

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra ochrany rostlin**



**Vliv esenciálních olejů na původce strupovitosti  
jabloní**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Kristýna Balážová**

**Obor studia: Zahradnictví**

**Vedoucí práce: Ing. Marie Maňasová, Ph.D.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv esenciálních olejů na původce strupovitosti jabloní" 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 datum odevzdání \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Marii Maňasové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce za její odborné vedení, ochotu, vstřícnost a věcné rady. Dále také Ing. Miloslavu Zouharovi, Ph.D. a Ing. Janě Wenzelové za pomoc a praktické rady při realizaci pokusů. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině, za podporu při studiu a psaní této práce.

## Souhrn

Bakalářská práce se věnuje výzkumu vlivu esenciálních olejů na původce strupovitosti *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., jehož nejčastějším hostitelem jsou jabloně. Patogen znehodnocuje především plody a při silnějším napadení dokáže narušit i vitalitu celých rostlin. Strupovitost tak patří v současné době mezi jednu z nejzávažnějších houbových chorob, která postihuje jabloně, jak ve světové, tak i domácí produkci.

V literárním přehledu se práce zabývá obecně problematikou strupovitosti jabloní, její škodlivostí, příznaky, morfologií a životním cyklem. Práce se také zabývá problematikou esenciálních olejů, jejich účinnosti, metodami extrakce a možného využití v ochraně rostlin.

V praktické části bakalářské práce bylo testováno celkem 13. esenciálních olejů z rostlin jako: *Mentha Spicata*, *Litsea Cubeba*, *Cymbopogon Citratus*, *Cymbopogon winterianus*, *Pelargonium graveolens*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Eugenia Caryophyllus*, *Cinnamomum ceylanicum*, *Cynamomum camphora*, *Origanum majorana* a *Lavandula hybrida*, které byly použity na několik izolátů *V. inaequalis* v *in vitro* podmínkách. Samotný vliv těchto 13-ti esenciálních olejů byl sledován u klíčení konidií a růstu mycelia. Z části byla také testována fytotoxicita esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* o různých koncentracích (1-9%). Poškození na listech jabloní se projevilo až od koncentrace 3%.

V rámci vlivu esenciálních olejů na klíčení konidií *V. inaequalis*, nejlepších výsledků dosahovaly esenciální oleje z rostlin *Eugenia caryophyllus* a *Thymus vulgaris*, které statisticky výrazně zvyšovaly mortalitu při klíčení spor. Olej z *Eugenia caryophyllus*, byl dokonce účinnější než známý fungicid Talent. Co se týče vlivu esenciálních olejů na růst mycelia *V. inaequalis*, nejlepších výsledků jasně vykazoval olej z *Eugenia caryophyllus*. U ostatních olejů byl vykazován menší či větší vliv na růst mycelia *V.i.*

**Klíčová slova:** *Venturia inaequalis*, strupovitost jabloní, ochrana rostlin, jabloně, esenciální oleje

## Impact of essential oils on the Apple scab

### Summary

Bachelor thesis is devoted to research of the effect of essential oils on the causative agent of apple scab *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., whose most common hosts are apple trees. Pathogen *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. degrades especially fruits and with higher contamination could even disrupt vitality of entire plants. Apple scab is currently one of the most serious fungal diseases affecting apples, both in the global and domestic production.

The literature review of this thesis deals with the general problems of apple-scab: its harmfulness, symptoms, morphology and life cycle. Further the thesis deals with matters of essential oils, their efficiency, methods of extraction and potential use in plant protection.

In the practical part of this bachelor's thesis were tested in total of 13 essential oils from plants, such as: *Mentha Spicata*, *Litsea Cubeba*, *Cymbopogon Citratus*, *Cymbopogon winterianus*, *Pelargonium graveolens*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Eugenia Caryophyllus*, *Cinnamomum ceylanicum*, *Cynamomum camphora*, *Origanum majorana* a *Lavandula hybrida*, which were used for a several isolates of *V. inaequalis* in vitro conditions. The actual impact of these thirteen essential oils has been studied in conidial germination and mycelial growth. The phytotoxicity of *Thymus vulgaris*'s essential oil was partially tested at various concentrations (1-9%). Apple-leaf harmful effect was manifested at concentration of 3% and higher.

Within the influence of essential oils on the germination of conidia of *V. inaequalis* the best results reached the essential oils from plants *Eugenia caryophyllus* and *Thymus vulgaris*, which statistically significantly increased the mortality of the spore during germination. The oil from *Eugenia caryophyllus* was even more effective than the known fungicide the Talent. Regarding the effect of essential oils on the mycelial growth of *V. inaequalis* the best results clearly showed a *Eugenia caryophyllus* oil. For other oils was reported greater or lesser influence on the growth of mycelium *V.i.*

**Keywords:** *Venturia inaequalis*, apple-scab, plant protection, apple-tree, essential oils

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Vědecká hypotéza a cíl práce</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Literární přehled</b> .....	<b>4</b>
3.1. Charakteristika rodu <i>Malus</i> .....	4
3.1.1. Botanické rozdělení .....	5
3.1.2. Původ a rozšíření .....	6
3.1.3. Popis .....	7
3.2. Původce strupovitosti jabloně – <i>Venturia Inaequalis</i> (Cke.) WINT. ....	7
3.2.1. Morfologie .....	8
3.2.2. Vývojový cyklus patogena .....	9
3.2.3. Příznaky onemocnění.....	11
3.3. Ochrana proti strupovitosti jabloní.....	12
3.3.1. Nepřímá ochrana.....	12
3.3.2. Chemická ochrana .....	12
3.3.2.1 <i>Kontaktní fungicidy</i> .....	13
3.3.2.2 <i>Systémové fungicidy</i> .....	13
3.3.2.3. <i>Genetická ochrana (rezistentní šlechtění)</i> .....	14
3.3.2.4. <i>Biologická ochrana a pomocné prostředky</i> .....	14
3.4. Esenciální oleje.....	15
3.4.1. Výskyt.....	15
3.4.2. Složení a vlastnosti .....	15
3.4.3. Účinky esenciálních olejů.....	16
3.4.3.1. <i>Antibakteriální účinky</i> .....	16
3.4.3.2. <i>Fungicidní účinky</i> .....	17
3.4.4. Způsoby extrakce.....	17
3.4.4.1. <i>Hydrodestilace</i> .....	17

3.4.4.2. Destilace s vodní parou.....	18
3.4.4.3. Lisování za studena.....	18
3.4.4.4. Enfleuráž.....	18
3.4.4.5. Extrakce organickými rozpouštědly.....	19
3.4.4.6. Superkritická fluidní extrakce (SFE).....	19
<b>4. Materiál a metody .....</b>	<b>20</b>
4.1. Biologický materiál .....	20
4.2. Příprava esenciálního oleje na zkoušku fytoxicity.....	21
4.3. Test na fytoxicitu.....	21
4.4. Příprava esenciálního oleje na zkoušku fytoxicity.....	22
4.5. Příprava naředěného talentu pro pokus .....	22
4.6. Příprava emulzí esenciálních olejů s adjuvantem (DMSO) .....	22
4.7. Složení a příprava pevného kultivačního media potato dextrose agar (PDA) ...	22
4.8. In vitro test na klíčení konidií.....	23
4.9. In vitro test na růst mycelia <i>Venturia inaequalis</i> .....	23
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>24</b>
5.1. Fytotoxické působení .....	24
5.2 Vliv esenciálních olejů na klíčení spor.....	24
5.3 Vliv esenciálních olejů na růst mycelia.....	26
<b>6. Diskuse .....</b>	<b>37</b>
<b>7. Závěr .....</b>	<b>39</b>
<b>8. Bibliografie .....</b>	<b>40</b>
<b>9. Seznam grafů .....</b>	<b>47</b>
<b>10. Seznam obrázků .....</b>	<b>48</b>
<b>11. Seznam tabulek .....</b>	<b>49</b>
<b>13. Přílohy .....</b>	<b>50</b>

## 1. Úvod

Ovocnářství má u nás dlouholetou tradici a jabloně, jsou tak bezesporu nejpěstovanějším ovocem u nás, a to především díky příznivým pěstitelským podmínkám. Jablka mají vysokou nutriční hodnotu a stále jsou pro české konzumenty číslem jedna, jak mezi tuzemským, tak i exotickým ovocem. Základem pro úspěšné pěstování jabloní jsou intenzivní výsadby, které potřebují celoroční péči (zpracování půdy, výživa a hnojení, řez, chemická ochrana proti chorobám a škůdcům atp.) aby tím bylo dosaženo každoročních pravidelných a kvalitních výnosů.

Strupovitost jabloní, jejímž původcem je houba *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., je jednou z nejzávažnějších a nejrozšířenějších chorob jabloní po celém světě i u nás. Většina nejpěstovanějších odrůd jabloní je více či méně náchylná ke strupovitosti, což způsobuje značné ekonomické ztráty napadením plodů. Udržení této choroby pod kontrolou s sebou naopak nese velké ekonomické náklady, a to především na pořízení chemických prostředků používaných proti této chorobě, jakož i náklady spojené s aplikací těchto prostředků. Některé sady vyžadují 15 až 20 aplikací fungicidních přípravků proti strupovitosti za rok. Díky častým aplikacím během sezóny, se tak průměrné roční náklady na ošetření pohybují kolem 5 000,- Kč na hektar. Navíc používání chemických prostředků nemusí být vždy zcela efektivní, což záleží především na průběhu počasí během daného roku. Negativní stránkou při používání chemické ochrany je kontaminace životního prostředí škodlivými cizorodými látkami a přítomnost reziduí pesticidů v plodech. A nejenom to, další riziko, které hrozí při jednostranném používání skupin fungicidů, je vytvoření rezistence na účinné látky.

Proto je v dnešní době vyvíjen tlak na výzkum možných alternativ, které by byly šetrnější k životnímu prostředí a tím vhodnější pro nízkoreziduální produkci jablek a zároveň by vykazovaly uspokojující účinky v boji proti strupovitosti.

Esenciální oleje jsou sekundárními metabolity, které jsou součástí obranného mechanismu rostlin. Jejich antimikrobiální a antimykotické účinky jsou známy již od starověku. Ale až tak v posledních 20 letech se shromažďuje čím dál více informací o jejich možných účincích a biologických funkcích a jsou tak utvářena komplexnější a aktuálnější data, která poukazují na dobré účinky olejů. Převážně se jedná o oleje *Thymus vulgaris* a *Eugenium caryophyllus*, které vykazují nejlepších účinků proti patogenu *Venturia inaequalis* v in vitro podmínkách, zvláště pak na inhibiční účinky na klíčení spor a růstu mycelia. Jedná



se tak možná o budoucí obohacení či možnou alternativu ochrany jabloní v integrované či ekologické produkci a tím, převedení z in vitro testů do běžné ovocnářské praxe.

## **2. Vědecká hypotéza a cíl práce**

**Vědecká hypotéza:** Existují rostlinné esence, které při aplikaci mají přímý dopad na vývoj patogena jabloní *Venturia inaequalis*.

**Cíl práce:** Cílem práce je otestovat vliv vybraných esenciálních olejů na vývoj patogena jabloní *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.

### 3. Literární přehled

#### 3.1. Charakteristika rodu *Malus*

Z botanického hlediska patří jabloně (rod *Malus* MILL.) do řádu *Rosales* a z pomologického hlediska se řadí jabloně k ovoci jádrovému. Úplné zařazení v rostlinné říši je následující:

**Říše:** rostliny (*Plantae*)

**Podříše:** cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)

**Oddělení:** krytosemenné (*Magnoliophyta*)

**Třída:** vyšší dvouděložné (*Rosopsida*)

**Podtřída:** (*Rosidae*)

**Řád:** růžotvaré (*Rosales*)

**Čeleď:** jabloňovité (*Malaceae*)

**Rod:** jabloň (*Malus*)

(Dvořák et al., 1976)

Velká většina kulturních odrůd u nás pěstovaných patří k druhu *M. pumila* MILL. a vznikla složitou hybridizací *M. silvestris* MILL. a některých dalších druhů jabloní rostoucích planě v Zakavkazí. Na vzniku evropských kulturních odrůd se podílely zejména druhy *Malus silvestris*, *M. pumila*, *M. prunifolia* Borkh., a pravděpodobně i *M. baccata*. (Dvořák et al. 1976). Při rezistentním šlechtění se používá jako zdroj rezistence proti strupovitosti *Malus floribunda* Sieb. (Dvořák et al. 1976).

Původ kulturních odrůd jabloní není přesně znám a také botanické třídění jabloní není jednotné. Doposud je popsáno cca 31 druhů jabloní čímž jen některé z nich mají význam v ovocnářství (Dvořák, 1987).

Ovšem jak uvádí Vejl et al. (2005), taxonomie zkoumaného rodu jabloní je složitá. Počet uváděných samostatných druhů závisí na autorovi a pohybuje se mezi 11 až 36 druhy. Tyto nesrovnalosti jsou způsobeny tvorbou mezidruhových kříženců, které někteří autoři považují za samostatné druhy.

Systematika rodu *Malus* Mill. Není jednotná, příčinou je značný polymorfismus většiny jabloňových druhů (Dvořák et al., 1976). Systém podle Lichonose (1964) obsahuje 30 druhů jabloní. Jabloně rozděljuje na dvě sekce: *Calycomeles* – jabloně s kalichem neopadavým a *Gymnomeles* – jabloně s kalichem opadavým (Dvořák et al., 1976).

### 3.1.1. Botanické rozdělení

Jak je již zmíněné výše, dle Lichonose (1964) byl vytvořen systém dvou sekcí, do kterých, bylo zahrnuto 30 druhů jabloní. Zde je uveden zjednodušený systém rozdělení podle Boček, 2005):

- sekce *Calycomeles* – jabloně s kalichem neopadavým
- podsekce *Eumalus* – jabloně pravé (*M. silvestris* Mill., *M. pumila* Mill., *M. sieversii* M.Roem atd.), *Prunifoliae* – jabloně slivolisté (*M. prunifolia* Borkh., *M. mikromalus* Makino atd.), *Chloromeles* – jabloně zelenoplodé (*M. coronaria* Mill., *M. ioensis* Britt., atd.) a *Eriomeles* – jabloně s kamenčitými (sklerenchymatickými) buňkami (*M. formosana* Kawak et Koidz., *M. Prattii* Schemid.).
- Sekce *Gymnomeles* – jabloně s kalichem opadavým
- Podsekce *Baccatae* – jabloně drobnoplodé (*M. baccata* Borkh., *M. sikkimensis* Roem., *M. floribunda* Sieb. atd.) a *Sorbomalus* – jabloně jeřábovité, tj. jabloně s více nebo méně laločnatými listy (*M. sargentii* Rehd., *M. fusca* Schneid).

Lichonos (1964) ovšem také uvádí, že většina druhů zařazených do jeho systému má hybridní původ, nebo jsou botanickými varietami, či modifikacemi jiných druhů. Jeho názorem je, že skutečných základních druhů jabloní je pouze 11. Jak uvádí Blažek (2001) lze všechny kulturní pěstované odrůdy zařadit do hybridního druhu *Malus x domestica* Borkh.

### 3.1.2. Původ a rozšíření

Kulturní jabloně vznikly pravděpodobně někde v oblasti Zakavkazska, Íránu a západního Turkmenistánu. Odtud se jabloně dál šířily do Malé Asie, Řecka, Itálie a do ostatních částí Evropy (Dlouhá et al., 1995; Blažek et al., 1998).

Aldwinckle et al. (1976) uvádí, že druh jabloně domácí (*M. x domestica*) Borkh. je podle výsledků molekulárních analýz spojován s druhem *M. siversii*, který z něj vychází.

První dochované zmínky o pěstování jabloní je možné nalézt ve starém Řecku. Ve svých spisech se o nich zmiňuje filosof Theofrastos (asi roku 287 př. n. l.), který jablka rozlišoval na planá a kulturní, neboli městská, raná i pozdní, sladká, epirská (podle kraje Epiros) a Dionysova (Dvořák a Vondráček 1969; Dvořák et al., 1976).

Již v době starověkého Říma docházelo k systematickému šlechtění plodů. Například Cato roku 178 př. n. l., ve svém díle „De re rustica“, doporučoval pěstování jabloní. V roce 79 n.l., římský senátor Plinius ve svém díle „Historia naturalis“ (Přírodní jevy), popsal sedmáct odrůd jabloní, které byly vysazovány v Itálii. Římané už v té době obratně ovládali techniku roubování a šířili tak své odrůdy dále do Evropy, prostřednictvím svých válečných výprav, kdy nahrazovali nekulturní jabloně šířené pravděpodobně jen ze semen. Díky tomu bylo pěstování jabloní zavedeno i severně od Alp (kolem Rýna a Dunaje). Po úpadku Římské říše, tak rázem upadlo i ovocnářství (Dvořák a Vondráček 1969; Dvořák et al., 1976).

V Čechách se nejprve pěstovaly jabloně v klášterních zahradách a v zahradách selských, teprve za vlády Karla IV., došlo k velkému rozšíření ovocnářství a potom, až během 15. a 16. století. V té době byly popsány nové způsoby štěpování a začaly vznikat první ovocnářské knihy. V 17. století v oboru štěpování vynikl Čech Jiří Holík, jako vynálezce, který napsal o štěpování knihu, která vyšla roku 1684. a byla vydána ještě několikrát. V roce 1820 Vlastenecko-hospodářská společnost založila Pomologický spolek, který měl sdružovat řadu zasloužilých šlechtitelů i ovocnářů (Dlouhá et al., 1995; Blažek et al., 1998; Vejl et al. 2005).

### 3.1.3. Popis

Koblížek (2006) do rodu *Malus* zahrnuje opadavé stromy nebo statné keře, někdy trnité. Ovocná rostlina je velmi složitým rostlinným organismem. Má tři základní vegetační orgány: kořeny, stonek–kmen a větve s listy.

Listy jsou střídavé, jednoduché, celistvé, pilovité nebo peřenolaločnaté až peřenoklané, v pupenu svinuté nebo řasnaté, řapíkaté s palisty. Květy jabloně jsou oboupohlavné, různobalné, pětičetné, s 15–20 (až 50) tyčinkami a pestíkem srostlým většinou z 5 plodolistů, semeník pak srůstá s šešulí. Plodem u jabloně je malvice, která je tvořena semeníkem a částečně kalichem. Mázdřítý endokarp tvoří zpravidla pětípouzdrnou korunu semeníku (jádřinec) v jejíž v každé části je jedno, dvě, někdy i více semen (Blažek, 2001). Mezokarp je dužnatý, různých chuťových vlastností a jakosti. Exokarp má různě zbarvenou slupku s méně nebo více výraznými lenticelami (Dvořák, 1987).

### 3.2. Původce strupovitosti jabloně – *Venturia Inaequalis* (Cke.) WINT.

Choroba, která je způsobena houbou *Venturia inaequalis* CKE., je známá již z první poloviny 19. století. (Smejkal, 1992) Jako první ji popsal fytopatolog Fries ze Švédska roku 1819, s pozdějšími dodatky z roku 1932 (Sandskär, 2003; Turechek, 2004). Další zmínky o chorobě se poté šířily z Německa, Ameriky a jiných zemí (Benada a Špaček, 1962) V České republice i na celém světě je strupovitost jabloně („apple scab“) jednou z nejvýznamnějších houbových chorob. *Venturia inaequalis* se vyskytuje na jabloních, téměř na všech odrudách kulturních, především u jabloně domácí (*Malus domestica*), její výskyt lze však pozorovat i na některých okrasných formách. (Blažek a kol., 2001; Kúdela et al., 2012). Strupovitost jabloně se ale mimo rod *Malus* vyskytuje též u dalších rodů a to: *Crataegus* L., *Pyracantha* M. Roem. a u druhu *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindley (Hluchý a kol., 1997).

Mimo kořeny je houba schopna napadnout všechny ostatní orgány rostliny (Blažek a kol., 2001). Dle Xu et al. 2009 bývá *Venturia inaequalis* každoročním původcem epidemií po celém světě. McHardy (1996) uvádí, že houba způsobující strupovitost jabloně *Venturia inaequalis* CKE. není hrozbou pro život stromu jako takový, avšak svými účinky na plody, tedy jablka, působí značné škody a patří tak ke každoročnímu ohrožení hospodářských výsledků v odvětví sadovnictví. Dle Thakur et al. (2013), dokáží problémy se strupovitostí snížit výnosy ovoce až o 70 % a celkově jsou napadená jablka pro obchod nevhodná.

Houba dokáže přezimovat v opadaném listí a během vegetace se šíří především za vlhkého a deštivého počasí. Nejškodlivější jsou rané infekce, vyvolávající deformaci plodů. Napadené plody nejsou pro člověka zdravotně závadné, jak se někteří milně domnívají, poškozený je z větší části pouze vzhled plodu (Hudec and Gutten, 2007).

Jak uvádějí Janick and Moore (2004), tato vřeckovýtrusná houba se objevuje prakticky celosvětově ve všech oblastech produkujících jablka a je každoroční hrozbou především v chladných vlhkých regionech s častým deštěm na jaře a začátkem léta. V polosuchých, až suchých teplých oblastech, pak choroba nemusí být až tak závažným problémem.

Strupovitost jabloně je chorobou vyskytující se plošně na celém území České republiky ve všech výrobních oblastech. Její škodlivost je přímo závislá na celoročním průběhu počasí. A proto se mohou její negativní dopady v jednotlivých letech značně lišit (Kůdela et al., 2012).

- **Taxonomické zařazení podle - VÁNI (1996):**

**Říše:** Fungi

**Oddělení :** *Eumycota*

**Pododdělení :** *Ascomycotina*

**Třída:** *Ascomycetes*

**Řád:** *Dothideales*

**Rod :** *Venturia* Sacc. 1882

**Druh :** telemorfa – *Venturia inaequalis* (Cke.) Winter, 1897

anamorfa – *Spilocaea pomi*, Fries, 1825 – (syn.: *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fuckel, 1870)

### 3.2.1. Morfologie

V pletivech opadaných listů se vyvíjejí plodnice (pseudoperithecia), v plodnicích se tvoří vřeka, obsahující vždy osm askospor (Obr. 1). Plodnice je kulovitého tvaru, tmavohnědá až černá, 90–150 µm velká, obsahující asi 50–100 vřecek. Válcovitá vřeka jsou 55–75 x 6–12 µm velká, bitunikátní (stavbou vícevrstevná, funkčně tvořená dvěma vrstvami). Při vyprazdňování se nejdříve vnější vrstva, méně pevná a křehká (exoascus), protrhne a vnitřní pružná vrstva (endoascus) se prodlouží až na 2–3x větší délku, zralé askospory se přesouvají do apikální části, ze které jsou otvorem vlivem turgoru aktivně vystřelovány (Juroch, 2010 ; Juroch, 2010b).

Askospory jsou žlutavě zelené až žlutohnědé, 11–16 x 5–7 µm velké. Jsou dvoubuněčné, horní buňka je kratší a širší než spodní. Nepohlavní rozmnožování se děje konidiemi. Konidie jsou jednobuněčné nebo dvoubuněčné, světle až tmavě olivově zeleně zbarvené, opačně kyjovitého, hruškovitého nebo někdy nepravidelného tvaru, na konci zašpičatělé, 20–30 µm dlouhé. Vznikají na konidioforech a tvoří se postupně během období sporulace. Konidiofory jsou krátké, nečlánkované vyrůstají z hnědého mycelia na povrch listů trhlinami v kutikule (Juroch, 2010a ; Juroch, 2010b).

### 3.2.2. Vývojový cyklus patogena

Houby třídy *Ascomycetes*, do které patří i patogen *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., který je fakultativním parazitem se vyskytuje ve dvou vývojových stádiích, tj. pohlavní a nepohlavní, která na sebe postupně během celého vývojového cyklu navazují (Juroch, 2010). Ferree & Warrington (2003) uvádějí, že tento patogen má během roku jeden sexuální cyklus a sérii asexuálních cyklů. Pohlavní a nepohlavní stádium má pro svůj vývoj specifické přírodní a ekologické podmínky, kdy se během cyklu ze způsobu parazitické výživy (u nepohlavního stádia) dostává do saprofytické fáze přežívání-pohlavní stádium (Horák, 1998, Juroch, 2010). Jejich vědecké pojmenování je anamorfa a teleomorfa. Anamorfa je nepohlavní forma (také zvaná jako nedokonalá fáze) a produkuje nepohlavní výtrusy. Teleomorfa je pohlavní forma (také zvaná jako dokonalá nebo pohlavní fáze) a produkuje pohlavní výtrusy-askospory v pseudoperitheciích (Horák, 1998; Janick and Moore, 2004).

Původce strupovitosti přezimuje plodničkami (pseudoperithecií) ve skvrnách v opadaných listech či přezimujících plodech. Mycelium prorůstá skrze pokožku do mezofytu a během zimy dochází k postupnému vývoji patogena. Na začátku vegetace, zpravidla již při rašení jabloní, nejpozději však při fázi myšího ouška, dochází k dozrání prvních askospor, které jsou primárním zdrojem infekce. Průběžně pak askospory zrají a uvolňují se s ohledem na průběh počasí až do konce června, největší infekční tlak však nastává v době kvetení jabloní (Stensvand et al., 1998, Hluchý et al, 2008).

Askospora se skládá ze dvou nestejně velkých buněk s tenkou vnější vrstvou a pružnou vnitřní stěnou, tato dvojitá membrána tzv. bitunikální askus, pomáhá patogenu přezimovat. K hlavním faktorům, které ovlivňují dozrání askospor v jarním období je teplota, která odpovídá období rašení jabloní (Baudyš, 1962; Ackermann, 1984; Blažek, 2001; Jha, 2009).



Optimální teplota pro dozrávání askospor je 13-20°C. Doba na vyvolání infekce se dá určit podle délky ovlhčení a teploty-čím příznivější teplota, tím je potřebná kratší doba ovlhčení (Vaverka, 1995; Hluchý et al., 2008). Podle Ackermanna (1998), při teplotě 21 °C trvá inkubace 7 dní, naopak při teplotě 2,5 °C trvá inkubace 21 dní.

Studiem vlivů počasí na jednotlivé patogeny se v minulosti zabýval především Mills. Jeho tabulka (Tab. 3) je základem pro signalizaci ošetření fungicidy proti strupovitosti (Vaverka, 1995).

Dalším důležitým faktorem pro prasknutí a dozrání věcek je dostatečné množství vlhkosti. Ovšem jen zvýšená vzdušná vlhkost nestačí, proto je onemocnění šířeno především za deštivého počasí. Dešťové srážky umožní věcku nabobtnat, to poté na vrcholu praskne a vymrští výtrusy, které se dostávají do vzduchu a pomocí vzdušných proudů jsou unášeny různě do okolí (někdy až na vzdálenost 300 m), především na právě rašící listy (Ackermann, 1998; Blažek, 2001).

Na vlhkém listu askospory klíčí a klíčící vlákno prorůstá skrze kutikulu, nikoliv přes průduchy. Při styku s kutikulou vytváří patogen adhézní slizové látky, pro lepší přilnutí k hostitelskému povrchu. Slizové látky jsou složeny z proteinů a sacharidů jako je  $\beta$  – galaktoza a N-acetylglukosaminyl. Předpokládá se, že patogen používá k porušení kutikuly enzymatickou hydrolýzu (Jha, 2009).

Obvykle je zapotřebí 9 až 17 dní, kdy se napadení askosporami projeví a na listech či plodech se začínají objevovat první slabé léze olivového zbarvení, které jsou později pokryty vrstvou konidioforů s černošedými konidiemi (Ferree and Warrington, 2003). Zde začíná sekundární infekce, kdy konidie jsou za pomoci vody splavovány do dolních partií stromu na listy a plody. Šíření na velké vzdálenosti však u konidií nehrozí. Tímto způsobem se za vhodných podmínek může strupovitost šířit během vegetace. Po opadu listů, kdy dochází k tvorbě přezimujících pohlavních stádií, se celý vývojový cyklus, (Obr. 2) může opakovat (Lánský a Kneifl, 2000; Lánský, 2005).

### 3.2.3. Příznaky onemocnění

Strupovitost napadá nejvíce a nejzávažněji listy a plody, a to v průběhu celé sezóny. Květy a šupiny pupenů jsou napadány v krátkém období na jaře a v pozdním létě. Na jaře jsou první symptomy v podobě sazovitých různě velkých lézí pozorovatelné na spodní straně listu a odtud jsou rozšiřovány dál. Jakmile se totiž listy zcela rozevrou, jejich svrchní strana se stává náchylná k infekci a léze jsou pak patrné na obou stranách listové čepele. Poškozená tkáň vypadá, jako by měla světlejší odstín zelené, než zdravá část listu. Skvrny jsou obvykle kruhového tvaru a postupně mění barvu na olivově zelenou až hnědou. Na povrchu se tvoří sametový povlak z tzv. konidií (Obr. 3). Skvrny, které se tvoří na mladých listech mohou být poměrně velké, často i okolo 1 cm i více v průměru. Na vyzrálých listech bývají skvrny zpravidla menší, jelikož starší listy jsou vůči infekci odolnější. Postižená tkáň se může stát zdeformovaná, svrašťelá a léze na listech se mohou protrhávat a praskat-Obr. 4 (Ferree and Warrington, 2003; Hluchý, 1997; Vaillancort and Hartman, 2005).

Tureček (2004) uvádí, že počet skvrn na listech může být značně nevyrovnaný. Od několika málo jednotek, až po stovky různě velkých skvrn. Dále uvádí, že skvrny mohou být pozorovatelné i na řapících listů, a to po jejich celé délce. Při jejich silném napadení, pak listy žloutnou a opadávají.

U silných infekcí dochází ke splývání skvrn, které tak mohou pokrývat větší část listu. Napadené listové čepele více transpirují. V poškozených částech pokožky dochází totiž k většímu výparu vody. Tato transpirace nakonec může vést až k předčasnému opadu listů v 1. polovině léta (Blažek, 2001). Ferree & Warrington (2003) uvádějí, že na stromech odlistěných v důsledku choroby v polovině léta, je násada květů v dalším roce snížena, díky nedostatku květních pupenů, vzniklých v minulém létě.

Prvním symptomem na plodech a květech je vodnaté pletivo, které přechází od sametového, zeleného až do hnědě zbarveného povlaku, které se časem mění na podobně vyhlížející skvrny šedočerného zabarvení, které jsou pozorovatelné na listech. Stejně jako u listů, tak i u plodů, způsobuje choroba největší skvrny na malých plodech v raném vývoji a dochází tím často k jejich deformaci. Při silné infekci dochází k opadu květů i malých plodů. Na větších a starších plodech se tvoří pouze drobné strupy s pravidelným tvarem-Obr. 5 (Blažek, 2001; Juroch, 2010a).

Strupovitost se může objevit i na sklizeném a uskladněném ovoci. Jedná se o tzv. skládkovou či pozdní strupovitost. Projevuje se v podobě mnohočetných černých lézí po celém povrchu plodu (Obr. 6). Díky lézím pak dochází k větší transpiraci pokožky a povrch jablka rychleji vadne (Blažek, 2001; Lánský, 2005).

### **3.3. Ochrana proti strupovitosti jablek**

Ochranná opatření lze rozdělit na nepřímá a přímá. Nepřímá představují obecně známé a prakticky využívané postupy a opatření při zakládání výsadeb a jejich údržbě. Přímá ochrana se dá rozdělit na mechanickou, biologickou a chemickou (Juroch, 2010b).

#### **3.3.1. Nepřímá ochrana**

Nepřímá ochrana v sobě zahrnuje především řadu preventivních pěstebních opatření. Mezi tato opatření lze zahrnout výběr, jak vhodného, tak především dobře vzdušného stanoviště, použití zdravého a kvalitního výsadbového materiálu a pravidelná prořezávka koruny, nejlépe tak, aby byla dosti vzdušná a prosvětlená. Dalším významným faktorem je shrabování a likvidace spadeneho listí, díky kterému dochází ke snížení potencionální hrozby primární infekce (Lánský, 2005). Blažek (2001), se také přiklání k preventivním opatřením. Navíc uvádí možnost aplikace 5% močoviny v období podzimu na spadene listí, která značně urychluje jeho rozklad v průběhu zimy.

#### **3.3.2. Chemická ochrana**

Mezi přímé ochranné metody patří převážně aplikace fungicidních prostředků na základě kvalifikované signalizace s tím, že je doporučeno skupiny fungicidů střídat, aby se pro strupovitost snížila potencionální možnost k získání rezistence vůči používaným přípravkům (Ferree and Warrington, 2003).

Aby chemická ochrana byla skutečně úspěšná, je nutné zvládnout primární infekce (v období duben až červen), které vytěsní potřebu dalších ošetření proti sekundárním infekcím (od července do sklizně dané odrůdy). Přípravky je možné používat buď preventivně či kurativně. K preventivní ošetření lze používat kontaktní fungicidy, nejčastěji v rozmezí po 7. až 10. dnech. Lze je aplikovat i před očekávanými dešťovými srážkami, je však nezbytné, aby přípravek na listech zcela zaschnul. Naproti tomu kurativní zásahy se provádějí po splnění pro vznik infekce. Dále je možná i kombinace obou ošetření. Zpravidla se před květem ošetřuje preventivně a po odkvětu kurativně (Lánský a kol. 2005; Juroch, 2010a; Lánský a Kloutvorová, 2014).

### 3.3.2.1 Kontaktní fungicidy

Kontaktní přípravky se využívají především k preventivnímu ošetření, jelikož se jedná o látky dobře účinné i při nízkých teplotách v raných fázích vegetace. Při aplikaci těchto fungicidů, je ovšem velmi důležité přesné a rovnoměrné pokrytí rostliny postříkem, aby bylo dosaženo co nejefektivnějšího účinku. Kontaktní fungicidy kurativní účinky téměř nevykazují nebo jen zcela výjimečně, naproti tomu se vyznačují nespecifickým vícebodovým působením. Navíc tyto fungicidy působí pouze na povrchu listů, tedy nepronikají přes rostlinou kutikulu, což sebou nese řadu nevýhod. Především při větším množství srážek dochází ke smývání přípravku a jeho účinnost je tím výrazně snížena. Je tedy nutné aplikaci i několikrát opakovat. Při vhodných podmínkách pro rozvoj strupovitosti (kombinace chladno a vlhko), se aplikuje někdy až 20 postříků během vegetace. Naproti tomu, výhodou těchto fungicidů je velmi malé, spíše zanedbatelné riziko vzniku rezistence. Mezi kontaktní fungicidy patří pomocné přípravky na bázi mědi a síry, které působí preventivně. Během vegetace se aplikace těchto přípravků nedoporučuje, jelikož mědnaté přípravky působí během vegetace značně fytotoxicky. Měď např. způsobuje na plodech silnou rziť. Proto je aplikace těchto přípravků vedena pouze brzy na jaře, nejpozději však do fenofáze zeleného poupěte (Vaillancourt and Hartman, 2000; Lánský a kol. 2005; Lánský a Kloutvorová, 2014; Nagy et al., 2014).

### 3.3.2.2 Systémové fungicidy

Výhodou Systémových fungicidů na rozdíl od těch kontaktních je, že nepůsobí jen na povrchu rostlin, nýbrž proniká až do jejich pletiv, kde je pomocí cévních svazků účinná látka rozváděna po všech částech ovocného stromu. Vyznačují se specifickým jednobodovým mechanismem účinku. Ten funguje tak, že rozvádí účinnou látku od kořenů rostliny po její vrcholy tzv. akropetálně. Tím je zajištěna ochrana i pro nové přírůsty. Nevýhodou těchto fungicidů je jejich velké riziko vzniku rezistence. Kurativní ošetření provádíme až po splnění podmínek pro vznik infekce, podle *Millsovy tabulky* (Tab. 3). K tomu všemu, musí být pěstitel vybaven spolehlivou signalizační technikou, která pak na základě měření teploty a délky ovlhčení listů přesně určí dobu pro rozvoj patogena. Navíc vedle signalizační techniky musí být vybaven výkonnou aplikační technikou a dostatkem fungicidních přípravků s dlouhou kurativní dobou tak, aby byl schopen provést ošetření během jednoho dne. Avšak jak již bylo zmíněno výše, riziko vzniku rezistence proti patogenu, je u kurativního ošetření velmi vysoké (Vaillancourt and Hartman, 2000; Lánský a kol., 2005; Lánský a Kloutvorová, 2014).

### 3.3.2.3. Genetická ochrana (rezistentní šlechtění)

Mezi genetickou ochranu lze zařadit především výsadbu rezistentních odrůd jabloní proti strupovitosti, která značně omezí četnost aplikací fungicidů, či naprosto eliminuje jejich používání. Ovšem rezistence převážně většiny odrůd pěstovaných v ČR i ve světě je založena na majorgenu Vf (Rvi6), získaného z jabloně malokvěté *Malus floribunda* Sieb. klon 821. Překonání rezistence, zaznamenaného v roce 2006 na několika územích ČR, jasně potvrdilo potřebu změny strategie ve šlechtění. Aktuálním cílem většiny šlechtitelských programů ve všech producentických zemích, je získání nových odrůd jabloní, s polygenně řízenou rezistencí proti patogenu (Juroch,2010a).

### 3.3.2.4. Biologická ochrana a pomocné prostředky

Carisse et al. 2000, uvádí účinnou biologickou metodu v podobě antagonistické houby *Microsphaeropsis sp.* (kmen P130A). Houba proniká skrze buněčnou stěnu nepřítel a tím vyvolává buněčnou smrt u nepřátelské houby *Venturia inaequalis* Cke. Bylo prokázáno, že tvorba askospor se v kontrolovaných podmínkách sníží o 85-98% a v polních podmínkách o 75-80%. V budoucnosti by mohla být tato metoda přínosem, především pro ekologickou a integrovanou produkci jablek.

Mezi pomocné prostředky patří např. přípravek Alginur, jehož hlavní složkou jsou výtažky z mořských řas (24%), dále rostlinné aminokyseliny, fosfonáty, fosfáty a draselné sloučeniny. Tyto složky fungují jako elicitory, které u rostliny vyvolávají obranný mechanismus, díky kterému je rostlina schopná se efektivně bránit vůči napadení patogenem. Tím se Alginur zásadně odlišuje od používání fungicidů a má značný vliv, na snížení napadení patogenem, zvýšení kvality produkce ale i snížení rizika druhotné strupovitosti a tím i na snížení nákladů na její ošetření. Největších výsledků, však Alginur vykazuje v kombinaci s kontaktními přípravky. V problémových obdobích, především za deštivého počasí je významným prostředkem POLISENIO. Účinná látka je na bázi polysulfidu vápenatého. Jedná se o kapalné listové hnojivo. Má však též významný vedlejší efekt na strupovitost. Je ideálním prostředkem pro aplikaci těsně po dešti. Dalším pomocným prostředkem je VitiSan, který se využívá kurativně na klíčící spory, první až druhý den infekce. Základní účinnou látkou je hydrogenuhličitan draselný. Aplikuje se ve fázi vlašského ořechu. Při použití na mladé plody totiž hrozí riziko jejich poškození rzivostí (Vávra a kol., 2011; Bagar,2012). Další možností ochrany proti strupovitosti v IZ a EZ je využití botanických pesticidů, jakožto různých esenciálních olejů nebo rostlinných extraktů (Thiesz et al., 2007; Pavela, 2011, Nagy et al. 2014; Sousa et al., 2015; Falta, 2016; Maňasová a kol., 2017).

### 3.4. Esenciální oleje

Esenciální olej je přírodní těkavou směsí, s charakteristickou silnou vůní, který je produktem sekundárního metabolismu v tělech aromatických rostlin. V přírodě hrají sekundární metabolity významnou roli v ochraně před predátory, mikroby a houbovými patogeny. Některé metabolity se také podílejí na obranných mechanismech proti abiotickým stresům (Bakkali et al., 2008; Bassole and Juliani 2012).

#### 3.4.1. Výskyt

Esenciální oleje, také známé jako těkavé oleje, jsou směsi komplexních látek biosyntetizovaných rostlinami. Jedná se o produkty sekundárního metabolismu rostlin, které se vyskytují v jejich různých částech: v listech, plodech, květech, kůře, nati, oplodí či v kořenech. Silice jsou uloženy např.: v e žláznatých buňkách, papilách, chlupech, mezibuněčných prostorách, nádržkách a kanálcích, odkud se při porušení rostlinných orgánů uvolňují. Jsou přítomny, jak v čerstvém, tak i sušeném rostlinném materiálu, a to v rozmezí od 0,01% do 10%. To je důvod, proč je nutné mít několik tun rostlinného materiálu na pouhých několik stovek litrů oleje. Jednotlivé části rostlin se sbírají v době, kdy je obsah cenných látek co nejvyšší. Na obsah účinných látek má vliv vláha během vegetace, odrůda, lokalita, roční období, ochrana, hnojení a další celá řada ovlivňujících faktorů (Sedláková, 2003; Rao and Pandey 2007; Bassole and Juliani 2012).

#### 3.4.2. Složení a vlastnosti

Mezi hlavní složky esenciálních olejů patří především dvě biosynteticky související skupiny. Tyto hlavní skupiny zahrnují terpeny a terpenoidy, jakožto i aromatické a alifatické složky (Bassole and Juliani, 2012). Podle Rao and Pandey, 2007 je můžeme rozdělit do dvou skupin:

- **Těkavá frakce**

Která tvoří 90 až 95% hmotnosti esenciálního oleje. Obsahuje monoterpeny, seskviterpenové uhlovodíky, jakožto i jejich oxidované deriváty spolu s alifatickými aldehydy, alkoholy a estery.

- **Permanentní zbytek**

Který obsahuje 1-10% hmotnosti oleje a obsahuje mastné kyseliny, steroly, karotenoidy, vosky a flavonoidy.

Esenciální oleje jsou charakteristické pro svoji nerozpustnost a nemísitelnost ve vodě. Naopak dobře rozpustné, jsou v organických rozpouštědlech (lív, chloroform, aceton, hexan).

Jejich nevýhodou je, že jsou často rozkládány působením denního světla a UV zářením. Proto je nutné je uchovávat v dobře uzavřených nádobách z tmavého skla, nejčastěji hnědé či fialové barvy. Silice jsou často téměř bezbarvé ale některé se vyskytují v různých barevných odstínech. Například k rudým odstínům patří pomeranč, k rezavým jasmín a k modrým heřmánek či hřebíček (Hay, 1993; Kantová a Kant, 2004; Vrtílek, 2011; Bassole and Juliani 2012).

„Ačkoliv jsou esenciální oleje složeny z několika desítek látek, obvykle obsahují 1-5 látek, jejichž obsah je majoritní a pro daný rostlinný druh typický. Mnohdy jsou pak tyto majoritní látky v synergickém vztahu s některou z dalších, ať už majoritní nebo minoritní složkou obsaženou v esenciálním oleji a společně významně zvyšují svojí biologickou účinnost“ (Pavela, 2011).

Mezi majoritní látky patří například karvakrol (30%) a thymol (27%) obsažené v esenciálním oleji z *Origanum compactum* (Obr. 7). Linalool (68%) obsažen v oleji z *Coriandrum sativum*, 1,8-cineol (45%), který je hlavní složkou olejů z *Rosmarinus officinalis*, dále pak eugenol (65%), jako hlavní komponent pro oleje z *Eugenia caryophyllus*, či mentol (60%) pro *Mentha piperita*. (Pavela, 2011).

### 3.4.3. Účinky esenciálních olejů

Složité sloučeniny obsažené v esenciálních olejích v sobě zahrnují široké spektrum různých biologických vlastností a účinků. V medicíně jsou silice využívány především pro své antibakteriální, antibiotické, antiseptické, antivirové, antioxidační, analgetické, hojivé, sedativní a jiné účinky. V zemědělství je pak největší zájem o antimikrobiální a insekticidní účinky (Carson and Hammer, 2011; Lang and Buchbauer, 2011).

#### 3.4.3.1. Antibakteriální účinky

Až do nedávna se významná účinnost esenciálních olejů nijak zvlášť nezkoumala. Nyní existuje celá řada výsledků, kterou můžeme najít ve vědecké a lékařské literatuře, kde je pojednáváno o antibakteriálních účincích esenciálních olejů v in vitro podmínkách. Některé esenciální oleje mají schopnost potlačovat růst, množení a šíření mikroorganismů, lze je tedy využít jako antimikrobiální látky. Antimikrobiální aktivita je zcela závislá na chemickém složení a obsahu jednotlivých složek. Tuto aktivitu lze připsat především monoterpenům, dále pak seskviterpenům a tím souvisejícím uhlovodíkům, fenolům a alkoholům. Molekuly, které mají největší antibakteriální potenciál jsou fenoly tymol a karvakrol, které úspěšně účinkují proti širokému spektru mikroorganismů. Dále jsou využívány aldehydy, jako např. geranial,

citronellal, kuminal či neral. Ketony, z nichž nejpoužívanější jsou: thujon, karvon, menton, benon nebo piperiton. A nakonec alkoholy, z nichž nejznámější jsou: geraniol, menthol, linalool, myrcenol, thujanol, terpineol a piperitol. Z celé nabídky esenciálních olejů, mezi ty neúčinnější s antibakteriálními účinky patří: tee tree, tymiánový, šalvějový či třezalkový (Lang and Buchbauer, 2011; Carson and Hammer, 2011; Hammer and Carson, 2011).

#### **3.4.3.2. Fungicidní účinky**

U celé řady extraktů a silic byly prokázány významné účinky nejen antibakteriální či insekticidní ale také fungicidní. Např. u hřebíčkovce vonného (*Eugenia aromatica*), který obsahuje velké množství biologicky aktivních látek, jež jsou složeny převážně z eugenolu (42-90%) a sesquiterpenu  $\beta$ -caryophyllenu (15-30%), byly zjištěny fungicidní a fungistatické účinky proti mnoha původcům chorob, jako jsou např. *Penicillium* sp. či *Fusarium* sp. (Pavela, 2012). Účinné jsou ale i další esenciální oleje, jako např.: z tymiánu (*Thymus vulgaris*), z bazalky (*Ocimum basilicum*) a z kajeputu (*Malaleuca quinquenervia*), které celkem dobře inhibují klíčení spor snětí (*Tilletia* sp.) v *in vitro* a *in vivo* podmínkách. Látky z těchto olejů, tedy tak prokazují svůj značný fungicidní potenciál. Oleje z tymiánu (*Thymus vulgaris*), ze skořice (*Cinamomum verum*) a pomerančovníku (*Citrus sinensis*) jsou považovány za vhodné kandidáty pro budoucí vývoj biofungicidů proti strupovitosti. Tyto oleje jsou schopné už v koncentracích od 0,01% až 0,1% efektivně potlačit klíčení konidií *Venturia inaequalis* Cke. Wint., z toho největší inhibiční účinky vykazuje tymiánový olej (Theisz et al. 2007; Hammer and Carson, 2011; Bálint et al. 2014, Nagy et al. 2014).

#### **3.4.4. Způsoby extrakce**

##### **3.4.4.1. Hydrodestilace**

Hydrodestilace patří mezi nejstarší a nejpoužívanější metodu extrakce a v praxi je používána dodnes. Charakteristickým znakem této metody je, že rostlinný materiál je v přímém kontaktu s vroucí vodou. Při varu je esenciální olej pomocí vodních par vytažen nad hladinu, kde se postupně ochlazuje a kondenzuje zpět do kapaliny. Esenciální olej je snadno oddělitelnou složkou díky své rozdílné hustotě, totiž plave na hladině. Ovšem některé vonné složky jsou ve vodě rozpustné a musí být z destilátu získány pomocí dalších destilačních či jiných extrakčních metod. Hlavní výhodou hydrodestilace je to, že teplota oleje nikdy nepřesáhne 100 °C, tudíž je tepelný rozklad cenných látek minimální (Gerberding, 1962, Pavela a Bárnet, 2011).



#### **3.4.4.2. Destilace s vodní parou**

Destilace s vodní parou, je obecně jednou z nejstarších a relativně jednoduchých metod získávání silice z rostlinné hmoty. Při této metodě je získáván jeden z nejvýznamnějších olejů a tím je olej z rodu Máta (*Mentha sp.*). A to tak, že, přes sušené části rostlin prochází pára, která vede z varného kotle přes potrubí, nejčastěji z mědi, aby bylo dosaženo částečného ochlazení vodní páry a bylo tak docíleno teploty, která cenné látky nerozkládá. Destilovaná látka je pak spolu s vodní parou dále vedena přes sestupný chladič až do jímadla. V laboratorních podmínkách je využíváno aparatur, u kterých vyvíječ páry tvoří frakční baňku s pojistnou trubicí, která by měla být dostatečně dlouhá (40 cm). Pára pak vede přes druhé frakční baňky, ve kterých se nachází destilovaná látka. Díky tomuto způsobu, je možné destilovat například látky, které jsou s vodou nemísitelné, aniž by bylo nutné je zahřívat na jejich bod varu. Důležité je, že soustava dvou vzájemně nemísitelných kapalin je destilována při teplotě nižší, než je teplota varu těkavější složky (Gerberding, 1962, Baser and Buchbauer, 2010, Pavela a Bárnet, 2011).

#### **3.4.4.3. Lisování za studena**

Lisování za studena je využíváno především pro extrakci esenciálního oleje z vnější vrstvy kůry – tzv. epicarpu u citrusových plodů, jako jsou např.: pomeranče, citrony, grapefruity či bergamot. Metoda spočívá v jednoduchém lisování kůry, která je před samotným lisováním z plodu ostrouhána, spláchnuta proudem vody a přecezena. Výsledkem je vodnatá směs složená ze silice a kapaliny. Silice se následně oddělí odstředěním na odstředivce. Výsledný produkt si zachovává svěží vůni zralých plodů. Ovšem je nutné si uvědomit, že oleje, které jsou získány touto metodou, mají relativně krátkou trvanlivost – cca 6 měsíců (Voldřich, 2009; Rao and Pandey 2006-07).

#### **3.4.4.4. Enfleuráž**

Jedná se o tradiční způsob získávání vonných látek pomocí tuků, a to zejména z květů rostlin (např. růže či jasmínu). Metoda je prováděna, buď za studena, především vepřovým sádlem, olivovým olejem za normální teploty, nebo za tepla macerací horkým tukem. Tuk je zpravidla nanášen v tenkých vrstvách na skleněné desky, které jsou zasazené v dřevěných rámech. Na vrstvu tuku jsou pak květy určené k získání vonných látek nasypány a rámy jsou postupně skládány na sebe. Poté, co jsou esenciální oleje do tuku absorbovány, je tuk dále extrahován pomocí ethanolu. Při této metodě lze získat velmi kvalitních a čistých silic (Voldřich, 2009; Rao and Pandey 2007).

#### **3.4.4.5. Extrakce organickými rozpouštědly**

Jedná se o známou metodu, při níž je organický materiál určitou dobu macerován v organických rozpouštědlech např. (benzenu, hexanu či petroletheru). Po odpaření rozpouštědla vznikne výsledná silice, která navíc obsahuje vosky a v alkoholech další nerozpustné látky. Jedná se o prvotní silici, která se jinak nazývá konkrét. Dále je pak konkrét zpracován a rozpouštěn za tepla v ethanolu, kdy vzniká za pomoci filtrace a odpaření, silice čistá, tzv. absolutní (Minařík et al., 1979; Pavela a Bárnet, 2011).

#### **3.4.4.6. Superkritická fluidní extrakce (SFE)**

Moderní zároveň velmi šetrná technologie extrakce pro nás velmi cenných látek, za pomoci rozpouštědel, které se nachází v superkritickém (nadkritickém) stavu pod vysokým tlakem, kde mají nejčastěji podobné vlastnosti jako rozpouštědla kapalná. Nejčastěji se k této metodě využívá CO<sub>2</sub> ale také propan, toulén, amoniak či NO<sub>2</sub>. V případě použití oxidu uhličitého probíhá extrakce zkapalněným plynem za podmínek nad kritickou teplotu a kritický tlak, tj. 31°C a 7,38 MPa. Za normálních podmínek je CO<sub>2</sub> plyn, při snížení tlaku se však mění na páru, kdy se po extrakci odpaří a tím nakonec zůstane jen čistá silice, která je jímána do sběrné nádoby. Silice by díky této nákladné metodě měly dosahovat vysokých kvalit a především čistoty. Proto jsou oleje získané metodou SFE na trhu těžko dostupné a značně drahé (Vrtílek 2011, Pavela a Bárnet, 2011; Rao and Pandey, 2007).

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Biologický materiál

- Pro pokusy na fytotoxicitu byly použity čerstvě natrhané mladé listy i s řapíky z jabloní odrůdy Idared, z pokusného a demonstračního pozemku ČZU v Praze–Suchdol.
- Pro pokusy s esenciálními oleji na jejich vliv proti růstu mycelia a vliv na inhibiční účinky klíčení spor v *in vitro* podmínkách, byly použity suspenze spor *Venturia inaequalis*, získané z různých lokalit na území České republiky (Obr. 8).

Tabulka 1 - Seznam izolátů *Venturia inaequalis*, použitých na pokus-vliv esenciálních olejů na růst mycelia

Číselné označení	Lokalita
1/16/8/3	Svitavy
9/16/3/3	Chrast (Vysočina)
7/16/2/3	Vyžlovka
17/16/5/2	Pokusné pole ČZU
4/16/3/3	Roztoky
3/16/8/3	Ruzyně-výzkumný ústav
3/16/1/3	Ruzyně-výzkumný ústav
19/16/5/2	Čistá-Litomyšl

- Všech 13 esenciálních olejů, (tab. 2) bylo nakoupeno od firmy Saloos a následně vyselektováno na základě jejich účinnosti v *in vitro* testech z předešlých pokusů. Jako adjuvant při ředění esenciálních olejů byl použit dimethyl sulfoxid (DMSO).

Tabulka 2 - seznam vybraných esenciálních olejů

Latinský název	Český název
<i>Litsea cubeba</i>	Vavřík kubébový
<i>Mentha spicata</i>	Máta klasnatá
<i>Cymbopogon citratus</i>	Voňatka citronová
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Voňatka winterová
<i>Thymus vulgaris</i>	Tymián obecný
<i>Pelargonium graveolens</i>	Muškát vonný
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rozmarýn lékařský
<i>Eugenia caryophyllus</i>	Hřebíčkovec vonný
<i>Ocimum basilicum</i>	Bazalka pravá
<i>Cinnamomum ceylanicum</i>	Skořicovník cejlonský
<i>Lavandula hybrida</i>	Levandule hybridní
<i>Origanum majorana</i>	Majoránka zahradní
<i>Cinnamomum camphora</i>	Kafrovník lékařský

#### 4.2. Příprava esenciálního oleje na zkoušku fytoxicity

Esenciální olej z *Thymus vulgaris* byl enkapsulován do želatiny o daných koncentracích od 10 do 90%. Výsledná koncentrace se tedy pohybovala od 1 do 9 %.

#### 4.3. Test na fytoxicitu

Pokus byl proveden 8.7.2016

Na test fytoxicity bylo připraveno 9 misek. Každá miska charakterizovala jinou míru koncentrace esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*. Do každé z misek byl vložen kus aranžovací hmoty, která byla přibližně půl hodiny před tím ponořena do vody, aby bylo dosaženo jejího rovnoměrného nasáknutí a mohla tak sloužit, jako zásobárna vody pro utržené listy jabloní. Na každou misku připadlo pět čerstvě utržených listů jabloní, odrůdy Idared, z pokusného pozemku ČZU – Suchdol. Listy byly pomocí žiletky na řapících zešikma seříznuty a poté zapíchnuty do aranžovací hmoty tak, aby se vzájemně nepřekrývaly či nedotýkaly. Nadále byl pomocí štětce enkapsulovaný esenciální olej z *Thymus vulgaris* rovnoměrně nanesen na každý list zvlášť. Misky se nacházely v laboratorních podmínkách, při běžné pokojové teplotě. Fytotoxické působení bylo vyhodnoceno po 24 hodinách, kdy byly také pořízeny jednotlivé fotografie.

#### 4.4. Příprava esenciálního oleje na zkoušku fytotoxicity

Esenciální olej z *Thymus vulgaris* byl enkapsulován do želatiny o daných koncentracích od 10 do 90%. Výsledná koncentrace se tedy pohybovala od 1 do 9 %.

#### 4.5. Příprava naředěného talentu pro pokus

Dle pokynů výrobce je potřeba 4,5 ml přípravku Talent na 10 l vody. V laboratorních podmínkách bylo pomocí pipety odebráno 22,5 $\mu$ l přípravku Talent, které bylo zředěno s 5 ml destilované vody.

#### 4.6. Příprava emulzí esenciálních olejů s adjuvantem (DMSO)

Pro přípravu 1 % emulze s přidáním adjuvantu (DMSO) je do namícháno a odměřeno pomocí pipety 1898 $\mu$ l dvakrát destilované vody se 100 $\mu$ l adjuvantu DMSO a 2 $\mu$ l vybraného esenciálního oleje.

#### 4.7. Složení a příprava pevného kultivačního media potato dextrose agar (PDA)

##### Materiál:

PDA – bramborovo – dextrózový – agar (potato dextrose agar) (Himedia)

##### Složení:

	g/l
• Bramborová infuze z 200 g	.4
• Dextróza	20
• agar	15

##### Pokyny od výrobce:

- na 1000 ml 39 g dehydratovaného média

### **Postup:**

Pro přípravu kultivačního média bylo naváženo 19,5 g dehydratovaného média-PDA (Himedia). Následně bylo potřebné množství dehydratovaného média nasypáno do vhodné Erlenmeyerovy baňky, která byla doplněna požadovaným množstvím (500ml) destilované vody, pomocí odměrného válce. Médium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 20 minut. Po vyndání z autoklávu bylo médium v Erlenmeyerově baňce postupně zchlazováno pod tekoucí vodou na přibližnou teplotu kolem 50°C. Do takto zchlazeného média bylo pomocí pipety přidáno 500µl širokospektrálního bakteriostatického antibiotika chloramfenikolu ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ ). Nakonec bylo médium rozlito do 60 mm a 90 mm Petriho misek.

### **4.8. In vitro test na klíčení konidií**

Byly připraveny Petriho misky o velikosti 60 mm, (Obr. 9) s pevným médiem potato dextrose agar (PDA) dle doporučení výrobce. Dále byly namíchaný emulze esenciálních olejů s adjuvancem dimethyl sulfoxid (DMSO) s 1% koncentrací esenciálních olejů. Na misky s agarem byla aplikována emulze, a to 250µl. Kontrolní varianty byly ošetřeny pouze pomocí DMSO, který byl na označené misky aplikován pomocí pipety. Na povrch média byl esenciální olej rozetřen po celém povrchu pomocí bakteriologické hokejky. Pro porovnání účinnosti byla do pokusu zařazena také varianta s nejčastěji používaným fungicidním přípravkem Talent, který byl vmíchán přímo do prochlazeného média (PDA), s ředěním podle doporučení výrobce. Především byla testována účinnost esenciálních olejů z rostlin *Mentha spicata*, *Thymus vulgaris*, *Eugenia Caryophyllus* a *Cymbopogon citratus* na klíčení spor *Venturia inaequalis*. Na připravené médium v Petriho miskách byla rozetřena vodná suspenze konidií pomocí zploštělé lžice z laboratorního skla. Po rozetření byly misky zajištěny Parafilmem (netoxickou pružnou páskou) aby nedocházelo k vysychání, difúzi plynů a kontaminaci. Nadále byly Petriho misky umístěny do termostatu při 22°C a po jednom týdnu vyhodnoceny. Na každou misku byly náhodně pomocí červené permanentní fixy nakresleny 3 čtverečky o velikosti 1x1cm. Nakonec byly z těchto ohraničených míst spočítány všechny klíčící a neklíčící konidie.

### **4.9. In vitro test na růst mycelia *Venturia inaequalis***

Byly připraveny Petriho misky o velikosti 90 mm (Obr. 10) s pevným médiem potato dextrose agar (PDA), které byly postupně ošetřeny všemi třinácti oleji, (Tab. 2) pomocí bakteriologické hokejky. Na ošetřené misky byly pasážovány jednotlivé testované izoláty

*Venturia inaequalis*. Esenciální oleje o koncentraci 1% byly rozetřeny pomocí bakteriologické hokejky. Do experimentu byla zařazena i varianta s fungicidem Talent, jako tomu bylo již u testu na klíčení konidií *V. inaequalis*. Dále byly misky umístěny do termostatu, při teplotě 22°C, na dobu jednoho měsíce. Po uplynutí inkubační doby byl nárůst mycelia *V. inaequalis*, (obr. 10 a 11) měřen pomocí automatického posuvného měřítka. Získaná data byla dále zpracována pomocí analýzy rozptylu v programu Statistika 12.0 (StatSoft).

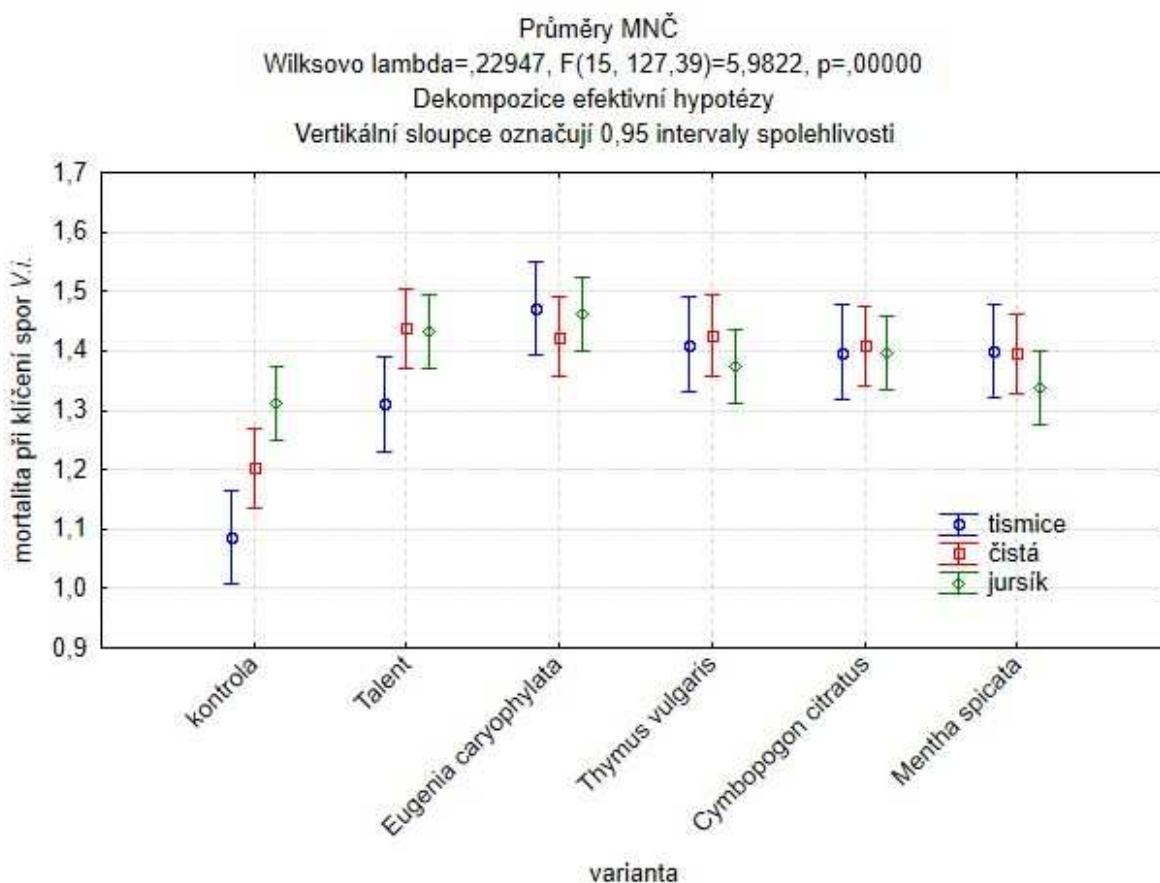
## 5. Výsledky

### 5.1. Fytotoxické působení

Vyhodnocení fytotoxicity proběhlo po 24.h, kdy byly pořízeny jednotlivé fotografie, na kterých jsou účinky enkapsulovaného esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* o různé koncentraci zřetelné. Na Obr 11. lze vidět ošetření o koncentraci 1-2%. Jak je po 24. hodinách patrné, žádné známky fytotoxicity se u těchto koncentrací neprojeví. Lehké známky fytotoxicity vykazoval až enkapsulovaný esenciální olej z *Thymus vulgaris* při konečné koncentraci 3% (Obr. 12). Po 24. hodinovém vyhodnocení fytotoxicity je patrné, že se u této koncentrace objevují lehké známky tzv. „popálení“ listů. Při konečné koncentraci 4% a 5% (Obr. 13) se na listech vlivem fytotoxicity, objevují drobné nekrotické skvrny. Na obrázku 13. lze pozorovat ošetření enkapsulovaným esenciálním olejem z *Thymus vulgaris* o konečné koncentraci 6% a 7 %. Působení o těchto koncentracích, způsobily na listech větší nekrotické skvrny. Velké a jasně patrné nekrotické skvrny můžeme pozorovat u ošetření s konečnou koncentrací 8% a 9% (Obr. 14). Na Obr. 15. je jasně patrné fytotoxické působení enkapsulovaným esenciálním olejem z *Thymus vulgaris* o konečné koncentraci 9%. Detail nám umožňuje pohled na značné léze, které zasahují téměř celý povrch listů.

### 5.2 Vliv esenciálních olejů na klíčení spor

Inhibiční účinek na klíčení spor jasně vykazovaly všechny použité esenciální oleje pro tento pokus, (Tab. 2). Z toho nejlepších výsledků dosahoval esenciální olej z *Eugenia caryophyllus*, který předčil i jeden z neznámějších fungicidů proti strupovitosti-Talent, graf 1.

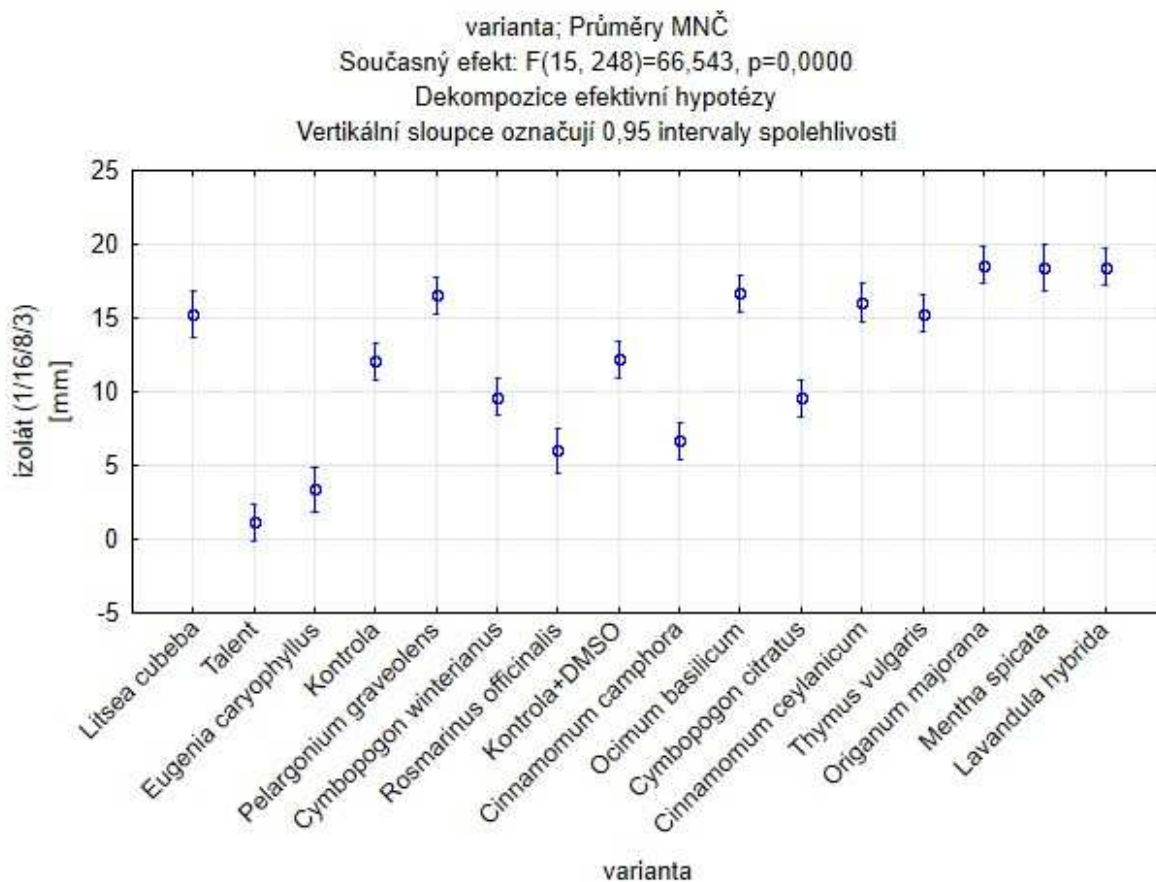


Graf 1 - Vliv esenciálních olejů na mortalitu klíčících spor *V.i.*

Graf 1 znázorňuje ošetření jednotlivými variantami a jejich vliv na mortalitu při klíčení spor *V.i.*, které byly odebrány z daných lokalit. Jak je z grafu patrné, olej z *Eugenia Caryophyllus* je statisticky nejlepší variantou ošetření. Ošetření předčilo dokonce i fungicid Talent. I u ostatních esenciálních olejů (*Thymus vulgaris*, *Cymbopogon vulgaris* a *Mentha Spicata*), jsou jasně patrné jejich účinky.

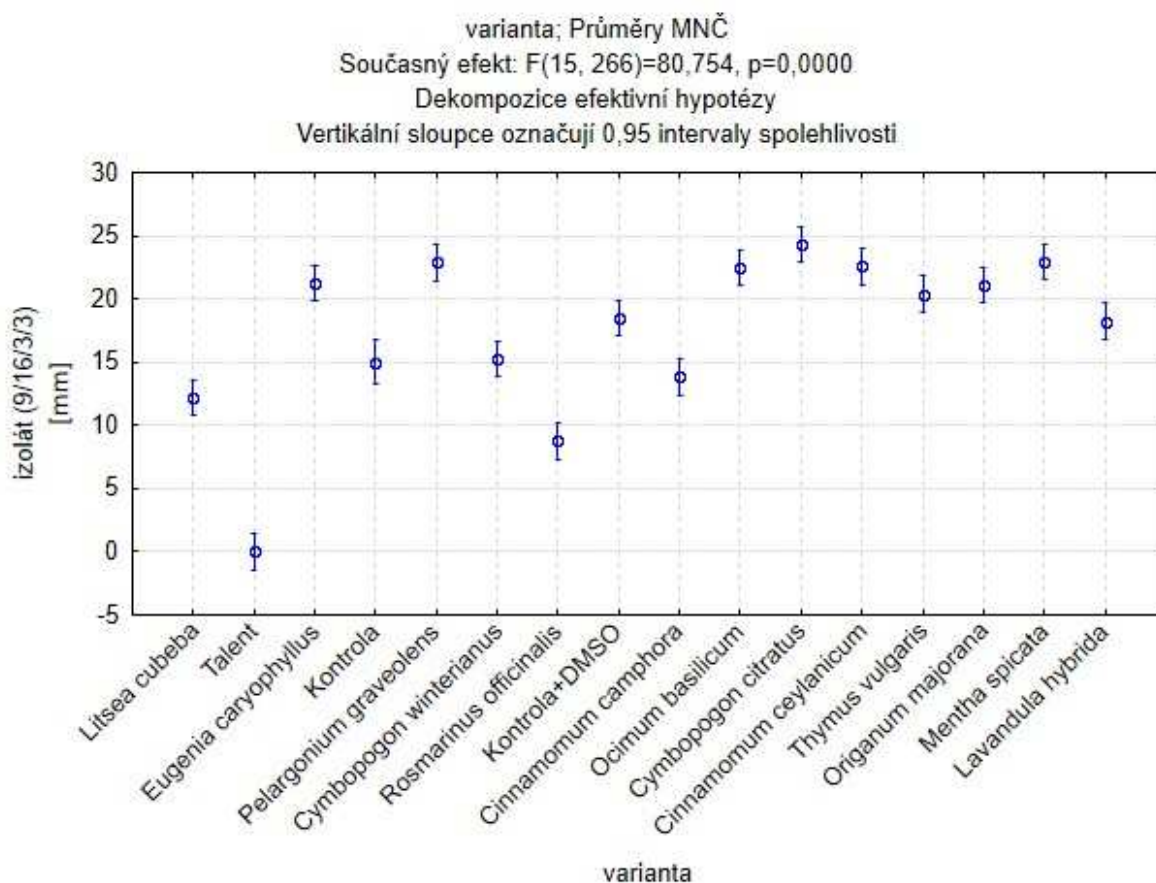


### 5.3 Vliv esenciálních olejů na růst mycelia



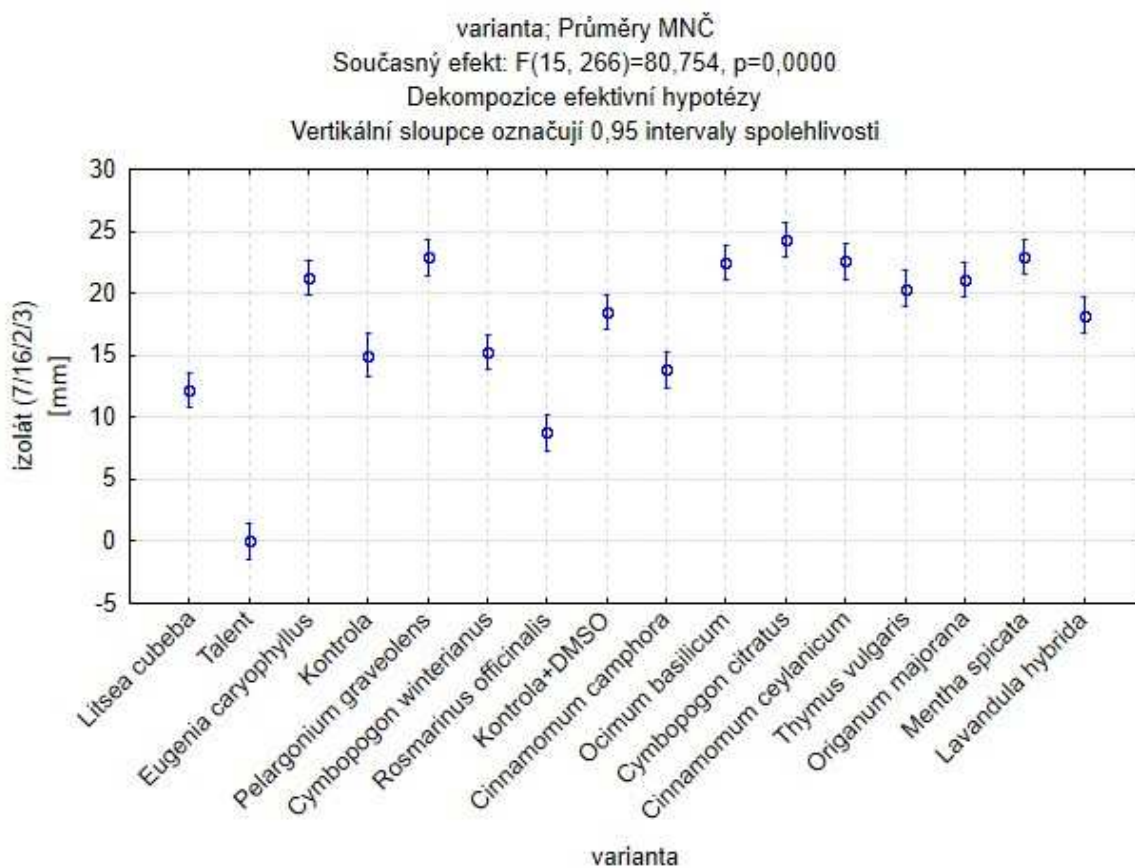
Graf 2 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia *Venturia inaequalis*- izolát (1/16/8/3)

Z grafu 2 můžeme vyčíst vliv jednotlivých variant ošetření esenciálními oleji na růst mycelia *Venturia inaequalis* – izolát (1/16/8/3). Pro srovnání je zde varianta s ošetřením Talent a dále čistá kontrola bez jakéhokoliv ošetření a kontrola, kde bylo aplikováno 100 $\mu$ l adjuvantu DMSO. Jak je z grafu patrné, jednoznačně nejúspěšnější variantou hned po Talentu je esenciální olej *Eugenia caryophyllus*. K porovnání daných variant ke všem izolátům byl použit i Tukeyův test, (Tab. 4-12) na porovnání homogenních skupin.



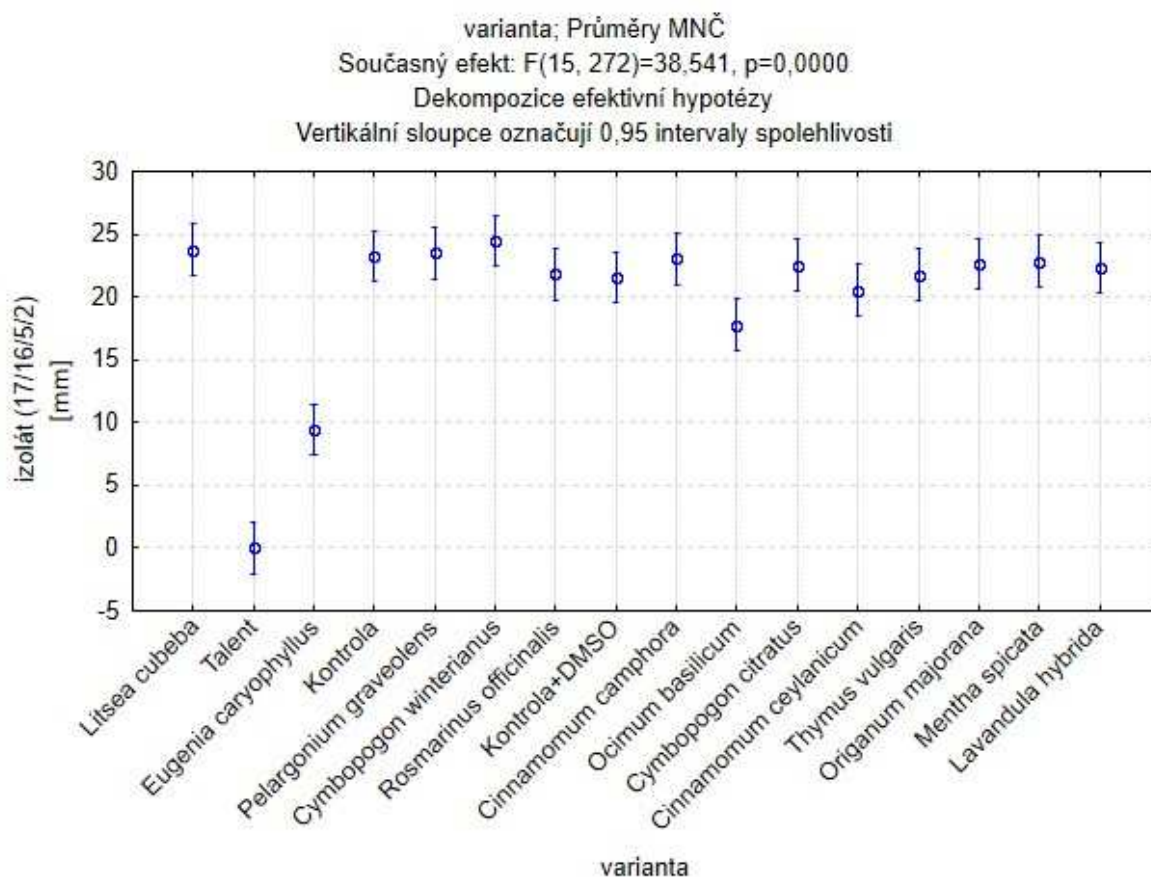
Graf 3 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia *Venturia inaequalis*-izolát (9/16/3/3)

Z grafu 3. lze vyčíst vliv jednotlivých variant ošetření esenciálními oleji na růst mycelia *Venturia inaequalis* – izolát (9/16/3/3). Z tohoto grafu vyplývá, že neúčinnějšími variantami hned po Talentu, je esenciální olej z *Rosmarinus officinalis* a *Litsea cubeba*. *Eugenia caryophyllus* i *Thymus vulgaris* jsou zde v pozadí.



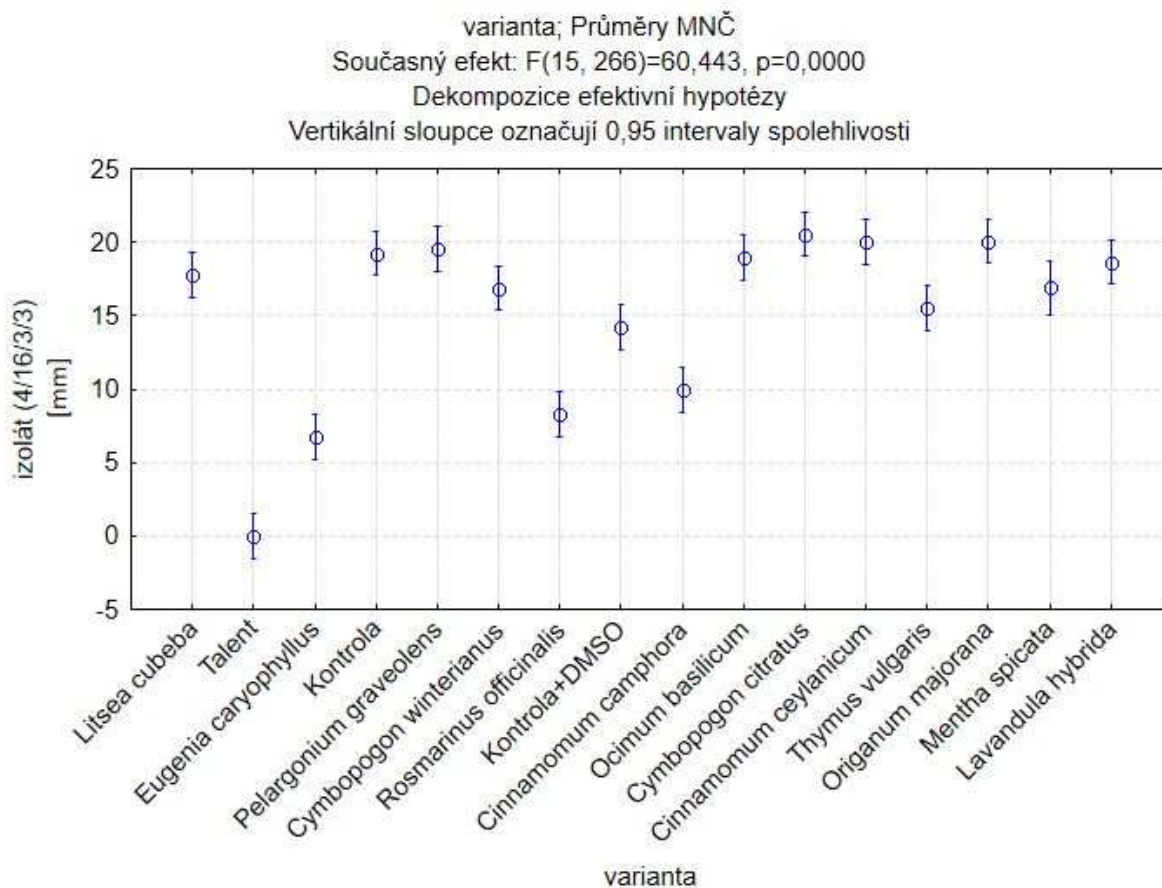
Graf 4 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia *Venturia inaequalis*-izolát (7/16/2/3)

Z grafu 4. lze vyčíst vliv jednotlivých variant ošetření esenciálními oleji na růst mycelia *Venturia inaequalis* – izolát (7/16/2/3). Stejně jako v případě grafu 4. i zde vyplývá, že nejúčinnějšími variantami hned po Talentu, je esenciální olej z *Rosmarinus officinalis* a *Litsea cubeba*. *Eugenia caryophyllus* i *Thymus vulgaris* jsou zde v pozadí.



Graf 5 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia *Venturia inaequalis*–izolát (17/16/5/2).

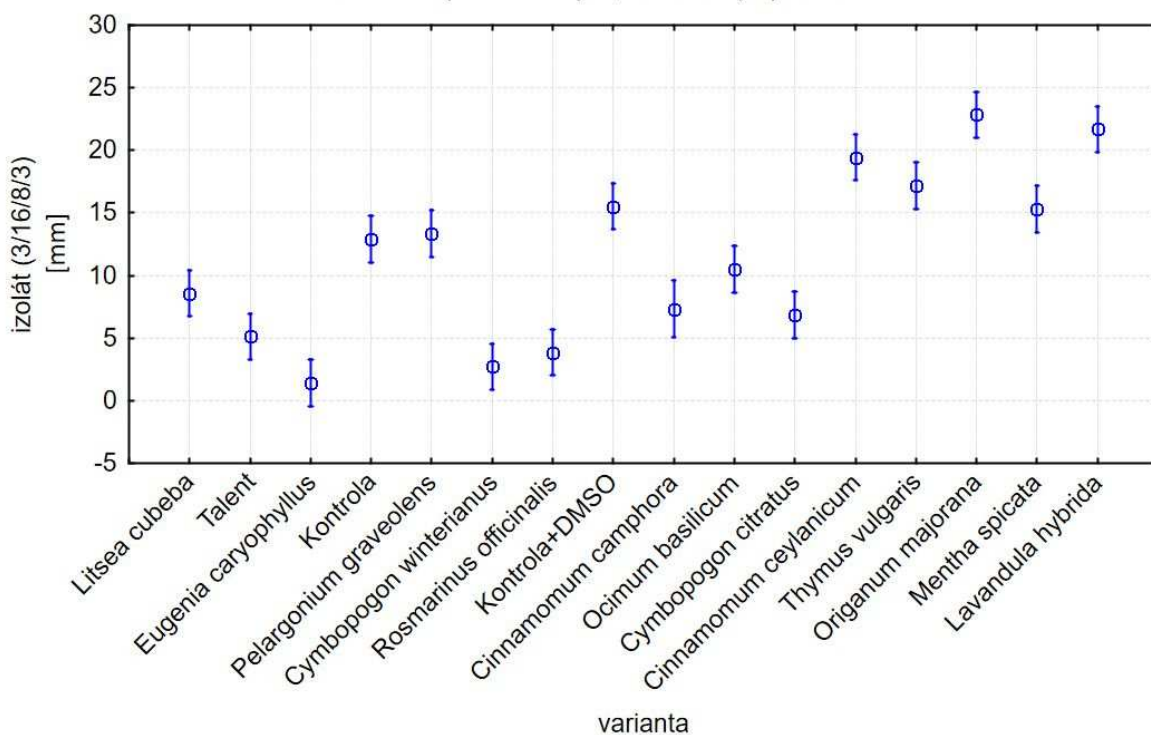
Z grafu 5. lze vyčíst vliv jednotlivých variant ošetření esenciálními oleji na růst mycelia *Venturia inaequalis*–izolát (17/16/5/2). Z tohoto grafu vyplývá, že esenciální olej z *Eugenia caryophyllus* je druhou nejúčinnější variantou ošetření hned po známém fungicidu Talent. Ostatní esenciální oleje jsou spíše v pozadí a jejich účinnost není v tomto případě patrná.



Graf 6 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia *Venturia inaequalis*-izolát (4/16/3/3)..

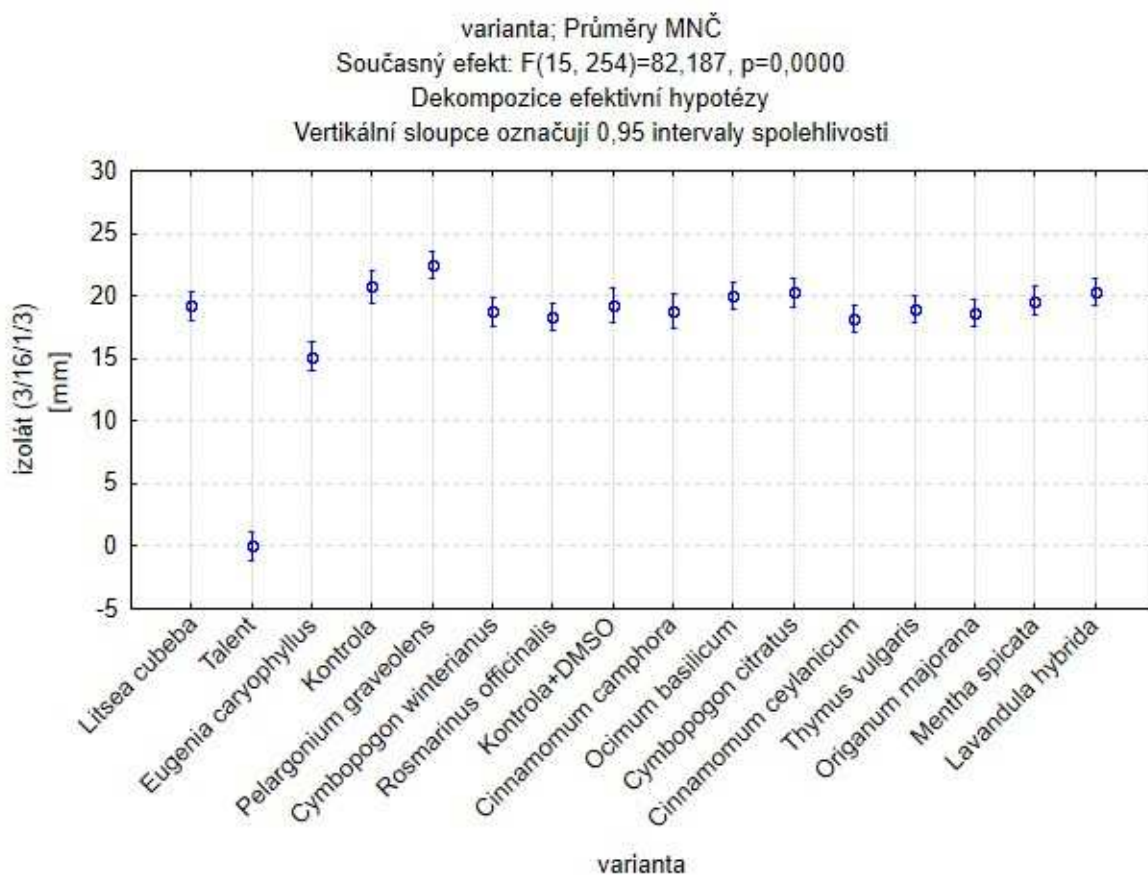
Na grafu 6. můžeme vypočítat vliv jednotlivých variant ošetření esenciálními oleji na růst mycelia *Venturia inaequalis*-izolát (4/16/3/3). Z tohoto grafu je patrné, že esenciální olej *Eugenia caryophyllus* je druhou nejúspěšnější variantou hned po fungicidu Talent. Dalšími úspěšnými esenciálními oleji jsou: *Rosmarinus officinalis* a *Cinnamomum camphora*.

varianta; Průměry MNČ  
 Současný efekt:  $F(15, 266)=52,079$ ,  $p=0,0000$   
 Dekompozice efektivní hypotézy  
 Vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti



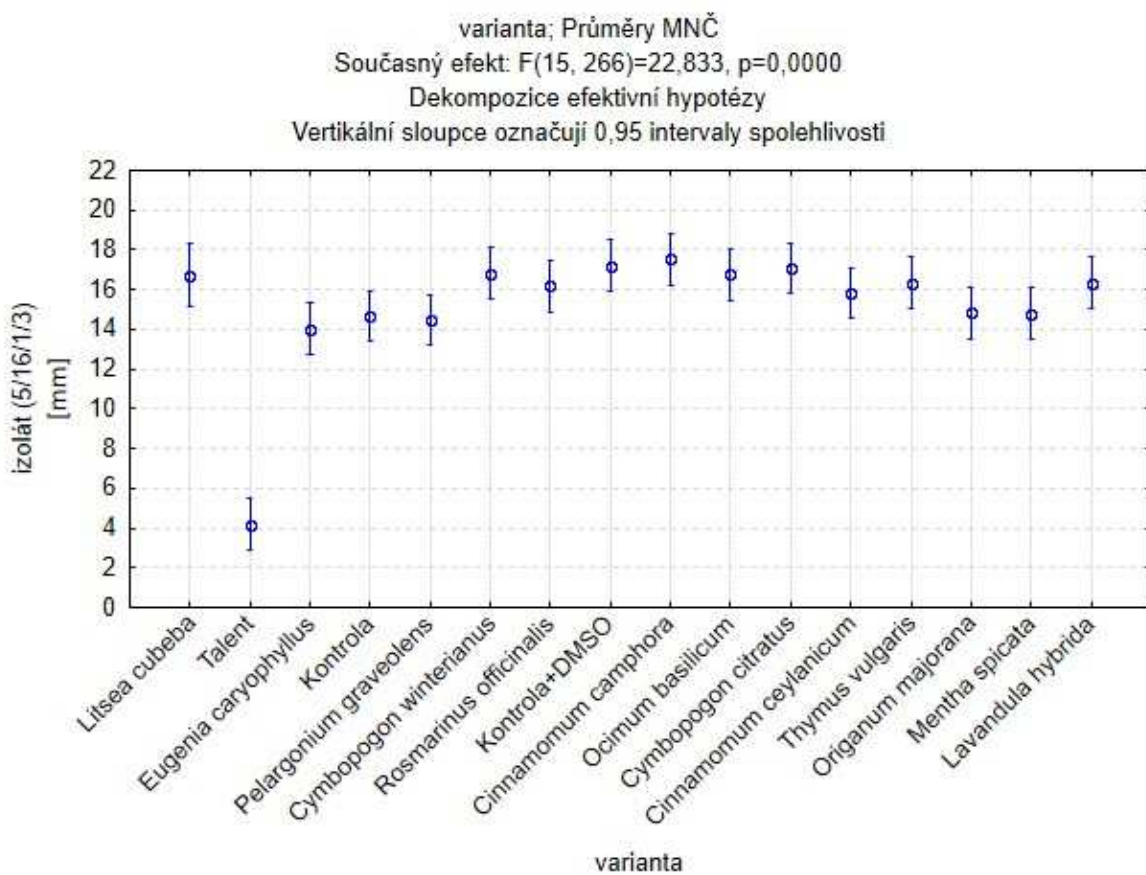
Graf 7 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia *Venturia inaequalis*-izolát (3/16/8/3).

Z grafu 7. lze vyčíst vliv jednotlivých variant ošetření esenciálními oleji na růst mycelia *Venturia inaequalis* – izolát (3/16/8/3). Z tohoto grafu vyplývá, že druhou nejúspěšnější variantou ošetření je zde esenciální olej z *Eugenia caryophyllus*. Dalšími úspěšnými esenciálními oleji jsou: *Cymbopogon winterianus*, *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus*, *Cinnamomum camphora* a *Litsea cubeba*.



Graf 8 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia *Venturia inaequalis*–izolát (3/16/1/3).

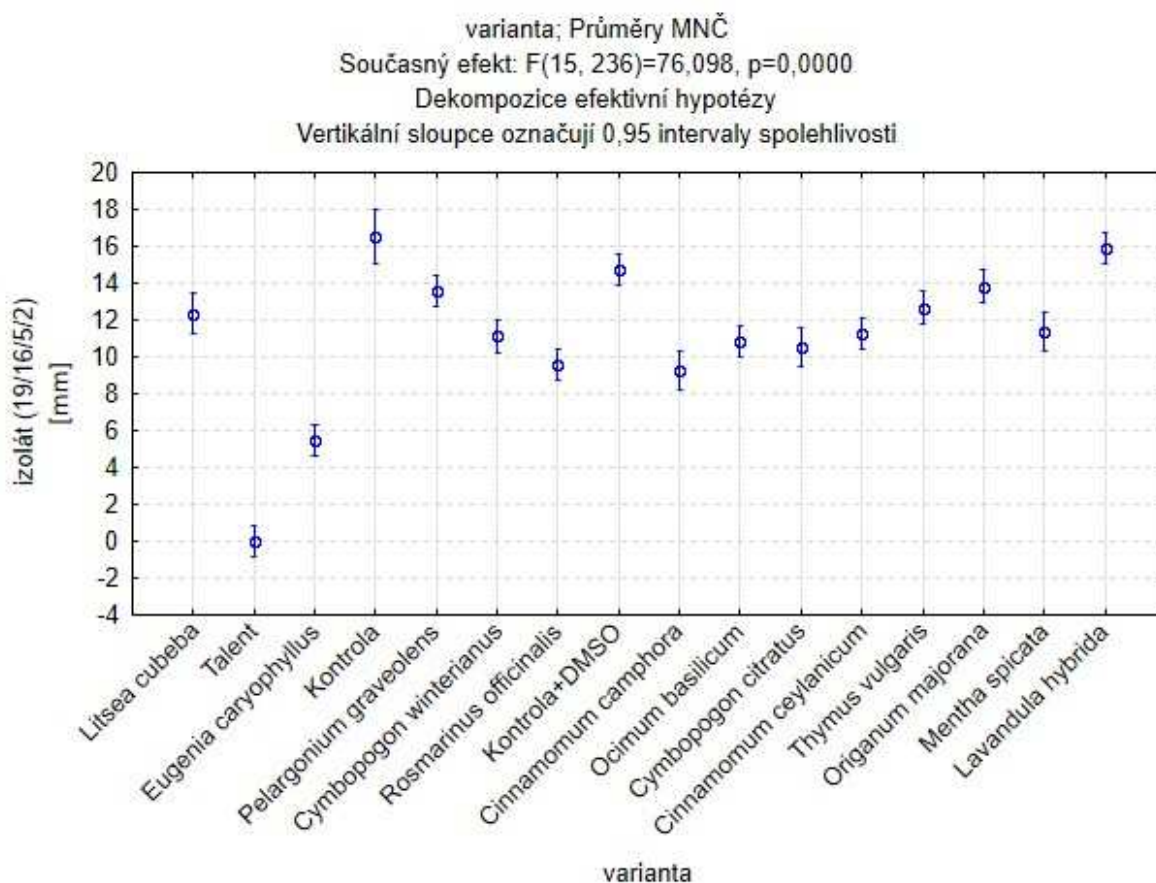
Z grafu 8. lze vyčíst vliv jednotlivých variant ošetření esenciálními oleji na růst mycelia *Venturia inaequalis*–izolát (3/16/1/3). Z tohoto grafu vyplývá, že esenciální olej z *Eugenia caryophyllus*, zde nemá až takové účinky, jako je tomu např. u grafu 3. či 8. Ostatní esenciální oleje jsou v účinnosti téměř vyrovnané a nemají na daný izolát větší vliv.



Graf 9 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia *Venturia inaequalis* – izolát (5/16/1/3).

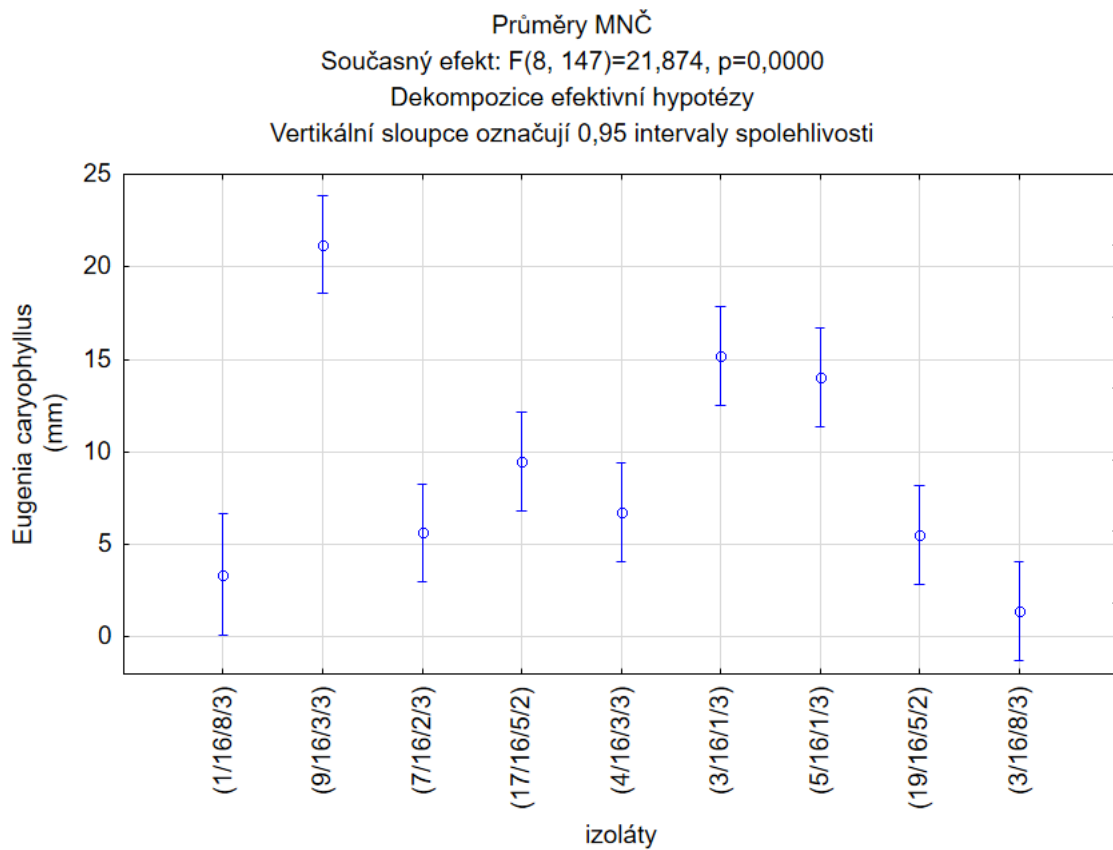
Na grafu 10. lze vypořadovat vliv jednotlivých variant ošetření esenciálními oleji na růst mycelia *Venturia inaequalis* – izolát (5/16/1/3). Stejně jako v případě grafu 9., esenciální olej z *Eugenia caryophyllus* je druhou neúspěšnější variantou, není však tak progresivní, jako je tomu např. u grafu 3 či 8. Další esenciální oleje nemají na daný izolát téměř žádný vliv.





Graf 10 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia *Venturia inaequalis* – izolát (19/16/5/2).

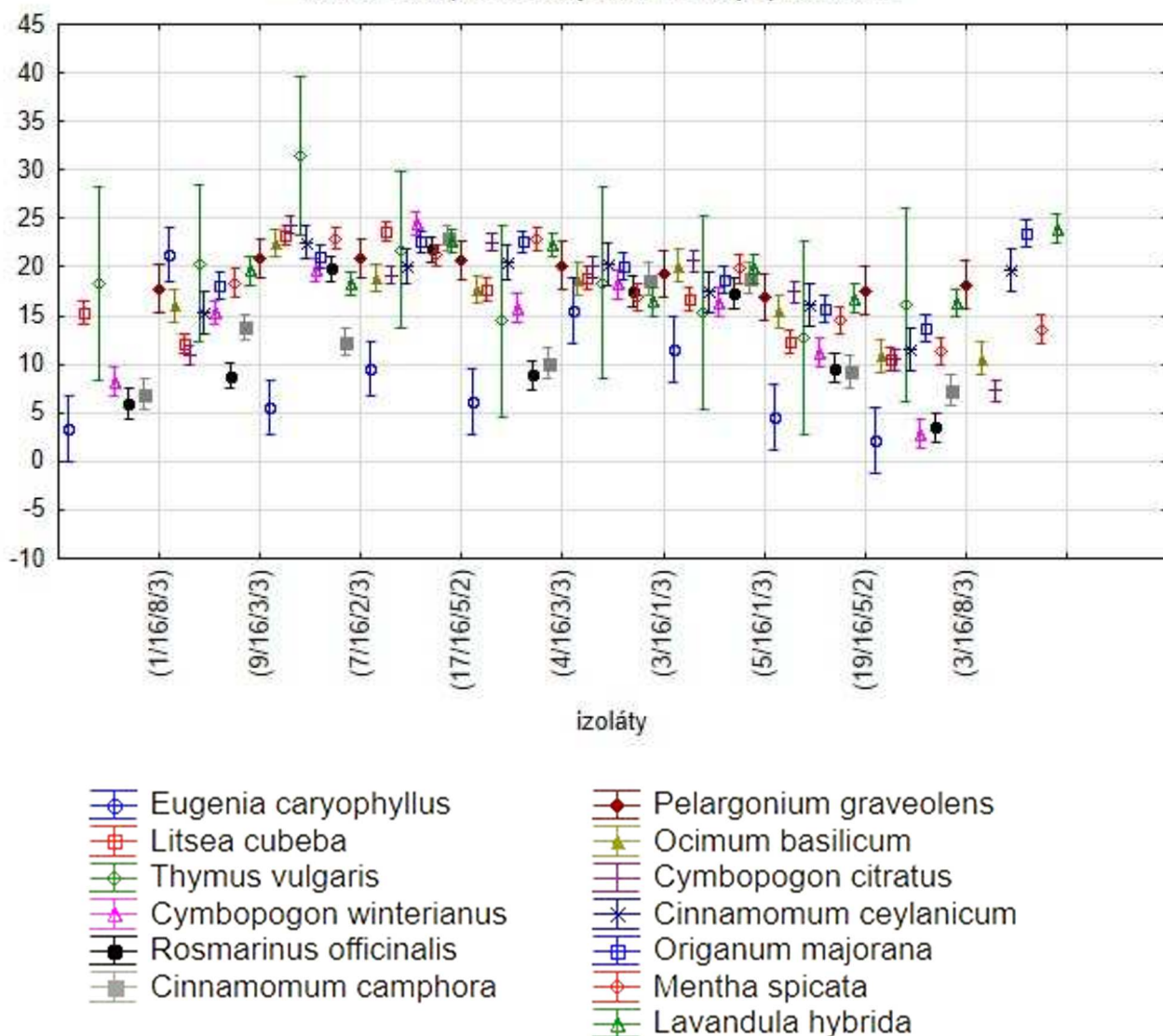
Na grafu 10. můžeme vypořadovat vliv jednotlivých variant ošetření esenciálními oleji na růst mycelia *Venturia inaequalis* – izolát (19/16/5/2). Druhým nejúspěšnějším ošetřením je esenciální olej z *Eugenia caryophyllus*. Dalšími esenciálními oleji, které mají značný účinek jsou: *Cinnamomum camphora*, a *Rosmarinus officinalis*. Ostatní oleje vykazovaly větší či menší míru účinku.



Graf 11 - Vliv esenciálního oleje z *Eugenia caryophyllus* na dané izoláty.

Na grafu 11. můžeme vidět vliv esenciálního oleje *Eugenia caryophyllus* (hřebíčku), na dané izoláty *Venturia inaequalis*. Jak je zde patrné, největší vliv měl esenciální olej na izoláty (3/16/8/3) a (1/16/8/3). Největší odchylka v působení nastala u izolátu (9/16/3/3).

Průměry MNČ  
 Wilksovo lambda=,00008, F(104, 734,04)=20,884, p=0,0000  
 Dekompozice efektivní hypotézy  
 Vertikální sloupce označují 0,95 intervaly spolehlivosti



Graf 12 - Vliv esenciálních olejů na dané izoláty.

Na grafu 12 lze vidět vliv všech 13. esenciálních olejů na dané izoláty. Jak je z grafu patrné, nejvyšší účinnost všech olejů, je především na izoláty - 1/16/8/3, 3/16 8/3. Naopak nejmenší účinnost esenciálních olejů, se odráží na izolátu - 17/16/5/2. V rámci porovnání účinnosti všech 13. esenciálních olejů, nejlépe na všechny izoláty působí olej z *Eugenia caryophyllus* dále pak z *Cinnamomum camphora* a z *Rosmarinus officinalis*. Esenciální olej z *Cymbopogon winterianus*. Co se týče esenciálního oleje z *Thymus vulgaris*, ve všech případech je viditelná jeho značná variabilita a nestabilita působení. Nelze tedy s jistotou určit jeho pravou účinnost.

## 6. Diskuse

Cílem práce bylo otestovat vliv esenciálních olejů na monosporové izoláty *Venturia inaequalis*. Především tak, vliv vybraných esenciálních olejů na klíčení konidií a růst mycelia v *in vitro* podmínkách. Využití esenciálních olejů má do budoucna velký potenciál a široké uplatnění a jejich pozitivní působnost již byla zkoumána v mnoha rozličných pokusech. Díky esenciálním olejům, které obsahují účinné látky, můžeme úspěšně zničit nebezpečné houby v potravinách či na zdech nebo zlikvidovat škodlivý hmyz (Pavela, 2011).

Například vliv esenciálních olejů proti bakteriím uvádí Mbega et al. (2012). zkoumal vliv esenciálních olejů na patogen *Xanthomonas spp.*, který způsobuje bakteriální listovou skvrnitost na rajčetech a způsobuje tak škody po celém světě. Testy probíhaly s esenciálními oleji o 2 % koncentraci, kterými bylo namořeno osivo. Jako nejúspěšnější esenciální oleje, které velmi účinně inhibovaly růst *Xanthomonas spp.*, v *in vitro* podmínkách, byly z *Rosmarinus officinalis* a *Eucalyptus globules*. Navíc u těchto esenciálních olejů nebyl pozorován žádný negativní vliv na klíčení semen rajčat.

Nagy et al 2014 uvadějí dobré účinky esenciálních olejů z rostlin *Citrus sinensis*, *Cinammomum verum* či *Thymus vulgaris* proti klíčení konidií *Venturia inaequalis* v *in vitro* podmínkách. Dále testovali účinky esenciálního oleje z *Cinammomum verum* in planta, kde vykazoval dobré preventivní a kurativní účinky, až do 24. hodin po inakulaci. V případě 72. hodin po inakulaci, byl účinek esenciálního oleje značně snížen.

Vliv esenciálního oleje z *Thymus vulgaris* na patogen *Botrytis cinerea* zkoumali Gebel and Magurno (2014). V tomto případě esenciální olej vykazoval vysokou účinnost proti polyfágnímu hbovému patogenu. Dalším, kdo zkoumal účinné látky obsažené v esenciálním oleji *Thymus vulgaris* a porovnával ho s účinky syntetického Thymolu, byl Moghtader (2012). Účinnost byla zkoumána na patogenu *Aspergillus niger*. Zjistil, že esenciální olej prokazuje lepší účinnost než syntetický thymol, který navíc nabýval účinnosti až při vysoké koncentraci 10%.

Naproti tomu Kláříč et al. (2007) zjistil pravý opak. Zkoumal vliv esenciálního oleje a syntetického thymolu na patogeny, jako např. *Aspergillus sp.*, *Cladosporium* či *Mucor sp.*, které se běžně nacházejí v domácnostech na vlhkých stěnách. Zjistil tak lepší působení syntetického thymolu na ovlivnění růstu houbových patogenů

V této bakalářské práci vykazoval esenciální olej z *Thymus vulgaris* větší vliv pouze na inhibiční účinky při klíčení spor *Venturia inaequalis*. V případě vlivu na růst mycelia, byl značně nestabilní. Je možné, že dané izoláty nemusely být čistě jen patogenem *Venturia*

*inaequalis*, proto je zde účinnost jinak spolehlivého esenciálního oleje nízká. Ovšem aby mohlo být tvrzení pravdivé, izoláty by musely být podrobeny dalšímu laboratornímu šetření- např. molekulární analýze. Nejlepších výsledků však vykazoval esenciální olej z *Eugenia caryophyllus* (syn. *Syzygium aromaticum*).

Například účinky eugenolu, který je obsažen v esenciálním oleji z *Eugenia caryophyllus*, byly zmíněny ve studii od Rana et al. (2011). Kdy pozorovali jeho inhibiční účinky na růst mycelia u patogenů *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus sp.* či *Fusarium moniliforme*, které běžně postihují rostliny.

Inhibiční účinek vykazoval *Eugenia caryophyllus* též na patogeny jako: *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* či *R. aerugiosus*. Extrakt z *E. caryophyllus* byl získán pomocí extrakce v acetonu a ethanolu (Tomar et al., 2015). Hřebíček je využíván v mnoha směrech. Již dlouhá léta jsou známy jeho antibakteriální, analgetické, antiseptické, anestetické ale právě i fungicidní a fungistatické účinky. Pavela (2012) uvádí významné insekticidní a akaricidní účinky proti škůdcům, jako např. *Spodoptera sp*, *Leptinotarsa, sp.* *Tetranychus urticae* a dokonce i mšice. Eugenol má dokonce vliv i na inhibici růstu larev. A je využíván i v řadě repelentů. Výtažek z hřebíčku je však také obsažen v řadě přípravků, jako je Herbadent, Alpa nebo Eucasol. Výsledky, kterých bylo v této práci dosaženo, dávají nový pohled na problematiku týkající se boje proti strupovitosti. Jedná se však stále o úspěchy provedené v laboratorních podmínkách (*in vitro*). Pokud by se do budoucna povedlo úspěšné převedení účinků tohoto oleje do pokusů *in vivo* a dále pak do běžné praxe, odpadlo by tím tak několikanásobné ošetřování chemickými prostředky, které neprospívají přírodě ani lidskému zdraví. Naproti tomu většina testovaných esenciálních olejů je pro lidi bezpečná a neobsahuje tak závadné složky pro jejich zdraví.

## 7. Závěr

Cílem práce bylo otestovat vliv vybraných esenciálních olejů na vývoj patogena jabloní *Venturia inaequalis*. Z celé škály esenciálních olejů bylo nakonec vybráno 13 nejúčinnějších, z předešlých pokusů.

Samotný vliv vybraných olejů byl sledován u klíčení konidií a růstu mycelia v *in vitro* podmínkách. Dále byla testována fytotoxicita na utržených mladých listech jabloní odrůdy Idared. Jedná se o všeobecně známou odrůdu, která je velice citlivá na strupovitost. Na listy byl nanesen enkapsulovaný esenciální olej z *Thymus vulgaris* o různých koncentracích. Jak bylo patrné z obrázku 10., k tzv. „popálení“ listů, došlo až od koncentrace 30 %.

Zvolená vědecká hypotéza, zda existují rostlinné esence, které při aplikaci mají přímý dopad na vývoj patogena jabloní *Venturia inaequalis*, byla v práci potvrzena. V rámci zkoumání vlivu esenciálních olejů na růst mycelia *Venturia inaequalis*, bylo prokázáno značné zamezení vývoje patogena nebo jeho potlačení u některých vybraných esenciálních olejů. Největší účinnost vykazoval olej z *Eugenia caryophyllus*. V případě vlivu na mortalitu spor, dokonce předčil samotný fungicid Talent a byl druhou nejlepší variantou ošetření, v případě vlivu na růst mycelia *V.i.* Dále byly úspěšné esenciální oleje z *Cinnamomum Camphora* a *Rosmarinus officinalis*. Esenciální olej z *Thymus vulgaris* byl úspěšný pouze na mortalitu spor ale jeho vliv na růst mycelia, působil podle statistických výsledků značně rozmanitě a neustáleně. Nedá se tedy s jistotou říci, zda skutečně nějakým způsobem zabraňuje růstu mycelia. Ostatní oleje pak měly větší či menší vliv na potlačení růstu mycelia *Venturia inaequalis*.

Výsledky z této práce byly též publikovány v periodiku Zahradnictví č. 1/2017.

## 8. Bibliografie

- Ackermann, P. 1998.** *Zásady efektivní ochrany proti strupovitosti jabloně.* Praha : Zahradnictví č. 23: 15-19 s, 1998. ISSN:1213-7596.
- Ackermann, P., Kožešník, M., Křištof, J., Navrátilová, M., Ráčil, K., Tichá, H., Vaňurová, E. 2004.** *Metodiky ochrany zahradních plodin.* Praha : Nakladatelství Květ, 2004, s. 303.
- Aldwinckle H.S., Gustafson H.L. and Lamb R.C.** *Early determination of genotypes for apple scab resistance by forced flowering of test cross progenic.* s.l. : Euphytica v.25, pp. 185-191.
- Bagar, M. 2012.** *Vinař-Sadař:odborný časopis pro vinohradníky, vinaře a ovocnáře :Řešení strupovitosti i dalších chorob v IP a EZ.* Olomouc : Baštan, 2012, s. 90-91. ISSN:1804-3054.
- Bakkali, F., Averbek, S., Averbek, D., Idaomar, M. 2008.** Biological effect of essential oils.[Online],2008,[Citace:20.22017.];  
<http://www.bashaar.org.il/files/%D7%91%D7%99%D7%95%D7%97%D7%A7%D7%A8%20-%20%D7%94%D7%A0%D7%9E%D7%9C%D7%94%202.pdf>.
- Bálint, J., Turóczi, B., Máthé, I., Benedek, K., Szabó, K., Balog, A. 2014.** In Vitro and In Vivo Effect of Poplar Bud (*Populi gemma*) Extracts on Late Blight (*Phytophthora infestans*).[Online],2014.[Citace:20.112016.];[https://www.researchgate.net/publication/264047536\\_In\\_Vitro\\_and\\_In\\_Vivo\\_Effect\\_of\\_Poplar\\_Bud\\_Populi\\_gemma\\_Extracts\\_on\\_Late\\_Blight\\_Phytophthora\\_infestans](https://www.researchgate.net/publication/264047536_In_Vitro_and_In_Vivo_Effect_of_Poplar_Bud_Populi_gemma_Extracts_on_Late_Blight_Phytophthora_infestans).
- Baloun, J., Jahodář, L., Leifertová, I., Štípek, S. 1989.** *Rostliny způsobující otravy a alergie.* Praha : Avicenum-zdravotnické nakladatelství, 1989, s. 236 s. ISBN: 08-083-89.
- Baser, C.,H.,K., Buchbauer, G. 2010.** *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications.* United States of America : CRC Press, 2010, p. 949. ISBN: 978-1-4200-6315-8.
- Bassolé, I. H. N. and Juliani, H. N. 2012.** *Essentials Oils in Combination and Their antimicrobial Properties.* Université de Ouagadougou,The State University of New Jersey : Molecules, 2012, pp. 3990-4006, ISSN: 1420-3049.
- Benada, J., Špaček, J. 1962.** *Zemědělská fytopatologie.* Praha, 1.vydání : Státní zemědělské nakladatelství, 1962. s. 1086.
- Bénaouf, G., Parisi, L. 1998.** *Charakterization of Venturia inaequalis pathogenicity on leaf discs of apple trees.* s.l. : Eut. J. Plant Pathology, 1998, pp. 785-793. ISSN:0929-1873.

- Biocont, L. 2010.** *Alginure. Katalog prostředků ekologické a integrované ochrany rostlin.* Brno : Biocont laboratory, 2010, s. 80.
- Blažek, J. a kolektiv. 1998.** *Ovocnictví.* Praha : Květ, 1998, s. 383. ISBN: 80-85362-33-3.
- Blažek, J. 1993.** *Historie šlechtění jabloní proti strupovitosti.* . Praha : Zahrádkář 11/93, ročník XXV. Český zahradnický svaz, s.z., 1993, SSN 0139–7781.
- **2001.** *Pěstujeme jabloně, 1. vydání.* Praha : Brázda, 2001, s. 255. ISBN 80-209-02945.
- **2008.** *Šlechtění jabloní, In Salaš, P. Šlechtění a množení zahradnických rostlin II.* Brno : MZLU v Brně, 2008. ISBN 978-80-7375-161-6.
- Carisse, O., Pillion, P., Rolland, D., Bernier, J. 2000.** Effect of Fall Application of Fungal Antagonists on Spring Ascospore Production of the Apple Scab Pathogen, *Venturia inaequalis*. [Online], 2000; [Cited: 112, 2017.]  
<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2000.90.1.31>.
- Carson, Ch., F., Hammer, A., K. 2011.** *Lipids and Essential oils as Antimicrobial Agent : Chemistry and Bioactivity of Essential oils.* [ed.] Halldor Thormar. United Kingdom : John Wiley and sons, 2011, pp. 203-223. ISBN: 9780470976678.
- Dlouhá, J., Valíček, P., Richter, M. 1995.** *Ovoce, 1. vydání.* Praha : Aventinum, 1995. s. 223. ISBN 80-7151-768-2.
- Dvořák, A. 1987.** *Pěstování jabloní.* Praha, 2. vydání : Státní zemědělské nakladatelství, 1987, s. 352. ISBN 07-098-87.
- Dvořák, A., Vondráček, J. 1969.** *Jablka - Malá pomologie 1.* Praha : Státní zemědělské nakladatelství, 1969, s. 335. ISBN: 07-006-69-04/44.
- Dvořák, A., Vondráček, K., Kohout, K., Blažek, J. 1976.** *Jablka.* Praha : Academia - nakladatelství Československé akademie věd, 1976, s. 588. ISBN 509-21-857.
- Falta V., a kol. 2016.** *Ochrana jádrovín v ekologické produkci.* Praha : Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2016, ISBN: 978-80-7427-194-6.
- Feree, D. C., Warrington, I. 2003.** *Apples: Botany, Production and Uses.* New York : CABI Pub, 2003, p. 660. ISBN: 08-519-9592-6.
- Flohrová, A. 1987.** *Perspektivní pesticidní látky rostlinného a mikrobiálního původu.* Praha : Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, 1987, s. 40.



- Gebel, P.M., Magurno, F. 2014.** ASSESSMENT OF THE ANTIFUNGAL POTENTIAL OF THE ESSENTIAL OIL FROM *Thymus vulgaris* AGAINST *Botrytis cinerea* CAUSATIVE AGENT OF POSTHARVEST GREY MOLD ON STRAWBERRY FRUITS. [Online] 2014; [Cited: 41, 2017.]  
[https://www.researchgate.net/profile/Franco\\_Magurno/publication/270576515\\_Assessment\\_of\\_the\\_antifungal\\_potential\\_of\\_the\\_essential\\_oil\\_from\\_Thymus\\_vulgaris\\_against\\_Botrytis\\_cinerea\\_causative\\_agent\\_of\\_postharvest\\_grey\\_mould\\_on\\_strawberry\\_fruits/links/54ae66](https://www.researchgate.net/profile/Franco_Magurno/publication/270576515_Assessment_of_the_antifungal_potential_of_the_essential_oil_from_Thymus_vulgaris_against_Botrytis_cinerea_causative_agent_of_postharvest_grey_mould_on_strawberry_fruits/links/54ae66).
- Gerberding, Spezialfabrik Konzentrierter Riech- und Aromastoffe. 1962.** *Pfefferminzöle und Menthol*. Holzmeinden : Dragoco, 1962, p. 133.
- Hammer, K., A., Carson, Ch., F. United Kingdom.** *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents : Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils*. [ed.] editor : Halldor Thormar. s.l. : John Wiley and Sons, United Kingdom. pp. 255-307. ISBN: 9780470976678.
- Hay, R.K.M., 1993.** *Volatile Oil crops: their biology, biochemistry and production*. 1. vyd. New Jersey : John Wiley and Sons, 1993, p. 14. s . ISBN: 0-582-07867-9.
- Hluchý M., Ackerman P., Zacharda M., Bagar V., Jetmarová E., Vanek G., 1997.** *Obrazový atlas chorob a škůdců ovocných dřevin a révy vinné*. Brno : Biocont Laboratory s.r.o., 1997, s. 428. ISBN: 80-901874-2-1.
- Hluchý M., Ackermann P., Zacharda M., Laštůvka Z., Bagar M., Jetmarová E., Vanek G., Szöke L., Plíšek B., 2008.** *Ochrana ovocných dřevin a révy v ekologické a integrované produkci*. Brno : Biocont Laboratory spol. s.r.o., 2008, s. 498. ISBN: 978-80-901874-7-4.
- Horák, J. 1998.** *Systémy racionální ochrany ovocných kultur*. Praha : Nakladatelství Květ, 1998, s. 36.
- Hudec, K., Gutten, J. 2007.** *Encyklopedie chorob a škůdců, komplexní ochrana vaší zahrady*. Brno : Computer press, 2007, s. 358 ISBN: 8025117682.
- Janick, J., Moore, J. N. 2004.** *Fruit Breeding, Volume 1, Tree and Tropical Fruits*. New York : Wiley, 2004. ISBN: 978-0-471-31014-3.
- Jha, G., Thakur, K., and Thakur, P. 2009.** *The Venturia Apple Pathosystem: Pathogenicity Mechanisms and Plant Defense Responses*. Palampur, India : Hindawi Publishing Corporation, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009, p. 10. ISSN: 1110-7243.

- Juroch, J. 2010a.** *Řízení ochrany proti strupovitosti jabloně (Venturia inaequalis (Cke.) Wint. Závěrečná práce.* Brno : CV MENDELU, 2010a.
- Juroch, J. 2010b.** *Strupovitost jabloně - nejvýznamější houbová choroba jabloní.* Praha : Ministerstvo zemědělství ČR, 2010b.
- Kantová, J., Kant, J. 2004.** *Přírodní léčiva: homeopatie, éterické oleje, krystaly, domácí léky.* Praha : Slovart, 2004, 256 s. ISBN: 80-7209-547-1.
- Klarić M.S., Kosalec, I., Mastelić, J., Piecková, E., Pepeljnak, S. 2007.** *Antifungal activity of thyme (Thymus vulgaris L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings.* Zagreb : Letters in Applied Microbiology, 2007, pp. 36-42.
- Kloutvorová, J., Lánský, M., Kupková, J., Vávra, R., Svoboda, A., Boček, S. 2009.** *Monitoring citlivosti populace houby Venturia inaequalis k vybraným pesticidům, Vědecké práce ovocnářské č. 21.* Praha : autor neznámý, 2009., s. 37-43. ISSN: 0231-6900.
- Koblížek, J. 2006.** *Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků.* Tišnov, 2. rozšířené vydání : Sursum, 2006, 551s. ISBN:80-732-3117-4.
- Kůdela, V., Kocourek, F., Bárnét, M. 2012.** *České a anglické názvy chorob a škůdců (Czech and English Names of Plant Diseases and Pests).* Praha : Profi Press s.r.o, 2012, 272 s. ISBN: 978-80-905080-4-0.
- Lang, G., Buchbauer, B. 2011.** *A review on recent research results (2008-20010) on essential oils as antimicrobials and antifungals.* Available from (wileyonlinelibrary.com) : Flavour and Fragrance Journal (online), 2011, DOI10.1001/ffj.2082.
- Lánský, M. 2005.** *Integrovaná ochrana ovoce v systému integrované ochrany.* Holovousy : Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský., 2005, 159s. ISBN:80-902636-7-4..
- Lánský, M., Kloutvorová, J. 2014.** *Strupovitost jabloně: nejvážnější choroba jablek.* [Online], 2014; [Citace: 21. 11 2016.] <<https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/choroby/strupovitost-jablone-nejvaznejsi-choroba-jablek>>.
- Lichonos, F. D. 1964.** *K voprosu o sistematike roda Malus Mill. - jablonja. Trud. priklad.* místo neznámé : Bot. Genet. Selek. 36, 1964, s. 5-16.
- Linkens, H.F., Jackson, J.F. 2011.** *Essential oils and waxes.* Berlin : Springer-Verlag, 2011, p. 337. ISBN-13 :978-3-642-84025-8.
- MacHardy, W. E. 1996.** *Apple scab: Biology, Epidemiology and Managment.* [Online], 1996;[Cited:418,2016.] <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/AppleScab.aspx>. ISBN: 978-089054-206-4.

- Maňasová, M., Wenzelová, J., Zouhar, M., Mazáková, J., Ryšánek, P., Balážová, K. 2017.** *Vliv esenciálních olejů na původce strupovitosti jabloně Venturia inaequalis*. Praha : Profi Press s. r. o., 2017, s. 68-72. ISSN : 1213-7596.
- Mbega, E., R., Magabala, R.,B., Mortensen, C.,N., Wulff,E.,G.,. 2012.** *Evaluation of essential oils as seed treatment for the kontrol of Xanthomonas spp. Asociated with the bacterial Lea spot of tomato in Tanzania*. s.l. : Journal of plant pathology, 2012, pp. 273-281. 94(2).
- Minařík, J. 1979.** *Farmakognosie*. Praha : Avicenum - zdravotnické nakladatelství, 1979, 383 s.
- Nagy, G., Hochbaum, T., Sárosi, S., Ladányi, M. 2014.** *In Vitro and in Planta Activity of Some Essential Oils against Venturia inaequalis (Cooke) G. Winter*. s.l. : ResearchGate, 2014, pp. 109-114. ISSN 0255-965X.
- Pavela. 2012.** *Rostlinné pesticidy (55.díl) Eugenia aromatica - hřebíčkovec vonný, č. 3/2012;* České Budějovice : Kurent, s.r.o., 2012, ISSN: 1801-7673.
- Pavela, R. a Bárnet, M. 2011.** *Alternativní plodina Saturejka zahradní (Saturea hortensis L.) pěstování, význam a využití v ochraně rostlin*. Praha 6-Ruzyně ,: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2011, 24 s. ISBN: 978-80-7427-083-3.
- Pavela, R. 2011.** *Botanické pesticidy*. České Budějovice : Kurent, s.r.o., 2011, 128 s. ISBN: 978-80-87111-26-0.
- Rana, I.S., Rana, A.S., Rajak, Ch. R. 2011.** *Evaluation of antifungal activity in essential oil of the Syzygium aromaticum (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol*. Sao Paulo : MEDICAL MICROBIOLOGY, 2011, ISSN 1517-8382.
- Rao, V.P.S. and Pandey, D. 2007.** *Extraction of essential oil and its applications, Bachelor Thesis*. Rourkela : National Instituteof Technology, 2007, p. 38.
- Sandskär, B. 2003.** *Apple Scab (Venturia inaequalis) and Pests in organic Orchards, Doctoral Thesis*. Alnarp : Swedish University of Agricultural Sciences, 2003, ISSN 1401-6249; ISBN 91-576-6416-1.
- Smejkal, M. 1992.** *Systém a evoluce vyšších rostlin - In: Rozsypal, S. et al., Fylogeneze, systém a biologie organismů*. Praha : SPN, 1992, s. 205-350.
- Sousa, R. M. O. F., Rosa, J. S., Silva, C. A., Almeida, M. T. M., Novo, M. T., Cunha, A. C.,Fernandes Ferreira, M. 2015.** Larvicidal, molluscicidal and nematocidal activities of essential oils and compounds from Foeniculum vulgare. [Online], 2015, [Cited: 2 28, 2017.] <https://link.springer.com/article/10.1007/s10340-014-0628-9>, p. 413-426

- Stensvand A., Amundsen T., Semb L., 1998.** *Discharge and Dissemination of Ascospore by Venturia inaequalis During Dew. Plant disease.* 1998, Vols. Number 7: p. 761-764.
- Thakur K., Chawla V., Bhatti S., Swarnkar M. K., Kaur J., Shankar J., Jha, G. 2013.** De Novo Transcriptome Sequencing and Analysis for *Venturia inaequalis*, the Devastating Apple Scab Pathogen. *PLoS ONE* 8(1): e53937. . [Online], 2013; [Cited: 12 16, 2016.] <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053937>.
- Thiesz, R., Balog, A., Ferencz, L., Albert J. 2007.** The Effects of plant extracts on apple scab (*Venturia inaequalis* Cooke) under laboratory conditions. [Online], 2007; [Cited: 1 21, 2017.] [https://www.researchgate.net/publication/260869712\\_The\\_effects\\_of\\_plant\\_extract\\_ons\\_on\\_apple\\_scab\\_Venturia\\_inaequalis\\_Cooke\\_under\\_laboratory\\_conditions](https://www.researchgate.net/publication/260869712_The_effects_of_plant_extract_ons_on_apple_scab_Venturia_inaequalis_Cooke_under_laboratory_conditions).
- Tomar, A., Tomar, Y., Tripathi, K.P. 2015.** *COMPARATIVE STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EUGENIA CARYOPHYLLUS AND CLEOME VISCOSA.* India : World Journal of Pharmaceutical Research, 2015, pp. 1477-1481. ISSN 2277– 7105.
- Vaillancourt, L.J., Hartman, J.R. 2000.** *Apple scab. The Plant Health Instructor.* [online, cit.3/2017]. Dostupné z WWW: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/AppleScab.aspx> ,2000, DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1005-01, Updated 2005.
- Váňa, J. 1996.** *Systém a vývoj hub a houbových organismů.* Praha : Karolinum, 1996, s. 68-109. ISBN: 8071841757.
- Vaverka, S. 1995.** *Zemědělská fytopatologie.* Brno : MZLU, 1995, s. 192. ISBN 80-7157-167-9.
- Vávra, R., Falta, V., Holý, K., Bagár, M. 2011.** *Zahradnictví : Systém ochrany jabloní proti strupovitosti jabloně v organické produkci.* Praha : Proffí Press s. r. o., 2011, s. 10-12. ISSN: 1213-7596.
- Vejl, P., Melounová, M., Sedlák, P., Zoufalá, J., Blažková, H., Milec, Z., Blažej, J., Vávra, R., Křelinová, J. 2005.** *Molekulární markery ve šlechtění jabloní.* Praha : Česká zemědělská univerzita, 2005, 78 s. ISBN: 80-213-1287-4.
- Voldřich, M. 2009.** *Výroba aromat a trestí. In: Co byste měli vědět o výrobě potravin ? : Technologie potravin.* vyd. 1 Ostrava : Key Publishing, 2009, s. 529-532. ISBN: 978-80-7418-051-4.
- Vrtílek, P. 2011.** *Bakalářská práce: Identifikace silic u vybraných druhů léčivých, aromatických a kořeninových rostlin.* Brno : Mendelova univerzita v Brně, 2011, s. 22-26.

**XU X., ROBERTS T., BARBARA D., HARVEY N. G., GAO L., SARGENT D. J. 2009.**

A genetic linkage map of *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. [Online], 2009; [Citate: 18. 4 2017.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19689797>.

## 9. Seznam grafů

Graf 1 - Vliv esenciálních olejů na mortalitu klíčících spor <i>V.i.</i> .....	25
Graf 2 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia <i>Venturia inaequalis</i> - izolát (1/16/8/3).....	26
Graf 3 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia <i>Venturia inaequalis</i> -izolát (9/16/3/3).....	27
Graf 4 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia <i>Venturia inaequalis</i> -izolát (7/16/2/3).....	28
Graf 5 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia <i>Venturia inaequalis</i> -izolát (17/16/5/2).....	29
Graf 6 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia <i>Venturia inaequalis</i> -izolát (4/16/3/3).....	30
Graf 7 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia <i>Venturia inaequalis</i> -izolát (3/16/8/3).....	31
Graf 8 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia <i>Venturia inaequalis</i> -izolát (3/16/1/3).....	32
Graf 9 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia <i>Venturia inaequalis</i> -izolát (5/16/1/3).....	33
Graf 10 - Vliv ošetření jednotlivých variant na růst mycelia <i>Venturia inaequalis</i> - izolát (19/16/5/2).....	34
Graf 11 - Vliv esenciálního oleje z <i>Eugenia caryophyllus</i> na dané izoláty.....	35
Graf 12 - Vliv esenciálních olejů na dané izoláty.....	36

## 10. Seznam obrázků

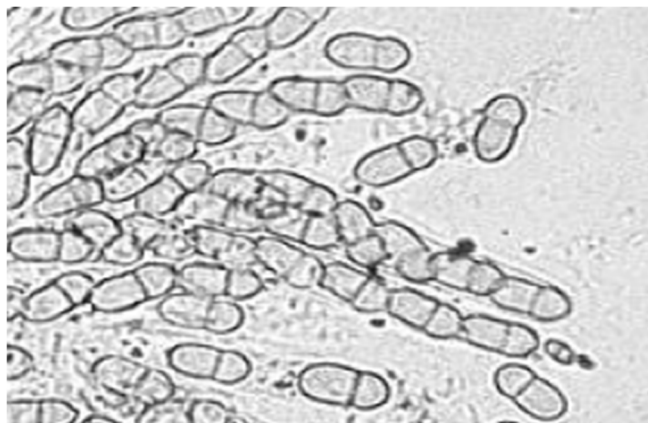
Obrázek 1 Askospory <i>Venturia inaequalis</i> (Kloutvorová, 2009).....	50
Obrázek 2 Vývojový cyklus <i>Venturia inaequalis</i> (Vejl a kol., 2005 ) .....	50
Obrázek 3 Konidie <i>Venturia inaequalis</i> (Vaillancourt and Hartman,2000).....	50
Obrázek 4 Příznaky strupovitosti na listu .....	51
Obrázek 5 Příznaky strupovitosti na plodu.....	51
Obrázek 6 Příznaky tzv. skládkové strupovitosti na plodech .....	52
Obrázek 7 Vzorce významných látek obsažených v esenciálních olejích.....	52
Obrázek 8 Označené lokality odběru izolátů na pokus- vliv esenciálních olejů na růst mycelia .....	53
Obrázek 9 Petriho misky (60mm).....	54
Obrázek 10 Mycelium <i>V.i.</i> , ošetření olejem <i>EC</i> .....	54
Obrázek 11 Ošetřené listy jabloní esenciálním olejem z <i>Thymus vulgaris</i> o konečné koncentraci 1 %.....	55
Obrázek 12 Ošetřené listy jabloní esenciálním olejem z <i>Thymus vulgaris</i> o konečných koncentracích 2% a 3% .....	55
Obrázek 13 Ošetřené listy jabloně esenciálním olejem z <i>Thymus vulgaris</i> o konečné koncentraci 4 % a 5%.....	56
Obrázek 14 Ošetření enkapsulovaným esenciálním olejem z <i>Thymus vulgaris</i> o konečné koncentraci 6% a 7%.....	56
Obrázek 15 Ošetřené listy jabloní esenciálním olejem z <i>Thymus vulgaris</i> o konečné koncentraci 8% a 9 %.....	57
Obrázek 16 Detail velmi silných nekrot – následek ošetření es. olejem z <i>TV</i> (konečná koncentrace 9%).....	57

## 11. Seznam tabulek

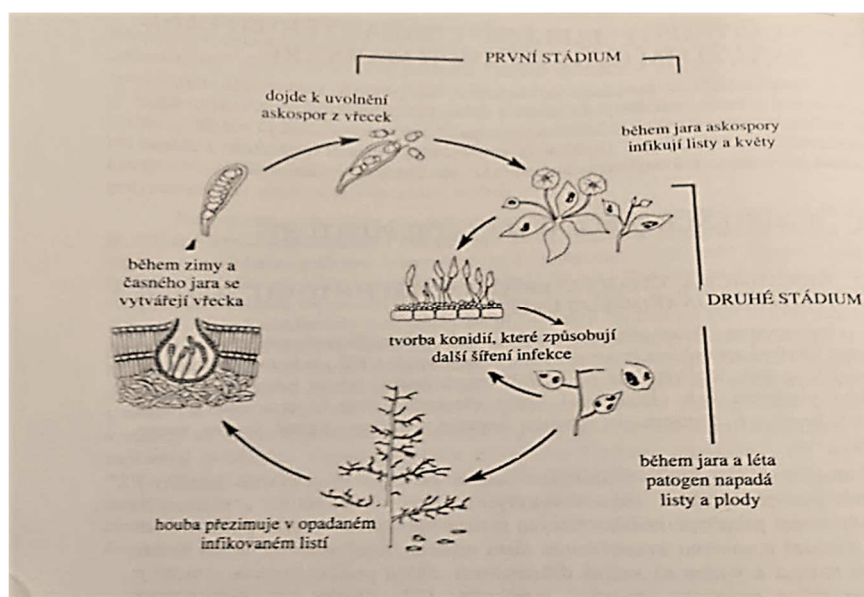
Tabulka 1 - Seznam izolátů <i>Venturia inaequalis</i> , použitých na pokus-vliv esenciálních olejů na růst mycelia .....	20
Tabulka 2 - seznam vybraných esenciálních olejů.....	21
Tabulka 1 - Podmínky pro vznik infekce patogenem <i>Venturia inaequalis</i> - dle Mills, LaPlante 1954; upraveno podle Blažka, 2001. ....	58
Tabulka 4 - Tukeyův test pro izolát (1/16/8/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.....	58
Tabulka 5 - Tukeyův test pro izolát (9/16/3/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.....	58
Tabulka 6 - Tukeyův test pro izolát (7/16/2/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.....	60
Tabulka 7 - Tukeyův test pro izolát (17/16/5/2), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.....	60
Tabulka 8 - Tukeyův test pro izolát (4/16/3/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.....	61
Tabulka 9 - Tukeyův test pro izolát (3/16/8/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.....	61
Tabulka 10 - Tukeyův test pro izolát (3/16/1/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.....	62
Tabulka 11 - Tukeyův test pro izolát (5/16/1/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.....	62
Tabulka 12 - Tukeyův test pro izolát (19/16/5/2), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.....	63



### 13. Přílohy



Obrázek 1 Askospory *Venturia inaequalis* (Kloutvorová, 2009)



Obrázek 2 Vývojový cyklus *Venturia inaequalis* (Vejl a kol., 2005 )



Obrázek 3 Konidie *Venturia inaequalis* (Vaillancourt and Hartman,2000)



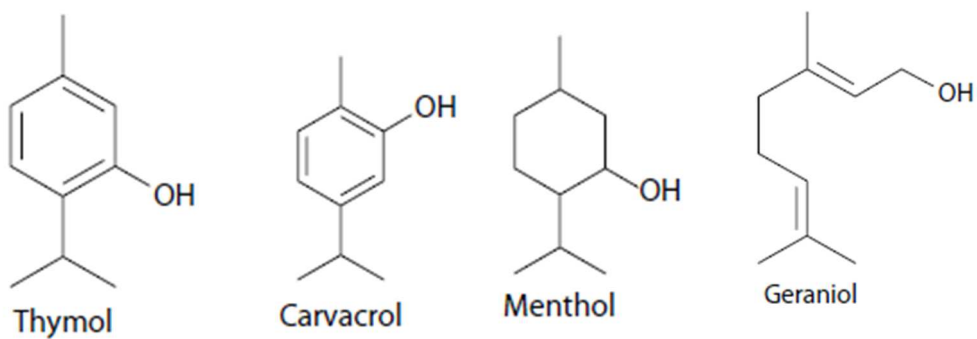
*Obrázek 4 Příznaky strupovitosti na listu*



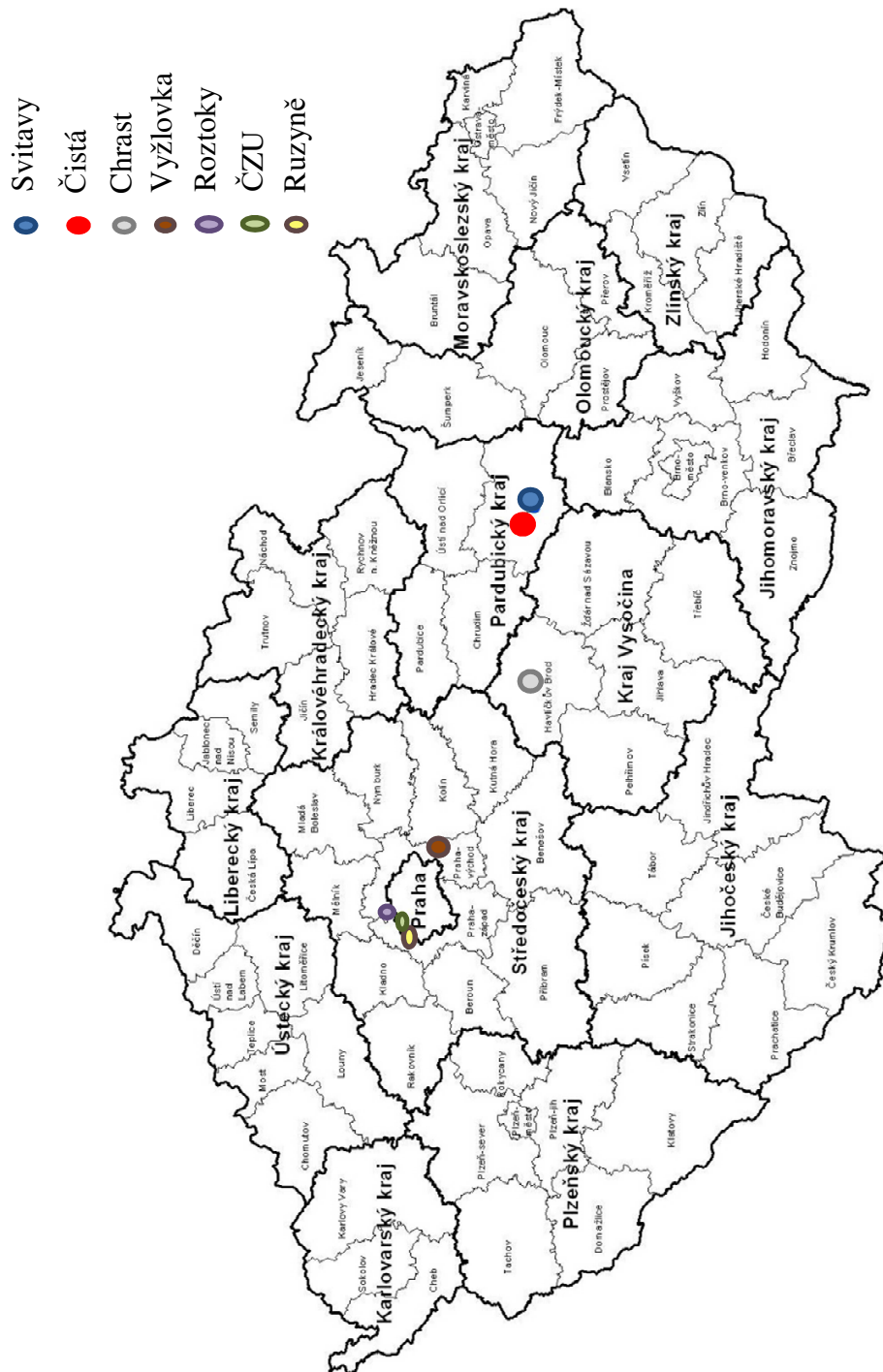
*Obrázek 5 Příznaky strupovitosti na plodu*



Obrázek 6 Příznaky tzv. skládkové strupovitosti na plodech



Obrázek 7 Vzorce významných látek obsažených v esenciálních olejích



Obrázek 8 Označené lokality odběru izolátů na pokus-vliv esenciálních olejů na růst mycelia



Obrázek 9 Petriho misky (60mm)



Obrázek 10 Mycelium V.i., ošetření olejem EC



Obrázek 11 Ošetřené listy jabloní esenciálním olejem z *Thymus vulgaris* o konečné koncentraci 1 %



Obrázek 12 Ošetřené listy jabloní esenciálním olejem z *Thymus vulgaris* o konečných koncentracích 2% a 3%



Obrázek 13 Ošetřené listy jabloně esenciálním olejem z *Thymus vulgaris* o konečné koncentraci 4 % a 5%.



Obrázek 14 Ošetření enkapsulovaným esenciálním olejem z *Thymus vulgaris* o konečné koncentraci 6% a 7%.



*Obrázek 15 Ošetřené listy jabloní esenciálním olejem z *Thymus vulgaris* o konečné koncentraci 8% a 9%.*



*Obrázek 16 Detail velmi silných nekróz – následek ošetření es. olejem z TV (konečná koncentrace 9%)*



Tabulka 3 - Podmínky pro vznik infekce patogenem *Venturia inaequalis* - dle Mills, LaPlante 1954; upraveno podle Blažka, 2001.

Průměrná teplota vzduchu během ovlhčení (°C)	Doba nepřetržitého ovlhčení povrchu listů nutná pro vznik infekce (hod)		
	Slabé	Střední	Silné
0,5 – 5	déle než dva dny		více než 60 hodin
6	25	34	51
7	21	28	42
8	19	25	38
9	15	20	30
10	14	19	28
11	12	18	26
12	11	16	24
13	11	15	23
14	10	14	22
15	10	13	21
16	9	13	19
17 – 24	9	12	18
25	11	14	21
25,5	13	17	26

Tabulka 4 - Tukeyův test pro izolát (1/16/8/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.

Tukeyův HSD test; proměnná izolát (1/16/8/3) Homogenní skupiny, alfa = ,05000; Chyba: meziskup. PČ = 7,5675, sv = 248,00									
Č. buňky	varianta	1	2	3	4	5	6	7	8
2	Talent	****							
3	<i>Eugenia caryophyllus</i>	****	****						
7	<i>Rosmarinus officinalis</i>		****						
9	<i>Cinnamomum camphora</i>		****	****					
11	<i>Cymbopogon citratus</i>			****	****				
6	<i>Cymbopogon winterianus</i>			****	****				
4	Kontrola				****	****			
8	Kontrola+DMSO				****	****	****		
1	<i>Litsea cubeba</i>					****	****	****	****
13	<i>Thymus vulgaris</i>						****	****	
12	<i>Cinnamomum ceylanicum</i>							****	****
5	<i>Pelargonium graveolens</i>							****	****
10	<i>Ocimum basilicum</i>							****	****
15	<i>Mentha spicata</i>							****	****
16	<i>Lavandula hybrida</i>								****
14	<i>Origanum majorana</i>								****

Tabulka 5 - Tukeyův test pro izolát (9/16/3/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.

Tukeyův HSD test; proměnná izolát (9/16/3/3) Homogenní skupiny, alfa = ,05000; Chyba: meziskup. PC = 9,2988, sv =								
Č. buňky	varianta	1	2	3	4	5	6	7
2	Talent	****						
7	Rosmarinus officinalis		****					
1	Litsea cubeba		****	****				
9	Cinnamomum camphora			****				
4	Kontrola			****	****			
6	Cymbopogon winterianus			****	****			
16	Lavandula hybrida				****	****		
8	Kontrola+DMSO				****	****		
13	Thymus vulgaris					****	****	
14	Origanum majorana					****	****	****
3	Eugenia caryophyllus					****	****	****
10	Ocimum basilicum						****	****
12	Cinnamomum ceylanicum						****	****
5	Pelargonium graveolens						****	****
15	Mentha spicata						****	****
11	Cymbopogon citratus							****

Tabulka 6 - Tukeyův test pro izolát (7/16/2/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná izolát (7/16/2/3); Homogenní skupiny, alfa = ,05000							
	varianta	1	2	3	4	5	6	7
2	Talent	****						
7	Rosmarinus officinalis		****					
1	Litsea cubeba		****	****				
9	Cinnamomum camphora			****				
4	Kontrola			****	****			
6	Cymbopogon winterianus			****	****			
16	Lavandula hybrida				****	****		
8	Kontrola+DMSO				****	****		
13	Thymus vulgaris					****	****	
14	Origanum majorana					****	****	****
3	Eugenia caryophyllus					****	****	****
10	Ocimum basilicum						****	****
12	Cinnamomum ceylanicum						****	****
5	Pelargonium graveolens						****	****
15	Mentha spicata						****	****
11	Cymbopogon citratus							****

Tabulka 7 - Tukeyův test pro izolát (17/16/5/2), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření.

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná izolát (17/16/5/2); Homogenní skupiny, alfa = 05000; Chyba: meziskup. PČ =				
	varianta	1	2	3	4
2	Talent	****			
3	Eugenia caryophyllus		****		
10	Ocimum basilicum			****	
12	Cinnamomum ceylanicum			****	****
8	Kontrola+DMSO			****	****
13	Thymus vulgaris			****	****
7	Rosmarinus officinalis			****	****
16	Lavandula hybrida			****	****
11	Cymbopogon citratus			****	****
14	Origanum majorana			****	****
15	Mentha spicata				****
9	Cinnamomum camphora				****
4	Kontrola				****
5	Pelargonium graveolens				****
1	Litsea cubeba				****
6	Cymbopogon winterianus				****

Tabulka 8 - Tukeyův test pro izolát (4/16/3/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná izolát (4/16/3/3); Homogenní skupiny, alfa = ,05000; Chyba: meziskup. PČ = 10,469, sv = 266,00					
	varianta	1	2	3	4	5
2	Talent	****				
3	Eugenia caryophyllus		****			
7	Rosmarinus officinalis		****			
9	Cinnamomum camphora		****			
8	Kontrola+DMSO			****		
13	Thymus vulgaris			****	****	
6	Cymbopogon winterianus			****	****	****
15	Mentha spicata			****	****	****
1	Litsea cubeba			****	****	****
16	Lavandula hybrida				****	****
10	Ocimum basilicum				****	****
4	Kontrola					****
5	Pelargonium graveolens					****
12	Cinnamomum ceylanicum					****
14	Origanum majorana					****
11	Cymbopogon citratus					****

Tabulka 9 - Tukeyův test pro izolát (3/16/8/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná izolát (3/16/8/3); Homogenní skupiny, alfa = ,05000; Chyba: meziskup. PČ = 15,779, sv = 266,00										
	varianta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3	Eugenia caryophyllus	****									
6	Cymbopogon winterianus	****	****								
7	Rosmarinus officinalis	****	****								
2	Talent	****	****	****							
11	Cymbopogon citratus		****	****	****						
9	Cinnamomum camphora		****	****	****						
1	Litsea cubeba			****	****	****					
10	Ocimum basilicum				****	****	****				
4	Kontrola					****	****	****			
5	Pelargonium graveolens						****	****			
15	Mentha spicata							****	****		
8	Kontrola+DMSO							****	****		
13	Thymus vulgaris							****	****	****	
12	Cinnamomum ceylanicum								****	****	****
16	Lavandula hybrida									****	****
14	Origanum majorana										****

Tabulka 10 - Tukeyův test pro izolát (3/16/1/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření

Tukeyův HSD test; proměnná izolát (3/16/1/3); Homogenní skupiny, alfa = ,05000; Chyba: meziskup. PČ = 5,5382, sv = 254,00						
Č. buňky	varianta	izolát (3/16/1/3) (Průměr)	1	2	3	4
2	Talent	0,00000	****			
3	Eugenia caryophyllus	15,17889		****		
12	Cinnamomum ceylanicum	18,13722			****	
7	Rosmarinus officinalis	18,36222			****	
14	Origanum majorana	18,67722			****	
6	Cymbopogon winterianus	18,73444			****	
9	Cinnamomum camphora	18,78667			****	
13	Thymus vulgaris	18,92500			****	
1	Litsea cubeba	19,18722			****	
8	Kontrola+DMSO	19,23583			****	
15	Mentha spicata	19,64056			****	
10	Ocimum basilicum	19,99278			****	****
11	Cymbopogon citratus	20,25778			****	****
16	Lavandula hybrida	20,29722			****	****

Tabulka 11 - Tukeyův test pro izolát (5/16/1/3), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření

Tukeyův HSD test; proměnná izolát (5/16/1/3); Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 7,7635, sv = 266,00					
Č. buňky	varianta	izolát (5/16/1/3) (Průměr)	1	2	3
2	Talent	4,17222	****		
3	Eugenia caryophyllus	14,02389		****	
5	Pelargonium graveolens	14,47722		****	****
4	Kontrola	14,66278		****	****
15	Mentha spicata	14,77722		****	****
14	Origanum majorana	14,83000		****	****
12	Cinnamomum ceylanicum	15,82889		****	****
7	Rosmarinus officinalis	16,17056		****	****
16	Lavandula hybrida	16,33500		****	****
13	Thymus vulgaris	16,33944		****	****
1	Litsea cubeba	16,73917		****	****
10	Ocimum basilicum	16,77167		****	****
6	Cymbopogon winterianus	16,80500		****	****
11	Cymbopogon citratus	17,07722		****	****
8	Kontrola+DMSO	17,20611			****
9	Cinnamomum camphora	17,54500			****

Tabulka 12 - Tukeyův test pro izolát (19/16/5/2), porovnání homogenních skupin jednotlivých variant ošetření

Tukeyův HSD test; proměnná izolát (19/16/5/2); Homogenní skupiny, alfa = ,05000; Chyba: meziskup. PČ = 3,5152, sv = 236,00										
Č. buňky	varianta	izolát (19/16/5/2) (Průměr)	1	2	3	4	5	6	7	8
2	Talent	0,00000	****							
3	Eugenia caryophyllus	5,49056		****						
9	Cinnamomum camphora	9,25917			****					
7	Rosmarinus officinalis	9,56222			****					
11	Cymbopogon citratus	10,51083			****	****				
10	Ocimum basilicum	10,84833			****	****				
6	Cymbopogon winterianus	11,13667			****	****				
12	Cinnamomum ceylanicum	11,24500			****	****				
15	Mentha spicata	11,36250			****	****	****			
1	Litsea cubeba	12,36750				****	****	****		
13	Thymus vulgaris	12,67056				****	****	****		
5	Pelargonium graveolens	13,58111					****	****		****
14	Origanum majorana	13,82389						****	****	****
8	Kontrola+DMSO	14,74500						****	****	****
16	Lavandula hybrida	15,92167							****	
4	Kontrola	16,53667							****	****