rostlinám méně daří na kamenitých, zamokřených nebo vlhkých půdách. Je také důležité volit správný sklon pozemku, na kterém nedochází k vodní erozi. Nutné je také dodržování vhodného osevního sledu plodin (Čepl a kol., 2009). Vokál a kol. (2013) tvrdí, že brambory nejsou náročné na předplodinu a sami patří mezi zlepšující plodiny.

Zpracování půdy je důležitým krokem při pěstování brambor. Podstatné je dbát na provzdušnění půdy kolem kořenů rostlin (Vokál a kol., 2013). Na podzim se po předchozí plodině realizuje mělké kypření půdy, které má za cíl zapravit posklizňové zbytky a omezit ztráty vody. Dále se pozemek uvláčí a zaseje se meziplodina, která je i následně vhodná pro zelené hnojení. Meziplodina je poté zapravena a zhruba v polovině října je pole vyhnojeno organickým hnojivem a hnojivem s podílem P, K a Mg. Bezprostředně poté následuje střední orba, která zmíněná hnojiva zapraví a celý pozemek se tím vyživí (Čepl a kol., 2009).

Volák a kol. (2013) tvrdí, že k rozrušení půdních hrud by mělo být na jaře realizováno nejprve urovnání půdního povrchu. Dále je v tomto období prováděno prokypření půdy ideálně do hloubky 20 cm. Je také velice důležité sázet brambory do odkameněné půdy. Tento postup je možné provádět metodou separace, anebo rýhováním. Odkamenění půdy přináší vyšší kvalitu hlíz, zvýšení výnosů a nedochází k utužení půd (Vokál a kol., 2013).

Čepl a kol. (2009) uvádějí, že po celou dobu vegetace by mělo docházet k odnímání živin rostlinami. Na 10 t hlíz s nadzemní částí rostlin a kořeny jsou pak hodnoty odběru živin následující: 40–50 kg N, 8,8 kg P, 70 kg K, 22 kg Ca a 8,4 kg Mg. Kasal a kol. (2010) dodávají, že velice významné jsou pro brambory samotné živiny, které jsou obsaženy v půdě. Obecně je tato půdní zásoba spojována s názvem stará půdní síla. Výživa rostlin je tedy ve větší míře závislá na staré půdní síle, než na samotném průběžném hnojení.

Klíčem úspěchu každého pěstování brambor je využívání certifikované sadby. Dalším významným krokem je příprava sadbového materiálu. Již při sklizení brambor se provádí

mechanické protřídění sadby, které vyloučí poničené a nahnílé hlízy. Sadbové hlízy se navíc nechávají narašit, a to při teplotě kolem 10 °C. Při pěstování raných konzumních brambor se pak dává sadba předkličovat, a to přibližně 6 týdnů před samotným sázením. U menších pěstitelů se nechává sadba ještě zhruba 20 dní před sázením zakořenit. Je také vhodné použít suché, či mokré moření proti původcům chorob a škůdcům (Čepl a kol., 2009).

Při samotném sázení brambor dbáme na jejich správný spon, který je dán meziřádkovou vzdáleností stanovenou většinou na 750 mm (Hamouz, 1994). Na základě jednotlivých pěstebních směrů je volena vzdálenost trsů v řádku. Mezi vnějšími hrůbky je například na odkameněných půdách vzdálenost zhruba 1050 mm a vzdálenost v řádku následně přizpůsobena výchozímu množství kusů na hektar. Zpravidla se však hlízy sázejí ve vzdálenosti ± 300 mm od sebe. Umísťují se do hloubky, která je totožná s velikostí bramborové hlízy a jsou pokryty až 150 mm ornice. Některé sázecí stroje obsahují zařízení, které je současně schopno aplikovat do země kapalná nebo tuhá hnojiva, či obsahují mechanismus umožňující moření (Vokál a kol., 2013).

3.2.3 Nejvýznamnější choroby a škůdci brambor

Existuje řada škodlivých činitelů, kteří napadají brambory a výrazně tak snižují jejich kvalitu a výnos. Většině z nich lze však předejít preventivním opatřením. Mezi nejvýznamnějšími můžeme jmenovat houbové, virové a bakteriální choroby, škůdce a také abionózy (Jůzl a Elzner, 2014).

Mšice se na bramborách nevyskytují ve velkém počtu a je proto velice snadné je na rostlinách přehlédnout. Na napadeném porostu nevznikají přímé škody, mšice jsou však hlavními přenašeči virů v porostech brambor – zejména virů S, M, A, X a Y. Cílená ochrana proti mšicím by měla být provedena zejména na množitelských porostech. Insekticidně by měla být sadba ošetřována již před založením porostu a následně by měl být fungicidní postřik opakován po zhruba 10 týdnech (Kazda, 2014).

Ve formě cyst se v rámci pozemku i mezi pozemky mohou šířit cystotvorná hád'átka bramborová (*Globodera rostochiensis*, *G. pallida*). Tyto druhy hád'átek napadají kořeny rostlin bramboru, napadené rostliny omezují svůj vzrůst a jejich nať žlutne. V boji proti těmto organismům by měla být uplatňována karanténní opatření (Pekárková a Růžička, 2013).

Rostliny brambor a zejména jejich hlízy je nutno chránit před škůdci, kteří způsobují jejich poškození. Drátovci mohou v hlízách zanechávat hnědé chodbičky a při jejich přemnožení může docházet k závažným ztrátám na výnosech. Povrchové žíry, které se spolu

často zaměňují, způsobují osenice a hlodavci. Silný žír hlíz způsobují také slimácci, kteří napadají i nadzemní části rostlin (Kazda, 2014).

Nejvíce diskutovaným škůdcem na bramborách je mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824), která poškozuje rostliny bramboru okusem nadzemní části rostliny a často i hlíz. Při silném výskytu může způsobit devastaci celého porostu. Škody mohou působit jak larvy, tak dospělci, přičemž larvy způsobují poškození daleko většího rozsahu. Ochranou proti mandelince bramborové je kombinace preventivních opatření a chemické ochrany (Hausvater a Doležal, 2013).

Velice heterogenními příznaky se projevují virové choroby brambor. Nejvýznamnějšími původci těchto chorob jsou viry X, M, A, S a Y, jež jsou přenášeny zejména mšicí řešetlakovou a mšicí broskvoňovou, infikovanou sadbou, ale také přes mechanické poranění. Infekci lze předejít preventivními opatřeními, které zahrnují zejména vyrovnaný porost a vyvážené hnojení dusíkem (Dědič, 2014).

Vločkovitost hlíz bramboru je způsobena patogenem *Rhizoctonia solani*. Tato houba napadá široké spektrum rostlinných druhů a je přenosná přes půdu a rostlinné zbytky. Infekčním zdrojem jsou sklerocia, z nichž klíčí mycelium napadající hlízy a očka. Původce choroby narušuje cévní svazky, což má také dopad na poškození báze stonků. Rostliny poté rychleji žloutnou a odumírají. Za vhodného počasí se může na stoncích objevit bílý povlak mycelia. Na hlízách se infekce projevuje různými prasklinami a deformacemi, na slupce jsou pak patrné korovité povlaky. Účinným opatřením proti vločkovitosti bramboru je fungicidní ošetření hlíz, případně půdy a správná agrotechnika (Hausvater a kol., 2011b).

Karanténní organismus *Synchytrium endobioticum*, způsobující rakovinu brambor, se vyznačuje tvorbou nádorů převážně na hlízách. Jako prevence proti této chorobě, by měly být voleny odolné odrůdy. Tento patogen však v posledních letech nebyl v České republice hlášen (Prokinová, 2014).

Bakteriální kroužkovitost bramboru, kterou způsobuje *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* představuje poměrně vysoké nebezpečí, zejména pro sadbové brambory. Řadí se do EPPO A2 karanténních organismů. Příznaky projevující se vadnutím je možné sledovat již od počátku kvetení. Patrnější je však vadnutí od konce srpna, kde je možné pozorovat na příčném řezu stonkem tmavnutí pletiva. Na hlízách se při podélném řezu vyskytují typické příznaky pro tuto chorobu. Možné je pozorovat sklovité pletivo, dále pak tmavě hnědý prsteneček,

který se nachází těsně pod slupkou. Chemická ani biologická ochrana proti tomuto patogenu není prozatím k dispozici (Matoušková a Táborská, 2007).

Mezi dalšími chorobami můžeme jmenovat aktinobakteriální obecnou strupovitost bramboru (původce: *Streptomyces scabiei*), stříbřitost slupky bramboru (původce: *Helminthosporium solani*), bakteriální černání stonků a měkkou hnilobu (původce: *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Erwinia chrysanthemi*) a v neposlední řadě plíseň bramboru, která je detailněji popsána v následujících kapitolách (Prokinová, 2014).

3.3 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (1876)

Jednou z neobávanějších chorob bramboru je plíseň bramboru způsobená patogenem *Phytophthora infestans*. S chorobou se setkáme zejména na podmáčených půdách, za deštivého a mírného počasí. V roce 1840 dokonce způsobila v Irsku hladomor. Hostitelské spektrum *P. infestans* zahrnuje, kromě brambor, i jiné rostliny z čeledi *Solanaceae* spp. (*Solanum lycopersicum* L.). Bylo zjištěno, že v USA a Kanadě patří mezi hostitelské rostliny také *Petunia x Hybrida*, *Solanum dulcamara* a *S. sarrachoides* (Stevenson et al., 2001).

3.3.1 Taxonomické zařazení *Phytophthora infestans*

Phytophthora infestans je dle Index Fungorum (2017) řazena z taxonomického hlediska do těchto skupin:

říše: *Chromista*

oddělení: *Oomycota*

třída: *Peronosporae*

řád: *Peronosporales*

čeleď: *Peronosporaceae*

rod: *Phytophthora* de Bary 1876

3.3.2 Původ patogena *Phytophthora infestans*

Existují dva zdroje důkazů, které se zabývají původem patogena *P. infestans*. První z nich je podložen historickými zprávami, které se věnují počátečnímu propuknutí infekce. Další je založen na znacích patogena z hlediska molekulární úrovně, které se liší v rámci různých oblastí světa. Na základě těchto podkladů byly stanoveny dvě možné teorie původu *P. infestans* –

andská a mexická. Teorie andská tvrdí, že patogen původně pochází z Jižní Ameriky, tedy ze stejné oblasti odkud pochází i jeho hlavní hostitel. Toto tvrzení bylo však později vyvráceno teorií mexickou, která uznává jako centrum původu patogena střední Mexiko. Bylo tak učiněno podrobnou analýzou, kde byly také poprvé stanoveny oba pohlavní typy A1 a A2 (Andrison, 1996).

V roce 1956 byl ve středním Mexiku poprvé nalezen pohlavní typ A2. Zatímco byl výskyt tohoto pohlavního typu hlášen do roku 1980 pouze v Mexiku, pohlavní typ A1 byl již rozšířen i jinde ve světě. V roce 1980 byl pohlavní typ A2 zjištěn i ve Švýcarsku a v současné době byl jeho výskyt potvrzen i v jiných částech světa (Ristaino, 2002).

3.3.3 Biologie patogena

P. infestans je hemibiotrofní organismus, který během svého životního cyklu prochází fází biotrofní, následně nekrotrofní a na závěr fází saprofytickou (Pieterse et al., 1992). Stélka patogena je představována hyfou bez přehrádek utvářející nepřehrádkované mycelium (Kalina a Váňa, 2005). Patogen se dále vyznačuje absencí chitinu ve stěnách buněk (Fry et Goodwin, 1997). Kalina a Váňa (2005) doplňují, že se v buněčných stěnách vyskytuje zejména celulóza, polyglukany a jiné látky. Pro patogena je také typická přítomnost dvou heterokontních bičíků u zoospor. *P. infestans* patří mezi druhy heterotalické, tedy druhy, jejichž pohlavní rozmnožování je podmíněno přítomností rozdílných pohlavních typů (Fry et Goodwin, 1997).

3.3.4 Rozmnožování

3.3.4.1 Nepohlavní rozmnožování

Infekce porostů brambor je způsobena především nepohlavním způsobem rozmnožování a k asexuálním cyklům může u tohoto polycyklického patogena docházet opakovaně (Stevenson et al., 2001). Na primárně infikovaných rostlinách se na vrcholových listcích formují sporangiofory, které vyrůstají z listových průduchů. Útvary sporangioforů se tvoří buď jednotlivě nebo po 2–5 ve svazku a na konci se větví (Juroch, 2011). Na konci sporangioforů se tvoří a následně odškrcují útvary citrónkovitého tvaru, zvané sporangia (příloha č. 5). Sporangia jsou typická velikostí 21–23 × 21–38 μm a přítomností apikálního póru (Stevenson et al., 2001), dále mají hladký povrch a na jejich bázi se nachází stopečka (Juroch, 2011). Optimální podmínky pro tvorbu sporangií jsou teplota kolem 20 °C a vlhkost nad 90 %. Sporangia jsou rozšiřována převážně v ranních hodinách, a to buď za pomoci větru, nebo deštěm (Andersson, 2007). Pokud nastanou nižší teploty (8–18 °C) začínají se ve sporangiu

formovat zoospory. Tyto pohyblivé spory jsou opatřeny dvěma bičíky a jsou zpravidla jednojaderné. Svou pohyblivost však zoospory ztrácejí po několika minutách, kdy encystují. Zoospory následně na příslušné rostlině klíčí v hyfu a pronikají do těla hostitele (Stevenson et al., 2001). K přímému klíčení sporangii v klíčící hyfu dochází za vyšších teplot v rozmezí od 18 do 24 °C (Juroch, 2011). Klíčení zoospor a sporangii doprovází následná tvorba apresoria a penetračního hrotu, což umožňuje patogenu lepší průnik do pletiva hostitele. Po proniknutí hyf do pletiva hostitele se patogen rychle šíří rozrůstáním hyf. Zároveň vytváří haustoria, pomocí nichž odjímá živiny hostitele, přičemž následně dochází i k destrukci pletiva (Grenville-Briggs et van West, 2005). Po několika dnech se znovu vytvářejí sporangiofory se sporangii, která mohou opět způsobit sekundární infekci dalších rostlin (Andersson, 2007). Agrios (1997) navíc doplňuje, že teploty kolem 30 °C zabraňují šíření infekce, avšak patogena zcela nezničí. Za vhodných podmínek dochází k opětovné aktivaci spor (Agrios, 1997)

Pokud se nepodstoupí příslušná opatření, může docházet i k infekci hlíz. Nákaza je způsobená smyvem sporangii z listů do půdy, kde dochází k jejich kontaktu s hlízou. K infekci dochází i během sklizně hlíz nebo při jejich manipulaci. Možnost nákazy je však ročníková záležitost a je i značně ovlivněna výběrem odrůd, velikostí hrůbků, chemickou ochranou a předčasným ničením natě (Stevenson et al., 2001, Hausvater, 2014). Klíčící sporangia a zoospory infikují hlízy, v nichž se dále rozrůstá mycelium. Takovéto hlízy se stávají zdrojem primární infekce v následujícím roce. Rostliny však nejprve vyklíčí bez jakýchkoli příznaků a choroba se projeví až za příznivých podmínek (Vokál a kol., 2013).

3.3.4.2 Pohlavní rozmnožování

Oproti nepohlavnímu způsobu rozmnožování, u kterého se infekční cyklus opakuje vícekrát za vegetační období, je cyklus u pohlavního rozmnožování *P. infestans* dokončen pouze jedenkrát za vegetaci (Kessel et Förch, 2006).

Do 80. let 20. století, se předpokládala možnost pouze nepohlavního typu rozmnožování. Detekován byl pouze výskyt pohlavního typu A1. Jedním z míst, kde byly prokázány oba pohlavní typy, a mohlo tedy docházet k pohlavnímu rozmnožování, bylo Mexiko (Fry et Goodwin, 1997). Z Mexika byl patogen dovezen nejprve do Evropy, odkud byl následně rozšířen i do jiných částí světa. Přítomnost obou pohlavních typů nebyla tedy vázána pouze na Mexiko (Stevenson et al., 2001). Výskyt obou pohlavních typů byl v roce 2003 prokázán také v České republice (Mazáková et al., 2006).

Specifikem pohlavního rozmnožování je přítomnost dvou pohlavních typů, a to typu A1 a A2. Pokud se setkají hyfy obou pohlavních typů, dochází k tvorbě oospor, které vznikají spojením antheridií a oogonií (Juroch, 2011). Při této interakci obou typů dochází k tvorbě specifických feromonů, které výskyt těchto gametangií podpoří (Mazáková a Táborský, 2005). Oospory jsou díky velice silné buněčné stěně schopny přežít nepříznivé podmínky, jako je sucho a mráz. Mohou v půdě přečkávat i několik let (Stevenson et al., 2001). Bylo dokázáno, že oospory mohou po dobu 2 dnů přežít jak velice nízké teploty (do -80 °C), tak i teploty do 35 °C (Drenth et al., 1995).

U tohoto patogena byla dokonce prokázána polyploidie. Bylo zjištěno, že izoláty získané z Británie obsahovaly vyšší množství DNA, než tomu bylo u izolátů z Mexika. Tento vyšší počet chromozomových sad, konkrétně tetraploidie, umožňuje britským izolátům snadnější přizpůsobení se chladnějším podmínkám (Sansome, 1977).

K pohlavnímu rozmnožování může dojít tehdy, jsou-li vytvořeny vhodné podmínky pro rozvoj choroby. Spodní listy jsou infikovány oosporami, a jsou tak chráněny před fungicidním postříkem. Oospory jsou poté schopny přetrvávat na rostlině i za nepříznivých podmínek, dokud se vhodné podmínky nevytvoří (Drenth et al., 1995). Při tomto typu rozmnožování dochází k tvorbě geneticky variabilních populací *P. infestans*, které jsou schopny překonávat rezistenci hostitele (Cooke et al., 2003).

Životní cyklus patogena *P. infestans* je znázorněn v příloze č. 1 této práce.

3.3.5 Příznaky napadení a zdroj infekce

Zdrojem infekce je především infikovaná sadba. Dalším diskutovatelným zdrojem jsou odolné oospory přežívající v půdě, a v potaz musíme brát i plevelné brambory (Hausvater a kol., 2011a).

Příznaky choroby způsobené *P. infestans* se mohou rozvinout na celé rostlině bramboru (Stevenson et al., 2001). Je-li primárně napadena sadba, šíří se patogen z hlízy do rostliny systémově. Nejprve dochází k projevům choroby na vegetačních vrcholech, poté se infekce šíří přes řapíky k listům a i na stonek. Skvrny na listech způsobené sekundární infekcí jsou zpravidla vodnaté, šedo-černé, mohou i nekrotizovat a za příznivých vlhkých podmínek se vytváří na spodní straně listu, na rozhraní zdravého a napadeného pletiva, vrstva sporangioforů (Juroch, 2011). Výskyt lézí se mění v závislosti na stáří rostliny a na klimatických podmínkách.

Patogen může sporulovat i na stonku. Ke sporulaci však dochází pouze za příhodných podmínek, jako jsou vysoká relativní vlhkost (100 %) nebo vysoká vlhkost povrchu rostlin a teplota, která se pohybuje mezi 12–24 °C. Tyto podmínky by měly setrvat minimálně po dobu 8 hodin. Projevy infekce se objevují nejprve na apikálních částech rostliny nebo na rozmezí řapíku a stonku (Stevenson et al., 2001).

Příznaky choroby můžeme zpočátku zaznamenat pouze lokálně, kdy se infekce šíří pouze v okolí rostlin pocházejících z infikované sadby, teprve následně se setkáváme s rozsáhlejším výskytem (Juroch, 2011). Stevenson et al. (2001) dodávají, že je na rostlinách rajčete snadné zejména po zaschnutí skvrn zaměnit chorobu s příznaky způsobené *Botrytis* spp.

V případě infekce hlíz se příznaky choroby zpočátku objevují jako tmavé skvrny (Prokinová, 2014). Léze jsou na hlízách zprvu nepatrné a mají olovnatou barvu, později se mohou propadat (Juroch, 2011). Přejít mezi zdravým a napadeným pletivem je na první pohled patrný. Napadené pletivo není hladké a patogen může pronikat do různých hloubek hlízy (Stevenson, 2001). Při rozkrojení hlízy jsou patrné převážně po okrajích hnědo-červené skvrny (Prokinová, 2014). Sekundárně mohou být hlízy napadány dalšími houbovými patogeny, mezi kterými můžeme jmenovat *Fusarium* spp. a *Phytophthora erythroseptica* (Stevenson, 2001).

Pro lepší představu jsou pak v příloze č. 3 a 4 fotografie typických příznaků na listech bramboru.

3.4 Metody ochrany proti *Phytophthora infestans*

V dnešní době je nejvíce používána integrovaná ochrana proti *Phytophthora infestans*, která se zabývá zejména preventivními opatřeními proti patogenu, používáním fungicidních přípravků a ukončováním vegetace pomocí likvidace natě (Hausvater a Doležal, 2014). Fungicidní přípravky se prozatím nepodařilo eliminovat a jsou tak důležitou součástí ochrany. Ochrana by však měla být vždy cílená s přihlédnutím na průběh počasí a odrůdu (Vokál a kol., 2013).

Podrobný přehled přípravků na ochranu rostlin včetně biopesticidů je k dispozici v příloze č. 2 této práce.

3.4.1 Rezistentní šlechtění

Haverkort et al. (2008) tvrdí, že výdaje spojené s ochranou proti *P. infestans* jsou značně vysoké. V Nizozemsku byly dokonce náklady na samotné chemikálie stanoveny zhruba na 330 EUR na hektar za jedno vegetační období (Haverkort et al., 2008). Počet vstupů do porostu,

spojených s aplikací chemických přípravků na ochranu rostlin, se u pěstitelů ze severní Evropy pohybuje mezi 10–15 za vegetaci. Je proto velice výhodné šlechtit rezistentní rostliny vůči *P. infestans*. Omezí se tak počet nutných chemických zásahů proti chorobě a zmírní se tak i dopady na životní prostředí (Jones et al., 2014).

Existují dva druhy rezistence bramboru vůči *P. infestans* (Sedlák a kol., 2005). První z nich je vertikální rasově specifická rezistence, která je charakteristická specifitou pouze proti určité rase. Řízení tohoto typu rezistence je podmíněno majorgenem, tedy genem velkého účinku. Tento typ rezistence je založen na teorii „gen proti genu“, kde je gen rezistence hostitele aktivován genem avirulence patogena (Věchet, 2012). Druh *Solanum demissum* Lindl. posloužil pro účely šlechtění *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, jako zdroj vertikální rezistence proti *P. infestans* (Wastie, 1991). Na majorgenem řízenou rezistenci nemají vliv vnější podmínky (Chloupek, 2008). Na základě této rezistence bylo klasifikováno 11 R-genů (Malcolmson et Black, 1966).

Dále existuje rasově nespecifická horizontální rezistence, která je řízena větším počtem genů (Ross, 1986). Rostliny jsou schopny reagovat na všechny rasy patogena. Tento typ rezistence je však složitý, protože je ovlivňován vnějšími podmínkami (Věchet, 2012). Chloupek (2008) dodává, že úroveň této rezistence je nižší, avšak pokud dojde ke vzniku nových ras, nedochází z pravidla k jejímu překonávání.

Podle Jurocha (2011) nejsou momentálně v České republice pěstovány odrůdy brambor, které by byly záměrně šlechtěny na rezistenci vůči *P. infestans*.

3.4.2 Nechemické metody

3.4.2.1 Preventivní opatření

Správně zvolená pěstitelská opatření zaručují omezení výskytu *P. infestans*. Jedná se zejména o preventivní zásahy a následně vhodně volenou posklizňovou manipulaci.

Výběr odrůdy je pro začátek pěstování velice důležitý. Měli by být vybírány kvalitní odolné odrůdy proti *P. infestans*, které jsou zároveň vhodné pro danou pěstitelskou plochu. Není však pravidlem, že jsou vysoce kvalitní odrůdy i ty nejodolnější. Důležité je také rozlišit, která odrůda je náchylnější k napadení nati, a která k napadení hlíz, a volit dle toho fungicidní ochranu (Hausvater a Doležal, 2014).

Dalším důležitým aspektem je volba pozemku, která je velmi podstatná v prevenci proti danému patogenu. Měly by být voleny pozemky, které nejsou zastíněné, vlhké a utužené. Zvláště citlivé odrůdy by měly být pěstovány ve vhodném prostředí (Vokál a kol., 2013).

Biologická příprava sadby zahrnuje procesy, které urychlují její vzcházení. Touto činností se při epidemickém šíření choroby urychluje vzcházení sadby a přináší tak zvýšený výnos plodiny (Hausvater a Doležal, 2014).

Podstatným prvkem zapojeného a silného porostu je správná výživa. Rostliny, které nejsou dostatečně vyživeny, nebo naopak mají některých prvků přebytek, snadněji odolávají napadení (Hausvater a Doležal, 2014). Podle Vokála a kol. (2013) je klíčová i přítomnost přijatelného hořčíku.

Úprava hrůbků má zásadní úlohu při ochraně hlíz. Je důležité jejich správné a dostatečné nahrnutí. Půda zde působí, jako ochrana před kontaktem spor a hlíz (Vokál a kol., 2013).

Předsklizňová opatření zahrnují desikaci, nebo porušení natě. Ke kontaminaci hlíz může docházet kontaktem s infikovanou natí nebo přímo ze sklízecího stroje. Mechanické poškození hlíz navíc zvyšuje riziko napadení. Pokud se před sklizní zjistí, že jsou napadeny hlízy, posune se termín sklizně. Silně napadené hlízy se pak skladují na místech pro ně určených a následně se třídí. Bramborové hlízy by se měly ukládat do větraných skladů (Hausvater a Doležal, 2014).

3.4.2.2 Ukončení vegetace likvidací natě

Účinnou ochranou před napadením hlíz je likvidace natě, a to buď mechanicky, nebo chemicky. Je tak ukončena vegetace a sníženo riziko napadení hlíz. Obecně se rozhoduje o ukončení vegetace likvidací natě, jeli napadeno 5–20 % nadzemních částí rostlin. K ukončení vegetace se však přistupuje s přihlédnutím na očekávaný průběh počasí (Čepl a kol., 2009).

3.4.3 Chemické metody

Fungicidní ochrana proti *P. infestans* si klade za cíl zabránit infekci natě a rozšíření původce choroby dále v porostu. Snahou je také zamezit infekci hlíz. V současné době je na trhu k dispozici 50 přípravků (aktuálně dle Eagri (2017) = 78) na ochranu proti *P. infestans*, které obsahují kolem 21 (aktuálně dle Eagri (2017) = 17) účinných látek. Je však důležité dodržovat antirezistentní strategii a střídat tedy příslušné účinné látky (Hausvater a Doležal, 2014).

Termín první aplikace fungicidu se stanovuje dle prognózy výskytu patogena, nebo na základě vývoje porostu. Ošetření se opakuje na základě doporučení na etiketě. Je však důležité sledovat průběh počasí a za chladnějšího a deštivějšího průběhu aplikovat přípravek častěji. Zředění přípravku vodou by mělo být 400 l/ha a více (Hausvater a kol., 2011a).

První aplikace fungicidu se provádí jako prevence proti dané chorobě a využívají se zpravidla kontaktní fungicidy například na bázi metiramu nebo mancozebu. Následující postřik se provádí před a na počátku propuknutí infekce. Nejúčinnějšími přípravky pro toto období jsou kontaktní fungicidy, dále pak fungicidy systémové a lokálně systémové. Poslední aplikace fungicidů by měla probíhat ke konci vegetace, kdy by se ochrana měla cílit především na hlízy (Vokál a kol., 2013).

3.4.4 Prognóza a signalizace výskytu

Prognóza výskytu choroby zahrnuje první včasné ošetření, které by mělo být v první řadě preventivní. Základem pro určení počátečního ošetření je využití negativní prognózy, nebo různých prognostických metod (Juroch, 2011).

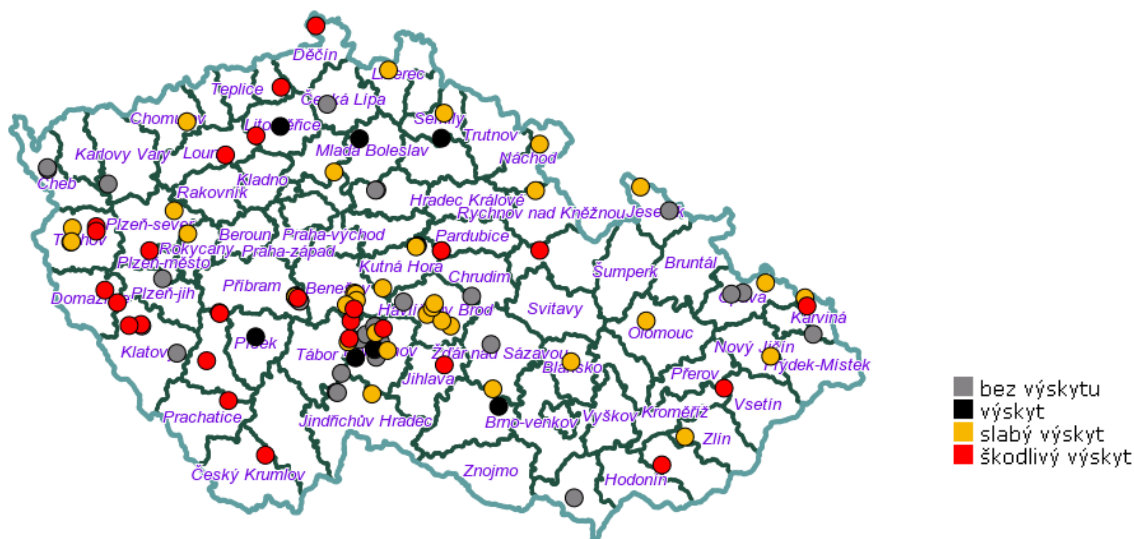
Metoda negativní prognózy bere v úvahu data spojená s klimatickými podmínkami ve vztahu k *P. infestans*. Určuje období, kdy by se choroba neměla v porostu objevit (Iglesias et al., 2010). Další metodou spojenou se sledováním prvního výskytu choroby je počítačový model BLITECAST, který umožňuje i stanovení jejího následného šíření. Zohledňuje data týkající se srážek, teploty, vlhkosti a udává i možnost vhodné volby a termínu aplikace fungicidního ošetření (Táborský a Doležal, 2006). V neposlední řadě je možné jmenovat model zvaný LATEBLIGHT, který umožňuje sledovat vývoj počasí, vývojové stadium hostitelské rostliny a simuluje aplikaci fungicidního postřiku (Andrade-Piedra et al., 2005).

Na základě negativní prognózy výskytu patogena se provádí signalizace prvního ošetření. První ošetření na základě signalizace se provádí, dosáhne-li hodnota kritického čísla 150. Jedná se zejména o ošetření porostů v místech náchylných ke vzniku infekce a u méně odolných odrůd, a to buď na základě prognostických metod, nebo v závislosti na vývojové fázi rostliny (Juroch, 2011).

Na obrázku č. 1 je znázorněn výskyt patogena *P. infestans* na bramboru v České republice. Je zde zobrazena sezóna 2015–2016, tj. období od 1. 10. 2015 do 30. 9. 2016. Škodlivý výskyt byl zaznamenán v Plzeňském, Ústeckém a Jihočeském kraji. Dále byl škodlivý výskyt registrován v okresech Benešov, Příbram, Ústí nad Orlicí, Pardubice, Karviná, Vsetín,

Uherské Hradiště, Jihlava, Pelhřimov, Tábor a Benešov. Bez výskytu pak byl například Karlovarský kraj.

Obrázek č. 1: Mapa výskytu *P. infestans* za období 2015–2016



(Zdroj: <http://eagri.cz/public/app/srsmapa/krok1-3.jsf>)

3.5 Botanické pesticidy

Největší význam na snížení produkce mají plevele, které mohou způsobit ztráty na výnosech až 34 %. Ztráty způsobené škůdci se pohybují okolo 18 % a nejméně s 16 % ovlivňují produkci ostatní patogeny (Oerke, 2006).

Zelená revoluce odstartovala používání syntetických přípravků na ochranu rostlin (Gupta et al., 2011). Navzdory tomu, že bylo jejich používání účinné a jednoduché, měly a mají tyto látky i své škodlivé účinky. V současné době vyplývají na povrch obavy z používání chemických přípravků, což dává novou příležitost vzniku nových botanických pesticidů (Dewhurst, 2001).

Oproti chemickým pesticidům se pesticidy botanické odlišují celou řadou výhod. Největší předností je, že vykazují velice nízkou toxicitu pro savce a jsou tak velice šetrné ke zdraví a životnímu prostředí. Neprokázal se také žádný vznik rezistence organismů k těmto přípravkům. Jsou velice šetrné k necílovým organismům a neovlivňují následnou kvalitu semen (Prakash et Rao, 1997). Botanické pesticidy se tak mohou jednoduše aplikovat nejen v rozvojových zemích jako náhrada pesticidů syntetických (Gupta et al., 2011). Pavela (2011) však dodává, že používání botanických pesticidů je poměrně finančně náročné.

3.5.1 Rozdělení botanických pesticidů

a) Botanické pesticidy první generace:

Jedná se o neselektivní látky s insekticidním účinkem používané k ochraně rostlin. Převážně se tyto látky používají v uzavřených prostorách, kde nehrozí zasažení necílových druhů organismů. Tyto látky jsou jedny z nejstarších a také velice účinných pesticidů. (účinné látky: *Pyretrum*, *Nikotin*, *Rotenon*, *Ryanodine*, *Veratrin*, *Quassin*, rostlinné oleje a mýdla)

b) Botanické pesticidy druhé generace:

Patří mezi selektivní pesticidní přípravky na ochranu rostlin se širokým spektrem účinku. Vývoj těchto přípravků započal od poloviny 20. století a soustředil se zejména na snížení zátěže životního prostředí a vlivu na zdraví člověka. Pozornost byla věnována i univerzálnosti přípravku, a to hlavně s přihlédnutím na jejich účinnost jak proti houbovým, bakteriálním, tak i hmyzím škůdcům. (účinné látky: *Azadirachtin*, *Karanjin*, *Tymol*, *Kuraridin* aj.)

c) Botanické pesticidy třetí generace:

Jsou to nové látky převážně s preventivním charakterem účinku. Zatím jsou však jen ve fázi vývoje. (účinné látky: kyselina salicylová, extrakt z *Urtica urens* aj.)

(Pavela, 2011)

3.6 Esenciální oleje

Z aromatických rostlin se získává celá řada účinných látek, mezi kterými můžeme jmenovat polyfenoly, terpeny i alkaloidy. Nejvýznamnější skupinou jsou však aromatické uhlovodíky, které můžeme obecně nazývat esenciálními oleji (Pavela, 2011).

V posledních letech se stále více mluví o esenciálních olejích, a to zejména díky jejich antimikrobiálním, insekticidním a fungicidním účinkům. Oproti chemickým přípravkům nezatěžují životní prostředí a jsou šetrné ke zdraví člověka (Pavela, 2011). Uplatňují se také v kosmetickém, potravinářském a farmaceutickém průmyslu (Bacílková a Paulusová, 2012).

3.6.1 Získávání esenciálních olejů

Izolace esenciálních olejů je možná z vonných rostlin, které obvykle pocházejí ze zemí s mírným až teplým klimatem. Hustota esenciálních olejů je obecně nižší než u vody, ale je možné je rozpouštět v tucích a organických rozpouštědlech. Získávání olejů může probíhat

prakticky ze všech rostlinných částí – listy, květy, plody, kůra aj. (Bakkali et al., 2008). Bacílková a Paulusová (2012) dodávají, že smysl silic v rostlinách nebyl ještě zcela popsán, jsou však považovány jako lákadla hmyzu, rovněž usměrňují výdej vody rostlinou a působí proti nepříznivým organismům.

Metody získávání olejů se volí dle účelu jejich následného využití. Obvykle se však extrahují destilací (hydrodestilací, destilací vodní parou, empyreumatickou destilací), extrakcí pomocí tuků, extrakcí pomocí nepolárních rozpouštědel a lisováním (Bacílková a Paulusová, 2012).

3.6.1.1 Lisování

Lisování je metoda extrakce olejů, která je prováděna stlačením rostlinné části. Nejúčinnějším případem extrakce je, když je účinná látka přítomna v povrchových částech rostlinného materiálu. Z takto získané silice se poté odstředivou silou oddělí esenciální olej (Lawrence, 1995).

3.6.1.2 Extrakce pomocí tuků

Tento typ izolace silic se provádí převážně u rostlin, kde je koncentrace silic příliš malá. Extrakce se provádí tak, že se nasbírají květy rostlin, které se rozprostírou na skleněnou tabuli pokrytou vrstvou tuku. Po 1–3 dnech se květy vymění za nové a tuk, který je nasycený silicemi, je extrahován alkoholem. Další možností je smíchání rostlinných částí s tukem a následné postupné zahřívání směsi. Po vylouhování se odstraní části rostlin a obsažené silice se přesunou do alkoholu, kde dochází i k celkovému zahuštění směsi (Bacílková a Paulusová, 2012).

3.6.1.3 Extrakce nepolárními rozpouštědly

Pro tento typ izolace se uplatňuje isohehexan, petrolether, nebo benzen. K extrakci silic dochází pomocí teplého alkoholu. Tento typ izolace je však velice finančně náročný a využívá se poměrně zřídka. Uplatňuje se především u rostlin s nízkým obsahem vonných látek, zejména při výrobě parfémů (Bacílková a Paulusová, 2012).

3.6.1.4 Hydrodestilace

Hydrodestilace je jednou z nejstarších a často využívaných metod získávání rostlinných silic. Jde o ponoření rostlinné části do vody a přivedení této směsi k varu. Olej je dále extrahován vodní parou a následně je zkondenzován zpět do vody, kde je snadno oddělitelný od vodné fáze. Problémem jsou však oleje rozpustné ve vodě, které musí být z destilátu

převedeny dalšími kroky (Salvador et Chisvert, 2007). Bacílková a Paulusová (2012) dodávají, že je tento způsob velice šetrný, neboť teplota nepřesahuje 100 °C.

3.6.1.5 Destilace vodní parou

Tento typ extrakce esenciálních olejů patří mezi velice šetrné způsoby a je zvláště výhodný pro extrakci tepelně odolných silic (Salvador et Chisvert, 2007). K získávání oleje slouží destilační zařízení. V prvním kroku se připraví rostlinný materiál, který se vloží do nádrže. Do jiné části nádrže se nalije voda. Následně se začne zařízení zahřívat, dokud nevznikne vodní pára. Pára proniká k rostlinnému materiálu a uvolňuje silice. Takto vzniklá směs silic dále uniká spolu s parou do chladicího zařízení a obě látky se přirozeně oddělují tak, že je získán čistý esenciální olej. Olej musí být následně skladován v tmavé nádobě (Baser, et al., 2010).

3.6.1.6 Empyreumatická destilace

K tepelnému rozkladu dochází při zahřívání dřeva nebo pryskyřice bez přístupu vzduchu. U některých produktů tepelného rozkladu dochází k vytěkání a po následné kondenzaci se složky oddělují, jako vodná vrstva (spolu s methanolem, kyselinou octovou aj.) a dehet (guajakol, kresoly, xyleny a jiné). Složení empyreumatického oleje (dehtu) se mění v závislosti na destilované surovině. Použití olej nalézá zejména v dermatologii (Moravcová, 2006).

3.6.2 Mechanismus účinku

Podstatným znakem esenciálních olejů je jejich hydrofobnost. Tato vlastnost jim umožňuje začlenit se do lipidových struktur mitochondrií eukaryotických organismů a bakteriálních buněčných membrán. V nich esenciální oleje narušují membránovou strukturu a zvyšují buněčnou propustnost (Knobloch et al., 1986). Bacílková a Paulusová (2012) doplňují, že mechanismus účinku působení silic na mikroorganismy není ještě plně znám. Některé látky, které jsou rozpustné v tucích, ovlivňují enzymy v membránách a narušují dýchací řetězec. Jiné účinné látky navíc interferují s buněčným metabolismem a to tak, že poškozují syntézu nukleových kyselin, bílkovin a cukrů (Bakkali et al., 2008).

3.6.3 Biologický efekt esenciálních olejů

3.6.3.1 Cytotoxicita

Lipofilní charakter esenciálních olejů umožňuje procházet cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Při průchodu často dochází k porušení vrstev polysacharidů,

fosfolipidů a mastných kyselin, což způsobuje vyšší propustnost membrán. Často tak dochází ke ztrátě iontů, či dokonce k rozpadu celé buňky (Turina et al., 2006).

Některé esenciální oleje způsobují srážení cytoplazmy nebo dokonce destrukci samotných lipidových nebo proteinových struktur (Burt, 2004; Gustafson et al., 1998).

3.6.3.2 Fototoxicita

Byla zjištěna existence esenciálních olejů, ve kterých jsou přítomny fotoaktivní molekuly (např. fotokumariny). Pod UVA světlem může například docházet k navázání psoralenů na DNA za vzniku nebezpečných mutagenních a cytotoxických aduktů. K této situaci však ve tmě nedochází. Oleje do buněk pronikají bez narušení membrán, což je rozdíl oproti olejům cytotoxickým. V případě vystavení těchto buněk světlu však dochází k radikálové reakci, která má za následek vznik volných radikálů, které jsou pro buňku letální (Bakkali et al., 2008).

3.6.3.3 Jaderná mutagenita

Byly provedeny studie vlivu silic na různé organismy, které se týkají jaderné mutageneze. U žádného esenciálního oleje však nebyl účinek jaderné mutagenity potvrzen. Existuje však řada výjimek, mezi nimiž můžeme jmenovat olej z *Artemisia dracunculoides*, jež měl mutagenní vliv na *Bacillus subtilis*. Genotoxický vliv byl také zaznamenán u *Mentha spicata* a *Anethum graveolens* ve vztahu k *Drosophila melanogaster*. Dále vykazovaly slabší mutagenní efekt látky carvacrol, thymol a carvon (Bakkali et al., 2008).

3.6.3.4 Karcinogenita

U většiny esenciálních olejů se předpokládá jejich bezpečnost z hlediska karcinogenity. Bylo však zjištěno, že některé složky esenciálních olejů mohou sekundárně vyvolat rakovinné bujení (Guba, 2001).

3.6.3.5 Specifičnost

Specifičnost účinku jednotlivých esenciálních olejů je závislá na individuálním složení olejů. Dále se specifita účinku odvíjí od míry propustnosti membrán a ve způsobu vazby na buněčné receptory (Bakkali et al., 2005).

3.6.4 Vybrané druhy aromatických rostlin

Níže popsané druhy aromatických rostlin byly následně využity v rámci metodické části práce.

3.6.4.1 *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor

C. winterianus je vysoká tráva z čeledi *Poaceae*, původem pocházející z Indie a Asie. Má značné insekticidní a repelentní účinky (Singh, 2014). Aromatický olej se získává parní nebo vodní destilací z listů rostliny (Pavela, 2011). Účinnými látkami, které jsou v oleji zastoupeny v nejvyšším poměru, jsou: limonene (3,77 %), β -citronellal (34,17 %), citronellol (11,80 %), geraniol (18,51 %) a elemol (4,30 %) aj. (Adams, 2007). V pokusech byl zjištěn vliv oleje *C. winterianus* na inhibici klíčení spor *Fusarium solani* (da Cruz et al., 2015).

Současně také probíhají pokusy vlivu výtažků z této rostliny proti houbovým chorobám, bakteriálním chorobám a ostatním škodlivým organismům (Pavela, 2011).

3.6.4.2 Máta klasnatá (*Mentha spicata* L.)

Tato rostlina z čeledi *Lamiaceae* je atraktivní pro svou charakteristickou chuť a vůni. *M. spicata* je léčivá rostlina, která nachází široké uplatnění při pomoci proti žaludečním potížím. Má blahodárné účinky i na nervový systém (Pavela, 2011). Dhifi et al. (2013) zjistili, že olej z rostliny působil inhibičně proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Pozitivně se osvědčil například u rodu *Salmonella* sp. (Dhifi et al., 2013).

Mimo to byly také zjištěny její insekticidní a fungicidní účinky (Pavela, 2011). Hlavními složkami silice jsou carvone (70,72 %), limonene (15,27 %), menthol (1,65 %) aj. (Adams, 2007), které nacházejí uplatnění v ochraně rostlin. Úspěšně se olej používá například proti padlí, fusariozám a plísním (Pavela, 2011).

3.6.4.3 Mateřídouška obecná (*Thymus vulgaris* L.)

Jedná se o aromatickou rostlinu z čeledi *Lamiaceae*, jejíž esenciální olej se získává hydrodestilací. Druh *T. vulgaris* pochází zejména ze Středomoří, ale expandoval i do jiných částí Evropy. Často je veřejností používán jako bylinný čaj, koření a také jako léčivá rostlina. Silice získané z *T. vulgaris* se již velmi dlouho používají jako přírodní konzervační prostředek potravin, ale také k přírodním aromaterapiím (Imelouane et al., 2009). Účinnými složkami jsou zejména thymol (48,07 %), p-cymene (16,40 %), γ -terpinene (5,74 %), a linalool (4,68 %) aj. (Adams, 2007). Tyto látky mají antimikrobiální účinky převážně proti bakteriálním patogenům (Imelouane et al., 2009).

Hoyos et al. (2012) ve svých studiích zjistili, že *Thymus vulgaris* má pozitivní vliv na eliminaci patogena *Pseudocercospora griseola*. *T. vulgaris* působí také účinně proti

houbovému patogenu *Phytophthora infestans*, který způsobuje plíseň bramboru na rajčatech a bramborách (Soylu et al., 2006).

3.6.4.4 Pelargonie vonná (*Pelargonium graveolens* (Thunb.) L'Hér.)

Původ tohoto keře bychom hledali nejspíše v severní Africe, odkud se dále rozšířil do jiných částí světa. Nejvíce je druh *P. graveolens* známý jako dekorační květina (Blerot et al., 2016). Listy keře jsou pokryty žláznatými chloupky a pronikavě voní po růžích. Ve velké míře je díky svým aromatickým účinkům keř využíván v kosmetickém průmyslu a slouží i k výrobě parfémů (Peterson et al., 2006). Nejvíce zastoupenými účinnými látkami v *P. graveolens* jsou s 32,56 % citronellool, 14,92 % geraniol a 5,38 % isomethone (Adams, 2007).

Dříve byly extrakty hojně využívány k léčbě úplavice, hemeroidů, různých zánětů a dokonce i proti rakovině. Dnes má široké uplatnění například při léčbě cukrovky, žaludečních problémů, žloutenky aj. (Peterson et al., 2006). San Aye et Matsumoto (2011) dodávají, že kromě příznivého vlivu *P. graveolens* na lidské zdraví se extrakty z této rostliny osvědčily i proti *Rhizoctonia solani*.

3.6.4.5 *Litsea cubeba* (Lour.) Pers.

Jedná se o rostlinu z čeledi *Lauraceae* (Yang et al., 2010). Její esenciální olej obsahuje účinnou látku geranial (40,05 %), neral (31,44 %), limonene (11,58 %) aj. (Adams, 2007). Silice se používají pro svoji vůni například v kosmetice. Mimo jiné se olej osvědčil pro své antimikrobiální a insekticidní účinky.

Pozitivní vliv silice z *L. cubeba* byl prokázán proti *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *P. infestans* aj. (Yang et al., 2010).

3.6.4.6 Hřebíčkovce kořený (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry)

Rostlina hřebíčku se řadí do čeledi *Myrtaceae* a je pěstována v mnoha tropických zemích. Nejvyšší procentuální zastoupení účinné látky oleje má eugenol (Zheng, 1992).

Éterické oleje získávané z rostliny *S. aromaticum* jsou již velice dlouhou dobu využívány jak v potravinářství, tak i v kosmetickém a lékařském průmyslu. Mají velice široké uplatnění v boji proti celé řadě mikroorganismů (Park et al., 2007). Olej lze využít jako dochucovadlo nebo jako ingredience pro výrobu parfémů (Zheng et al., 1992). Využití ale také nalézá v lékařském průmyslu jako lék proti astmatu nebo jako antiseptický přípravek v dentistických

ordinacích (Cai et Wu, 1996). Rana et al. (2011) ve svých pokusech zjistili, že esenciální olej působí kurativně i proti *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus fumigates*.

Nana et al.(2015) zjistili, že olej získaný z *S. aromaticum* disponuje fungicidní aktivitou proti houbovému patogenu *Phytophthora megakarya*, který škodí na kokosových ořeších. Huang et Ho (1998) doplňují, že má příznivý vliv i na potlačení *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* aj.

3.6.4.7 Blahovičník citroníkový (*Eucalyptus citriodora* (Hook.) In T. L. Mitchell)

Rostlina *Eucalyptus citriodora* je vonný strom, který patří do čeledi *Myrtaceae*. Olej se získává z čerstvých nebo sušených listů a má velice široké uplatnění (Barbosa et al., 2016). Prokázalo se, že esenciální olej obsahuje 80,11 % β -citronellalu, 5,90 % citronellolu aj. (Adams, 2007).

Používání citronellalu se osvědčilo proti houbovým a bakteriálním chorobám (Pattnaik et al., 1995). Ve svých pokusech Silva et al. (2003) dokázali, že esenciální olej získaný z *Eucalyptus* ssp. má příznivý vliv na respirační a zánětlivé stavy a účinkuje dokonce i proti bolesti. Další využití nalézá v kosmetickém a potravinářském průmyslu (Silva et al., 2003). Mulyaningsih et al. (2011) provedli studii *E. citriodora* proti MDR (multidrugresistant) gram-negativním bakteriím (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), která se potvrdila jako účinná.

Maciel et al. (2010) dodávají, že esenciální olej má vliv i na hmyzího škůdce *Lutzomyia longipalpis*. Olej z *E. citriorora* se osvědčil i proti houbovým patogenům *Phytophthora cactorum* a *Cryponectria parasitica* (Lee et al., 2008).

3.6.4.8 Fenykl obecný (*Foeniculum vulgare* Mill.)

Rostlina *Foeniculum vulgare* spadající do čeledi *Apiaceae* patří mezi léčivé a aromatické druhy. Původním areálem výskytu je Středomoří, ale rozšířila se i do ostatních částí světa. Plodem jsou suchá semena sladké chuti, která nacházejí široké uplatnění (Rather et al., 2012). Nejvíce zastoupenou účinnou látkou je anethol (76,48 %), dále esenciální olej obsahuje limonene (5,68 %), fenchone (5,51 %), estragole (4,75 %) aj. (Adams, 2007).

Největší uplatnění mají semena *F. vulgare* jako dochucovadlo a koření (Rather et al., 2012). Používají se často i v humánní medicíně, kde se uplatňují zejména jako deflatulencia. Byly dokonce provedeny studie na zvířatech, kde byl sledován vliv výtažků z *F. vulgare*. Potvrdil se také vliv na léčbu zeleného zákalu a potencionální využití mají výtažky i jako

diuretikum nebo lék na snížení hypertenze (Agarwal et al., 2008). Bylo však zjištěno, že dlouhodobé používání látky estragolu může vyvolat kancerogenní účinky (Rather et al., 2012).

Olej z *F. vulgare* má akaricidní aktivitu proti *Dermatophagoides farinae* a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Lee, 2004). Ve své studii potvrdili Soylu et al. (2007) také účinnost tohoto esenciálního oleje proti růstu patogena *Sclerotinia sclerotiorum*. Zároveň došlo k inhibici sklerocií a hyf v půdě (Soylu et al., 2007). Použití oleje se také osvědčilo k inhibici růstu mycelia *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium graminearum* a *F. moniliforme* (Singh et al., 2006).

3.6.4.9 Levandule lékařská (*Lavandula angustifolia* Mill.)

Trvalka *Lavandula angustifolia* pochází původně z jižní Evropy a spadá do čeledi *Lamiaceae* (Shawl et Kumar, 2000). Pozitivních účinků si všimli již staří Řekové a Římané a obliba této rostliny přetrvala dodnes (Cavanagh et Wilkinson, 2002). Nejvíce zastoupenými složkami oleje jsou linalool (32,65 %) a linalylacetát (36,72 %) aj. (Adams, 2007).

Největší využití má tato rostlina v kosmetickém průmyslu a při výrobě parfémů. Často je olej využíván i pro své blahodárné terapeutické účely. Silice je možno získat jak z květů, tak listů, přičemž je jeho získání možné převážně parní destilací. Dále tento esenciální olej vyniká svými protizánětlivými účinky. Pozitivně působí i proti řadě mikroorganismů. (Cavanagh et Wilkinson, 2002). Lis-Balchin et Hart (1999) potvrzují též aktivitu proti křečím hladkého svalstva.

Olej získaný z *L. angustifolia* je významný i pro své akaricidní účinky (Perrucci et al., 1996). Ve svých výsledcích pak D'Auria et al. (2005) zjistili, že po aplikaci esenciálního oleje dochází k inhibici mycelia *Candida albicans*, a to od 0,125% koncentrace.

3.6.4.10 Bedrník anýz (*Pimpinella anisum* L.)

Rostlina *Pimpinella anisum* pochází původem z teplých oblastí Indie, Turecka a Íránu. Esenciální olej je získáván ze semen a je často využíván, jak při výrobě parfémů, tak v medicíně (Gülçin et al., 2003). Nejvíce (88,55 %) zastoupenou látkou je anethole (Adams, 2007).

Pourgholami et al. (1999) potvrdili ve svých studiích vliv esenciálního oleje získaného z *P. anisum* na snížení křečí. Mimo jiné má tento olej vliv na gynekologické problémy, příznivě působí proti astmatu a ulevuje od potíží spojených s trávením (Gülçin et al., 2003).

Studie Tunç et al. (2000) dokonce potvrdily 100% účinnost oleje proti potěmnikovi skladištnímu (*Tribolium confusum*) a zavíječi moučnémému (*Ephestia kuehniella*).

3.6.4.11 Rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis* L.)

Evropská rostlina z čeledi *Lamiaceae* pochází z Evropy a má řadu pozitivních účinků na lidské zdraví (Takayama et al., 2016). Dále se dá například využít v kosmetickém i potravinářském průmyslu nebo při výrobě parfémů (Miguel et al., 2007). Nejvyšší zastoupení mají látky eucalyptol (27,29 %), camphor (20,40 %) a α -pinene (17,76 %) (Adams, 2007).

Byla zjištěna antimikrobiální aktivita esenciálního oleje proti patogenům na potravinách. Pozitivní vliv byl sledován proti *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* aj. (Burt, 2004).

Isman et al. (2008) potvrdili insekticidní účinek proti *Pseudaletia unipuncta* a *Trichoplusia ni*. Da Silva Bomfim et al. (2015) zjistili, že má tento esenciální olej mimo jiné značné fungicidní účinky na růst mycelia *Fusarium verticillioides*, přičemž narušuje buněčnou stěnu patogena.

3.6.4.12 Šalvěj lékařská (*Salvia officinalis* L.)

Tato aromatická rostlina z čeledi *Lamiaceae* má široké uplatnění v potravinářském, kosmetickém i lékařském průmyslu (Chalchat et al., 1998). Příprava esenciálního oleje je možná hydrodestilací (Delamare et al., 2007). Nejvíce zastoupenými složkami v oleji jsou camphene (6,25 %), eucalyptol (10,48 %), α -thujone (21,44 %) a camphor (17,76 %) aj. (Adams, 2007).

Tento olej vykazuje antibakteriální, protizánětlivé a antifungální účinky. Značný vliv má na potlačení *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* aj.

Byl prokázán i fungistatický vliv na *Verticillium dahliae* a obdobné účinky měl olej i na *Penicillium aurantiogriseum*. Jako účinná se ověřila koncentrace 5 mg/l. Obdobné testy byly provedeny i proti patogenu *Alternaria alternata* (Rus et al., 2015).

4 Metodika

4.1 Sběr vzorků

V roce 2014 a 2016 byly v průběhu výskytu patogena na hostitelských rostlinách bramboru nasbírány vzorky pletiva listů s typickými příznaky plísně bramboru – šedohnědé skvrny, povlak sporangioforů na spodní straně listu. Sběr infikovaných vzorků rostlin byl proveden ve 4 krajích a ve 14 lokalitách. Lichožpeřené listy byly vloženy do mikrotenových sáčků, označeny a po převozu ihned zpracovány, případně do druhého dne uchovány v lednici při teplotě 4 °C.

4.2 Příprava média

K přípravě žitného agaru bylo použito 60 g žitných obilek, které byly nejprve povrchově desinfikovány pomocí 70% ethanolu a 20% Sava. Obilky byly poté důkladně propláchnuty destilovanou vodou (ddH₂O) a nasypány do misky, kam bylo přidáno dostatečné množství ddH₂O potřebné k jejich klíčení. Kapalina byla po 36 hodinách slita a ponechána pro další kroky přípravy média. Naklíčené obilky byly spolu s 350 ml ddH₂O rozmixovány a po dobu 3 hodin inkubovány ve vodní lázni (Memmert) při teplotě 50 °C. Takto připravená směs byla přefiltrována přes dvojvrstvou gázu a ke vzniklému filtrátu byla přilita uschovaná tekutina. Dále byl objem doplněn do 1 l destilovanou vodou a ke zředěnému filtrátu bylo přisypáno 15 g agaru a 20 g sacharózy (oboje Dr. Kulich Prarma). Závěrem byl agar sterilizován při teplotě 121 °C po dobu 20 minut v autoklávu (MLS 3780 Sanyo). Takto připravený agar bylo možné rozlít ve sterilních podmínkách flowboxu (Labculture Esco Class II Type A2) do Petriho misek (Gama).

4.3 Sporulace *P. infestans* na listu

Z infikovaných rostlin byly vystřiženy části listů, které byly vloženy do skleněných Petriho misek (vlhkých komůrek). Misky (průměr 90 mm) byly opatřeny 3 kruhovými filtračními papíry ovlhčenými ddH₂O. Sporulace patogena byla podpořena inkubací ve tmě při teplotě 16–18 °C v termostatu (Lovibond). Z dostatečně rozrostlých sporangioforů byla sporangia následně přeočkována na živné médium.

4.4 Izolace patogena

Z listů infikovaných patogenem *P. infestans*, jehož sporulace byla podpořena umístěním do vlhké komůrky, byla pomocí stereomikroskopu (Leica Zoom 2000) a sterilní jehly přenesena

sporangia patogena na živné médium v Petriho misce. Sporangia byla umístěna na agar v Petriho misce třikrát, ve tvaru trojúhelníku, aby byla zvýšena úspěšnost izolace. Misky byly následně označeny a důkladně zabaleny parafilmem. Zhruba po 10–14 dnech inkubace ve tmě při teplotě 16–18 °C (termostat) bylo rozrostlé mycelium použito k dalšímu přeočkování na nové živné médium.

Misky s narostlým myceliem byly z termostatu přeneseny do podmínek flow boxu, kde byly pomocí sterilního skalpelu vyříznuty špalíčky (5 × 5 mm) z okraje aktivně rostoucí kultury patogena. Špalíčky s myceliem byly vloženy na nové živné médium a misky byly opatřeny opět parafilmem. Petriho misky byly inkubovány v termostatu a zhruba po 14 dnech bylo možné sledovat nárůst mycelia. Tímto způsobem byly vzorky uchovávány a v případě další potřeby mohly být znovu přeočkovány.

4.5 Stanovení fungicidní aktivity esenciálních olejů

Vliv esenciálních olejů na růst mycelia patogena *P. infestans* byl zkoumán pomocí *in vitro* testu na agaru. Pro testování byly použity esenciální oleje získané z následujících rostlin:

esenciální olej z:	zkratka
<i>Cymbopogon winterianus</i>	CW
<i>Eucalyptus citriodora</i>	EC
<i>Foeniculum vulgare</i>	FV
<i>Lavandula angustifolia</i>	LA
<i>Litsea cubeba</i>	LC
<i>Mentha spicata</i>	MS
<i>Pelargonium graveolens</i>	PG
<i>Pimpinella anisum</i>	PA
<i>Rosmarinus officinalis</i>	RO
<i>Salvia officinalis</i>	SO
<i>Syzygium aromaticum</i>	SA
<i>Thymus vulgaris</i>	TV

Výše zmíněné éterické oleje byly zakoupeny od firmy Saloos. Pro zvýšení jejich rozpustnosti v agaru byl k olejům přidán v poměru 1:1 dimethylsulfoxid = DMSO (Sigma-Aldrich). Do živného média (žitný agar) byl po zchlazení pomocí pipety aplikován roztok esenciálního oleje spolu s DMSO. Test byl proveden ve třech opakováních. Pro každý izolát byla realizována kontrolní varianta, u které byl do agaru přidán pouze DMSO (0,1%). Agar byl

spolu s důkladně rozpuštěným esenciálním olejem rozlit do jednotlivých Petriho misek o průměru 90 mm.

Z aktivně rostoucích kultur jednotlivých izolátů byly korkovrtem (9 mm) vyříznuty terčíky, které byly vloženy do středu Petriho misek na agar. Zhruba po třech týdnech inkubace (tma, 16–18 °C), kdy mycelium izolátu na kontrolní variantě dosáhlo okraje misky, byl změřen růst mycelia i u varianty s esenciálním olejem. Narostlé mycelium bylo měřeno pomocí digitálního posuvného měřítka ve dvou směrech na sobě kolmých. Inhibice růstu mycelia u varianty obsahující esenciální olej byla vypočítána na základě porovnávání růstu mycelia na kontrolní variantě bez obsahu esenciálního oleje.

Inhibice růstu mycelia byla stanovena podle následujícího vzorce:

$$\text{Inhibice růstu [\%]} = 100 - \left[\left(\frac{mT}{mK} \right) \times 100 \right]$$

mT nárůst mycelia na testované variantě s esenciálním olejem [ϕ v mm]

mK nárůst mycelia na kontrolní variantě [ϕ v mm]

V první fázi pokusu byla použita 0,1 % (1000 μ l/ml) koncentrace esenciálních olejů. Oleje, které 100% neinhibovaly růst mycelia *P. infestans*, byly vyloučeny z dalšího testování.

4.6 Stanovení MIC

Účinné esenciální oleje, které vykazovaly 100% inhibiční účinek na růst mycelia izolátů patogena *P. infestans* při 0,1% koncentraci, byly podrobeny dalšímu testování s cílem stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC). Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace byla vytvořena koncentrační řada esenciálních olejů. Příslušný EO byl rozpuštěn v DMSO tak, aby po jeho rozpuštění v agaru byla vytvořena příslušná koncentrace: 0,1% (1000 μ l/l), 0,08% (800 μ l/l), 0,06% (600 μ l/l), 0,04% (400 μ l/l) a 0,02% (200 μ l/l). Kontrolní varianty obsahovaly pouze DMSO a testy byly opět provedeny ve třech opakováních. Po inkubaci byl u všech variant vyhodnocen růst mycelia.

Pro vyhodnocení získaných dat byl použit program Statistika – statistický test jednofaktorová ANOVA. Tento test znázornil závislost nárůstu mycelia *P. infestans*, na koncentraci esenciálního oleje. Pro porovnání všech esenciálních olejů a MIC, byla použita parametrická ANOVA s interakcemi.

Po získání výsledků byly u čtyř esenciálních olejů provedeny detailnější koncentrační řady k určení přesnější MIC. EO byl smíchán s DMSO tak, aby vznikly koncentrace, které jsou znázorněny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Koncentrační řady čtyř esenciálních olejů

TV		PG		CW		SA	
0,02%	200 µl/l	0,06%	600 µl/l	0,1%	1000 µl/l	0,02%	200 µl/l
0,025%	250 µl/l	0,065%	650 µl/l	0,105%	1050 µl/l	0,04%	400 µl/l
0,03%	300 µl/l	0,07%	700 µl/l	0,11%	1100 µl/l	0,06%	600 µl/l
0,035%	350 µl/l	0,075%	750 µl/l	0,115%	1150 µl/l	0,08%	800 µl/l
0,04%	400 µl/l	0,08%	800 µl/l	0,12%	1200 µl/l	0,1%	1000 µl/l

Získané hodnoty byly opět zpracovány pomocí analýzy rozptylu, kde byla použita jednofaktorová ANOVA.

4.7 Determinace pohlavních typů *P. infestans*

4.7.1 Izolace genomické DNA

Postup potřebný k získání dostatečného množství nukleové kyseliny v příslušné čistotě zahrnuje její izolaci z přirozeného materiálu. V první fázi byla provedena homogenizace mycelia příslušného izolátu *P. infestans*. Nejprve byla zchlazena třecí miska a třecí tlouček pomocí tekutého dusíku. Dále byl tekutý dusík použit i pro zmrazení mycelia *P. infestans*, které bylo následně seškrábáno z povrchu agarů, převedeno do třecí misky a dostatečně rozdrceno.

Genomická DNA byla extrahována pomocí GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) dle postupu výrobce. K ještě zmrzlému homogenizovanému biologickému materiálu bylo přidáno 375 µl lyzačního pufru [LA]. Po smíchání s LA pufrům byl homogenát převeden do mikrozkuřavky a bylo k němu připipetováno 50 µl lyzačního pufru [LB]. Obsah mikrozkuřavky byl pečlivě promíchán a mikrozkuřavka byla vložena na 10 minut do suchého termostatu (Biosan), kde byla inkubována při teplotě 65 °C. Následně bylo ke směsi přidáno 130 µl precipitačního pufru [PPT] a směs byla krátce promíchána otáčením v ruce a přendána na 5 minut na led. Mikrozkuřavka se směsí byla centrifugována (Schoeller Universal 320R Hettich) 5 minut při 14 000 × g. Centrifugací byla směs rozdělena na fáze, z čehož byl opatrně odpipetován horní supernatant do nové mikrozkuřavky s modrou filtrační kolonkou. Následovala centrifugace 1 minutu při 14 000 × g, kdy modrá kolonka zachytila nepotřebné buněčné zbytky. Modrá kolonka byla odstraněna a k filtrátu bylo přidáno 700 µl binding pufru [BIND] a vše bylo pipetou důkladně promícháno.

Mezitím byla připravena nová mikrozkušavka s červenou kolonkou, do které bylo napipetováno 500 μl column preparation solution [CPS], který slouží pro navázání DNA na povrch kolonky. Tato zkušavka byla centrifugována při $14\,000 \times g$ 1 minutu. Obsah mikrozkušavky byl po centrifugaci vylit.

V dalším kroku bylo napipetováno 700 μl směsi s binding puffem do mikrozkušavky s červenou kolonkou. Mikrozkušavka byla centrifugována 1 minutu a následně byl roztok profiltrovaný přes červenou kolonku vylit. Dále se postup opakoval i se zbytkem roztoku. Následně byla červená kolonka převedena do nové mikrozkušavky a bylo připipetováno 500 μl promývacího puffu [WASH]. Následovala centrifugace při $14\,000 \times g$, po dobu 1 minuty. Roztok WASH puffu, profiltrovaného na dno mikrozkušavky, byl vylit. Tento krok byl zopakován s tím rozdílem, že centrifugace trvala 3 minuty. Kolonka byla následně přendána do nové mikrozkušavky. Dále bylo připipetováno 120 μl (předehřátého na $65\text{ }^\circ\text{C}$) elučního puffu [ES]. Po 5 minutách inkubace při pokojové teplotě byla v následujícím kroku provedena centrifugace 1 minutu při $14\,000 \times g$. V posledním kroku byla červená kolonka odstraněna. Mikrozkušavka byla pečlivě popsána a uložena při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$ na pozdější použití.

Tento postup byl současně proveden pro všechny zkoumané izoláty patogena *Phytophthora infestans*.

4.7.2 PCR – polymerázová řetězová reakce

DNA získaná při izolaci z mycelia patogena *P. infestans* byla použita pro amplifikaci úseku DNA specifického pro oba pohlavní typy A1 a A2 pomocí PCR. Nejprve byla připravena reakční směs o celkovém objemu 25 μl :

<i>látka (zásobní koncentrace)</i>	<i>objem (finální koncentrace)</i>
ddH ₂ O	19,15 μl
puffr pro <i>Taq</i> polymerázu (10 \times) (Thermo Fisher Scientific)	2,5 μl (1 \times)
MgCl ₂ (25 mM) (Thermo Fisher Scientific)	1,5 μl (2,5 mM)
dNTP (25 mM) (Thermo Fisher Scientific).....	0,25 μl (0,25 mM každého)
primer mix (25 μM) (Sigma-Aldrich).....	0,4 μl (0,4 μM každého)
<i>Taq</i> polymeráza (5 U/ μl) (Thermo Fisher Scientific).....	0,2 μl (1 U)
templátová DNA	1 μl (cca 10–100 ng)

Tento postup byl zopakován pro všechny vzorky DNA. Mikrozkumavky byly následně přendány do termocykleru (Thermal cycler C1000).

Program PCR reakce započal počáteční denaturací, neboli rozvolněním dvouřetězcové DNA, která trvala 5 minut při 94 °C. Následovalo 29 cyklů, přičemž se každý skládal z 3 fází. Střídala se zde denaturace (při 94 °C, po dobu 1 min), dále annealing, neboli nasedání specifických primerů komplementárně na vlákno DNA (při 53 °C, po dobu 1 min) a polymerace, což je prodlužování komplementárního řetězce (72 °C, po dobu 1 min). Po dokončení všech cyklů byla PCR reakce zakončena konečnou polymerací, která trvala 4 min při 72 °C.

Použité primery (Judelson et al., 1995):

Vedoucí	W16-1	5'-AACACGCACAAGGCATATAAATGTA-3'
Reverzní	W16-2	5'-GCGTAATGTAGCGTAACAGCTCTC-3'

4.7.3 Gelová elektroforéza

K potvrzení přítomnosti DNA fragmentů byla použita horizontální gelová elektroforéza (Clever). Pro tyto účely byl připraven 1% agarózový gel. Gel byl připraven tak, že byl smíchán Tris-Borát-EDTA = TBE pufr (Sigma-Aldrich) (1×) s potřebným množstvím agarózy (Serva). K rozpuštění agarózy v pufru byla použita mikrovlnná trouba. Po následném zchlazení byl pro účely vizualizace fragmentů DNA přidán do gelu roztok ethidium bromidu (0.5 µg/ml). Důkladně rozmíchaný roztok byl nalit do elektroforetické vaničky, kam byl poté vložen i tvarující hřebínek tvořící po zaschnutí jamky. Takto připravený gel se nechal minimálně 30 minut zatuhnout. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vyjmut a vanička s gelem byla přendána do elektroforetické cely (Clever Scientific). Vše bylo zalito TBE pufrem (1×). Do jamek bylo vždy aplikováno 5 µl PCR produktu spolu s 2 µl barviva (6x DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific). Pro snadnější určení velikosti produktu byl vždy na začátek a konec aplikován do jamek hmotnostní standard (MassRuler™ DNA Ladder Low Range, Thermo Fisher Scientific). Elektroforetická cela byla nakonec uzavřena a separace DNA probíhala při napětí 5-8 V/cm. Přítomnost DNA fragmentů bylo možné pozorovat zhruba po 15 minutách pomocí UV transiluminátoru.

4.7.4 Restrikční štěpení

Jelikož jsou primery použité pro PCR specifické pro oba pohlavní typy, bylo ještě potřeba provést restrikční štěpení namnožených úseků DNA. Restrikční směs byla připravena smícháním:

<i>látka (zásobní koncentrace)</i>	<i>objem (finální koncentrace)</i>
PCR produkt	10 μ l
Y ⁺ /tango pufru (10 \times) (Thermo Fisher Scientific).....	1,2 μ l (1 \times)
enzym <i>Hae</i> III (<i>Bsu</i> RI) (10 U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific)	1 μ l (10 U)

Takto připravená směs byla vortexována (IKA-Genius 3), následně krátce odstředěna a inkubována přes noc při teplotě 37 °C. Restrikční produkty byly separovány pomocí horizontální elektroforézy s 1,5% agarózovým gelem.

5 Výsledky

5.1 Sběr vzorků a izolace patogena *Phytophthora infestans*

Vzorky infikovaných pletiv pocházely ze čtyř krajů. V roce 2014 se jednalo o 10 izolátů z kraje Vysočina (Veselý Žďár, Nové Dvory, Pohled, Valečov) a Středočeského kraje (Čelákovice, Semice). Vzorky byly označeny jako: VŽ 13/14, VŽ 14/14, ND 2/14, P 1/14, V1 1/14, V3 1/14, Č 1/14, Č 3/14, S 1/14 a S 11/14. V roce 2016 bylo získáno dalších 10 vzorků, a to z Plzeňského kraje (Velhartice, Malý Bor), kraje Vysočina (Domanínek, Lukavec, Želiv, Lípa, Valečov, Veselý Žďár), Středočeského kraje (Únětice) a z Hlavního města Prahy (Praha-Suchdol). Tyto vzorky byly označeny, jako MB 1/16, D 5/16, S 1/16, Lu 7/16, Ž 2/16, L 16/16, V1 3/16, VŽ 1/16, Ve 5/16 a U 2/16.

Tabulka č. 2: Původ vzorků *P. infestans*

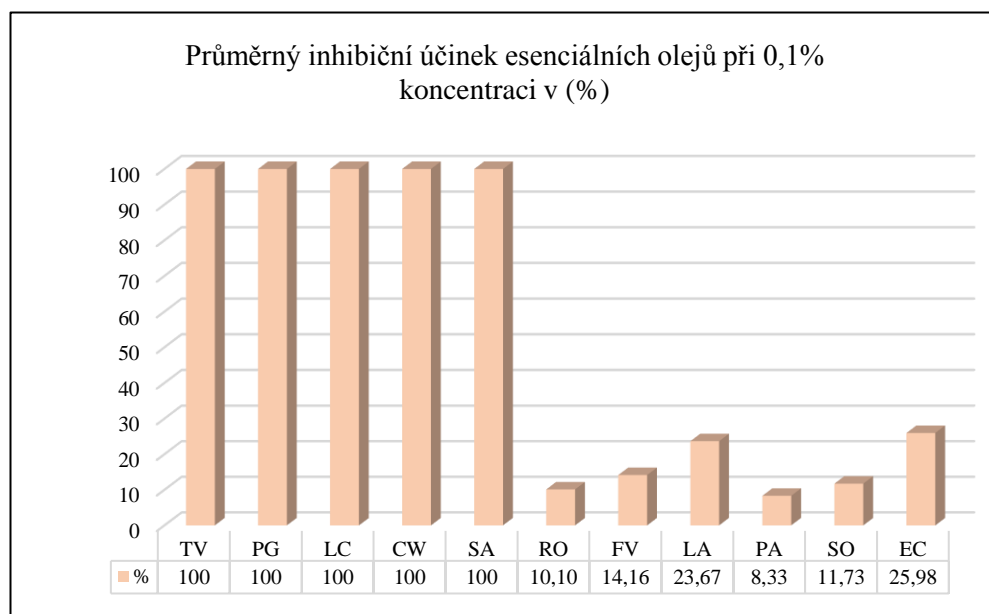
izolát	lokalita/kraj	datum sběru	rostlina/odruža	původ izolátu	pohlavní typ
VŽ 13/14	Veselý Žďár, kraj Vysočina	21.7.2014	B / N	list	A1
VŽ 14/14	Veselý Žďár, kraj Vysočina	21.7.2014	B / N	list	A1
ND 2/14	Nové Dvory, kraj Vysočina	21.7.2014	B / N	list	A2
P 1/14	Pohled, kraj Vysočina	21.7.2014	B / N	list	A2
V1 1/14	Valečov, kraj Vysočina	21.7.2014	B / Flavia	list	A1
V3 1/14	Valečov, kraj Vysočina	18.8.2014	B / Žofie	list	A2
Č 1/14	Čelákovice, Středočeský kraj	3.11.2014	B (výdrol) / N	list	A2
Č 3/14	Čelákovice, Středočeský kraj	3.11.2014	B / N	list	A2
S 1/14	Semice, Středočeský kraj	3.11.2014	B (výdrol) / N	list	A2
S 11/14	Semice, Středočeský kraj	3.11.2014	B (výdrol) / N	list	A2
MB 1/16	Malý Bor, Plzeňský kraj	27.6.2016	B / Eurogrande	list	A2
D 5/16	Domanínek, kraj Vysočina	1.7.2016	B / Alice	list	A1
S 1/16	Praha-Suchdol, hlavní město Praha	4.7.2016	B / Berber	list	A1
Lu 7/16	Lukavec, kraj Vysočina	20.7.2016	B / Antoaneta	list	A2
Ž 2/16	Želiv, kraj Vysočina	20.7.2016	B / Carrera	list	A2
L 16/16	Lípa, kraj Vysočina	20.7.2016	B / Granola	list	A2
V1 3/16	Valečov, kraj Vysočina	20.7.2016	B / Finka	list	A1
VŽ 1/16	Veselý Žďár, kraj Vysočina	7.8.2016	B / N	list	A1
Ve 5/16	Velhartice, Plzeňský kraj	9.8.2016	B / Bionta	list	A2
U 2/16	Únětice, Středočeský kraj	1.9.2016	R / N	list	A1

Z tabulky č. 2 je patrné, že většina vzorků byla získána z infikovaných rostlin bramboru mimo izolátu U2/16, který byl získán z infikované rostliny rajčete. Veškeré izoláty pocházely z listů napadených rostlin a u některých z nich byla známa i odrůda.

5.2 Stanovení aktivity esenciálních olejů

V první fázi pokusu byl stanoven průměrný inhibiční účinek esenciálních olejů při 0,1% koncentraci. Pro testování bylo využito 10 izolátů získaných v roce 2014 a testy byly provedeny vždy ve třech opakováních. Esenciální oleje, které inhibovaly mycelium ze 100 %, byly využity v další části experimentu. Oleje, které hranice 100 % nedosáhly, byly z následujícího testování vyřazeny. Průměrný inhibiční účinek jednotlivých esenciálních olejů při 0,1% koncentraci je znázorněn v grafu č. 1.

Graf č. 1: Průměrný inhibiční účinek esenciálních olejů



Z výsledků vyplývá, že nejúčinněji inhibovaly mycelium *P. infestans* esenciální oleje získané z *Thymus vulgaris* (TV), *Pelargonium graveolens* (PG), *Litsea cubeba* (LC), *Cymbopogon winterianus* (CW) a *Syzygium aromaticum* (SA). Průměrný inhibiční účinek byl u všech zmíněných 100% (příloha č. 7). Esenciální olej z *Eucalyptus citriodora* (EC) inhiboval mycelium z 25,98 %. Průměrný inhibiční účinek esenciálního oleje z *Lavandula angustigolia* (LA) dosáhl pouze 23,67 %. Nejmenší antifungální vliv měly oleje z *Foeniculum vulgare* (FV) (14,16 %), *Salvia officinalis* (SO) (11,73 %), *Roramarinus officinalis* (RO) (10,10 %) a *Pimpinella anisum* (PA) (8,33 %).

Esenciální oleje z *E. citriodora*, *L. angustigolia*, *F. vulgare*, *S. officinalis*, *R. officinalis* a *P. anisum* byly z dalších testů, týkajících se stanovení minimální inhibiční koncentrace, vyřazeny. Nárůst mycelia je při použití těchto olejů znázorněn v příloze č. 6.

5.3 Stanovení minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů

V další části experimentu byly u účinných esenciálních olejů vytvořeny koncentrační řady, sloužící k určení minimální inhibiční koncentrace jednotlivých olejů. Olej byl vždy smíchán s DMSO tak, aby vznikla koncentrace: 0,1% (1000 $\mu\text{l/l}$), 0,08% (800 $\mu\text{l/l}$), 0,06% (600 $\mu\text{l/l}$), 0,04% (400 $\mu\text{l/l}$) a 0,02% (200 $\mu\text{l/l}$). Testy byly provedeny na izolátech získaných z roku 2014. Do experimentu byl také navíc zařazen EO získaný z *Mentha spicata*, kvůli jeho potenciální účinnosti, zjištěné na základě souběžně probíhajících pokusů. Pro testování vlivu *M. spicata* na inhibici mycelia byly použity izoláty z roku 2016. Minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů jsou pro každý izolát (2014) znázorněny v tabulce č. 3. Výsledné MIC pro *M. spicata* jsou poté znázorněny v tabulce č. 4.

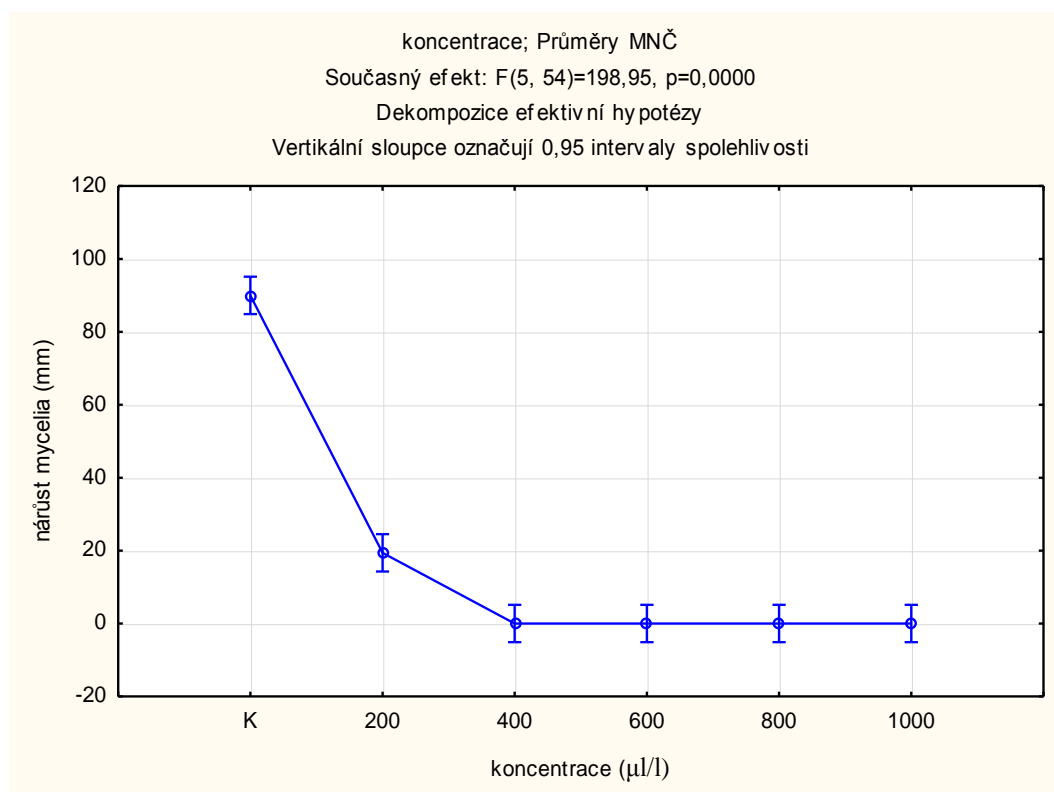
Tabulka č. 3: Minimální inhibiční koncentrace jednotlivých esenciálních olejů

minimální inhibiční koncentrace (MIC) – [$\mu\text{l/l}$]					
izolát	TV	PG	CW	SA	LC
VŽ 13/14	400	800	1000	600	400
ND 2/14	400	800	1000	400	400
S 11/14	400	800	1000	600	600
Č 1/14	400	800	1000	600	1000
VŽ 14/14	400	800	1000	600	1000
P 1/14	400	800	1000	800	600
S 1/14	400	800	1000	600	400
Č 3/14	400	800	1000	400	600
V3 1/14	400	800	1000	600	1000
V 11/14	400	800	1000	600	600

a) *Thymus vulgaris*

Jak vyplývá z grafu č. 2, esenciální olej z *T. vulgaris* vykazoval silnou fungicidní aktivitu. Nárůst mycelia byl zpozorován až u 0,02% koncentrace. U oleje z *T. vulgaris* byla tedy MIC stanovena na 0,04 % u všech izolátů *P. infestans*. Příklad koncentrační řady u izolátu ND 2/14 je znázorněn v příloze č. 8.

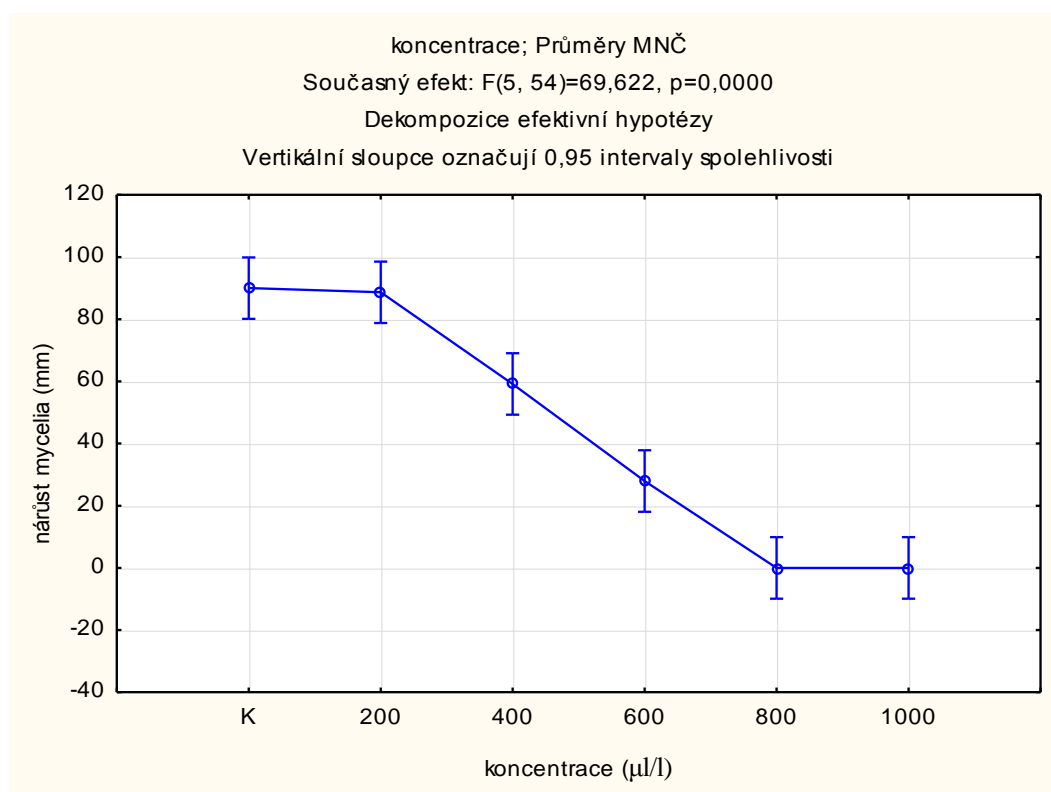
Graf č. 2: Koncentrační řada u esence z *T. vulgaris*



b) *Pelargonium graveolens*

V testech provedených na esenciálním oleji z *P. graveolens* byl registrován nárůst mycelia *P. infestans* u 0,06% koncentrace. Z grafu č. 3 je zřejmé, že olej z *P. graveolens* vykazoval minimální inhibiční aktivitu při 0,08% koncentraci. Pro lepší představu je v příloze č. 9 znázorněna koncentrační řada izolátu VŽ 13/14.

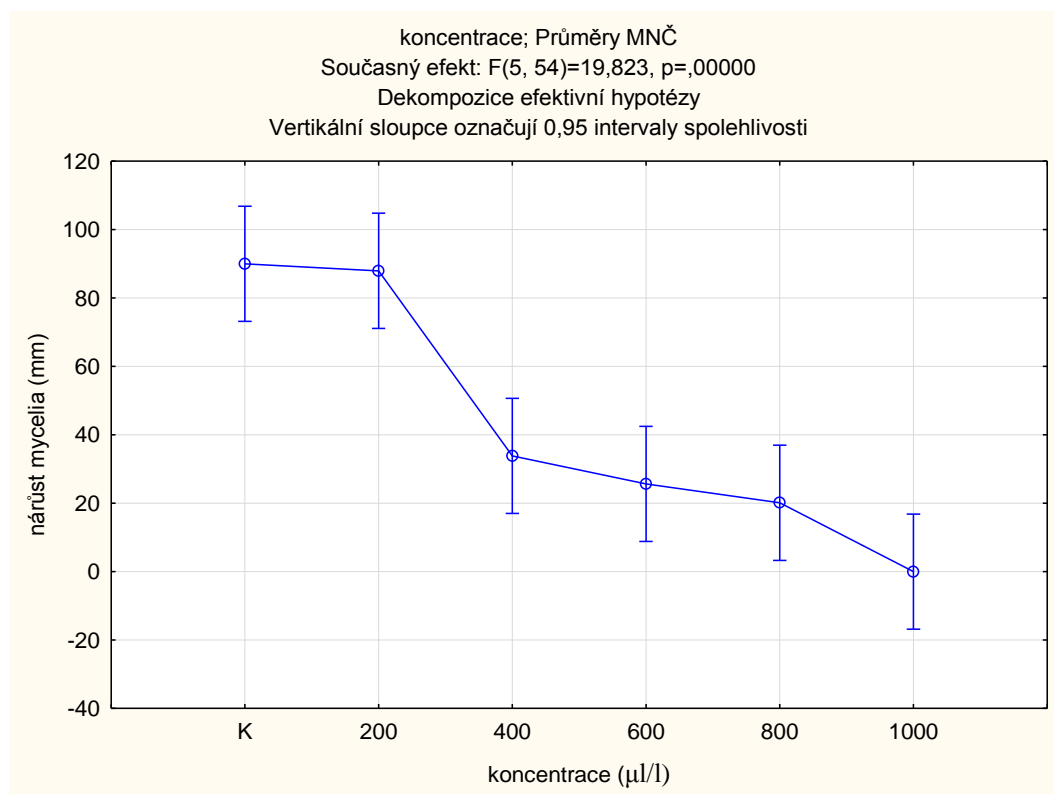
Graf č. 3: Koncentrační řada u esence z *P. graveolens*



c) *Litsea cubeba*

U oleje získaného z *L. cubeba* vyšly MIC rozdílně v rámci jednotlivých izolátů (viz graf č. 4). U *L. cubeba* nastala minimální inhibice mycelia při 0,04% koncentraci u izolátů VŽ 13/14, ND 2/14 a S 1/14 (S1/14 – viz příloha č. 12). U izolátů Č 1/14, VŽ 14/14 a V3 1/14 byla však MIC 0,1%. U zbytku izolátů byla stanovena MIC na 0,06% (graf č. 4).

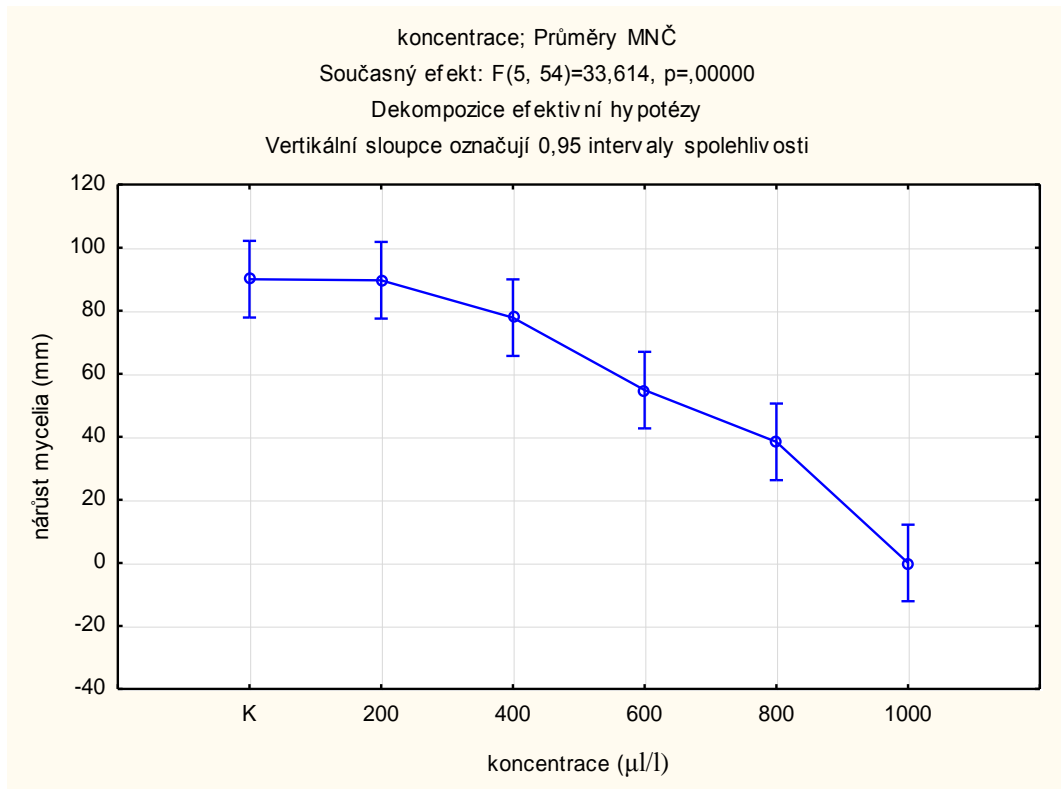
Graf č. 4: Koncentrační řada u esence z *L. cubeba*



d) *Cymbopogon winterianus*

Nejméně účinný byl z této fáze testování olej získaný z *C. winterianus*. Jeho MIC, proti *P. infestans*, byla u všech testovaných izolátů 0,1%. Nárůst mycelia v závislosti na koncentraci je pro představu znázorněn v grafu č. 5. V příloze č. 10 této práce, je pak možno shlédnout koncentrační řadu izolátu VŽ3 1/14.

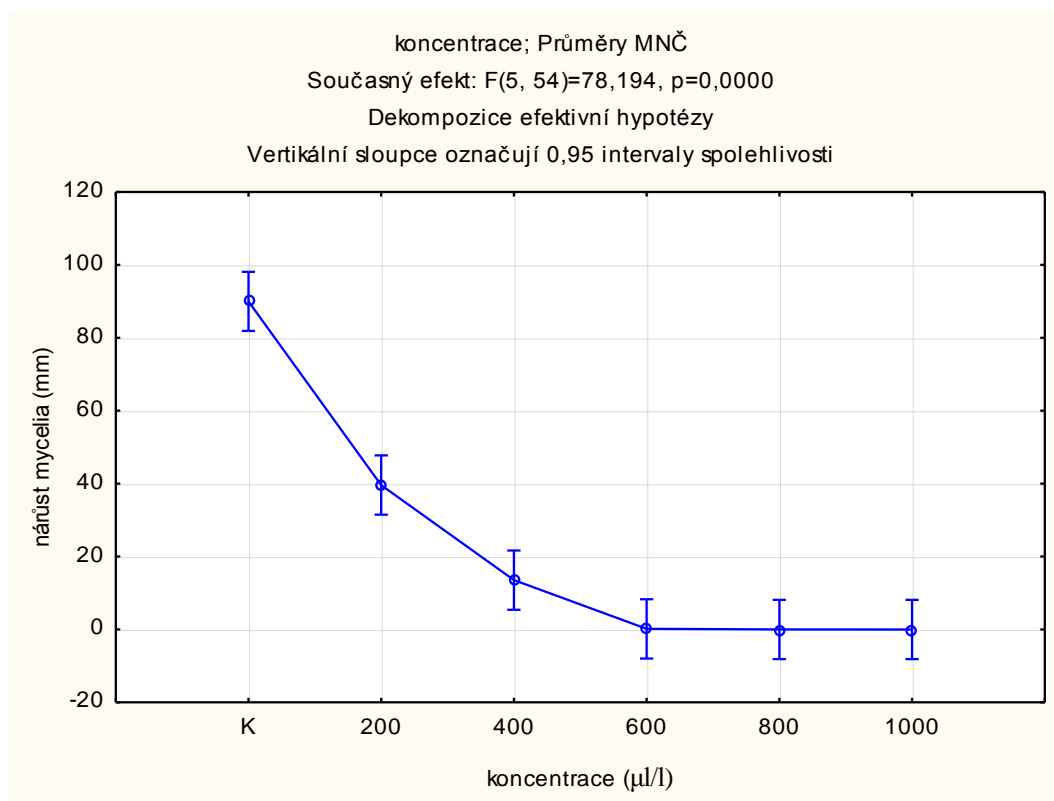
Graf č. 5: Koncentrační řada u esence z *C. winterianus*



e) *Syzygium aromaticum*

Nejnižší minimální inhibiční koncentrace byla u oleje z *S. aromaticum* 0,04 % - a to u izolátů ND 2/14 a Č 3/14. U izolátu P 1/14 (příloha č. 11) byla MIC 0,08 % a u ostatních 0,06 %. MIC se tedy pohybuje mezi 0,04-0,06 % v závislosti na izolátu. Účinnost esenciálního oleje je znázorněna v grafu č. 6.

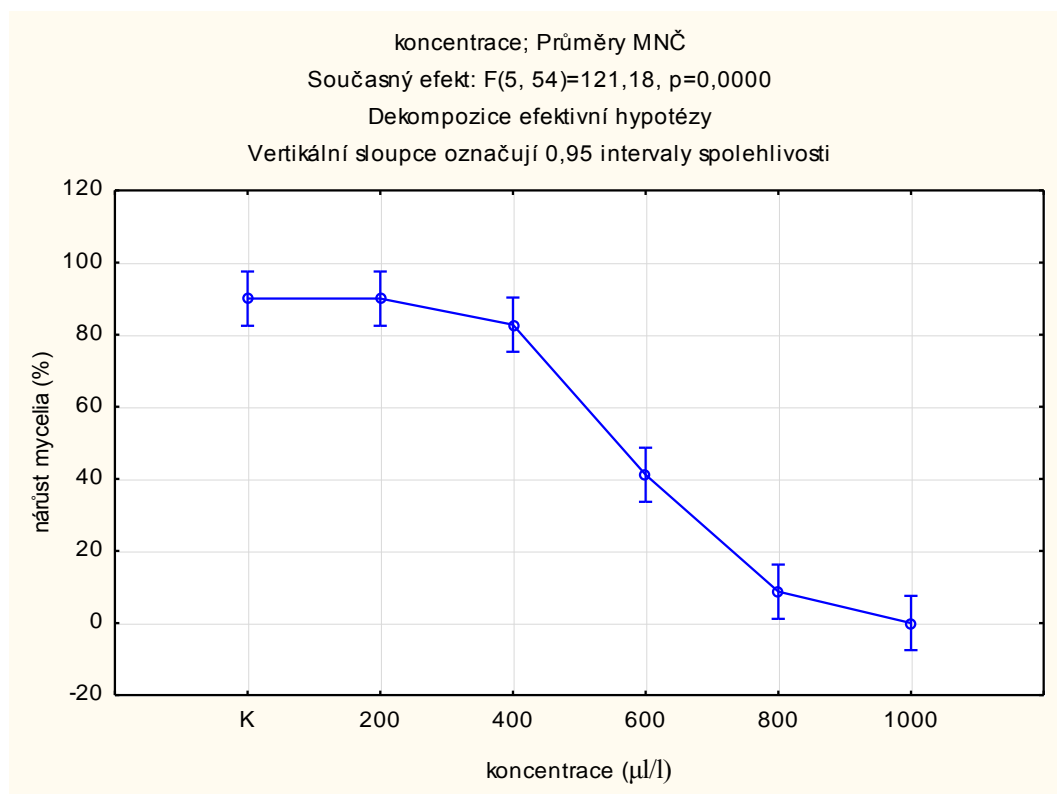
Graf č. 6: Koncentrační řada u esence z *S. aromaticum*



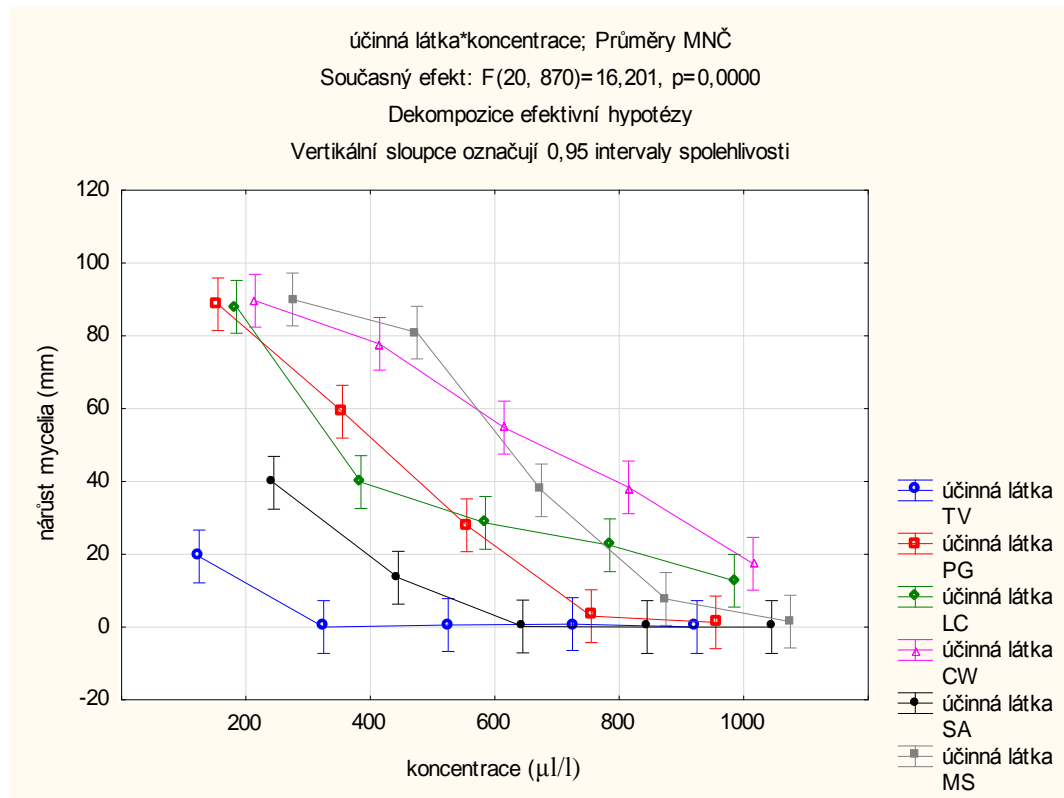
f) *Mentha spicata*

Testování účinnosti oleje z *M. spicata* proběhlo na izolátech získaných z roku 2016. Minimální inhibiční koncentrace byla u izolátů V 3/16, Ve 5/16 a Lu 7/16 0,1%. U izolátu S 1/16 0,06% a u zbývajících 0,08%. Z grafu č. 7 je patrné, že se MIC pohybovala mezi 0,08-0,1 %. Koncentrační řada izolátu D 5/16 je znázorněna v příloze č. 13.

Graf č. 7: Koncentrační řada u esence z *M. spicata*



Graf č. 8: Porovnání jednotlivých esencí účinných proti *P. infestans*

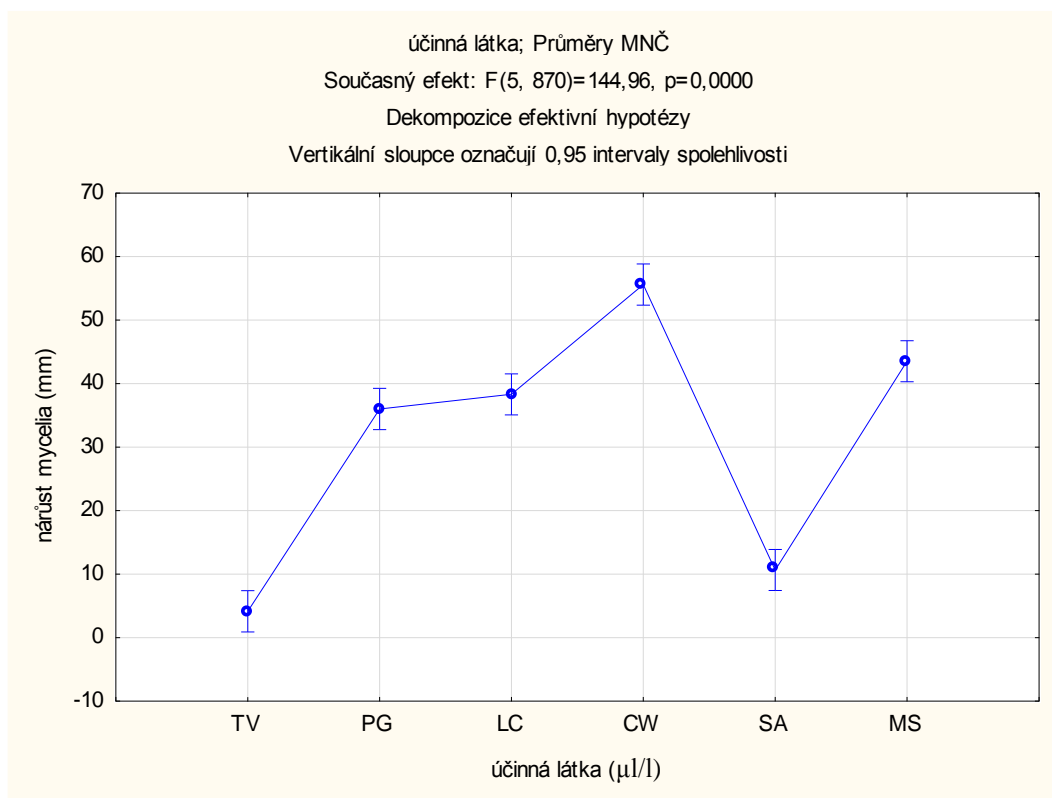


V grafu č. 8 je zobrazena účinnost všech esenciálních olejů a jejich vlivu na růst mycelia patogena *P. infestans*. Nejlepších výsledků dosáhl olej z *T. vulgaris* a naopak olej z *C. winterianus* se osvědčil až při vyšších koncentracích.

Podrobné výsledky, které znázorňují nárůst mycelia *P. infestans* v závislosti na použité koncentraci určitého esenciálního oleje, jsou k dispozici v přílohách č. 14-18 této práce.

Pro lepší představu je v grafu č. 9 zobrazena minimální inhibiční koncentrace jednotlivých olejů.

Graf č. 9: MIC jednotlivých esenciálních olejů



Nejvyšší nárůst mycelia byl zaznamenán po aplikaci oleje z *Cymbopogon winterianus* (CW). Obdobná antifungální účinnost byla pak registrována u olejů z *Pelargonium graveolens* (PG), *Litsea cubeba* (LC) a *Mentha spicata* (MS). Nejlepších výsledků dosahovaly oleje z *Thymus vulgaris* (TV) a *Syzygium aromaticum* (SA).

5.4 Detailnější stanovení minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů

V další části experimentu bylo provedeno konkrétnější stanovení minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů. Koncentrační řady byly sestaveny dle tabulky č. 1. a pro tyto účely byly využity Petriho misky s průměrem 80 mm. Testování proběhlo na izolátech získaných z roku 2016 a byly využity esenciální oleje z rostlin *T. vulgaris*, *P. graveolens*, *C. winterianus* a *S. aromaticum*. Esenciální olej z *L. cubeba* byl, kvůli různorodým výsledkům, z této fáze testování vyřazen. Výsledné minimální inhibiční koncentrace jsou znázorněny v tabulce č. 4.

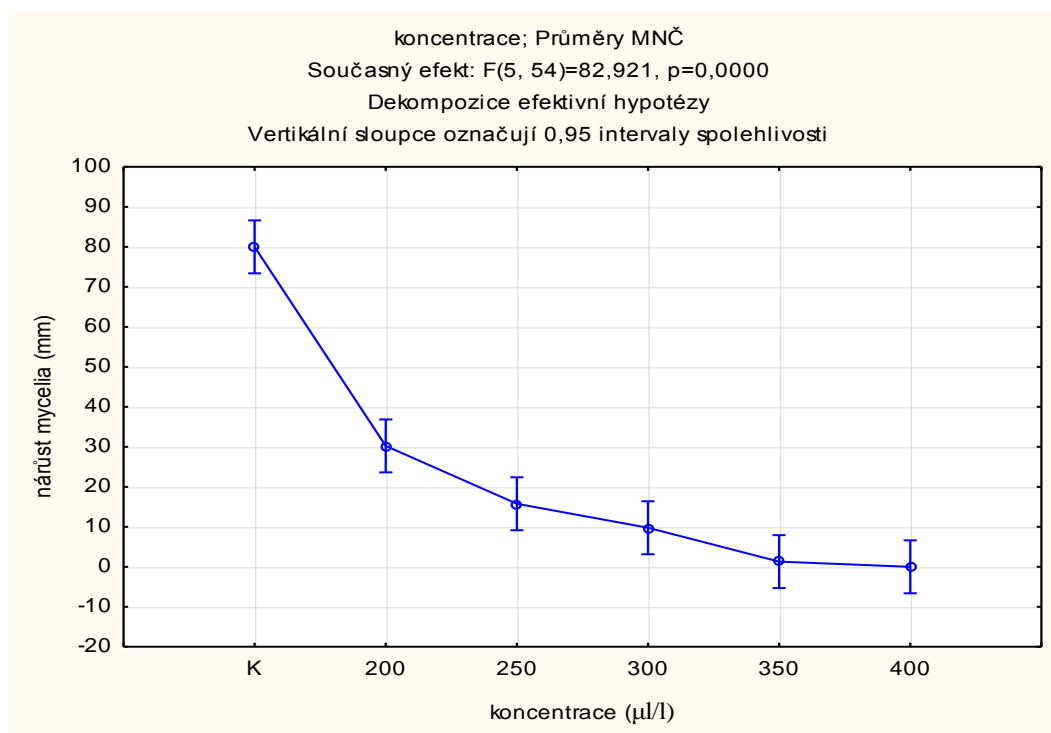
Tabulka č. 4: Minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů

minimální inhibiční koncentrace (MIC) – [μl/l]					
izolát	TV	PG	MS	CW	SA
D 5/16	350	750	800	1000	400
V 3/16	250	750	1000	1000	400
M B1/16	250	600	800	1000	400
Ve 5/16	250	600	1000	1000	200
Ž 2/16	250	650	800	1000	400
S 1/16	350	700	600	1000	400
U 2/16	350	600	800	1000	200
Lu 7/16	400	600	1000	1000	400
VŽ 1/16	350	800	800	1000	200
L 16/16	300	650	800	1000	400

a) *Thymus vulgaris*

U oleje z *T. vulgaris* byla nakonec MIC stanovena na 0,025 – konkrétně u izolátů V 3/16, M B1/16, Ve 5/16 a Ž 2/16. U izolátů D 5/16, S 1/16, U 2/16 a VŽ 1/16 byla stanovena 0,035% MIC, u izolátu L 16/16 byla inhibiční koncentrace 0,03% a u Lu 7/16 0,04%. V grafu č. 10 je znázorněn nárůst mycelia při použití příslušné koncentrace esenciálního oleje.

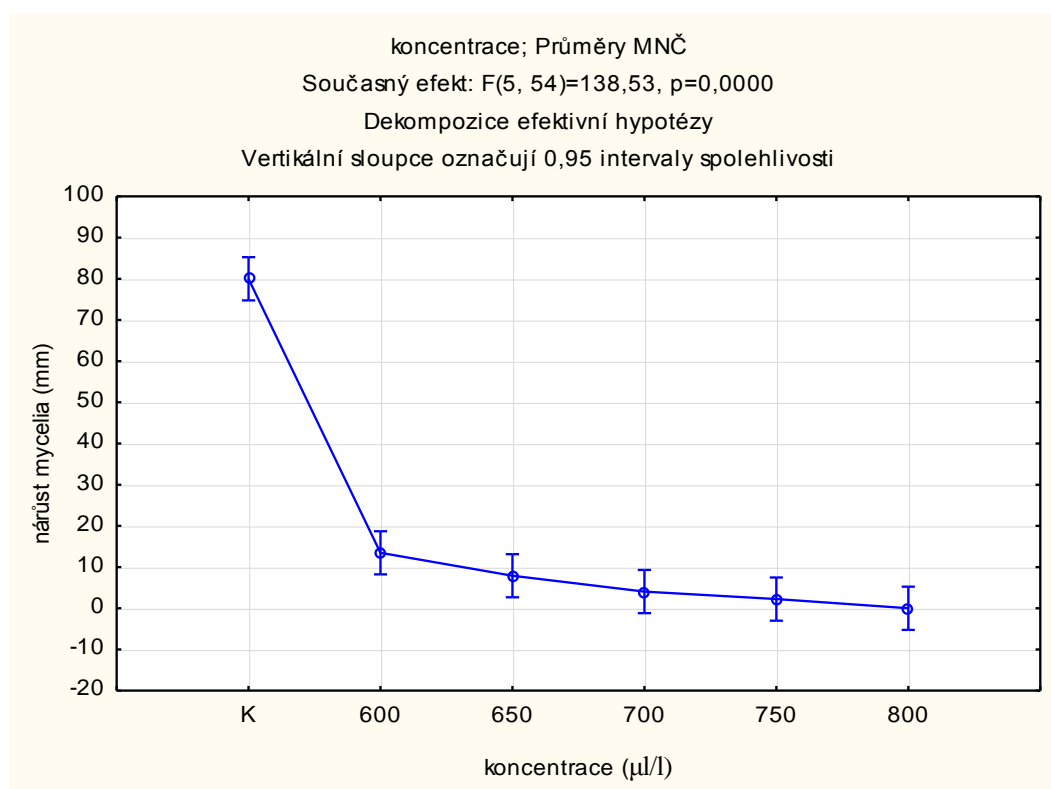
Graf č. 10: Detailnější koncentrační řada esence z *T. vulgaris*



b) Pelargonium graveolens

U oleje z *P. graveolens* byla inhibice mycelia nejnižší (0,06 %) u izolátů M B1/16, Ve 5/16, U 2/16 a Lu 7/16. U izolátů Ž 2/16 a L 16/16 byla MIC 0,065 %, u S 1/16 0,07 %, u D 5/16 a V 3/16 0,075 % a u VŽ 1/16 0,08 % (graf č. 11).

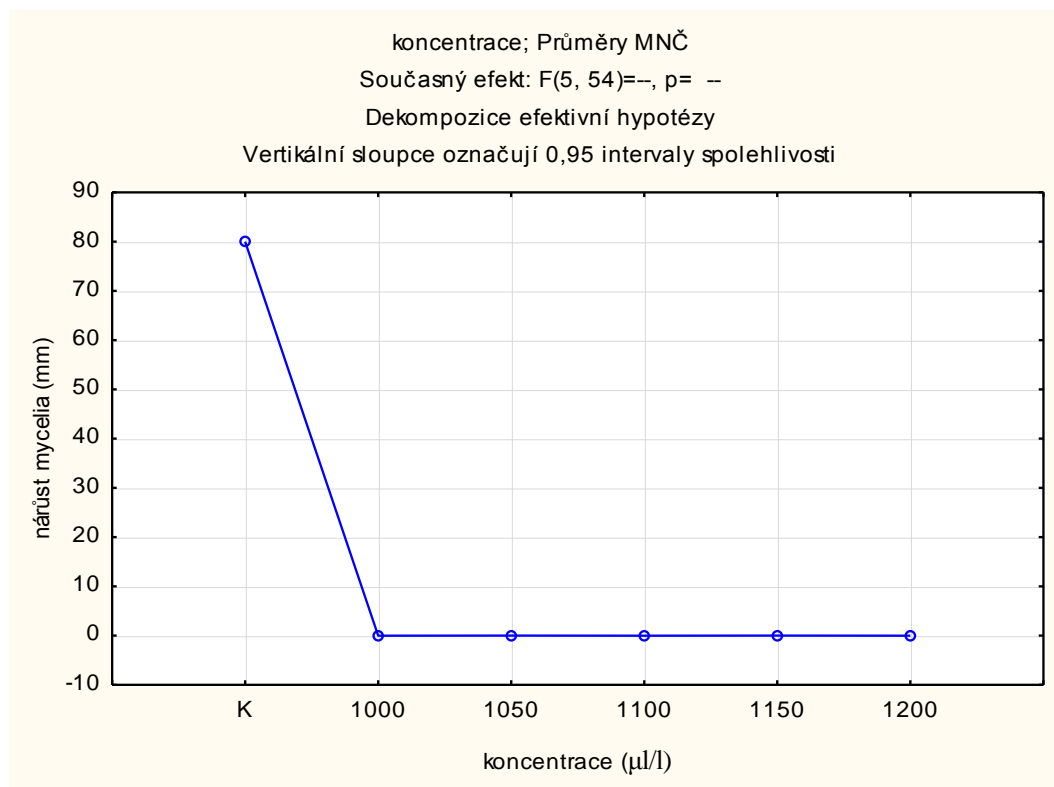
Graf č. 11: Detailnější koncentrační řada esence z *P. graveolens*



c) *Cymbopogon winterianus*

MIC esenciálního oleje z *C. winterianus* byla potvrzena z předchozího testování a byla stanovena na 0,1 % u všech izolátů (graf č. 12).

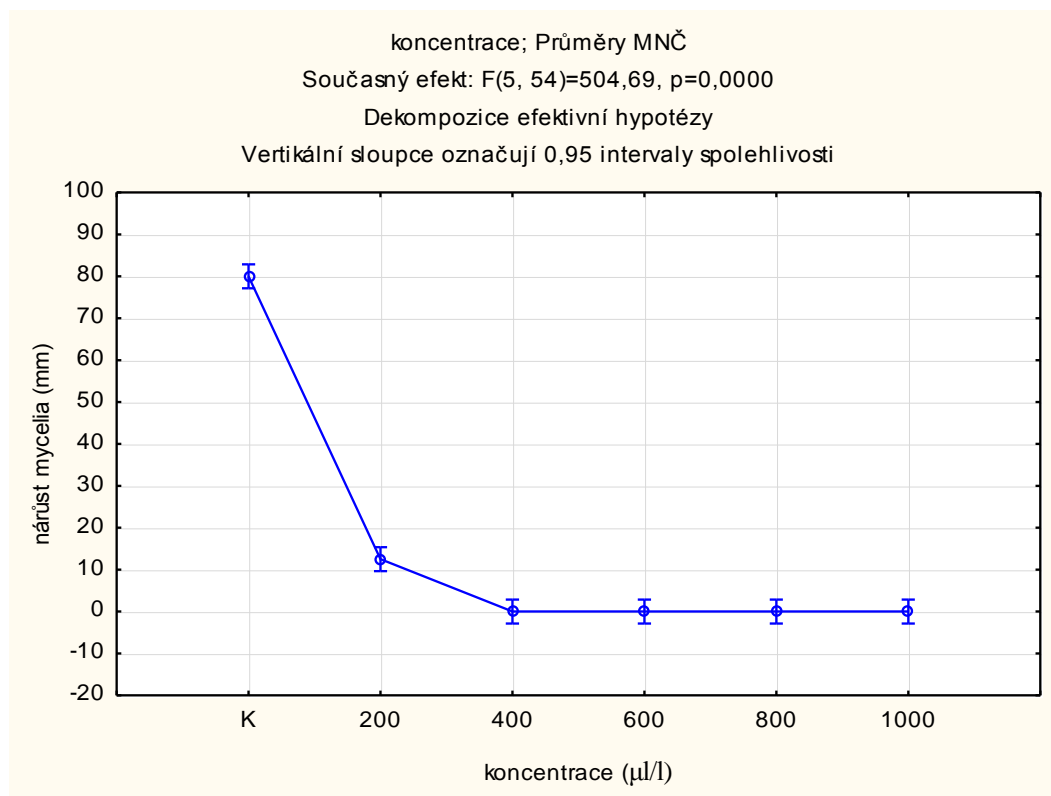
Graf č. 12: Detailnější koncentrační řada esence z *C. winterianus*



d) *Syzygium aromaticum*

Olej získaný ze *S. aromaticum* vykazoval nejnižší inhibiční aktivitu 0,02 % u izolátů Ve 5/16, U 2/16 a VŽ 1/16. U ostatních izolátů byla MIC 0,04 % (graf č. 13).

Graf č. 13: Detailnější koncentrační řada esence z *S. aromaticum*



Kvůli variabilitě výsledků u esenciálního oleje z *L. cubeba*, nebyla u této esence provedena detailnější koncentrační řada.

Podrobné výsledky, týkající se detailního zjištění minimální inhibiční koncentrace, jsou znázorněny v přílohách č. 19-23 této práce.

5.5 Determinace pohlavních typů patogena *P. infestans*

5.5.1 Potvrzení přítomnosti DNA fragmentů

V první fázi byla provedena u všech izolátů pocházejících z roku 2014 a 2016, pro účely molekulárně-biologických testů, izolace genomické DNA. Získaná DNA byla využita k amplifikaci sekvence DNA s využitím metody PCR a primerů W16-1 a W16-2.

Vizualizace molekul DNA je znázorněna na obrázku č. 2 na 1% agarózovém gelu smíchaném s ethidium bromidem. Do jamek v gelu byl aplikován PCR produkt spolu s nanášecí

barvou. Pro správné určení velikosti byl na začátek a konec gelu aplikován do jamky molekulární marker (M). Na pozici 1 je pak pro lepší představu nanášena pozitivní kontrola. DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru. U obou pohlavních typů byly amplifikovány DNA úseky o velikosti přibližně 557 bp.

Obrázek č. 2: Příklad elektroforeogramu amplifikovaných DNA fragmentů patogena *P. infestans* na 1% agarózovém gelu



K amplifikaci DNA segmentů došlo u všech testovaných variant 2–11. Vzorky PCR produktů bylo poté možné podrobit restričnímu štěpení.

5.5.2 Restriční štěpení

K restričnímu štěpení byla zapotřebí příprava restriční směsi, která se skládala z PCR produktu, Y^+ /tango pufru a restričního enzymu *Bsu*RI. Na obrázku č. 3 jsou znázorněny separované DNA fragmenty na 1,5% agarózovém gelu. Po restriční analýze a elektroforetické separaci byla velikost fragmentů pohlavního typu A1 557, 457 a 100 bp nebo PCR produkt zůstal neštěpený. U pohlavního typu A2 jsou na elektroforeogramu viditelné dva fragmenty o velikosti 457 bp a 100 bp.

Obrázek č. 3: Příklad elektroforeogramu restričně štěpených fragmentů DNA patogena *P. infestans* na 1,5% agarózovém gelu



Z obrázku č. 3 je patrná převaha pohlavních typů A2 u izolátů získaných v roce 2014. Pohlavní typ A2 by zaznamenán na pozici 1 (Č 1/14), 2 (ND 2/14), 3 (S 11/14), 4 (Č 3/14), 7 (S 1/14), 9 (P1/14) a 10 (V3 1/14). Pohlavní typ A1 byl potvrzen na pozici 5 (VŽ 14/14), 6 (VŽ 13/14) a 8 (V1 1/14). V tabulce č. 1 jsou uvedené pohlavní typy u jednotlivých izolátů použitých

při testování esenciálních látek. Přítomnost obou pohlavních typů *P. infestans* v porostu brambor dává možnost vzniku odolných oospor.

6 Diskuze

Medializace informací o negativních účincích pesticidních látek, týkajících se rizik spojených s diabetem, rakovinou, Parkinsonovou chorobou, demencí aj., podnítila společnost k upřednostňování bezreziduálních potravin. Mimo jiné může také následkem chemických přípravků na ochranu rostlin docházet k negativním dopadům na životní prostředí. Názory znalců se však ohledně omezení pesticidů rozcházejí. Kritici tvrdí, že by se jejich používání mělo okamžitě zastavit, druhá strana tvrdí, že je jejich úplné omezení nemožné. Řešením je vývoj alternativních látek na ochranu rostlin bez nežádoucích vedlejších účinků (Eyhorn et al., 2015).

Koul et al. (2008) tvrdí, že vhodnou alternativou je buď produkce vysoce selektivních odbouratelných pesticidů, nebo aplikace esenciálních olejů. Využívání esenciálních olejů na ochranu rostlin začalo být v Evropě rozšiřováno již od počátku 16. století (Burt, 2004). Výhodou je, že nepodléhají zdlouhavému registračnímu řízení, nedochází u nich ke vzniku rezistence a jsou bezpečné pro necílové organismy. Velký potenciál mají zejména v rozvojových zemích, odkud většina aromatických rostlin potřebná pro jejich extrakci pochází (Koul et al., 2008).

Obecně se dá říci, že esenciální oleje obsahují kolem 20 různých složek v různé koncentraci. Nejvíce zastoupené jsou monoterpeny a seskviterpeny (Sharifi-Rad et al., 2017). Kalemba et Kunicka (2003) doplňují, že se složení esenciálního oleje může měnit i v rámci stejného druhu určité aromatické rostliny. Často je chemické složení ovlivňováno vnějšími podmínkami, způsobem extrakce či tím, z které části rostliny byl olej extrahován (Kalemba et Kunicka, 2003).

V testech prováděných týmem Quintanilla et al. (2002) byl sledován vliv 4 esenciálních olejů na růst mycelia *P. infestans*. Byly porovnávány účinky silic získaných z *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Melissa officinalis* a *Mentha x piperita* L. Průměrný nárůst mycelia se *in vitro* podmínkách pohyboval mezi 63-89 %, přičemž mycelium nejméně inhiboval olej z *O. vulgare*. Nejvyšší průměrná inhibice byla zaznamenána u *T. vulgaris* (89%), kde byl nárůst mycelia registrován při 6,25 μ l/250 ml (Quintanilla et al., 2002). V této práci se olej z *T. vulgaris* rovněž velice osvědčil, přičemž byla průměrná inhibice mycelia 100% při 0,1% koncentraci a nárůst mycelia byl zaznamenán při první fázi testování u 0,02% koncentrace. Minimální inhibiční koncentrace byla tedy stanovena na 0,04 %. V druhé fázi testování byla u izolátů V 3/16, M B1/16, Ve 5/16 a Ž 2/16 stanovena MIC dokonce na 0,025 %. Soyly et al.

(2006) potvrdil účinnost těkavých složek z *T. vulgaris* na inhibici růstu při koncentraci 0,3 µg/1 ml, tedy 0,03 %.

Využití oleje z *Pelargonium graveolens* na potlačení *P. infestans* nebylo prozatím zaznamenáno. Preedy (2015) však tvrdí, že má olej z pelargonie značný vliv na potlačení *Sclerotium rolfsii* na *Mentha* spp. a také se osvědčil pro své insekticidní účinky. V první fázi této práce byl zaznamenán minimální inhibiční účinek *P. graveolens* u 0,08% koncentrace. V druhé části práce byla MIC u některých izolátů (M B1/16, Ve 5/16, U 2/16, Lu 7/16) i 0,06 %.

Minimální inhibiční koncentrace u oleje z *Cymbopogon winterianus* byla v pokusech první i druhé části této práce stanovena na 0,1 %. Pavela (2011) doplňuje, že se oleje získané z rodu *Cymbopogon* spp. používají hlavně pro své insekticidní účinky. Byly dokonce vyrobeny obojky pro psy, obsahující olej proti vším, blechám a jinému hmyzu (Pavela, 2011). Olej však také účinně působil proti *Rhizoctonia solani* a *Fusarium oxysporum* (Hajieghrari et al., 2005). Vliv oleje *C. winterianus* na růst *P. infestans* však nebyl ve vědecké literatuře zaznamenán. Není proto možné provést porovnání s výsledky této práce.

V pokusu byl stanoven průměrný inhibiční účinek *Syzygium aromaticum* při 0,1% koncentraci na 100%. MIC byla u izolátů ND 2/14 a Č 3/14 0,04%, u izolátu P1/14 dokonce 0,08% a u zbytku 0,06%. U třech izolátů z roku 2016 byla MIC stanovena na 0,02 % - konkrétně Ve 5/16, U 2/16 a VŽ 1/16. Bowers et Locke (2004) však potvrdili účinek oleje z hřebíčku pouze na *Phytophthora nicotians*.

Soylu et al. (2006) zmiňují, že oleje z fenyklu (*Foeniculum vulgare*), levandule (*Lavandula stoechas* subsp. *stoechas*), rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*) a vavřínu (*Laurus nobilis*) se prokázaly jako účinné proti *P. infestans*. V práci byl také zkoumán vliv vavřínu, ale z *Litsea cubeba* a MIC byla u třech izolátů 0,04% - konkrétně u VŽ 13/14, ND 2/14 a S1/14. U izolátů Č 1/14, VŽ 14/14 a V3 1/14 byla však MIC 0,1%. V tomto případě tedy záleží na konkrétním izolátu *P. infestans*, avšak určitý vliv, byl stejně jako u Soyly et al. (2006) také zaznamenán.

Antifungální efekt byl také pozorován u esenciálních olejů získaných z *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Artemisia* spp., *Hedera helix* a *Xanthium strumarium*. Fungistatický efekt byl registrován u *R. officinalis*, kde bylo použito 20 µl esence na 1 ml agaru. Mezi prvním a devátým dnem byl přírůstek mycelia pouze 9 mm. Při tomto testování byla použita radiální měřicí metoda (Rodino et al., 2013). Průměrný inhibiční účinek byl v této práci

při 0,1% koncentraci pouze 10,10 %. Je zřejmé, že Rodino et al. (2013) použili vyšší koncentraci esenciálního oleje, a také mohl mít EO jiné chemické složení. Inhibici klíčení spor *P. infestans* zkoumal ve své studii Wang et al. (2001) s pozitivním výsledkem u *Foeniculum vulgare*. Rostlinný prášek byl macerován spolu s 80% etanolem a poté byl zředěn 500x. Pro kontrolu byl použit 0,1% etanol a metalaxyl-mancozeb, jako fungicidní kontrola. Po 1,5 hodině od ošetření se zoospory neobjevily a stejně tak tomu bylo po 3 hodinách, kde byl výskyt rovněž 0%. Pro zjištění účinku *F. vulgare* bylo použito 500 µl látky na 100 ml žitného agaru. *F. vulgare* inhiboval mycelium v tomto poměru ze 100 % (Wang et al., 2001). V našich pokusech byla však zaznamenána průměrná inhibice mycelia při 1000 µl/l pouze 14,16 %, což je opět založeno na použití nižší koncentrace, než u výsledků Wang et al. (2001). Ve výzkumu Olanya et Larkin (2006) byla dosažena u *Lavandula angustifolia* inhibice růstu patogena *P. infestans* při 100 ppm necelých 20 %. Toto tvrzení se shoduje s našimi výsledky, neboť průměrná inhibice mycelia při 0,1% koncentraci byla 23,67 %. Dle testů Abayhne et Chauhan (2016) bylo potvrzeno, že nejnižší efekt na potlačení *P. infestans* měly *Eucalyptus globules* a *Hagenia abyssinica*. Největší efekt byl naopak prokázán u *Datura stramonium* a *Rhamnus prinoides* (Abayhne et Chauhan, 2016). V práci byl sice posuzován vliv *Eucalyptus citriodora*, avšak také s velice nízkým inhibičním účinkem. Yanar et al. (2011) provedly výzkum vlivu různých esenciálních olejů na růst mycelia *P. infestans*. Bylo zjištěno, že *Salvia officinalis* úplně inhibuje růst mycelia při 4% koncentraci. Nejlépe se osvědčil olej z *Xanthium strumarium*, který inhiboval mycelium již při 2% koncentraci (Yanar et al., 2011). V práci byl posuzován účinek při 0,1% koncentraci, který se však příliš neosvědčil.

Mimo jiné existuje řada alternativních látek, které mají fungicidní efekt na růst mycelia *P. infestans*. Dle Tiilikkala et Segerstedt (2009) byl zjištěn inhibiční efekt březového oleje proti tomuto patogenu. Další alternativou, kterou ve studii zjistili Son et al. (2008), je využití *Fusarium oxysporum*. Nepatogenní forma EF119 má potenciální inhibiční aktivitu vůči *P. infestans* (Son et al., 2008). V testech provedených Zegeye et al. (2011) byl zjištěn potenciální účinek rodu *Trichoderma*. Dr N. Arnold dokonce vyzoroval, že u hub šřavnatek (*Hygrophorus* spp.) nedochází k napadení žádnými patogeny. Se svým týmem přišel po podrobném rozboru k závěru, že tyto houby obsahují vysoký obsah antibiotických látek. Tyto látky se řadí mezi oxokrotonové kyseliny, jež mají vliv na inhibici hub z oddělení Oomycota, mezi které patří i *P. infestans* (Koubová, 2010). Ve své studii potvrdili Olanya et Larkin (2006) účinnost biologického přípravku Serenade, který je připraven na bázi *Bacillus subtilis* (kmen QST 713). Dále Koubová (2003) zmiňuje, že byl zkoumán vliv extraktů z čínských léčivých

bylin na *P. infestans*. Pozitivně se na inhibici mycelia osvědčil extrakt získaný z *Terminalia chebula* a *Anemarrhena asphodeloides* (Koubová, 2003). Esenciální olej z *Laurus nobilis* se v pokusu Soyulu et al. (2006) osvědčil proti *P. infestans*. Úplná inhibice mycelia však nastala až při 51,2 µg/ml, tedy při nejvyšší testované koncentraci. Olej získaný z *Piper nigrum* je však do budoucna vhodnou alternativou boje proti tomuto patogenu. V současné době je většina esenciálních olejů, potenciálně využitelných v ochraně rostlin, pouze ve fázi vývoje. Vzhledem k jejich širokému spektru příznivých účinků, mezi kterými můžeme jmenovat netoxičnost, široké spektrum účinnosti, dostupnost materiálu, zabránění vzniku rezistentních odrůd, snadné zacházení aj., existují i nevýhody esenciálních olejů. Mezi nimi můžeme jmenovat pracnost výroby, nutnost dobrých znalostí, omezená výroba, vysoká cena a nutnost opakování aplikace přípravku (Pavela, 2011). Diskutovaným prvkem je i jejich rychlé vytěkání do prostředí po aplikaci do vnějších podmínek. Je tedy velice důležité zvolit správnou formulaci přípravku a využít například enkapsulace aromatických látek.

Tomášek a Dvořák (2009) také zmiňují, že je výhodné používat biostimulátory, které podporují růst rostlin. Například Sulzberger (1998) tvrdí, že je vhodné použít pro stimulaci růstu a podporu obranyschopnosti rostlin brambor výměšky z kalifornských žížal.

V pokusu byla potvrzena přítomnost obou pohlavních typů – A1 i A2. Je tedy zvýšena pravděpodobnost vzniku odolných oospor, a to zejména v okrese Valečov. Mazáková a Ryšánek (2005) zjistili v České republice mezi roky 2003-2005 první výskyt pohlavního typu A2. Ve svých pokusech také zjistili, že může u oospor docházet ke vzniku rezistentních genotypů k chemickým fungicidům (Mazáková a Ryšánek, 2005). Drenth et al. (1995) ve svých pokusech zkoumali přežívání oospor při velmi vysokých a naopak při velmi nízkých teplotách. Nakonec došli k závěru, že při vystavení oospor extrémním podmínkám, nedochází k jejich usmrčení, ale pouze k pozastavení infekčnosti. Schopnost infikovat porost se však vrátí, jakmile jsou vytvořeny vhodné podmínky (Drenth et al., 1995).

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo otestovat vliv vybraných esenciálních olejů na *Phytophthora infestans*, způsobující plíseň bramboru. V první části práce byla provedena průměrná inhibice růstu mycelia při 0,1% koncentraci. Ze 100 % inhibovaly mycelium patogena oleje získané z *Thymus vulgaris*, *Pelargonium graveolens*, *Litsea cubeba*, *Cymbopogon winterianus* a *Syzygium aromaticum*. Esenciální oleje získané z rostlin *Eucalyptus citriodora*, *Lavandula angustifolia*, *Foeniculum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* a *Pimpinella anisum* se při této koncentraci projeví jako neúčinné. Z dalšího testování byly tedy tyto oleje vyřazeny.

Na základě výsledků získaných z první fáze testování byly sestaveny koncentrační řady esenciálních olejů. Pomocí těchto řad byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) jednotlivých esenciálních olejů. Testy byly provedeny na izolátech získaných z roku 2014 a navíc byla pro porovnání přidána esence z *Mentha spicata*, testovaná na izolátech z roku 2016. V experimentu se osvědčily všechny testované oleje, avšak v rozdílných koncentracích. Nejlépe inhiboval mycelium esenciální olej z *T. vulgaris*, kde byla MIC stanovena na 0,04 % u všech izolátů *P. infestans*. Nejhorších výsledků dosáhl olej z *C. winterianum*. Jehož MIC proti *P. infestans* byla 0,1%.

Pro konkrétnější určení minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů byly u některých esencí vytvořeny detailnější koncentrační řady. Pro tyto účely byly použity izoláty získané v roce 2016. U oleje z *T. vulgaris* se MIC nakonec pohybovala mezi 0,025–0,035 %, a u tří izolátů dosáhla 0,04% koncentrace. U oleje z *P. graveolens* nastala u některých izolátů inhibice mycelia při 0,06% koncentraci, u některých však až při 0,08 %. Minimální inhibiční koncentrace esenciálního oleje z *C. winterianus* se potvrdila z předchozího testování a byla stanovena na 0,1 % u všech izolátů. Olej získaný ze *S. aromaticum* vykazoval nejnižší inhibiční aktivitu u třech izolátů již při 0,02% koncentraci. U ostatních byla stanovena na 0,04 %. Kvůli variabilitě výsledků u esenciálního oleje z *L. cubeba*, nebyla u této esence provedena detailnější koncentrační řada.

Hypotéza práce, zda existují esenciální oleje inhibující mycelium *Phytophthora infestans*, byla potvrzena. Nejlépe se v boji proti *P. infestans* tedy osvědčily EO získané z *T. vulgaris* a *S. aromaticum*.

V další části práce byly u všech izolátů získaných v roce 2014 a 2016 určeny pohlavní typy *P. infestans*. Pomocí molekulárně biologických metod byla potvrzena přítomnost obou

typů – A1 i A2. Současný výskyt obou pohlavních typů na jednom stanovišti tedy umožňuje vznik odolných oospor.

8 Seznam literatury

- Abayhne, M. A., Chauhan, N. M. 2016. Antifungal Activity of Various Medicinal Plants against Late Blight of Potato from Ethiopia. *Journal of Scientific Research & Reports*. 12 (5). 1-9.
- Adams, R. P. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA. p. 804. ISBN : 9781932633214
- Agarwal, R., Gupta, S. K., Agrawal, S. S., Srivastava, S., Saxena, R. 2008. Oculohypotensive effects of *Foeniculum vulgare* in experimental models of glaucoma. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 52 (1). 77-83.
- Agrios, G. N. 1997. Plant pathology. Fourth edition. Academic Press. San Diego. p. 635. ISBN: 0120445646.
- Andersson, B. 2007. Sexual reproduction in *Phytophthora infestans* – epidemiological consequences. Doctoral thesis. Department of Forest Mycology and pathology. Sweden. p. 31. ISBN: 9789157673763
- Andrade-Piedra, J. L., Forbes, G. A., Shtienberg, D., Grünwald, N. J., Chacón, M. G., Taipe, M. V., Fry, W. E. 2005. Qualification of a plant disease simulation model: Performance of the LATEBLIGHT model across a broad range of environments. *Phytopathology*. 95 (12). 1412-1422.
- Andrivon, D. 1996. The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathology*. 45 (6). 1027-1035.
- Bacílková, B., Paulusová, H. 2012. Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál. Oddělení péče o fyzický stav archiválií. Národní archiv. Praha. 28 s.
- Bajwa, U., Sandhu, K. S. 2014. Effect of handling and processing on pesticide residues in food—a review. *Journal of Food Science and Technology*. 51(2). 201-220.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*. 46 (2). 446-475.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Idaomar, M., 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 585 (1). 1-13.
- Barbosa, L. C. A., Filomeno, C. A., Teixeira, R. R. 2016. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. *Molecules*. 21 (12). 1671.
- Baser, K. H. C., Buchbauer, G. (eds.). 2010. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press, Taylor and Francis Group. p. 975. ISBN: 9781420063158.
- Blerot, B., Baudino, S., Prunier, C., Demarne, F., Toulemonde, B., Caissard, J. C. 2016. Botany, agronomy and biotechnology of *Pelargonium* used for essential oil production. *Phytochemistry Reviews*. 15 (5). 935-960.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International journal of food mikrobiology*. 94 (3). 223-253.
- Bowers, J. H., Locke, J. C. 2004. Effect of formulated plant extracts and oils on population density of *Phytophthora nicotianae* in soil and control of *Phytophthora* blight in the greenhouse. *Plant Disease*. 88 (1). 11-16.
- Cai, L., Wu, C. D. 1996. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Natural Products*. 59 (10). 987-990.
- Cavanagh, H. M. A., Wilkinson, J. M. 2002. Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research*. 16 (4). 301-308.
- Colborn, T., vom Saal, F. S., Soto, A. M. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*. 101 (5). 378-384.
- Cooke, D. E. L., Young, V., Birch, P. R. J., Toth, R., Gourlay, F., Day, J. P., Carnegie, S. F., Duncan, J. M. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995 – 97). *Plant Pathology*. 52. 181-192.
- Čepl, J., Červínová, E., Čížek, M., Domkářová, J., Exnarová, J., Greplová, M., Hausvater, E., Krpálková, A., Vokál, B., Zášková, J. 2012: Máme rádi brambory: proč jsou brambory zdravé, jak je správně nakupovat i pěstovat, úspěšné projekty PRV a několik osvědčených receptů. Ministerstvo zemědělství České republiky. Praha. 111 s. ISBN: 9788074340604.
- Čepl, J., Čížek, M., Doležal, P., Domkářová, J., Hamouz, K., Hausvater, E., Kasal, P., Lachman, J., Rasoča, V., Urbancová, M., Vokál, B. 2009. Konzumní brambory na poli, zahradě a

- v kuchyni. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod. 206 s. ISBN: 9788086940230.
- Český statistický úřad 2016. Odhady sklizně zemědělských plodin – operativní zpráva [online]. 15. 8. 2016 [cit. 2017-03-10]. Dostupné z <<https://www.czso.cz/documents/10180/36741213/2701291602.pdf/f01cafb1-cc4a-461c-9206-848d583b26df?version=1.0>>
- da Cruz, T. P., Alves, F. R., Mendonca, R. F., Costa, A. V., de Jesus Junior, W. C., Pinheiro, P. F., Marins, A. K. 2015. Fungicide activity of essential oil *Cymbopogon winterianus* jowit (citronella) against *Fusarium solani*. Bioscience Journal. 31 (1). 1-8.
- da Silva Bomfim, N., Nakassugi, L. P., Oliveira, J. F. P., Kohiyama, C. Y., Mossini, S. A. G., Grespan, R., Machinski, M. 2015. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Food chemistry. 166. 330-336.
- D'auria, F. D., Tecca, M., Strippoli, V., Salvatore, G., Battinelli, L., Mazzanti, G. 2005. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. Medical mycology. 43 (5). 391-396.
- Dědič, P. 2014. Hlavní virové choroby bramboru v ČR. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod. 15 s. ISBN: 9788086940557.
- Delamare, A. P. L., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. Food chemistry. 100 (2). 603-608.
- Dewhurst, I. C. 2001. Toxicological assessment of biological pesticides. Toxicology letters. 120 (1). 67-72.
- Dhifi, W., Jelali, N., Mnif, W., Litaïem, M., Hamdi, N. 2013. Chemical composition of the essential oil of *Mentha spicata* L. from Tunisia and its biological activities. Journal of Food Biochemistry. 37 (3). 362-368.
- Drenth, A., Janssen, E. M., Govers, F. 1995. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. Plant pathology. 44 (1). 86-94
- Eyhorn, F., Roner, T., Specking, H. 2015. Reducing pesticide use and risks-What action is needed? HELVETAS Swiss Intercooperation. p. 31.

- Fry, W. E., Goodwin, S. B. 1997. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Disease*. 81 (12). 1349-1357.
- Grenville-Briggs, L. J., van West, P. 2005. The biotrophic stages of oomycete–plant interactions. *Advances in applied mikrobiology*. 57. 217-243.
- Guba, R. 2001. Toxicity myths – essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy*. 11 (2). 76-83.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö. İ. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food chemistry*. 83 (3). 371-382.
- Gupta, A., Sharma, S., Naik, S. N. 2011. Biopesticidal value of selected essential oils against pathogenic fungus, termites, and nematodes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65 (5) 703-707.
- Gustafson, J. E., Liew, Y. C., Chew, S., Markham, J. L., Bell, H. C., Wyllie, S. G., Warmington, J. R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 26. 194-198.
- Hajieghrari, B., Mohammadi, M. R., Hadian, D. 2005. Antifungal activity of *Cymbopogon parkeri* stapf. essential oil on some important phytopathogenic fungi. *Communications in agricultural and applied biological science*. 71 (3). 937-941
- Hamouz, K. 1994. *Základy pěstování konzumních a průmyslových brambor*. Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR. Praha. 56 s. ISBN: 8071050903.
- Hausvater, E. Doležal, P. 2013. *Ochrana brambor proti mandelince bramborové*. 5. vydání. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod. 11 s. ISBN: 9788086940502.
- Hausvater, E., Doležal, P. 2014. *Integrovaná ochrana proti plísni bramboru*. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod. 23 s. ISBN: 9788086940571.
- Hausvater, E., Doležal, P., Dejmalová, J. 2011a. *Plíseň bramboru*. 4. vydání. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod. 11 s. ISBN: 9788086940342.
- Hausvater, E., Doležal, P., Dejmalová, J. 2011b. *Vločkovitost hlíz bramboru a možnosti ochrany*. 4. vydání. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod. 11 s.

- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., Van der Vossen, E. A. G. 2008. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research*. 51 (1). 47-57.
- Hayes, W. J. 1967. Toxicity of pesticides to man: risks from present levels. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 167 (1007). 101-127.
- Hoyos, J. M. Á., Alves, E., Rozwalka, L. C., Souza, E. A. D., Zeviani, W. M. 2012. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. *Ciência e Agrotecnologia*. 36 (3). 270-284.
- Huang, Y., Ho, S. H. 1998. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of Stored Products Research*. 34 (1). 11-17.
- Chalchat, J. C., Michet, A., Pasquier, B. 1998. Study of clones of *Salvia officinalis* L. yields and chemical composition of essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 13 (1). 68-70.
- Chloupek, O. 2008. *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. 3. vydání. Academia. Praha. 307 s. ISBN: 9788020015662.
- Iglesias, I., Escuredo, O., Seijo, C., Méndez, J. 2010. *Phytophthora infestans* prediction for a potato crop. *American journal of potato research*. 87 (1). 32-40.
- Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathélet, J. P., Ankit, M., Khedid, K., El Bachiri, A. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agricultural and Biology*. 11 (2). 205-208.
- Index Fungorum 2017. [Online]. 2017. [cit. 2017-03-09]. Dostupné z: <<http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=232148>>
- Isman, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*. 19. 603-608.
- Isman, M. B. 2002. Insect antifeedants. *Pesticide Outlook*. 13. 152-157.
- Isman, M. B., Wilson, J. A., Bradbury, R. 2008. Insecticidal Activities of Commercial Rosemary Oils (*Rosmarinus officinalis*.) Against Larvae of *Pseudaletia unipuncta*. and *Trichoplusia ni*. in Relation to Their Chemical Compositions. *Pharmaceutical Biology*. 46 (1-2). 82-87.

- Jones, J. D., Witek, K., Verweij, W., Jupe, F., Cooke, D., Dorling, S., Foster, S. 2014. Elevating crop disease resistance with cloned genes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 369 (1639). 20130087.
- Juroch, J. 2011. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary původce chorob plísně bramboru a rajčete. Ministerstvo zemědělství ČR ve spolupráci se Státní rostlinolékařskou správou. Praha. 8 s. Dostupné také z: <<http://eagri.cz/public/web/file/125259/plisen.pdf>>
- Judelson, H. S., Spielman, L. J., Shattock, R. C. 1995. Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics*. 141. 503-512.
- Jůzl, M., Elzner, P. 2014. Pěstování okopanin. Mendelova univerzita v Brně. Brno. 100 s. ISBN: 9788075091963.
- Kalemba D., Kunicka A. 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10. 813-829
- Kalina T., Váňa J. 2005. Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Karolinum. Praha. 608 s. ISBN: 8024610361.
- Kasal P., Čepl J., Vokál B. 2010. Hnojení brambor. Výzkumný ústav bramborářský. Havlíčkův Brod. 23 s. ISBN: 9788086940243
- Kazda, J. 2014. Škůdci polních plodin. Profi Press. Praha. 116 s. ISBN: 9788086726618.
- Kessel, G. J. T., Förch, M. G. 2006. Effect of UV-exposure on germination of sporangia of *Phytophthora infestans*. *Wageningen. PRI*. 11.
- Knobloch, K., Weis, N., Weigand, H. 1986. Mechanism of antimicrobial activity of essential oils. *Planta medica*. 52 (06). 556-556.
- Koubová, D. Léčivé byliny z Dálného východu v ochraně proti plísni bramborové [online]. Agronavigátor. 27. září 2009 [cit. 2017-03-22]. Dostupné z <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=1&typ=1&val=18631&ids=415>>
- Koubová, D. *Phytophthora infestans*: Řešení na dosah [online]. Agronavigátor. 30. dubna 2010 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=1&typ=1&val=100729&ids=105>>
- Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G. S. 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International*. 4 (1). 63-84.

- Kutnar, F. 1963. Malé dějiny brambor. Východočeské nakladatelství. Havlíčkův Brod. 153 s.
- Lawrence, B. M. 1995. The isolation of aromatic materials from natural plant products. A manual on the essential oil industry. 57-154.
- Lee, H. S. 2004. Acaricidal activity of constituents identified in *Foeniculum vulgare* fruit oil against *Dermatophagoides* spp.(Acari: *Pyroglyphidae*). Journal of agricultural and food chemistry. 52 (10). 2887-2889.
- Lee, Y. S., Kim, J., Shin, S. C., Lee, S. G., Park, I. K. 2008. Antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. Flavour and Fragrance Journal. 23 (1). 23-28.
- Lis-Balchin, M., Hart, S. 1999. Studies on the mode of action of the essential oil of Lavender *Lavandula angustifolia* P. Miller. Phytotherapy Research. 13 (6). 540-542.
- Maciel, M. V., Morais, S. M., Bevilaqua, C. M. L., Silva, R. A., Barros, R. S., Sousa, R. N., Souza-Neto, M. A. 2010. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. Veterinary parasitology. 167 (1). 1-7.
- Malcolmson, J. F., Black, W. 1966. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Euphytica. 15 (2). 199-203.
- Matoušková, H., Táborská, M. 2007. Bakteriální kroužkovitost bramboru. Ministerstvo zemědělství, Státní rostlinolékařská správa. Praha. 8 s. Dostupný také z: <http://eagri.cz/public/web/file/58328/Krouzkovitost_bramboru_web.pdf>
- Mazáková, J., Táborský, V. 2005. Plíseň bramborová – složení populací patogenu *Phytophthora infestans*. Rostlinolékař. 16 (4). 23 - 24.
- Mazáková J., Ryšánek P. 2005. Stanovení charakteristik izolátů *Phytophthora infestans* získaných v letech 2003-2005.
- Mazáková J., Táborský V., Zouhar M., Ryšánek P., Hausvater E., Doležal P. 2006. Occurrence and distribution of mating types A1 and A2 of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech Republic. Plant Protection Science. 42. 41-48.
- Miguel, M. G., Guerrero, C., Rodrigues, H., Brito, J. 2007. Essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., effect of harvesting dates, growing media and fertilizers. In Proceedings of

the 3rd IASME/WSEAS International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development (pp. 24-26).

- Moravcová, J. 2006. Biologicky aktivní přírodní látky. Interní studijní pomůcka. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Praha. 107 s. Dostupné také z: <<https://www.yumpu.com/sk/document/view/23052933/pomucka-biologickyaktivni-prirodni-latky>>
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Reichling, J., Wink, M. 2011. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical biology*. 49 (9). 893-899.
- Nana, W. L., Eke, P., Fokom, R., Bakanrga-Via, I., Begoude, D., Tchana, T., Fekam Boyom, F. 2015. Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* and *Zanthoxylum xanthoxyloides* essential oils against *Phytophthora megakarya*. *Journal of Phytopathology*. 163 (7-8). 632-641.
- Novák, J. 2007. Jedovaté rostliny kolem nás. Grada. Praha. 176 s. ISBN: 9788024715490.
- Oerke, E. C. 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*. 144 (01). 31-43.
- Olanya, O. M., Larkin, R. P. 2006. Efficacy of essential oils and biopesticides on *Phytophthora infestans* suppression in laboratory and growth chamber studies. *Biocontrol Science and Technology*. 901-917.
- Park, M. J., Gwak, K., Yang, I., Choi W., Jo, H., Chang, J., Jeung, E., Choi I. 2007. Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* bailey and their constituents against various Dermatophytes. *The Journal of Microbiology*. 45. 460-465.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Kole, C. 1995. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*. 86 (349). 237-246.
- Pavela, R. 2011. Botanické pesticidy. Kurent. České Budějovice. 128 s. ISBN: 9788087111260.
- Pekárková, J. Růžička, T. 2013. Výsledky detekčního průzkumu výskytu škodlivých organismů v ČR za rok 2012. ČR – Státní rostlinolékařská správa, organizační složka státu. Praha. 67 s.

- Pepperný, K. Rezidua pesticidů v potravinách – zdravotní rizika a aktuální stav [online]. Přednáška připravená pro XX. českou a slovenskou konferenci o ochraně rostlin pořádanou ČZU (FAPPZ). Praha. 2015, září. [cit. 2016-11-10]. Dostupné z <<http://www.szu.cz/tema/rezidua-pesticidu-v-potravinach-zdravotni-rizika-a-aktualni>>
- Perrucci, S., Macchioni, G., Cioni, P. C., Flamini, G., Morelli, I., Taccini, F. 1996. The activity of volatile compounds from *Lavandula angustifolia* against *Psoroptes cuniculi*. *Phytotherapy Research*. 10 (1). 5-8.
- Peterson, A., Machmudah, S., Roy, B. C., Goto, M., Sasaki, M., Hirose, T. 2006. Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81 (2). 167-172.
- Pieterse, C. M., de Wit, P. J., Govers, F. P. 1992. Molecular aspects of the potato - *Phytophthora infestans* interaction. *European Journal of Plant Pathology*. 98. 85-92.
- Pourgholami, M. H., Majzoob, S., Javadi, M., Kamalinejad, M., Fanaee, G. H. R., Sayyah, M. 1999. The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 66 (2). 211-215.
- Prakash, A., Rao, J. 1997. Botanical pesticides in agriculture. Cuttack. Central Rice Research Institute. p. 461. ISBN: 1873718259
- Preedy, V., R. (ed.). 2015. Essential oils in food preservation, flavor and safety. Academic Press. London. p. 930. ISBN: 9780124166417.
- Prokinová, E. 2014. Choroby polních plodin. Profi Press. Praha. 92 s. ISBN: 9788086726595.
- Quintanilla, P., Rohloff, J., Iversen, T. H. 2002. Influence of essential oils on *Phytophthora infestans*. *Potato Research*. 45. 225-235.
- Rana, I. S., Rana, A. S., Rajak, R. C. 2011. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42 (4). 1269-1277.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., Qurishi, M. A. 2012. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*. 9 (2). 1574-1583.
- Ristaino, J. B. 2002. Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. *Microbes and Infection*. 4. 1369-1377.

- Rodino, S., Dobre, A., Butu, M. 2013. Screening of some indigenous plants for identifying the inhibitory effect against *Phytophthora infestans*. Studia Universitatis " Vasile Goldis" Arad. Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series). 23 (4). 483.
- Ross, H. 1986. Potato Breeding – problems and perspectives. Journal of Plant Breeding. 13. 132.
- Rus, C. F., Pop, G., Alexa, E., Şumălan, R. M., Copolovici, D. M. 2015. Antifungal activity and chemical composition of *Salvia officinalis* L. essential oil. Research Journal of Agricultural Science. 47 (2).
- Salvador, A., Chisvert, A. 2007. Analysis of cosmetic products. Elsevier. London. p. 506. ISBN: 9780444522603.
- San Aye, S., Matsumoto, M. 2011. Effect of some plant extracts on *Rhizoctonia* spp. and *Sclerotium hydrophilum*. Journal of Medicinal Plants Research. 5 (16). 3751-3757.
- Sansome, E. 1977. Polyploidy and induced gametangial formation in British isolates of *Phytophthora infestans*. Microbiology. 99 (2). 311-316.
- Sedlák P., Křenek P., Vejl P., Melounová M., Zoufalá J., Kreuz L., Domkářová J. 2005. Posouzení praktické využitelnosti vybraných DNA markerů rezistence bramboru vůči *Phytophthora infestans*. Osivo a sadba, sborník referátů. ČZU v Praze. 162-168.
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Sharifi-Rad, R. 2017. Biological Activities of Essential Oils. Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. Molecules. 22 (1). 70.
- Shawl, A. S., Kumar, S. 2000. Potential of lavender oil industry in Kashmir. Journal of Medicinal Aromatic Plant Science. 22. 319-321.
- Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L., Matos, F. J. A. 2003. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. Journal of ethnopharmacology. 89 (2). 277-283.
- Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M. P., Catalan, C. 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. Food control. 17 (9). 745-752.
- Singh, N. K., Vemu, B., Nandi, A., Singh, H., Kumar, R., Dumka, V. K. 2014. Acaricidal activity of *Cymbopogon winterianus*, *Vitex negundo* and *Withania somnifera* against

- synthetic pyrethroid resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Parasitology research. 113 (1). 341-350.
- Snedeker, S. M. 2001. Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and dieldrin. Environmental Health Perspectives. 109 (1). 35-47.
- Son, S. W., Kim, H. Y., Choi, G. J., Lim, H. K., Jang, K. S., Lee, S. O., Kim, J. C. 2008. Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. Journal of applied microbiology. 104 (3). 692-698.
- Soylu, E. M., Soylu, S., Kurt, S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia. 161 (2). 119-128.
- Soylu, S., Yigitbas, H., Soylu, E. M., Kurt, Ş. 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of applied mikrobiology. 103 (4). 1021-1030.
- Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D., Weingartner, D. P. (eds.). 2001. Compendium of Potato Diseases. 2nd ed. Journal of Agricultural Science. p. 144. ISBN: 9780890542750.
- Sulzberger R. 1998. Kompost und Wurmhumus (Compost and Vermihumus). Bayerischer Landwirtschaftsverlag. München. p. 127.
- Štefan, J., Hladík, J., Adámek, T., Dobisíková, M., Eliášová, H., Fišer, J., Šuláková, H., Vaněk, D., Vilímek, M. 2012. Soudní lékařství a jeho moderní trendy. Grada Publishing, a. s. Praha. 448 s. ISBN: 9788024735948.
- Táborský, V., Doležal, P. 2006. Prognóza výskytu plísně bramboru. Problematika rezistence patogena *Phytophthora infestans* k fungicidům. Agromanuál. 1 (5). 28-31.
- Takayama, C., de-Faria, F. M., de Almeida, A. C. A., Dunder, R. J., Manzo, L. P., Socca, E. A. R., Luiz-Ferreira, A. 2016. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 6 (8). 677-681.
- Tiilikkala, K., Segerstedt, M. 2009. Koivutisle-kasvinsuojelun uusi innovaatio. 143. p. 129.
- Tomášek, J., Dvořák, P. 2009. Alternativní ochrana brambor v systému ekologického zemědělství. Úroda: časopis pro rostlinnou produkci. 12. 164-168.

- Tunç, I., Erler, F. 2000. Fumigant activity of anethole, a major component of essential oil of anise *Pimpinella anisum* L. International Organisation for Biological and Integrated Control – West Palaearctic Regional Section – Bulletin. 23 (10). 221-226.
- Turina, A. D. V., Nolan, M. V., Zygadlo, J. A., Perillo, M. A. 2006. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. Biophysical chemistry. 122 (2). 101-113.
- Věchet, L. (ed.). 2012. Mechanizmy interakcí hostitel - patogen a základy šlechtění na odolnost. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Praha. 66 s. ISBN: 9788074270727.
- Vlček, V., Pohanka, M. 2011. Environmentální aspekty užití organofosforových a karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice. Chemické listy. 105. 908-912.
- Vokál, B., Bárta, J., Bártová, V., Čepl, J., Čížek, M., Doležal, P., Domkářová, J., Dohanyos, M., Faltus, M., Greplová, M., Hamouz, K., Hausvater, E., Homolka, P., Horáčková, V., Hůla, J., Kasal, P., Kopačka, V., Koukalová, V., Mayer, V., Melzoch, K., Opatrný, Z., Patáková, P., Paulová, L., Polzerová, H., Rajchl, A., Rychtera, M., Šantrůček, L., Šárka, E., Ševčík, R., Tajovský, M., Vejchar, D., Zámečník, J. 2013. Brambory: šlechtění – pěstování – užití – ekonomika. Profi Press. Praha. 160 s. ISBN: 9788086726540.
- Wang, S. T., Wang, X. Y., Liu, J. L., Cao, K. Q. 2001. Screening of Chinese herbs for the fungitoxicity against *Phytophthora infestans*. Journal of Agricultural University of Hebei. 24 (2). 101-107.
- Wastie, R. L. 1991. Breeding for resistance. In: Ingram, D. S. - Williams, P. H. ed. Advances in Plant Pathology *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Academic Press. 193-224.
- Yanar, Y., Kadioğlu, I., Gökçe, A., Demirtas, I., Gören, N., Çam, H., Whalon, M. 2011. In vitro antifungal activities of 26 plant extracts on mycelial growth of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. African Journal of Biotechnology. 10 (14). 2625-2629.
- Yang, Y., Jiang, J., Qimei, L., Yan, X., Zhao, J., Yuan, H., Wang, M. 2010. The fungicidal terpenoids and essential oil from *Litsea cubeba* in Tibet. Molecules. 15 (10). 7075-7082.
- Zegeye, E. D., Santhanam, A., Gorfu, D., Tessera, M., Kassa, B. 2011. Biocontrol activity of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* against *Phytophthora infestans* under greenhouse conditions. Journal of Agricultural Technology. 7 (6). 1589-1602.

Zheng, G. Q., Kenney, P. M., Lam, L. K. 1992. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of natural products*. 55 (7). 999-1003.

Žižka, J. 2015. Situační a výhledová zpráva: Brambory. Ministerstvo zemědělství. Praha. 47 s.

ISBN: 9788074342677 Dostupné také z:

<http://eagri.cz/public/web/file/437279/SVZ_Brambory_11_2015.pdf>

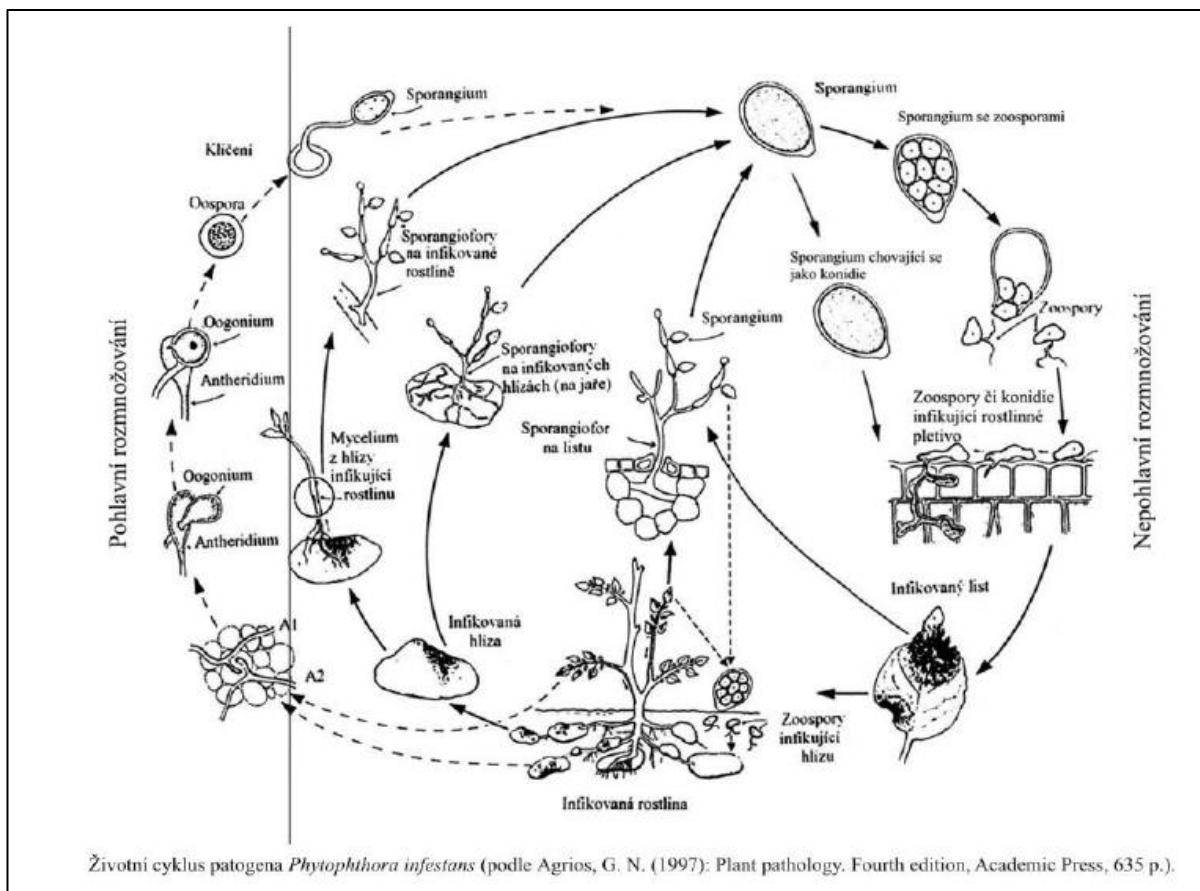
9 Seznam příloh

Příloha č. 1:	Životní cyklus patogena <i>Phytophthora infestans</i>	79
Příloha č. 2:	Seznam registrovaných přípravků proti <i>P. infestans</i> (akt. k roku 2017)	79
Příloha č. 3:	Počáteční příznaky napadení patogenem <i>P. infestans</i>	81
Příloha č. 4:	Pokročilé stádium infekce patogenem <i>P. infestans</i>	82
Příloha č. 5:	Sporangiofor se sporangiemi patogena <i>P. infestans</i>	82
Příloha č. 6:	Neúčinné esenciální oleje při 0,1% koncentraci	83
Příloha č. 7:	Účinné esenciální oleje při 0,1% koncentraci.....	84
Příloha č. 8:	Koncentrační řada u esence z <i>Thymus vulgaris</i> (izolát: ND 2/14)	84
Příloha č. 9:	Koncentrační řada u esence z <i>Pelargonium graveolens</i> (izolát: VŽ 13/14) ...	85
Příloha č. 10:	Koncentrační řada u esence z <i>Cymbopogon winterianus</i> (izolát: VŽ3 1/14) .	85
Příloha č. 11:	Koncentrační řada u esence z <i>Syzygium aromaticum</i> (izolát: P 1/14)	86
Příloha č. 12:	Koncentrační řada u esence z <i>Litsea cubeba</i> (izolát: S 1/14)	86
Příloha č. 13:	Koncentrační řada u esence z <i>Mentha spicata</i> (izolát: D 5/16)	87
Příloha č. 14:	Nárůst mycelia <i>P. infestans</i> [mm] po aplikaci esenciálního oleje z <i>Thymus vulgaris</i>	88
Příloha č. 15:	Nárůst mycelia <i>P. infestans</i> [mm] po aplikaci esenciálního oleje z <i>Pelargonium graveolens</i>	88
Příloha č. 16:	Nárůst mycelia <i>P. infestans</i> [mm] po aplikaci esenciálního oleje z <i>Litsea cubeba</i>	89
Příloha č. 17:	Nárůst mycelia <i>P. infestans</i> [mm] po aplikaci esenciálního oleje z <i>Cymbopogon winterianus</i>	89
Příloha č. 18:	Nárůst mycelia <i>P. infestans</i> [mm] po aplikaci esenciálního oleje z <i>Syzygium aromaticum</i>	90
Příloha č. 19:	Nárůst mycelia <i>P. infestans</i> [mm] po aplikaci esenciálního oleje z <i>Thymus vulgaris</i> (detailní koncentrační řada)	90

Příloha č. 20: Nárůst mycelia <i>P. infestans</i> [mm] po aplikaci esenciálního oleje z <i>Pelargonium graveolens</i> (detailní koncentrační řada).....	91
Příloha č. 21: Nárůst mycelia <i>P. infestans</i> [mm] po aplikaci esenciálního oleje z <i>Mentha spicata</i> (detailní koncentrační řada).....	91
Příloha č. 22: Nárůst mycelia <i>P. infestans</i> [mm] po aplikaci esenciálního oleje z <i>Cymbopogon winterianus</i> (detailní koncentrační řada).....	92
Příloha č. 23: Nárůst mycelia <i>P. infestans</i> [mm] po aplikaci esenciálního oleje z <i>Syzygium aromaticum</i> (detailní koncentrační řada).....	92

10 Přílohy

Příloha č. 1: Životní cyklus patogena *Phytophthora infestans*



(převzato z Agrios, G. N. 1997. Plant pathology. Fourth edition. Academic Press. p. 635)

Příloha č. 2: Seznam registrovaných přípravků proti *P. infestans* (akt. k roku 2017)

Název přípravku	Název účinné látky	Dávka
Acrobat MZ WG	Dimethomorf (CS), Mankozeb (K)	2 kg/ha 300-600 l vody/ha
Airone SC	Hydroxid měďnatý (K), Oxichlorid měďnatý (K)	3,1 l/ha 600-800 l vody/ha
Altima 500 SC	Fluazinam (S)	0,3-0,4 l/ha
Antre 70 WG	Propineb (K)	25 g /4-6 l vody/100 m ²
Badge WG	Hydroxid měďnatý (K), Oxichlorid měďnatý (K)	3 kg/ha 600-800 l vody/ha
Banjo Forte	Dimethomorf (CS), Fluazinam (S)	1 l/ha 300-600 l vody/ha
Banko 500 SC	Chlorthalonil (K)	2 l/ha 200-400 l vody/ha
Carial Flex	Cymoxanil (CS), Mandipropamid (K, CS)	0,6 kg/ha 200-600 l vody/ha
Cobran	Hydroxid měďnatý (K)	2 kg/ha 400 l vody/ha
Consento	Propamokarb-hydrochlorid (S), Fenamidon (S)	1,6-2 l/ha 200-600 l vody/ha
Coprantol Duo	Hydroxid měďnatý (K), Oxichlorid měďnatý (K)	3 kg/ha 600-800 l vody/ha
Criterion	Mankozeb (K), Benalaxyl (S)	2,5 kg/ha 200 - 600 l vody/ha
Cuproxat SC	Síran měďnatý zásaditý	5,3 l/ha 300-600 l vody/ha
Cuprozin Progress	Hydroxid měďnatý (K)	2 l/ha
Curzate Gold	Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)	2,3 kg/ha 300-400 l vody/ha

Curzate M WG	Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)	2,3 kg/ha 300-400 l vody/ha
Cymbal Flow	Cymoxanil (CS)	0,5 l/ha 200-600 l vody/ha
Cymbal	Cymoxanil (CS)	0,2-0,25 kg/ha + Dithane DG Neotec
Danso Flow	Cymoxanil (CS)	0,5 l/ha 200-600 l vody/ha
Dauphin 45	Cymoxanil (CS)	0,22 kg/ha + Dithane DG Neotec-TM
Defender Dry	Hydroxid měďnatý (K)	2 kg/ha 400 l vody/ha
Defender	Hydroxid měďnatý (K)	2 l/ha
Dithane DG Neotec	Mankozeb (K)	2 kg/ha 200-600 l vody/ha
Dithane M 45	Mankozeb (K)	2 kg/ha 200-600 l vody/ha
Drago	Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)	2 kg/ha 350-600 l vody/ha
Drum Flow	Cymoxanil (CS)	0,5 l/ha 200-600 l vody/ha
Emendo M	Mankozeb (K), valifenalát (S)	2,5 kg/ha
Fantic M	Mankozeb (K), Benalaxyl-M (S)	2,5 kg/ha 200-600 l vody/ha
Flowbrix	Oxichlorid měďnatý (K)	2,7-3,3 l/ha
Frownicide	Fluazinam (S)	0,3-0,4 l/ha
Funguran progress	Hydroxid měďnatý (K)	2 kg/ha 400 l vody/ha
Funguran-OH 50 WP	Hydroxid měďnatý (K)	4-5 kg/ha
Galben M	Benalaxyl (S), Mankozeb (K)	2,5 kg/ha 200 - 600 l vody/ha
Grecale	Cymoxanil (CS), Fluazinam (S)	0,6 l/ha 200-600 l vody/ha
Green Doctor	Pythium oligandrum M1	100-200 g/ha
Champion 50 WG	Hydroxid měďnatý (K)	2 kg/ha 300-600 l vody/ha
Infinito	Propamokarb-hydrochlorid (S), Fluopikolid (S)	12-16 ml 2-6 l vody /100 m2
Kocide 2000	Hydroxid měďnatý (K)	3,75 kg/ha
Kunshi	Cymoxanil (CS), Fluazinam (S)	0,4 - 0,5 kg/ha
Kuprikol 250 SC	Oxichlorid měďnatý (K)	0,6-0,8 % (60-80 ml/10 l vody)
Kuprikol 50	Oxichlorid měďnatý (K)	0,8 - 1 % (40 - 50 g/5 l vody)
Manfil 75 WG	Mankozeb (K)	2,1 kg/ha
Manfil 80 WP	Mankozeb (K)	2 kg/ha 200-600 l vody/ha
Manzate 75 WG	Mankozeb (K)	2 kg/ha
Mastana SC	Mankozeb (K)	3,2 l/ha
Mixanil	Chlorthalonil (K), Cymoxanil (CS)	2 l/ha
Moximate 725 WG	Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)	2,5 kg/ha 300-500 l vody/ha
Moximate 725 WP	Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)	2,5 kg/ha 300-500 l vody/ha
Nando 500 SC	Fluazinam (S)	0,3 - 0,4 l/ha
Nautile DG	Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)	2 kg/ha 200-600 l vody/ha
Nautile WP	Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)	2,25 kg/ha 200-600 l vody/ha
NOVOZIR MN 80 NEW	Mankozeb (K)	2 kg/ha 200-600 l vody/ha
Ohayo	Fluazinam (S)	0,3-0,4 l/ha
Palmas	Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)	2,2 kg/ha 200-600 l vody/ha
Penncozeb 75 DG	Mankozeb (K)	2 kg/ha
Polydresser	Pythium oligandrum M1	100-200 g/ha
Polyram WG	Metiram (K)	20 g/100 m2 (20 g/10 l vody)
Polyversum – Biogarden	Pythium oligandrum M1	100-200 g/ha 300-800 l vody/ha
Polyversum – Polygandron	Pythium oligandrum M1	100-200 g/ha 300-800 l vody/ha
Polyversum	Pythium oligandrum M1	100-200 g/ha
Presidium	Dimethomorf (CS), Zoxamid (K)	1 l/ha 200-600 l vody/ha
Profilux	Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)	2-2,5 kg/ha
PROXANIL	Cymoxanil (CS), Propamokarb (S)	2,5 l/ha 200-400 l vody/ha

Ranman Top	Kyazofamid (K)	0,5 l/ha
Revus MZ	Mandipropamid (K,CS), Mankozeb (K)	2-2,5 kg/ha 200-600 l vody/ha
Revus Top	Difenokonazol (S), Mandipropamid (K,CS)	0,6 l/ha 200-600 l vody/ha
Revus	Mandipropamid (K,CS)	0,6 l/ha 200-600 l vody/ha
Ridomil Gold MZ Pepite	Mankozeb (K), Metalaxyl-M (S)	25 g /2-6 l vody /100 m2
Sacron WG	Cymoxanil (CS)	0,22 kg/ha + Dithane DG Neotec-TM
Sereno	Mankozeb (K), Fenamidon (S)	1,5 kg/ha 200 - 600 l vody/ha
Tanos 50 WG	Cymoxanil (CS), Famoxadon (K)	0,6 - 0,7 kg/ha 300-400 l vody/ha
Valbon	Mankozeb (K), Bentiavalikarb (S)	1,6 kg/ha 200-400 l vody/ha
Valis M	Mankozeb (K), valifenalát (S)	2,5 kg/ha
Vendetta	Fluazinam (S), Azoxystrobin (S)	0,5 l/ha 200-500 l vody/ha
Winby	Fluazinam (S)	0,3-0,4 l/ha
Zampro Duo	Mankozeb (K), Ametoktradin (K)	2,5 kg/ha 100-500 l vody/ha
Zetanil WG	Cymoxanil (CS), Mankozeb (K)	2-2,4 kg/ha
Signal 500 SC	Fluazinam (S)	0,3-0,4 l/ha 300-400 l vody/ha

(dostupné z: www.eagri.cz)

Příloha č. 3: Počáteční příznaky napadení patogenem *P. infestans*



Příloha č. 4: Pokročilé stádium infekce patogenem *P. infestans*

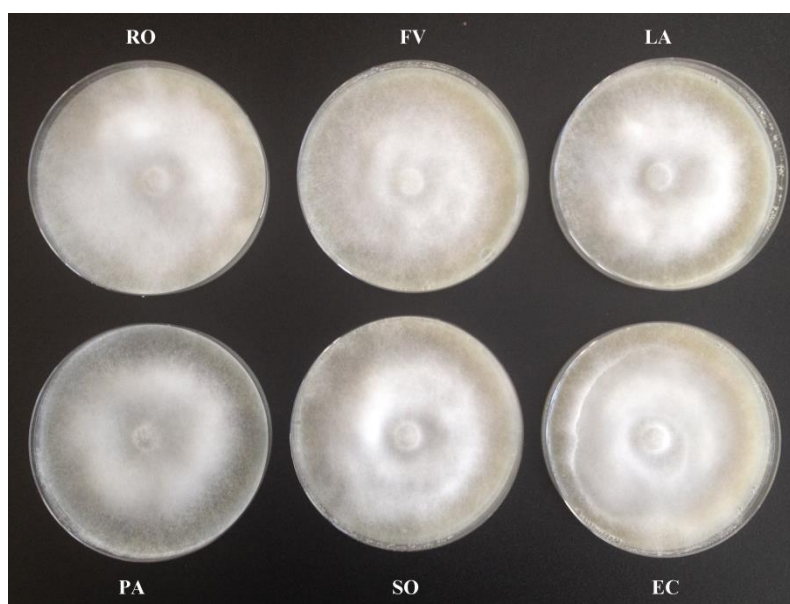


Příloha č. 5: Sporangiofor se sporangiiemi patogena *P. infestans*



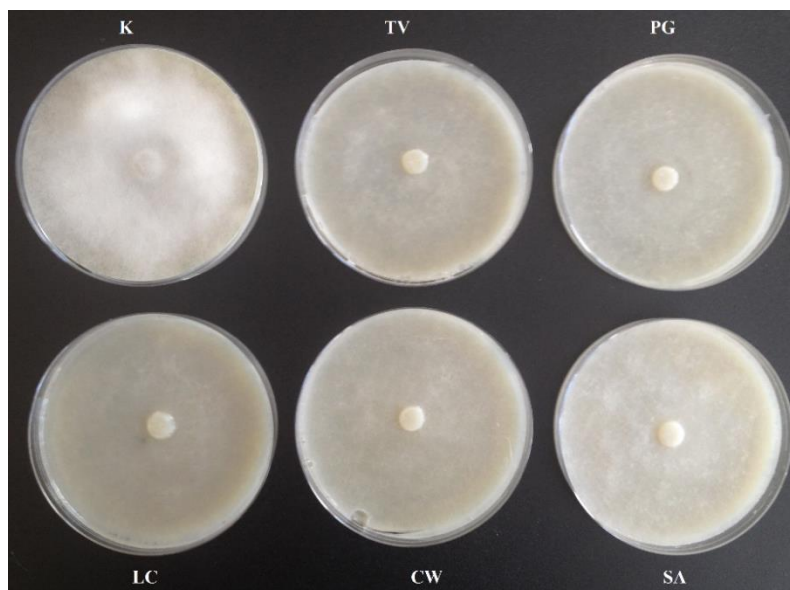


Příloha č. 6: Neúčinné esenciální oleje při 0,1% koncentraci



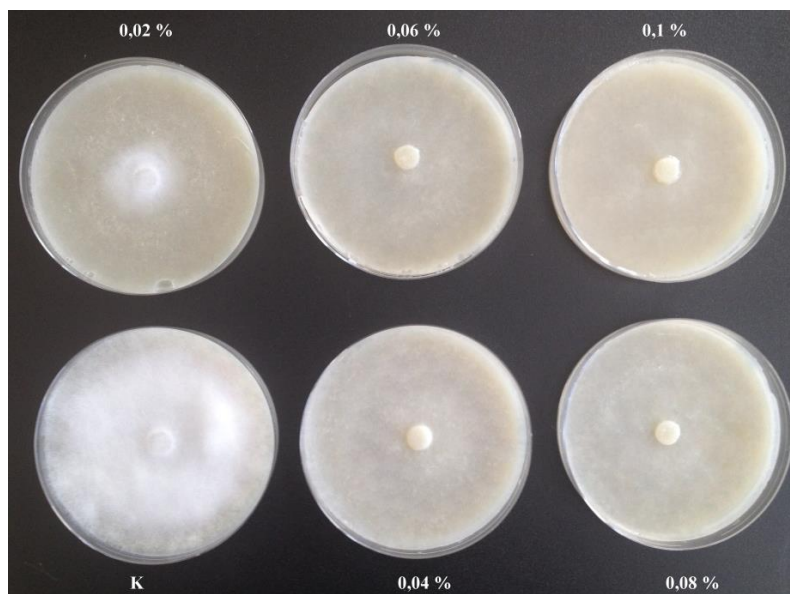
(*Rosmarinus officinalis* (RO), *Foeniculum vulgare* (FV), *Lavandula angustifolia* (LA), *Pimpinella anisum* (PA), *Salvia officinalis* (SO), *Eucalyptus citriodora* (EC))

Příloha č. 7: Účinné esenciální oleje při 0,1% koncentraci

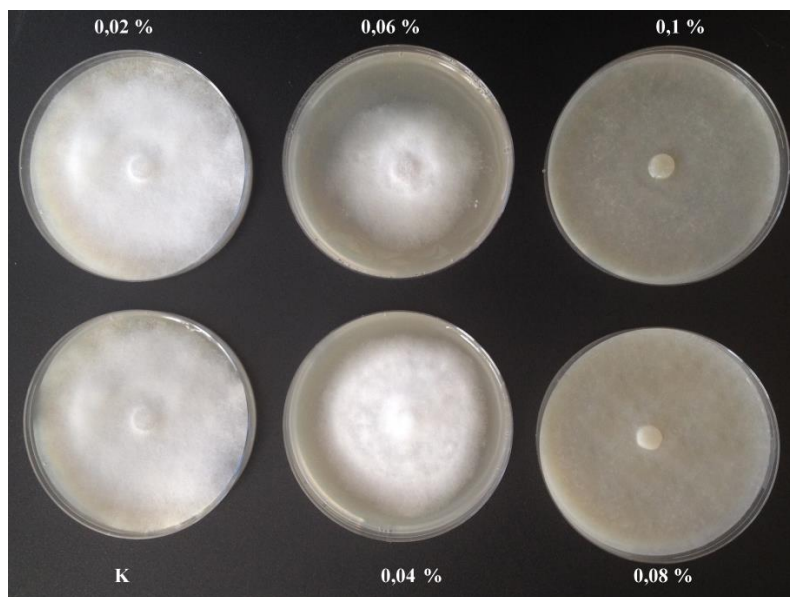


(*Thymus vulgaris* (TV), *Pelargonium graveolens* (PG), *Litsea cubeba* (LC), *Cymbopogon winterianus* (CW) a *Syzygium aromaticum* (SA))

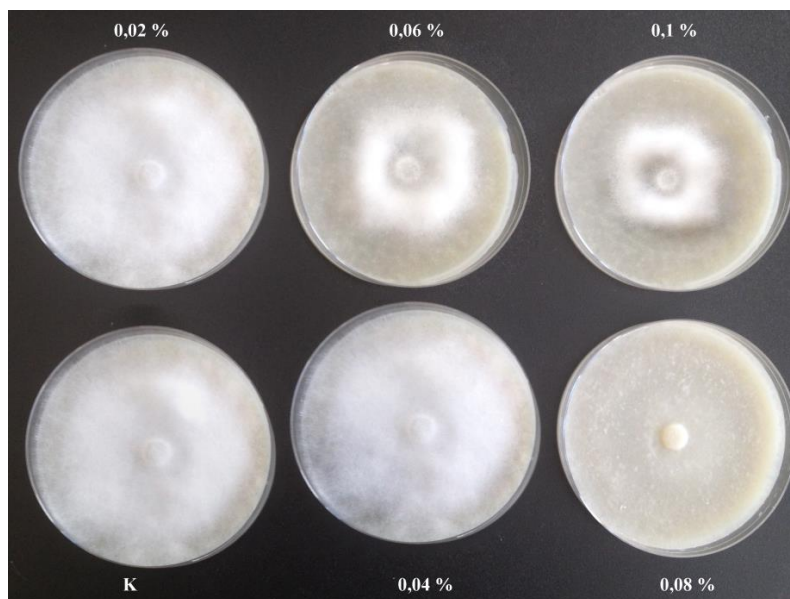
Příloha č. 8: Koncentrační řada u esence z *Thymus vulgaris* (izolát: ND 2/14)



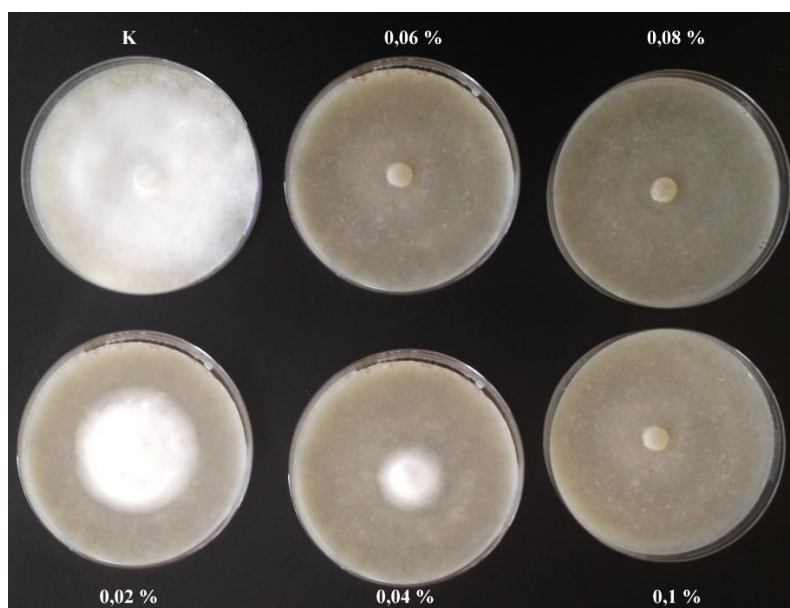
Příloha č. 9: Koncentrační řada u esence z *Pelargonium graveolens* (izolát: VŽ 13/14)



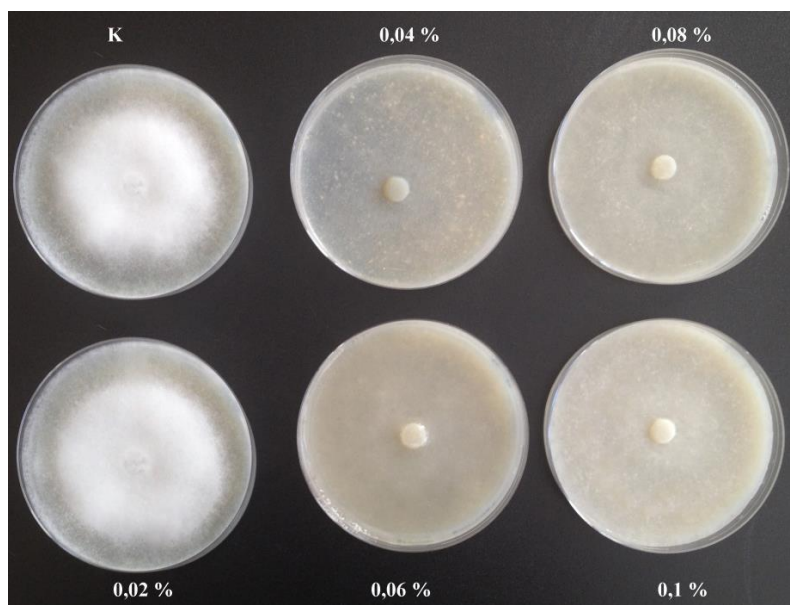
Příloha č. 10: Koncentrační řada u esence z *Cymbopogon winterianus* (izolát: VŽ3 1/14)



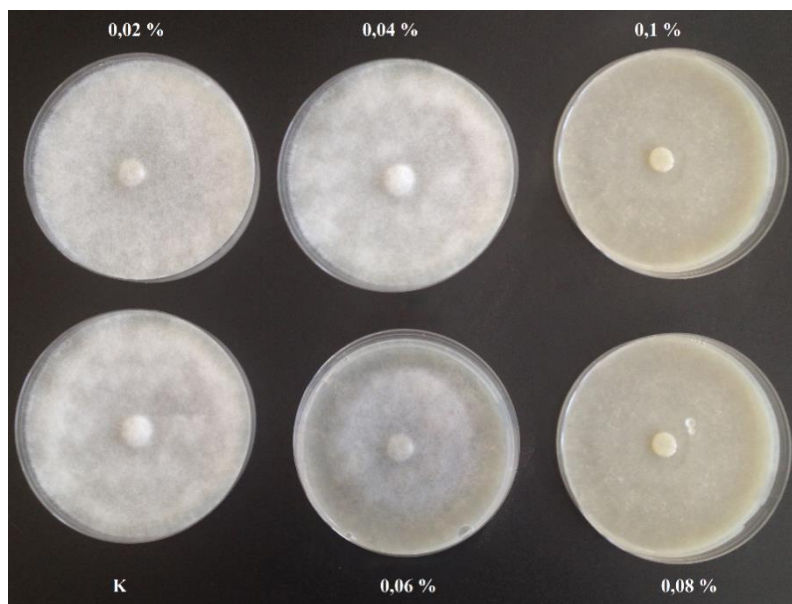
Příloha č. 11: Koncentrační řada u esence z *Syzygium aromaticum* (izolát: P 1/14)



Příloha č. 12: Koncentrační řada u esence z *Litsea cubeba* (izolát: S 1/14)



Příloha č. 13: Koncentrační řada u esence z *Mentha spicata* (izolát: D 5/16)



Příloha č. 14: Nárůst mycelia *P. infestans* [mm] po aplikaci esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*

IZOLÁT	TV 200			TV 400			TV 600			TV 800			TV 1000		
VŽ 13/14	63,5	54,8	56,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ND 2/14	7,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S11/14	7,65	9,9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Č1/14	7,7	8,75	10,75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VŽ14/14	40,75	42,9	42,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P1/14	42,35	51,65	28,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1/14	7,95	8,75	7,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Č3/14	9,7	10,05	8,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V31/14	12,4	9,25	5,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V11/14	8,95	7,15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Příloha č. 15: Nárůst mycelia *P. infestans* [mm] po aplikaci esenciálního oleje z *Pelargonium graveolens*

IZOLÁT	PG 200			PG 400			PG 600			PG 800			PG 1000		
VŽ 13/14	90	90	90	63,25	73,55	71,4	39	56,65	42,5	0	0	0	0	0	0
ND 2/14	90	90	90	71,15	73,7	90	20,95	20,7	26,85	0	0	0	0	0	0
S11/14	90	90	87,5	59,25	50,3	61,75	13,05	15,55	22,45	0	0	0	0	0	0
Č1/14	90	90	90	90	90	85,05	28,2	36	43,75	0	0	0	0	0	0
VŽ14/14	90	90	90	90	90	90	90	90	90	0	0	0	0	0	0
P1/14	90	85	90	15,6	20,35	16	11,75	12,95	0	0	0	0	0	0	0
S1/14	90	90	90	49,05	40,75	57,85	13,65	11,4	0	0	0	0	0	0	0
Č3/14	90	90	90	80,6	61,05	90	18,65	0	0	0	0	0	0	0	0
V31/14	90	90	90	55,25	69	37,8	40,25	28,4	44,95	0	0	0	0	0	0
V11/14	90	90	52,3	9	12,35	10,9	11,7	0	9,05	0	0	0	0	0	0

Příloha č. 16: Nárůst mycelia *P. infestans* [mm] po aplikaci esenciálního oleje z *Litsea cubeba*

IZOLÁT	LC 200			LC 400			LC 600			LC 800			LC 1000		
VŽ 13/14	90	90	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ND 2/14	90	90	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S11/14	90	90	90	52,3	27,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Č1/14	90	90	90	58,85	90	90	90	90	48,95	90	85	56,6	0	0	0
VŽ14/14	90	90	90	90	90	90	90	90	90	80,05	38,45	66,9	0	0	0
P1/14	75,65	90	90	20,85	7,95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1/14	90	90	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Č3/14	90	90	90	64,35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V31/14	90	90	90	90	90	90	90	90	90	74,25	56,85	55,25	0	0	0
V11/14	90	90	42,95	0	41,7	20,63	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Příloha č. 17: Nárůst mycelia *P. infestans* [mm] po aplikaci esenciálního oleje z *Cymbopogon winterianus*

IZOLÁT	CW 200			CW 400			CW 600			CW 800			CW 1000		
VŽ 13/14	90	90	90	83,9	81,6	90	43,25	62,55	69,9	68,8	42,2	59,25	0	0	0
ND 2/14	90	90	90	90	90	90	30,3	59,35	45,55	25,75	21,85	20,7	0	0	0
S11/14	90	90	90	90	90	90	68	72,15	42,49	27,05	32,45	29,3	0	0	0
Č1/14	90	90	90	90	90	90	78,25	73,65	78	71,8	90	90	0	0	0
VŽ14/14	90	90	90	90	90	90	83,6	90	90	90	90	90	0	0	0
P1/14	90	90	90	60,4	32,65	32,95	28,05	51,15	37,1	14,2	13,25	12,2	0	0	0
S1/14	90	90	90	90	90	90	33,6	24,85	22,09	20,1	0	11,85	0	0	0
Č3/14	90	90	90	90	90	90	63,7	67,1	39,4	11,45	12,35	29,8	0	0	0
V31/14	90	90	90	90	90	90	90	80,95	80,1	67,65	40,35	62,45	0	0	0
V11/14	79,6	90	90	19,35	21,75	21,15	8,95	12,8	17,35	7	0	0	0	0	0

Příloha č. 18: Nárůst mycelia *P. infestans* [mm] po aplikaci esenciálního oleje z *Syzygium aromaticum*

IZOLÁT	SA 200			SA 400			SA 600			SA 800			SA 1000		
VŽ 13/14	47,97	29,91	46,82	22,64	12,17	7,61	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ND 2/14	71,14	75,08	66,63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S11/14	7,91	0	7,35	0	7,24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Č1/14	60,6	72,04	76,17	33,38	54,09	11,92	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VŽ14/14	59,31	62,39	65,83	22,67	30,87	22,67	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P1/14	59,14	68,3	54,38	18,22	20,55	36,96	5,13	0	0	0	0	0	0	0	0
S1/14	59,14	68,3	54,38	18,22	20,55	36,96	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Č3/14	9,66	8,05	8,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V31/14	9,25	0	6,79	6,23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V11/14	9,51	8,99	15,38	7,72	8,22	7,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Příloha č. 19: Nárůst mycelia *P. infestans* [mm] po aplikaci esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* (detailní koncentrační řada)

IZOLÁT	TV 200			TV 250			TV 300			TV 350			TV 400		
D5/16	38	35	20	34	13	16	48	36	13	0	0	0	0	0	0
V3/16	15	35	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MB1/16	24	23	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ve5/16	20	20	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ž2/16	20	15	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1/16	61	49	63	15	38	19	50	0	14	0	0	0	0	0	0
U2/16	14	29	0	30	14	0	14	12	15	0	0	0	0	0	0
Lu7/16	7	3	62	26	41	21	20	0	24	13	13	13	0	0	0
VŽ1/16	40	50	80	52	36	63	47	0	0	0	0	0	0	0	0
L16/16	35	14	40	25	11	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Příloha č. 20: Nárůst mycelia *P. infestans* [mm] po aplikaci esenciálního oleje z *Pelargonium graveolens* (detailní koncentrační řada)

IZOLÁT	PG 600			PG 650			PG 700			PG 750			PG 800		
D5/16	22	22	20	21	20	21	22	0	0	0	0	0	0	0	0
V3/16	0	30	15	22	23	10	18	0	17	0	0	0	0	0	0
MB1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ve5/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ž2/16	19	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1/16	47	58	22	17	31	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
U2/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lu7/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VŽ1/16	26	0	26	16	19	21	23	21	21	23	21	23	0	0	0
L16/16	30	32	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Příloha č. 21: Nárůst mycelia *P. infestans* [mm] po aplikaci esenciálního oleje z *Mentha spicata* (detailní koncentrační řada)

IZOLÁT	MS 200			MS 400			MS 600			MS 800			MS 1000		
D5/16	80	80	80	80	80	80	80	80	40	0	0	0	0	0	0
V3/16	80	80	80	80	80	80	0	0	54	28	0	64	0	0	0
MB1/16	80	80	80	80	80	80	65	54	22	0	0	0	0	0	0
Ve5/16	80	80	80	80	80	80	0	44	34	0	53	0	0	0	0
Ž2/16	80	80	80	80	80	70	31	47	43	0	0	0	0	0	0
S1/16	80	80	80	80	80	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
U2/16	80	80	80	80	80	34	0	32	16	0	0	0	0	0	0
Lu7/16	80	80	80	80	71	56	80	45	33	30	39	18	0	0	0
VŽ1/16	80	80	80	69	49	47	48	50	49	0	0	0	0	0	0
L16/16	80	80	80	51	80	80	0	80	70	0	0	0	0	0	0

Příloha č. 22: Nárůst mycelia *P. infestans* [mm] po aplikaci esenciálního oleje z *Cymbopogon winterianus* (detailní koncentrační řada)

IZOLÁT	CW 1000			CW 1050			CW 1100			CW 1150			CW 1200		
D5/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V3/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MB1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ve5/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ž2/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
U2/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lu7/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VŽ1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L16/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Příloha č. 23: Nárůst mycelia *P. infestans* [mm] po aplikaci esenciálního oleje z *Syzygium aromaticum* (detailní koncentrační řada)

IZOLÁT	SA 200			SA 400			SA 600			SA 800			SA 1000		
D5/16	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V3/16	20	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MB1/16	18	20	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ve5/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ž2/16	23	16	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1/16	19	15	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
U2/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lu7/16	29	40	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VŽ1/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L16/16	19	14	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0