

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů



Využití esenciálních olejů v ochraně rostlin vůči patogenům

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Anna Lebdušková

Studijní program: Biologie (N1501)

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: RNDr. Božena Sedláková, Ph.D.

Olomouc 2023

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora: Bc. Anna Lebdušková
Název práce: Využití esenciálních olejů v ochraně rostlin vůči patogenům
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce: RNDr. Božena Sedláková, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2023

ABSTRAKT

Diplomová práce se věnuje ochraně rostlin a uskladněných plodů vůči vybraným biotrofním a saprofytickým patogenům s využitím esenciálních olejů, které mohou představovat bezpečnější alternativu chemických ochranných prostředků. Teoretická část zahrnuje literární rešerši na téma možných příčin vzniku rostlinných chorob a přirozených obranných mechanismů rostlin, dále charakterizuje prostředky pro ochranu rostlin před jejich patogeny a rozebírá problematiku vzniku rezistence. Experimentální část se zabývá účinky 6 esenciálních olejů vůči patogenům *Pseudoperonospora cubensis* a *Podosphaera xanthii* na listech *Cucumis sativus* a dále vůči plísním rodu *Alternaria* a *Fusarium* na plodu tykve *Cucurbita maxima*. Na základě získaných experimentálních dat se v ochraně listů *Cucumis sativus* vůči patogenu *Podosphaera xanthii* jako účinný prokázal olej citronelový, který působil inhibičně v celém rozsahu testovaných koncentrací. Vůči patogenu *Pseudoperonospora cubensis* byly účinné v celém rozsahu testovaných koncentrací oleje citronelový a tymiánový, avšak problematické byly jejich fytotoxické účinky vůči modelové rostlině. V ochraně vůči oběma saprofytickým plísním byl účinný pouze olej tymiánový. Jako neúčinný v ochraně vůči všem testovaným patogenním organismům se projevil olej kajeputový, který vykazoval nejmenší inhibiční účinky a zároveň působil nejméně fytotoxicky.

Klíčová slova: Esenciální oleje, *Pseudoperonospora cubensis*, *Podosphaera xanthii*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita maxima*
Počet stran: 64
Počet příloh: 9
Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Bc. Anna Lebdušková
Title: Use of essential oils in plant protection against pathogens
Type of thesis: Master
Department: Laboratory of growth regulators, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Supervisor: RNDr. Božena Sedláková, Ph.D.
The year of presentation: 2023

ABSTRACT

The diploma thesis is devoted to the protection of plants and stored fruits against selected biotrophic and saprophytic pathogens using essential oils, which can represent a safer alternative to chemical protective agents. The theoretical part includes a literature search about possible causes of plant diseases and natural defense mechanisms of plants. Further characterizes plant protection agents and analyzes the issue of the emergence of resistance. The experimental part deals with the effects of 6 essential oils against the pathogens *Pseudoperonospora cubensis* and *Podosphaera xanthii* on the leaves of *Cucumis sativus* and against the fungi of the genera *Alternaria* and *Fusarium* on the squash *Cucurbita maxima*. Based on the obtained experimental data, citronella oil proved to be effective in the protection of *Cucumis sativus* leaves against the pathogen *Podosphaera xanthii*, which had an inhibitory effect in the entire range of tested concentrations. Against the pathogen *Pseudoperonospora cubensis*, citronella and thyme oils proved to be effective in the entire range of tested concentrations. Problematic were their phytotoxic effects against the model plant. Only thyme oil was effective in protecting against both saprophytic fungi. Cajeput oil was shown to be ineffective in protecting against all tested pathogenic organisms, which showed the least inhibitory effects and at the same time had the least phytotoxic effect.

Keywords: Essential oils, *Pseudoperonospora cubensis*, *Podosphaera xanthii*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita maxima*
Number of pages: 64
Number of appendices: 9
Language: Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za použití literárních zdrojů uvedených v závěru práce pod vedením RNDr. Boženy Sedlákové, Ph.D.

V Olomouci dne

Podpis:

Bc. Anna Lebdušková

Poděkování

Děkuji své vedoucí práce RNDr. Boženě Sedlákové, Ph.D. za ochotu, vstřícnost a odborné vedení při vypracování této diplomové práce. Za podporu děkuji také své rodině, přátelům a kolegyním Adele, Ivaně a Natálii.

Výsledky získané v experimentální části této diplomové práce byly řešeny v rámci projektů IGA UP PňF 2022-001 a IGA UP PňFF 2023-002.

OBSAH

1. Úvod	1
2. Cíle práce.....	2
3. Literární část.....	3
3.1. Choroby rostlin.....	3
3.1.1. Přirozené obranné mechanismy rostlin.....	4
3.1.2. Cesty a mechanismy patogeneze	6
3.2. Rostliny čeledi tykvovitých a jejich původci chorob	7
3.2.1. Okurka setá	8
3.2.2. Tykev velkoplodá	9
3.2.3. Biotrofní patogeny	9
3.2.4. Saprofytické patogeny	12
3.3. Ochrana rostlin	14
3.3.1. Chemická ochrana rostlin v podobě syntetických pesticidů	15
3.3.2. Biologická ochrana rostlin	18
3.3.3. Esenciální oleje v ochraně rostlin	21
3.4. Rezistence	24
3.4.1. Vznik nežádoucí rezistence	24
3.4.2. Indukovaná rezistence rostlin	27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1. Materiál	30
4.1.1. Pomůcky, přístroje a chemikálie.....	30
4.1.2. Rostlinný materiál.....	30
4.1.3. Patogenní organismy.....	31
4.1.4. Esenciální oleje	32
4.1.5. Fungicidní přípravky.....	32
4.2. Metodika	33

4.2.1.	Příprava emulzí esenciálních olejů a roztoků fungicidů	33
4.2.2.	Vyhotovení listových disků	34
4.2.3.	Postup práce s patogenem <i>Podosphaera xanthii</i>	35
4.2.4.	Postup práce s patogenem <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	38
4.2.5.	Postup práce s patogeny rodu <i>Alternaria</i> a <i>Fusarium</i>	40
5.	Výsledky	42
5.1.	<i>Podosphaera xanthii</i>	42
5.2.	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	45
5.3.	<i>Alternaria</i>	47
5.4.	<i>Fusarium</i>	48
5.5.	Souhrnné výsledky účinků EO	49
6.	Diskuze	51
7.	Závěr	55
8.	Literatura	56
9.	Přílohy	64

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABA	Kyselina abscisová
ATP	Adenosintrifosfát
Atp.	A tak podobně
Ca ²⁺	Vápenaté ionty
CMV	Virus mozaiky dýňovitých (tykvovitých)
CNS	Centrální nervová soustava
CYP450	Cytochrom P450
CYSDV	Virus kadeřavosti listů tykve
DDT	Dichlordifenyltrichlorethan
DMI	Demetylační inhibitory
EO	Esenciální olej/e
GABA	Kyselina γ -aminomáselná
GC-MS	Spojení metod plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie
ISR	Indukovaná systémová rezistence
LPMO	Lytické polysacharidové monooxygenázy
MAMP	Microbe associated molecular patterns (z angličtiny molekulární vzory spojované s mikroby)
Např.	Například
NLR	Nucleotide-binding leucine-rich repeat receptor (z angličtiny nukleotid vazebný receptor bohatý na leucin)
PAMP	Pathogen associated molecular patterns (z angličtiny molekulární vzory spojované s patogeny)
PC	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>
PDA	Bramborový agar (z angličtiny potato dextrose agar)
PR1, PR2	Pathogen related genes 1, 2 (z angličtiny geny související s patogeny)
PRR	Pattern recognition receptor (z angličtiny receptor rozpoznávající vzor)
PX	<i>Podosphaera xanthii</i>
QoI	Vnější inhibitory chinonu
SA	Kyselina salicylová
SAR	Systémová rezistence
<i>SqVYV</i>	Squash vein yellowing virus (z angličtiny virus žloutnutí žil dýně)
<i>THT</i>	Tyramin hydroxycinnamoyl transferáza
TyDC	Tyrosin dekarboxyláza
Tzn.	To znamená
Tzv.	Takzvaný/á/é
UPOL	Univerzita Palackého v Olomouci
UV	Ultrafialové záření
UV-C	Ultrafialové záření typu C
<i>ZYMV</i>	Virus žluté mozaiky cukety

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Projevy intenzivního napadení listů tykve obecné (<i>Cucurbita pepo</i>) padlím tykvovitých	10
Obrázek 2: Napadení listů okurky seté (<i>Cucumis sativus</i>) patogenem <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	11
Obrázek 3-4: Projevy hniloby stonku na rostlině kukuřice způsobené napadením plísní rodu <i>Alternaria</i>	13
Obrázek 5: Projevy hniloby stonku na rostlině kukuřice způsobené napadením plísní rodu <i>Fusarium</i>	13
Obrázek 6: Schéma uspořádání disků v plastové krabici	35
Obrázek 7: Schéma uspořádání listových disků na Petriho misce při testování PX.	36
Obrázek 8: Schéma uspořádání 24-jamkové destičky	39
Obrázek 9: Schéma uspořádání listových disků na Petriho misce při testování účinků EO vůči PC.	39
Obrázek 10: Schéma uspořádání kusů dýně velkoplodé (<i>Cucurbita maxima</i>) v plastové krabici.	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Vybrané pesticidní látky, jejich účel užití a nepříznivé účinky na lidské zdraví.	18
Tabulka 2: Vybrané biopesticidní účinné látky, jejich původ, účinky a některé komerčně dostupné přípravky, jejichž základem jsou tyto látky, které jsou dostupné na evropském trhu.....	20
Tabulka 3: Tabulka účinných látek v ochraně rostlin, které jsou součástí některých esenciálních olejů.....	23
Tabulka 4: Vybrané induktory imunitního systému rostlin, jejich původ, účinky a možnosti využití.....	29
Tabulka 5: Specifikace patogenních organismů a jejich izolátů.	31
Tabulka 6: Seznam testovaných esenciálních olejů, původ a výrobce.	32
Tabulka 7: Využité fungicidní prostředky, jejich účinná látka a výrobce.	33
Tabulka 8: Příprava emulzí EO v příslušných koncentracích.	34
Tabulka 9: Příprava roztoků fungicidů.....	34
Tabulka 10: Stupnice pro hodnocení pokrytí listového disku narostlou <i>PX</i>	37
Tabulka 11: Výsledky testování účinků EO vůči izolátům 22/21 Px a 26/21 Px v rozsahu koncentrací 0,025; 0,05 a 0,075 %.	43
Tabulka 12: Výsledky testování účinků EO vůči izolátům OL PC 7/21 a PC 28/18 2 v rozsahu koncentrací 0,025; 0,05 a 0,075 %.	45
Tabulka 13: Výsledky testování účinků EO o koncentraci 1,5 % vůči plísni rodu <i>Alternaria</i>	47
Tabulka 14: Výsledky testování účinků EO o koncentraci 1,5 % vůči plísni rodu <i>Fusarium</i>	48
Tabulka 15: Souhrnné výsledky reakcí jednotlivých patogenů vůči všem testovaným EO	49

1. ÚVOD

Celosvětově produkované plodiny jsou neustále ohrožovány mnoha mikrobiálními patogeny, které mohou způsobovat jejich poškození před i po sklizni (Khetabi *et al.*, 2021). Před sklizní plodiny může ohrožovat obligátně biotrofní plíseň *Pseudoperonospora cubensis* z oddělení *Oomycota* způsobující plísňové infekce nebo ektoparazitická houba *Podosphaera xanthii* z řádu *Erysiphales* způsobující padlí (Lebeda & Cohen, 2011; Lebeda *et al.*, 2021). Mezi významné posklizňové patogeny patří saprofytické invazivní houbové patogeny rodu *Alternaria* a *Fusarium* z oddělení *Ascomycota* (Antunes & Cavao, 2010; Karim *et al.*, 2016).

Pro zabránění snižování výnosnosti pěstování je tedy nutné rostliny chránit před parazity. V minulosti se využívaly především syntetické chemické preparáty, jejichž používání mohlo vést k rozvoji rezistence v populaci patogenu. Jejich rezidua také mohla představovat potenciální nebezpečí pro lidské zdraví po požití ošetřených plodin. Tyto látky měly rizikový vliv rovněž na životní prostředí (Hosseini *et al.*, 2020). Pro eliminaci těchto nepříznivých důsledků je nutné hledat a začít využívat bezpečné alternativní ochranné prostředky. Vhodnou náhradou představují například různé druhy záření (např. LED, gamma, UV), dále roztoky solí, přípravky biologické ochrany (např. kvasinky, bakterie) nebo rostlinné extrakty (Rod *et al.*, 2005; Ballester & Lafuente, 2017; Youssef *et al.*, 2020; Matrose *et al.*, 2021).

Jako velmi slibné alternativní látky v ochraně rostlin se jeví také esenciální oleje (Khetabi *et al.*, 2021). Některé jejich složky (např. limonen, karvakrol) již prokázaly své antimikrobiální, insekticidní a herbicidní účinky, kterých lze využívat v zemědělství (Fierascu *et al.*, 2020). Dalším benefitem esenciálních olejů je jejich snadná biodegradabilita, minimální účinky na necílové organismy a zpomalování výskytu rezistence u škůdců (Janisiewicz & Korsten, 2002; Senthil-Nathan, 2020).

2. CÍLE PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše na téma rostlinných chorob, ochrany rostlin před jejich patogeny a o problematice vzniku rezistence.
2. Testování a hodnocení účinků esenciálních olejů vůči 2 biotrofním patogenům – vůči původci plísně tykvovitých (*Pseudoperonospora cubensis*) a padlí tykvovitých (*Podosphaera xanthii*), na listech okurky seté (*Cucumis sativus*), kultivaru Perseus F1. Zhodnocení získaných dat, vyvození závěrů a možností využití.
3. Testování a hodnocení účinků esenciálních olejů na plodu tykve velkoplodé (*Cucurbita maxima*) vůči saprofytickým plísním rodu *Fusarium* a *Alternaria*. Zhodnocení získaných dat, vyvození závěrů a možností využití.

3. LITERÁRNÍ ČÁST

3.1. Choroby rostlin

Rostliny jsou po celou dobu svého života vystavovány různým stresovým podmínkám, které mohou vést k rozvoji chorob (De Oliveira, 2019). Ty mohou být způsobeny biotickými nebo abiotickými faktory, případně jejich kombinací. Mezi biotické faktory patří především bakteriální, virové a houbové infekce. Biotické faktory se vzájemně ovlivňují s faktory abiotickými (Nazarov *et al.*, 2020). Mezi ně patří například světlo, teplo, chlad, sucho, povětrnostní podmínky, salinita půdy nebo přítomnost toxických látek. Environmentální podmínky, tedy abiotické faktory hrají významnou roli pro růst a správný vývoj rostlin (De Oliveira, 2019).

Pro každou čeleď rostlin jsou ideální podmínky pro pěstování rozdílné. Zásadní roli hraje zásobení vodou, obsah humusu v půdě, druh půdy a její pH. Nadměrná závlaha a nemožnost dostatečného osychání rostlin může vést ke zvýšenému infekčnímu tlaku houbových patogenů. Významnou roli hraje také zásobení základními nutrienty. Nevhodný typ půdy však nelze nahradit zvýšeným hnojením minerálními hnojivy. Přehnojení rostlin má často opačný efekt a rostliny se pak stávají náchylnější k napadení patogeny. Pro správnou výživu rostlin je vhodné využívat statkový hnůj nebo kompost, v nichž jsou obsaženy látky a organismy, které mají schopnost redukovat choroboplodné zárodky (Rod *et al.*, 2005).

Změnou ideálních environmentálních podmínek může docházet k alteracím fyziologických procesů a rostliny se tak mohou stávat citlivější vůči infekčním faktorům. Snadno rozpoznatelná je například dysfunkce chloroplastů, které tvoří méně chlorofylu. Listy rostliny jsou pak mozaikovitě zbarvené, nebo trpí chlorózami, tedy světlým zbarvením, po celé ploše listu. Typicky se chorobný stav projevuje ztrátou turgoru – vadnutím, dále skvrnitostí, nekrotizací, hnilobou, hypertrofií a hyperplazií, deformacemi, vrásněním a kroucením listů a destrukcí postižené tkáně (Nazarov *et al.*, 2020).

V časopise *Molecular Plant Pathology* byly publikovány 3 výzkumy (Mansfield *et al.*, 2012, Scholthof *et al.*, 2011, Dean *et al.*, 2012), ve kterých byly sestaveny seznamy 10 nejvýznamnějších původců chorob z řad virových, bakteriálních a houbových patogenů. Jednotlivé patogeny byly vybrány na základě jejich vědeckého

a ekonomického významu. První studie (Mansfield *et al.*, 2012) uvádí nejvýznamnější bakteriální patogeny. Zařadila mezi ně následující bakterie: *Pseudomonas syringae* (napadá široké spektrum hostitelských rostlin, způsobuje např. bakteriální skvrnitost rajčat nebo krvácivou rakovinu jírovce maďalu), *Ralstonia solanacearum* (představuje druhový komplex, který je původcem hnědé hniloby brambor, bakteriálního vadnutí rajčat a tabáku) a *Agrobacterium tumefaciens* (způsobuje neoplastickou transformaci v místě poranění rostlin). Druhá studie (Scholthof *et al.*, 2011) se zabývala virovými patogeny. Mezi nejvýznamnější virové původce zařadila viry napadající rostliny tabáku, rajčat a okurek – virus tabákové mozaiky, virus bronzovitosti rajčete a virus mozaiky dýňovitých. A třetí studie (Dean *et al.*, 2012) se věnovala houbovým patogenům. Mezi nejvýznamnější zařadila následující: *Magnaporthe oryzae* (napadá rostliny rýže), *Botrytis cinerea* (neboli šedá plíseň, která může napadat široké spektrum druhů), *Puccinia spp.* (způsobuje rez pšenice) a dva druhy rodu *Fusarium* – *F. graminearum* (napadá obiloviny) a *F. xyssporum* (napadá rajčata, bavlníky a banánovníky).

3.1.1. Přirozené obranné mechanismy rostlin

Rostliny si během svého vývoje vytvořily komplexní obranný systém, který je schopen je efektivně chránit před biotickými i abiotickými stresovými podmínkami z okolního prostředí (Ballhorn *et al.*, 2009). Tento systém zahrnuje mechanismy fyzické, chemické i molekulární povahy (Mostafa *et al.*, 2022).

Fyzické bariéry jsou efektivní především vůči makroskopickým škůdcům, například vůči herbivorům a různým druhům hmyzu. Tyto bariéry zahrnují například vrstvy epidermis, trny, trichomy nebo kutikulu. Kutikula díky svému složení s vysokým obsahem triterpenoidů tvoří kluzký povrch rostlin, na který je obtížné se přichytit (Mostafa *et al.*, 2022). Hraje také důležitou roli v ochraně vůči abiotickým stresorům, kdy zamezuje nadměrným ztrátám vody (Serrano *et al.*, 2014). Vysoká hustota trichomů a trnů podporuje zvýšenou obranyschopnost vůči napadení rostliny hmyzovými škůdci (Mostafa *et al.*, 2022).

Chemické mechanismy zahrnují především produkty sekundárního metabolismu (Mostafa *et al.*, 2022). Sekundární metabolity, jako jsou alkaloidy, flavonoidy nebo fenoly. Tyto metabolity nejsou pro rostliny nezbytné, přinášejí jim ovšem mnoho výhodných vlastností, které vedou ke zvýšení životaschopnosti a obranyschopnosti vůči patogenním organismům a škůdcům (Zaynab *et al.*, 2018; Agostini-Costa *et al.*, 2012).

U těchto látek byly prokázány antivirové, antimikrobiální i antimykotické účinky, kterých lze využít v ochraně vůči infekcím způsobeným viry, bakteriemi a houbovými organismy (Zaynab *et al.*, 2018). Například fenoly působí na membránové proteiny a deformují jejich stavbu, tím mění permeabilitu membrán, což vede k narušení životně důležitých funkcí patogenního organismu (De Oliveira *et al.*, 2011). Fenolické látky také představují účinnou ochranu vůči některým abiotickým faktorům – environmentálním stresovým podmínkám v podobě vysoké salinity půdy, sucha a UV záření (Kumar *et al.*, 2020). Sekundární metabolity jsou díky svému původu zároveň šetrné k životnímu prostředí i lidskému zdraví. V budoucnosti by tedy mohly představovat alternativu k syntetickým pesticidům. Indukce syntézy některých sekundárních metabolitů je spjata s nepříznivými vnějšími podmínkami a funkcí rostlinného imunitního systému (Zaynab *et al.*, 2018).

Funkce rostlinného imunitního systému patří mezi molekulární mechanismy obrany rostlin (Hu *et al.*, 2021). Jeho vývoj probíhal miliony let na základě interakcí rostlin s různými patogeny. Tvoří tedy velmi komplexní složitý systém, který je schopen rozeznávat specifické struktury patogenů. Specifické struktury jsou představovány molekulami MAMP (microbe associated molecular patterns, z angličtiny molekulární vzory spojované s mikroby) a PAMP (pathogen associated molecular patterns, z angličtiny molekulární vzory spojované s patogeny), které jsou specificky rozpoznávány receptory imunitního systému (Asai & Shirasu, 2015; Lu & Tsuda, 2021). Molekuly MAMP a PAMP jsou nejčastěji reprezentovány v podobě lipopolysacharidů, flagelinu, peptidoglykanů, chitinu nebo β -glukanů (Hu *et al.*, 2021). Imunitní receptory jsou dvojího typu – extracelulární PRR (pattern recognition receptor, z angličtiny receptor rozpoznávající vzor) a intracelulární NLR (nucleotide-binding leucine-rich repeat receptor, z angličtiny nukleotid vazebný receptor bohatý na leucin). Tato interakce může výrazně ovlivnit obrannou reakci. Dochází pak ke zvýšenému influxu Ca^{2+} iontů, které fungují jako druhý posel, dále dochází ke tvorbě reaktivních forem kyslíku, aktivaci mitogen-aktivované protein kinázové kaskády, indukci exprese obranných genů a biosyntéze jejich produktů – například některých fytohormonů (Lu & Tsuda, 2021).

3.1.2. Cesty a mechanismy patogeneze

Patogen je parazitický organismus, který roste a množí se na úkor hostitelského organismu (rostliny) a způsobuje jeho chorobný stav. Schopnost patogenu způsobit tento stav je spojen s jeho patogenitou – schopností napadnout rostlinu a usadit se na něm (Agrios, 2005). Klíčovou roli tedy hraje schopnost překonání fyzických bariér (např. kutikula, buněčná stěna), manipulace imunitního systému nebo odebrání důležitých nutrientů (Toruño, Stergiopoulos & Coaker, 2016). Odebírání vody a nutrientů znesnadňuje rostlinám jejich další vývoj a reprodukci. Dochází poté k jejich oslabení, abnormálnímu vývoji a růstu (Agrios, 2005).

Některé druhy plísní (např. *Cladosporium fulvum*) a bakterií (např. *Pseudomonas syringae*) dokáží pro vstup do rostlinných buněk využít již existující otvory na povrchu rostlin (důsledky poškození, rány, průduchy). Hlavní bránu představují právě přirozeně se vyskytující průduchy. Proces infekce skrz průduchy může být usnadněn manipulací imunitního systému, která zahrnuje blokaci procesů následujících pro interakci imunitních receptorů s MAMP nebo PAMP, které by vedly k obranné imunitní reakci a eliminaci patogenu (Agrios, 2005; Melotto *et al.*, 2006). Tato blokáce následně vede k ovlivnění hormonální regulace imunitní reakce. Například uzavírání průduchů je fyziologicky regulováno hormonálně kyselinou abscisovou (ABA) nebo kyselinou salicylovou (SA). ABA ovšem hraje v regulaci obranné reakce hraje minoritní roli. Látka coronatin, která je produkována patogenním organismem dokáže napodobovat derivát hormonu kyseliny jasmonové, která funguje jako antagonist vlivu SA. Následně pak tedy dochází k otevírání průduchů (Melotto *et al.*, 2006; Montillet *et al.*, 2013).

Mezi další strategie patogeneze patří narušení struktury povrchu rostlin. Některé patogeny produkují látky, které specificky poškozují buněčné stěny a narušují tak celistvost tkání. Tento proces je důležitý pro rozšíření infekce a urychlení procesu patogeneze. Patogen se pak z infikovaných rostlin může snadno šířit na rostliny zdravé a může docházet až k rozvoji epidemií (Agrios, 2005). Mezi tyto látky patří oxidativní enzymy – například lytické polysacharidové monooxygenázy (LPMO), které jsou produkovány různými viry, bakteriemi i houbovými organismy. Pro aktivitu LPMO je nutná přítomnost mědi, která funguje jako jejich kofaktor. Katalyzují degradaci struktury buněčné stěny štěpením glykosidové vazby polysacharidů lignocelulózy nebo

celulózy (Johansen, 2016). Aktivita enzymu může být umocněna přístupem světla a fotosyntetických pigmentů (Cannella *et al.*, 2016).

Důležitým cílem patogenních organismů jsou také chloroplasty, které hrají významnou roli v časných fázích střetnutí patogenního organismu a imunitního systému rostlin. Po interakci MAMP a imunitních receptorů dochází k ovlivnění exprese genů kódovaných v chloroplastech. Chloroplasty jsou pak schopny tvořit reaktivní formy kyslíku, které působí jako obrana proti infekci. Virulentní bakterie *Pseudomonas syringae* produkují efektorové látky, které ovlivňují expresi těchto genů, což vede k destabilizaci fotosystému II, inhibici transportu elektronů a inhibici tvorby reaktivních forem kyslíku (De Torres Zabala *et al.*, 2015).

3.2. Rostliny čeledi tykvovitých a jejich původci chorob

Čeď tykvovitých (latinsky *Cucurbitaceae*) představuje velkou a rozmanitou skupinu plodících rostlin s celosvětovým významem. Zahrnuje 130 rodů s více než 800 známými druhy (Rolnik & Olas, 2020). Do čeledi patří globálně rozšířené typické druhy, jako jsou okurky (např. okurka nakládačka, salátová polní, salátová skleníková), tykve (např. patyzon, cuketa žlutá, cuketa zelená, okrasné tykve) a melouny (např. cukrový, vodní) (Rod *et al.*, 2005).

Pěstování rostlin čeledi tykvovitých pro zajišťování potravy započalo již před 3000 lety v západní Asii, avšak v průběhu času si plody těchto rostlin našly i různá další uplatnění. Sloužily třeba jako nádoby nebo hudební nástroje (Rolnik & Olas, 2020). Byly využívány také kvůli jejich pozitivnímu vlivu na lidské zdraví a jejich léčivým účinkům. Rostliny čeledi tykvovitých jsou bohaté na látky, které vykazují farmakologickou aktivitu především glykosidy, steroidy, pryskyřice, polyfenoly, taniny, kukurbitaciny, karotenoidy, terpenoidy a saponiny. Všeobecně tyto rostliny a jejich plody na lidský organismus působí antioxidačně, antidiabeticky, protizánětlivě, protinádorově, hepatoprotektivně a mají regulační aktivitu vůči imunitnímu a kardiovaskulárnímu systému. Kukurbitaciny obsažené především v semenech jsou spojovány s laxativními, emetickými a antihelmintickými účinky, dále dokáží působit antifungálně, antivirově a antibakteriálně. Rostliny a plody jsou bohaté také na vlákninu, což podporuje střevní činnost. Jsou proto vhodné při léčbě střevních onemocnění. V tradiční medicíně některých zemí se tykev obecná (*Cucurbita pepo*)

využívala k léčbě střevních parazitárních onemocnění (červi, tasemnice) a při potížích s ledvinami a močovým měchýřem (Rolnik & Olas, 2020; Rajasree *et al.*, 2016).

V současnosti jsou tykvovitě rostliny masivně pěstovány pro zajištění potravy produkcí jejich plodů. Pěstují se především v subtropických a tropických částech Číny, Turecka, Indie a Ruské federace. Zde jsou produkovány především okurky (*Cucumis sativus*), dýně (*Cucurbita spp.*) a melouny (*Cucumis melo*, *Cucumis lanatus*). Každá z těchto plodin je napadána různými patogeny virového, bakteriálního i houbového původu, což vede k poškození rostlin i plodů a následně ke snížení výnosnosti produkce pěstování (Grumet *et al.*, 2021; FAOSTAT, 2021).

Okurky se potýkají především s infekcemi způsobenými plísní okurkovou (nově plíseň tykvovitých; původce *Pseudoperonospora cubensis*), vláknitými houbami rodu *Fusarium*, virem mozaiky dýňovitých (CMV) nebo houbou *Phytophthora capsici* (Naegele & Wehner, 2016). Tykve čelí infekcím způsobeným především viry – například virem žluté mozaiky cukety (ZYMV) nebo virem kadeřavosti listů tykve (CYSDV), dále původci padlí tykvovitých (*Podosphaera xanthii*), plísnovými organismy (*Pseudoperonospora cubensis*) a vláknitými houbami rodu *Fusarium* (Martín-Hernández & Picó, 2021; Paris, 2016). Melouny jsou ohrožovány různými viry – například Cucurbit chlorotic yellows virus (CCYV) a Squash vein yellowing virus (SqVYV), dále původci padlí tykvovitých (*Podosphaera xanthii*) a plísněmi rodu *Fusarium* nebo bakteriemi (*Acidovorax citrulli*) a viry žluté mozaiky cukety (ZYMV) (Lebeda, Křístková, Sedláková & McCreight, 2016; Kousik *et al.*, 2018).

Následující podkapitoly (3.2.1., 3.2.2.) se věnují 2 zástupcům čeledi tykvovitých – okurce seté (*Cucumis sativus*) a tykvi velkoplodé (*Curcubita maxima*), kterých bylo využíváno při vypracování experimentální části této diplomové práce. Další podkapitoly (3.2.3. a 3.2.4.) se budou zabývat biotrofními (*Pseudoperonospora cubensis*, *Podosphaera xanthii*) a saprofytickými organismy (r. *Fusarium*, r. *Alternaria*), kterých bylo rovněž využíváno při vypracování experimentální části.

3.2.1. Okurka setá

Okurka setá latinsky *Cucumis sativus*, je jeden z předních druhů spadajících do čeledi tykvovitých rostlin. Jedná se o jednoletou poléhavou rostlinu pocházející z Indie. Dorůstá výšky až 45-180 cm, dle potřeby ji lze vyvazovat na konstrukce. Listy jsou okrouhlé a dlanitě členité. Tvoří žluté zvonkovité květy, ze kterých vyrůstají

bobulovité plody se zeleným oplodím a bílou dužinou. Tyto plody se liší tvarem, velikostí i přítomností různých pichlavých výrůstků podle odrůdy. Vhodná půda pro pěstování je s vysokým obsahem humusu, s častou a hojnou zálivkou, naopak okolní klima je vhodné sušší. Vysoká vlhkost souvisí s vyšší pravděpodobností výskytu houbových patogenů (padlí, plíseň okurková – nově plíseň tykvovitých), vůči kterým jsou rostliny okurky nejvíce náchylné (Burnie *et al.*, 2007).

3.2.2. Tykev velkoplodá

Tykev velkoplodá, latinsky *Cucurbita maxima*, je významný druh čeledi tykvovitých rostlin pocházející pravděpodobně ze subtropické části Jižní Ameriky. Tvoří rozvětvené poléhavé šlahouny s úponky, její listy jsou okrouhlé, téměř bez laloků. Na rostlinách rostou plody tvarově, velikostně i barevně velmi rozmanité. Existují odrůdy s modrošedým, oranžovým a různě pravidelně i nepravidelně tvarovaným oplodím. Plody tedy své využití naleznou jak v tradiční kuchyni, tak jako krmivo pro zvířata nebo jako dekorace. Jejich pěstování je vhodné ve směsné půdě, s vysokým obsahem živin, hnoje a kompostu (Burnie *et al.*, 2007).

3.2.3. Biotrofní patogeny

Obligátně biotrofní organismy, mezi které patří například původci padlí tykvovitých nebo plísně okurkové (nově označována jako plíseň tykvovitých), pro svůj život a úspěšnou reprodukci potřebují živou hostitelskou tkáň (Marine *et al.*, 2016).

Původců padlí (v angličtině označováno jako “powdery mildews”) je mnoho. Tvoří velmi rozsáhlou, rozmanitou a celosvětově rozšířenou skupinu organismů. Jednotliví zástupci se liší se morfologicky i anatomicky. Taxonomicky se řadí do říše *Fungi*, oddělení *Ascomycota* a řádu *Erysiphales*. Napadají krytosemenné rostliny, a to planě rostoucí, zemědělsky významné i okrasně rostoucí druhy. Řadí se tedy mezi jedny z nejvýznamnějších patogenů rostlin vůbec (Lebeda *et al.*, 2017).

Podosphaera xanthii (dále jen *PX*) je jedním z původců choroby nazývané padlí tykvovitých (Trecate *et al.*, 2019). Patří do rodu *Podosphaera*. Tyto houbové organismy tvoří epifytické mycelium, to znamená, že jeho hyfy rostou na povrchu epidermálních buněk hostitele. Dvnitř těchto buněk zasahují pouze haustoria, které představují orgány sloužící k získávání nutrientů. *PX* je také schopna tvořit velké množství konidií

(nepohlavních spór), což vede ke snadnému šíření infekce vlivem proudění vzduchu na další rostliny (Lebeda *et al.*, 2017; Bandamaravuri *et al.*, 2020).

Napadení rostlin padlím způsobeným *PX* je snadno rozeznatelné od jiných infekcí díky tvorbě charakteristických bílých povlaků na povrchu rostlin (Sedlářová *et al.*, 2021). Zpočátku se projevuje bílými kruhovitými skvrnami s práškovitou strukturou na částech listů, později se může šířit na celý list, dále i na řapík a stonek (Bandamaravuri *et al.*, 2020). *PX* lze považovat za teplomilný druh padlí, rozvoj napadení tedy podporuje vyšší teplota (22-26 °C) zejména při procesech klíčení konidií a při vývoji jejich vláken (Lebeda *et al.*, 2017; Trecate *et al.*, 2019). Infekce padlím následně rostliny oslabuje, odebírá rostlinám vodu, odčerpává asimiláty vzniklé fotosyntézou, což vede k omezení jejich růstu, rychlejšímu vysychání listů, opadu listů a ke snižování kvality plodů (Trecate *et al.*, 2019; Sedlářová *et al.*, 2021).



Obrázek 1: Projevy intenzivního napadení listů tykve obecné (*Cucurbita pepo*) padlím tykvovitých (Autorka snímku: Božena Sedlářová; Lebeda *et al.*, 2017)

Pseudoperonospora cubensis (dále *PC*) je jedním z původců plísně tykvovitých rostlin, konkrétně plísně okurkové (nově plíseň tykvovitých) (Rod *et al.*, 2005; Marine *et al.*, 2016; Bandamaravuri *et al.*, 2020). Patří mezi tzv. houbám podobné organismy. Taxonomicky se řadí do říše *Chromista*, oddělení *Oomycota* a řádu *Peronosporales*. V angličtině jsou *Peronospor*y označovány jako “downy mildews” neboli nepravá padlí. Morfologicky se totiž podobají houbovým organismům tím, že tvoří vláknité mycelium a tvoří spóry ve sporangiích. Mají ovšem i jiné vlastnosti než houby (*Fungi*). Liší se například stavbou buněčné stěny, která je tvořena především celulózou s přítomností hydroxyprolinu. Dále se liší některými rozdílnými metabolickými drahami

– například způsobem syntézy aminokyseliny lysinu. Fylogeneticky jsou *Peronospory* nejbliže příbuzné hnědým řasám a rozsivkám (Sedlářová *et al.*, 2021).

PC způsobuje především lokální infekce se specializací na listy rostlin *Cucurbitaceae* (Lebeda *et al.*, 2006; Sedlářová *et al.*, 2021). V Evropě je schopna napadat rostliny rodu *Cucumis* a *Cucurbita*. V Severní a Střední Americe je *PC* schopna napadat také rod *Citrullus* (Rod *et al.*, 2005; Pavelková *et al.*, 2011). Rozmnožuje se nepohlavně pomocí sporangií, které se snadno šíří prouděním vzduchu. Do rostlinných buněk pronikají nepřímou penetrací skrz průduchy. Při procesu jejich klíčení je nutná přítomnost vody. Vliv na klíčení má také okolní teplota. Optimální jsou vyšší teploty okolo 20 °C přes den a nižší okolo 15 °C v noci (Rod *et al.*, 2005; Sedlářová *et al.*, 2021). V rostlinných buňkách *PC* intenzivně tvoří mycelium s haustorií, které slouží k odebírání nutrientů. Během 5-14 dní začíná mycelium prorůstat skrz průduchy na povrch listu, kde tvoří charakteristické příznaky infekce způsobené *PC* (Sedlářová *et al.*, 2021). Na vrchní straně listu se objevují žluté ohraničené skvrny a na spodní straně skvrny chlorotické (Marine *et al.*, 2016; Bandamaravuri *et al.*, 2020). Dále se na spodní straně listu tvoří tmavě šedý až černý povlak, který tvoří sporulující mycelium plísně (Rod *et al.*, 2005). Postupem času dochází k nekróze a opadu listů, až úhynu celé rostliny. Celkové nepospívání rostlin vede také k produkci menších nebo deformovaných plodů (Marine *et al.*, 2016; Bandamaravuri *et al.*, 2020).

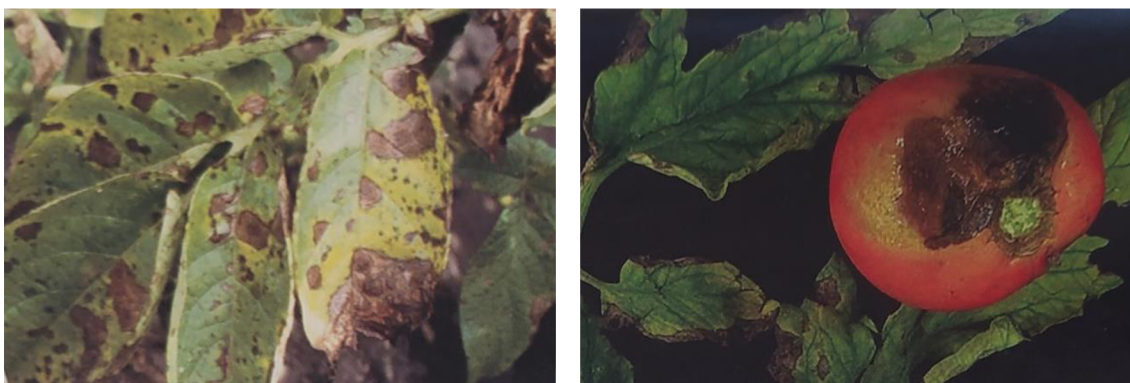


Obrázek 2: Napadení listů okurky seté (*Cucumis sativus*) patogenem *Pseudoperonospora cubensis* (Autor snímku: Jaroslav Rod; Rod, 2008).

3.2.4. Saprofytické patogeny

Saprofytické organismy jsou schopny získávat energii z rozkládajících se buněk uhynulých rostlin. Patří mezi ně i rody *Alternaria* a *Fusarium* spadající do říše *Fungi* a oddělení *Ascomycota*. Oba rody jsou typickou součástí půdní mikroflóry, kde se účastní rozkladných procesů. Dále mohou působit jako oportunisticky patogenní organismy, především při setkání s oslabenými rostlinami. Patří také mezi významné posklizňové patogeny, které mohou způsobovat velké ekonomické ztráty (Rod *et al.*, 2005; Thomma, 2003; Karim *et al.*, 2016). Zástupci těchto rodů jsou schopni tvořit i nebezpečné mykotoxiny, které mohou představovat zdravotní riziko pro člověka (Schiro *et al.*, 2018).

Rod *Alternaria* představuje různorodou skupinu organismů. Zahrnuje druhy napadající okrasné i hospodářsky významné rostliny – například obiloviny nebo některé rostliny plodící zeleninu a ovoce (Thomma, 2003). Mezi hlavní zástupce patří *A. alternata*, *A. brassicicola*, *A. citri*, *A. alternata*, *A. cucumerina* a *A. pluriseptata*. Všeobecně zástupci rodu způsobují listové infekce, které se projevují vznikem nekrotických lézí s okolní chlorotickou skvrnou tvořenou jejich metabolity (např. toxiny). *A. cucumerina* a *A. pluriseptata* jsou původcem *Alternariové* skvrnitosti tykvovitých projevující se žluto-hnědou skvrnitostí na vrchní straně listů i na plodech (Rod *et al.*, 2005; Thomma, 2003). Ve vlhkém prostředí (po dešti, zavlažování, postřiku) se na těchto skvrnách tvoří kyjovité konidie, které se následně během suchého období mohou šířit vlivem větru (Rod *et al.*, 2005). Mycelium typicky tvoří melanin, který dává konidiím charakteristické tmavé zbarvení. U *Alternarií* dosud nebyla popsána žádná pohlavní stádia, houba je schopna přežít ve formě vláknitého mycelia nebo spor na rozkládajících se rostlinách. V nepříznivých podmínkách tvoří dormantní spory, které mohou při obnovení příznivých podmínek začít klíčit a pronikat do hostitele. Méně virulentní druhy jsou schopny procházet ranami nebo průduchy. Virulentnější druhy mohou pronikat přímo, díky schopnosti využívání specializovaných enzymů (např. kutinázy, lipázy, galakturonidázy), které štěpí důležité komponenty buněčných stěn hostitele (Thomma, 2003). Dalšími aspekty virulence je tvorba toxických látek (alternariol, alternariolmonomethylether, altenuen a kyselina tenuazonová), které mohou kontaminovat potravu a ohrožovat lidské zdraví (Schiro *et al.*, 2018).



Obrázek 3-4: Projevy hniloby stonku na rostlině kukuřice způsobené napadením plísni rodu *Alternaria* (Agrios, 2005).

Druhy spadající do rodu *Fusarium* jsou kosmopolitně rozšířené a patří mezi jedny z nejvýznamnějších složek půdní mikroflóry. Většina druhů tohoto rodu žije na odumřelých částech rostlin, blízko povrchu půdy. Tvoří charakteristické struktury, tzv. chlamydospory a rezistentní konidie, které pomáhají přežít v nepříznivých podmínkách. Obecně jsou zástupci rodu *Fusarium* schopni přežít v extrémních podmínkách: při nízkých hodnotách pH (2-4), vysoké vlhkosti a při nedostatku kyslíku (např. v rašeliništích). Jedná se například o druhy *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum* nebo *F. verticillioides* (Rod *et al.*, 2005; Karim *et al.*, 2016). Vadnutí rostlin způsobené infekcí *F. oxysporum* se projevuje hnilobou kořenů s následným šířením cévními svazky do nadzemní části, kdy pak celá rostlina hnědne a umírá. Infekce *F. solani* je spojena s hnilobou kořenových krčků a bází lodyh. Při *Fusariových* infekcích se postupem času může objevovat i charakteristicky zabarvené narůžovělé mycelium (Rod *et al.*, 2005). Většina druhů rodu *Fusarium*, především *F. graminearum* a *F. culmorum*, produkuje toxické látky (např. zearalenon, deoxynivalenol, nivalenol), které po konzumaci infikované potravy, představují zdravotní riziko v podobě chronických mutagenních a karcinogenních účinků (Schiro *et al.*, 2018).



Obrázek 5: Projevy hniloby stonku na rostlině kukuřice způsobené napadením plísni rodu *Fusarium* (Agrios, 2005).

3.3. Ochrana rostlin

Se vznikem zemědělství, který je datován přibližně do doby neolitu, je úzce spjata nutnost ochrany rostlin. Člověk tehdy začal cíleně pěstovat rostliny pro zajištění hlavního zdroje potravy, přičemž se potýkal s chorobami houbového, bakteriálního i virového původu. Největší problém představovaly především škůdci z řad hmyzu (Pavela, 2020). Tyto skutečnosti vedly ke snižování výnosnosti pěstování rostlin a také k potencionálnímu ohrožování lidského zdraví. Cílem tedy bylo objevit a vyvinout prostředky účinné v ochraně rostlin – pesticidy (Matthews, 2018).

V minulosti bylo v ochraně rostlin před škůdci a patogeny využíváno nejrůznějších látek, a to na základě anorganického i biologického. Mezi první látky anorganického původu používané v ochraně rostlin lze zařadit síru, její oxidy a soli, které se využívaly již okolo roku 1000 před naším letopočtem k vykuřování sýpek. Dále se využívaly přípravky na bázi arzenu v ochraně proti hmyzu (Pavela, 2020). V Číně se hojně využívalo hašené vápno při ochraně semen (Banaszkiewicz, 2010). První zmínky o využití biologické ochrany rostlin a sklizených plodů se datují až do doby starých Mayů (3000 před naším letopočtem), kdy byly využívány plody pálivé papričky *Capsicum annum L.* v ochraně úrody uskladněné v sýpkách (Pavela, 2020). Dále se k ochraně rostlin využívalo pěstování smíšených rostlinných kultur, kdy lidé nevědomky uplatňovali přirozené ekologické vztahy mezi organismy, jako jsou predace, parazitismus a kompetice. Cíleně byla predace využívána v Číně okolo roku 300. Tehdy byly k ochraně citrusových sadů nasazováni draví mravenci *Oecophylla smaragdina* proti housenkám a škůdcům dřeva (Pavela, 2020; Banaszkiewicz, 2010).

V období starověku byly upřednostňovány z vědeckého hlediska poněkud pochybné metody založené na náboženství a rituálech. Rovněž ve středověku se využívaly metody, které byly založeny spíše na pověrách. Metody z těchto historických epoch tedy budou vynechány. Od druhé poloviny 18. století do první poloviny 19. století probíhala v Evropě revoluce v zemědělství, která podpořila racionální přístup v ochraně rostlin (Banaszkiewicz, 2010). V této době se využívaly přípravky především rostlinného původu – odvary z tabákových listů, extrakty nebo sušená rozemletá květenství *Chrysanthemum cinerariaefolium*, dále prášky vyrobené z kořenů tropických rostlin rodu *Derris* (Matthews, 2018; Pavela, 2020; Banaszkiewicz, 2010). Jako insekticid byl využíván i odvar z routy vonné (*Ruta graveolens*), který poskytoval velmi nepříjemný zápach (Matthews, 2018). Byly ovšem využívány

i anorganické a velmi toxické látky – například chlorid rtuťnatý, který měl navíc schopnost akumulace v půdě (Banaszkiewicz, 2010). Pro přípravu pesticidních přípravků byly využívány i kombinace organických a anorganických látek – například roztoky vytvořené ze směsi kravského hnoje a nehašeného vápna, které byly následně aplikovány injekční stříkačkou pro regulaci výskytu mšic. V ochraně před infekcí plísní vinné révy (“downy mildew”) byl využíván postřik roztokem vyrobeným ze směsi síranu měďnatého, vápna a mléka. Během 19. století docházelo také ke zdokonalování technik a postupů aplikace látek využívaných v ochraně rostlin. Byly vyvíjeny nejrůznější nástroje – například speciální štětce, košťata, postřikovače nebo injekční stříkačky, kterými byly tyto látky na rostliny nanášeny (Matthews, 2018).

K největšímu rozmachu a vývoji pesticidních látek došlo ve 20. století. V první polovině se využívaly stále poměrně toxické sloučeniny s dlouhým poločasem rozpadu, které měly nepříznivý vliv na životní prostředí. Tento vliv se tehdy nebral v úvahu (Banaszkiewicz, 2010). Vznikaly anorganické přípravky především na základě síry, arsenu a mědi (Matthews, 2018). S vývojem techniky (např. leteckých postřiků) se pesticidy často zbytečně nadužívaly, také se užívaly nahodile, bez prokázaného ohrožení rostlin. Dalším problémem bylo, že tyto přípravky nebyly příliš účinné a nebyly selektivní (Banaszkiewicz, 2010). Ve 40. letech se začaly syntetizovat organochlorované a organofosfátové pesticidy, dále karbamáty, rtuťnaté nebo organické měďnaté fungicidy (Matthews, 2018; Pavela, 2020). Klasickým příkladem je také látka DDT (dichlordifenyltrichlorethan). Tento prášek byl považován za zázrak a symbol lepší budoucnosti (Banaszkiewicz, 2010). Od druhé poloviny 20. století se začaly projevovat závažné problémy neuváženého používání pesticidních látek. Docházelo k vývoji rezistentních populací škůdců a patogenů, k nepříznivému působení na necílové organismy a na životní prostředí celkově. Na konci 20. století se proto výzkum nových pesticidních látek začal ubírat “alternativní” cestou za nalezením nových bezpečnějších látek pro ochranu rostlin (Pavela, 2020).

3.3.1. Chemická ochrana rostlin v podobě syntetických pesticidů

V období po druhé světové válce se začaly hojně produkovat a využívat syntetické chemické látky určené k ochraně rostlin a uskladněných plodin, jinak nazývané také jako syntetické pesticidy (Stoytcheva, 2011a; Rani *et al.*, 2021). Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole – pesticidy představují velkou skupinu látek

určených k ochraně a prevenci před šířením (nejen) chorob rostlin (Stoytcheva, 2011a). Lze je využívat v různých odvětvích života, za různými účely a cílit jimi na různé organismy. Každý přípravek je také charakterizován svým mechanismem účinků. Mají proto velmi široké pole působnosti (Rani *et al.*, 2021).

Rozlišujeme pesticidy využívané v zemědělství, domácnostech a v ochraně veřejného zdraví. Zemědělské slouží k ochraně rostlin a plodin. Pesticidy pro užití v domácnostech se hubí škůdci, jako jsou např. hlodavci, hmyz nebo bakterie. Pesticidy používanými v ochraně veřejného zdraví se zamezuje šíření přenašečů onemocnění (např. blech). Dále lze pesticidy dělit na základě cílového organismu – insekticidy cílí na hmyz, fungicidy na houbové organismy a herbicidy na plevely a další. Dle chemické struktury rozlišujeme organochloridové a organofosfátové pesticidy, karbamáty, triaziny, deriváty kyseliny fenoxycetové a další (Rani *et al.*, 2021). Zástupci jednotlivých skupin jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 1), kde je uveden i jejich účel využívání a nepříznivé účinky. Tato kapitola bude dále zaměřena pouze na využití syntetických pesticidů v ochraně rostlin a jejich plodů.

Syntetické pesticidy se během 20. století staly velmi oblíbené díky jejich vysoké účinnosti, snadné aplikaci a nízké ceně (Rani *et al.*, 2021). Tehdy se využívaly především deriváty kyseliny fenoxycetové (např. kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová), organochlorované (např. DDT, aldrin, dieldrin) a organofosfátové pesticidy (např. parathion; Banaszkiwicz, 2010; Rani *et al.*, 2021). Je nutno říci, že lidstvo s těmito látkami v minulosti zacházelo neuváženě. Aplikace probíhala často nesystematicky, neefektivně, neselektivně a bez zřejmého ohrožení rostlin. Navíc u těchto látek nebyly dostatečně probádány všechny jejich vlastnosti a účinky (Banaszkiwicz, 2010). S jejich nadužíváním souvisí možný vznik rezistence v populaci patogenních organismů (Villaverde *et al.*, 2016). Později bylo také dokázáno, že jsou schopny akumulace a perzistence v životním prostředí. Velký problém představovala i bioakumulace v organismech, která vedla k postupnému zabudování do celého potravního řetězce. Typickým příkladem může být právě látka DDT (Banaszkiwicz, 2010).

Objev pesticidních účinků DDT, neboli dichlordifenyltrichlorethanu, znamenal příchod revoluce v používání pesticidů. Zpočátku byl DDT považován za zázrak v podobě širokospektrálního a odolného přípravku, který zvyšoval celosvětovou produkci potravin. DDT byl využíván i mimo oblast zemědělství. Ve 30. a 40. letech

20. století byl využíván při regulaci výskytu komárů přenášejících malárii nebo k hubení vší (Stoytcheva, 2011a). Později bylo zjištěno, že vlastnost perzistence není příliš výhodná. U organismů již dříve vystavených účinkům DDT, především u ryb a ptáků, docházelo k poškození reprodukční schopnosti. U ptáků konkrétně DDT zasahoval do metabolismu vápníku, kdy následně docházelo k ovlivnění tloušťky skořápek vajec, které pak praskaly ještě před vylihnutím ptáčat (Banaszkiewicz, 2010).

Účinné látky pesticidních přípravků svými účinky cílí na životně důležité procesy cílových organismů. Blokují pak například enzymatický nebo hormonální systém, což vede k jejich úhynu (Banaszkiewicz, 2010). Pesticidy mohou působit širokospektrálně nebo selektivně. Selektivní pesticidy jsou schopny zacílit specificky vůči jednomu druhu nebo skupině organismů a na ty necílové působí minimálně nebo vůbec. Naproti tomu širokospektrální působí nespecificky také na necílové organismy a celkově na životní prostředí, což je považováno za nežádoucí (Stoytcheva, 2011a). Zvýšená expozice těmto látkám může působit až letálně. Obtížné je hodnocení subletálních dávek, kdy tyto látky mohou vykazovat teratogenní, mutagenní, karcinogenní, imunotoxické nebo embryotoxické účinky (Banaszkiewicz, 2010).

Mnoho v minulosti používaných pesticidních látek bylo kvůli svým nepříznivým účinkům vůči lidskému zdraví a životnímu prostředí zakázáno, nebo alespoň omezeno (viz Tabulka 1; Rani *et al.*, 2021). I když už se řada z nich mnoho let nepoužívá, stále zůstávají přítomné v některých půdách. Důkazem jejich perzistence a odolnosti jsou některé výzkumy z posledních let. Například Hofman *et al.* (2017) ve svém výzkumu uvádí objev reziduí triazinových herbicidů na území České republiky, konkrétně atrazinů a simazinů, které jsou na území EU zakázány již od roku 2004.

Tabulka 1: Vybrané pesticidní látky, jejich účel užití a nepříznivé účinky na lidské zdraví (Banaszkiewicz, 2010; Rani et al., 2021; Alengebawy et al., 2021).

Skupina pesticidů	Zástupce	Účel užití	Nepříznivé účinky
Organochloridy	DDT	Insekticid	Nevolnost, záchvaty třesu
	BHC	Insekticid	Poškození CNS, záchvaty
	Aldrin	Insekticid	Myoklonické záškuby, závratě
	Dieldrin	Insekticid	Zvracení, svalové poruchy
Organofosfáty	Malathion	Insekticid	Průjem, rozostřený zrak, selhání respirace
	Methyl-parathion	Insekticid, repelent	Selhání respirace, poruchy zraku
Karbamáty	Karbaryl	Insekticid	Průjem, rozostřený zrak
Triaziny	Atrazin	Herbicid	Selhání ledvin, měštnavé srdeční selhání
	Simazin	Herbicid	Poruchy plodnosti, selhání ledvin
Deriváty kyseliny fenoxycetové	Kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová	Herbicid	Nervozita, bolesti hlavy, závratě
Benzimidazoly	Thiophanate-methyl	Fungicid	Abnormality u spermií, riziko vrozených defektů plodu

Pesticidy využívané v současnosti představují v porovnání s pesticidy využívanými v minulosti bezpečnější variantu. Jsou účinnější a působí selektivně na cílové organismy, což umožňuje jejich využívání v nižších koncentracích. Vykazují také nižší perzistenci v životním prostředí. Některé z nich ovšem stále představují určité riziko především pro vodní organismy. Některé jsou zařazeny mezi endokrinní disruptory, mezi kontaminanty spodních vod, nebo patří do skupiny látek podezřelých z karcinogenity (Hofman *et al.*, 2017). Vývoj nových účinných a bezpečnějších variant je tedy na místě.

3.3.2. Biologická ochrana rostlin

Biologickou ochranou se rozumí využívání přirozených přírodních procesů a mechanismů pro ochranu rostlin. Zahrnuje mechanismy založené na poznatcích především z oborů fytofarmacie, etologie a ekologie (Bleša *et al.*, 2020). Tento přístup není nový, příkladem může být již zmiňovaná aplikace dravých mravenců v boji proti housenkám v citrusových sadech starověké Číny (Banaszkiewicz, 2010). Až v první polovině 20. století, kdy se změnil pohled na ideální pesticidní přípravek, se začal významně vyvíjet vědní obor zaměřující se na tuto oblast ochrany rostlin. Ideální

pesticidní přípravek by měl tedy podle posledních standardů být vysoce selektivní, minimálně toxický pro necílové organismy, vysoce účinný již při nízkých koncentracích a málo perzistentní, čímž je minimalizována akumulace v životním prostředí a zajištěna prevence vzniku rezistence. Dodnes se tento obor zabývá vývojem technologií a postupů biologické ochrany, dále se snaží pochopit principy nutné pro její aplikaci v praxi (Bleša *et al.*, 2020; Villaverde *et al.*, 2016).

Pochopení vztahů mezi organismy je v oblasti biologické ochrany rostlin klíčové (Stenberg *et al.*, 2021). Narozdíl od chemické ochrany, která by měla cílit přímo na jeden druh nebo skupinu organismů a tím ho z dané biocenózy eliminovat, biologická ochrana působí komplexně, systémově a nespecificky. Nedochozí tedy ke kompletnímu vyhubení škůdce či patogenu, ale pouze k regulaci jeho populace a omezení infekčních forem (Bleša *et al.*, 2020). Využívá se zde přirozených ekologických vztahů, jako jsou kompetice, symbióza, predace, parazitismus nebo herbivorie, které se objevují mezi různými organismy (Bleša *et al.*, 2020; Stenberg *et al.*, 2021). Těmito organismy mohou být například bezobratlí (roztoči *Typhlodromus pyri* nebo vosičky *Encarsia formosa*), obratlovci (ptáci), některé mikroorganismy, viry a houbové organismy. Jejich přímým nebo nepřímým zaváděním (např. poskytování úkrytů, domečků) se do prostředí místní biocenózy vnáší také diverzita, která podporuje uplatňování ekologických vztahů mezi organismy (Pavela, 2010; Bleša *et al.*, 2020). Jako obecný příklad lze uvést potlačování růstu patogenu (případně plevelu nebo škůdce) aplikací jiného organismu, který je s nežádoucím patogenem v určitém vztahu a je schopen na něj působit antagonisticky (např. svými metabolity; Bleša *et al.*, 2020; Stenberg *et al.*, 2021).

Další strategií biologické ochrany je aplikace přirozeně se vyskytujících bioaktivních látek, jinak nazývané taky jako biopesticidy. Biopesticidy jsou definovány jako látky biologického původu s pesticidními účinky, které byly získány z přírodních zdrojů, jako jsou rostliny, bakterie, houby nebo zvířata (Laxmishree & Nandita, 2017). Konkrétně se pak může jednat o látky vzniklé například sekundárním metabolismem rostlin nebo fermentačními procesy mikroorganismů (Bleša *et al.*, 2020).

Mezi bakterie syntetizující látky, kterých se využívá jako biopesticidů patří rody *Streptomyces*, *Pseudomonas* a *Saccharopolyspora*. Spinosyny produkované bakteriemi *Saccharopolyspora spinosa* a *Saccharopolyspora pogona* působí insekticidně, jako alosterické aktivátory nikotinových acetylcholinových receptorů. Polyoxiny tvořené

Streptomyces cacaoi fungují antimykoticky jako inhibitory syntázy chitinu. Rhamnolipidy bakterie *Pseudomonas aeruginosa* působí antibakteriálně, kdy způsobují lýzu buněk (Villaverde *et al.*, 2016).

Biopesticidy botanického původu jsou rostlinami produkovány v rámci sekundárního metabolismu za účelem jejich ochrany před napadením patogeny nebo herbivory. Na základě chemické struktury mezi sekundárními metabolity rozlišujeme saponiny, alkaloidy, terpeny, fenoly, peptidy a další látky (Laxmishree & Nandita, 2017; Bleša *et al.*, 2020). Od těchto látek jsou odvozeny některé komerčně dostupné přípravky. Jsou založeny především na extraktech z chryzantém (*Chrysanthemum cinerariifolium*), zederachu indického (*Azadirachta indica*), česneku, tabáku (rod *Nicotiana*), kožnatců (rod *Derris*) nebo dalších bobovitých rostlin obsahující rotenony a mnoha dalších. Významnou skupinu tvoří také aromatické rostliny (např. eukalyptus, máta, rozmarýn), které tvoří komplexní směsi sekundárních metabolitů – aromatické esenciální oleje (Pavela, 2020; Laxmishree & Nandita, 2017). Z důvodu jejich využívání při experimentální části této diplomové práce jim bude věnována samostatná kapitola (3.3.3.). U některých těchto látek zatím nebyly zcela objasněny mechanismy účinku, naopak u některých bylo popsáno účinků více (Villaverde *et al.*, 2016). Některé z těchto účinků jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2: Vybrané biopesticidní účinné látky, jejich původ, účinky a některé komerčně dostupné přípravky, jejichž základem jsou tyto látky, které jsou dostupné na evropském trhu (Pavela, 2020; Villaverde *et al.*, 2016; Laxmishree & Nandita, 2017).

Biopesticid	Původ	Účinky	Komerční přípravky
Azadirachtin	<i>Azadirachta indica</i>	Insekticid Přesný mechanismus účinku není znám	NeemAzal-T/S (Trifolio-M GmbH., Německo)
Pyrethrin	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> , <i>Chrysanthemum coccineum</i>	Insekticid Modulátor sodíkového kanálu	Organihum protex, Naturforte EC (Garden Ché, Španělsko)
Rotenon	rody <i>Derris</i> , <i>Tephrosia</i> , <i>Lonchocarpus</i>	Insekticid Inhibitor elektronového transportu v mitochondriálním komplexu I.	V Evropě se nevyužívají, kvůli nedostupnosti východních rostlin. Využívají se v USA, Indii, Číně, Malajsi.
Nikotin	rod <i>Nicotiana</i>	Insekticid Agonista nikotinových acetylcholinových receptorů	Kvůli nové legislativě EU jsou přípravky z trhu postupně stahovány.

Současná biologická ochrana by měla představovat plnohodnotný alternativní způsob v ochraně rostlin, navíc ji lze považovat za udržitelnější a bezpečnější díky snadné biodegradabilitě, nízké perzistenci, čímž se také předchází vývoji rezistence. I přesto se zatím využívá především v menším ekologickém zemědělství, v konvenčním se objevuje méně. Všechny účinky těchto látek dosud nejsou prozkoumány, což znamená příležitost pro jejich testování a nové cesty ve výzkumu (Bleša *et al.*, 2020; Laxmishree & Nandita, 2017).

3.3.3. Esenciální oleje v ochraně rostlin

Esenciální oleje rovněž patří mezi prostředky biologické ochrany. Jelikož je jejich využití součástí této diplomové práce, je jim tedy věnována tato samostatná kapitola, kde budou popsány podrobněji.

Esenciální oleje neboli rostlinné silice, jsou komplexní sloučeniny tvořené v rámci sekundárního metabolismu rostlin (Stoycheva, 2011b). Jedná se o hydrofobní, těkavé, různě zbarvené a čiré kapaliny (Mani-López *et al.*, 2021). Jsou získávány z vonných rostlin čeledí *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Astraceae* a *Apiaceae*, které je tvoří ve svých siličných kanálcích nebo žláznatých trichomech (Bleša *et al.*, 2020; Pavela, 2020; Stoycheva, 2011b). Odtud jsou extrahovány pomocí metod hydrodestilace nebo parní destilace, případně superkritickou extrakcí s využitím oxidu uhličitého (Pavela, 2020; Stoycheva, 2011b). Sestávají z mnoha biologicky aktivních složek, především z terpenů, terpenoidů a aromatických uhlovodíků. U mnoha těchto složek již bylo prokázáno, že působí baktericidně, fungicidně, insekticidně a proti okusu herbivory (Bleša *et al.*, 2020; Mani-López *et al.*, 2021; Stoycheva, 2011b). Těchto vlastností je využíváno například v lékařství, kosmetice, parfumerii, potravinářství a zemědělství. Tradičně se některé vonné rostliny (např. *Origanum compactum*, *Coriandrum sativum*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzigium aromaticum* nebo *Mentha piperita*) využívaly již v minulosti v některých středomořských a asijských státech pro ochranu uskladněných plodin (Pavela, 2020).

Celkové chemické složení každého esenciálního oleje je unikátní. Je ovlivněno prostředím a technikami pěstování, dále samozřejmě i metodami využitými při jejich zpracování a výchozím materiálem pro jejich extrakci (listy, kůra, semena, kořeny, atp.). Podrobně je pak jejich složení zkoumáno pomocí GC-MS metod (spojením plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie; De-Montijo-Prieto *et al.*, 2021).

Jedná se o heterogenní směsi složené z terpenů, terpenoidů, monocyklických alkoholů, bicyklických alkoholů, acyklických monoterpenových alkoholů, alifatických aldehydů, kyselin, monocyklických ketonů, esterů a ketonů (Mostafa *et al.*, 2021). Každý druh esenciálního oleje je tvořen desítkami těchto látek, avšak pouze několik (většinou 1-3) z nich tvoří majoritní podíl. Různé poměry majoritních a minoritních látek se pak podílí na tvorbě charakteristické vůně (Bleša *et al.*, 2020). Jednotlivé složky se mohou také vzájemně ovlivňovat a umocňovat tak biologickou aktivitu (Pavela, 2020). Komplexnost směsi pak vede k efektivnějšímu působení a předcházení vzniku adaptace a rezistence u patogenních a nepříznivě působících organismů (Villaverde *et al.*, 2016).

Esenciální oleje jsou schopny působit vůči širokému spektru patogenů. Jsou vhodné pro regulaci infekcí a napadení rostlin způsobených bakteriemi, houbovými organismy i hmyzem (De-Montijo-Prieto *et al.*, 2021). Vůči hmyzu některé působí neurotoxicky, jiné jsou schopny modifikovat chloridové kanály, což následně vede k vyšší propustnosti pro neurotransmiter GABA. Vůči mikrobiálním patogenům dokáží působit i v relativně nízkých dávkách, kdy inhibují jejich růst nebo rozmnožování (Pavela, 2020). Mezi nejběžnější mechanismy účinku esenciálních olejů patří změny na membránách patogenních organismů, které vedou ke změně jejich dynamiky, následně ke změně jejich permeability pro různé molekuly a nakonec k lýze celé buňky (De-Montijo-Prieto *et al.*, 2021). Konkrétní příklad lze uvést u houbových patogenů: esenciální oleje jsou schopny narušit buněčnou stěnu, proniknout dovnitř buněk, kde následně modulují funkce membrán (i těch mitochondriálních). Dochází pak k porušení životně důležitých funkcí: rovnováha elektrolytů, změny v metabolismu proteinů, změny v koncentracích vápenatých iontů, narušení funkce protonové pumpy v mitochondriích, což zastavuje získávání ATP. Narušením mitochondriálních membrán dochází také k úniku cytochromu c, což následně vede k aktivaci apoptotické nebo nekrotické buněčné smrti. Tyto účinky lze studovat transmisí elektronovou mikroskopií, testy pro přítomnost některých enzymů (superoxiddismutáza, glutathion peroxidáza), nebo polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Mani-López *et al.*, 2021).

V současnosti jsou esenciální oleje a jejich bioaktivní složky intenzivně studovány s cílem vyvinout efektivní alternativní přípravky (např. pesticidy, repelenty, insekticidy), které by ve srovnání s chemickými prostředky představovaly ekologičtější variantu. Jejich účinky jsou zkoumány zejména pro účely zemědělství a potravinářství,

kde by mohlo být využíváno jejich mikrobicidních a antioxidačních účinků v ochraně uskladněných plodů a potravin před patogeny a předčasným zkažením. Další výhodnou vlastností esenciálních olejů je nízká toxicita pro savce, ptáky, ryby a pro životní prostředí celkově, díky jejich těkavosti mají totiž nízkou perzistenci. Nevýhodou esenciálních olejů může představovat jejich hydrofobní charakter, který lze obejít novější technikou – enkapsulací, neboli zapouzdřením (Pavela, 2020; De-Montijo-Prieto *et al.*, 2021).

Tabulka 3: Tabulka účinných látek v ochraně rostlin, které jsou součástí některých esenciálních olejů (Gwynn, 2014).

Původ	Účinná látka	Užití	Cílový organismus
Rostliny <i>Cassia tora L.</i>	Cinnamaldehyd	Fungicid	<i>Rhizoctonia spp.</i> , <i>Verticillium spp.</i>
Rod rostlin <i>Cymbopogon</i>	Citronelový olej (obs. Citronellal, geraniol, citronellal, geranyl acetát)	Herbicid	<i>Jacobaea vulgaris</i>
Rostliny česneku Semena <i>Azadirachta indica</i>	Česnekový extrakt	Nematicid	<i>Tylenchorhynchus spp.</i> , <i>Pratylenchus spp.</i>
Rostliny <i>Citrus auratium</i>	Neemový olej	Fungicid, akaricid, insekticid	Široká škála cílových organismů
Různé rostlinné zdroje	Pomerančový olej	Fungicid, insekticid	Padlí, třásnokřídlí, molice
	Thymol	Fungicid	<i>Botrytis spp.</i>

3.4. Rezistence

V předchozích kapitolách byla zmíněna důležitost ochrany rostlin před patogeny a škůdci, především za účelem zajištění potravy a ochrany uskladněných plodin před předčasným zkažením. Významnou roli zde hraje také vznik rezistence (zvýšená odolnost), na kterou lze pohlížet z různých úhlů. Rostliny jsou schopny vytvořit si rezistenci vůči působení patogenů a škůdců. Naopak i patogenní organismy a škůdci se mohou stát rezistentní vůči ochranným pesticidním prostředkům (Rimbaud *et al.*, 2021). Mechanismy rezistence mohou být tedy vnímány jako nežádoucí, nebo jich může být využíváno v náš prospěch. V následujících podkapitolách (3.4.1. a 3.4.2.) budou popsány tyto 2 úhly pohledu, jak je možné vnímat a pohlížet na problematiku rezistence.

3.4.1. Vznik nežádoucí rezistence

Účinnost ochrany rostlin, stejně tak i skladovaných plodin, prostřednictvím ochranných pesticidních prostředků (např. insekticidy, fungicidy) je ohrožena vznikem rezistence v populaci patogenu (Hawkins *et al.*, 2018). Patogenní organismy mají schopnost se velmi rychle adaptovat novým podmínkám (Rimbaud *et al.*, 2021). Současně využívané pesticidy se navíc snaží působit cíleně, což sice snižuje riziko ohrožování necílových organismů, ale může usnadňovat proces vzniku rezistence (Hawkins *et al.*, 2018). Šíření genů zodpovědných za vznik rezistence také přispívá přetrvávání pesticidních přípravků v životním prostředí v subtoxických dávkách (Agathokleous *et al.*, 2023). Jejich aplikací se v prostředí vytváří velký selekční tlak, kterým dochází ke změně frekvence výskytu určitých genových alel v dané populaci patogenu. Dříve neutrální nebo škodlivé alely se mohou stát v nových podmínkách výhodné a tak frekventovanější (Hawkins *et al.*, 2018).

Mnoho studií se zaměřuje pouze na biochemické mechanismy patogenních organismů, které vedou ke snížené citlivosti vůči pesticidům. Mezi tyto mechanismy patří především vznik mutací v cílovém místě působení pesticidu, zvýšení exprese určitého genu, zvýšení metabolické přeměny pesticidu nebo jeho eflux. Hawkins *et al.* (2018) ovšem tvrdí, že mechanismy související se vznikem a šířením rezistence mají širší evoluční kontext a jejich podrobnější pochopení je základem úspěšné prevence vzniku rezistence (Hawkins *et al.*, 2018). Pravděpodobnost vzniku rezistence lze předpokládat na základě genetické struktury. Ta je charakterizována mírou a rozložením

genetické diverzity. V oblasti genové diverzity je vhodné rozlišovat genovou a genotypovou diverzitu. Genová diverzita je určována počtem a frekvencí zastoupených alel v určitých lokusech. Genotypová diverzita je dána počtem a frekvencí multilokusových genotypů nebo geneticky odlišnými jedinci v dané populaci. Druhý typ diverzity je pro rostlinné patogeny s častým nepohlavním rozmnožováním velmi důležitým jevem (McDonald & Linde, 2002).

Genetická výbava úzce souvisí také s evolučním potenciálem populace. Pokud je evoluční potenciál vysoký, pak je pro danou populaci snadnější vznik rezistence, na rozdíl od populace s nízkým evolučním potenciálem, kdy je vznik rezistence méně pravděpodobný (McDonald & Linde, 2002; Lebeda *et al.*, 2010). Evoluční potenciál je ovlivněn několika parametry – četností vzniku mutací, velikostí populace, reprodukčním systémem a genovým a genotypovým tokem (McDonald & Linde, 2002). Při změně prostředí (např. aplikací pesticidu), mohou vznikat *de novo* mutace, které jsou ve změněném prostředí výhodné (např. mutace vedoucí k rezistenci vůči danému pesticidu; Hawkins *et al.*, 2018). Mutacemi pak dochází ke změnám přímo v sekvenci DNA jednotlivých genů (McDonald & Linde, 2002). Tyto změny mohou vznikat izolovaně u jednoho, nebo nezávisle na sobě u více jedinců v populaci a následně se dále šířit danou populací (prostřednictvím křížení) nebo do dalších (prostřednictvím horizontálního přenosu). Četnost vzniku této mutace musí být tak vysoká, aby nedocházelo k jejím ztrátám prostřednictvím genetického driftu (Hawkins *et al.*, 2018). Velikost dané populace je důležitá především z důvodu lepší úspěšnosti přežití a lepší přizpůsobivosti jedinců. Zvyšuje se také pravděpodobnost přítomnosti mutantních jedinců. Typ reprodukčního systému ovlivňuje distribuci diverzity uvnitř dané populace. Existuje sexuální (příbuzenský a nepříbuzenský), asexuální a smíšený systém reprodukce. U asexuálních patogenů je významná především genotypová diverzita, jejich geny příliš diverzifikované nejsou, protože jsou šířeny klonálními liniemi. Naopak je tomu u sexuálních a smíšených patogenů, které pravidelně prochází procesem rekombinace genetické informace (např. konjugace, křížení). Zde dochází k novým kombinacím alel, proto tedy sexuální a smíšené patogeny představují větší riziko než ty asexuální. Genový a genotypový tok je proces, během něhož dochází k výměně genů nebo celých genotypů (u přísně asexuálních populací) mezi oddělenými populacemi. Těmito procesy je opět zvyšována diverzita populací. Některé populace

vytváří speciální částice – propagule, které slouží k šíření svých genů nebo celých genotypů na velkou vzdálenost (McDonald & Linde, 2002).

Nejvyšší evoluční potenciál pak tedy mají velké populace se smíšeným reprodukčním systémem, vysokým migračním potenciálem a vysokou četností vzniku mutací (McDonald & Linde, 2002). Příkladem populace patogenů s vysokým evolučním potenciálem mohou být třeba původci padlí tykvovitých (*Golovinomyces cichoracearum* a *Podosphaera xanthii*), které jsou velmi variabilní po stránkách své patogenity a virulence, což dokazuje také existence velkého počtu popsáných patotypů a ras. Rezistence vůči karbamátovým fungicidům byla u těchto patogenů prokázána již v 60. letech 20. století. Postupem času byla prokázána rezistence i vůči dalším fungicidním přípravkům – například vůči demetylačním inhibitorům (DMI), vnějším inhibitorům chinonu (QoI) a fungicidům na bázi karboximidu (Lebeda *et al.*, 2010).

Mechanismy vzniku rezistence závisí také na povaze využitého pesticidního přípravku, konkrétně vůči jakým cílovým organismům je zaměřen (např. insekticidy vůči hmyzu, fungicidy vůči houbovým organismům). Rezistence vůči insekticidům je zprostředkována většinou metabolickými procesy, prostřednictvím monooxygenáz CYP 450 nebo hydrolytických esteráz, které rychle detoxikují insekticidní přípravky. Další významný mechanismus je modifikace cílového místa působení insekticidu, kdy dochází ke změně struktury receptoru, což zamezuje interakci insekticidu a receptoru. Nejčastěji jsou takto modifikovány selektivní GABA receptory pro ionty chloru, což vede k rezistenci vůči DDT, pyrethroidům nebo karbamátům. Dochází také k alteraci toxikokinetiky insekticidů, kdy dochází k jejich snížené absorpci nebo zvýšení rychlosti exkrece. Vůči fungicidním přípravkům jsou využívány obdobné mechanismy vzniku rezistence. Mezi nejběžnější patří alterace cílového místa (receptoru) mutací, čímž je znemožněno působení fungicidu, dále zvýšený metabolismus, který vede k detoxikaci, nebo volba alternativní metabolické dráhy, která se vyhýbá cílovému receptoru. Houbové organismy jsou schopny fungicid vypudit z buněk efluxem. Dobře popsány jsou rezistence vůči benzimidazolům, difenylamidům a fosforothiolátům (Clark & Yamaguchi, 2002).

3.4.2. Indukovaná rezistence rostlin

Fenomén rezistence (odolnosti) lze vnímat také v pozitivním smyslu. Využívá se ho v procesu tzv. indukované rezistence rostlin, která se využívá k jejich ochraně před napadením patogeny a k ochraně sklizených plodin před předčasným nežádoucím znehodnocením. Působení indukované rezistence bylo popsáno před více než 20 lety. Tehdy byly dokázány příznivé účinky ultrafialového záření C (UV-C) ve vytvoření rostlinné odolnosti vůči určitým patogenům a chladu. Mechanismy indukované rezistence lze tedy využívat v ochraně vůči biotickým i abiotickým stresovým podmínkám (Romanazzi *et al.*, 2016). Indukovaná rezistence rostlin navíc představuje jednu z ekologicky přijatelných alternativ chemických přípravků (Burketova *et al.*, 2015). Existuje ve dvou typech, buď jako získaná systémová rezistence (SAR), nebo jako indukovaná systémová rezistence (ISR). Oba typy jsou v rostlinách zprostředkovány fytohormony (kyselina salicylová, kyselina jasmonová a etylen) a vyvolávají dlouhodobou ochranu před mnoha druhy patogenních organismů (Romanazzi *et al.*, 2016).

Vznik indukované rezistence spočívá ve stimulaci imunitního systému rostlin různými vnějšími vlivy biotického i abiotického původu, což následně vede k posílení přirozených imunitních reakcí a obranyschopnosti rostlin (Romanazzi *et al.*, 2016; Burketova *et al.*, 2015). Posílení imunitních odpovědí je zprostředkováno na úrovni fyziologických, transkripčních, metabolických nebo epigenetických mechanismů. Fyziologické změny zahrnují např. zvýšení intracelulární hladiny vápníku, která spouští toky iontů přes membrány, které vedou k depolarizaci membrány, membránová depolarizace spouští elektrickou signalizaci, která umožňuje vnímat lokální poranění. Transkripční změny zahrnují změny na úrovni exprese transkripčních faktorů spojených s mechanismy obranné reakce. Metabolické změny jsou využívány při tvorbě symbiotických procesů mykorrhizy. A v poslední řadě epigenetické změny zahrnují změny ve struktuře chromatinu (např. imprinting, paramutace, transpozony a umlčování genů), které mohou ovlivňovat expresi genů souvisejících s obrannou reakcí (Mauch-Mani *et al.*, 2017).

Mechanismus indukované rezistence lze tedy popsat jako soubor ošetření rostlin, které zesilují a zefektivňují imunitní reakce rostlin (Romanazzi *et al.*, 2016). Nejprve jsou tedy rostliny vystaveny určitému neškodnému induktoru, který stimuluje aktivaci imunitního systému a zvýšené vnímavosti vůči dalším vnějším vlivům. Při této aktivaci

dochází k výše zmíněným změnám na fyziologické, transkripční, metabolické nebo epigenetické úrovni (Romanazzi *et al.*, 2016; Mauch-Mani *et al.*, 2017). Aktivace může probíhat v rámci sekund až hodin po stimulaci imunitního systému a může trvat pouze dočasně nebo i celý život rostliny. Tyto změny mohou být dokonce děděny do dalších generací. Reakce vůči těmto vnějším podnětům mohou být velmi podobné nebo naopak se může jednat o reakce velmi specifické. Jako konkrétní příklad lze uvést rostliny vystavené lipopolysacharidovým molekulám mikrobiálního původu jako induktoru imunitní reakce, což vede ke změnám na úrovni transkripce v podobě přechodné indukce *THT* genů, a na úrovni metabolické v podobě přechodného zvýšení TyDC enzymatické aktivity. Poté byly rostliny vystaveny bakteriálnímu patogenu *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, kdy došlo ke zvýšené transkripci genů *PR1*, *PR2* a *THT*, dále ke zvýšené TyDC enzymatické aktivitě a zvýšené syntéze antibakteriálních konjugátů hydroxycinnamoylu a tyraminu (Mauch-Mani *et al.*, 2017). U PR proteinů (z angličtiny pathogenesis related) kódovaných geny *PR1* a *PR2* se předpokládá, že přispívají k vývoji rezistence (Romanazzi *et al.*, 2016).

Induktory rezistence neboli molekuly stimulace imunitního systému, mohou být biotického i abiotického charakteru. Mezi biotické induktory patří molekuly odvozené od houbových organismů, bakterií, virů a hmyzu. Abiotické induktory zahrnují chemické a fyzikální prostředky (Romanazzi *et al.*, 2016; Burketova *et al.*, 2015; Mauch-Mani *et al.*, 2017). Výčet a zařazení nejvýznamnějších induktorů je uveden v následující tabulce (Tabulka 4).

Tabulka 4: Vybrané induktory imunitního systému rostlin, jejich původ, účinky a možnosti využití (Romanazzi et al., 2016; Burketova et al., 2015).

Typ induktorů	Původ	Induktory	Využití, účinky
Biotické	Houbové organismy	Chitin, chitosan	Nespecifické antimikrobiální účinky
	Řasy	Ulvany, fukany, karagenany, laminariny	Antivirové, houbové organismy, plísně
	Bakterie	Peptidoglykany, lipopolysacharidy, flageliny, O-antigeny	Bakteriální (<i>P. syringae</i>) a plísňová onemocnění (<i>Fusarium</i>)
	Vyšší rostliny	Extrakty (<i>Reynoutria sacchalinensis</i> , <i>Azadirachta indica</i>), esenciální oleje	Různé účinky
Abiotické	Chemické látky	Benzothiadiazol	Proti bakteriálním, plísňovým a virovým onemocněním
		Probenazol	Bakteriální a plísňová onemocnění rýže
		Kyselina β -aminomáselná	Širokospektrální
	Fyzikální jevy	UV-C	Ochrana uskladněných plodin před chladem a patogeny

P. syringae – *Pseudomonas syringae*

Mechanismy indukované rezistence byly dosud prokázány v kontrolovaných podmínkách (skleníky, pěstební komory) (Burketova *et al.*, 2015). Byla prokázána například rezistence vůči *Pseudomonas syringae*, která byla zařazena na seznam nejvýznamnějších bakteriálních patogenů (Mansfield *et al.*, 2012; Burketova *et al.*, 2015). V budoucnosti by mohly být mechanismy indukované rezistence využívány ve větším měřítku, avšak je nutné znát poměrně složité vztahy mezi patogeny a rostlinami navzájem. Poté by bylo možné nadesignovat model, který by mohl být aplikován na polích, případně na celou krajinu (Rimbaud *et al.*, 2021; Burketova *et al.*, 2015). I když v této problematice existuje stále mnoho nejasností (např. způsob výroby ve velkém, efektivita účinnosti, následná výnosnost rezistentních rostlin), i tak představuje udržitelnou a perspektivní alternativu ochrany rostlin. Její výhodou je navíc ochrana i před abiotickými stresory, kterou současná komerční ochrana rostlin nemůže nabídnout (Burketova *et al.*, 2015).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část diplomové práce byla vypracována na Katedře botaniky Univerzity Palackého v Olomouci.

4.1. Materiál

4.1.1. Pomůcky, přístroje a chemikálie

Pomůcky: automatické pipety (10-100 μ l, 100-1000 μ l), buničina, dřevěné prkénko, filtrační papír, gumový balónek, kádinky (25 ml), kahan, korkovrt, květináče, nůžky, očkovací klička, odměrné baňky (100 ml), perlit, Petriho misky (100 mm), pinzety, plastové krabičky, plastové misky, plastový rozprašovač, sáčky, skleněný rozprašovač, stříčka, zápalky, zátky

Přístroje: světelný mikroskop (Olympus, model CHK-G, Japonsko)

Chemikálie: ethanol (96%), destilovaná voda

4.1.2. Rostlinný materiál

Pro vypracování experimentální části diplomové práce byly využívány 2 druhy rostlin a jejich různé části – listy okurky seté (*Cucumis sativus L.*) a plody tykve velkoplodé (*Cucurbita maxima, typ Hokkaido*).

Rostliny okurky seté byly vypěstovány ze semen tohoto druhu, kultivaru Perseus F1, nemořené osiva, od dodavatele Semo a.s. (Smržice, Česká republika). Semena byla vyseta do květináčů se substrátem perlitem, následně po asi měsíci růstu přesazeny do substrátu pro balkonové rostliny 0018 FLORCOM SB a pěstovány ve skleníku Univerzity Palackého v Olomouci na Katedře botaniky.

Rostliny tykve velkoplodé byly vypěstovány na experimentálním pozemku UPOL z neošetřených semen tohoto druhu od dodavatele Semo a.s. (Smržice, Česká republika). Na nich byly vypěstovány tykve v rámci polního pokusu se zástupci čeledi *Cucurbitaceae*, kde byly zastoupeny všechny hlavní rody z této čeledi (*Cucumis*, *Cucurbita*, *Citrullus*). Tyto tykve byly následně využity pro vypracování experimentální části této diplomové práce.

4.1.3. Patogenní organismy

Při testování účinků emulzí esenciálních olejů (dále jen EO) vůči biotrofním patogenním organismům *Pseudoperonospora cubensis* (dále jen PC) a *Podosphaera xanthii* (dále jen PX) byly využity 2 izoláty od každého tohoto patogenu (PC 28/18 2, OL PC 7/21, 26/21 Px, 22/21 Px). Tyto izoláty jsou součástí pracovní kolekce udržované Dr. Boženou Sedlákovou ve Fytopatologické laboratoři Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Při testování účinků emulzí EO vůči saprofytickým patogenním organismům (plísně rodu *Fusarium* a *Alternaria*) byl využit pouze 1 izolát od každého tohoto patogenu. Tyto izoláty byly izolovány Dr. Pavlem Matušinským z infikovaných plodů tykví velkoplodých (*Cucurbita maxima*) na experimentálním pozemku Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V následující tabulce (Tabulka 5) jsou uvedeny použité izoláty příslušných patogenních organismů, jejich původ a datum sběru z hostitelského organismu (pokud bylo blíže specifikováno).

Tabulka 5: Specifikace patogenních organismů a jejich izolátů.

Hostitelská rostlina	Patogenní organismus	Izoláty	Původ	Datum sběru
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	PC 28/18 2	ČR	2018
		OL PC 7/21	ČR, Olomouc-Holice, experimentální pozemek UPOL, hostitelská rostlina <i>Cucumis sativus</i>	25. 8. 2021
	<i>Podosphaera xanthii</i>	26/21 Px	ČR, Olomouc-Holice, experimentální pozemek UPOL, hostitelská rostlina <i>Cucurbita maxima</i>	15. 8. 2021
		22/21 Px	ČR, Nový Jičín-Kojetín, zahrada, hostitelská rostlina <i>Cucurbita pepo</i>	14. 8. 2021
<i>Cucurbita maxima</i>	<i>Alternaria</i>	nespecifikováno	ČR, Olomouc-Holice, experimentální pozemek UPOL, hostitelská rostlina <i>Cucurbita maxima</i> (typ Hokkaido)	2021
	<i>Fusarium</i>	nespecifikováno	ČR, Olomouc-Holice, experimentální pozemek UPOL, hostitelská rostlina <i>Cucurbita maxima</i> (typ Hokkaido)	2021

4.1.4. Esenciální oleje

Testované esenciální oleje (EO) pochází z pracovní kolekce Katedry kvality a bezpečnosti potravin Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze. Jejich výčet, rostlinný původ a výrobce (pokud bylo blíže specifikováno poskytovatelem EO) je uveden v následující tabulce (Tabulka 6).

Tabulka 6: Seznam testovaných esenciálních olejů, původ a výrobce.

Esenciální olej	Původ	Výrobce
Citronelový	Voňatka citronová (<i>Cymbopogon winterianus</i>), Indonésie	Saloos naturcosmetic s.r.o., Brněnská 2430/21b, Blansko, ČR
Hřebíčkový	Hřebíčkovec kořený (<i>Syzygium aromaticum</i>)	nespecifikováno
Kajeputový	Kajeput střídavolistý (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	nespecifikováno
Mátový	Máta kadeřavá (<i>Mentha spicata</i>), Čína	Saloos naturcosmetic s.r.o., Brněnská 2430/21b, Blansko, ČR
Skořicový	Skořicovník pravý (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	nespecifikováno
Tymiánový	Tymián obecný (<i>Thymus vulgaris</i>), Španělsko	Saloos naturcosmetic s.r.o., Brněnská 2430/21b, Blansko, ČR

4.1.5. Fungicidní přípravky

Při testování účinků esenciálních olejů (EO) vůči saprofytickým organismům (rodu *Alternaria* a *Fusarium*) byly jako pozitivní kontrola využívány komerčně dostupné fungicidní přípravky Bumper 25 EC a Topas 100 EC.

Bumper 25 EC je systémový fungicidní přípravek ve formě emulgovatelného koncentrátu s protektivními i kurativními účinky. Využívá se k ochraně listů a klasů rostlin pšenice, žita, ječmene a trav vůči napadení např. následujícími patogeny: padlí travní (*Erysiphe graminis*), rez plevová (*Puccinia glumarum*), rez ječná (*Puccinia triticina*) a další. Účinnou látkou je Propiconazol (238 g/l). Přípravek je vysoce toxický pro vodní organismy s dlouhodobými účinky (ADAMA Irvita N. V., 2014).

Topas 100 EC je systémový fungicidní přípravek ve formě emulgovatelného koncentrátu s protektivními i kurativními účinky. Je určen k ochraně jádruvin, vinné révy, jahod, černého rybízu a zeleniny vůči chorobám způsobeným houbovými patogeny. Účinná látka je Penkonazol (100 g/l), který brzdí syntézu ergosterolu, čímž brzdí funkci buněčných membrán. Přípravek je toxický pro vodní organismy,

s dlouhodobými účinky. Představuje i možné ohrožení lidského zdraví v podobě vážného podráždění očí nebo poškození plodu v těle matky (Syngenta, 2019).

Tabulka 7: Využité fungicidní prostředky, jejich účinná látka a výrobce.

Fungicid	Účinná látka	Výrobce
Bumper 25 EC	Propiconazol	ADAMA Irvita Plant Protection N. V., Curacao, Nizozemské Antily
Topas 100 EC	Penconazol	Syngenta Crop Protection AG, Basel, Švýcarsko

4.2. Metodika

V následujících podkapitolách budou popsány některé společné postupy, které byly využívány při testování účinků EO vůči všem 3 typům patogenů (4.2.1.) nebo pouze vůči biotrofním patogenům (4.2.2.). V dalších podkapitolách (4.2.3., 4.2.4., 4.2.5.) jsou popsány jednotlivé metody, jejich úpravy a vývoj, podle kterých byla vypracována experimentální část diplomové práce. Každá podkapitola se věnuje postupu testování účinků EO vůči jednomu příslušnému patogennímu organismu.

4.2.1. Příprava emulzí esenciálních olejů a roztoků fungicidů

Emulze EO byly připravovány pro všechny patogenní organismy stejným způsobem. Pro každou koncentraci každého EO byla připravena a popsána odměrná baňka o objemu 100 ml. V digestoři do ní bylo napipetováno příslušné množství příslušného EO. Následně byl objem doplněn destilovanou vodou po rysku. Poté byla baňka uzavřena zátkou pro zabránění nadměrnému vytékávání EO. Před aplikací byly emulze vždy dobře protřepány pro získání co nejrovnoměrnější distribuce EO. Jako negativní kontrola při testování sloužila destilovaná voda. V následující tabulce (Tabulka 8) jsou uvedeny všechny koncentrace emulzí EO použité při testování vůči všem testovaným patogenům a objemy látek potřebných pro jejich přípravu.

Tabulka 8: Příprava emulzí EO v příslušných koncentracích.

Koncentrace emulze [%]	Objem EO [μ l]	Objem destilované vody [ml]
0 - negativní kontrola	0	100
0,025	25	99,975
0,05	50	99,950
0,075	75	99,925
0,1	100	99,900
0,2	200	99,800
0,3	300	99,700
0,4	400	99,600
0,5	500	99,500
0,6	600	99,400
1,5	1500	98,500

Při testování účinků emulzí EO vůči saprofytickým plísním rodu *Alternaria* a *Fusarium* byly jako pozitivní kontrola využity komerčně dostupné fungicidní přípravky Bumper 25 EC (účinná látka Propiconazol) a Topas 100 EC (účinná látka Penkonazol). Jejich roztoky byly připraveny taktéž do 100 ml odměrných baněk v koncentracích doporučených výrobcem. V následující tabulce (Tabulka 9) jsou uvedeny objemy jednotlivých fungicidů a destilované vody potřebných pro přípravu roztoků o příslušné koncentraci.

Tabulka 9: Příprava roztoků fungicidů.

Fungicid	Koncentrace roztoku [%]	Objem fungicidu [μ l]	Objem destilované vody [ml]
Bumper 25 EC	0,166	166	99,834
Topas 100 EC	0,030	30	99,970

4.2.2. Vyhotovení listových disků

Listové disky byly zhotovovány pro účely testování účinků emulzí EO vůči patogenům *Pseudoperonospora cubensis* a *Podosphaera xanthii*. Pro jejich zhotovení byly vybírány starší a pevnější listy rostlin okurky seté. Celý proces probíhal co nejrychleji a nejopatrněji, aby nedocházelo k nežádoucím účinkům znehodnocování listů (vadnutí, deformace). List byl ustříhnut, položen žilnatinou nahoru na dřevěné prkénko a pomocí korkovrtu byly tvořeny disky v množství potřebném na 1 Petriho misku (pro PX 15 kusů, pro PC 12 kusů). Místa na listu byla volena mezi nejsilnějšími žilkami tak, aby výsledné disky byly co nejrovnější. Následně byly tyto disky ihned využity pro experiment.

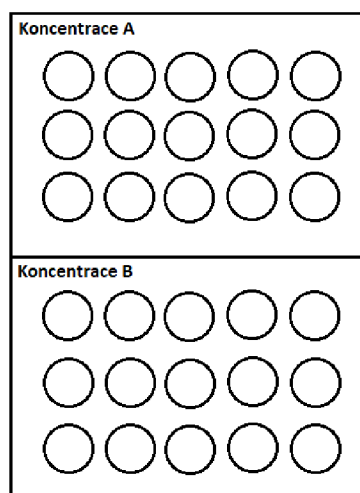
4.2.3. Postup práce s patogenem *Podosphaera xanthii*

Kultivace

Pro kultivaci obou izolátů *Podosphaera xanthii* (dále jen *PX*; izoláty 22/21 Px, 26/21 Px) byly využívány přibližně měsíc staré rostliny okurky seté kultivaru Perseus F1, zasazené po 3-4 kusech (dle jejich velikosti) v květináči se substrátem perlitem. Tyto rostliny byly inokulovány *PX* otěrem listu o list již napadené rostliny okurky seté. Inkubace probíhala ve fytotronu při teplotě 17-20 °C, po dobu 7-10 dní. Poté byl patogen připraven pro využití při testování účinků EO.

Metoda 1: Testování účinků emulzí EO (0,2-0,6 %) metodou postřiku, kultivace v plastových krabičkách (Loubová, 2022)

Byly připraveny emulze EO o koncentracích 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 a 0,6 %. Následně byla příslušná koncentrace EO aplikována plastovým rozprašovačem na 2-3 listy okurky seté. Poté byly listy zabaleny do igelitového sáčku po dobu 30 minut tak, aby byly maximalizovány účinky EO a bylo zabráněno jejich vytékání do okolí. V mezičase byly připraveny plastové krabičky: Byly do nich vloženy 4 vrstvy buničiny a 1 vrstva filtračního papíru. Všechny vrstvy byly následně navlhčeny destilovanou vodou pomocí stříčky. Po 30 minutách inkubace byly listy odstřiženy a byly z nich zhotoveny listové disky (dle podkapitoly 4.2.2.). Disky byly umístěny do připravených krabiček po 15 kusech (3 opakování po 5 discích), vždy 2 koncentrace do jedné krabičky (viz schéma uspořádání na Obrázku 6). Takto připravené disky byly následně naočkovány příslušným izolátem *PX* otěrem listu o list již napadené rostliny okurky seté. Inkubace probíhala ve fytotronu při teplotě 17-20 °C, po dobu 11 dní, kdy probíhalo pravidelné hodnocení výsledků.



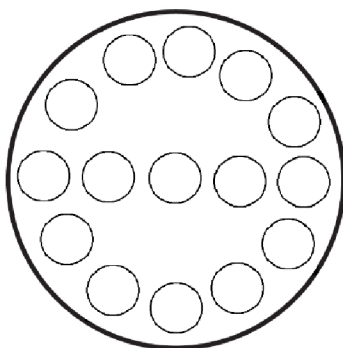
Obrázek 6: Schéma uspořádání disků v plastové krabičce. V horní části jsou disky ošetřené koncentrací A, v dolní části disky ošetřené koncentrací B.

Metoda 2: Testování účinků emulzí EO (0,2-0,6 %) metodou namáčení disků a kultivace v plastových krabičkách dle modifikované metody listových disků (Sedláková & Lebeda, 2008)

Byly připraveny emulze EO o koncentracích 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 a 0,6 %. Listy okurky seté byly tedy nejprve ustříženy a následně z nich byly vyhotoveny listové disky (dle podkapitoly 4.2.2.). Příslušná emulze EO byla vždy nejprve dobře protřepán a vylit do plastové misky. Poté do něj byly pomocí pinzety na krátký okamžik (cca 1 s) ponořeny disky v potřebném počtu. Ošetřené disky byly umístěny do připravených plastových krabiček (navlhčené 4 vrstvy buničiny a 1 vrstva filtračního papíru) dle schématu vyobrazeného na Obrázku 6. Následně byly disky inokulovány příslušným izolátem *PX* otěrem listu o list již napadené rostliny okurky seté. Inkubace probíhala ve fytotronu při teplotě 17-20 °C, po dobu 11 dní, kdy probíhalo pravidelné hodnocení výsledků.

Metoda 3: Testování účinků emulzí EO (0,025-0,075 %), kultivace v Petriho miskách dle modifikované metody listových disků (Sedláková & Lebeda, 2008)

Byly připraveny emulze EO o koncentracích 0,025; 0,05 a 0,075 %. Listy okurky byly odstříženy, byly z nich vyhotoveny disky (dle podkapitoly 4.2.2.), které byly na krátkou dobu (cca 1 s) ponořeny do příslušné emulze EO. Ošetřené disky byly následně vloženy do připravených Petriho misek (navlhčené 4 vrstvy buničiny a 1 vrstva filtračního papíru) – každá koncentrace zvlášť (viz schéma uspořádání na Obrázku 7). Následně byly disky inokulovány příslušným izolátem *PX* otěrem listu o list již napadené rostliny okurky seté. Inkubace probíhala ve fytotronu při teplotě 17-20 °C, po dobu 11 dní, kdy probíhalo pravidelné hodnocení výsledků.



Obrázek 7: Schéma uspořádání listových disků na Petriho misce při testování *PX*.

Způsob hodnocení

Oba izoláty *PX* byly hodnoceny zvlášť stejným způsobem. Experiment byl založen 1. den, následně probíhala 7 dní inkubace v ideálních podmínkách, při nichž *PX* měla možnost růst. Následně 7. den probíhalo 1. hodnocení, 9. den probíhalo 2. hodnocení a 11. den poslední 3. hodnocení. Při těchto pravidelných hodnoceních bylo provedeno kvantitativní hodnocení dle Lebedovy metody (1986). Vizually bylo hodnoceno procentuální zasažení plochy každého listového disku okurky seté. Byla tedy hodnocena plocha, kde narostla *PX*. Tato metoda představuje pětibodovou stupnici (0-4) popisující stupeň napadení patogenem (viz Tabulka 10). Tyto hodnoty byly zaneseny do protokolu (viz Příloha 1).

Tabulka 10: Stupnice pro hodnocení pokrytí listového disku narostlou *PX* (Lebeda, 1986).

Stupeň intenzity napadení (sporulace)	Míra pokrytí listového disku [%]
0	0
1	< 25 %
2	25-50 %
3	50-75 %
4	> 75 %

Kvantitativní hodnocení zahrnuje výpočet celkového stupně napadení (*P*) dle Townsenda & Heubergera (1943), kde byly využita data získaná z průběžných kontrol a zanesených v protokolech. Výpočet byl proveden dle následujícího vzorce:

$$P = \frac{\sum (n \cdot v) \cdot 100}{x \cdot N} \quad ; \text{ kde}$$

n = počet disků v každé kategorii napadení,

v = stupeň napadení,

x = maximální stupeň napadení

N = celkový počet hodnocených disků

Kvalitativní hodnocení citlivosti patogenů vůči emulzím EO bylo provedeno dle Urbana a Lebedy (2006), kdy byly rozlišovány 3 typy reakcí: senzitivní reakce (označována jako „-“), kdy byl stupeň napadení ≤ 10 %. Dále tolerantní reakce, kdy byl stupeň napadení 10,1-34,9 % (označována jako „(-)“) a rezistentní reakce, kdy byl stupeň napadení ≥ 35 % (označována „+“).

Byla stanovena také hodnota ED₅₀, tedy hodnota efektivní koncentrace každé emulze EO, která inhibovala sporulaci u 50 % *PX*.

4.2.4. Postup práce s patogenem *Pseudoperonospora cubensis*

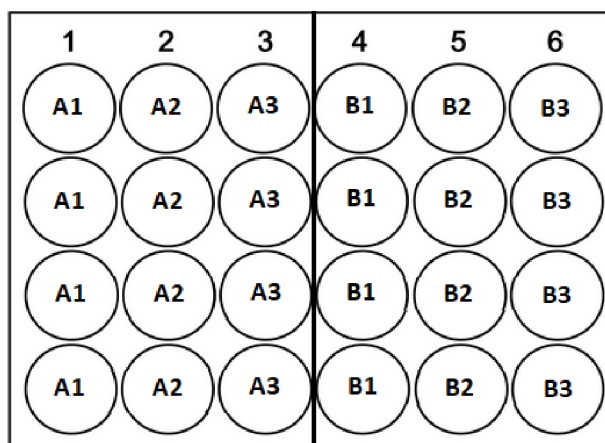
Kultivace a uchovávání

Pseudoperonospora cubensis (dále jen *PC*) byla kultivována na Petriho miskách se 4 vrstvami buničiny a 1 vrstvou filtračního papíru. Všechny vrstvy byly následně navlhčeny optimálním objemem destilované vody pomocí stříčky. Do takto připravené Petriho misky byla vložena část listu okurky seté žilnatinou nahoru, tak aby pokryla co největší plochu filtračního papíru. Následně byl připraven očkovací roztok příslušného izolátu *PC*: list okurky seté, na kterém byl narostlý příslušný izolát, byl pinzetou přemístěn do kádinky s destilovanou vodou a dobře vymáčán tak, aby se do vody uvolnilo co nejvíce sporií. Pro kontrolu přítomnosti sporangii byl připravený očkovací roztok prohlédnut pod mikroskopem pod stonásobným zvětšením. Očkování bylo provedeno pomocí skleněného rozprašovače s jemným nástřikem na plochu celého listu v Petriho misce. Uzavřené Petriho misky byly inkubovány 5-7 dní ve fytotronu při teplotě 17-20°C. Prvních 24 hodin byly zakryty černým igelitem, aby na ně nesvítilo světlo a sporangia tak mohla lépe klíčit.

Po 5 dnech kultivace bylo s *PC* možné provést experiment, nebo ji bylo možné skladovat v mrazničce až 6 měsíců při teplotě - 80 °C. Zmrazený vzorek bylo také možné využít pro další kultivaci a opakování celého procesu.

Metoda 1: Testování účinků emulzí EO (0,025-0,2 %) v jamkové destičce dle modifikované metodiky plovoucích listových disků (Urban & Lebeda, 2006)

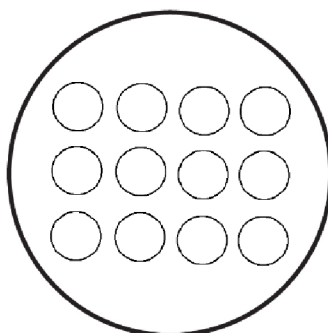
Byly připraveny emulze EO o koncentracích 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 a 0,2 %. Jejich účinky byly testovány v jamkové destičce o 24 jamkách. Do příslušné jamky byl napipetována příslušná emulze EO asi do $\frac{2}{3}$ objemu jamky. Na každé destičce pak tedy byly 2 koncentrace emulzí, každému příslušelo 12 jamek (3 opakování po 4 discích – viz schéma uspořádání destičky na Obrázku 8). Následně byly vyhotoveny listové disky a umístěny do každé jamky, tak aby plavaly na hladině emulze. Očkování listových disků očkovacím roztokem se sporangii příslušného izolátu *PC* a inkubace probíhaly stejným způsobem jako v předchozí části s názvem „Kultivace a uchovávání“. Průběžně bylo prováděno hodnocení výsledků.



Obrázek 8: Schéma uspořádání 24-jamkové destičky. Ve sloupcích 1-3 se nachází 3 opakování (A1-A3) po 4 discích pro koncentraci A daného esenciálního oleje. Ve sloupcích 4-6 se nachází 3 opakování (B1-B3) po 4 discích pro koncentraci B.

Metoda 2: Testování účinků emulzí EO (0,025-0,2 %) na Petriho miskách dle modifikované metody listových disků (Sedláková & Lebeda, 2008)

Byly testovány účinky emulzí o koncentracích 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 a 0,2 %. Do Petriho misek byly připraveny 4 vrstvy buničiny a 1 vrstva filtračního papíru, poté byly všechny vrstvy navlhčeny stříčkou. Poté byly vyhotoveny listové disky dle podkapitoly 4.2.2. Příslušná využívaná emulze EO byla nejprve dobře protřepána a vylita do plastové misky. Poté do něj byly pomocí pinzety na krátký okamžik (cca 1 s) ponořeny disky v potřebném množství. Na filtrační papír každé Petriho misky pak tedy bylo umístěno celkem 12 listových disků ošetřených příslušnou emulzí EO (3 opakování po 4 discích – viz schéma uspořádání na Obrázku 9) žilnatinou nahoru. Očkování listových disků očkovacím roztokem se sporangii příslušného izolátu *PC* a inkubace probíhaly stejným způsobem jako v předchozí části s názvem „Kultivace a uchovávání“. Průběžně bylo prováděno hodnocení výsledků.



Obrázek 9: Schéma uspořádání listových disků na Petriho misce při testování účinků EO vůči *PC*.

Metoda 3: Testování účinků emulzí EO (0,025-0,075 %) na Petriho miskách dle modifikované metody listových disků (Sedláková & Lebeda, 2008)

Byly testovány účinky emulzí EO o koncentracích 0,025; 0,05 a 0,075 %. Celý následující postup této metody testování je totožný s postupem uvedeným v předchozí části s názvem „Metoda 2“.

Způsob hodnocení

Hodnocení účinků EO vůči *PC* bylo provedeno na základě stejných metod jako hodnocení účinků EO vůči *PX*. Rozdílná byla pouze doba kultivace *PC* a počet listových disků pro hodnocení (pouze 3×4 disky).

Experiment byl tedy založen 1. den, následně probíhala 5 dní inkubace v ideálních podmínkách, při nichž *PC* měla možnost růst. Následně 5. den probíhalo 1. hodnocení, 7. den probíhalo 2. hodnocení a 9. den poslední 3. hodnocení. Při těchto průběžných hodnoceních bylo provedeno kvantitativní hodnocení a tyto hodnoty byly zaneseny do protokolu (viz Příloha 2).

Kvantitativní hodnocení bylo stejně jako u *PX* provedeno na základě metod dle Lebedy (1984) a Townsenda & Heubergera (1943). Kvalitativní hodnocení bylo provedeno taktéž jako u *PX* na základě metody dle Urbana a Lebedy (2004). Stejně tak byla stanovena i hodnota ED₅₀.

4.2.5. Postup práce s patogeny rodu *Alternaria* a *Fusarium*

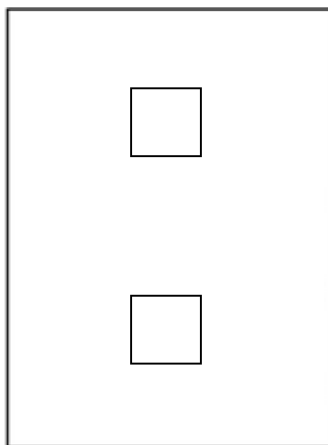
Kultivace

Kultivace saprofytických plísní rodu *Alternaria* a *Fusarium* probíhala dle metodiky uvedené ve studii Matusinského *et al.* (2015) – na bramborovém agaru (PDA) v Petriho miskách při teplotě 20 °C v temnu po dobu 5 dní. Poté bylo možné s plísněmi provést experiment.

Testování účinků emulzí EO (1,5 %)

Byly testovány emulze vybraných EO o koncentraci 1,5 %. Současně byly testovány také účinky 2 fungicidních přípravků, které sloužily jako pozitivní kontrola – Bumper 25 EC (0,166 %) a Topas 100 EC (0,03 %). Pro toto testování byly připraveny malé plastové krabičky. Byly do nich vloženy 4 vrstvy buničiny a 1 vrstva filtračního papíru, celý obsah byl následně navlhčen destilovanou vodou pomocí stříčky. Plod dýně velkoplodé byl rozkrájen na kusy o rozměrech přibližně 1,5×1,5 cm, které byly následně ponořeny do emulze EO a umístěny do připravené krabičky

– 2 kusy dýně pro každý EO zvlášť (viz schéma uspořádání na Obrázku 10). Poté byly inokulovány patogeny rodu *Fusarium* a *Alternaria*. Agarosový gel s narostlým patogenem byl rozkrájen skalpelem na čtverce o rozměrech přibližně 2×2 mm. Na každý kus plodu dýně byl umístěn čtverec agarosy s narostlým příslušným patogenem. Krabičky byly inkubovány ve fytotronu při teplotě 17-20 °C.



Obrázek 10: Schéma uspořádání kusů dýně velkoplodé (*Cucurbita maxima*) v plastové krabici.

Způsob hodnocení

Hodnocení bylo provedeno pro každý druh celkem dvakrát – po 7 a následně po 14 dnech od inokulace. Vizualně byl hodnocen procentuální nárůst pokrytí – celkový stupeň napadení, kdy čtverec PDA nebyl do celkové plochy započítáván. Tyto hodnoty byly zaznamenány do protokolu (viz Příloha 3). Toto hodnocení bylo provedeno dvěma nezávislými pozorovateli pro minimalizaci subjektivity hodnocení a z těchto výsledků byla vypočítána průměrná hodnota. Dále byla hodnocena reakce patogenu vůči testované koncentraci, kdy byla využita metoda dle Urbana a Lebedy (2006), kde jsou rozlišovány 3 typy reakcí: senzitivní reakce (označována jako „-“), kdy byl stupeň napadení ≤ 10 %. Dále tolerantní reakce, kdy byl stupeň napadení 10,1-34,9 % (označována jako „(-)“) a rezistentní reakce, kdy byl stupeň napadení ≥ 35 % (označována „+“).

5. VÝSLEDKY

V následujících podkapitolách (5.1.1., 5.1.2., 5.1.3., 5.1.4.) jsou popsány výsledky jednotlivých způsobů testování účinků EO vůči všem využitím patogenním organismům a popsány důvody změn a úprav metodik jednotlivých experimentů. V poslední podkapitole této kapitoly (5.1.5.) budou popsány souhrnné výsledky a porovnání účinků jednotlivých olejů vůči jednotlivým patogenům.

5.1. *Podosphaera xanthii*

První využitá metoda (uvedena jako Metoda 1 uvedena v podkapitole 4.2.3.) dle Loubové (2022) pro testování účinků emulzí EO vůči 2 izolátům *PX* nebyla vhodná. Vysoké koncentrace testovaných emulzí (0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 %) v kombinaci s vyšší teplotou v igelitovém sáčku působily fyto toxicky vůči listům okurky seté, kdy docházelo k jejich zrychlenému vadnutí. Následně docházelo také k odbarvování a rozpouštění listových disků v platových krabičkách během kultivace. Metoda proto nebyla dále využívána a byla nahrazena.

Jako druhá byla využita modifikovaná metoda listových disků dle Sedlákové a Lebedy (2008; uvedena jako Metoda 2 v podkapitole 4.2.3.), kdy byly nejprve vyhotoveny listové disky, následně aplikována příslušná emulze EO, kultivace probíhala ve velkých plastových krabičkách, kde byly umístěny vždy 2 koncentrace EO společně. Testované koncentrace (0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 %) byly opět příliš vysoké. I bez kombinace s působením vyšší teploty docházelo k fyto toxickým účinkům v podobě sesychání, deformování a odbarvování listových disků. Dále docházelo vlivem těkavosti olejů ke zkreslování výsledků jednotlivých koncentrací v rámci jedné krabičky. Nejvýrazněji byl tento vliv pozorovatelný u krabičky, kde byla umístěna kontrola (využití pouze destilované vody) spolu s první koncentrací EO (0,2 %), kdy na kontrolních discích nerostl žádný patogen. Metoda byla nahrazena a dále se nevyužívala.

Jako finální byla využívána metoda (uvedena jako Metoda 3 v podkapitole 4.2.3.), kdy se opět vycházelo z modifikované metody listových disků dle Sedlákové a Lebedy (2008). Došlo k výraznému snížení využitých koncentrací emulzí EO (0,025; 0,05; 0,075 %). Dále po aplikaci příslušné koncentrace byly listové disky kultivovány v Petriho miskách – každá koncentrace zvlášť ve své misce, aby nedocházelo k ovlivňování výsledků vlivem těkavosti olejů. Tato metoda testování vykazovala

minimální účinky fytotoxicity vůči listovým diskům a zároveň byla účinná vůči oběma izolátům *PX*. Tato metoda tedy byla využívána pro další testování účinků EO a její výsledky jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 11).

Tabulka 11: Výsledky testování účinků EO vůči izolátům 22/21 *Px* a 26/21 *Px* v rozsahu koncentrací 0,025; 0,05 a 0,075 %.

Izolát <i>PX</i>		22/21 <i>Px</i>				26/21 <i>Px</i>			
Olej / Koncentrace [%]		K	0,025	0,05	0,075	K	0,025	0,05	0,075
Citronelový	P [%]	91,67	0	0	0	90	0	0	0
	Reakce		-	-	-		-	-	-
	ED ₅₀		< 0,025 %				< 0,025 %		
Hřebíčkový	P [%]	91,67	0	0	0	90	15	0	0
	Reakce		-	-	-		(-)	-	-
	ED ₅₀		< 0,025 %				< 0,025 %		
Kajeputový	P [%]	95,83	65,83	48,33	46,67	83,33	76,67	53,33	48,33
	Reakce		+	+	+		+	+	+
	ED ₅₀		0,025-0,05 %				0,05-0,075 %		
Mátový	P [%]	100	15	0	0	78,33	21,67	0	0
	Reakce		(-)	-	-		(-)	-	-
	ED ₅₀		< 0,025 %				< 0,025 %		
Skořicový	P [%]	94,17	57,5	1,67	0	90	43,33	0	0
	Reakce		+	-	-		+	-	-
	ED ₅₀		0,025-0,05 %				< 0,025 %		
Tymiánový	P [%]	86,67	1,67	0	0	36,67	41,67	0	0
	Reakce		-	-	-		+	-	-
	ED ₅₀		< 0,025 %				< 0,025 %		

P – celkový stupeň napadení [%], typ reakce patogenu – senzitivní („-“), tolerantní („(-)“), rezistentní (+)

Ze získaných experimentálních dat uvedených v Tabulce 11 je patrné, že v ochraně vůči oběma izolátům *PX* byl účinný pouze olej citronelový, který vykazoval 100% inhibiční účinky v celém rozsahu testovaných koncentrací. Celkový stupeň napadení P byl roven 0 a reakce patogenu byla vždy senzitivní. Hodnota ED₅₀ byla stanovena na nižší než 0,025 %. Jako další účinný olej v ochraně vůči *PX* lze hodnotit olej hřebíčkový, který taktéž vykazoval inhibiční účinky v celém rozsahu testovaných koncentrací ale pouze u izolátu 22/21 *Px*. U druhého izolátu 26/21 *Px* byl při koncentraci 0,025 % celkový stupeň napadení P větší než 10 a došlo tedy k tolerantní reakci patogenu. Hodnota ED₅₀ byla taktéž stanovena menší než 0,025 %. Jako další účinný se z dostupných dat projevil olej tymiánový, který vůči izolátu 22/21 *Px* vykazoval inhibiční účinky v celém rozsahu testovaných koncentrací, došlo tedy k senzitivní reakci patogenu a hodnota ED₅₀ byla stanovena menší než 0,025 %. Při testování druhého izolátu 26/21 *Px* došlo k technickým potížím, kdy nebylo možné

zajistit optimální podmínky pro kultivaci *PX*. Tyto výsledky proto nejsou považovány za validní. Méně účinný se v ochraně vůči *PX* projevil olej mátový, vůči kterému oba izoláty patogenu projevíly tolerantní reakci u nejnižší testované koncentrace. Hodnota ED_{50} byla také stanovena menší než 0,025 %. Olej skořicový se projevil jako další méně účinný. Izolát 22/21 *Px* vykazoval rezistentní reakci u nejnižší koncentrace a u dalších dvou došlo k reakci senzitivní. Hodnota ED_{50} byla stanovena v intervalu 0,025-0,05 %, protože nelze zcela přesně určit obsah účinné látky oleji. Izolát 26/21 *Px* vykazoval také k rezistentní reakci u nejnižší testované koncentrace, avšak hodnota ED_{50} byla stanovena menší než 0,025 %. Jako nejméně účinný se při testování projevil olej kajeputový, u kterého se celkový stupeň napadení disků *P* vždy pohybovala nad hodnotou 35 %, reakce patogenu vůči tomuto oleji byla tedy vždy rezistentní. Hodnota ED_{50} byla stanovena v intervalu 0,025-0,05 % pro izolát 22/21 *Px* a v intervalu 0,05-0,075 % pro izolát 26/21 *Px*.

Důležité je přihlídnout také k problematice fytotoxicity esenciálních olejů, které byly prokázány během testování. Nejméně fytotoxicky působil olej kajeputový, u kterého zůstávaly listové disky většinou po celou dobu testování zelené v celém rozsahu testovaných koncentrací. U mátového oleje docházelo k fytotoxickým účinkům pouze u nejvyšší koncentrace. U skořicového a hřebíčkového oleje docházelo k fytotoxickým účinkům u koncentrací 0,05 a 0,075 %. U citronelového a tymiánového oleje docházelo k fytotoxickému působení v celém rozsahu testovaných koncentrací. Tyto účinky se u všech olejů (kromě hřebíčkového a kajeputového) projevily odbarvováním a rozpouštěním listových disků. U oleje hřebíčkového navíc docházelo k hnědnutí listových disků. Tyto účinky jsou zachyceny ve fotodokumentaci (Příloha 4), která zachycuje průběh testování během jednotlivých kontrol. Tento průběh je ovšem zkrácen přítomností jiných nespecifických saprofytických organismů, jejichž výskyt byl podpořen technickými potížemi při zajišťování optimálních podmínek pro kultivaci *PX*.

5.2. *Pseudoperonospora cubensis*

První metoda (uvedena jako Metoda 1 v podkapitole 4.2.4.), kdy bylo využíváno modifikované metody plovoucích disků dle Urbana a Lebedy (2006), nebyla pro testování účinků emulzí EO vhodná. Docházelo k nadměrnému kontaktu listových disků se emulgemi EO (0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2 %), což se projevovalo fytotoxickými účinky v podobě odbarvování a rozpouštění listových disků. Tato metoda dále nebyla využívána.

Dále byla využívána modifikovaná metoda listových disků dle Sedlákové a Lebedy (2008; uvedena jako Metoda 2 v podkapitole 4.2.4.) upravena pro PC. Listové disky byly ponořeny do emulze EO a následně umístěny do Petriho misek, každá koncentrace zvlášť (obdobně jako při testování PX, pouze s rozdílem počtu listových disků). Byly opět testovány koncentrace 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2 %. Dvě nejvyšší koncentrace byly příliš vysoké a působily fytotoxicky, v další metodě (uvedena jako Metoda 3 v podkapitole 4.2.4.) tedy už byly testovány pouze koncentrace 0,025; 0,05 a 0,075 %. Výsledky Metody 3 jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka 12).

Tabulka 12: Výsledky testování účinků EO vůči izolátům OL PC 7/21 a PC 28/18 2 v rozsahu koncentrací 0,025; 0,05 a 0,075 %.

Izolát PC		OL PC 7/21				PC 28/18 2			
Olej / Koncentrace [%]	K	0,025	0,05	0,075	K	0,025	0,05	0,075	
Citronelový	P [%]	82,29	0	0	0	82,25	0	0	0
	Reakce		-	-	-		-	-	-
	ED ₅₀		< 0,025 %				< 0,025 %		
Hřebíčkový	P [%]	82,29	38,54	0	0	82,25	43,75	0	0
	Reakce		+	-	-		+	-	-
	ED ₅₀		< 0,025 %				< 0,025 %		
Kajeputový	P [%]	95,83	90,63	60,42	41,67	94,79	95,83	62,5	37,58
	Reakce		+	+	+		+	+	+
	ED ₅₀		0,05-0,075 %				0,05-0,075 %		
Mátový	P [%]	95,83	62,5	37,5	0	94,79	54,17	0	0
	Reakce		+	+	-		+	-	-
	ED ₅₀		0,025-0,05 %				0,025-0,05 %		
Skořicový	P [%]	95,83	1,04	0	0	94,79	4,17	0	0
	Reakce		-	-	-		-	-	-
	ED ₅₀		< 0,025 %				< 0,025 %		
Tymiánový	P [%]	95,83	0	0	0	94,79	0	0	0
	Reakce		-	-	-		-	-	-
	ED ₅₀		< 0,025 %				< 0,025 %		

P – celkový stupeň napadení [%], typ reakce patogenu – senzitivní („-“), tolerantní („(-)“), rezistentní (+)

Na základě získaných experimentálních dat uvedených v předchozí tabulce (Tabulka 12) lze usoudit, že neúčinnější v ochraně před oběma izoláty *PC* byly olej citronelový a tymiánový, které působily inhibičně v celém rozsahu testovaných koncentrací. Celkový stupeň napadení *P* se rovnal ve všech případech 0 a reakce patogenu vůči těmto olejům pak tedy byla vždy senzitivní. Hodnota ED_{50} u obou olejů byla stanovena jako menší než 0,025 %. Jako další účinný olej se projevil olej skořicový, který působil inhibičně v celém rozsahu testovaných koncentrací, avšak u nejnižší koncentrace oba izoláty stále vykazovaly omezenou sporulaci (OL *PC* 7/21 – 1,04 %, *PC* 28/18 2 – 4,17 %). Reakce patogenu i přesto byla v celém rozsahu senzitivní. Hodnota ED_{50} byla stanovena menší než 0,025 %. Hřebíčkový olej na oba izoláty *PC* působil stejným způsobem. U nejnižší koncentrace byl celkový stupeň napadení *P* větší než 35 %, reakce patogenu vůči oleji byla tedy rezistentní. U obou vyšších koncentrací už došlo k reakci senzitivní. Hodnota ED_{50} byla stanovena menší než 0,025 %. Olej mátový působil vůči izolátům rozdílně. Vůči izolátu OL *PC* 7/21 působil inhibičně pouze u nejvyšší koncentrace (0,075 %), kde byla hodnota *P* rovna 0. U obou nižších koncentrací byla hodnota *P* větší než 35 % a došlo tedy k reakci rezistentní. Hodnota ED_{50} byla stanovena v intervalu 0,025-0,05 %. Izolát *PC* 28/18 2 vykazoval rezistentní reakci pouze u nejnižší koncentrace (0,025 %) a u těch vyšších došlo k reakci senzitivní. Hodnota ED_{50} byla stanovena v intervalu 0,025-0,05 %. Jako nejméně účinný se v rámci testování projevil olej kajeputový. Oba izoláty *PC* v celém rozsahu testovaných koncentrací vůči oleji projevily rezistentní reakci. Hodnoty ED_{50} byly stanoveny shodně v intervalu 0,05-0,075 %.

Ve většině testování byly zaznamenány fytotoxické účinky esenciálních olejů, které se projevovaly obdobně jako při testování účinků EO vůči *PX*. Tyto projevy jsou tedy uvedeny již v předchozí kapitole (viz kapitola 5.1.). Fotodokumentace uvedena v Příloze 5 zachycuje průběh testování a fytotoxické účinky EO. Tyto zachycené výsledky byly zkresleny technickými potížemi, kdy nebyly zcela zajištěny optimální podmínky pro kultivaci *PC*.

5.3. *Alternaria*

Testování účinků EO vůči saprofytické plísni rodu *Alternaria* bylo provedeno v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK21010064 – Využití biologicky aktivních látek rostlinného původu při skladování zemědělských produktů. Výsledky tohoto testování účinků emulzí EO o koncentraci 1,5 % jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 13).

Tabulka 13: Výsledky testování účinků EO o koncentraci 1,5 % vůči plísni rodu *Alternaria*.

Patogen	<i>Alternaria</i>				
	Olej / Koncentrace [%]	K	Bumper	Topas	1,5
Citronelový	P [%]				2,5
	Reakce				-
Hřebíčkový	P [%]				0
	Reakce				-
Kajeputový	P [%]				86,25
	Reakce	100	96,25	100	+
Mátový	P [%]		+	+	0
	Reakce				-
Skořicový	P [%]				0
	Reakce				-
Tymiánový	P [%]				0
	Reakce				-

P – celkový stupeň napadení [%]; typ reakce patogenu – senzitivní („-“), tolerantní („(-“), rezistentní (+), Bumper – Bumper 25 EC, Topas – Topas 100 EC

Z výsledků uvedených v Tabulce 13 je patrné, že jediný signifikantně neúčinný olej v ochraně vůči plísni rodu *Alternaria* byl olej kajeputový, u kterého byl zaznamenán celkový stupeň napadení o hodnotě 86,25 % a patogen tedy projevil reakci rezistentní. U citronelového oleje byl zaznamenán celkový stupeň napadení 2,5 %, avšak reakce patogenu již byla považována za senzitivní. Všechny ostatní oleje lze považovat za účinné v ochraně vůči plísni rodu *Alternaria* vzhledem k celkovému stupni napadení kusu tykve (0 %) a senzitivní reakci patogenu. Součástí testování byly také fungicidní přípravky Bumper 25 EC a Topas 100 EC, které byly využity jako pozitivní kontrola. U obou fungicidů byly zaznamenány vysoké hodnoty celkového stupně napadení kusu tykve, lze tedy usoudit, že s využitím dané metodiky nejsou pro ochranu vůči plísni rodu *Alternaria* vhodné.

Účinky skupiny esenciálních olejů vůči plísni rodu *Alternaria* v průběhu testování jsou zaznamenány ve fotodokumentaci v Příloze 6.

5.4. *Fusarium*

Testování účinků EO vůči saprofytické plísni rodu *Fusarium* bylo provedeno v rámci projektu Ministerstva zemědělství QK21010064 – Využití biologicky aktivních látek rostlinného původu při skladování zemědělských produktů. Výsledky tohoto testování účinků emulzí EO o koncentraci 1,5 % jsou shrnuty v následující tabulce (Tabulka 14).

Tabulka 14: Výsledky testování účinků EO o koncentraci 1,5 % vůči plísni rodu *Fusarium*.

Patogen		<i>Fusarium</i>			
		K	Bumper	Topas	1,5
Citronelový	P [%]				97,50
	Reakce				+
Hřebíčkový	P [%]				100
	Reakce				+
Kajeputový	P [%]				100
	Reakce	100	72,50	100	+
Mátový	P [%]		+	+	17,50
	Reakce				(-)
Skořicový	P [%]				55
	Reakce				+
Tymiánový	P [%]				0
	Reakce				-

P – celkový stupeň napadení [%]; typ reakce patogenu – senzitivní („-“), tolerantní („(-“), rezistentní (+), Bumper – Bumper 25 EC, Topas – Topas 100 EC

Z výsledků uvedených v Tabulce 14 je patrné, že jako jediný účinný esenciální olej v ochraně vůči plísni rodu *Fusarium* lze považovat olej tymiánový, u kterého nebyla zaznamenána žádná tvorba mycelia (celkový stupeň napadení byl 0 %) a tedy senzitivní reakce patogenu. Jako částečně účinný lze považovat olej mátový, u kterého byl zaznamenán celkový stupeň napadení tykve o hodnotě 17,5 % a dále olej skořicový, u kterého byl zaznamenán celkový stupeň napadení o hodnotě 55 %. Ostatní oleje (citronelový, hřebíčkový, kajeputový) lze považovat za neúčinné v ochraně vůči tomuto patogenu z důvodu vysoké hodnoty celkového stupně napadení, která se buď rovnala 100 %, nebo se k této hodnotě velmi blížila (97,5 %).

Součástí testování bylo také hodnocení účinků fungicidních přípravků Bumper 25 EC a Topas 100 EC. Oba byly s využitím dané metodiky neúčinné.

Účinky skupiny esenciálních olejů vůči plísni rodu *Fusarium* v průběhu testování jsou zaznamenány ve fotodokumentaci v Příloze 7.

5.5. Souhrnné výsledky účinků EO

Tato kapitola porovnává účinky jednotlivých esenciálních olejů vůči všem testovaným patogenním organismům (*PX*, *PC*, *Alternaria* a *Fusarium*) a jejich izolátům (22/21 Px, 26/21 Px, OL PC 7/21, PC 28/18 2). Byla sestavena souhrnná tabulka (Tabulka 15), která přehledně shrnuje kvalitativní hodnocení reakcí patogenu dle Urbana a Lebedy (2006) vůči všem EO a jejich koncentracím využitým při testování. V tomto hodnocení jsou rozlišovány 3 typy reakcí: senzitivní (označována jako „-“), kdy byl stupeň napadení ≤ 10 %, tolerantní, kdy byl stupeň napadení 10,1-34,9 % (označována jako „(-)“) a rezistentní, kdy byl stupeň napadení ≥ 35 % (označována „+“). Pokud byla reakce rezistentní, olej byl považován za neúčinný, pokud byla reakce tolerantní, olej byl považován za částečně účinný a pokud byla reakce senzitivní, daný olej byl považován za účinný v ochraně vůči danému patogenu.

Tabulka 15: Souhrnné výsledky reakcí jednotlivých patogenů vůči všem testovaným EO.

Patogen (izolát)	22/21 Px	26/21 Px	OL PC 7/21	PC 28/18 2	Alternaria	Fusarium
Olej	Koncentrace v pořadí: 0,025; 0,05; 0,075 %				Koncentrace: 1,5 %	
Citronelový	---	---	---	---	-	+
Hřebíčkový	---	(-) --	+ --	+ --	-	+
Kajputový	+++	+++	+++	+++	+	+
Mátový	(-) --	(-) --	++-	+ --	-	(-)
Skořicový	+ --	+ --	---	---	-	+
Tymiánový	---	+ --	---	---	-	-

U výsledků PX a PC každé označení (+, (-), -) představuje typ reakce pro danou testovanou koncentraci v pořadí 0,025; 0,05; 0,075 %. Typ reakce patogenu – senzitivní („-“), tolerantní („(-)“), rezistentní (+).

Z Tabulky 15 je patrné, že olej citronelový byl s využitím dané metodiky účinný v ochraně vůči oběma izolátům *PX* i oběma izolátům *PC*. Při hodnocení jeho účinků vůči saprofytickým plísním byl účinný pouze vůči plísni rodu *Alternaria*. Hřebíčkový olej vykazoval při hodnocení účinků vůči izolátům *PX* různé účinky. Vůči izolátu 22/21 Px působil v celém rozsahu testovaných koncentrací účinně a vůči izolátu 26/21 Px u nejnižší koncentrace 0,025 % byl částečně účinný. Vůči oběma izolátům *PC* byl účinný pouze při koncentracích 0,05 a 0,075 %. Při hodnocení účinků vůči saprofytickým plísním byl účinný v ochraně vůči rodu *Alternaria*, naopak neúčinný vůči rodu *Fusarium*. Olej kaputový se dle získaných experimentálních dat projevil jako neúčinný vůči všem testovaným patogenům v celém rozsahu testovaných koncentrací. Olej mátový byl v ochraně vůči oběma izolátům *PX* částečně účinný při nejnižší

koncentraci 0,025 % a účinný při vyšších koncentracích 0,05 a 0,075 %. Účinky vůči izolátům *PC* byly rozdílné – vůči OL PC 7/21 byl účinný pouze u nejvyšší koncentrace 0,075 % a vůči PC 28/18 2 byl účinný u koncentrací 0,05 a 0,075 %. Vůči plísni rodu *Alternaria* byl účinný a vůči rodu *Fusarium* částečně účinný. Skořicový olej působil na oba izoláty *PX* shodně – byl účinný pouze u vyšších koncentrací 0,05 a 0,075 %. V ochraně vůči oběma izolátům *PC* byl účinný v celém rozsahu testovaných koncentrací. Vůči *Alternaria* působil účinně naopak vůči *Fusarium* účinný nebyl. Olej tymiánový byl účinný téměř vůči všem druhům patogenů a jejich izolátům. Jedinou výjimkou byla neúčinnost vůči izolátu 26/21 Px. Tyto výsledky byly ovšem zatíženy technickými potížemi a jejich validita je sporná.

Esenciální oleje by pak podle výše zmíněné účinnosti vůči všem testovaným patogenům mohly být seřazeny sestupně (tzn. od nejúčinnějšího po nejméně účinný) následovně: tymiánový a citronelový, mátový, skořicový, hřebíčkový, kajeputový olej. Rozdílné pořadí esenciálních olejů by bylo sestaveno z pohledu fytotoxicity. Při testování *PX* a *PC* by bylo pořadí následující: tymiánový, citronelový, hřebíčkový, skořicový, mátový, kajeputový olej. Významné fytotoxické účinky EO vůči plodu *Cucurbita maxima* nebyly zaznamenány.

6. DISKUZE

V literární části byla vypracována rešerše na téma chorob rostlin, které mohou vznikat v důsledku působení biotických i abiotických stresových podmínek. Byly zde všeobecně shrnuty přirozené obranné mechanismy rostlin, kterými se mohou před příčinami chorob bránit a dále byly popsány strategie, kterých využívají patogenní organismy při napadání rostlin. Další kapitola pojednává o rostlinách čeledi tykvovitých a jejich původců chorob z všeobecného pohledu a podkapitoly se zaměřují na rostliny a patogeny, kterých bylo využíváno při vypracování experimentální části diplomové práce. Další kapitola seznamuje s vybranými prostředky pro ochranu rostlin chemického původu, dále s prostředky biologické ochrany rostlin. Samostatná kapitola byla věnována esenciálním olejům, kterých bylo využíváno v experimentální části diplomové práce. Poslední kapitola seznamuje s problematikou vzniku rezistence ze dvou úhlů pohledu. Tím prvním je vznik nežádoucí rezistence v populaci patogenu a druhý popisuje možnost využití vzniku rezistence v podobě indukované rezistence rostlin.

V experimentální části diplomové práce byla testována účinnost skupiny 6 esenciálních olejů (EO; citronelový, hřebíčkový, kajepuťový, mátový, skořicový, tymiánový) vůči biotrofním patogenům *Podosphaera xanthii* (PX) a *Pseudoperonospora cubensis* (PC) a saprofytickým patogenům rodu *Alternaria* a *Fusarium*. Byly hodnoceny také jejich fytotoxické účinky vůči listům *Cucumis sativus* a plodu *Cucurbita maxima*.

Nejprve byla pro testování účinků EO vůči PX byla použita Metoda celých rostlin dle Loubové (2022), která pro toto testování z důvodu nadměrného fytotoxického působení nebyla vhodná a dále se nevyžívala. Metoda byla nahrazena metodou dle Sedlákové a Lebedy (2008), která byla upravena pro využití k testování účinků EO, kdy byly nejprve vytvořeny listové disky a až poté aplikovány emulze EO. Nejvýznamnější úpravou bylo zkrácení expozice listových disků ochranným prostředkům z původních 30 minut na dobu potřebnou k ponoření disku do emulze EO (asi 1 sekunda). Další úpravou bylo také přesunutí experimentu z velkých plastových krabiček, kde byly současně umístěny 2 koncentrace v 1 krabičce do Petriho misek, kde byla každá koncentrace umístěna zvlášť. V plastových krabičkách totiž docházelo vlivem těkavosti EO k ovlivňování výsledků, což bylo nejlépe pozorovatelné

u krabičky, kde byla umístěna negativní kontrola (0 %) spolu s nejnižší koncentrací emulze EO (0,2 %). V další fázi testování byly tedy upraveny i testované koncentrace, které byly mnohonásobně sníženy z 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 a 0,6 % na 0,025; 0,05 a 0,075 % emulze EO. Takto upravená metoda se jevila jako vhodná pro testování účinků emulzí EO, proto byla dále využívána. Výsledky této metody jsou zaznamenány v Tabulce 11.

Pro testování účinků EO vůči *PC* byla využita modifikovaná metoda plovoucích disků dle Urbana a Lebedy (2006), kdy z důvodu nadměrného styku emulzí EO s listovými disky docházelo ke značným fyto toxickým účinkům v podobě odbarvování a rozpouštění listových disků. Tato metoda byla shledána jako nevhodná pro testování účinků EO a nebyla dále využívána. V další fázi testování byla využívána obdobně upravená metoda jako pro testování účinků vůči *PX* dle Sedlákové a Lebedy (2008), pouze s tím rozdílem, že byl zachován počet hodnocených disků (3×4) z předchozí metody. Dále byly testovány pouze 3 nejnižší koncentrace 0,025; 0,05 a 0,075 % z důvodu nadměrné fyto toxicity 2 vyšších koncentrací 0,1 a 0,2 %. Výsledky této metody jsou zaznamenány v Tabulce 12.

Způsob hodnocení účinků EO vůči patogenům *PX* a *PC* probíhal stejným způsobem. Kvalitativní hodnocení bylo provedeno dle metody Lebedy (1984), kdy byly při průběžných kontrolách zaznamenávány hodnoty stupně zasažení do protokolů (viz Příloha 1 a 2). Následně bylo provedeno celkové kvantitativní hodnocení dle Townsenda a Heubergera (1943). Kvalitativní hodnocení bylo provedeno na základě metody dle Urbana a Lebedy (2004) a poté byla stanovena i hodnota ED₅₀. Jediným rozdílem byl interval provedení průběžných kontrol vzhledem k povaze obou patogenních organismů, kdy *PC* vykazuje rychlejší schopnost sporulace než *PX*.

Na základě získaných dat uvedených v Tabulce 11 lze říci, že neúčinnější v ochraně vůči oběma izolátům *PX* je olej citronelový, který vykazoval 100% inhibiční účinky v celém rozsahu testovaných koncentrací, hodnota P se vždy rovnala 0, reakce *PX* byla tedy vždy senzitivní a hodnota ED₅₀ byla stanovena menší než 0,025 %. Účinnost citronelového oleje v ochraně vůči *PX* potvrzuje také studie Mostafy *et al.* (2021). Naopak jako nejméně účinný vůči oběma izolátům *PX* byl shledán olej kajeputový, vůči kterému došlo ve všech případech k reakci rezistentní. Sporné jsou výsledky tymiánového oleje zaznamenané u izolátu 26/21 *Px*, kdy z technických důvodů nebylo možné zajistit optimální podmínky pro kultivaci *PX* a došlo

tak k ovlivnění růstu a konečně i výsledků tohoto testování, což je patrné z hodnoty P uvedené u kontroly (0 %), která dosáhla pouze hodnoty 36,67 %.

Jako nejúčinnější v ochraně vůči PC lze na základě získaných dat uvedených v Tabulce 12 opět označit olej citronelový a dále olej tymiánový. Oba tyto oleje prokázaly 100% inhibiční účinky v celém rozsahu testovaných koncentrací, oba izoláty tedy ve všech případech reagovaly senzitivně a hodnota ED₅₀ byla stanovena menší 0,025 %. Jejich účinnost v ochraně vůči PC potvrzuje také studie Ahameda *et al.* (2022). Naopak nejméně účinným byl opět olej kajeputový, vůči kterému oba izoláty PC projevily ve všech případech rezistentní reakci.

Pro testování účinků EO vůči saprofytickým plísním rodu *Alternaria* a *Fusarium* byl využit plod tykve *Cucurbita maxima*. Využitá koncentrace byla volena na základě studie (Poonpaiboonpipat *et al.*, 2013), která hodnotila fytotoxické účinky citronelového esenciálního oleje z rostliny *Cymbopogon citratus*. Studie uvádí, že koncentrace oleje do 2,5 % nezpůsobuje narušení rovnováhy elektrolytů, která indikuje narušení buněčných membrán a tedy poškození hostitelské rostliny.

Kvantitativní hodnocení účinků EO vůči saprofytickým plísním rodu *Alternaria* a *Fusarium* bylo provedeno vizuálně dvěma nezávislými pozorovateli pro minimalizaci subjektivity hodnocení. Dále bylo provedeno kvalitativní hodnocení výsledků na základě metody Urbana a Lebedy (2004).

Jako nejúčinnější v ochraně rostlin vůči saprofytické plísni rodu *Alternaria* se na základě získaných dat (viz Tabulka 13) projevily oleje hřebíčkový, mátový, skořicový a tymiánový, které dokázaly své 100% inhibiční účinky, kdy vždy došlo k senzitivní reakci patogenu. Naopak jako nejméně účinný se projevil olej kajeputový, u kterého došlo k rezistentní reakci patogenu.

Na základě experimentálních dat (viz Tabulka 14) lze usoudit, že jako nejúčinnější v ochraně rostlin vůči saprofytické plísni rodu *Fusarium* se projevil pouze olej tymiánový, u kterého došlo ke 100% inhibici a tedy senzitivní reakci patogenu. Účinnost tymiánového oleje v ochraně vůči plísni rodu *Fusarium* a dalším houbovým organismům potvrzuje také studie Matusinského *et al.* (2015). Naopak jako neúčinné, vůči kterým projevily patogen rezistentní reakci se projevily oleje: citronelový, hřebíčkový, kajeputový a skořicový. Jako částečně účinný se projevil olej mátový, u kterého došlo k reakci tolerantní.

Tyto rozdílné účinky jednotlivých esenciálních olejů jsou dány jejich rozdílným složením. Vždy záleží na způsobu pěstování rostlin, ze kterých je olej extrahován a na způsobu extrakce. Esenciální oleje sestávají z mnoha složek, které lze stanovit pomocí GC-MS technik. Tyto složky se mohou navzájem ovlivňovat a umocňovat svou biologickou aktivitu (De-Montijo-Prieto *et al.*, 2021; Pavela, 2020). Přesné stanovení konkrétních účinných látek tedy není možné. Umocňování účinků biologicky aktivních složek dokládá také studie Mostafy *et al.* (2021), kde byly testovány účinky směsi 4 EO vůči *PX* na rostlinách *Cucumis sativus*. Při využití směsi olejů došlo k významnému snížení výskytu patogenu v porovnání s účinností olejů využitých samostatně.

Využité izoláty *PX* a *PC* téměř ve všech případech reagovaly stejně (viz Tabulka 15). Výjimkou je reakce izolátů *PX* vůči oleji hřebíčkovému a dále reakce izolátů *PC* vůči oleji mátovému. Tyto rozdílné reakce mohou být způsobeny rozdílným původem izolátů (viz Tabulka 5). K rozdílnosti mezi výslednými reakcemi izolátů *PX* vůči tymiánovému oleji není přihlíženo vzhledem k nemožnosti dodržení ideálních podmínek pro kultivaci *PX* při testování účinku tohoto oleje vůči izolátu 26/21 *Px*.

Mnohé studie (Mostafa *et. al.*, 2021; Poonpaiboopipat *et al.*, 2013) upozorňují na potenciální fytotoxické účinky esenciálních olejů aplikovaných ve vyšších koncentracích. Toto tvrzení lze podpořit pořízenými snímky v průběhu testování účinků EO vůči *PX* a *PC* za využití dané metodiky (viz Příloha 4 a 5), kdy v mnoha případech docházelo k projevům fytotoxického působení. Z pohledu fytotoxického působení lze využitě esenciální oleje sestupně (od nejvíce toxického) seřadit následovně: tymiánový, citrónový, hřebíčkový, skořicový, mátový, kajepuťový olej. Při testování účinků EO vůči saprofytickým plísním nebyly zaznamenány významné fytotoxické účinky vůči plodu *Cucurbita maxima*.

Na základě získaných dat lze některé EO považovat za účinné v ochraně rostlin vůči rozmanitým patogenním organismům. V minulosti již byly u některých jejich biologicky aktivních složek (např. u terpenů, terpenoidů, aromatických uhlovodíků) prokázány antioxidační, baktericidní, fungicidní a insekticidní účinky. Výhodná je také jejich nízká toxicita vůči savcům a životnímu prostředí. Představují tedy slibnou alternativu ke konvenčním přípravkům chemické ochrany a v oblasti biologické ochrany tak zaujímají nezastupitelné místo. Jejich výhodných vlastností a účinků lze využívat v oblastech zemědělství a potravinářství při ochraně rostlin i uskladněných

plodin před předčasným zkažením (Mani-López *et al.*, 2021; Pavela, 2020; De-Montijo-Prieto *et al.*, 2021).

7. ZÁVĚR

Literární část obsahuje rešerši, která byla vypracována s využitím aktuálních zahraničních i českých zdrojů. Pojednává o chorobách rostlin, které mohou vznikat v důsledku působení biotických i abiotických stresových podmínek. Rešerše dále seznamuje s rostlinami čeledi tykvovitých a některými jejich původci chorob. Představuje také vybrané prostředky pro ochranu rostlin chemické povahy i některé prostředky biologické ochrany, mezi které patří i esenciální oleje. V poslední řadě rozebírá problematiku vzniku rezistence.

V experimentální části byly testovány a hodnoceny účinky šesti esenciálních olejů (citronelového, hřebíčkového, kajeputového, mátového, skořicového a tymiánového) vůči patogenům *Podosphaera xanthii* (izoláty 22/21 Px, 26/21 Px) a *Pseudoperonospora cubensis* (izoláty OL PC 7/21, PC 28/18 2) v koncentracích 0,025; 0,05 a 0,075 % a vůči saprofytickým plísním rodu *Alternaria* a *Fusarium* v koncentraci 1,5 %. Jako nejúčinnější vůči všem využitým patogenům se na základě získaných experimentálních dat za využití daných metod prokázaly oleje tymiánový a citronelový, vůči kterým patogeny téměř ve všech případech reagovaly senzitivně. Naopak jako nejméně účinný vůči všem využitým patogenům projevil olej kajeputový, vůči kterému patogeny reagovaly vždy reakcí rezistentní.

Na základě získaných experimentálních dat lze některé esenciální oleje považovat za účinné v ochraně rostlin vůči různým patogenním organismům. Jejich výhodné účinky (antioxidační, baktericidní, fungicidní a insekticidní) byly prokázány již v minulosti. Výhodná je též jejich nízká toxicita vůči savcům a životnímu prostředí. Představují tedy slibnou alternativu ke konvenčním přípravkům chemické ochrany a v oblasti biologické ochrany tak zaujímají nezastupitelné místo. Jejich výhodných vlastností a účinků by mohlo být v budoucnosti využíváno v oblastech zemědělství a potravinářství při ochraně rostlin i uskladněných plodin před předčasným zkažením ve větším měřítku.

Všechny stanovené cíle v zadání diplomové práce byly splněny.

8. LITERATURA

- ADAMA Irvita Plant Protection N. V., 2014: Bumper 25 EC. Přípravek na ochranu rostlin.
- Agathokleous E., Sonne C., Benelli G., Calabrese E. J. & Guedes R. N. C., 2023: Low-dose chemical stimulation and pest resistance threaten global crop production. *Science of The Total Environment*, vol. 878(20), article number 162989. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.162989.
- Agostini-Costa T. da S., Vieira R. F., Bizzo H. R., Silveira D. & Gimenes M. A., 2012: Secondary metabolites. In: *Chromatography and Its Applications*. ISBN: 978-953-51-0357-8. DOI: 10.5772/35705.
- Agrios G. N., 2005: *Plant Pathology*, Fifth edition. Elsevier. ISBN: 9780080473789.
- Ahamed M. A., Doaa Z. S. & El-Habbak M. H., 2022: Role of Some Essential Plant Oils, Fungicides and Inducer Resistance Elicitors on The Management of Cucumber Downy Mildew. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 14(2):193-206(2022). DOI: 10.21608/eajbsf.2022.274572.
- Alengebawy A., Abdelkhalek S. T., Qureshi S. R. & Wang M.-Q, 2021: Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications. *Toxics*, 9(3):42. DOI: 10.3390/toxics9030042.
- De Oliveira A. B. (Ed.), 2019: *Abiotic and Biotic Stres in Plants*. IntechOpen. ISBN: 9781789238112.
- Antunes M. D. C. & Cavao A. M., 2010: The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5): 351-366. DOI: 10.1002/ffj.1986.
- Asai S. & Shirasu K., 2015: Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, vol. 28, 1-8. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.08.008.
- Ballester, A. R. & Lafuente, M. T., 2017: LED Blue Light-induced changes in phenolics and ethylene in citrus fruit: Implication in elicited resistance against *Penicillium digitatum* infection. *Food Chemistry*, 218, 575–583. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.089
- Ballhorn D. J., Kautz S., Heil M. & Hegeman A. D., 2009: Cyanogenesis of Wild Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) Is an Efficient Direct Defence in Nature. *PLoS ONE*, 4(5). DOI: 10.1371/journal.pone.0005450.
- Banaszkiewicz T., 2010: Evolution of Pesticide Use. In: *Influence of the Pesticide Dump on the Environment: 7-18*. ISBN: 978-83-929462-9-8.

- Bandamaravuri K. B., Nayak A. K., Bandamaravuri A. S. & Samad A., 2020: Simultaneous detection of downy mildew and powdery mildew pathogens on *Cucumis sativus* and other cucurbits using duplex-qPCR and HRM analysis. *AMB Express*, vol. 10(1). 10.1186/s13568-020-01071-x.
- Bleša D., Matušinský P., Tvarůžek L., Svačinová I., Růžková S. & Hambálková M., 2020: Využití biologické ochrany v produkci rostlin. *Agromanuál*, vol. 2, 78-81. ISSN: 1801-7673.
- Burketova L., Trda L., Ott P. G & Valentova O., 2015: Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. *Biotechnology Advances*, vol.33(6), part 2, 994-1004. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.004.
- Cannella D., Möllers K. B., Frigaard N. U., Jensen P. E., Bjerrum M. J., Johansen K. S. & Felby C., 2016: Light-driven oxidation of polysaccharides by photosynthetic pigments and a metalloenzyme. *Nature Communications*, 7, article number: 11134. DOI: 10.1038/ncomms11134.
- Clark J. M. & Yamaguchi I., 2001: Scope and Status of Pesticide Resistance. *American Chemical Society*, 11-21: 1-22. ACS Symposium Series 808:1-22. DOI: 10.1021/bk-2002-0808.ch001.
- De Oliveira T. L. C., de Araújo Soares R., Ramos E. M, Cardoso M. D. G., Alves E. & Piccoli R. H., 2011: Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144(3), 546-555. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.022.
- De Torres Zabala, M., Littlejohn, G., Jayaraman, S., Studholme D., Bailey T., Lawson T., Tillich M., Licht D., Bölter B., Delfino L., Truman W., Mansfield J., Smirnov N. & Grant M., 2015: Chloroplasts play a central role in plant defence and are targeted by pathogen effectors. *Nature Plants*, 1(6), article number: 15074. DOI: 10.1038/nplants.2015.74.
- Dean R., Van Kan J. A., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu P. D., Rudd J. J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. & Foster G. D., 2012: The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4):414-30. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
- De-Montijo-Prieto S., Razola-Díaz M. d.C., Gómez-Caravaca A. M., Guerra-Hernandez E.J., Jiménez-Valera M., Garcia-Villanova B., Ruiz-Bravo A. & Verardo V., 2021: Essential Oils from Fruit and Vegetables, Aromatic Herbs, & Spices: Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities, 10(11), article number 1091. DOI: 10.3390/biology10111091.
- FAOSTAT, 2021: Crops and livestock products. Production quantities of Pumpkins, squash and gourds by country; Production quantities of Cucumbers and gherkins by country. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Dostupné online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (citováno 15. 3. 2023).

- Fierascu R. C., Fierascu I. C., Dinu-Pirvu C. E., Fierascu I. & Paunescu A., 2020: The application of essential oils as a next-generation of pesticides: recent developments and future perspectives. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 75(7–8), 183-204. DOI: 10.1515/znc-2019-0160.
- Geoffrey Burnie, Denise Greig, Sue Forrester, Hf Ullmann, Sarah Guest, Michelle Harmony & Sue Hobley, 2007: Botanika. Ilustrovaný abecední atlas: 10 000 zahradních rostlin s návodem, jak je pěstovat. Přeložila Dana Čížková, editor Petr Hejný. ISBN: 978-80-7209-936-8.
- Grumet R., McCreight J. D., McGregor C., Weng Y., Mazourek M., Reitsma K., Labate J., Davis A. & Fei Z., 2021: Genetic Resources and Vulnerabilities of Major Cucurbit Crops. *Genes*, 12(8), 1222. DOI: 10.3390/genes12081222.
- Gwynn R. L. (Ed.), 2014: The Manual of Biocontrol Agents. Fifth Edition. ISBN: 978-1-901396-87-4.
- Hawkins N. J., Bass C., Dixon A. & Neve P., 2018: The evolutionary origins of pesticide resistance. *Botanical Reviews*, vol. 94(1), 135-155. DOI: 10.1111/brv.12440.
- Hofman J., Hvězdová M., Kosubová P., Dinisová P., Šimek Z., Brodský L., Šumoda M., Škulcová L. Sářka M., Svobodová M., Krkošová L., Vašíčková J., Neuwirthová N. & Bielská L., 2017: Rezidua pesticidů v orných půdách České republiky. *Agromanuál*, 12(11/12): 34-38.
- Hosseini S., Amini J., Saba M. K., Karimi K., & Pertot I., 2020: Preharvest and Postharvest Application of Garlic and Rosemary Essential Oils for Controlling Anthracnose and Quality Assessment of Strawberry Fruit During Cold Storage. *Frontiers in Microbiology*, 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01855.
- Hu S.-P., Li J.-J., Dhar N., Li J.-P., Chen J.-Y., Jian W., Dai X.-F. & Yang X.-Y., 2021: Lysin Motif (LysM) Proteins: Interlinking Manipulation of Plant Immunity and Fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6):3114. DOI: 10.3390/ijms22063114.
- Janisiewicz W. J. & Korsten I., 2002: Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1): 411-441. DOI: 10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158.
- Johansen K. S., 2016: Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tool for Lignocellulose Degradation. *Trends in Plant Science*, vol. 21(11): 926-936. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.07.012
- Karim N. F., Mohd M., Nor N. M. & Zakaria L., 2016: Saprophytic and Potentially Pathogenic Fusarium Species from Peat Soil in Perak and Pahang. *Tropical Life Sciences Research*, 27(1): 1-20.

- Khetabi A. E., Lahlali R., Ezrari S., Radouane N., Lyousfi N., Banani H., Askarne L., Tahiri A., Ghadraoui L. E., Belmalha S. & Barka E. A., 2021: Role of plant extracts and essential oils in fighting against postharvest fruit pathogens and extending fruit shelf life: A review. *Trend in Food Science & Technology*, 120(8): 402-417. DOI: 10.1016/j.tifs.2022.01.009.
- Kousik C. S., Brusca J. & Turechek W. W., 2018: Diseases and Disease Management Strategies Take Top Research Priority in the Watermelon Research and Development Group Members Survey (2014 to 2015). *Plant Health Progress*, 17(1), 53-58. DOI: 10.1094/PHP-S-15-0047.
- Kumar S., Abedin M. M., Singh A. K. & Das S., 2020: Role of Phenolic Compounds in Plant-Defensive Mechanisms. In: *Plant Phenolics in Sustainable Agriculture*, 517-532. DOI: 10.1007/978-981-15-4890-1_22.
- Laxmishree C. & Nandita S., 2017: Botanical pesticides – a major alternative to chemical pesticides: A review. *International Journal Life Sciences*, vol. 5(4): 722-729.
- Lebeda A. & Cohen Y, 2011: Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) - biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. *European Journal of Plant Pathology*, 129(2): 157-192. DOI: 10.1007/s10658-010-9658-1.
- Lebeda A., 1986: Padlí okurkové. Erysiphe cichoracearum, Sphaerotheca fuliginea (Cucumber powdery mildew. Erysiphe cichoracearum, Sphaerotheca fuliginea). In: Lebeda, A. (Ed.): *Methods of Testing Vegetable Crops for Resistance to Plant Pathogens*, VHI Sempra, Research Institute of Vegetable crops, Olomouc, 87-91.
- Lebeda A., Křístková E., Sedláková B. & McCreight J. D., 2016: Initiative for international cooperation of researchers and breeders related to determination and denomination of cucurbit powdery mildew races. Cucurbitaceae 2016, XIth Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics & Breeding, July 24-28, 2016, Warsaw, Poland 2016 pp.148-152 ref.28.
- Lebeda A., Mazánková J. & Táborský V., 2006: *Protozoa a chromista*. ISBN: 80-903545-1-3.
- Lebeda A., McGrath M. T. & Sedláková B., 2010: Fungicide Resistance in Cucurbit Powdery Mildew Fungi. InTech. DOI: 10.5772/14080.
- Lebeda A., Mieslerová B., Huszár J. & Sedláková B., 2017: Padlí kulturních a planě rostoucích rostlin. ISBN: 978-80-87091-69-2.
- Lebeda A., Sedláková B., Křístková E., Widrlechner M. P. & Kosman E., 2021: Understanding pathogen population structure and virulence variation for efficient resistance breeding to control cucurbit powdery mildews. *Plant Pathology*, 70(6): 1364-1377. DOI: 10.1111/ppa.13379.
- Loubová Věra, 2022: Biologické přípravky v ochraně vůči padlí dýňovitých. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky, Univerzita Palackého v Olomouci.

- Lu Y. & Tsuda K., 2021: Intimate Association of PRR- and NLR-Mediated Signaling in Plant Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 34(1): 3-14. DOI: 10.1094/MPMI-08-20-0239-IA.
- Mani-López E., Cortés-Zavaleta O. & López-Malo A., 2021: A review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi. *SN Applied Sciences*, 3(1): 44 DOI: 10.1007/s42452-020-04102-1.
- Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S. V., Machado M. A., Toth I., Salmond G. & Foster G. D., 2012: Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6):614-29. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
- Marine S. C., Newark M. J., Korir R. C. & Everts K. L., 2016: Evaluation of Rotational Biopesticide Programs for Disease Management in Organic Cucurbit Production. *Plant Disease*, 100(11): 2226-2233. DOI: 10.1094/PDIS-02-16-0252-RE.
- Martín-Hernández A. M. & Picó B., 2021: Natural Resistances to Viruses in Cucurbits. *Agronomy*, 11(1). DOI: 10.3390/agronomy11010023.
- Matrose N. A., Obikeze K., Belay Z. A., & Caleb O. J., 2021: Plant extracts and other natural compounds as alternatives for post-harvest management of fruit fungal pathogens: A review. *Food Bioscience*, 41, article number 100840. DOI: 10.1016/j.fbio.2020.100840.
- Matthews G. A., 2018: A History of Pesticides. ISBN: 978 1 78639 487 7.
- Matušinský P., Zouhar M., Pavela R. & Nový P., 2015: Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. *Industrial Crops and Products*, 67(1):208-215. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.01.022.
- Mauch-Mani B., Bacelli I., Luna E. & Flors V., 2017: Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual Review of Plant Biology*, vol. 68: 485-512. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042916-041132.
- McDonald B. A. & Linde C., 2002: Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 40: 349-379. DOI: 10.1146/annurev.phyto.40.120501.10144.
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K. & He S. Y., 2006: Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell*, vol. 126(5): 969-980. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.054.
- Montillet J. L., Leonhardt N., Mondy S., Tranchimand S., Rumeau D., Boudsocq M., Garcia A. V., Douki T., Bigeard J., Laurière C., Chevalier A., Castresana C. & Hirt H., 2013: An Abscisic Acid-Independent Oxylinin Pathway Controls Stomatal Closure and Immune Defense in Arabidopsis. *PLoS Biology*, 11(3). DOI: 10.1371/journal.pbio.1001513.

- Mostafa S., Wang Y., Zeng W. & Jin B., 2022: Plant Responses to Herbivory, Wounding, and Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13):7031. DOI: 10.3390/ijms23137031.
- Mostafa Y. S., Hashem M., Alshehri A. M., Alamri S., Eid E. M., Ziedan E.-S. H.E. & Alrumman S. A., 2021: Effective Management of Cucumber Powdery Mildew with Essential Oils. *Agriculture*, 11(11), 1177. DOI: 10.3390/agriculture11111177.
- Naegele R. P. & Wehner T. C., 2016: Genetic Resources of Cucumber. In: Grumet, R., Katzir, N., Garcia-Mas, J. (eds): *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae*. Springer International Publishing. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. DOI: 10.1007/7397_2016_3. ISBN: 978-3-319-49330-5.
- Nazarov P. A., Baleev D. N., Ivanova M. I., Sokolova L. M. & Karakozova M. V., 2020: Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection. *Acta Naturae*, 12(3): 46–59. DOI: 10.32607/actanaturae.11026.
- Paris H. S., 2016: Genetic Resources of Pumpkins and Squash, Cucurbita spp. In: Grumet, R., Katzir, N., Garcia-Mas, J. (eds): *Genetics and Genomics of Cucurbitaceae*. Springer International Publishing. Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. DOI: 10.1007/7397_2016_3.
- Pavela R., 2020: Přírodní cestou nejen proti chorobám a škůdcům. ISBN: 978-80-87111-84-0.
- Pavelková J., Lebeda A. & Sedláková B., 2011: First report o Pseudoperonospora cubensis on Cucurbita moschata in the Czech republic. Department o Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech republic. DOI: 10.1094/PDIS-01-11-0055.
- Poonpaiboonpipat T., Pangnakorn U., Suvunnamek U., Teerarak M., Charoenying P. & Laosinwattana C., 2013: Phytotoxic effects of essential oil from *Cymbopogon citratus* and its physiological mechanisms on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). *Industrial Crops and Products*, vol. 41:403-407. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.04.057.
- Rajasree R. S., Sibi P. I., Francis F. & William H., 2016: Phytochemicals of Cucurbitaceae Family – A Review. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, vol. 8(1): 113-123.
- Rani L., Thapa K., Kanojia N., Sharma N., Singh S., Grewal A. S., Srivastav A. L. & Kaushal J., 2021: An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, vol. 283(10), 124657. DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.124657.
- Rimbaud L., Fabre F., Papaix J., Moury B., Lannou C., Barrett L. G. & Thrall P. H., 2021: Models of Plant Resistance Deployment. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 59: 125-152. DOI: 10.1146/annurev-phyto-020620-122134.
- Rod J., 2008: Atlas chorob a škůdců ovoce, zeleniny a okrasných rostlin. Vydavatelství VÍKEND. ISBN: 978-80-86891-85-9.

- Rod J., Hluchý M., Zavadil K., Prášil J, Somssich I. & Zacharda M., 2005: *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy*. ISBN: 80-901874-3-9.
- Rolnik A. & Olas B., 2020: Vegetables from Cucurbitaceae family and their products: Positive effect on human health. *Nutrition*, vol. 78. DOI: 10.1016/j.nut.2020.110788.
- Romanazzi G., Sanzani S. M., Bi Y., Tian S., Martínez P. G. & Alkan N., 2016: Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 122, 82-94. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2016.08.003.
- Sedláková B. & Lebeda A., 2008: Fungicide Resistance in Czech Populations of Cucurbit Powdery Mildews. *Phytoparasitica*, 36(3):272-289. DOI: 10.1007/BF02980774.
- Sedlářová M., Mieslerová B., Trojanová Drábková Z. & Lebeda A., 2021: Biotrofní houby a peronospory planě rostoucích rostlin. Česká fytopatologická společnost, Praha. ISBN: 978-80-903545-9-2.
- Senthil-Nathan S., 2020: A review of resistance mechanisms of synthetic insecticides and botanicals, phytochemicals, and essential oils as alternative larvicidal agents against mosquitoes. *Frontiers in Physiology*, 10. DOI: 10.3389/fphys.2019.01591.
- Serrano M., Coluccia F., Torres M., L'Haridon F. and Métraux J.-P., 2014: The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*. 2014; vol. 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00274
- Schiro G., Verch G., Grimm V. & Müller M. E. H., 2018: Alternaria and Fusarium Fungi: Differences in Distribution and Spore Deposition in a Topographically Heterogeneous Wheat Field. *Journal of Fungi*, 4(2):63. DOI: 10.3390/jof4020063.
- Scholthof K. B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C. & Foster G. D., 2011: Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9):938-954. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x.
- Stenberg J. A., Sundh I., Becher P. G., Björkman C., Dubey M., Egan P. A., Friberg H., Gil J. F., Jensen D. F., Jonsson M., Karlsson M., Khalil S., Ninkovic V., Rehmann G., Vetukuri R. R. & Viketoft M., 2021: When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, vol. 94: 665–676. DOI: 10.1007/s10340-021-01354-7.
- Stoytcheva M. (Ed.), 2011a: Pesticides in the modern world - Trends in pesticides analysis. InTech. ISBN: 978-953-307-437-5.
- Stoytcheva M. (Ed.), 2011b: Pesticides. Formulations, Effects, Fate. InTech. ISBN 978-953-307-532-7.
- Syngenta Crop Protection AG, 2019: Topas 100 EC. Přípravek na ochranu rostlin.
- Thomma B. P. H. J., 2003: Alternaria spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, vol. 4(4): 225-236. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x.

- Toruño T. Y., Stergiopoulos I. & Coaker G., 2016: Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 54: 419-441. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080615-100204.
- Townsend G. R. & Heuberger J. W., 1943: Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *The Plant Disease Reporter*, 27: 340-343.
- Trecate L., Sedláková B. Mieslerová B., Manstretta V., Rossi V. & Lebeda A., 2019: Effect of temperature on infection and development of powdery mildew on cucumber. *Plant Pathology*, vol. 68(6), 1165-1178. DOI: 10.1111/ppa.13038.
- Urban J. & Lebeda A., 2006: Fungicide resistance in cucurbit downy mildew – methodological, biological and population aspects. *Annals of Applied Biology*. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2006.070.x.
- Villaverde J. J., Sandín-España P., Sevilla-Morán B., López-Goti C. & Alonso-Prados J. L., 2016: Biopesticides from natural products: current development, legislative framework, and future trends. *BioResources* 11(2): 5618-5640. DOI: 10.15376/biores.11.2.Villaverde.
- Youssef, K., Roberto, S. R., Tiepo, A. N., Constantino, L. V., de Resende, J. T. V., & Abo-Elyousr, K. A. M., 2020: Salt Solution Treatments Trigger Antioxidant Defense Response against Gray Mold Disease in Table Grapes. *Journal of Fungi*, 6(3). DOI: 10.3390/jof6030179.
- Zaynab M., Fatima M., Abbas S., Sharif Y., Umair M., Zafar M. H. & Bahadar K., 2018: Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*, vol. 124: 198-202. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.08.034.

9. PŘÍLOHY

Příloha 1: Protokol z hodnocení účinků skořicového oleje vůči *PX*, izolát 26/21 Px.

Příloha 2: Protokol z hodnocení účinků kajeputového oleje vůči *PC*, izolát PC 28/18 2.

Příloha 3: Protokol z hodnocení účinků esenciálních olejů vůči plísni rodu *Fusarium*.

Příloha 4: Ukázky sporulace biotrofních patogenů (*PC*, *PX*) na listových discích *Cucumis sativus* po 7 dnech od inokulace. *PC* (vlevo), *PX* (vpravo)

Příloha 5: Saprofytické plísně po kultivaci na PDA v Petriho misce.

Příloha 6: Fotodokumentace průběhu testování účinků EO vůči *PX*, izolát 22/21 Px.

Příloha 7: Fotodokumentace průběhu testování účinků EO vůči *PC*, izolát PC 28/18 2.

Příloha 8: Fotodokumentace průběhu testování účinků EO vůči plísni rodu *Alternaria*.

Příloha 9: Fotodokumentace průběhu testování účinků EO vůči plísni rodu *Fusarium*.

Příloha 1: Protokol z hodnocení účinků skořicového oleje vůči *PX*, izolát 26/21 Px.

Datum inokulace: 4. 4. 2022

Esenciální olej: Skořicový

Patogen: *Podosphaera xanthii*

Izolát: 26/21 Px

Koncentrace: Kontrola 0 %

Opakování	1. hodnocení	2. hodnocení	3. hodnocení
1	3; 2; 2; 2; 3	3; 2; 2; 2; 3	4; 4; 4; 4; 4
2	2; 3; 1; 1; 1	2; 3; 1; 1; 2	3; 4; 4; 4; 4
3	1; 1; 1; 1; 1	1; 1; 1; 2; 2	2; 2; 3; 4; 4

Koncentrace: 0,025 %

Opakování	1. hodnocení	2. hodnocení	3. hodnocení
1	1; 0; 0; 1; 0	1; 0; 0; 1; 0	1; 1; 3; 1; 1
2	0; 1; 1; 1; 1	0; 0; 1; 1; 1	1; 1; 1; 2; 2
3	0; 1; 0; 1; 1	0; 1; 0; 1; 0	2; 3; 2; 2; 3

Koncentrace: 0,05 %

Opakování	1. hodnocení	2. hodnocení	3. hodnocení
1	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0
2	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0
3	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0

Koncentrace: 0,075 %

Opakování	1. hodnocení	2. hodnocení	3. hodnocení
1	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0
2	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0
3	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0

Příloha 2: Protokol z hodnocení účinků kajeputového oleje vůči *PC*, izolát PC 28/18 2.

Datum inokulace: 22. 4. 2022

Esenciální olej: Kajeputový

Patogen: *Pseudoperonospora cubensis*

Izolát: PC 28/18 2

Koncentrace: Kontrola 0 %

Opakování	1. hodnocení	2. hodnocení	3. hodnocení
1	4; 3; 3; 4	4; 0; 4; 4	4; 0; 4; 4
2	4; 3; 4; 3	4; 3; 4; 3	4; 4; 4; 4
3	4; 3; 3; 4	3; 3; 3; 4	4; 3; 4; 4

Koncentrace: 0,025 %

Opakování	1. hodnocení	2. hodnocení	3. hodnocení
1	2; 3; 4; 4	4; 3; 4; 4	4; 3; 4; 4
2	4; 3; 4; 3	4; 4; 4; 3	4; 4; 4; 3
3	3; 3; 1; 2	3; 4; 2; 2	4; 4; 3; 3

Koncentrace: 0,05 %

Opakování	1. hodnocení	2. hodnocení	3. hodnocení
1	3; 3; 2; 0	4; 4; 4; 0	4; 4; 4; 0
2	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0
3	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0

Koncentrace: 0,075 %

Opakování	1. hodnocení	2. hodnocení	3. hodnocení
1	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0
2	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0
3	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0	0; 0; 0; 0; 0

Příloha 3: Protokol z hodnocení účinků esenciálních olejů vůči plísni rodu *Fusarium*.

Datum inokulace: 10. 10. 2022

Patogen: *Fusarium*

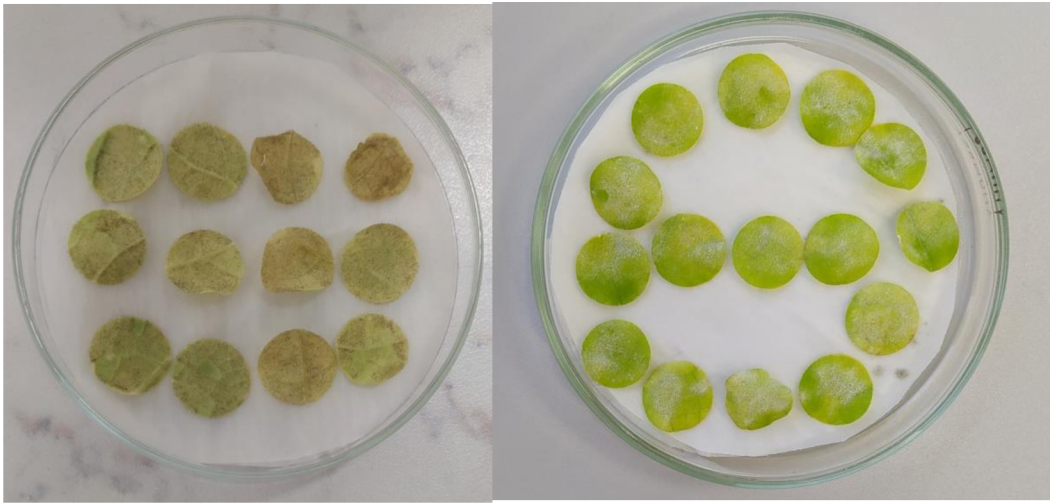
Koncentrace: Kontroly

Kontrola	1. hodnocení	2. hodnocení
Negativní (0 %)	80 %; 90 %	100 %; 100 %
Bumper (0,166 %)	100 %; 100 %	100 %; 100 %
Topas (0,03 %)	100 %; 100 %	100 %; 100 %

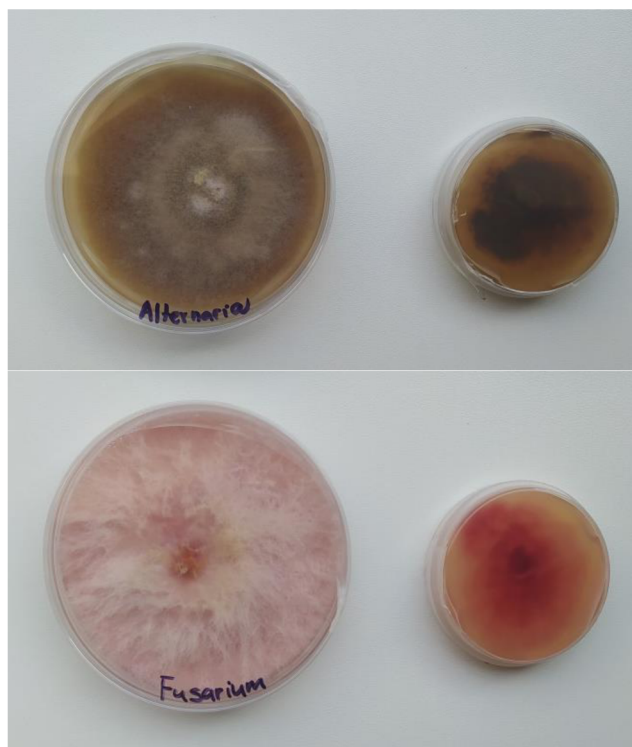
Koncentrace: 1,5 %





















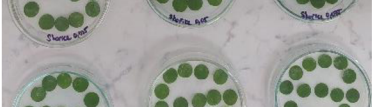



Esenciální olej	1. hodnocení	2. hodnocení
Citronelový	100 %; 70 %	100 %; 100 %
Hřebíčkový	100 %; 100 %	100 %; 100 %
Kajepuťový	100 %; 100 %	100 %; 100 %
Mátový	0 %; 0 %	0 %; 50 %
Skořicový	100 %; 0 %	100 %; 60 %
Tymiánový	0 %; 0 %	0 %; 0 %

Příloha 4: Ukázky sporulace biotrofních patogenů (*PC*, *PX*) na listových discích *Cucumis sativus* po 7 dnech od inokulace. *PC* (vlevo), *PX* (vpravo)



Příloha 5: Saprofytické plísně po kultivaci na PDA v Petriho misce. *Alternaria* (nahore), *Fusarium* (dole)



Pořadí kontroly	Založení			1. hodnocení			2. hodnocení			3. hodnocení		
	Koncentrace / Olej	0,025 %	0,05 %	0,075 %	0,025 %	0,05 %	0,075 %	0,025 %	0,05 %	0,075 %	0,025 %	0,05 %
Citronelový												
Hřebíčček												
Kajeputový												
Mátový												
Skořicový												
Tymiánový												

Příloha 6: Fotodokumentace průběhu testování účinků EO vůči PX, izolát 22/21 Px.

Příloha 7: Fotodokumentace průběhu testování účinků EO vůči PC, izolát PC 28/18.2.

Pořadí kontroly	Založení			1. hodnocení			2. hodnocení			3. hodnocení		
	0,025 %	0,05 %	0,075 %	0,025 %	0,05 %	0,075 %	0,025 %	0,05 %	0,075 %	0,025 %	0,05 %	0,075 %
Citronelový												
Hřebíčkový												
Kajepuťový												
Mátový												
Skořicový												
Tymiánový												

Příloha 8: Fotodokumentace průběhu testování účinků EO vůči plísni rodu *Alternaria*.

Pořadí kontroly	Založení	1. hodnocení	2. hodnocení
Olej / fungicid	Koncentrace Topas 100 EC: 0,03 %; koncentrace Bumper 25 EC: 0,166 %; koncentrace oleje: 1,5 %		
Zleva: kontrola (0 %), Topas, Bumper			
Zleva: Citronelový, hřebíčkový, kajeputový			
Zleva: mátový, skořicový, tymiánový			
	Založení	1. hodnocení	2. hodnocení

Pořadí kontroly	Založení	1. hodnocení	2. hodnocení
Olej / fungicid	Koncentrace Topas 100 EC: 0,03 %; koncentrace Bumper 25 EC: 0,166 %; koncentrace oleje: 1,5 %		
Zleva: kontrola (0 %), Topas, Bumper	<p>Photodocumentation of Fusarium test results for control, Topas, and Bumper treatments. The image shows three Petri dishes labeled 'Kontrola (0 %)', 'Topas (0,03 %)', and 'Bumper (0,166 %)'. Each dish contains two potato cubes with red squares on top. The control shows significant fungal growth, while the treated samples show reduced growth.</p>		
Zleva: Citronelový, hřebíčkový, kajepuťový	<p>Photodocumentation of Fusarium test results for Citronella, Caraway, and Cardamom essential oils. The image shows three Petri dishes labeled 'Citronela (1,5 %)', 'Hřebíček (1,5 %)', and 'Kajepuť (1,5 %)'.</p>		
Zleva: mátový, skořicový, tymiánový	<p>Photodocumentation of Fusarium test results for Mint, Cinnamon, and Thyme essential oils. The image shows three Petri dishes labeled 'Máta (1,5 %)', 'Skořice (1,5 %)', and 'Tymián (1,5 %)'.</p>		

Příloha 9: Fotodokumentace průběhu testování účinku EO vůči plísni rodu *Fusarium*.