

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra ochrany rostlin**



**Účinnost esenciálních olejů na vybrané patogeny rostlin**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Radka Hrnčířová**

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

©2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Účinnost esenciálních olejů na vybrané patogeny rostlin" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 4. 2016

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Evě Zuskové za pomoc při práci na pokusu a při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Janě Mazákové, Ph.D. za kontrolu a za pomoc při konečném zpracování této práce.

# Účinnost esenciálních olejů na vybrané patogeny rostlin

## Souhrn

Bakalářská práce se zabývá účinností esenciálních olejů z vybraných aromatických rostlin *Palergonium graveolens*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha spicata*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus*, *Eugenia caryophyllus*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Litsea cubeba*, *Pimpinella anisum*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris* na fytopatogenní houby *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* a *Leptosphaeria maculans*.

V první části literárního přehledu je sepsána obecná charakteristika esenciálních olejů, historie, vznik a jejich účinné látky. Druhá část literárního přehledu představuje charakteristiku vybraných rostlin a esenciálních olejů z nich získaných.

Samotná práce je zaměřena na ověření účinnosti esenciálních olejů z dvanácti rostlin a následné určení minimální inhibiční koncentrace. Pokus byl prováděn s organismy vypěstovanými v prostředí *in vitro* a to v několika fázích, aby byla zaručena výsledná účinnost esenciálního oleje na dané patogeny. V první fázi pokusu byla ověřena účinnost olejů v koncentraci 0,1 %, aby následně v druhé fázi mohly být vyselektovány ty oleje, u kterých byl zaznamenán účinek. Tyto oleje byly použity ve třetí fázi při tvorbě koncentračních řad. Následně bylo provedeno měření růstu mycelia, vyhodnocení účinnosti a určení minimální inhibiční koncentrace.

V přílohách práce jsou zveřejněny fotografie z pokusu a v příslušných kapitolách jsou uvedeny výsledky těchto pokusů.

**Klíčová slova:** Esenciální látky, alternativní ochrana, antifungální účinek, *in vitro* testy.

# Effectiveness of essential oils on selected plant pathogens

## Summary

The thesis studies the effectiveness of various essential oils extracted from selected aromatic plants: *Palergonium graveolens*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha spicata*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus*, *Eugenia caryophyllus*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Litsea cubeba*, *Pimpinella anisum*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris* used against phytopathogen organism *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* and *Leptosphaeria maculans*.

The first part of the thesis describes general characteristics of essential oils, its history and effectivity of substances. The second part of the text deals with the characteristics of selected plants and the essential oils extraction.

The aim of the thesis is to prove the effectiveness of essential oils extracted from twelve different plants followed by the determination of minimal inhibition concentration. The experiment was executed using organisms grown *in vitro* in several phases to ensure the final effectiveness of essential oils for the pathogens. The first phase of the experiment was to prove the effectiveness of essential oils concentrated 0,1 %, to be able to select the effective oils for the next phase. These oils were used to make concentrates. The final process was to determine minimal inhibition concentration, to measure the growth of mycelia and to evaluate the effectiveness. The attachment contains the results of the experiment and additional pictures.

**Keywords:** essential substances, alternative protection, antifungal activity, *in vitro* tests

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíl práce</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Literární přehled</b>	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Integrovaná ochrana rostlin</b>	<b>9</b>
<b>3.2</b>	<b>Choroby plodin a jejich původci</b>	<b>9</b>
3.2.1	<i>Botrytis cinerea</i>	10
3.2.2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	11
3.2.3	<i>Leptosphaeria maculans</i>	13
<b>3.3</b>	<b>Esenciální oleje</b>	<b>14</b>
3.3.1	Historie esenciálních olejů	14
3.3.2	Způsob získávání esenciálních olejů	15
3.3.3	Obsažené látky	16
3.3.4	Účinnost esenciálních olejů na patogeny rostlin	17
3.3.5	Použité esenciální oleje	18
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Použité chemikálie a přístroje</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Izolace patogenů do čistých kultur</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>Stanovení účinku esenciálních olejů</b>	<b>25</b>
<b>4.4</b>	<b>Stanovení minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>27</b>
<b>5.1</b>	<b>Stanovení aktivity esenciálních olejů</b>	<b>27</b>
<b>5.2</b>	<b>Stanovení minimální inhibiční koncentrace</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>33</b>
	<b>Literární zdroje</b>	<b>34</b>
	<b>Přílohy</b>	<b>39</b>

# 1 Úvod

Esenciální oleje z některých rostlin mohou mít inhibiční účinek na různé druhy škodlivých organismů, jako jsou např. bakterie, viry, houby nebo škodlivý hmyz. Použití esenciálních olejů patří mezi alternativní ochranu rostlin a je na rozdíl od konvenčních chemických přípravků pro rostliny přirozenější. V dnešní době je stále problematičtější uvádět na trh klasické pesticidy a to především od doby, kdy začala platit nová směrnice EU (Rámcová směrnice Evropského parlamentu a Rady o udržitelném využívání pesticidů 2009/128/ES, článek č. 14 a příloha č. III - Povinnost pro profesionální uživatele pesticidů využívat zásady integrované ochrany rostlin (IOR) podle přílohy III směrnice - od 1. 1. 2014 v ČR (EU)). Díky této směrnici je kladen důraz na uplatnění modernějších a šetrnějších pěstebních a ochranných postupů v rostlinné produkci.

I běžní spotřebitelé se v současné době čím dál častěji obracejí k plodinám vypěstovaným v podmínkách, které jsou šetrnější k životnímu prostředí a rostlinám samotným. Proto je důležité neustále tyto postupy rozvíjet a nacházet stále vhodnější a účinnější prostředky pro ochranu rostlin. Zkoumání esenciálních olejů je v současné době v rozvoji, ale do budoucna by mohlo mít velký význam v ekologické ochraně rostlin.

## **2 Vědecká hypotéza a cíl práce**

Existují esenciální oleje, které mají inhibiční účinek na růst houbových patogenů rostlin a potenciální využití v ochraně hostitelských rostlin před těmito patogeny.

Cílem práce bylo testování účinku vybraných esenciálních olejů na růst vybraných houbových patogenů rostlin, určení minimální inhibiční koncentrace u účinných olejů na tyto patogeny a zmapování problematiky, týkající se těchto fytopatogenních hub a vybraných esenciálních olejů.

Zároveň bylo za cíl stanoveno zmapovat a popsat danou problematiku studiem odborné literatury.



## 3 Literární přehled

### 3.1 Integrovaná ochrana rostlin

Systém integrované ochrany rostlin (dále jen IOR) je systém, který upřednostňuje alternativní ochranu rostlin a zároveň pomáhá snížit závislost na pesticidech. Snahou je najít vhodnější ekologičtější řešení ochrany, která by byla pro přírodu i člověka přirozenější (Ackermann a kol., 2013).

Pro IOR je v první řadě velmi důležité zvolit vhodné rezistentní odrůdy pro pěstování. V druhé řadě je potřeba zajistit správné pěstební podmínky, aby byla co nejvíce zamezena šance napadení původci chorob a škůdci. V případě napadení je důležité určení správné diagnostiky a ideálního řešení. Systém IOR má tedy za úkol udržet škodlivé organismy pod hladinou škodlivosti s předností využití ekonomicky, ekologicky a toxikologicky přijatelných metod. Dnes existuje již mnoho publikací, které se touto problematikou zabývají. Snaží se pěstitelům radit, jak zamezit působení škodlivých organismů. Základem je individuální přístup, a proto je důležité zabývat se konkrétní chorobou nebo škůdcem, aby byla účinnost ochrany co nejefektivnější (Ackermann et al. 2013).

Například Flowerdew (2010) ve své knize uvádí deset možných ochranných opatření, jimiž lze bojovat proti původcům chorob a škůdcům ekologicky. V knize jsou uváděny způsoby od vzájemného působení rostlin až po využití biologické ochrany rostlin.

V IOR se v současné době uplatňují i tzv. botanické pesticidy. Dosavadní pesticidní a fungicidní látky se kvůli novým požadavkům pro registraci často mohou stát nevhodnými, a právě to je důvodem pro vývoj nových biologických látek. Látky s pesticidními účinky mohou být esenciální oleje, alkaloidy, lipidy a jiné. Jejich účinky z důvodu nízké aktivity některých silic nebo fytotoxicity nemusejí být vždy zcela vyhovující, a proto je složitější jejich uvádění na trh (Dang et al., 2012).

### 3.2 Choroby plodin a jejich původci

Chorob, které ohrožují polní plodiny je celá řada. Častými příznaky u většiny chorob houbového či bakteriálního původu bývají charakteristické skvrny a postupné uhnívání nebo jiné poškození rostlin. Takové poškození má vliv na kvalitu a výnos plodin. Proto je třeba

najít postupy, jimiž se dá chorobám předejít. Preventivní ochranou před těmito chorobami bývá dodržování správné agrotechniky a pěstebních postupů. Časté mohou být i choroby skládkové, nejčastěji hniloby. Takovým chorobám se dá předejít dodržováním správných postupů skladování. Typickými původci těchto chorob jsou fytopatogenní houby (Kazda a kol., 2010).

Tato práce se zabývá fytopatogenními houbami *Botrytis cinerea*, *Leptosphaeria maculans* a *Sclerotinia sclerotiorum*, které v současné době napadají čím dál více druhů plodin a způsobují velké ztráty na kvalitě a výnosu.

### **3.2.1 *Botrytis cinerea* Pers. (1794)**

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Ascomycota*

Třída: *Leotiomycetes*

Řád: *Helotiales*

Čeleď: *Sclerotiniaceae*

dle Index Fungorum (2016)

Jedná se o široce polyfágní patogen s vláknitou stélkou, jehož pohlavní stadium je *Botryotinia fuckeliana*. Makroskopickým znakem této houby je typické vzdušné šedavé mycelium a tvorba drobných kulovitých sklerocií. Choroba, kterou *Botrytis cinerea* způsobuje, se nazývá plíseň šedá nebo šedá hniloba v závislosti na hostiteli, kterým může být celá řada rostlin (Kůdela a kol., 2012).

Tato choroba je velice rozšířená a v současné době postihuje více než 230 rostlinných druhů, ale nejčastěji to bývají rostliny z čeledi *Brassicaceae* (Carta, 1996). Příznaky této choroby jsou poměrně dobře rozpoznatelné. Jsou to mokvavé hnilobné skvrny, které se postupně zvětšují. *B. cinerea* napadá různé části rostlin od listů až po plody, ale vždy snadněji napadne pletivo, které je poškozené mechanicky, mrazem nebo nějakým škůdcem. Napadené pletivo je pokryté šedavým myceliem a vyrůstá hlavně při vyšší vzdušné vlhkosti. Napadené části rostliny odumírají. Stonky se lámou a generativní části uhnívají. Houba dokáže přežít na infikovaných zbytcích rostlin a podmínkou pro vznik a šíření choroby je

ovlhčení povrchu rostliny alespoň 4 až 5 hodin. Šíření tohoto patogena zamezují fungicidní postřiky aplikované proti jiným houbovým patogenům (Kazda a kol., 2010).

*B. cinerea* způsobuje velké ekonomické ztráty i při nedodržení správných skladovacích postupů, kde je velké riziko mechanického poškození. Mycelium a klíčící spory mohou přežívat i na skladovacích přepravkách a velice snadno se přenášejí na uskladněné plodiny. Plodiny se tak často mohou infikovat mezi sebou a je nutné napadené plodiny ihned zlikvidovat. Tento patogen je velice přizpůsobivý a toleruje teploty od 0 °C až po 25 °C. Proto je potřeba zabránit poškození pletiv plodin, aby bylo zabráněno snadnějšímu napadení (Buchwaldt, Rimmer, 2007).



**Obrázek 1: Pokročilé příznaky způsobené *Botrytis cinerea* na *Brassica oleracea convar. capitata***

### **3.2.2 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (1884)**

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Ascomycota*

Třída: *Leotiomycetes*

Řád: *Helotiales*

Čeleď: *Sclerotiniaceae*

dle Index Fungorum (2016)

*S. sclerotiorum* způsobuje bílou hnilobu, která je známá i jako sklerotiniová hniloba. *Sclerotinia* je vřeckatá houba, tvořící bílé mycelium na napadeném pletivu. Typická je tvorba nepravidelných velmi tvrdých černých útvarů – sklerocií, které slouží k přežívání houby a to hlavně v půdě. Ze sklerocií vyrůstají malé plodničky – apothecia, v kterých se tvoří vřeka s askosporami. Ty jsou hlavním zdrojem infekce. *S. sclerotiorum* napadá široký okruh plodin kromě čeledi *Poaceae*, ale hlavními plodinami, které tato nemoc postihuje, bývá řepka, slunečnice a hořčice. Mezi významné hostitele patří mák, hrách, luskoviny a zelenina (Kazda a kol., 2010). Patogen se nejčastěji šíří při vlhkém a chladném počasí. Příznaky na těchto plodinách bývají často velmi podobné. Choroba se nejlépe šíří v teplejších a sušších podmínkách a je velice adaptabilní. Projevuje se skvrnami s bílým vatovitým myceliem a černými sklerocii uvnitř. V další fázi napadení mohou začít pletiva měknout a odumírat. Sklerocia mohou v půdě přežívat i několik let a jsou připravena napadnout svého hostitele (Ackermann a kol., 2013).

Od roku 1950, kdy se začaly rozšiřovat plochy pro pěstování řepky, nabývá *S. sclerotiorum* stále většího významu a to hlavně v Evropě, Kanadě, Indii, Číně a Austrálii. U některých druhů z čeledi *Brassicaceae* se již vyskytují rezistentní odrůdy.

Základním opatřením proti této chorobě je střídání hostitelských a nehostitelských plodin a v případě chladného a vlhkého počasí je dobré použít fungicidy nebo biologickou ochranu na bázi *Coniothyrium minitans*. U některých plodin z čeledi *Brassicaceae* může *S. sclerotiorum* způsobovat až 50% ztráty na výnosech (Buchwaldt, 2007).



**Obrázek 2: Typické příznaky bílé hniloby na *Dacus carota* subs. *sativus***

### 3.2.3 *Leptosphaeria maculans* (Tul. & C. Tul.) Ces. & De Not. (1863)

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Ascomycota*

Třída: *Dothideomycetes*

Řád: *Pleosporales*

Čeleď: *Leptosphariaceae*

*anamorfa*: *Phoma lingam* (Tode) Desm. (1849)

dle Index Fungorum (2016)

Tento patogen je původcem velmi známé choroby s názvem fomová hniloba brukvovitých. U řepky olejky je používán název fomové černání stonků řepky (Kůdela a kol., 2012). Patogen přežívá v půdě 2-3 roky a choroba, kterou způsobuje, patří mezi nejznámější choroby řepky olejné. V současné době je tato choroba stále na vzestupu (Prokinová, 2003).

Příznaky se projevují nejčastěji na podzim tmavohnědými až černými skvrnami na kořenovém krčku. Na listech se choroba projevuje zprvu nažloutlými skvrnami, které jsou uprostřed šedobílé s malými černými tečkami – pyknidami. Pyknidy jsou pro tuto chorobu typické. Skvrny je možné sledovat i na šešulích a bočních větvích. Později se infekce může rozšířit po celé rostlině včetně kořenů. Napadená pletiva na kořenech a bázi stonku později rozpraskají a zkorkovají. Rostliny se v místě kořenového krčku zaškrucují, lámou se a později rostlina odumírá.

Zdrojem nákazy mohou být nezapravené posklizňové zbytky, kvůli kterým se nákaza může šířit větrem nebo deštěm. Choroba se může přenášet i osivem. Méně významným zdrojem šíření jsou konidie (pykno-spory), vyvíjející se v pyknidách na napadených částech rostlin.

Prevenčí proti této chorobě je zdravé osivo, volba vhodných odrůd, vyrovnaná výživa, omezení poškození pletiv, správná agrotechnika a vhodný, minimálně 3letý, osevní postup (Ackermann a kol., 2013).

Jako další prevencí proti fomové hnilobě může být i namáčení semen do teplé vody, kdy je potřeba, aby semena byla asi 15-30 minut ponořena ve vodě o teplotě kolem 50 °C.

V současné době je v některých státech Evropy a USA zaveden certifikační program, který stanovuje toleranci infikovaného osiva. U některých druhů řepky byla prokázána rezistence na fomovou hnilobu (Rimmer, van den Berg, 2007).



**Obrázek 3: Příznaky fomové hniloby na listu *Brassica napus* subsp. *napus*, kde jsou dobře patrné pyknidy.**

### **3.3 Esenciální oleje**

Esenciální oleje jsou vonné, těkavé látky obsahující pestrou směs sloučenin, v kterých převládají látky terpenické povahy. Jsou hojně užívány v aromaterapii, dochucovadlech a parfumerii. Esenciální oleje jsou sekundární metabolity rostlin a v rostlině se mohou nacházet v různých částech – v listech (*Ocimum basilicum*), v květech (*Rosa* sp.), v plodech (*Citrus* spp., *Coriandrum sativum*), v klejoprskyřici (*Boswellia* spp.), v kůře (*Cinnamomum zeylanicum*), v kořenech a oddencích (*Petroselinum* spp.). Význam výskytu esenciálních olejů v rostlinách není zatím zcela objasněn, ale je možné, že slouží jako jakási forma komunikace mezi rostlinami. Rostliny je používají jako ochranné látky proti býložravcům, k lákání hmyzu na opylování a ochraně rostlinu proti škůdcům. Teplo způsobuje, že se silice z rostlin odpařují a tak vytváří ochranné prostředí před bakteriemi, houbami a škodlivým hmyzem (Bremness, 1994).

Silice bývají zpravidla bezbarvé, ale delším uchováváním a převážně oxidací se mohou často měnit jejich vlastnosti, především barva (Nebovidský a kol., 1925).

#### **3.3.1 Historie esenciálních olejů**

Germann (2013) ve své knize uvádí, že užívání esenciálních olejů má velkou historii, která započala asi 7000 let před n. l. v Číně. V této době se esenciální oleje užívaly hlavně ke

konzervaci vína. Vůbec nejstarším doloženým důkazem je nález destilační aparatury, která je z doby asi 3000 let před n. l. a pochází z Pákistánu. Toto zařízení funguje na principu získávání éterických olejů pomocí vodních par a tento princip je užíván dodnes.

I staří Egypťané využívali účinky esenciálních olejů. Oleje měli nezastupitelnou roli při balzamování mrtvých těl. V Alexandrii, která byla ve své době město s 200 000 obyvateli, bylo nutné udržovat hygienu. A proto se zde dennodenně na ulicích pářily ve speciálně vykopaných strouhách vonné kužely.

Ve středověku bylo rozšířené používání esenciálních rostlin hlavně proti moru. Lidé již v této době věřili, že některé esenciální oleje mohou zamezit příznakům některých nemocí. Lékaři, kteří léčili nemocné, si často vycpávali obličejové roušky šátky, v kterých byl napuštěn olej z jalovce nebo rozmarýnu. Odpařováním látek se tak prý „dezinfikoval“ vzduch. V 16. století začala cena těchto olejů stoupat (Gremann, 2013).

První metodický výzkum provedl francouzský chemik M. J. Dumas. Své výsledky poprvé publikoval v roce 1833. Zjistil, že esenciální oleje mají několik složek a určil některé z nich, především některé uhlovodíky. Nejzajímavější výzkum však provedl O. Wallach za pomoci svých spolupracovníků. Začali totiž izolovat a popisovat jednotlivé terpeny, aby mohli později zkoumat jejich základní účinné látky (Baser et al., 2010).

Lidé se snažili vyrobit syntetický olej a v roce 1862 se to konečně podařilo. V roce 1920 přišel na trh první syntetický parfém a tím se pro parfémový průmysl otevřelo široké pole působnosti, kterého využívá dodnes. K terapeutickým účelům a relaxaci jsou ovšem synteticky vyráběné oleje zcela nepoužitelné a nemůžou nikdy nahradit čistě přírodní látky. (Germann, 2013).

### **3.3.2 Způsob získávání esenciálních olejů**

K získání určitého množství silice je vždy potřeba mnohonásobně vyšší množství části rostliny, která silici obsahuje. Například k získání 1 kg levandulové silice je potřeba 120 kg květů (Svojtka and Co., 2008).

Pro výrobu těchto olejů se používají různé techniky. Nejvyužívanější stále zůstává destilace vodní parou. Princip této metody je jednoduchý: v uzavřené baňce se odpařuje voda a přes připojenou chladicí trubku se zase ochlazuje. Rostlinný materiál se umístí na sítko v baňce, která je zúžená a pod ní je vroucí voda. Pomocí horka a vznikajícího tlaku vynáší vodní pára drobné voňavé molekuly z rostlin mechanicky s sebou vzhůru. Pára

ochlazená v chladicí trubce zkondenzuje. Takto kondenzovaná voda se nazývá hydrolát. Esenciální olej se usadí na povrchu hydrolátu, což pak umožní jeho oddělení.

Další možnost získávání olejů spočívá v použití florentinské nádoby. Jedná se o láhev s širokým hrdlem, ze které vede po straně u dna trubka, sahající téměř až k ústí nádoby. Tato nádoba se používá k oddělení dvou nemísitelných kapalin. Kapalina, která je těžší, klesne ke dnu a lehčí kapalina odteče postranní odtokovou trubicou ven. Podle druhu výchozího materiálu se mění doba destilace i teplota (Germann, 2013).

Pro získávání oleje především ze slupek citrusových plodů se nejčastěji používá lisování za studena. Mačkáním vnější vrstvy slupky praskají buňky, které obsahují olej. Ten se zachytává do speciálních nádob. Lisováním za studena lze snadno získat oleje, které jsou citlivé na vysokou teplotu. Oleje z citrusových plodů mívají často kratší trvanlivost než oleje jiné. Je to z důvodu velkého podílu monoterpenů (Nebovidský a kol., 1925).

Enfleuráž je také způsob získávání éterických olejů, ale dnes se již moc nepoužívá, protože je to velice složitý proces. Na skleněnou desku s tenkou vrstvou tuku se ručně pokladou květy. Vrstva se přiklopí další skleněnou deskou a přes dvanáct hodin se skladují na chladném a suchém místě. Těchto desek se na sebe klade v několika vrstvách, ale květy se musí často měnit, a tak je potřeba velké množství pracovních sil. Proto se tímto způsobem získává olej téměř pouze z jasmínu (Germann, 2013).

### **3.3.3 Obsažené látky**

Bacílková a Paulusová (2012) uvádějí, že silice se skládají z velkého počtu chemických sloučenin. V jedné silici může být až 50 látek. Celkově jich však bylo nalezeno kolem 500. V některých silicích převládá jedna hlavní složka. Mezi takové silice patří například eugenol, který vytváří hřebíčkovce vonný.

Nebovidský a kol. (1925) uvádí, že každá silice je charakteristická některou ze svých složek a podle toho se dají posuzovat. Silice se chemicky rozkládají a určuje se u nich jejich hlavní složka a příměsi. Téměř každá silice se dá uměle připravit, ale nikdy nebude vykazovat takové účinky jako silice přírodní.

Silice obsahují zpravidla látky s nižší molekulovou hmotností, bez glykosidní vazby a s menším počtem kyslíkatých funkcí. Tyto vlastnosti odpovídají látkám, jako jsou monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny a fenylypropany. V silicích je zastoupené mnoho typů



organických sloučenin. Uhlovodíky se objevují téměř ve všech silicích. Jsou zde zastoupeny monocyklické monoterpeny - limonen (citrusy),  $\alpha$ -terpinen (koriandr),  $\alpha$ -felandren (fenykl a blahovičnick), bicyklické monoterpeny - pinen (jehličnany) a bicyklické sekviterpeny - kadinen.

Alkoholy, které se v silicích objevují převážně jako acyklické monoterpeny - geraniol, linalool a citronellool, monocyklické alkoholy - menthol a bicyklické - borneol. Aldehydy jsou v silicích zastoupeny jako acyklické i cyklické formě. Mezi acyklické patří monoterpeny citral (geranial) a citronellal a mezi cyklické aldehydy například vanilin. Ketony se v silicích vyskytují buď jako monocyklické monoterpeny – menthon (máta peprná), karvon (kmín), pieriton (blahovičnick), diosfenol nebo jako bicyklické monoterpeny – kafr, thujon anebo neterpenické – iron (kosatec). Fenoly, které jsou obsaženy s silicích, mohou mít také různé formy. Nejznámějšími a nejdůležitějšími přírodními fenoly jsou eugenol (hřebíčkovec), thymol (tymián) a karvakrol (tymián). Další složkou silic jsou fenolické étery. Patří mezi ně anethol (anýz, fenykl), safrol (sassafras) a deriváty safrolu. Jiné silice jako například eukalyptová - eukalyptol nebo merlíková – askaridol obsahují oxidy. Další složkou jsou estery, mezi které patří octany terpineolu, borneolu nebo geraniolu (Bacílková a Paulusová, 2012).

### 3.3.4 Účinnost esenciálních olejů na patogeny rostlin

V současné době probíhá mnoho výzkumů založených na testování účinnosti esenciálních olejů na různé patogeny rostlin.

Adebayo et al. (2013) ve svém výzkumu popisují účinnost esenciálních olejů z rostlin *Origanum vulgare* a *Monarda didyma* na houbu *Botrytis cinerea* izolovanou z *Fragaria x ananassa*. Účinky těchto olejů byly srovnávány s komerčním přípravkem firmy Gloves off. Tento přípravek obsahuje téměř stejný podíl thymolu a karvakrolu jako je v rostlině *Thymus vulgaris* a původně byl vyroben jako čistící a desinfekční prostředek do domácností a nemocnic. Jejich výsledky dokazují, že komerční přípravek sice dokáže potlačit růst mycelia, ale účinky přírodních esenciálních olejů jsou vyšší ve srovnání s tímto komerčním přípravkem.

Adiguzel et al. (2007) se zabývali zkoumáním složení esenciálního oleje z rostliny *Satureja hortensis* a účinku tohoto oleje a methanolového extraktu z této rostliny na různé patogeny rostlin. Olej ze *S. hortensis* obsahuje kromě jiných látek hlavně thymol a karvakrol. Olej a methanolový extrakt z *S. hortensis* byl testován na mnoha druzích bakterií a hub a u

většiny těchto organismů byl zaznamenán velký účinek esenciálního oleje i methanolového extraktu. Minimální inhibiční koncentrace se u těchto látek pohybovala od 15,62 do 250 µl/ml. Větší účinky však potvrdil methanolový extrakt ze *S. hortensis*.

Další výzkum účinnosti esenciálních olejů na různé patogeny provedli Daferera et al. (2002), kteří zkoumali esenciální oleje z *Origanum* sp., *Thymus* sp., *Dictamnus* sp., *Lavandula* sp., *Rosmarinus* sp., *Salvia* sp. a *Mentha* sp. a jejich účinnost na *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Jejich výsledky dokazují, že oleje z *Origanum* sp., *Thymus* sp. a *Dictamnus* sp. úplně inhibovaly růst vybraných patogenů. Tyto výsledky jsou připisovány především obsahu thymolu a karvakrolu v esenciálních olejích těchto rostlin. Naopak u rostlin *Lavandula* sp., *Rosmarinus* sp., *Salvia* sp. a *Mentha* sp. byla prokázána mnohem nižší inhibiční schopnost.

Surviliene et al. (2009) zkoumali účinnost esenciálních olejů z rostlin *Picea abies*, *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis* a *Abies siberica* proti *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavus* var. *oryzae*, *Mortierella hyalina* var. *hyaline*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sporotrichum aurantiacum*, *Phoma exiqa* a *Clonostachys rosea* f. *catenulata* izolovaných z jablek a ze zeleniny v závislosti na množství použitého esenciálního oleje a na inkubační době patogenů. Jejich výzkum odhalil, že po 4 dnech inkubace byla účinnost olejů největší a v následujících dnech se účinnost u některých ze zkoumaných olejů snižovala.

Prasad et al. (2010) se zabývali zkoumáním *in vitro* účinku esenciálních olejů z rostlin *Eugenia* sp., *Cedrus* sp., *Cymbopogon citratus*, *Mentha x piperita*, *Citronella* sp. a plodu z *Myristica fragrans* proti houbě *Phomopsis azadirachtea* a zjistili, že největší účinek mají na tuto houbu oleje z *Cymbopogon citratus* a *Citronella* sp., kteří růst této hniloby inhibovali 100% a to při koncentraci 0,25 %.

### 3.3.5 Použité esenciální oleje

#### 3.3.5.1 *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (1906)- Voňatka citronová

*Cymbopogon citratus*, u nás známá také pod anglickým názvem lemongrass, je trsnatá tráva patřící do čeledi *Poaceae*, která dorůstá až 2 metrů. Dnes je rozšířena v teplejších oblastech téměř po celém světě, ale její původ je v Indii. Její listy obsahují 0,5 až 1 % silice, jejímiž hlavními složkami jsou citral, myrcen, limonen a geraniol. Tato silice má

opravdu široké využití a je velice oblíbená v parfumerii jako léčivo a dokonce jako surovina při výrobě papíru (Valíček a kol., 2002).

#### 3.3.5.2 *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor – Voňatka winterova

Původ této rostliny můžeme zaznamenat na dvou místech. Jedním z nich je Jáva a druhým je Cejlon. Podle těchto míst původu se *Cymbopogon winterianus* rozděluje na jávský typ a cejlonský typ. Oba dva typy mají hodně společného. Patří do čeledi *Poaceae* stejně jako *Cymbopogon citratus*. Jsou to trsnaté trávy asi 2 metry vysoké. Jejich listy jsou tenké, světle zelené a lehce načervenalé uvnitř. Olej z těchto rostlin obsahuje především geraniol, citronellol a citronellal. Rozdíl těchto dvou typů je patrný až po chemické analýze obou druhů. Cejlonský typ obsahuje nižší podíl citronellolu a citronellalu ve srovnání s jávským typem. Oleje z těchto rostlin se používají jako analgetika, jako dochucovadla do různých pokrmů a jako vonná látka do parfémů a aromaterapií (Silva et al., 2010).

#### 3.3.5.3 *Eucalyptus citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson - Blahovičník citroníkový

*Eucalyptus citriodora* patří do čeledi *Myrtaceae* a je u nás známý pod svým latinským názvem *Eucalyptus*, který ale zahrnuje stovky, většinou stromovitých druhů, pocházejících z Austrálie a Malajsie.

*E. citriodora* je stálezelený strom s růžovou a šedou kůrou. Od ostatních druhů se odlišuje svou vůní. Silice se získávají z listů a mladých výhonů a obsahuje především citral a citronellol (Valíček a kol., 2002).

Olej z této rostliny bývá obsažen v olejích do aromalamp. Při jeho odpařování dochází k uvolňování horních dýchacích cest. Používá se také jako olej do koupelových olejů, kde má za úkol uvolňovat svalstvo (Vermeulen, 2001).

#### 3.3.5.4 *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) - Hřebíčkovec kořenný

Hřebíčkovec je dlouho žijící stálezelený strom s lesklými zelenými listy a růžovými pupeny poupat, která se mění ve voňavé červené květy a fialové plody. Olej se získává vodní

destilací z poupat těchto květů. Zemí původu hřebíčkovce je Madagaskar a Indonésie (Farrer – Halls, 2005).

Patří do čeledi *Myrtaceae* a velmi brzy je znám v Číně, v dynastii Han, kdy bylo pravidlo, že se k císaři lidé smí přiblížit pouze s hřebíčkem v ústech pro vonný dech (Fillnerová, 2009).

Silice hřebíčkovce obsahuje převážně eugenol (asi 90 %). Nejvíce se tedy hřebíčkovce užívá při potížích v dutině ústní, kde působí antibakteriálně a ulevuje při bolesti zubů. Dokáže i snížit hladinu cukru v krvi (Jahodář, 2016).

#### 3.3.5.5 *Foeniculum vulgare* Mill. - Fenykl obecný

Fenykl obecný patří do čeledi *Apiaceae*, pochází ze Středozeší a je to zpravidla dvouletá nebo vytrvalá bylina s dužnatým kořenem a jemně rýhovanou až 2 m vysokou lodyhou. Fenykl má malé sytě žluté květy uspořádané ve velké bohaté okolíky kvetoucí od července do září. Semena, která se sbírají, mají silný kořenitý zápach a nasládlou chuť. Silice obsahuje několik složek, ale mezi hlavní patří anethol a fenchon. Tyto účinné látky se užívají jako prostředek ke zvýšení činnosti střev (Korbelář, Endris, 1970).

Homeopaté používají fenykl jako podporu tvorby mléka u kojících matek. Fenykl je bylina známá často i pod lidovým názvem – římský kopr (Wojtowicz, 2004).

#### 3.3.5.6 *Lavandula angustifolia* Mill. (1768) - Levandule lékařská

Levandule pochází ze Středomoří. Patří do čeledi *Lamiaceae* a pěstuje se převážně ve Francii, Španělsku a Itálii. Je to asi 80 cm vysoký polokeř. Kvete fialovými květy a celá rostlina je příjemně aromatická. Kvetoucí nať obsahuje 0,8–1,5 % silice, jejíž hlavními složkami jsou linalool, linalylacetát, 1,8–cineol, limonen, pinen, karyofylen a levandulylacetát. Levandulová silice se přidává do luxusních parfémů a patří mezi jednu z nejvíce užívaných rostlinných silic. Užívá se také jako léčivá rostlina, tlumí křeče a celkově napomáhá k uklidnění, zmírnění bolestí při migrénách a její nať se používá k aromatizování čaje a jiných nápojů. Hospodářský význam mají i jiné druhy, které ale neprodukují silici tak dobré kvality jako *Lavandula angustifolia* (Valíček a kol., 2002).

### 3.3.5.7 *Litsea cubeba* Lam. - Vavřín kubébový

*Litsea cubeba* patří do čeledi *Lauraceae* a původem pochází z jihovýchodu Asie, kde se dnes také hojně pěstuje a využívá pro své léčivé účinky. Je to dvoudomý opadavý strom nebo keř dorůstající se výšky až 12 metrů s plodem v podobě malých černých bobulí. Suché plody obsahují 0,3–1,5 % silice, jejímiž hlavními složkami jsou citral, limonen, methyl – hepteon,  $\alpha$ -pinen a linalool. Silice z rostliny *L. cubeba* má výrazně citronovou vůni, je hojně využívaná v parfumerii a jako léčivka při problémech se záněty kloubů, s revmatismem a při léčbě závratí a různých duševních poruch (Valíček a kol., 2002).

### 3.3.5.8 *Mentha spicata* L - Máta klasná

Máta pochází ze subtropického podnebného pásu a patří do čeledi *Lamiaceae*. Je to drobná růžově kvetoucí léčivka s oválnými až eliptickými listy. Plodem je suchá tvrdka, obsahující 1-4 semena. Obsahuje 1-3 % silice, v níž je více než 50 % mentholu, dále jeho estery s kyselinou octovou a přes 10 % menthonu a dalších asi 40 terpenických látek. Máta se často užívá na žaludeční potíže, žaludeční nevolnosti a pomáhá při léčbě koliky. Pravidelné pití mátového čaje posiluje nervovou soustavu a má mírné afrodisiakální účinky (Pavela, 2011).

### 3.3.5.9 *Pelargonium graveolens* L'Hér. - Pelargonie vonná

Pelargonie patří do čeledi *Geraniaceae* a již její objevení v Jižní Africe bylo senzací. Pro tuto vytrvalou jemně chloupkatou rostlinu s členitými listy je typická silice, která je obsažena převážně v listech, květech a stoncích. Silice šíří silnou vůni růží a již od té doby se z pelargonie vyrábí tzv. geraniový olej užívaný zejména v kosmetických přípravcích (Vermeulen, 2001).

V současné době je silice z muškátu využívána jako neúčinnější z esenciálních olejů, které pomáhají čistit lymfatický systém a odstranit celulitidu. Často se tedy využívá na lymfatické masáže (Farrer- Halls, 2007).

Valíček a kol., (2002) uvádějí, že z *P. graveolens* lze získat silice obsahující především geraniol, citronellol, isomenthon, geranylformát, citronellylformát, linalool a guaia – 6,9 - dien.

#### 3.3.5.10 *Pimpinella anisum* L. - Bedrník anýz

Jedná se o jednoletou bylinu z čeledi *Apiaceae* asi 50 cm vysokou s vřetenovitým oddenkem pocházející z jihu Evropy. Má bílé květy uspořádané v okolíky a jejím plodem je dvounažka. Bedrník je rostlina známá již od středověku, kdy byla užívána jako prostředek, který zneškodňuje každý jed. Všechny části této rostliny velice aromaticky voní. Pochází z Asie a dnes se v mnohých zemích hojně pěstuje. Její užívanou částí jsou semena, která se sbírají v srpnu nebo v září a obsahuje asi 1,5 až 6 % silice. Užívá se hlavně ve farmacii k přípravě aromatických olejů, lihů, sirupů, léčivých čajů, ale i v domácnosti jako koření. Bedrník má silnější protikřečový účinek než fenykl a kmín, uklidňuje a působí proti kašli. Největší podíl silice tvoří složka anethol, který má nasládlou chuť (Korbelář, Endris, 1970).

#### 3.3.5.11 *Salvia officinalis* L. - Šalvěj lékařská

Šalvěj je vytrvalá bylina s dřevnatými lodyhami, vysoká kolem 1 metru a patřící do čeledi *Lamiaceae*. Pochází z oblasti Balkánského poloostrova. Horní část lodyhy je více bylinná a dolní část dřevnatá a plstnatá. Listy dosahují délky asi 10 cm a šířky asi 4 cm. Jsou zejména v mládí jemně plstnaté později téměř lysé. Květy jsou fialové a kvetou v červnu a v červenci. Na korunce květu je trubka, která je zarostlá jemnými chloupky, které zabraňují přístupu některým druhům hmyzu ke žlázkám obsahujícím silici. Užitkovou částí jsou listy a nať. V listech je silice (1,5 %–2,5 %), která obsahuje složky jako je thujon, salviol a cineol. Dále listy obsahují také třísloviny (asi 8 %), estrogenní hormony a amid kyseliny nikotinové. Silice v malých dávkách snižuje vylučování potu, působí protizánětlivě a mírně močopudně. Šalvějové bonbony jsou užívány proti zánětům v ústech a šalvějový med je velmi ceněný a velice chutný (Korbelář, Endris, 1970).

#### 3.3.5.12 *Thymus vulgaris* L. - Tymián obecný

Tymián je vytrvalá bylina až 40 cm vysoká s lodyhami silně zdřevnatělými s původem ze Středozeří. Květy má nachové barvy a jsou ve vidlanovitých svazečcích. Plodem jsou tvrdky (Korbelář, Endris, 1970).

Tymián patří do čeledi *Lamiaceae*. Užívanou částí Tymiánu je nať, která se používá k dochucování jídel, protože právě tato část rostliny obsahuje největší množství silice (2–2,4 %). Hlavními složkami jsou thymol, citral, kafr, karavon, karvakrol a 1,8-cineol.

Tymiánová silice se přidává i do zubních past, protože má protizánětlivé účinky (Valíček a kol. 2002).

## 4 Metodika

Aktivita patogenů byla sledována na živném médiu s 0,1% koncentrací esenciálního oleje. Termín vyhodnocení pokusu byl stanoven na základě růstu patogena na kontrolní variantě. Od každého patogena byl použit vždy jeden izolát. Esenciální oleje které při 0,1% koncentraci nezpůsobily 100% inhibici růstu patogenů byly z dalšího testování vyřazeny. Účinné oleje byly dále použity v koncentračních řadách, aby mohla být stanovena minimální inhibiční koncentrace esenciálního oleje. Pro přehlednost byly všechny esenciální oleje použity ve zkratkách.

Olej z *Palergonium graveolens* je v tabulkách označen „PG“, *Eucalyptus citriodora* jako „EC“, *Mentha spicata* jako „MS“, *Cymbopogon citratus* jako „CC“, *Cymbopogon winterianus* jako „CW“, *Eugenia caryophyllus* jako „HŘ“, *Foeniculum vulgare* jako „FV“, *Lavandula angustifolia* jako „LA“, *Litsea cubeba* jako „LC“, *Pimpinella anisum* jako „PA“, *Salvia officinalis* „SA“ a *Thymus vulgaris* jako „TV“.

### 4.1 Použité chemikálie a přístroje

Patogeny byly izolovány a dále inkubovány na braborovo-dextrózovém agaru (Potato Dextrose Agar) od firmy Himedia. Izoláty byly po celou dobu růstu mycelia umístěny při stálé teplotě 21 °C v termostatu Lovibond. Živné médium bylo připraveno dle doporučení výrobce. A to tak, že do 500 ml destilované vody bylo přidáno 19,5 g agaru. Veškeré práce spojené s izolací a přeočkováváním kultur jednotlivých patogenů byly prováděny ve sterilních podmínkách laminárního boxu (Laminar Flow Cabinet, od firmy ESCO), který dopomáhal zabránit infikování živného média jinými organismy. Pro uchování a dobré podmínky pro růst mycelia byly použity Petriho misky o průměru 90 mm, které byly po obvodu zalepeny Parafilmem. Všechny esenciální oleje byly získány od firmy Míča a Harašta Břeclav.

### 4.2 Izolace patogenů do čistých kultur

Izoláty byly získány z infikovaných pletiv rostlin a z nich izolovány do čistých kultur na živné médium.

Izolace *Botrytis cinerea* byla provedena z pletiva infikovaného zelí hlávkového (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *alba* DC. Ranos), které bylo získáno ze skladu rodinné



firmy v lokalitě Semice a z infikovaných plodů papriky (*Capsicum annum* L.), zakoupených v supermarketu. *Leptosphaeria maculans* byla izolována z listů čínského zelí (*Brassica chinensis* L.), získaného z pozemku katedry ochrany rostlin na ČZU. Pro získání *Sclerotinia sclerotiorum* byly použity infikované kořeny mrkve (*Dacus carota* subs. *sativus*). Mrkev byla také získána z rodinné firmy ze Semic. Z infikovaných pletiv byly sterilní jehlou odebrány vzorky a přemístěny na živný agar PDA do Petriho misek.

### 4.3 Stanovení účinku esenciálních olejů

Pro stanovení antifungálního účinku byly použity esenciální oleje v 0,1% koncentraci. Byly použity oleje z rostlin *Palergonium graveolens*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha spicata*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus*, *Eugenia caryophyllus*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Litsea cubeba*, *Pimpinella anisum*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*. Před aplikací esenciálního oleje do živného média byl použit vždy jeden esenciální olej rozpuštěný v DMSO (dimetylsulfoxid) v poměru 1:1.

Stanovení účinnosti esenciálních olejů na vybrané patogeny bylo prováděno *in vitro* metodou na agaru. Do zchlazeného živného média byl přidán pomocí mikropipety roztok esenciálního oleje s DMSO a byla tak vytvořena 0,1% koncentrace. Byla vytvořena i kontrola pro srovnávání nárůstu mycelia. Při přípravě kontrolní varianty nebyl použit žádný esenciální olej. Do živného média byl přidán pouze roztok DMSO (0,1 %) a na zatuhlý agar následně naočkován příslušný patogen. Na každou Petriho misku s 0,1% koncentrací některého z olejů byl naočkován vždy jeden patogen. Celý tento postup byl zopakován desetkrát. Každá Petriho miska byla bezpečně uzavřena Parafilmem, aby byl zamezen přístup roztočů, kteří by do Petriho misek zanesly nežádoucí mikroorganismy. Každá miska byla pečlivě označena, aby bylo patrné, který esenciální olej a který patogen byl použit. Kultivační doba byla stanovena na základě růstu patogenů na kontrolní variantě a inkubace probíhala v tmavém prostředí se stálou teplotou 21 °C. Bylo provedeno vyhodnocení nárůstu mycelia na agaru na všech variantách a na základě porovnání s kontrolou byl stanoven inhibiční účinek esenciálního oleje.

Pokud esenciální oleje vykazovaly 100% inhibiční účinnost, byla u těchto olejů dále zkoumána jejich účinnost v nižších koncentracích (0,08 %, 0,06 %, 0,04 % a 0,02 %), aby mohla být následně stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC). MIC je minimální

stanovená koncentrace esenciálního oleje, která 100% inhibuje růst patogena. Oleje, které byly vyhodnoceny jako neaktivní, byly z dalšího zkoumání vyřazeny a vyhodnoceny jako neúčinné.

Pro stanovení výsledných údajů v tabulkách a stanovení MIC byl použit tento vzorec:

$$(100 - [(dT/dC) \times 100]),$$

kde dT je průměr nárůstu mycelia na variantě s esenciálním olejem (v mm) a dC je průměr nárůstu mycelia na kontrolní variantě (v mm).

#### **4.4 Stanovení minimální inhibiční koncentrace esenciálních olejů**

Esenciální oleje, jejichž účinek byl patrný při použití 0,1% koncentrace, byly dále použity pro určení minimální inhibiční koncentrace. Roztok DMSO s esenciálním olejem byl přidán do agarů vždy v takovém objemu, aby byla docílena požadovaná koncentrace. Koncentrací pro určení minimální inhibiční koncentrace bylo zvoleno celkem 5, vždy o 0,02 % méně.

0,1% 1000 µl/l

0,08% 800 µl/l

0,06% 600 µl/l

0,04% 400 µl/l

0,02% 200 µl/l

Každá varianta byla vytvořena celkem v deseti opakováních, aby bylo dosaženo přesnějších výsledků. Do kontrolní varianty bylo přidáno pouze odpovídající množství DMSO. Nárůst mycelia jednotlivých hub byl vždy srovnáván s nárůstem mycelia na kontrolní variantě.

## 5 Výsledky

### 5.1 Stanovení aktivity esenciálních olejů

V první fázi pokusu byla vyhodnocena účinnost esenciálních olejů, jejichž koncentrace v agaru odpovídala 0,1 %. Tato koncentrace byla stanovena jako maximální pro možné komerční použití na základě zpracované literatury. Oleje vyhodnocené jako neúčinné byly z dalšího zkoumání vyřazeny a v jiných koncentracích již nebyly použity.

Tabulka 1. Vyhodnocení účinnosti esenciálních olejů při 0,1% koncentraci oproti kontrole.

Vybrané patogeny	Účinnost jednotlivých esenciálních olejů v koncentraci 0,1 %											
	CC	CW	EC	HŘ	FV	LA	LC	MS	PG	PA	SO	TV
<i>Botrytis cinerea</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Leptosphaeria maculans</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabulka č. 1 vyjadřuje účinné oleje, u kterých nebyl zaznamenán nárůst mycelia na živném médiu znaménkem „+“ a neúčinné oleje, u kterých byl zaznamenán nárůst mycelia znaménkem „-“. Z tabulky je patrné, že oleje, které byly vyhodnoceny jako aktivní, byly ve většině případů účinné na všechny tři patogeny. Výjimkou je olej z *L. cubeba* (LC), který byl účinný pouze na *S. sclerotiorum*. Olej z *C. citratus* (CC) byl tak účinný na *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* i na *L. maculans*. Olej z *E. caryophyllus* (HŘ) byl také účinný na *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* i na *L. maculans*. Olej *T. vulgaris* (TV) byl vyhodnocen jako účinný také na *B. cinerea*, *S. sclerotiorum* i na *L. maculans*. Ostatní esenciální oleje získané z *P. graveolens*, *E. citriodora*, *M. spicata*, *C. winterianus*, *F. vulgare*, *L. angustifolium*, *L. cubeba*, *P. anisum* a *S. officinalis* byly vyhodnoceny jako neúčinné oleje, protože jejich aktivita nebyla prokázána ani u jednoho z patogenů.

## 5.2 Stanovení minimální inhibiční koncentrace

V druhé fázi pokusu byly použity pouze oleje, u kterých byla prokázána jejich účinnost při 0,1% koncentraci, tedy olej z *C. citratus*, *E. caryophyllus*, *L. cubeba* a *T. vulgaris*. Tyto oleje byly použity v koncentracích 0,1 %, 0,08 %, 0,06 %, 0,04 % a jako nejnižší koncentrace byla zvolena 0,02 %. Po vyhodnocení účinnosti olejů, byla stanovena minimální inhibiční koncentrace, při které je olej schopen 100 % inhibovat růst mycelia na živném médiu. Každý olej byl ve všech koncentracích proti každému z patogenů použit celkem v deseti opakováních, aby bylo dosaženo co nejpřesnějších výsledků. Při vyhodnocování nárůstu mycelia byl vždy měřen průměr narostlého mycelia v každé Petriho misce. Podle daného vzorce byla vypočítána procentuální účinnost daného oleje, která je uvedena v tabulce.

**Tabulka 2. Vyhodnocení účinnosti esenciálních olejů v % pro jednotlivé koncentrace proti *Botrytis cinerea* v porovnání s kontrolou.**

koncentrace es. oleje v %	Inhibiční účinek esenciálních olejů v %		
	CC	HŘ	TV
0,10	100	100	100
0,08	40	80	0
0,06	0	0	0
0,04	0	0	0
0,02	0	0	0

Tabulka č. 2 popisuje průměrnou procentuální účinnost esenciálních olejů ze všech deseti opakování. Olej z *C. citratus* (CC) je 100% účinný proti *B. cinerea* pouze v koncentraci 0,1%. Tedy žádná z Petriho misek nebyla porostlá myceliem. V koncentraci 0,08 % vykazuje účinnost pouze 40 % a v dalších nižších koncentracích nebyla jeho účinnost zaznamenána. Jako minimální inhibiční koncentrace byla tedy vyhodnocena koncentrace 0,1%.

Olej z rostliny *E. caryophyllus* (HŘ) je neúčinnější v koncentraci 0,1%. V další koncentraci 0,08 % se jeho účinnost snížila na 80 % a v dalších nižších koncentracích účinnost nebyla zaznamenána vůbec. Minimální inhibiční koncentrace oleje z *E. caryophyllus* proti *Botrytis cinerea* je tedy 0,1 %.

*T. vulgaris* (TV) vykazuje největší účinnost (100 %) pouze v koncentraci 0,1 %. V dalších koncentracích nebyla jeho účinnost zaznamenána. Minimální inhibiční koncentrace oleje z *Thymus vulgaris* proti *B. cinerea* je tak 0,1 %.

**Tabulka 3. Vyhodnocení účinnosti esenciálních olejů v % pro jednotlivé koncentrace proti *Sclerotinia sclerotiorum* v porovnání s kontrolou.**

koncentrace es. oleje v %	Inhibiční účinek esenciálních olejů v %			
	CC	HŘ	LC	TV
0,10	100	100	100	100
0,08	100	0	100	100
0,06	80	0	100	100
0,04	90	0	20	0
0,02	40	0	0	0

V tabulce je vyjádřena průměrná procentuální účinnost oleje ze všech deseti opakování. *C. citratus* (CC) je naprosto spolehlivě nejúčinnější v koncentraci 0,1 % i 0,08 %. Tuto koncentraci tedy můžeme považovat za minimální inhibiční koncentraci proti *Sclerotinia sclerotiorum*. V koncentraci 0,06 % byla zaznamenána účinnost pouze 80 %, ale tato koncentrace je stále dostatečná, protože v koncentraci 0,04 % esenciálního oleje je jeho účinnost stále vysoká. Nejnižší účinnost byla zaznamenána v koncentraci 0,02 %. U rostliny *E. caryophyllus* (HŘ) byla zaznamenána 100 % účinnost pouze při koncentraci 0,1 %. Tato koncentrace je tedy stanovena jako minimální inhibiční koncentrace oleje z *E. caryophyllus* proti *S. sclerotiorum*.

Olej z *L. cubeba* (LC) vykazuje 100% inhibiční účinek v koncentraci 0,1, 0,08 i 0,06 %. Při koncentraci 0,04 % se účinnost oleje snížila na 20 %. Proto byla jako nejnižší inhibiční koncentrace u oleje z *Litsea cubeba* určena proti *S. sclerotiorum* koncentrace 0,06 % proti.

Posledním účinným olejem (z vybraných olejů pro tuto práci) proti *S. sclerotiorum* byl esenciální olej z *T. vulgaris*, který je, stejně jako olej z *L. cubeba*, nejúčinnější v koncentraci 0,1, 0,08 a 0,06 %. V dalších nižších koncentracích nebyla jeho účinnost zaznamenána a nárůst mycelia byl tedy 100 %. Za minimální inhibiční koncentraci esenciálního oleje z rostliny *T. vulgaris* proti *S. sclerotiorum* můžeme tedy označit koncentraci 0,06 %.

**Tabulka 4. Vyhodnocení účinnosti esenciálních olejů v % pro jednotlivé koncentrace proti *Leptosphaeria maculans* v porovnání s kontrolou.**

koncentrace es. oleje v %	Inhibiční účinek esenciálních olejů v %		
	CC	HŘ	TV
0,10	100	100	100
0,08	100	100	100
0,06	80	100	99
0,04	50	100	62
0,02	40	0	0

Výsledky v tabulce č. 4 opět značí průměrnou procentuální účinnost olejů ze všech deseti opakování. Olej z *C. citratus* (CC) vykazoval nejvyšší možnou účinnost v koncentraci 0,1 a 0,08 %. V koncentraci 0,06 % se aktivita oleje mírně snížila na 80 %. V dalších koncentracích se účinnost oleje opět snížila. V koncentraci 0,04 % byla účinnost oleje 50 % a v koncentraci 0,02 % byla zaznamenána pouze 40% účinnost. Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace oleje z *C. citratus* proti *L. maculans* tedy může být stanovena koncentrace 0,08 %.

U oleje z rostliny *E. caryophyllus* byla zaznamenána 100 % inhibiční účinnost při koncentraci 0,1, 0,08, 0,06 i 0,04 %. Při koncentraci 0,02 % nebyla zaznamenána žádná účinnost oleje. Minimální inhibiční koncentrace může být tedy u oleje z *E. caryophyllus* proti *L. maculans* označena koncentrace 0,04%.

Esenciální olej z rostliny *T. vulgaris* vykazoval nejvyšší 100% účinnost v koncentraci 0,1% a 0,08%. Koncentrace 0,06% by se také dala označit za 100%, ovšem v koncentraci 0,04% účinnost oleje značně poklesla na 62 % a v koncentraci 0,02% nebyla zaznamenána žádná účinnost ani v jednom z opakování. Za minimální inhibiční koncentraci u oleje z *T. vulgaris* proti *L. maculans* může být tedy označena koncentrace 0,06 %.

## 6 Diskuze

Esenciální oleje jsou komplexy těkavých sloučenin, které můžeme izolovat z různých rostlin. Tyto oleje mají široce rozmanité vlastnosti. Jednou z těchto vlastností je obsah obranných látek proti některým škůdcům a původcům chorob rostlin. Jsou to tedy přírodní nepřátelé některých fytopatogenních organismů (Harrewijn et al., 2001).

Hadizadeh et al. (2009) tvrdí, že poptávka po potravinách vyrobených z plodin ošetřených pesticidy stále klesá. Veřejnost upřednostňuje plodiny, které nejsou ošetřovány klasickými pesticidy, ale jinými alternativními možnostmi ochrany. Tímto je vyvíjen stále větší tlak na vývoj těchto alternativních metod. Esenciální oleje, které jsou registrované jako potravinářsky čisté látky, by mohly být vhodnou alternativou k pesticidům.

Gogoi et al. (1997) se zabýval výzkumem antifungálních účinků oleje z rostliny *Litsea cubeba* v různých koncentracích proti *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternata* a *Aspergillus niger*. Jeho výsledky odhalily, že v podmínkách *in vitro* je olej z *Litsea cubeba* účinný na všechny tyto patogeny. V této práci byl olej z *Litsea cubeba* testován na *Botrytis cinera*, *Sclerotinia sclerotiorum* a *Leptosphaeria maculans*. Jeho účinek byl prokázán pouze na *Sclerotinia sclerotiorum*. Nejnižší koncentrace s účinností 100 % byla stanovena na 0,06 %.

Účinností oleje z rostliny *Mentha spicata* se zabývali Singh et al. (1994), kteří tento olej testovali proti *Fusarium oxysporum*. Jejich výsledky prozradily vysokou aktivitu tohoto oleje. Pokusy byly prováděné přímo na hostitelské rostlině a jejich semenech a bylo zjištěno, že olej neprokázal žádné nepříznivé účinky. Tento výzkum by tak mohl mít zásadní vliv při budoucím vývoji fungicidů na základě esenciálních olejů. V této práci se antifungální účinky oleje z *Mentha spicata* neprokázali ani na jednom z testovaných patogenů a to ani v nejvyšší zvolené 0,1% koncentraci.

Kumar et al. (2007) zveřejnili svoji studii, kde se zabývali různými vonnými silicemi v účinnosti proti *Aspergillus flavus*. Ze všech zkoumaných olejů prokázal nejvyšší antifungální účinek olej z *Thymus vulgaris*. Olej z této rostliny prokázal i účinky proti *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* a *Botryodiplodia theobromae*. Olej z *Thymus vulgaris* obsahující hlavně thymol by tak mohl být potenciálně využit v ochraně rostlin. V této práci

byl olej z *Thymus vulgaris* jedním z neúčinnějších esenciálních olejů a jeho účinky se prokázaly proti všem třem sledovaným patogenům a u některých i v nižší koncentraci 0,06 %.

Olej z *Eugenia caryophyllus* zkoumal i Thobunluepop (2009), který testoval antifungální účinky tohoto oleje na fytopatogenní houby *Alternaria solani*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium moniliforme* a *Rhizoctonia solani*. Ve svých *in vitro* testech prokázal silné antifungální účinky a to hned proti všem čtyřem zkoumaným patogenům. I v této práci se olej z *Eugenia caryophyllus* prokázal jako účinný a to především díky eugenolu, který obsahuje. V této práci je olej z *Eugenia caryophyllus* účinný proti všem třem sledovaným patogenům a to i v nižších koncentracích. Proto by bylo vhodné zkoumat dál jeho antifungální účinky i na jiné fytopatogenní organismy, popřípadě zkoumat tento esenciální olej také na jeho nežádoucí účinky, kvůli kterým by v budoucnu nemohl být použit jako botanický pesticid.

V mnoha publikacích se s esenciálními oleji pracuje také jako s insekticidy. Jednou z takových je i publikace Sea et al. (2009), kteří testovali insekticidní účinky esenciálních olejů. Do výzkumu bylo zařazeno celkem 26 různých druhů rostlin, mezi kterými se objevil i olej z *Pelargonium graveolens* a *Litsea cubeba*. Tyto oleje byly testovány svými účinky proti Japonským termitům. Ale testy popsané v tomto dokumentu si zaslouží další studium jako potenciální insekticidy proti termitům, protože některé látky z těchto olejů se zdály být toxické. Právě tato toxicita může představovat silné omezení ve využití esenciálních olejů a probíhá mnoho výzkumů na zjištění reálného rizika pro konzumenta.



## 7 Závěr

- Pro celkové zhodnocení antifungálních účinků vybraných esenciálních rostlin na tři vybrané patogeny byly použity *in vitro* testy, které u některých z olejů prokázaly vysoké antifungální účinky.
- Pro pokus byly izolovány tři patogeny – *Botrytis cinerea* ze zelí hlávkového (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *alba* DC. Ranos), *Leptosphaeria maculans* z listů čínského zelí (*Brassica chinensis* L.) a *Sclerotinia sclerotiorum* z napadených kořenů mrkve (*Dacus carota* subs. *sativus*).
- V první fázi byly zkoumány esenciální oleje získané z dvanácti rostlinných druhů (*Palergonium graveolens*, *Eucalyptus citriodora*, *Mentha spicata*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus*, *Eugenia caryophyllus*, *Foeniculum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Litsea cubeba*, *Pimpinella anisum*, *Salvia officinalis*, *Thymus vulgaris*) v 0,1% koncentraci na všechny tři patogeny. Byla stanovena inkubační doba dle nárůstu mycelia na kontrolních variantách, na které nebyl použit žádný esenciální olej. Jako úspěšné tedy účinné oleje byly vyhodnoceny oleje vykazující 100% inhibiční účinek na růst mycelia patogenů. Jednalo se o esenciální oleje z rostlin *Cymbopogon citratus*, *Eugenia caryophyllus*, *Litsea cubeba* a *Thymus vulgaris*.
- V druhé fázi byla u účinných esenciálních olejů stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) na základě zvolených koncentračních řad esenciálních olejů. U izolátu *Botrytis cinerea* byla MIC pro *Cymbopogon citratus* (CC) i pro *Eugenia caryophyllus* (EC) stanovena na 0,1 % a pro *Thymus vulgaris* na 0,1 %. U patogena *Sclerotinia sclerotiorum* byla MIC pro olej z *Litsea cubeba* (LC) a *Thymus vulgaris* (TV) stanovena na 0,06 %. U *Cymbopogon citratus* (CC) byla MIC stanovena na 0,08 % a u *Eugenia caryophyllus* (HŘ) na 0,1%. U izolátu *Leptosphaeria maculans* byla jako MIC pro olej z *Cymbopogon citratus* stanovena koncentrace 0,08 %, pro olej z *Eugenia caryophyllus* 0,04 % a pro olej z *Thymus vulgaris* 0,06 %.

## Literární zdroje

Ackermann P., Talich P., Řehák V., Kocourek F., (eds.). 2013. Metodická příručka integrované ochrany rostlin proti chorobám, škůdcům a plevelům. Praha: Česká společnost rostlinolékařská, 360 s. ISBN 978-80-02-02480-4

Adebayo, O., Dang, T., Bélanger, A., Khanizadeh, S. 2013. Antifungal studies of selected essential oils and a commercial formulation against *Botrytis cinerea*, Journal of food research; Vol. 2, No. 1

Adiguzel, A., Ozer, H., Kilic, H., Cetin, B. 2007. Screening of antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* on foodborne bacteria and fungi. Czech J. food sci., 25: 81-98.

Bacílková, B., Paulusová, H. 2012. Vliv silic a jejich hlavních účinných látek na mikroorganismy a na archivní materiál. Národní archiv. Oddělení péče o fyzický stav archiválií. 28 s.

Baser, K. H. C., Buchbauer, G. 2010. Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press, Taylor and Francis Group. 994 p.

Bremness, L. 1994. Bylinář: zdraví, krása a radost. 1. vyd. Praha: Fortuna Print, 286 s. ISBN 80-85873-00-1.

Buchwaldt, L. 2007. Sclerotinia White Mold (Cabbage Drop, Stem Rot, Watery Soft Rot). P. 43-47. In: Rimmer, S. R., Shattuck, V. I., Buchwaldt, L.: Compendium of Brassica Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, 117 p.

Buchwaldt, L., Rimmer, S. R. 2007. Botrytis Gray Mold. P. 24-25. In: Rimmer, S. R., Shattuck, V. I., Buchwaldt, L.: Compendium of Brassica Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, 117 p.

Carta C., Moretti M. D. L., Peana A. T. 1996. Activity of the Oil of *Salvia officinalis* L. against *Botrytis cinerea*. *Journal of essential oil research*, 8: 399–404.

Daferera, D. J., Ziogas B. N., Polissiou, M. G. 2002. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis*. *Crop protection* 22: 39-44.

Dang, Q., Lim, Ch.H., Kim, J.-Ch. 2012. Current status of botanical pesticides for crop protection. *Res. Plant Dis.* 18(3) : 175–185.

Farrer-Halls, G., 2005. *The aromatherapy bible: the definitive guide to using essential oils*. New York: Sterling Pub. Co, 400 p. ISBN 1402730063

Fillnerová, 6/2009, *Potravinářská revue*, Schaller Lebensmitteltechnik, spol. s.r.o. Wiberg GmbH, 41 s.

Flowerdew, B., 2012. *Simple green pest and disease control*. New York: Skyhorse Pub., 112 p. ISBN 9781616086343

Germann, G., Germann, P., 2013. *Rostliny pro aromaterapii: 90 vonných rostlin, jejich znaky a způsob využití*. 1. vyd. Praha: Grada, 216 s. ISBN 978-80-247-4672-2

Gogoi, P., Baruah, P., Nath., S. C. 1997. Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* Pers. *Journal of Essential oil research*. 9 (2): 213-215.

Hadizadeh, I., Peivastegan, B., Hamzehzarghani, H. 2009. Antifugal activity of essential oils from some medicinal plants of Iran against *Alternaria alternate*. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (5):857-861.

- Harrewijn, P., van D. A. M. Oosten, and P. G. M. Piron, 2001. Natural terpenoids as messengers. A multidisciplinary study of their production, biological functions and practical applications. 90 (2):299-300.
- Kazda, J. Mikulka, J. Prokinová, E. 2010. Encyklopedie ochrany rostlin. Profi Press s.r.o. Praha. 399 s. ISBN: 978-80-86726-34-2
- Korbelář, J., Endris, Z., 1970. Naše rostliny v lékařství. 3., rozš. a přeprac. vyd. Praha: Avicenum, 495 s.
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Sekhar, Ch., Nawal, P., Dubey, K., 2008. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. Innovative food science & emerging technologies, 9(4): 577-580.
- Kůdela, V., Kocourek, F., Bárnet, M. 2012. České a anglické názvy chorob a škůdců rostlin. Česká akademie zemědělských věd, Odbor rostlinolékařství, 272 s. ISBN 978-80-905080-4-0
- Nebovidský, J., Kočí, K., (ed.). 1925. Silice, či, Oleje eterické: jich původ, výroba a upotřebení v praxi. Praha: Vlastním nákladem redaktora Karla Kočího. Knihovna časopisu Československý mydlář a voňavkář, sv. I.
- Pavela, R., 2011. Rostlinné pesticidy. 43. díl, máta - rostlina vhodná nejen do čaje. Agromanuál. 6 (1). 26 s.
- Prasad, N. M. N., Bhat, S. S., Sreenivasa, M. Y. 2010. Antifungal activity of essential oils againsts *Phomopsis azadirachtae* – the causative agent of die-back disease of neem. Journal of agricultural technology 6(1): 127-133.
- Prokinová, E., 2003. Choroby řepky význam v ČR a ochrana proti nim, Katedra ochrany rostlin, Česká zemědělská univerzita

Rimmer, S. R., van den Berg, C. G. J. 2007. Black leg (Phoma stem canker). P. 19-21. Compendium of Brassica Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota, 117 p.

Seo, SM., Kim, J., Lee, SG., Shin, CH., Shin, SC., Park, IK., Pak, J., 2009. Fumigant antitermitic activity of plant essential oils and components from Ajowan ( *Trachyspermum ammi* ), Allspice ( *Pimenta dioica* ), caraway ( *Carum carvi* ), dill ( *Anethum graveolens* ), Geranium ( *Pelargonium graveolens* ), and Litsea ( *Litsea cubeba* ) oils against Japanese termite ( *Reticulitermes speratus* Kolbe). 12 (16):1119-26.

Silva, MR., Ximenes, RM., da Costa, JG., Leal, LK., de Lopes, AA., Viana, GS. 2010. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. / Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol ;381 (5):415-26.

Surviliene, E., Valiuškaite, A., Snieškiene, V., Stankevičiene, A. 2009. Effect of essential oils on fungi osolated froma apples and vegetables. Scientific works of the lithuanian institute of horticulture and lithuanian university of agriculture. Sodininkyste ir daržininkyste: 28 (3).

Svojtka a Co., 2008. Léčivé bylinky a esence: zdraví a harmonie z přírody. 1. české vyd. Praha, 96 s. ISBN 978-80-7352-886-7

Thobunluepop, P., 2009. Implementation of bio-fungicides and seed treatment in organic rice cv. KDML 105 farming. Pakistan journal of biological sciences. 12 (16):1119-26.

Valíček, P., Hlava, B., Holubová, K., Hušák, S., Kokoška, L., Matějka, V., Michl, J., Pavel, L., Polesný, Z., Wróblewská, E., Zelený V. 2002. Užitkové rostliny tropů a subtropů. Academia. 486 s. ISBN: 80-200-0939-6

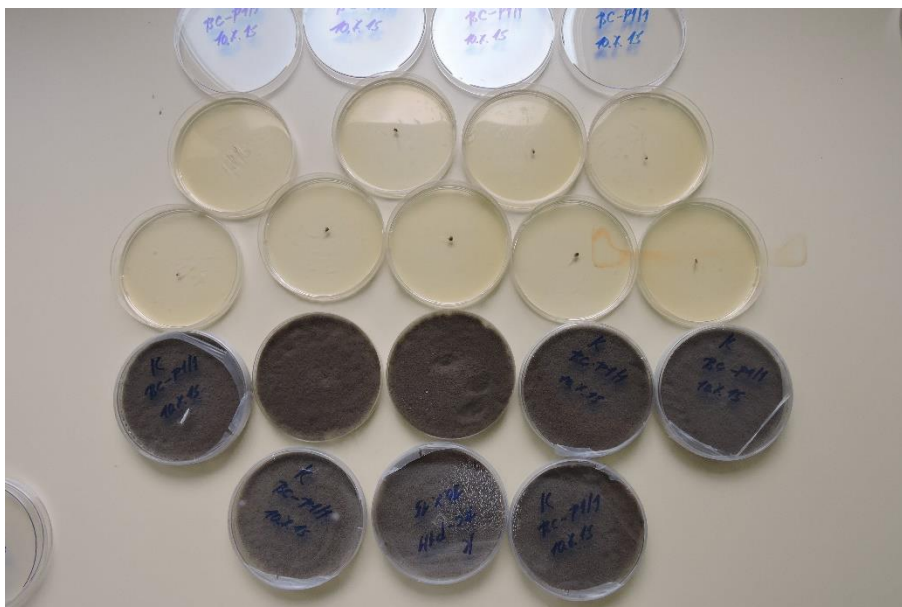
Vermeulen, N. 2001. Encyklopedie bylin a koření. 2. vyd. Čestlice: Rebo, 319 s. ISBN 80-7234-169-3

Wojtowicz, D., 2004. Bylinky z vlastní zahrady. Vyd. 1. Brno: Computer Press,. Abeceda české zahrady (CP Books), 72 s. ISBN 80-251-0240-8

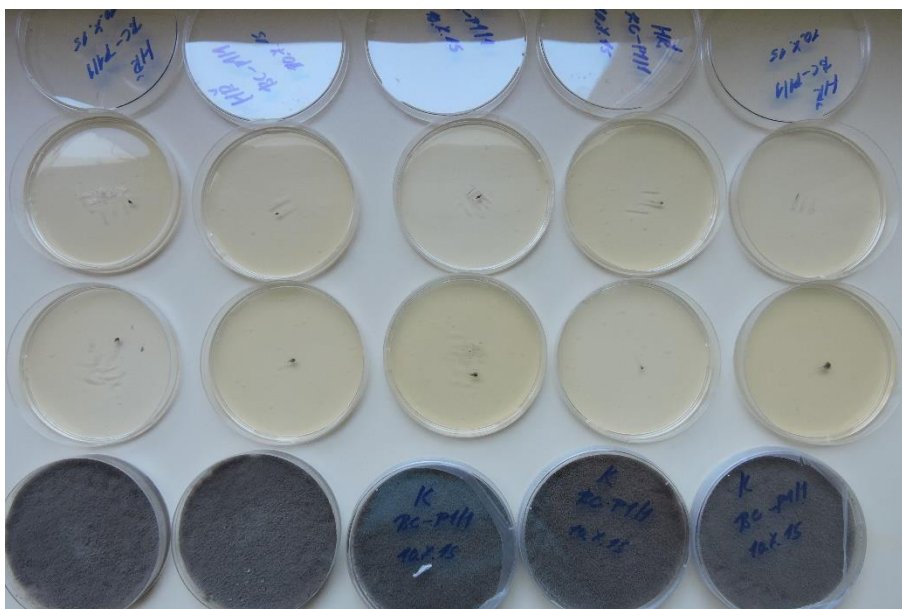
Jahodář, *Eugenia aromatica*/ hřebíčkovec vonný, [online], [citace 6. 2. 2016 ]. Dostupné z <http://www.avicenna.cz/item/eugenia-aromatica-hrebickovec-vonny>

Index Fungorum Partnership, 2016. Index Fungorum [oline], [citace 6. 4. 2016]. Dostupné z <http://www.indexfungorum.org/>

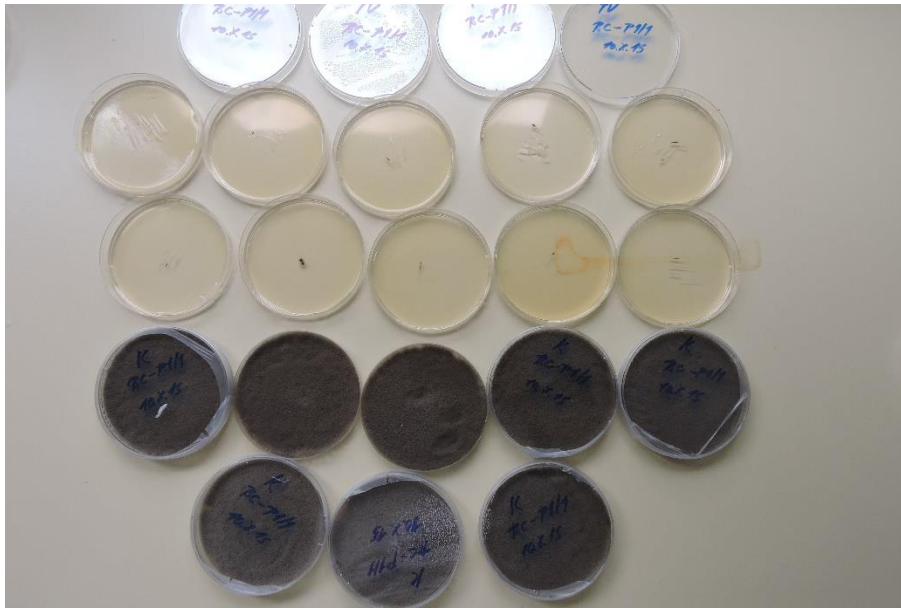
## Přílohy



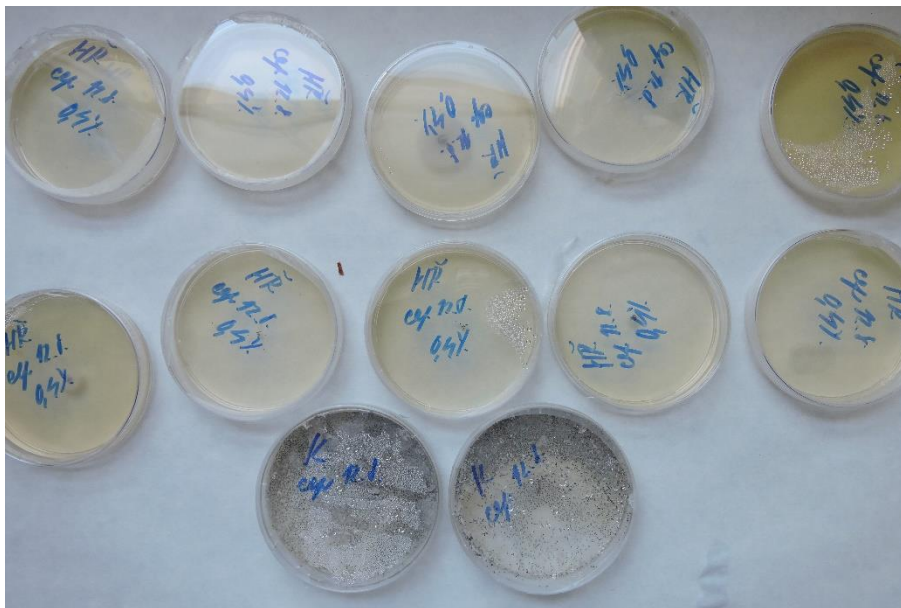
Obrázek 4: Test vlivu esence z *Cymbopogon citratus* na *Botrytis cinerea* v koncentraci 0,1% v deseti opakováních a ve srovnání s kontrolou



Obrázek 5: Test vlivu oleje z *Eugenia caryophyllus* na *Botrytis cinerea* v koncentraci 0,1 % v deseti opakováních a ve srovnání s kontrolou.

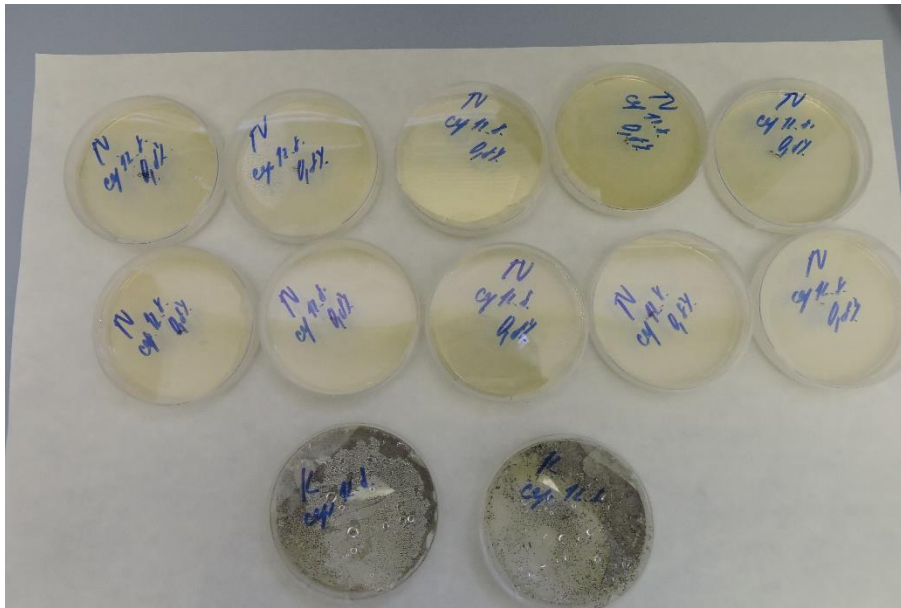


Obrázek 6: Test vlivu oleje z *Thymus vulgaris* na *Botrytis cinerea* v koncentraci 0,1% v deseti opakováních a ve srovnání s kontrolou

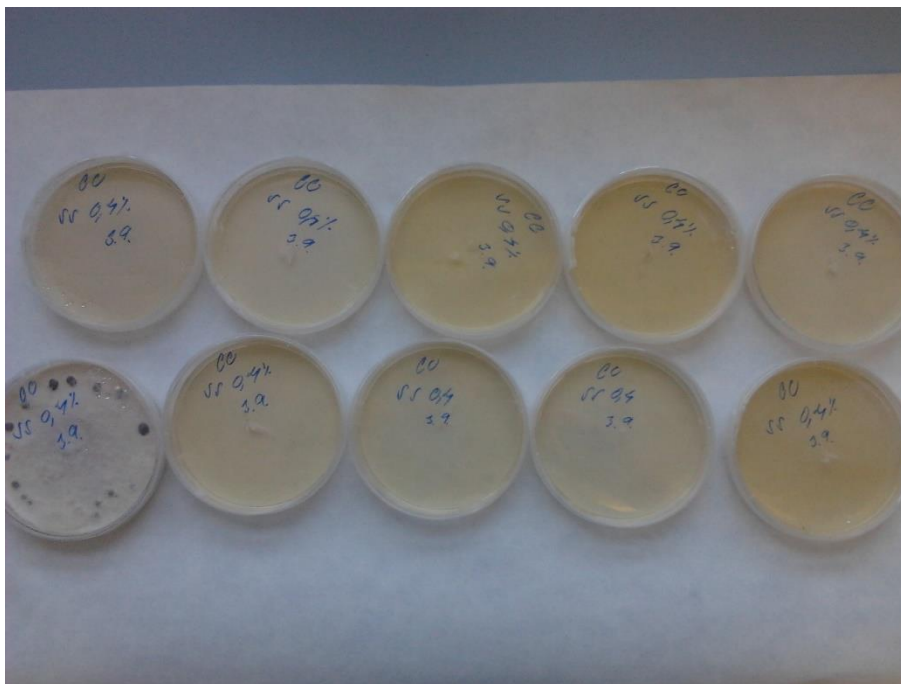


Obrázek 7: Test vlivu oleje z *Eugenia caryophyllus* na *Leptosphaeria maculans* v koncentraci 0,04 % v deseti opakováních a ve srovnání s kontrolou.





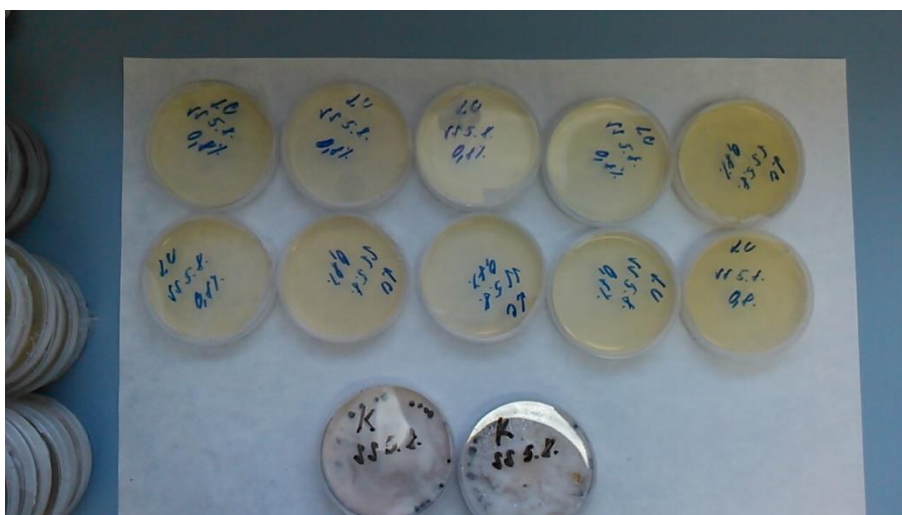
Obrázek 8: Test vlivu oleje z *Thymus vulgaris* na *Leptosphaeria maculans* v koncentraci 0,08 % v deseti opakováních a ve srovnání s kontrolou.



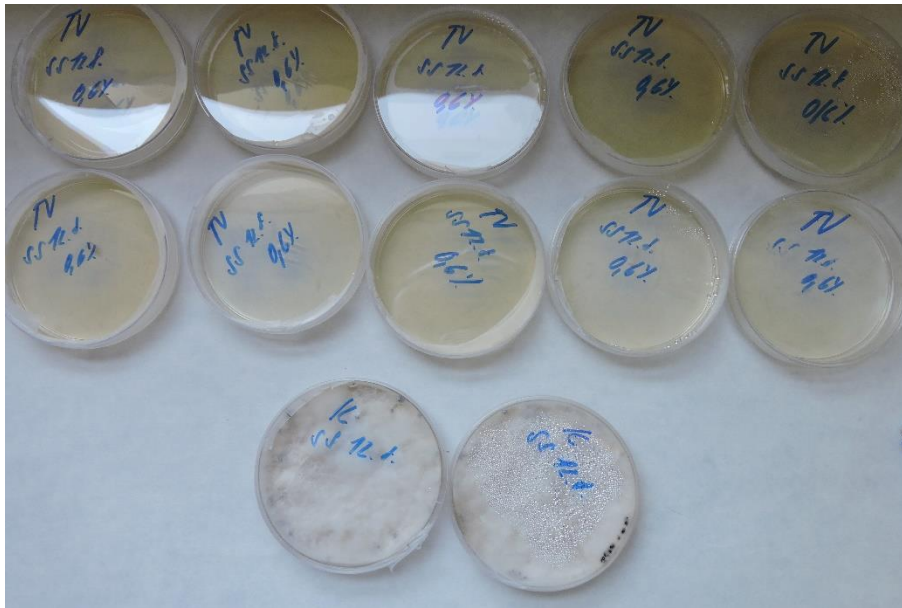
Obrázek 9: Test vlivu oleje z *Cymbopogon citratus* na *Sclerotinia sclerotiorum* v koncentraci 0,08 % v deseti opakováních.



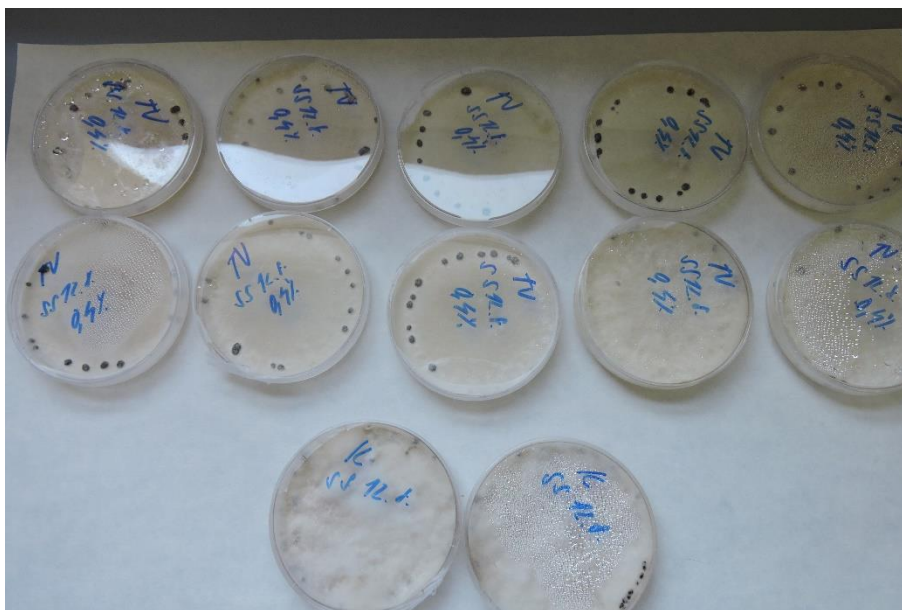
Obrázek 10: Test vlivu oleje z *Eugenia caryophyllus* na *Sclerotinia sclerotiorum* v koncentraci 0,1 % v deseti opakování a ve srovnání s kontrolou.



Obrázek 11: Test vlivu oleje z *Litsea cubeba* na *Leptosphaeria maculans* v koncentraci 0,08 % v deseti opakování a ve srovnání s kontrolou.



Obrázek 12: Test vlivu oleje z *Thymus vulgaris* na *Leptosphaeria maculans* v koncentraci 0,06 % v deseti opakování a ve srovnání s kontrolou.



Obrázek 13: Test vlivu oleje z *Thymus vulgaris* na *Leptosphaeria maculans* v koncentraci 0,04 % v deseti opakování a ve srovnání s kontrolou.