



**POTENCIÁL ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ
A JEJICH SLOŽEK V EKOLOGICKÉ OCHRANĚ
HLÍZ BRAMBORU
PROTI SKLÁDKOVÝM PATOGENŮM**

Kolektiv autorů

**CERTIFIKOVANÁ METODIKA
2024**

VÝZKUMNÝ ÚSTAV BRAMBORÁŘSKÝ HAVLÍČKŮV BROD, s.r.o.
MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
FARMUS – FARMA RODINY MUSILOVÝCH

KOLEKTIV AUTORŮ

Ing. Martin Knoch, Ph.D., (30 %); **Mgr. Věra Loubová**, (20 %); **Bc. Marie Veselská**, (5 %), **Ing. Josef Vacek, Ph.D.**, (5 %)
Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o.

Ing. Barbora Jílková, Ph.D., (30 %); **Ing. Jana Víchová, Ph.D.**, (5 %)
Mendelova univerzita v Brně

Ing. Lukáš Musil, (5 %)
Farma rodiny Musilových (Olešenka)

DEDIKACE



Metodika byla vypracovaná v rámci podpory od Ministerstva zemědělství ČR – projektu NAZV č. QK21010083 s názvem *Ekologická ochrana konzumních brambor jako zdravé zeleniny proti vybraným půdou a sadbou přenášeným patogenům*.

Publikaci bylo Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským uděleno osvědčení č. UKZUZ 207200/2024 ze dne 9. 12. 2024 o uznání uplatněné certifikované metodiky v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“.

OPONENTI

Ing. Bc. Pavla Šenkeříková

(oponent z odborného orgánu státní správy)

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělská (Oddělení ekologického zemědělství)

Hroznová 63/2, 603 00 Brno - Pisárky

e-mail: pavla.senkerikova@ukzuz.gov.cz

Ing. Petr Dvořák, Ph.D.

(odborný oponent)

Česká zemědělská univerzita v Praze (Katedra agroekologie a rostlinné produkce)

Kamýcká 129, 165 00 Praha - Suchbát

e-mail: dvorakp@af.czu.cz

Metodika byla uplatněna v roce 2024

1 CÍL METODIKY	3
2 VLASTNÍ POPIS METODIKY	3
2.1 ÚVOD	3
2.1.1 Stříbřitost slupky bramboru	3
2.1.2 Fusariová hniloba bramboru	5
2.1.3 Fomová hniloba bramboru	6
2.1.4 Měkká hniloba hlíz bramboru	7
2.1.5 Esenciální oleje a složky esenciálních olejů	8
2.2 VLASTNÍ POSTUP	9
2.2.1 Stanovení vlivu vybraných složek EO na houbové patogeny bramboru přenášené půdou a sadbou	9
2.2.1.1 Stanovení vlivu složek EO na houbové patogeny bramboru v <i>in vitro</i> podmínkách	9
2.2.1.2 Stanovení vlivu složek EO na houbové patogeny bramboru v <i>in vivo</i> podmínkách	10
2.2.2 Stanovení vlivu vybraných EO a složek EO proti bakteriálním patogenům bramboru přenášeným sadbou	13
2.2.2.1 Stanovení vlivu EO a složek EO proti pektinolytickým bakteriím v <i>in vitro</i> podmínkách	13
2.2.2.2 Stanovení vlivu EO a složek EO proti pektinolytickým bakteriím v <i>in vivo</i> podmínkách	15
2.2.3 Zkouška stolní hodnoty hlíz po ošetření složkami EO mořením a fumigací	16
2.3 PŘÍKLAD PRAKTICKÉHO VYUŽITÍ	17
2.3.1 Stanovení vlivu složek EO na houbové patogeny bramboru	17
2.3.1.1 Stanovení vlivu složek EO na houbové patogeny bramboru v <i>in vitro</i> podmínkách	17
2.3.1.2 Stanovení vlivu složek EO na houbové patogeny bramboru v <i>in vivo</i> podmínkách	20
2.3.2 Stanovení vlivu EO a složek EO na pektinolytické bakterie napadající hlízy bramboru	23
2.3.2.1 Stanovení vlivu EO a složek EO na pektinolytické bakterie napadající hlízy bramboru v <i>in vitro</i> podmínkách	23
2.3.2.2 Stanovení vlivu EO a složek EO na pektinolytické bakterie napadající hlízy bramboru v <i>in vivo</i> podmínkách	26
2.3.3 Zkouška stolní hodnoty hlíz po ošetření složkami EO mořením a fumigací	31
2.3.4 Možnosti zvýšení účinnosti a stability EO	31
2.3.5 Závěr	32
3 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	33
4 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	33
5 EKONOMICKÉ ASPEKTY	33
6 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	34
7 SEZNAM VYBRANÝCH PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	37

PODĚKOVÁNÍ

Poděkování patří pracovníkům České sbírky mikroorganismů (CCM) – Masarykově univerzitě za poskytnutí potřebných kultur hub a Sbírcce fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií (CPABB, VÚRV, v.v.i) za poskytnutí nezbytných bakteriálních kmenů. Obě sbírky patří pod Národní program konzervace a využívání genetických zdrojů mikroorganismů a drobných živočichů hospodářského významu. Poděkování patří rovněž Ing. Renatě Švecové z Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod, s. r. o., z Laboratoře genetických zdrojů za organoleptické vyhodnocení experimentů. Dále děkujeme za spolupráci Ing. Lence Charvátové, Bc. Anně Kočicové, Ing. Dominiku Špačkovi a Ing. Marku Jahnovi. Děkujeme firmě M+H Míča & Harašta, s.r.o., za poskytnutí esenciálních olejů a jejich složek.

1 CÍL METODIKY

Cílem certifikované metodiky bylo zjištění vlivu vybraných esenciálních olejů (EO) a jejich složek na houbové a bakteriální patogeny bramboru přenášené půdou a sadbou pomocí *in vitro* a *in vivo* experimentů (moření a fumigace). Jednalo se o skládkové houby *Helminthosporium solani* (stříbřitost slupky bramboru), *Fusarium solani* var. *coeruleum* (fusariová hniloba bramboru) a *Phoma foveata* (fomová hniloba bramboru) a pektinolytické bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium atrosepticum* a *Dickeya solani* (měkká hniloba hlíz bramboru). Byl posouzen potenciál využití EO a jejich složek pro biologickou ochranu hlíz bramboru před důležitými houbovými a bakteriálními patogeny během skladování. Dílčím cílem bylo organoleptické vyhodnocení po ošetření hlíz formou moření a fumigace.

2 VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1 ÚVOD

Brambor (*Solanum tuberosum* L.) je čtvrtou celosvětově nejvýznamnější potravinářskou plodinou, hned za rýží (*Oryza sativa* L.), pšenicí (*Triticum aestivum* L.) a kukuřicí (*Zea mays* L.). Jde také o významnou neobilnou potravinářskou plodinu, která hraje nezastupitelnou roli v celosvětovém zásobování potravinami. Brambory jsou bohaté na velké množství makroživin (jako jsou sacharidy a vláknina) a mikroživin (jako jsou vitamíny a minerály); navíc jsou také důležitým zdrojem antioxidantů ve stravě člověka (Liu *et al.*, 2022).

V roce 2023 byly v České republice brambory pěstovány na ploše 27 020 ha. Z toho 20 947 ha v zemědělském sektoru a 6 073 ha v sektoru domácností. Na této ploše bylo za rok 2023 sklizeno celkem 703 078 tun brambor, z toho 39 366 tun raných brambor, 55 384 tun sadbových brambor a 608 328 tun ostatních brambor. V roce 2023 byla pro výrobu škrobu použita plocha brambor 5 054 ha s produkcí 151 088 tun. Průměrný výnos činil 18,30 t/ha raných, 27,33 t/ha ostatních, 21,20 t/ha sadbových. Průměrný výnos činil 29,89 t/ha a průměrná škrobnatost hlíz byla 19,2% (ČSÚ).

Brambor je hostitelem mnoha patogenů (Czajkowski *et al.*, 2011). Některé houby, bakterie a viry mohou způsobit významná posklizňová onemocnění hlíz během skladovacího procesu (Fan *et al.*, 2021). Hlízy bramboru obsahují více než 70% vody, díky čemuž jsou po sklizni během manipulace, přepravy a skladování náchylné k různým patogenům způsobujícím různé hniloby a léze (Bojanowski *et al.*, 2013). Kontrola chorob je základní součástí správy skladů. Většina chorob nepochází ze skladu, ale ze dvou primárních zdrojů – hlíz nebo půdy. Mnoho problémů s chorobami se však může do jisté míry vyvinout ve skladu, a pokud nejsou kontrolovány, důsledky mohou být katastrofické, ať už jde o fyzické rozložení hlíz, nebo o ztrátu tržní hodnoty hlíz. Skládkové choroby dělíme na hniloby a choroby vzhledu hlíz. Hniloby šířící se ve skladu jsou: měkká hniloba hlíz bramboru (*Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp.) a fusariová hniloba bramboru (*Fusarium* spp.). Výrazně méně často se objevuje fomová hniloba bramboru (*Phoma foveata* (Foister) Aveskamp, Gruyter et Verkley, 2010) a vodnatá hniloba bramboru (*Pythium* spp.). Choroby vzhledu šířící se ve skladu jsou: stříbřitost slupky bramboru (*Helminthosporium solani* Durier et Mont., 1849) a podstatně méně často černá tečkovitost bramboru (*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, 1958). Ve skladu brambor se mohou nacházet i další choroby zvyšující hmotnostní ztráty a snižující výtěžnost praných hlíz, jejichž výskyt ovšem nesouvisí se skladováním a přechází již z pole. Jsou to plíseň bramboru (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, 1876), projevující se po naskladnění nejčastěji jako sekundární měkká hniloba hlíz, vložkovitost hlíz bramboru [*Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk, 1956 (teleom.), *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn, 1858 (anam.)], aktinobakteriální obecná strupovitost bramboru (*Streptomyces scabiei* corrig. (ex Thaxter 1892) Lambert et Loria 1989a), zduřelá nekrotická kroužkovitost (*Potato virus Y-NTN*) a hnědá skvrnitost bramboru (*Alternaria* spp.) (Vacek & Plíštil, 2020).

Rozvoj infekcí hlíz bramboru bakteriemi a houbami může během skladování způsobit značné ekonomické ztráty, a proto je nezbytné hledat vhodné metody ochrany. Vhodnou ekologickou alternativu by mohly představovat EO a jejich složky. Používání syntetických pesticidů vedlo k degradaci životního prostředí, rozvoji odolnosti patogenů a možnému nebezpečí pro různé necílové druhy (včetně rostlin, zvířat a lidí). Udržitelný přístup tedy vyžaduje prozkoumání životaschopných ekologicky šetrných alternativ. Rostlinné biopesticidy v této souvislosti přitahují značnou pozornost kvůli své cílové specifičnosti, šetrnosti k životnímu prostředí, biologické rozložitelnosti a bezpečnosti pro člověka a další formy života (Gupta *et al.*, 2023).

2.1.1 STŘÍBŘITOST SLUPKY BRAMBORU

Stříbřitost slupky způsobená houbou *Helminthosporium solani* Durieu & Mont., (1849) [*H. atrovirens* syn. *Spondylocladium atrovirens*], je choroba bramboru, která se stala v posledních letech ekonomicky významnou (Errampalli *et al.*, 2001). Obvykle nezpůsobuje ztráty na výnosech (Wale *et al.*, 2008). Vyvolává většinou kosmetické vady hlíz, čímž může negativně ovlivnit trh s konzumními a sadbovými bramborami. Vzhledem k rostoucí poptávce po praných hlízách snižuje tržní hodnotu hlíz (Cullen *et al.*, 2001). Infekce hlíz patogenem zvyšují propustnost slupky pro vodu, čímž dochází ke snížení jejich hmotnosti (obr. 1) během skladování (Secor & Gudmestad, 1999). Choroba může mít významný vliv na vývoz, zejména sadbových hlíz, protože na certifikovaných sadbových hlízách je povolena pouze omezená infekce *H. solani* (Denner *et al.*, 1997). Hranolky a chipsy vyrobené z napadených hlíz mají často nepřijatelné hnědé okraje (Holley & Kawchuk, 1996). Vzestup výskytu stříbřitosti je připisován nedostačující odolnosti odrůd bramboru k *H. solani* (Rodriguez *et al.*, 1996) a neúčinným ochranným opatřením (Errampalli *et al.*, 2001).

Houba vytváří tmavé mycelium, stromata a konidiofory s konidii (Barnett & Hunter, 1998). Hyfy se vyskytují ve felému, felodermu a kortikální vrstvě hlíz (Heiny & McIntyre, 1983). Léze s hojnou sporulací (obr. 3) se jeví jako hnědé až spálené, zatímco zralé léze jsou stříbřité (Hunger & McIntyre, 1979). Teploty v rozmezí 15–32 °C a vysoká vlhkost mají často za následek klíčení konidií, což vede k infekci hlíz (Heiny & McIntyre, 1983). Mycelium proniká do epidermis přes lenticely a/nebo proniká do peridermu a způsobuje ztrátu pigmentace, což má za následek vznik stříbřitých lézí (Rodriguez *et al.*, 1995, 1996; Wale *et al.*, 2008). S výjimkou hlíznatých druhů *Solanum tuberosum* (Rodriguez *et al.*, 1995) a *S. elaeagnifolium* (Sethuraman *et al.*, 1997) nejsou jiné druhy rostlin hostiteli pro *H. solani* (Jellis & Taylor, 1974).



Obr. 1: Snížení hmotnosti hlíz během skladování způsobené houbou *H. solani*



Obr. 2: Symptomy stříbřitosti slupky bramboru způsobené *H. solani* na odrůdě Belana

Cyklus onemocnění stříbřitosti má dvě fáze: polní a skladovací. Primárním zdrojem inokula *H. solani* jsou infikované sadbové hlízy (Hide & Adams, 1980; Jellis & Taylor, 1977). K infekci hlíz může dojít během vegetačního období z infikované sadby (Secor & Gudmestad, 1999) a půdního inokula (Firman & Allen, 1995b) nebo při skladování (Jellis & Taylor, 1977; Rodriguez *et al.*, 1996), kdy za příznivých podmínek dochází ke sporulaci houby činící hlízy sazovitěho vzhledu (Secor & Gudmestad, 1999). Primární infekce, ke které dochází brzy po iniciaci hlízy, je často soustředěna na stolonové konce hlíz (Jellis & Taylor, 1977). Většina infekcí se vyskytuje před sklizní, i když k ní může dojít při sklizni nebo mohou být konidie přeneseny při zavlažování (Firman & Allen, 1995a). Závažnost onemocnění se výrazně zvyšuje při dlouhodobém skladování hlíz, kdy se může patogen šířit pomocí konidií (Secor & Gudmestad, 1999). Ačkoliv je *H. solani* považováno za patogen hlíz, může přezimovat v půdě jako saprofyt na rostlinných zbytcích (Jellis & Taylor, 1977; Mérida & Loria, 1994). Nicméně přezimující půdní inokulum nehraje v epidemiologii důležitou roli (Jellis & Taylor, 1974).

Název onemocnění je odvozen od charakteristického kovového, stříbřitého lesku starších lézí na povrchu hlíz bramboru (obr. 2). Příznaky onemocnění se objevují na hlízách, ale ne na stonku nebo kořenech (Fahn, 1982). Stříbrné zbarvení peridermu je způsobeno ztrátou pigmentu, prostřednictvím vysoušení buněk a ukládáním suberinu (Frazier *et al.*, 1998). Pigmentace hlíz není tak výrazná u odrůd brambor s červenou slupkou (obr. 4) (Jellis & Taylor, 1977). První příznaky stříbřitosti na hlízách jsou světle hnědé kruhové skvrny popř. léze na konci stolonu, které mohou být tmavě olivové barvy (Cullen *et al.*, 2001; Jellis & Taylor, 1977). Léze na hlízách v půdě zůstávají malé, ale během skladování se zvětšují (Jellis & Taylor, 1977; Mérida & Loria, 1994). Jednotlivé léze postupně splývají (Mérida & Loria, 1994). Stříbřitost a černá tečkovitost, způsobená *Colletotrichum coccodes*, jsou často zaměňovány. Obě choroby způsobují skvrny na peridermu a často se vyskytují společně (Errampalli *et al.*, 2001).



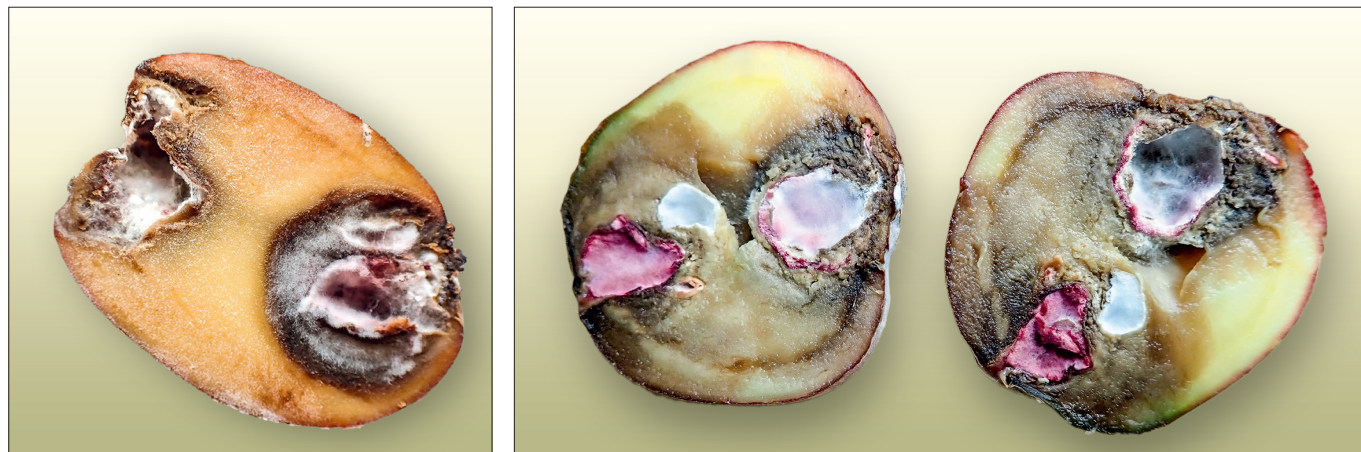
Obr. 3: Sporulace *H. solani* na slupce hlízy odrůdy Belana



Obr. 4: Symptomy stříbřitosti na odrůdě Red Anna

2.1.2 FUSARIOVÁ HNILOBA BRAMBORU

Fusariová hniloba bramboru (známá jako suchá hniloba bramboru), která může být vyvolána několika druhy rodu *Fusarium*, je významnou skládkovou chorobou bramboru s celosvětovým hospodářským významem (Cullen *et al.*, 2005; Stevenson, 2001). Způsobuje ji více než 13 druhů rodu *Fusarium* (Cullen *et al.*, 2005). Jedná se zejména o *F. solani* var. *coeruleum* (syn. *F. coeruleum* (Libert) Sacc.), *F. sulphureum* Schlechtend. (syn. *F. sambucinum* Fuckel), *F. avenaceum* (Fr.:Fr.) Sacc., *F. culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc., *F. oxysporum* Schlechtend. Fr., *F. acuminatum* Ellis & Everh., *F. crookwellense* L. W. Burgess, P. E. Nelson & T. A. Toussoun, *F. equiseti* (Corda) Sacc., *F. graminearum* Schwabe, *F. scirpi* Lambotte & Fautrey, *F. semitectum* & Ravenel, *F. sporotrichioides* Sherb. a *F. tricinctum* (Corda) Sacc. (Gachango *et al.*, 2012).



Obr. 5 a 6: Symptomy fusariové hniloby bramboru na hlíze odrůdy Red Anna

Druhy rodu *Fusarium* infikují téměř všechny pěstované plodiny a brambory nejsou výjimkou (Estrada *et al.*, 2010). Jsou sice považovány za hlavní hrozbu pro skladované hlízy díky vzniku hniloby, ale jejich negativní účinky lze pozorovat i na poli v podobě bránění rozvoji klíčků, vadnutí a degradace kořenů rostlin bramboru (Cullen *et al.*, 2005). Druhy rodu *Fusarium* mohou potenciálně způsobit velké ztráty na výnosu odhadované v průměru od 6 do 25%, s infekcí během skladování až 60% a mohou zhoršit kvalitu hlíz (Cullen *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2021). Poškození hlíz se stává závažnější, když fusariovou hnilobu doprovázejí během skladování další choroby, jako je měkká hniloba hlíz bramboru způsobená bakteriemi rodu *Pectobacterium* a *Dickeya* a plíseň bramboru vyvolaná patogenem *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, 1876 (Secor & Gudmestad, 1999).

Kromě toho, že jsou druhy rodu *Fusarium* patogenní, jsou také známé produkcí mykotoxinů. Druhy způsobující fusariovou hnilobu bramboru mohou produkovat mykotoxiny sambutoxin, trichotheceny, fusarin C, kyselina fusarová, zearalenon a deoxynivalenol (Bojanowski *et al.*, 2013; Desjardins, 2006).

Typickým příznakem na slupce hlíz brambor infikovaných *Fusarium* spp. je především vrásčitý hnědý vzhled a propadlé pletivo se suchým a kožovitým vzhledem. Počáteční příznaky jsou mělké, malé hnědé skvrny v místech poranění hlíz po přibližně 30 dnech skladování. Následně se infikované pletivo začne zvětšovat ve všech směrech. Nakonec jsou na zvětšených lézích pozorovány soustředné prstence a odumřelé pletivo začíná být vysušováno (Xing-dong & Hua-li, 2014; Zhang *et al.*, 2023). Na průřezu hlíz v dutině pod lézemi (obr. 5 a 6) je pozorováno bílé, růžové, žluté, fialové nebo cihlově oranžové mycelium a masa spor (Stevenson, 2001; Vatankhah *et al.*, 2019). S progresí onemocnění mají celé hlízy s příznaky těžkého rozkladu vždy scvrklý a dehydratovaný vzhled. V závažných případech se mohou postižené hlízy úplně rozložit, což má za následek kašovitou strukturu a nepříjemný zápach. Proto je důležité identifikovat a zvládnout fusariovou hnilobu bramboru včas, aby se zabránilo jejímu dalšímu šíření a minimalizovaly se ekonomické ztráty (Xue *et al.*, 2023).

Druhy rodu *Fusarium* jsou přenášeny sadbou i půdou. Přežívání konidií druhů rodu *Fusarium* v půdě a na rostlinných zbytcích je hlavním rezervoárem inokula a zdrojem infekcí hlíz na poli (Cullen *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2008). Protože druhy rodu *Fusarium* nemohou proniknout přes periderm hlíz, může dojít k infekci pouze přes rány nebo praskliny v peridermu (Secor & Gudmestad, 1999), způsobené hlavně manipulací při sázení, sklizni a třídění (Stevenson, 2001). Houby rodu *Fusarium* mohou dobře přežít při 4–10 °C. Agresivita různých druhů závisí na podmínkách skladování a odrůdě bramboru (Al-Mughrabi *et al.*, 2013; Bojanowski *et al.*, 2013; Peters *et al.*, 2008).

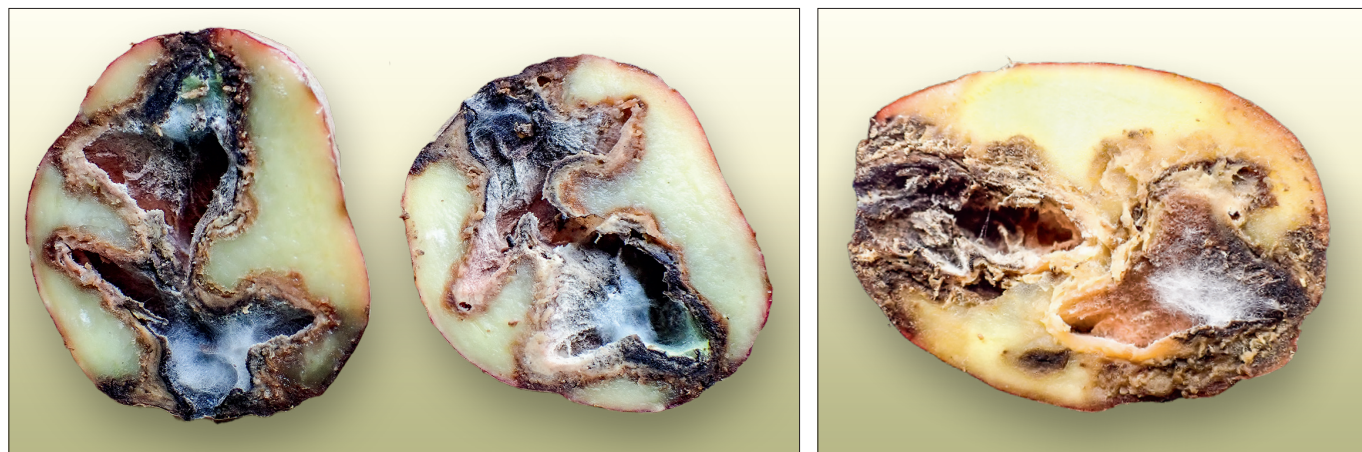
Pro ochranu hlíz před patogeny rodu *Fusarium* je nejdůležitější zajistit vhodná pěstitelská opatření spolu s optimalizací podmínek skladování. Klíčová je výsadba zdravých hlíz, vyvarování se poranění hlíz během sklizně a zajištění vhodných podmínek pro hojení ran (Stevenson, 2001). Sklizeň vyzrálých hlíz minimalizuje možnost hniloby ve skladech. Střídání plodin, které je nejvíce doporučovanou pěstitelskou praxí při zvládnutí patogenů přenášovaných půdou, není příliš účinné (Bojanowski *et al.*, 2013) z důvodu dlouhodobého přežívání konidií druhů rodu *Fusarium* v půdě a jejich širokému spektru hostitelů (Peters *et al.*, 2008). Ochrana hlíz proti *Fusarium* spp. dále zahrnuje používání odolných odrůd, možnost využití ultrafialového záření

a aplikaci fungicidů (Al-Mughrabi *et al.*, 2013; Bång, 1992; Bojanowski *et al.*, 2013; Gachango *et al.*, 2012; Peters *et al.*, 2008; Ranganna *et al.*, 1997). Poslední dobou jsou zkoumána a vyvíjena ekologická ochranná opatření, jako je používání organických kyselin a solí (Hua-Li *et al.*, 2017), anorganických solí (Y. C. Li *et al.*, 2009; Yaganza *et al.*, 2014), chitosanu (Y. Li *et al.*, 2009), biologických antagonistů (Al-Mughrabi *et al.*, 2013; Aydin, 2019) a esenciálních olejů (Wei *et al.*, 2020; Xing-dong & Hua-li, 2014).

2.1.3 FOMOVÁ HNILOBA BRAMBORU

Phoma foveata (Foister) Aveskamp, Gruyter et Verkley, 2010 je jedním z nejčastěji se vyskytujících skládkových patogenů brambor. Způsobuje fomovou hnilobu bramboru (tzv. gangrénu), která byla poprvé popsána v roce 1940. Za určitých podmínek může ve skladu vyvolat značné ztráty. Vyskytuje se častěji v chladnějším podnebí. Díky zdokonalenému skladovacímu managementu a zvýšené dostupnosti rezistentních odrůd se výskyt *P. foveata* neustále snižuje, ale je stále rozšířená v Severní Evropě a v určitých částech Austrálie (Stevenson, 2001). Odrůdy konzumních brambor však vykazují rozdíly v odolnosti, zatímco škrobové odrůdy jsou poměrně odolné (Mulder *et al.*, 2005).

Přítomnost *P. foveata* se projevuje symptomy na hlízách, na jejichž slupce lze pozorovat propadlé nekrotické skvrny (Stevenson, 2001). Choroba se vyvíjí povrchově nebo ve větší hloubce v závislosti na odrůdě (Mulder *et al.*, 2005). Na slupce hlíz (obvykle v ranách, očkách nebo lenticelách) se vyvíjejí malé, tmavé prohlubně, které se zvětšují. Tyto skvrny jsou hladké nebo nepravidelně zvrásněné. Pod nekrotickými se nachází tmavě hnědá nebo nafialovělá hniloba s různě tvarovanými dutinami s myceliem fialově šedé barvy (obr. 7 a 8). Pyknidy se mohou tvořit jednotlivě nebo ve shlucích, na povrchu lézí nebo v myceliu vystylajícím dutiny hlíz. Jsou obvykle globoidní (90–200 µm v průměru) a tmavě hnědé až černé. Zpočátku subepidermální pyknidy, se stávají erumpentní a vytlačují hyalinní, nonseptátní, cylindrické pyknidiospory (2–3 × 4–5 µm) (Stevenson, 2001). Symptomy na hlíze lze pozorovat od listopadu a prosince (Rasocho *et al.*, 2008; Stevenson, 2001). *P. foveata* může napadat také odumírající stonky vlivem dozrávání nebo desikace, na jejichž bázích se tvoří podélné nekrotické léze dlouhé až 25 cm. Tyto léze jsou o něco tmavší než nenapadené odumřelé části rostliny a jsou pokryty hnědými až černými pyknidami (Mulder *et al.*, 2005; Rasocho *et al.*, 2008).



Obr. 7 a 8: Symptomy fomové hniloby bramboru na průřezu hlízou odrůdy Red Anna

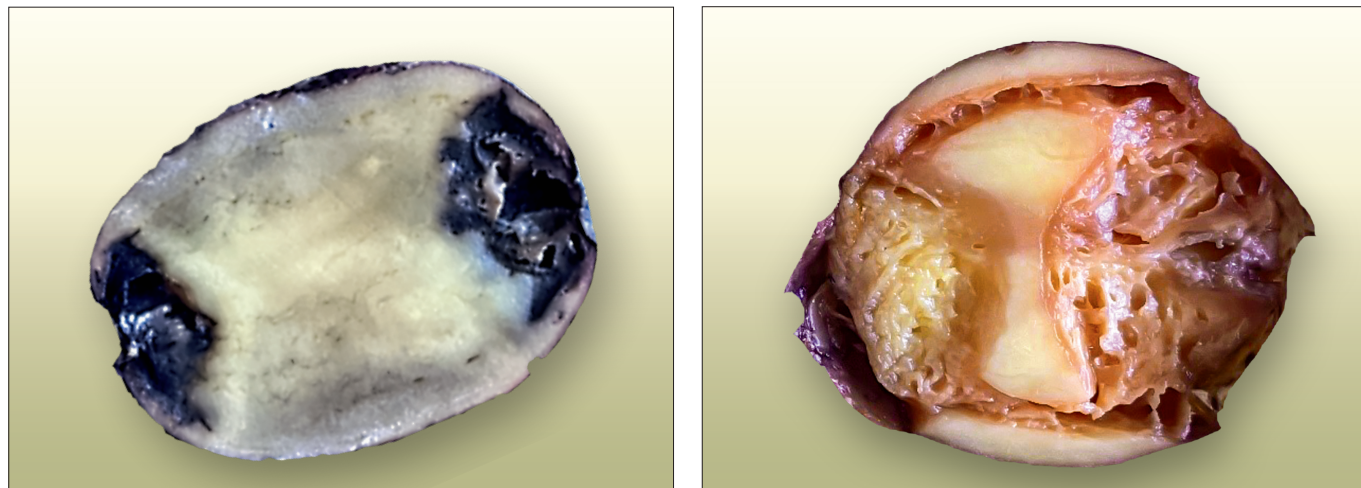
Houba přežívá na hlízách a v menší míře v půdě. Čím vyšší je úroveň infekce sadbových hlíz nebo půdy, tím větší je riziko vzniku hniloby během skladování (Mulder *et al.*, 2005). Při výsadbě hlíz s hnilobou nebo latentně infikovaných sadbových hlíz může patogen přejít do nové vznikajících stonků, ve kterých infekce zůstává latentní, dokud stonky neodumřou, a to buď přirozeně nebo po desikaci (Stevenson, 2001). Úroveň infekce obvykle klesá v první části vegetačního období a od konce července se zvyšuje. V horkých létech je vývoj houby značně omezen. Stupeň infekce se výrazně zvyšuje během druhého a třetího týdne po zničení natě (Mulder *et al.*, 2005). Pyknidy se objevují na povrchu stonků, obvykle v ojedinělých skupinách. Dešťové kapky spláchnou pyknidiospory do půdy a rovněž rozšíří inokulum na sousední rostliny. Před sklizní může dojít k infekci hlíz očky nebo lenticelami—obvykle tam, kde je vysoká vlhkost půdy. Pyknidiospory šířící se přímo půdou jsou také významným zdrojem inokula pro infekci hlíz při sklizni. K šíření inokula z hlízy na hlízu dochází snadno během sklizně a třídění, kdy je půda a povrch hlíz vlhký. Téměř každá infekce hlíz *P. foveata* se vyvíjí po poranění vnesením inokula z kontaminované půdy na povrch hlízy, nebo je inokulum skryto v peridermu. K infekci hlíz dochází během sklizně, třídění nebo jakékoli jiné manipulace s hlízami během skladování. Výskyt fomové hniloby zvyšuje vlhká půda, noční mrazíky, nízké denní teploty (méně než 12 °C) v období sklizně a nízké teploty při skladování, třídění nebo manipulaci (Stevenson, 2001). Problémy mohou nastat při opožděné sklizni za nízkých teplot, protože patogen způsobuje infekce brambor při teplotách pod 8 °C. Pokud jsou teploty v době infekce vyšší než 8 °C, vytvoří hlíza korkové pletivo kolem houby a zapouzdří ji. Houba tak zůstane přítomna v latentním stádiu. Při nižší teplotě houba začne růst a dochází k rozvoji hniloby. Latentní infekce mohou být také aktivovány pohmožděním (Mulder *et al.*, 2005). Zpoždění ničení natě nebo sklizně podporuje produkci inokula v půdě a zvyšuje riziko rozvoje choroby. Naopak

vyšší teploty (20–24 °C) během růstu a suchá půda před sklizní udržují inokulum *P. foveata* na nízké úrovni (Stevenson, 2001). *P. foveata* může přežít ve skladech, boxech, na strojích a zařízeních. Spory houby mohou být přenášeny větrem, při třídění nebo při čistění skladovacích prostor a strojů (Mulder *et al.*, 2005).

Ochranou proti *P. foveata* u bramboru je omezení mechanického poškození pomocí vhodných technologií v období sklizně a po sklizni omezením manipulace s hlízami v průběhu skladování. Pro zabránění výskytu choroby je také použití zdravé sadby. Další možnost ochrany bramboru proti *P. foveata* je moření dlouhodobě skladovaných hlíz fungicidy (Rasocha *et al.*, 2008; Stevenson, 2001).

2.1.4 MĚKKÁ HNILOBA HLÍZ BRAMBORU

V evropských klimatických podmínkách vyvolávají na hlízách bramboru měkkou hnilobu pektinolytické bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones 1901) Hauben *et al.*, 1999 emend. Gardan *et al.*, 2003, syn. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones 1901) Bargey *et al.*, 1923 (Pcc), *Pectobacterium atrosepticum* (van Hall, 1902) Garden *et al.*, 2003, syn. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall, 1902) Dye 1969 (Pa), *Dickeya solani* van der Wolf *et al.*, 2014 (Ds) syn.: *Erwinia chrysanthemi* Burkholder *et al.*, 1953, *Dickeya dadantii* Samson *et al.*, 2005, syn.: *Erwinia chrysanthemi* Burkholder *et al.*, 1953, *Dickeya dianthicola* Samson *et al.*, 2005 syn.: *Erwinia chrysanthemi* pv. *dianthicola* (Hellmers 1958) Dickey 1979 a *Dickeya zeae* Samson *et al.*, 2005, syn.: *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae* (Sabet) Victoria *et al.*, 1975 (Saddler, 2016). Tyto fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie s peritrichálně uspořádanými bičíky mají G-reakci a nevytváří spory. Na kultivačním médiu tvoří hladké krémové kolonie (Charkowski, 2006). Optimální růstová teplota druhu *Pectobacterium atrosepticum* je 21–26 °C, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 26–30 °C a *Dickeya* spp. 30–37 °C (Víchová, 2020).



Obr. 9 a 10: Symptomy měkké hniloby na průřezu hlízou odrůdy Red Anna

Kromě bramboru způsobují tyto bakterie onemocnění i u jiných hostitelských rostlin. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* je polyfágní patogen napadající zástupce z čeledí Solanaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Apiaceae, Papaveraceae a další (CABI Plant, 2022). Polyfágní jsou i *Dickeya dianthicola* (Czajkowski *et al.*, 2013) a *Dickeya zeae* (Osdaghi, 2022). *P. atrosepticum* byla v minulosti považována za monofágní napadající pouze lilek brambor, bylo však prokázáno, že je schopna infikovat i jiné druhy z čeledi Solanaceae (Ma *et al.*, 2018). *Dickeya solani* se zaměřuje především na brambory (Sławiak *et al.*, 2009).

Bakterie produkují pektinolytické enzymy, celulózu, hemicelulózu, arabanázu a proteázu. Tyto enzymy degradují buněčné stěny rostlinných buněk, dochází k tzv. maceraci pletiv. Schopnost růstu jak za přítomnosti, tak bez přístupu kyslíku umožňuje pronikat do vnitřních pletiv rostlin (Hossain *et al.*, 2005).

Nejvýznamnějším zdrojem infekce bývají hlízy bramboru, na kterých patogen přežívá v lenticelách či v cévních svazcích, půda, rostlinné zbytky a kontaminovaná závlahová voda. V půdě mohou bakterie přežít od 1 týdne až do 6 měsíců, značně však záleží na půdních podmínkách – teplotě, vlhkosti a pH. Délka tohoto období může být i delší, ale pouze v případě přítomnosti rostlinných zbytků nebo živých i nehostitelských rostlin, kde bakterie vegetuje v okolí kořenů jako epifyt nebo saprofyt (Czajkowski *et al.*, 2011).

Primární infekce vzniká z matečných infikovaných hlíz, odkud se patogen šíří za vegetace cévními svazky do stonků rostliny. K šíření mezi jednotlivými rostlinami může docházet mnoha způsoby, například kontaminovanou vodou, hmyzem, mechanizací při sklizni, převozu nebo třídění hlíz, kdy se napadená macerovaná pletiva rozpadají a kontaminují bakteriemi své okolí (Czajkowski *et al.*, 2011). K sekundární infekci dochází nejčastěji přirozenými otvory – lenticelami, stomaty, kořeny, nebo přes poškození a poranění (Víchová, 2020). V průběhu skladování hlíz mohou pektinolytické bakterie dokončovat rozklad poškozených pletiv primárně napadených jinými patogeny, např. *Fusarium* spp. či *Phytophthora infestans* (Secor & Gudmestad, 1999).

Příznaky měkké hniloby hlíz se mohou projevit již v půdě, následně i v průběhu sklizně a skladování. Napadené hlízy jsou charakteristické hnilobným zápachem. Při napadení přes lenticely se jejich okolí zabarvuje hnědými, vodnatými, propadajícími se lézemi. Při systémovém napadení se první příznaky projevují v pupkové části hlízy hnědnutím v místě napojení na stolon. V dužnině dochází k hnědnutí a rozkladu cévních svazků a postupné maceraci přecházející z krémové do tmavě hnědé až černé hmoty s polotuhou konzistencí (obr. 9 a 10).

V průběhu vegetace bakterie napadají i nadzemní části rostlin bramboru, kde způsobují tzv. bakteriální černání stonku. Prvotní příznaky můžeme sledovat na bázi stonku, na kterém se začínají objevovat černé léze, které za sucha zasychají a tvrdnou. Rostlina zastavuje růst a vadne, ve vlhčím prostředí se léze zvětšují, pletiva ztrácejí pevnost, odumírají a hnijí. Napadeny mohou být celé trsy nebo jen některé z částí. Na průřezu napadeným stonkem, můžeme pozorovat rozklad pletiv a zhnědlé cévní svazky. V pokročilejším stádiu choroby lze hnijící stonky lehce vytáhnout z půdy, v této fázi bývají napadeny i podzemní části rostliny, včetně nových hlíz (Rasocho *et al.*, 2008; Víchová, 2020).

Škody na napadených porostech způsobené špatným vzházením a následnou mezerovitostí, ztrátou asimilační plochy a hnilobou hlíz mohou dosahovat až 25% ztrát na výnosu. Šíření měkké hniloby ve skladech může způsobit ztráty až 30% na množství a kvalitě skladovaných hlíz (Malko *et al.*, 2019). Velmi důležitou roli hraje preventivní ochrana, která zahrnuje používání certifikovaného sadbového materiálu, nejlépe narašeného nebo naklíčeného, omezení mechanického poškození hlíz, omezení šíření a rozvoje ostatních chorob (Rasocho *et al.*, 2008). Po sklizni je důležitým opatřením naskladňování suchých hlíz a v průběhu skladování větrat, aby se zabránilo srážení vody na hlízách, a tím i vzniku infekce (Víchová, 2020). Chemická ochrana hlíz bramboru proti pektinolytickým bakteriím je značně omezena. V Registru přípravků na ochranu rostlin jsou povoleny pouze přípravky s účinnou látkou hydroxid měďnatý, který se aplikuje před výsadbou či po výsadbě hlíz bramboru. Pro zlepšení odolnosti rostlin jsou také povoleny přípravky s účinnými látkami chitosan a chitosan hydrochlorid.

2.1.5 ESENCIÁLNÍ OLEJE A SLOŽKY ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ

Esenciální oleje (EO), známé jako silice, jsou sekundární metabolity aromatických rostlin biosyntetizované v různých částech rostlin jako jsou epidermální buňky, glandulární trichomy a sekreční dutiny nebo kanálky. EO jsou směsí různých bioaktivních lipofilních látek těkavé povahy, jako jsou terpeny (terpenoidy), fenoly, ketony, aldehydy, alkoholy, estery, fenylopropanoidy, oxidy a další sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností vyznačující se silnou vůní (Albuquerque *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008; Baldim *et al.*, 2019; Bergman *et al.*, 2019). Název „esenciální olej“ vznikl z „essence“, tj. přítomnosti vůně a chuti (Baldim *et al.*, 2019). V jednotlivých EO lze identifikovat 20 až 60 sloučenin (složek EO). Z těchto sloučenin jsou dvě nebo tři složky ve vysoké koncentraci oproti ostatním. Některé sloučeniny se mohou nacházet pouze ve stopovém množství. Biologická aktivita EO je obecně připisována jedné nebo dvěma z těchto hlavních sloučenin. Existuje také možnost, že biologická aktivita EO může být výsledkem několika složek, které působí synergicky a mají významný účinek (Bakkali *et al.*, 2008). Je známo přibližně 3000 EO, z toho 300 komerčně důležitých zejména pro farmaceutický, kosmetický, parfumérský, sanitární, zemědělský a potravinářský průmysl (Bakkali *et al.*, 2008). EO se extrahují z rostlin konvenčně hydrodestilací, parní destilací nebo tlakem za studena (Bahrami *et al.*, 2016; Maes *et al.*, 2019; Masango, 2005; Sempere-Ferre *et al.*, 2021).

EO se nachází v různých rostlinných druzích, které patří do čeledí Asteraceae, Lamiaceae, Cyperaceae, Zingiberaceae, Piperaceae, Apiaceae, Myrtaceae, Solanaceae, Apocynaceae a Lauraceae (Albuquerque *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008; Bergman *et al.*, 2019; Sempere-Ferre *et al.*, 2021). EO mohou být produkovány různými orgány rostlin, tj. pupeny, květy, listy, stonky, větvičky, semena, plody, kořeny, dřevo nebo kůra (Bergman *et al.*, 2019). Mezi různými bioaktivními složkami EO jsou uváděny jako nejhojnější monoterpeny (Bakkali *et al.*, 2008; Caputo *et al.*, 2018). Carvacrol a thymol jsou monoterpenoidní fenoly s výraznou antifungální aktivitou (De Vincenzi *et al.*, 2004). Carvacrol je součástí EO z mnoha rostlin, například z dobromysle obecné (*Origanum vulgare* L.), tymiánu (*Thymus vulgaris* L.), *Lepidium flavum* Torr.), saturejky zahradní (*Satureja hortensis* L.), citroníku bergamotu (*Citrus aurantium* subsp. *Bergamia* (Risso) Engl.) a černuchy seté (*Nigella sativa* L.) (Maćzka *et al.*, 2023). Thymol je izomerický s carvacrolem a je hlavní aktivní složkou EO extrahovaného z tymiánu (*T. vulgaris*). Thymol může být rovněž extrahován z dalších rostlin, například z bazalky (*Ocimum basilicum* L.), drsnoplodíku moráčovitého (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill), z různých druhů rodu dobromysl (*Origanum* L.) nebo saturejky (*Satureja* L.) (Escobar *et al.*, 2020). D-carvone je monocyklický monoterpenový keton, který se v přírodě vyskytuje v enantiomerech, a to jako L-carvone a D-carvone (Bouyahya *et al.*, 2021). D-carvone je složkou EO z kmínu kořenného (*Carum carvi* L.) nebo kopru vonného (*Anethum graveolens* L.). L-carvone se nachází v EO například z máty klasnaté (*Mentha spicata* L.) (Morcia *et al.*, 2016). Linalool je monoterpenový acyklický terciální alkohol, který se v přírodě vyskytuje ve dvou enantiomerech, tj. L-linalool a D-linalool (Aprotosoae *et al.*, 2014). Linalool je součástí EO z mnoha rostlin, například z levandule širokolisté (*Lavandula latifolia* Medikus), levandule lékařské (*Lavandula angustifolia* Mill.), koriandru setého (*Coriandrum sativum* L.), bazalky pravé (*Ocimum basilicum* L.), anebo yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis* L.) (Bakkali *et al.*, 2008; Maćzka *et al.*, 2022). Menthol je monocyklický monoterpenový alkohol. Je to bílá pevná krystalická látka vyskytující se ve dvou enantiomerech, tj. L-menthol a D-menthol. Hlavní formou mentholu v přírodě je forma L-menthol (Kamatou *et al.*, 2013). Menthol a menthon jsou hlavní složkou EO z máty peprné (*Mentha x piperita* L.) (Malekmohammad *et al.*, 2021) a máty poleje (*Mentha pulegium* L.) (Bahrami

et al., 2016). α -pinene je bicycklý monoterpen, který má dvě enantiomerní formy, tj. L- α -pinene [(R)- α -pinene, (-)- α -pinene] a D- α -pinene [(S)- α -pinene, (+)- α -pinene]. α -pinene je hlavním sekundárním metabolitem mnoha EO z jehličnanů, například z borovice lesní (*Pinus sylvestris* L.), borovice limby (*Pinus cembra* L.), borovice kleče (*Pinus mugo* Turra) a borovice černé (*Pinus nigra* J. F. Arnold). Dalšími rostlinnými zdroji obsahující α -pinene jsou EO získané z pepřovníku černého (*Piper nigrum* L.), jalovce (*Juniperus* L.) a z konopí setého (*Cannabis sativa* L.) (Allenspach & Steuer, 2021). Limonene je monocyklický monoterpen, který se vyskytuje ve dvou formách, tj. L-limonene [(R)-limonene, (-)-limonene] a D-limonen [(S)-limonene, (+)-limonene]. Dále se limonen může vyskytovat jako racemická směs dipenten (Anandakumar et al., 2021). Limonene se nachází v EO z více než 300 rostlin, převážně z rodu *Citrus* L. (Ravichandran et al., 2018). D-limonene se vyskytuje v EO z kůry citrusů (*Citrus* L.), jako je citron, pomeranč, grapefruit, limetka a mandarinka (Gupta et al., 2021). L-limonene se nachází v EO z jehlic borovice (*Pinus* L.) nebo z máty klasnaté (Erasto & Viljoen, 2008). Eucalyptol je bicycklý terpenoid, který je součástí EO získávaných z různých rostlinných druhů. Je hlavní složkou EO extrahovaných z listů eukalyptu, například *Eucalyptus smithii* R.T. Baker, *E. globulus* Labill., *E. maidenii* F. Muell., *E. bicostata* Maiden, Blakely & Simmonds, *E. sideroxylon* A. Cunn. ex Woolls, *E. cinerea* F. Muell. ex Benth a *E. leucoxylon* F. Muell. Eucalyptol je také důležitou složkou EO z jiných rostlin, například z kajeputu střídavolistého (*Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betche) Cheel), rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis* L.), šalvěje lékařské (*Salvia officinalis* L.), pelyňku afrického (*Artemisia afra* Jacq. ex Willd.), vavřínu vznešeného (*Laurus nobilis* L.) a levandule klasnaté (*Lavandula stoechas* L.) (Maćzka et al., 2021). Cinnamaldehyd je aromatický aldehyd (Friedman, 2017), který se nachází v EO získaného z kůry skořicovníku a dalších druhů rodu *Cinnamomum* (Guzman, 2014). Kafr a α - a β -thuyon byly pozorovány jako hlavní složka EO *Artemisia herba-alba* Asso (Dahmani-Hamzaoui & Baaliouamer, 2010).

V přírodě hrají EO důležitou roli v ochraně rostlin pro své antibakteriální, antivirové, antifungální, insekticidní a repelentní vlastnosti (Bakkali et al., 2008). Díky přírodnímu původu, vysoké biologické odbouratelnosti a obecně nízké toxicitě a šetrnosti k životnímu prostředí jsou EO a jejich složky slibnými kandidáty na vývoj nových biopesticidů pro agronomické účely (Morke-liünė et al., 2021; Pavela & Benelli, 2016) jako alternativy k syntetickým fungicidům (Bahrami et al., 2016; Coleman et al., 2001; Sempere-Ferre et al., 2021).

2.2 VLASTNÍ POSTUP

2.2.1 STANOVENÍ VLIVU VYBRANÝCH SLOŽEK EO NA HOUBOVÉ PATOGENY BRAMBORU PŘENÁŠENÉ PŮDOU A SADBOU

2.2.1.1 Stanovení vlivu složek EO na houbové patogeny bramboru v *in vitro* podmínkách

TECHNICKÉ VYBAVENÍ

- Autokláv (Biobase, OT032; Čína)
- Flowbox (Telstar MH-100; Španělsko)
- Fotoaparát Olympus TG-6 (Olympus, Japonsko)
- Termostat
- Laboratorní analytické váhy (Mettler AE 160)
- Mikrovlnná trouba (ETA; Česká republika)
- Pipety (2–20 μ l, 20–200 μ l a 100–1000 μ l)
- Uzavíratelné plastové boxy (25 l) (Jysk)
- Plastové mikrozskumavky 1,5 ml a 2,0 ml (Eppendorf)
- Petriho misky o průměru 90 mm
- Preparační jehla na pasážování hub
- Korkovrt o průměru 6 mm
- Parafilm
- Odměrný válec (100 ml)
- Odměrná baňka se zábrusem (50 ml)
- Jednorázové rukavice
- Měřítka

CHEMIKÁLIE

- Technický ethanol (70%) – sterilizace pracovních prostor
- Ethanol 96%, p.a. (Ing. Petr Švec - PENTA s. r. o., Česká republika)
- D-Glukosa bezvodá (Ing. Petr Švec - PENTA s. r. o., Česká republika)
- Sabouraud Maltose Agar (SMA; HiMedia, Indie)
 - 65 g/l SMA média
 - 20 g/l glukosa
 - doplnit destilovanou vodou
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Destilovaná voda – příprava pomocí přístroje Demiwa 5 ros (WATEK s. r. o., Česká republika)
- Čisté přírodní složky EO (vše od Sigma-Aldrich, Německo)
- α -pinene (98%; 147524-250ML)
- carvacrol (99%, W224511-100G-K)
- cinnamaldehyd (\geq 95%, W228613-100G-K)
- D-carvone (\geq 96%, W224928-100G-K)
- eucalyptol (\geq 99%; W246506-1KG-K)
- L-linalool (\geq 95%, natural)
- L-menthol (\geq 99%; W266523-100G-K)
- L-menthone (\geq 96%; W266701-1KG-K)
- (R)-(+)-limonene (97%; 183164-100ML)
- thymol (\geq 98,5%; T0501-100G)

BIOLOGICKÝ MATERIÁL

- Houba *Helminthosporium solani* potřebná pro pokusy byla izolována z přirozeně infikovaných hlíz bramboru s typickými příznaky onemocnění (stříbřitost slupky hlíz) pocházejících z České republiky (Českomoravská vrchovina). Patogen byl následně identifikován pomocí real-time PCR dle Cullen *et al.* (2001). Jako standard sloužil izolát CCM F-511 pocházející z České sbírky mikroorganismů (Brno). *H. solani* bylo kultivováno při $25 \pm 1^\circ\text{C}$ v Petriho miskách (průměr 90 mm) na médiu SMA.
- Houba *Fusarium solani* var. *coeruleum* (CCM F-3) potřebná pro experimenty byla získána z České sbírky mikroorganismů (Brno) a byla kultivována na Potato Dextrose Agar (PDA; HiMedia, Mumbai, Indie) při $25 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Houba *Phoma foveata* byla zapůjčena z České sbírky mikroorganismů v Brně, pěstována na médiu PDA na Petriho miskách a uchována při teplotě $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

SOFTWARE PRO ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

- STATISTICA 7 (StatSoft, Inc., USA)

STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ EXPERIMENTŮ

- Statistické vyhodnocení experimentů bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu (jednofaktorová nebo vícefaktorová ANOVA) a Tukey HSD testu ($p < 0,01$).

Antifungální aktivita testovaných složek EO byla stanovena za použití techniky inhibice radiálního růstu mycelia. Testované složky EO byly ředěny 96% ethanolem (1 : 10) s následným přidáním pár kapek Tweenu 20 [0,01% (v/v)] k dokonalému rozptýlení v médiu. Příslušný objem rozpuštěné složky EO byl přidán do sterilizovaného SMA/PDA média o teplotě $40\text{--}45^\circ\text{C}$ pro získání finální koncentrace 0–1600 ppm. Po dostatečném promíchání byly roztoky SMA/PDA okamžitě nality do Petriho misek (20 ml/PM) o průměru 90 mm. Po zchladnutí a ztuhnutí živné půdy byl pomocí sterilního korkovrtu vykrojen agarový disk s inokulem houby z kultury staré tři týdny o průměru 6 mm a umístěn do středu PM, které byly následně utěsněny parafilmem. PM bez složky EO byly použity jako kontrola. Od každé varianty koncentrace byly připraveny tři opakování a PM byly inkubovány při $25 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 10–12 dnů u houby *H. solani* a 7 dnů u hub *F. solani* var. *coeruleum* a *P. foveata*. Kultivace probíhala v uzavíratelných plastových boxech (obr. 11). Následně byly změřeny průměry kultur hub jednotlivých variant pokusu (v mm) a vypočítány jednotlivé růstové charakteristiky mycelia. Výsledky byly vyjádřeny jako průměr tří nezávislých opakování pro každou kombinaci patogen–složka EO. Inhibice růstu mycelia (MGI) byla vypočítána pomocí následujícího vzorce dle Albuquerque *et al.* (2006):

$$\text{MGI} = \left[\frac{(\text{DC} - \text{DO})}{\text{DC}} \right] \times 100 \text{ [\%]}$$

DC: Radiální růst mycelia kontroly (mm) – průměr kolonie houby neošetřené složkou EO

DO: Radiální růst mycelia (mm) – průměr kolonie houby ošetřené složkou EO

Dále byla stanovena povaha účinku složek EO na houby (fungistatický a/nebo fungicidní). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální fungicidní koncentrace (MFC) testovaných EO u hub byly provedeny podle Plodpai *et al.* (2013). Hodnoty MIC byly stanoveny jako nejnižší koncentrace složek EO, která zcela zabránila (inhibovala) viditelnému růstu hub po inkubaci. Pro stanovení MFC byly přeneseny inhibované houby na agarových discích v PM ošetřených EO o koncentracích vyšších než MIC na čerstvé médium (SMA/PDA) a proběhla inkubace při $25 \pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 14 dnů. Poté bylo sledováno oživení růstu hub, které stanovilo koncentraci fungicidního účinku. MFC byla definována jako nejnižší koncentrace, při které nebyl po subkultuře pozorován žádný růst kolonií hub na čerstvém médiu SMA/PDA. Hodnoty IC_{50} (koncentrace, které vytvářejí 50% inhibiční účinek) byly graficky vypočteny z křivek dávky a reakce na základě měření v různých koncentracích dle Chang *et al.* (2008).

2.2.1.2 Stanovení vlivu složek EO na houbové patogeny bramboru v *in vivo* podmínkách

Účinnost složek EO s nejvyšší antifungální aktivitou zjištěnou v *in vitro* testech (tj. carvacrol, thymol a cinnamaldehyde) byla ověřena pomocí *in vivo* experimentů přímo na hlízách bramboru, kde byl zjišťován vliv výparů složek EO (fumigace) a vliv moření hlíz složkami EO na růst *H. solani*, *F. solani* var. *coeruleum* a *P. foveata*.



Obr. 11: Stanovení vlivu složek EO na houbové patogeny bramboru v *in vitro* podmínkách

TECHNICKÉ VYBAVENÍ

- Exsikátory (Super-Star-Desiccator, Siccó, Německo) s využitelným objem 42 l a celkovým objemem 45 l
- Uzavíratelné plastové boxy (25 l) (Jysk)
- Buničina, filtrační papír
- Petriho miska o průměru 90 mm
- Fotoaparát Olympus TG-6 (Olympus, Tokyo, Japonsko)
- Laboratorní analytické váhy (Mettler AE 160)
- Pipety (2–20 µl, 20–200 µl a 100–1000 µl)
- Sterilní skalpel
- Korkovrt o průměru 7 mm
- Třepačka (Kavalier LT 3, Nedform s. r. o., CZ)
- Epruvety o objemu 50 ml
- Plastové mikrozkušavky 1,5 ml a 2,0 ml (Eppendorf)
- Jednorázové rukavice
- Bürkerova komůrka (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Německo)

CHEMIKÁLIE

- Carvacrol (2%) a cinnamaldehyde (2%) navázané na biopolymer dle patentu Matušinský *et al.* (2020)
- Thymol (2%) – 1 g krystalického thymolu byl rozpuštěn ve 2 ml ethanolu (96%), následně přidán řepkový olej (3 ml) a destilovaná H₂O (9 ml) + Tween 20 (dle potřeby k dokonalé disperzi), vznikl tak zásobní roztok o koncentraci 6,90%, který byl dále ředěn na koncentraci 2% pomocí destilované H₂O (nelze navázat na biopolymer díky jeho krystalické formě)
- Řepkový olej
- Cinnamaldehyde (≥ 95%, Sigma-Aldrich, Německo)
- Carvacrol (99%, Sigma-Aldrich, Německo)
- Thymol (≥98,5%; Sigma-Aldrich, Německo)
- SAVO (NaClO; Unilever, Bohumín, Česká republika)
- Destilovaná H₂O – příprava pomocí přístroje Demiwa 5 ros (WATEK s. r. o., Česká republika)
- Technický ethanol (70%) – sterilizace pracovních prostor
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ethanol 96%, p.a. (Ing. Petr Švec – PENTA s. r. o., Česká republika) – ředění thymolu

BIOLOGICKÝ MATERIÁL

- Houba *Fusarium solani* var. *coeruleum* (CCM F-3) potřebná pro experimenty byla získána z České sbírky mikroorganismů (Brno) a byla kultivována na PDA při 25 ± 1 °C. Byla izolována z hlíz bramboru. Inokulum houby *F. solani* var. *coeruleum* bylo připraveno seškrábnutím mycelia z živného média z Petriho misky pomocí skalpelu a vloženo do epruvety se sterilní destilovanou vodou. Koncentrace konidií byla vyhodnocena pomocí Bürkerovy komůrky. Pro experimenty byla použita koncentrace 5 × 10⁵ konidií/ml.
- Houba *P. foveata* (CCM F-608) potřebná pro pokusy byla získána z České sbírky mikroorganismů (Brno). Byla izolována z hlíz bramboru s lézemi fómové hniloby. Houba byla kultivována na Potato Dextrose Agar (PDA; HiMedia, Mumbai, India) při 25 ± 1 °C v Petriho miskách (průměr 90 mm). Inokulum houby *P. foveata* bylo připraveno seškrábnutím mycelia z živného média z Petriho misky pomocí skalpelu a vloženo do epruvety se sterilní destilovanou vodou. Koncentrace konidií byla vyhodnocena pomocí Bürkerovy komůrky. Pro experimenty byla použita koncentrace 4 × 10⁴ konidií/ml.
- Hlízy odrůdy Red Anna o velikosti 35–45 mm (česká konzumní odrůda šlechtitelské společnosti Vesa Velhartice, a. s., citlivá na infekci houbami a bakteriemi).
- Hlízy odrůdy Belana o velikosti 35–45 mm se symptomy *H. solani* (raná odrůda pro přímý konzum, varný typ AB, citlivá na infekci *H. solani*, udržovatel: EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH., D, zakoupená v supermarketu).

SOFTWARE PRO ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

- ImageJ 1.53e (Maryland, USA, <https://imagej.net/software/imagej/>)
- STATISTICA 7; StatSoft, Inc., USA

STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ EXPERIMENTŮ

- Statistické vyhodnocení experimentů bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu (jednofaktorová nebo vícefaktorová ANOVA) a Tukey HSD testu ($p < 0,01$).

Stanovení vlivu fumigace hlíz složkami EO na infekci *H. solani*

Pokusy pro stanovení vlivu fumigace hlíz složkami EO na infekci *H. solani* byly provedeny v exsikátorech s využitelným objem 42 l a celkovým objemem 45 l (obr. 12). V exsikátorech byla rovnoměrně rozmístěna plata od vajec (obr. 13), na která byly vyrovnány hlízy bramboru odrůdy Belana ($n = 7$) o velikosti 35–45 mm vykazující slabé symptomy stříbřitosti (přirozená infekce). Hlízy byly před aplikací vyfotografovány fotoaparátem. Do exsikátorů byly položeny Petriho misky s buničinou, na kterou byla aplikována čistá složka EO o objemu 4,2 ml, u thymolu 4,2 g (100 ml/m³). Pro zajištění požadované vlhkosti byla plata a filtrační papír umístěný pod Petriho miskou navlhčeny destilovanou vodou. Do pokusu byla zařazena kontrola bez ošetření složkami EO. Od každé varianty pokusu byla provedena tři opakování. Po 60 dnech inkubace ošetřených hlíz při teplotě 10–15 °C a relativní vlhkosti 99% byl pokus vyhodnocen. Pro tento účel byly testované hlízy znovu vyfotografovány. Potom bylo provedeno vlastní vyhodnocení intenzity infekce hlíz (závažnosti onemocnění) pomocí softwaru ImageJ 1.53e. Účinnost složek EO byla stanovena jako rozdíl intenzity napadení hlíz po a před jejich aplikací.

Stanovení vlivu moření hlíz složkami EO na infekci *H. solani*

V dalším experimentu byl stanoven vliv moření hlíz složkami EO na infekci *H. solani*. Hlízy ($n = 7$) odrůdy ‚Belana‘ o velikosti 35–45 mm vykazující slabé symptomy stříbřitosti (přirozená infekce) byly ponořeny do složek EO o koncentraci 2 % po dobu 2 s. Pro vyšší účinnost a stabilitu byly složky EO (carvacrol a cinnamaldehyd) navázány na biopolymer podle patentu. Matušinský *et al.* (2020), jehož podstata spočívá v tom, že obsahuje stabilní formu složky EO v podobě mikrokapiček, které jsou uzavřeny v obalu tvořeném biopolymerem obsahujícím želatinu a chitosan v poměru 3 : 10, kdy ve 100 ml fungicidního prostředku je obsaženo 0,5 až 1,5 ml EO, 9,5 až 8,5 ml řepkového oleje na ředění EO, 0,2 ml polyethylenglykol sorbitanu monooleátu, 13,3 ml biopolymeru tvořícího obal mikrokapiček a 76,5 ml 0,5% hmotn. roztoku tripolyfosfátu sodného. Thymol byl naředěn na 2% koncentraci – viz *chemikálie* (díky jeho krystalické formě nelze navázat na biopolymer). Do pokusu byla zařazena kontrola (varianta bez ošetření). Hlízy byly vyrovnány do sterilních uzavíratelných plastových boxů (25 l) na filtrační papír nasycený destilovanou vodou (150 ml). Od každé varianty pokusu byla provedena tři opakování. Boxy byly uzavřeny a uloženy do skladu při teplotě 10–15 °C a relativní vlhkosti 99%. Před založením pokusu byly hlízy vyfoceny. Po 60 dnech inkubace byl zjištěn rozsah intenzity infekce hlíz (závažnosti onemocnění) jednotlivých variant pokusu. Pro tento účel byly hlízy vyfotografovány a následně bylo provedeno vyhodnocení intenzity infekce hlíz (%) pomocí softwaru ImageJ 1.53e. Účinnost jednotlivých složek EO byla stanovena jako rozdíl intenzity napadení hlíz po jejich aplikaci a před jejich aplikací.

Dále byla zjištěna intenzita sporulace *H. solani* na ošetřených a neošetřených hlízách u obou variant aplikace složek EO (moření a fumigace). Pro tento účel byla vyříznuta plocha slupky se symptomy stříbřitosti pomocí korkovrtu (průměr 7 mm). Vyříznuté terčíky (tři terčíky ze sedmi hlíz) byly vloženy do uzavíratelné zkumavky s destilovanou vodou (5 ml) a po uzavření byly třepány na třepačce 10 min při intenzitě 100 kvů/min pro uvolnění konidií. Následně byla stanovena intenzita sporulace (počet konidií/ml) jednotlivých variant pokusu pomocí Bürkerovy komůrky.

Stanovení vlivu fumigace hlíz složkami EO na infekci *P. foveata* a *F. solani* var. *coeruleum*

Pomocí *in vivo* experimentů byl přímo na hlízách bramboru dále zjišťován vliv fumigace a moření hlíz složkami EO na infekci *P. foveata* a *F. solani* var. *coeruleum*. Zdravé sadbové hlízy o velikosti 35–45 mm odrůdy Red Anna byly omyty pod tekoucí vodou pro odstranění ulpívajících zbytků půdy a dezinfikovány v 1% roztoku NaClO po dobu 15 min, poté byly opláchnuty ve sterilní destilované vodě a následně ponechány k oschnutí přes noc na vzduchu při pokojové teplotě. Hlízy byly mechanicky poraněny vpichem pomocí sterilní ocelové tyčky (průměr: 3 mm; délka: 10 mm) v korunkové a pupkové části.

Pokusy pro stanovení vlivu fumigace na růst *P. foveata* a *F. solani* var. *coeruleum* byly provedeny v exsikátorech s využitelným objem 42 l a celkovým objemem objem 45 l. Připravené rány na hlízách byly pomocí pipety inokulovány roztokem konidií *P. foveata* nebo *F. solani* var. *coeruleum* (10 μ l) a hlízy ($n = 7$) byly rovnoměrně rozmístěny do exsikátorů na plata od vajec. Do exsikátorů byly položeny Petriho misky s buničinou, na kterou byla aplikována čistá silice o objemu 4,2 ml (100 ml/m³), u thymolu 4,2 g (100 g/m³). Pro zajištění požadované vlhkosti byla plata a filtrační papír umístěný pod Petriho miskou navlhčena destilovanou vodou. Jako pozitivní kontrola sloužila varianta bez ošetření hlíz složkami EO (pouze inokulace suspenzí konidií spor). Negativní kontrolou byla varianta s aplikací sterilní destilované vody. Od každé varianty pokusu byla provedena tři opakování. Po 28 dnech inkubace ošetřených hlíz při teplotě 5–8 °C a relativní vlhkosti 99% byl pokus vyhodnocen. Pomocí nože byla hlíza rozkrojena přes očkovací body. Po vyfocení fotoaparátem Olympus TG-6 byla hodnocena plocha hniloby hlíz (intenzita napadení) (%) jednotlivých variant pokusu pomocí softwaru ImageJ 1.53e.



Obr. 12 a 13: Založení pokusu vlivu fumigace hlíz na patogeny hlíz bramboru v exsikátorech

Stanovení vlivu moření hlíz složkami EO na infekci *P. foveata* a *F. solani* var. *coeruleum*

V dalším experimentu byl stanoven vliv moření hlíz složkami EO na infekci *P. foveata* a *F. solani* var. *coeruleum*. Hlízy odrůdy Red Anna o velikosti 35–45 mm byly ponořeny do složek EO o koncentraci 2 % po dobu 2 s. Pro vyšší účinnost a stabilitu byly složky EO (carvacrol a cinnamaldehyd) navázány na biopolymer podle patentu Matušinský *et al.* (2020). Thymol byl naředěn na 2% koncentraci – viz *chemikálie* (díky jeho krystalické formě nelze navázat na biopolymer). Do pokusu byla zařazena pozitivní kont-

rola (pouze inokulace konidii *P. foveata* nebo *F. solani* var. *coeruleum*) a negativní kontrola (aplikace sterilní destilované vody). Hlízy byly vyrovnány do sterilních uzavíratelných plastových boxů (25 l) na filtrační papír nasycený destilovanou vodou (150 ml).



Obr. 14: Stanovení vlivu výparů složek EO (fumigace) a moření hlíz brambor na patogeny ve skladu

Od každé varianty pokusu byla provedena tři opakování. V každé variantě bylo sedm hlíz. Boxy byly uzavřeny a uloženy do skladu při teplotě 5–8 °C a relativní vlhkosti 96–99 % (obr. 14). Po 60 dnech inkubace byl zjištěn rozsah intenzity infekce hlíz jednotlivých variant pokusu. Pomocí nože byla hlíza rozkrojena přes očkovací body. Po vyfocení fotoaparátem Olympus TG-6 byla hodnocena plocha hniloby (%) pomocí softwaru ImageJ 1.53e.

2.2.2 STANOVENÍ VLIVU VYBRANÝCH EO A SLOŽEK EO PROTI BAKTERIÁLNÍM PATOGENŮM BRAMBORU PŘENÁŠENÝM SADBOU

2.2.2.1 Stanovení vlivu EO a složek EO proti pektinolytickým bakteriím v *in vitro* podmínkách

TECHNICKÉ VYBAVENÍ

- Autokláv (Tuttnauer 2540M, Tuttnauer Europe b.v., Nizozemí)
- Flowbox (Captair Biocap RNA/DNA, Erlab® Group, Francie)
- Laboratorní analytické váhy (Kern EW, Kern & Sohn GmbH, Německo)
- Termostat (Prime Series Incubator, Sanyo Gallenkamp PLC, Velká Británie)
- Termostat (Lovibond, Liebherr, Německo)
- Denzitometr (Den-1 McFarland Densitometer, BioSan, Lotyšsko)
- Sterilizátor (Mettler SN55, Mettler GmbH & Co. KG, Německo)
- Vortex (Stuart, BioCote Limited, Velká Británie)
- Třepačka (GFL 3005, GFL, Německo)
- Fotoaparát Canon EOS M200 (Japonsko)
- Pipety 1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl a vícekanálová pipeta (Finnpipette, ThermoScientific, Finsko)
- Uzavíratelné plastové boxy (12,35 l) (Jysk)
- Plastové mikrozkušavky 1,5 ml a 2,0 ml (Eppendorf, Německo)
- Plastové PCR mikrozkušavky 0,2 ml (Multiply®-Procup 0,2 ml, Satstend AG & Co. KG, Německo)
- Petriho misky o průměru 90 mm
- Očkovací klička
- Očkovací hokejka
- Disky z filtračního papíru o průměru 6 mm
- Parafilm
- ZIP plastové sáčky
- Potravinová fólie
- Plastový stojan na mikrozkušavky
- Odměrný válec (1000 ml)
- Jednorázové rukavice
- Pravítko

CHEMIKÁLIE

- Technický ethanol (70%) – sterilizace pracovních prostor
- Ethanol 96%, p.a. (Lih kvasný rafinovaný jemný, 96%, Merci s. r. o., Česká republika)
- King B Agar (HiMedia, Indie)
- Mueller Hinton Agar (MHA, HiMedia, Indie)
- Mueller Hinton Broth (MHB, HiMedia, Indie)
- Resazurin (Merck KGaA, Německo)
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Destilovaná voda
- Fyziologický roztok
- Čisté EO (Většinu esenciálních olejů ve 100% koncentraci dodala firma M+H Míča&Harašta s. r. o., Česká republika):
 - *Carum carvi oil* (EO z kmínu kořeného),
 - *Cinnamomum cassia leaf oil* (EO ze skořicovníku čínského) slouží v laboratoři ÚPŠRR MENDELU jako pozitivní kontrola,
 - *Cinnamomum zeylanicum bark oil* (EO ze skořicovníku ceylonského),
 - *Cuminum cyminum fruit oil* (EO ze šabreje kmínovitého),
 - *Eugenia caryophyllus leaf oil* (EO z hřebíčkovce kořeného),
 - *Foeniculum vulgare dulce fruit oil* (EO z fenyklu obecného),
 - *Melaleuca alternifolia leaf oil* (EO z kajeputu střídavolistého neboli tea tree),
 - *Mentha piperita oil* (EO z máty peprné),
 - *Origanum vulgare oil* (EO z dobromysle obecné),
 - *Rosmarinus officinalis leaf oil* (EO z rozmarýnu lékařského),

- *Thymus vulgaris oil* (EO z tymiánu obecného) (Florihana Distillerie, Francie).
- Čisté složky EO:
 - α -pinene (98%; 147524-250ML; Sigma-Aldrich, Německo),
 - carvacrol ($\leq 100\%$; M+H Míča&Harašta s. r. o., Česká republika),
 - cinnamaldehyde ($\geq 95\%$, W228613-100G-K; Sigma-Aldrich, Německo) sloužil v laboratoři ÚPŠRR MENDELU jako pozitivní kontrola,
- D-carvone ($\leq 100\%$; M+H Míča&Harašta s. r. o., Česká republika),
- L-menthone ($\geq 96\%$; W266701-IKG-K; Sigma-Aldrich, Německo),
- (R)-(+)-limonene (97%; 183164-100ML; Sigma-Aldrich, Německo),
- thymol (přírodní a syntetická forma $\leq 100\%$; M+H Míča&Harašta s. r. o., Česká republika).

BIOLOGICKÝ MATERIÁL

- Bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (kmen CPPB 56) byla zakoupena ze Sbírký fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií (VÚRV v. v. i., Praha). Bakteriální kmeny byly kultivovány na King B agaru při optimální teplotě pro růst a rozmnožování bakterie 28 ± 1 °C. Pro všechny experimenty byla použita koncentrace $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, což odpovídá hodnotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice změřené na denzitometru.
- Bakterie *Pectobacterium atrosepticum* (kmen CPPB 81) byla zakoupena ze Sbírký fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií (VÚRV v. v. i., Praha). Bakteriální kmeny byly kultivovány na King B agaru při optimální teplotě pro růst a rozmnožování bakterie 26 ± 1 °C. Pro všechny experimenty byla použita koncentrace $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, což odpovídá hodnotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice změřené na denzitometru.
- Bakterie *Dickeya solani* (kmen CPPB 200) byla zakoupena ze Sbírký fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií (VÚRV v. v. i., Praha). Bakteriální kmeny byly kultivovány na King B agaru při optimální teplotě pro růst a rozmnožování bakterie 32 ± 1 °C. Pro všechny experimenty byla použita koncentrace $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, což odpovídá hodnotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice změřené na denzitometru.

SOFTWARE PRO ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

- TIBCO Statistica® version 14.0.0.15 (USA)

Pro prvotní testování EO a složek EO byla vybrána disková difuzní metoda (DDM), při které byly hodnoceny inhibiční zóny vzniklé po ošetření EO/složkami EO, a na základě nich vyhodnocena citlivost bakteriálních kmenů. Následovaly metody minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC), jejichž cílem bylo stanovení nejnižší možné koncentrace, která inhibuje či trvale usmrcuje testované bakteriální patogeny.

Disková difuzní metoda

Metodika vycházela z EUCAST (2021) s uzpůsobením pro podmínky antibakteriálního vlivu esenciálních olejů a jejich složek. Bakteriální suspenze byla připravena do fyziologického roztoku.

Esenciální oleje a jejich složky byly ředěny 96% ethanolom s přidáním několika kapek Tween 20 (0.01% [w/v]) pro lepší homogenitu a pro získání základní koncentrace 100 μ l/ml. Další koncentrace (75; 50; 25; 10 a 5 μ l/ml) byly připraveny ze základního ředění přidáním sterilní destilované vody a několika kapek Tween 20. Vzorky byly zvortexovány.

Na Petriho misky s MHA bylo pipetováno 100 μ l připravené bakteriální suspenze a sterilní hokejkou byla suspenze rovnoměrně rozetřena. Po zaschnutí inokula bylo pipetováno 7,5 μ l roztoku EO/složky EO o dané koncentraci na čtyři disky sterilního filtračního papíru o průměru 6 mm, které byly na Petriho misce rovnoměrně rozmístěny do čtverce. Inkubace probíhala v termostatu při optimální teplotě pro růst bakterií: 28 °C pro *Pcc*, 26 °C pro *Pa* a 32 °C pro *Ds*. Po 24 h byly odečítány vzniklé inhibiční zóny (IZ). Testování probíhalo ve třech opakováních, s negativní růstovou kontrolou (disky se sterilní destilovanou vodou), pozitivní kontrolou (EO ze skořicovníku čínského pro EO a cinnamaldehyde pro složky EO) a ethanolom v dané koncentrační řadě.

Citlivost bakterií k EO/složkám EO byla hodnocena podle metodiky Ponce *et al.* (2003). Ke kategorizaci citlivosti bakterií byl použit průměr inhibiční zóny. Bakterie byly necitlivé k účinkům EO/složky EO při průměru IZ menším než 8 mm, citlivé při IZ 9–14 mm, velmi citlivé při IZ 15–19 mm a extrémně citlivé při průměru IZ více než 20 mm.

Minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace

Metodika byla převzata od Hajian-Maleki *et al.* (2021) a EUCAST (2003) a modifikována dle testovaných podmínek. Bakteriální suspenze byla připravena v MHB.

Esenciální oleje a složky EO byly ředěny v koncentrační řadě (100; 75; 50; 25; 10; 5; 3; 2,5; 1,5; 0,5 μ l/ml) a jejich roztoky byly připraveny 1,1 \times koncentrovanější z důvodu přidání bakteriálního inokula. K ředění následných koncentrací byl použit MHB.

Vzhledem k těkavosti EO/složek EO bylo zvoleno testování v 0,2 ml PCR mikrozkušnicích, do kterých bylo pipetováno 135 μ l roztoku EO/složky EO v daných koncentracích a 15 μ l bakteriálního inokula. Testování probíhalo ve čtyřech opakováních. Byly také připraveny kontrolní varianty – negativní kontrola bakteriálního inokula, pozitivní kontrola (EO ze skořicovníku

čínského či cinnamaldehyde ve zvolené koncentrační řadě), kontrola čistoty MHB, kontrola čistoty EO/složky EO v dané koncentraci. Destička s mikrozkuvkami byla zabalena do fólie a inkubována při optimální teplotě pro růst bakterie s nepřetržitým třepáním při rychlosti 100 rpm.

HODNOCENÍ MIC

Nejprve byl z mikrozkuvek odebrán potřebný objem pro hodnocení MBC. Do zbylého objemu jednotlivých vzorků bylo pipetováno 15 µl 0,01% roztoku barviva resazurinu, jehož změna zabarvení v roztoku sloužila jako indikátor živých bakteriálních buněk. Metodika byla částečně převzata od Mann & Markham (1998). Vzorky byly opět zabaleny do fólie a inkubovány další 2 h při optimální teplotě pro růst bakterií s nepřetržitým třepáním při rychlosti 120 rpm. Poté byly hodnoceny barevné změny vzorků oproti kontrolám. Fialové až růžové zbarvení testovaného vzorku znamenalo přítomnost živých bakterií, modré zbarvení znamenalo přítomnost mrtvých bakterií. Poslední koncentrace, u které bylo zjištěno modré zbarvení, byla hodnocena jako MIC.

HODNOCENÍ MBC

Po 24 h byl z mikrozkuvek odebrán vzorek 10 µl, který byl pipetován na plotny s MHA. Inkubace probíhala při optimální teplotě pro růst bakterií dalších 24 h. První koncentrace, u které nebyl zjištěn růst bakterií, byla hodnocena jako MBC.

2.2.2.2 Stanovení vlivu EO a složek EO proti pektinolytickým bakteriím v *in vivo* podmínkách

TECHNICKÉ VYBAVENÍ

- Autokláv (Tuttnauer 2540M, Tuttnauer Europe b.v., Nizozemí)
- Flowbox (Captair Biocap RNA/DNA, Erlab[®] Group, Francie)
- Laboratorní analytické váhy (Kern EW, Kern & Sohn GmbH, Německo)
- Termostat (Prime Series Incubator, Sanyo Gallenkamp PLC, Velká Británie)
- Termostat (Lovibond, Liebherr, Německo)
- Denzitometr (Den-1 McFarland Densitometer, BioSan, Lotyšsko)
- Sterilizátor (Mettler SN55, Mettler GmbH & Co. KG, Německo)
- Fotoaparát Canon EOS M200 (Japonsko)
- Pipety 1–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl, 1–10 ml (Finnpipette, ThermoScientific, Finsko)
- Uzavíratelné plastové boxy (12,35 l) (Jysk)
- Plastové mikrozkuvky 1,5 ml a 2,0 ml (Eppendorf, Německo)
- Petriho misky o průměru 90 mm
- Očkovací klička
- Parafilm
- Plastový stojan na mikrozkuvky
- Odměrný válec (25 ml, 100 ml, 1000 ml)
- Laboratorní kádinky (150 ml, 1000 ml)
- Kovová tyčinka o průměru 2 mm
- Jednorázové rukavice

CHEMIKÁLIE

- Technický ethanol (70%) – sterilizace pracovních prostor
- Ethanol 96%, p.a. (Lih kvasný rafinovaný jemný, 96%, Merci s. r. o., Česká republika)
- King B Agar (HiMedia, Indie)
- TWEEN 20 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Chlornan sodný (NaClO, SAVO Unilever, Česká republika)
- Destilovaná voda
- Čisté EO – Esenciální oleje ve 100% koncentraci dodala firma M+H Míča&Harašta s. r. o. (Česká republika):
 - *Mentha piperita oil* (EO z máty peprné),
 - *Cinnamomum cassia leaf oil* (EO ze skořicovníku čínského),
 - *Origanum vulgare oil* (EO z dobromysle obecné).
- Čisté složky EO:
 - carvacrol (M+H Míča&Harašta s. r. o., Česká republika),
 - cinnamaldehyde (≥95%, W228613-100G-K; Sigma-Aldrich, Německo),
 - L-menthone (≥96%; W266701-1KG-K; Sigma-Aldrich, Německo).

BIOLOGICKÝ MATERIÁL

- Bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (kmen CPPB 56) byla zakoupena ze Sbírký fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií (VÚRV v. v. i., Praha). Bakteriální kmeny byly kultivovány na King B agaru při optimální teplotě pro růst a rozmnožování bakterie 28 ± 1 °C. Pro všechny experimenty byla použita koncentrace 1,5 × 10⁸ CFU/ml, což odpovídá hodnotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice změřené na denzitometru.
- Bakterie *Pectobacterium atrosepticum* (kmen CPPB 81) byla zakoupena ze Sbírký fytopatogenních a zemědělsky prospěšných bakterií (VÚRV, v. v. i., Praha). Bakteriální kmeny byly kultivovány na King B agaru při optimální teplotě pro růst a rozmnožování bakterie 32 ± 1 °C. Pro všechny experimenty byla použita koncentrace 1,5 × 10⁸ CFU/ml, což odpovídá hodnotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice změřené na denzitometru.
- Růst a rozmnožování bakterie 26 ± 1 °C. Pro všechny experimenty byla použita koncentrace 1,5 × 10⁸ CFU/ml, což odpovídá hodnotě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice změřené na denzitometru.

- Hlízy odrůdy Red Anna o velikosti 30–38 mm (česká konzumní odrůda citlivá na infekci houbami a bakteriemi; šlechtitelská společnost Vesa Velhartice, a. s., Česká republika).
- Hlízy odrůdy Antonia o velikosti 35–40 mm (poloraná až polopozdní odrůda pro přímý konzum, varný typ AB, udržovatel: EUROPLANT Pflanzenzucht GmbH., D) (Ovo-Sadba, spol. s r. o., Česká republika).

SOFTWARE PRO ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

- Software pro obrazovou analýzu Assess 2.0 (APS Press, USA),
- TIBCO Statistica® version 14.0.0.15 (USA).

V *in vivo* podmínkách bylo zvoleno ošetření EO/složkami EO metodou moření (tj. máčení a oplachu) a fumigace hlíz dvou odrůd bramboru. U metody máčení a oplachu byla zkoušena účinnost jak preventivní, tak i kurativní. Vzorky byly inkubovány v temné místnosti při teplotě 22 ± 2 °C (pokožová teplota) a při teplotě 15 °C (předskladovací teplota vhodná pro regeneraci hlíz) po dobu 7–10 dnů.

Moření – máčení

Metodika byla částečně převzata od Hajian-Maleki *et al.* (2021). Testy byly založeny po 6 hlízách ve dvou opakováních s kontrolou růstu inokula příslušné bakterie. Hlízy byly nejprve povrchově desinfikovány NaClO a 2× důkladně opláchnuty destilovanou vodou.

Preventivní ošetření máčením – do hlíz byly udělány sterilní kovovou tyčinkou dva protilehlé vpichy (pupková a korunková část hlízy) o průměru 2 mm a hloubce 4 mm. Hlízy byly máčeny 20 min v EO/složce EO ve stanovené MIC a poté se nechaly oschnout. Po oschnutí bylo do ran pipetováno 15 µl bakteriálního inokula. Hlízy byly umístěny do krabice, uzavřeny víkem a inkubovány buď při teplotě 22 ± 2 °C, či 15 °C. Po 7–10 dnech byly hlízy podélně rozříznuty přes místa poranění a hnilobné plochy byly vyfotografovány. Vyhodnocení velikosti hnilobné plochy bylo provedeno pomocí obrazové analýzy programem Assess 2.0.

Kurativní ošetření máčením – sterilní kovovou tyčinkou byly udělány dva protilehlé vpichy (pupková a korunková část hlízy) o průměru 2 mm a hloubce 4 mm. Do ran bylo pipetováno 15 µl bakteriálního inokula. Hlízy byly umístěny do krabice na navlhčený filtrační papír, dobře uzavřeny víkem a inkubovány 24 h za teploty 22 ± 2 °C. Po 24 h byly hlízy máčeny na 20 min v EO/složce EO ve stanovené MIC a poté se nechaly oschnout. Hlízy byly umístěny do krabice, uzavřeny víkem a inkubovány za daných podmínek – viz preventivní ošetření. Po 7–10 dnech byly hlízy podélně rozříznuty přes místa poranění a byly pořízeny fotografie hnilobné plochy. Vyhodnocení velikosti hnilobné plochy bylo provedeno pomocí obrazové analýzy programem Assess 2.0.

Moření – oplach

Test probíhal totožně jako test máčení, rozdíl byl pouze v délce kontaktu EO/složky EO s povrchem hlízy. Oplach probíhal po dobu 30 s.

Fumigace

Metodika byla částečně převzata od Song *et al.* (2009) a Perumal *et al.* (2017). Testy byly provedeny na odrůdách Red Anna ($n = 6$) a Antonia ($n = 6$) ve dvou opakováních, s kontrolou růstu inokula příslušné bakterie. Hlízy byly nejprve povrchově desinfikovány NaClO a 2× důkladně opláchnuty destilovanou vodou. Do hlíz byly udělány sterilní kovovou tyčinkou dva protilehlé vpichy o průměru 2 mm a hloubce 4 mm. Do ran bylo pipetováno 15 µl bakteriálního inokula. Hlízy byly umístěny do krabice. Do krabice byla také vložena otevřená Petriho miska s buničitou vatou, na kterou byl pipetován čistý EO/složka EO. Množství EO/složky EO bylo přepočítáno na objem použité krabice, tak aby bylo splněno množství 100 ml/m³. Krabice byly uzavřeny víkem. Víko bylo ještě po obvodu fixováno parafilmem. Inkubace probíhala za teploty 22 ± 2 °C nebo 15 °C po dobu 7–10 dnů v temné místnosti.

2.2.3 ZKOUŠKA STOLNÍ HODNOTY HLÍZ PO OŠETŘENÍ SLOŽKAMI EO MOŘENÍM A FUMIGACÍ

Na závěr byla provedena zkouška stolní hodnoty hlíz po ošetření EO mořením a fumigací. Hlízy byly jeden den před zkouškou vyjmuty ze skladu a umístěny při pokojové teplotě. Vzorky hlíz byly vařeny v páře ve varných skleněných mísách (obr. 15). Hlízy nebyly předem loupány, krájeny a soleny. Vlastní hodnocení provádělo pět osob. Testované vzorky hlíz byly servírovány pod čísly degustátorům (obr. 16), kteří nezávisle na sobě bonitovali jednotlivé vlastnosti podle ČSN 46 22 11 a Vidner *et al.* (1987). K neutralizaci chuti mezi jednotlivými vzorky sloužila voda. Zkouška byla provedena za denního světla.

TECHNICKÉ VYBAVENÍ

- Hrnce (varné skleněné mísy) s párou

CHEMIKÁLIE

- Mléko nebo voda (k neutralizaci chuti mezi jednotlivými vzorky)



Obr. 15: Hrnce (varné skleněné mísy) s párou pro přípravu vzorků hlíz ke zkoušce stolní hodnoty



Obr. 16: Zkouška stolní hodnoty hlíz ošetřených fumigací a mořením

2.3 PŘÍKLAD PRAKTICKÉHO VYUŽITÍ

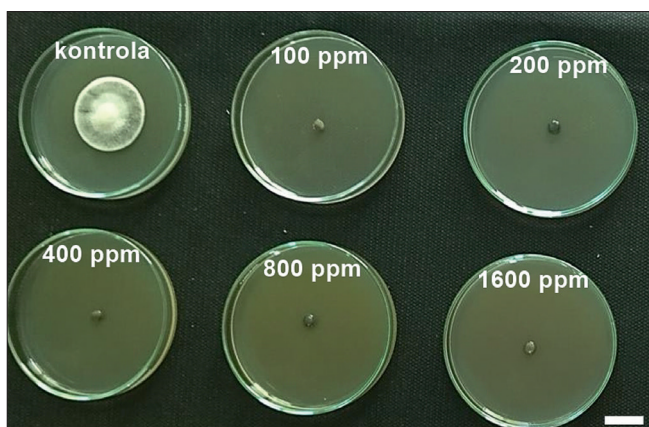
2.3.1 STANOVENÍ VLIVU SLOŽEK EO NA HOUBOVÉ PATOGENY BRAMBORU

2.3.1.1 Stanovení vlivu složek EO na houbové patogeny bramboru v *in vitro* podmínkách

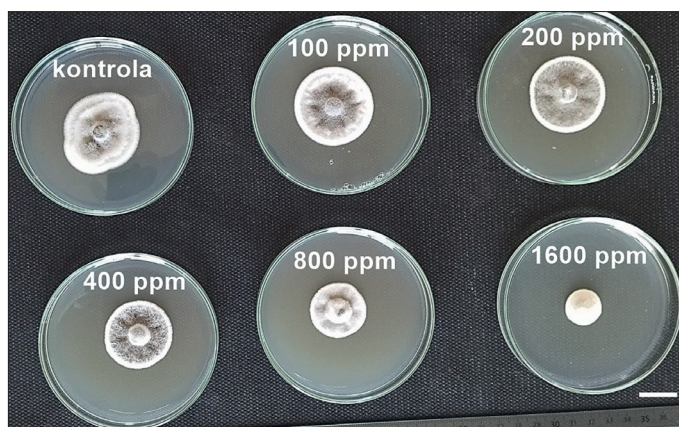
Pro zjištění vlivu EO na růst hub byly provedeny nejprve laboratorní *in vitro* pokusy, kde byla vyhodnocena antifungální aktivita EO při různých koncentracích.

Stanovení vlivu složek EO na *H. solani* v *in vitro* podmínkách

Z výsledků stanovení vlivu složek EO na růst houby *H. solani* v *in vitro* podmínkách vyplývá, že všechny hodnocené složky EO prokázaly antifungální aktivitu (Tab. 1). Porovnání získaných dat při koncentraci 100 ppm ukázalo, že všechny testované složky EO byly schopny inhibovat růst mycelia *H. solani* v rozmezí od 3,1% do 100%. Mezi jednotlivými složkami EO byly zjištěny statisticky vysoce průkazné rozdíly v antifungální aktivitě. Nejvyšší úroveň inhibice růstu mycelia (inhibiční účinek) proti *H. solani* byla získána pomocí thymolu, carvacrolu (obr. 17) a cinnamaldehydu bez statisticky významných rozdílů mezi nimi. Proto byly uvedené složky EO vybrány pro použití v dalších *in vivo* experimentech. Nejnižší úroveň inhibice proti tomuto patogenu byla zjištěna u (R)-(+)-limonenu (obr. 18).



Obr. 17: Inhibice růstu *H. solani* při aplikaci carvacrolu



Obr. 18: Inhibice růstu *H. solani* při aplikaci (R)-(+)-limonenu

Tab. 1: Rozdíly v průměrné inhibici růstu mycelia (MGI) *H. solani* mezi různými koncentracemi složek EO

Složka EO	Koncentrace složky EO (ppm)					
	0	100	200	400	800	1600
(R)-(+)-limonene	0	3,1 ^d	7,1 ^e	14,2 ^c	31,4 ^b	51,1 ^b
α -pinene	0	7,4 ^{cd}	14,9 ^{de}	18,1 ^c	29,3 ^b	54,9 ^b
D-carvone	0	24,2 ^{bc}	39,5 ^c	100 ^a	100 ^a	100 ^a
carvacrol	0	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
eucalyptol	0	6,9 ^{cd}	31,8 ^{cd}	35,1 ^c	59,7 ^b	100 ^a
cinnamaldehyde	0	86,9 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
L-linalool	0	41,3 ^b	49,6 ^{bc}	92,6 ^{ab}	100 ^a	100 ^a
L-menthone	0	10,0 ^{cd}	14,3 ^{de}	50,9 ^{bc}	100 ^a	100 ^a
L-menthol	0	38,2 ^b	63,6 ^b	100 ^a	100 ^a	100 ^a
thymol	0	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a

Všechny údaje jsou průměry tří opakování. Průměrné hodnoty ve sloupci, které sdílí stejný horní index, se na základě Tukey HSD testu významně neliší ($p < 0,01$). Různá malá písmena v tabulce označují statisticky významné rozdíly.

Nejnižší hodnota IC_{50} byla pozorována za použití thymolu a carvacrolu následovaného cinnamaldehydem (Tab. 2). Zkoumání fungistatických a/nebo fungicidních aktivit odhalilo, že thymol, carvacrol a cinnamaldehyde měly fungicidní vlastnosti proti *H. solani* v koncentracích 80, 100 a 120 ppm (Tab. 2). Thymol, carvacrol a cinnamaldehyde měly nejnižší MIC mezi testovanými složkami EO. Složky EO inhibovaly růst patogenu způsobem závislým na dávce. Nejvyšší fungicidní schopnost byla zaznamenána u thymolu (80 ppm), carvacrolu (100 ppm) a cinnamaldehydu (120 ppm), naopak nejnižší α -pinene (3400 ppm) a (R)-(+)-limonene (3300 ppm).

Tab. 2: Antifungální aktivita složek EO na růst mycelia *H. solani*

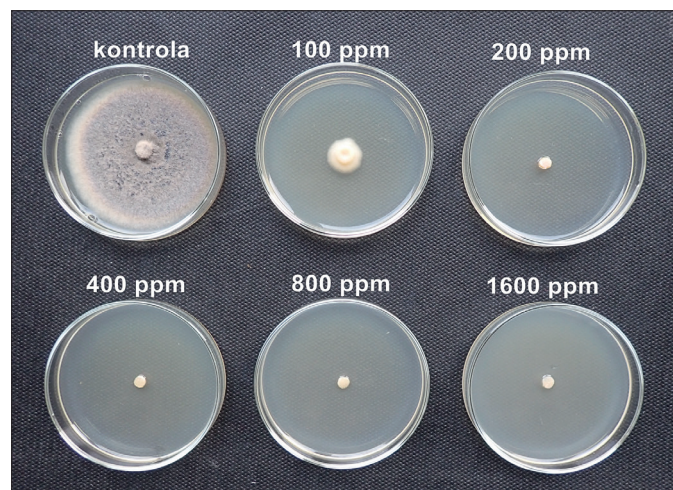
Složka EO	IC50 (ppm)	MIC (ppm)	MFC (ppm)
(R)-(+)-limonene	1600	3200	3300
α -pinene	1600	3200	3400
D-carvone	175	350	350
carvacrol	40	80	100
eucalyptol	700	1400	1700

Složka EO	IC50 (ppm)	MIC (ppm)	MFC (ppm)
cinnamaldehyde	60	120	120
L-linalool	225	450	500
L-menthone	300	600	600
L-menthol	125	250	250
thymol	40	80	80

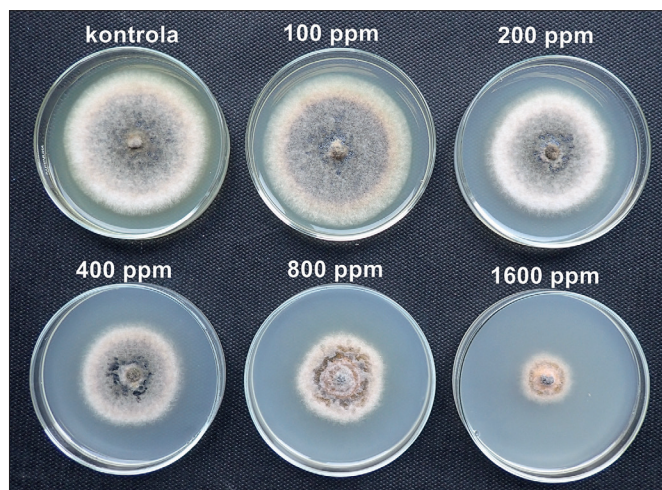
Hodnoty představují průměr tří nezávislých opakování pro každou kombinaci patogen-složka EO. IC_{50} – koncentrace, která vytváří 50% inhibiční účinek; MIC – minimální inhibiční koncentrace; MFC – minimální fungicidní koncentrace.

Stanovení vlivu složek EO na *P. foveata* v *in vitro* podmínkách

Pro zjištění vlivu složek EO na růst houby *P. foveata* byly provedeny nejprve laboratorní *in vitro* pokusy, kde byla vyhodnocena antifungální aktivita EO při různých koncentracích. Z výsledků pokusů vyplývá, že všechny hodnocené složky EO prokázaly antifungální aktivitu (Tab. 3). Porovnání získaných dat při koncentraci 100 ppm ukázalo, že všechny testované složky EO byly schopny inhibovat růst mycelia *P. foveata* v rozmezí od 4,59% do 78,31%. Mezi jednotlivými složkami EO byly zjištěny statisticky vysoce průkazné rozdíly v antifungální aktivitě. Nejvyšší úroveň inhibice růstu mycelia (inhibiční účinek) proti *P. foveata* byla získána pomocí thymolu (obr. 19), carvacrolu a cinnamaldehydu bez statisticky významných rozdílů mezi nimi. Nejnižší úroveň inhibice proti tomuto patogenu byla zjištěna u (R)-(+)-limonenu a α -pinenu (obr. 20).



Obr. 19: Inhibice růstu *P. foveata* při aplikaci thymolu



Obr. 20: Inhibice růstu *P. foveata* při aplikaci α -pinenu

Tab. 3: Rozdíly v průměrné inhibici růstu mycelia (MGI) *P. foveata* mezi různými koncentracemi složek EO

Složka EO	Koncentrace složky esenciálního oleje (ppm)					
	0	100	200	400	800	1600
(R)-(+)-limonene	0	5,13 ⁱ	13,72 ^{fghi}	16,58 ^{fghi}	30,87 ^{fg}	55,42 ^{cd}
α -pinene	0	11,66 ^{ghi}	13,00 ^{fghi}	18,82 ^{fghi}	30,06 ^{fgh}	67,26 ^{bcd}
D-carvone	0	24,53 ^{fghi}	72,78 ^{bcd}	100 ^a	100 ^a	100 ^a
carvacrol	0	74,99 ^{bc}	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
eucalyptol	0	4,59 ⁱ	9,18 ^{hi}	27,57 ^{fgh}	75,04 ^{bcd}	100 ^a
cinnamaldehyde	0	22,20 ^{fghi}	82,34 ^{ab}	100 ^a	100 ^a	100 ^a
L-linalool	0	16,98 ^{fghi}	33,99 ^{ef}	72,32 ^{bcd}	100 ^a	100 ^a
L-menthone	0	6,86 ⁱ	52,57 ^{de}	80,59 ^{ab}	100 ^a	100 ^a
L-menthol	0	32,65 ^{efg}	68,06 ^{bcd}	100 ^a	100 ^a	100 ^a
thymol	0	78,31 ^b	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a

Všechny údaje jsou průměry tří opakování. Průměrné hodnoty ve sloupci, které sdílí stejný horní index, se na základě Tukey HSD testu významně neliší ($p < 0,01$). Různá malá písmena v tabulce označují statisticky významné rozdíly.

Dále byla stanovena IC_{50} , MIC a MFC (Tab. 4). Nejnižší hodnota IC_{50} byla pozorována za použití thymolu a carvacrolu (65 ppm) následovaného cinnamaldehydem (125 ppm). Zkoumání fungistatických a/nebo fungicidních aktivit odhalilo, že EO thymol a carvacrol měly fungicidní vlastnosti proti *P. foveata* v koncentracích 200 ppm, cinnamaldehyde 300 ppm (Tab. 4). Naopak nejnižší fungicidní schopnost byla zaznamenána u (R)-(+)-limonene (2900 ppm), α -pinene (2600 ppm) a eucalyptolu (1300 ppm). Thymol, carvacrol a cinnamaldehyde měly rovněž nejnižší MIC mezi testovanými EO (tj. 130, 130 a 250 ppm). Složky EO inhibovaly růst patogenu způsobem závislým na dávce. Thymol, carvacrol a cinnamaldehyde byly na základě nejvyšší antifungální aktivity v *in vitro* testech vybrány pro použití v následujících *in vivo* experimentech.

Tab. 4: Antifungální aktivita složek EO na růst mycelia *P. foveata*

Složka EO	IC_{50} (ppm)	MIC (ppm)	MFC (ppm)
(R)-(+)-limonene	1400	2800	2900
α -pinene	1200	2400	2600
D-carvone	150	300	800
carvacrol	65	130	200
eucalyptol	500	1000	1300

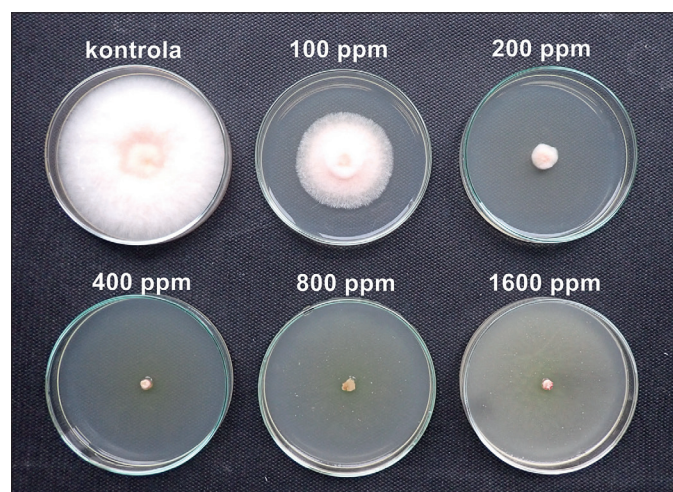
Složka EO	IC_{50} (ppm)	MIC (ppm)	MFC (ppm)
cinnamaldehyde	125	250	300
L-linalool	280	560	600
L-menthone	250	500	600
L-menthol	150	300	500
thymol	65	130	200

Hodnoty představují průměr tří nezávislých opakování pro každou kombinaci patogen-složka EO. IC_{50} – koncentrace, která vytváří 50% inhibiční účinek; MIC – minimální inhibiční koncentrace; MFC – minimální fungicidní koncentrace.

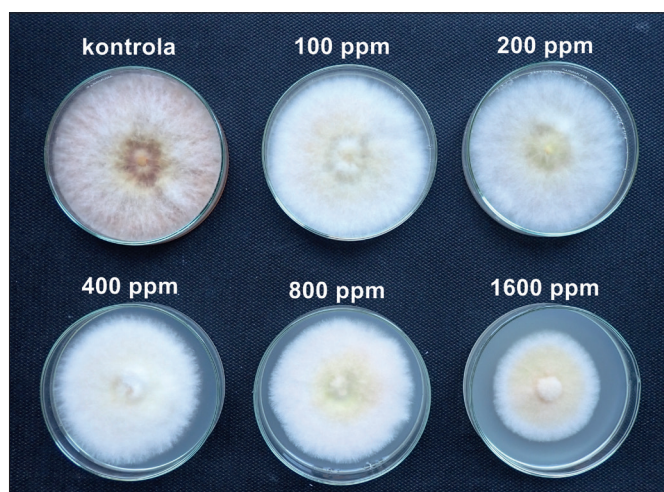
Stanovení vlivu složek EO na *F. solani* var. *coeruleum* v *in vitro* podmínkách

Z výsledků pokusů vyplývá, že všechny hodnocené složky EO měly v *in vitro* podmínkách průkazný vliv na inhibici růstu *F. solani* var. *coeruleum*. Mezi kontrolou a jednotlivými koncentracemi složek EO byly zjištěny významné rozdíly. Antifungální aktivita jednotlivých složek EO se průkazně lišila (Tab. 5).

Nejvyšší antifungální aktivita byla zaznamenána u carvacrolu, thymolu a L-mentholu (obr. 21), které způsobily již při koncentraci 200 ppm inhibici růstu mycelia *F. solani* var. *coeruleum* 100%, resp. 82,96%. Nejnižší antifungální aktivita byla zaznamenána u (R)-(+)-limonenu (obr. 22) a α -pinenu.



Obr. 21: Inhibice růstu *Fusarium solani* var. *coeruleum* při aplikaci L-mentholu



Obr. 22: Inhibice růstu *Fusarium solani* var. *coeruleum* při aplikaci (R)-(+)-limonenu

Tab. 5: Rozdíly v průměrné inhibici růstu mycelia (MGI) *F. solani* var. *coeruleum* mezi různými koncentracemi složek EO

Složka EO	Koncentrace složky esenciálního oleje (ppm)					
	0	100	200	400	800	1600
(R)-(+)-limonene	0	0	2,22 ^{lm}	12,96 ^{hijk}	15,56 ^{hij}	29,26 ^g
α -pinene	0	0	0	6,32 ^{ijklm}	22,46 ^{gh}	41,05 ^f
D-carvone	0	9,82 ^{ijklm}	66,32 ^{de}	92,63 ^{ab}	100 ^a	100 ^a
carvacrol	0	92,59 ^{ab}	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
eucalyptol	0	0	0	10,37 ^{ijkl}	69,26 ^{de}	91,11 ^{ab}
cinnamaldehyde	0	16,67 ^{hi}	60,00 ^e	100 ^a	100 ^a	100 ^a
L-linalool	0	22,50 ^{gh}	41,25 ^f	75,00 ^{cd}	100 ^a	100 ^a
L-menthone	0	5,19 ^{klm}	39,63 ^f	83,33 ^{bc}	100 ^a	100 ^a
L-menthol	0	42,59 ^f	82,96 ^{bc}	100 ^a	100 ^a	100 ^a
thymol	0	46,25 ^f	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a

Všechny údaje jsou průměry tří opakování. Průměrné hodnoty ve sloupci, které sdílí stejný horní index, se na základě Tukey HSD testu významně neliší ($p < 0,01$). Různá malá písmena v tabulce označují statisticky významné rozdíly.

Dále byla stanovena IC_{50} , MIC a MFC (Tab. 6). Nejnižší hodnota IC_{50} byla pozorována za použití carvacrolu (60 ppm) a thymolu (100 ppm) následovaného L-mentholem (150 ppm). Při stanovení fungistatických a/nebo fungicidních aktivit zjištěno, že nejvyšší fungicidní účinek proti *F. solani* var. *coeruleum* měl carvacrol (150 ppm), thymol (250 ppm) a cinnamaldehyde (400 ppm) (Tab. 6). Naopak nejnižší fungicidní schopnost byla zaznamenána u (R)-(+)-limonenu (5600 ppm), α -pinenu (3900 ppm) a eucalyptolu (1600 ppm). Thymol, carvacrol a L-menthol měly nejnižší MIC mezi testovanými EO (tj. 120, 200 a 300 ppm). Složky EO EO inhibovaly růst patogenu způsobem závislým na dávce.

Tab. 6: Antifungální aktivita složek esenciálních olejů na růst mycelia *F. solani* var. *coeruleum*

Složka EO	IC_{50} (ppm)	MIC (ppm)	MFC (ppm)
(R)-(+)-limonene	2800	5600	5600
α -pinene	1900	3800	3900
D-carvone	210	420	900
carvacrol	60	120	150
eucalyptol	670	1340	1600

Složka EO	IC_{50} (ppm)	MIC (ppm)	MFC (ppm)
cinnamaldehyde	180	360	400
L-linalool	250	500	600
L-menthone	270	540	600
L-menthol	150	300	900
thymol	100	200	250

Hodnoty představují průměr tří nezávislých opakování pro každou kombinaci patogen-složka EO. IC_{50} – koncentrace, která vytváří 50% inhibiční účinek; MIC – minimální inhibiční koncentrace; MFC – minimální fungicidní koncentrace.

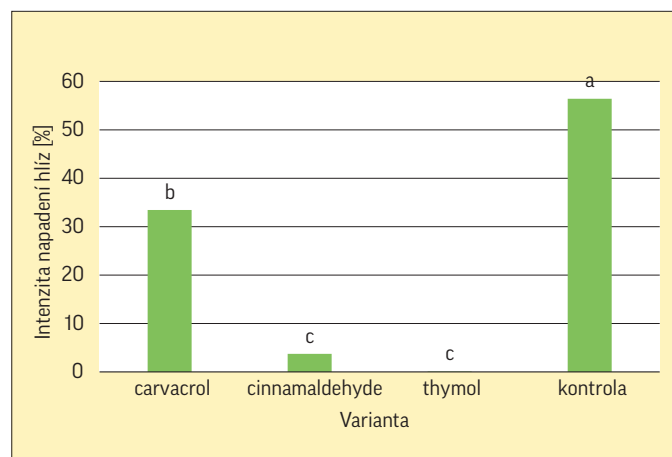
2.3.1.2 Stanovení vlivu složek EO na houbové patogeny bramboru v *in vivo* podmínkách

Účinnost nejúčinnějších složek EO v *in vitro* experimentech byla ověřena pomocí *in vivo* pokusů přímo na hlízách, které byly ošetřeny pomocí fumigace a moření.

Stanovení vlivu složek EO na *H. solani* v *in vivo* podmínkách

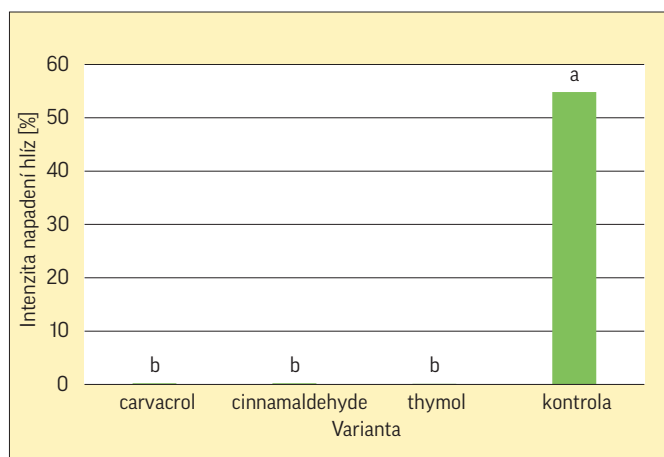
Po ošetření hlíz fumigací bylo zjištěno statisticky vysoce průkazné snížení intenzity napadení *H. solani* oproti neošetřené kontrole u všech testovaných složek EO (obr. 23). Nejvyšší vliv na snížení intenzity napadení měl thymol (99,83 %). Cinnamaldehyde snížil intenzitu napadení o 93,40% a carvacrol o 40,72%. Po ošetření hlíz mořením bylo zjištěno statisticky vysoce průkazné snížení intenzity napadení *H. solani* rovněž u všech testovaných složek EO (obr. 24). Relativní snížení napadení hlíz *H. solani* se pohybovalo od 99,57% do 99,78% (Tab. 8). Vyšší vliv na snížení napadení hlíz *H. solani* mělo moření.

Obr. 23: Průměrná intenzita napadení hlíz *H. solani* (plocha lézí v %) po 60 dnech od aplikace složek EO formou fumigace



Všechny údaje jsou průměry tří opakování, z nichž každé je reprezentováno sedmi hlízami; různá písmena ve sloupcích označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) podle Tukey HSD testu.

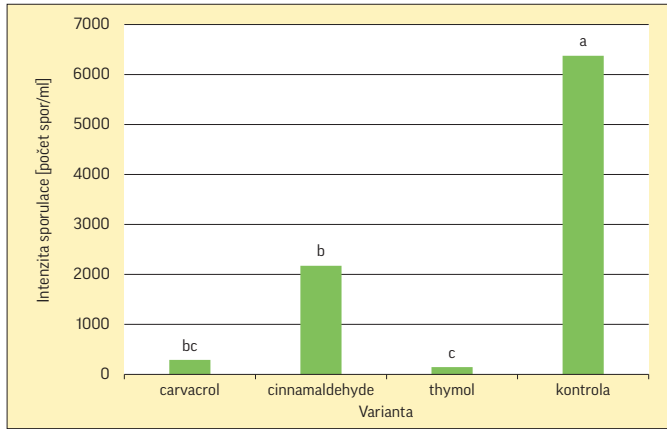
Obr. 24: Průměrná intenzita napadení hlíz *H. solani* (plocha lézí v %) po 60 dnech od aplikace složek EO formou moření



Všechny údaje jsou průměry tří opakování, z nichž každé je reprezentováno sedmi hlízami; různá písmena ve sloupcích označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) podle Tukey HSD testu.

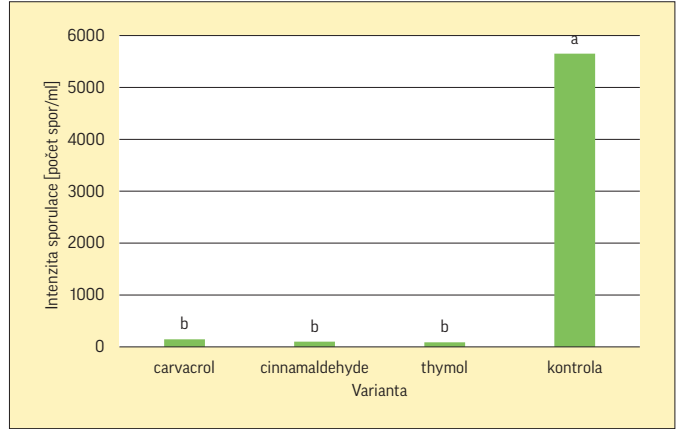
Po ošetření hlíz všemi testovanými složkami EO bylo zjištěno statisticky vysoce průkazné snížení intenzity sporulace *H. solani* oproti neošetřené kontrole u obou variant aplikace (obr. 25 a 26). Vyšší vliv na intenzitu sporulace *H. solani* mělo moření hlíz než fumigace. Relativní snížení intenzity sporulace se pohybovalo od 97,44% do 98,44% u moření, resp. 65,92% do 97,73% u fumigace (Tab. 7). Aplikace thymolu byla nejúčinnější u obou variant ošetření hlíz, sporulace se snížila o 98,44% a 97,73% ve srovnání s neošetřenou kontrolou.

Obr. 25: Průměrná intenzita sporulace *H. solani* na hlízách po aplikaci složek EO formou fumigace po 60 dnech od aplikace



Všechny údaje jsou průměry tří opakování, z nichž každé je reprezentováno sedmi hlízami (z každé hlízy tři terčíky); různá písmena ve sloupcích označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) podle Tukey HSD testu.

Obr. 26: Průměrná intenzita sporulace *H. solani* na hlízách po aplikaci složek EO formou moření po 60 dnech od aplikace



Všechny údaje jsou průměry tří opakování, z nichž každé je reprezentováno sedmi hlízami (z každé hlízy tři terčíky); různá písmena ve sloupcích označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) podle Tukey HSD testu.

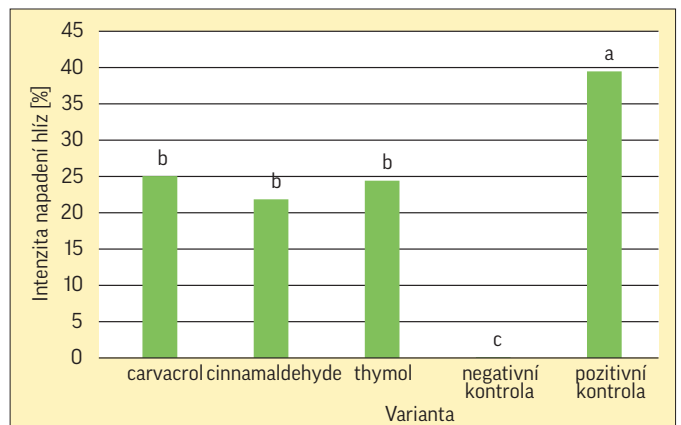
Tab. 7: Relativní snížení intenzity sporulace *H. solani* na hlízách po fumigaci a moření (%)

Druh složky EO	Fumigace	Moření
Carvacrol	95,46	97,44
Cinnamaldehyde	65,92	98,23
Thymol	97,73	98,44

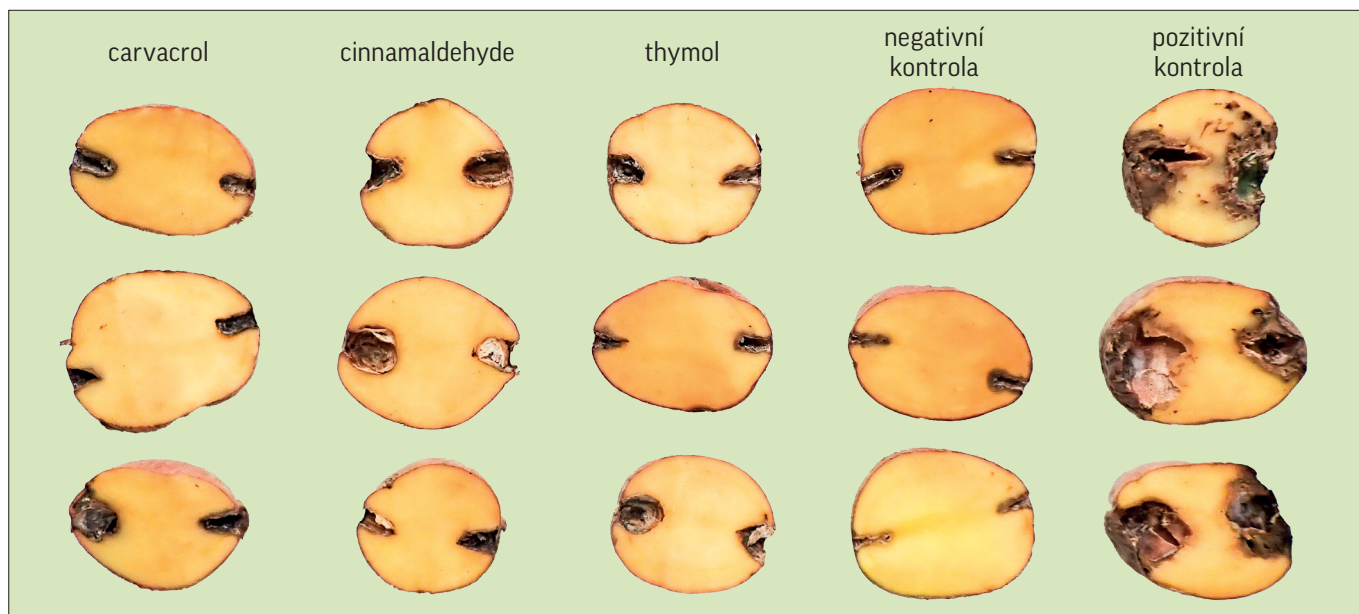
Stanovení vlivu složek EO na *P. foveata* v *in vivo* podmínkách

Hlízy ošetřené sterilizovanou vodou (negativní kontrola) nevykazovaly symptomy hniloby. Docházelo pouze k viditelné diskoloraci pletiva v okolí vpichu vlivem oxidace a suberizace. Naproti tomu hlízy inokulované *P. foveata* (pozitivní kontrola) vykazovaly silné příznaky hniloby. Hlízy ošetřené složkami EO a inokulované *P. foveata* vykazovaly slabé příznaky hniloby (obr. 28). Při aplikaci složek EO došlo ke zpomalení hniloby hlíz a k výraznému zmírnění symptomů. Po ošetření hlíz fumigací bylo zjištěno vysoce průkazné snížení intenzity napadení *P. foveata* oproti neošetřené kontrole u všech testovaných složek EO (obr. 27). Nejvyšší vliv na snížení intenzity napadení měl cinnamaldehyde (44,64 %). Thymol snížil intenzitu napadení o 38,15% a carvacrol o 36,55%. Mezi testovanými složkami EO nebyl v účinnosti na patogen zaznamenán významný rozdíl. Po ošetření hlíz mořením bylo zjištěno statisticky vysoce průkazné snížení intenzity napadení *P. foveata* rovněž u všech testovaných EO (obr. 29). Vyhodnocení napadení *P. foveata* hlíz po ošetření hlíz složkami EO formou moření je dokumentováno na obr. 28. Relativní snížení napadení hlíz *P. foveata* (Tab. 8) se pohybovalo od 67,88% (cinnamaldehyde) do 78,28% (carvacrol). Mezi testovanými složkami EO nebyl v účinnosti na patogen zaznamenán významný rozdíl. Vyšší vliv na snížení napadení hlíz *P. foveata* mělo moření oproti fumigaci.

Obr. 27: Průměrná intenzita napadení hlíz *P. foveata* (plocha hniloby v %) po čtyřech týdnech od ošetření složkami EO pomocí fumigace.

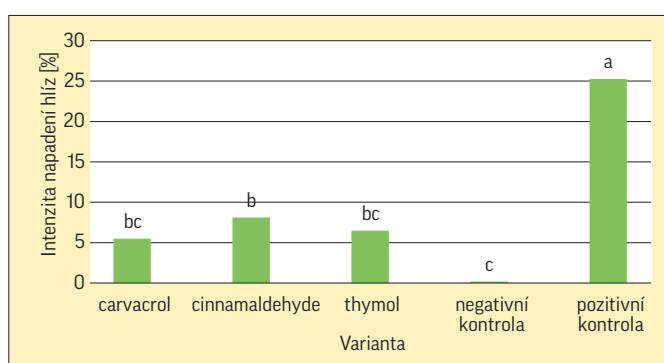


Statistické hodnocení experimentů bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu (jednofaktorová ANOVA). Všechny údaje jsou průměry tří opakování, z nichž každé je reprezentováno sedmi hlízami; různá písmena ve sloupcích označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) podle Tukey HSD testu.



Obr. 28: Vyhodnocení napadení *P. foveata* hlíz po ošetření hlíz složkami EO formou moření

Obr. 29: Průměrná intenzita napadení hlíz *P. foveata* (plocha hnilyby v %) po čtyřech týdnech od ošetření složkami EO pomocí moření.

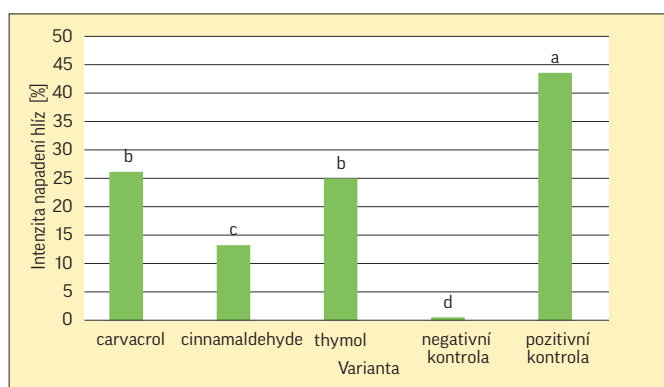


Statistické hodnocení experimentů bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu (jednofaktorová ANOVA). Všechny údaje jsou průměry tří opakování, z nichž každé je reprezentováno sedmi hlízy; různá písmena ve sloupcích označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) podle Tukey HSD testu.

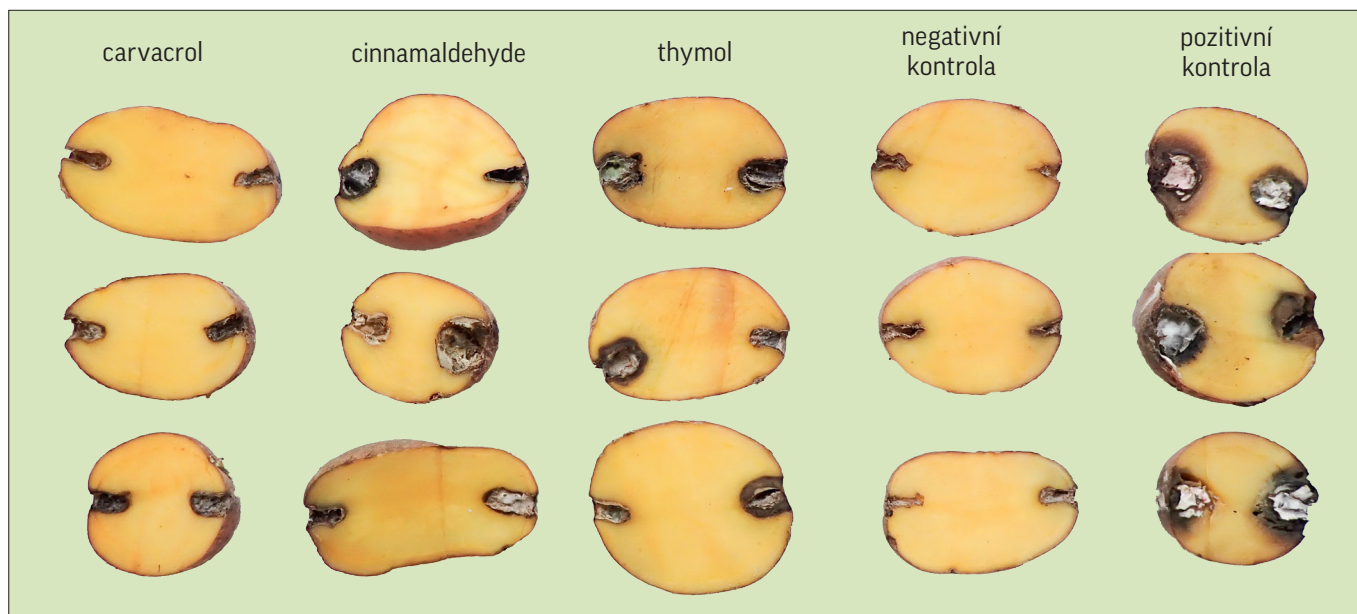
Stanovení vlivu složek EO na *F. solani* var. *coeruleum* v *in vivo* podmínkách

Hlízy ošetřené sterilizovanou vodou (negativní kontrola) nevykazovaly symptomy hnilyby. Docházelo pouze k viditelné diskoloraci pletiva v okolí vpichu vlivem oxidace a suberizace. Naproti tomu hlízy inokulované *F. solani* var. *coeruleum* (pozitivní kontrola) vykazovaly silné příznaky hnilyby. Hlízy ošetřené složkami EO a inokulované *F. solani* var. *coeruleum* vykazovaly slabé příznaky hnilyby (obr. 31). Při aplikaci složek EO došlo ke zpomalení hnilyby hlíz a k výraznému zmírnění symptomů. Po ošetření hlíz fumigací bylo zjištěno vysoce průkazné snížení intenzity napadení *F. solani* var. *coeruleum* oproti neošetřené kontrole u všech testovaných složek EO (obr. 30). Nejvyšší vliv na relativní snížení intenzity napadení měl cinnamaldehyde (69,63 %). Thymol snížil intenzitu napadení o 57,31% a carvacrol o 40,03%. Mezi testovanými složkami EO nebyl v účinnosti na patogen kromě cinnamaldehyde zaznamenán významný rozdíl. Po ošetření hlíz mořením bylo zjištěno statisticky vysoce průkazné snížení intenzity napadení *F. solani* var. *coeruleum* rovněž u všech testovaných EO (obr. 32). Vyhodnocení napadení *F. solani* var. *coeruleum* hlíz po ošetření hlíz složkami EO formou moření je dokumentováno na obr. 31. Relativní snížení napadení hlíz *F. solani* var. *coeruleum* (Tab. 8) se pohybovalo od 56,07% (cinnamaldehyde) do 81,44% (carvacrol). Mezi testovanými složkami EO nebyl v účinnosti na patogen zaznamenán významný rozdíl. Vyšší vliv na snížení napadení hlíz *F. solani* var. *coeruleum* mělo moření oproti fumigaci.

Obr. 30: Průměrná intenzita napadení hlíz *F. solani* var. *coeruleum* (plocha hnilyby v %) po čtyřech týdnech od ošetření složkami EO pomocí fumigace.

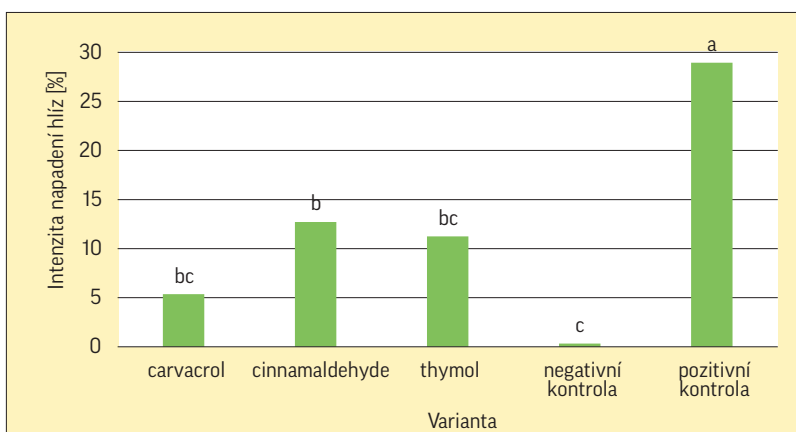


Statistické hodnocení experimentů bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu (jednofaktorová ANOVA). Všechny údaje jsou průměry tří opakování, z nichž každé je reprezentováno sedmi hlízy; různá písmena ve sloupcích označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) podle Tukey HSD testu.



Obr. 31: Vyhodnocení napadení *F. solani* var. *coeruleum* hlíz po ošetření hlíz složkami EO formou moření

Obr. 32: Průměrná intenzita napadení hlíz *F. solani* var. *coeruleum* (plocha hniloby v %) po čtyřech týdnech od ošetření složkami EO pomocí moření.



Statistické hodnocení experimentů bylo provedeno pomocí analýzy rozptylu (jednofaktorová ANOVA). Všechny údaje jsou průměry tří opakování, z nichž každé je reprezentováno sedmi hlízami; různá písmena ve sloupcích označují statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) podle Tukey HSD testu.

Tab. 8: Relativní snížení intenzity napadení hlíz houbami po fumigaci a moření (%)

Druh houby	Druh složky EO	Fumigace	Moření
<i>Helminthosporium solani</i>	Carvacrol	40,72	99,57
	Cinnamaldehyde	93,40	99,62
	Thymol	99,83	99,78
<i>Phoma foveata</i>	Carvacrol	36,55	78,28
	Cinnamaldehyde	44,64	67,88
	Thymol	38,15	74,29
<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	Carvacrol	40,03	81,44
	Cinnamaldehyde	69,63	56,07
	Thymol	57,31	61,16

2.3.2 STANOVENÍ VLIVU EO A SLOŽEK EO NA PEKTINOLYTICKÉ BAKTERIE NAPADAJÍCÍ HLÍZY BRAMBORU

2.3.2.1 Stanovení vlivu EO a složek EO na pektinolytické bakterie napadající hlízy bramboru v *in vitro* podmínkách

Stanovení vlivu EO a složek EO na *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* v *in vitro* podmínkách

Při koncentracích 100, 75 a 50 $\mu\text{l/ml}$ (Tab. 9) byl nejúčinnější EO ze skořicovníku ceylonského. Průměrné hodnoty IZ byly podobné jako u pozitivní kontroly (EO ze skořicovníku čínského). Inhibiční zóny při koncentraci 100 $\mu\text{l/ml}$ EO z dobromysle, máty a šabreje byly srovnatelné s koncentracemi 75 a 50 $\mu\text{l/ml}$ pozitivní kontroly. Nejmenší průměrné IZ při nejvyšší koncentraci byly naměřeny u EO z fenyklu, kmínu, rozmarýnu a tymiánu, tyto hodnoty byly srovnatelné s hodnotami pozitivní

kontroly při koncentraci 25 µl/ml. Testován byl také účinek ethanolu, který byl použit pro počáteční ředění EO. Při koncentraci odpovídající 100 µl/ml vzorku byla naměřena průměrná hodnota IZ 7,2 mm a při dalších koncentracích byla rovna 6 mm.

Dle (Ponce *et al.*, 2003) byl kmen CPPB 56 *Pcc* extrémně citlivý na EO ze skořicovníku ceylonského (IZ 20,46 mm) při koncentraci 100 µl/ml a velmi citlivý při koncentracích 75 a 50 µl/ml. Bakterie byla rovněž velmi citlivá na EO z dobromysle (IZ 15,0 mm) při koncentraci 100 µl/ml. U ostatních EO v koncentracích 100 a 75 µl/ml, stejně jako u EO ze skořicovníku ceylonského a tymiánu v koncentraci 25 µl/ml, byla zjištěna pouze citlivá reakce *Pcc*.

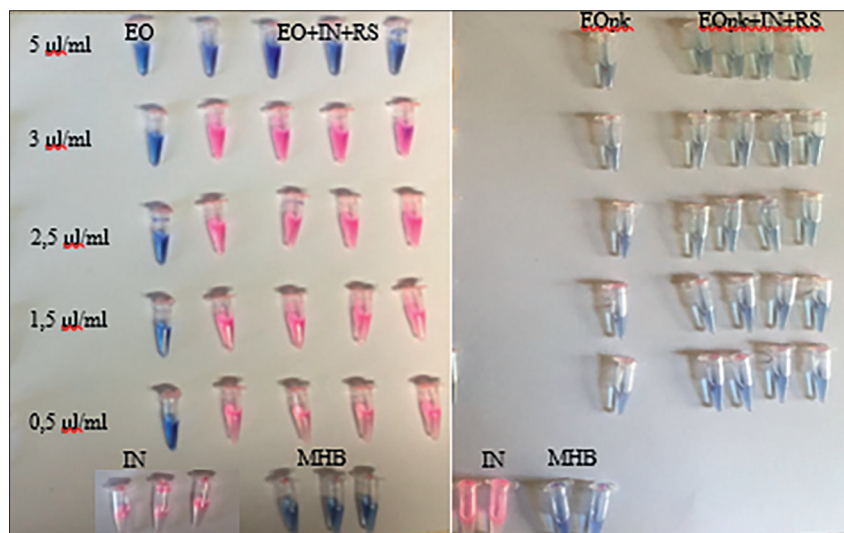
Při stanovení MIC bylo zjištěno, že EO ze skořicovníku ceylonského (< 0,5 µl/ml) vykazuje nejlepší antibakteriální aktivitu (Tab. 9). Hodnota MIC byla shodná s pozitivní kontrolou. Překvapivý obrat však nastal při stanovení MBC, kdy EO ze skořicovníku ceylonského měl vyšší hodnotu MIC (5 µl/ml) než EO z hřebíčkovce (2,5 µl/ml) a máty (3 µl/ml). Esenciální oleje z dobromysle a šabreje měly shodnou hodnotu MIC a MBC (5 µl/ml). Nejvyšší hodnota MBC byla zjištěna u EO z rozmarýnu (obr. 33).

Tab. 9: Disková difuzní metoda, minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace EO pro *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

EO	Průměr inhibiční zóny (mm) ^{1,2)}				MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)
	Koncentrace (µl/ml)					
	100	75	50	25		
dobromysl	15,00 ^{cde}	12,67 ^{defg}	11,67 ^{fghijk}	8,50 ^{klmop}	5	5
fenykl	10,71 ^{fghijkl}	10,33 ^{fghijklm}	7,38 ^{nop}	7,33 ^{nop}	3	10
hřebíčkovec	12,83 ^{defg}	12,08 ^{efghij}	9,08 ^{klmno}	7,88 ^{mnpop}	1,5	2,5
kmín	11,25 ^{fghijkl}	9,96 ^{ghijklmno}	7,50 ^{nop}	7,13 ^{op}	5	10
máta	14,79 ^{cde}	12,42 ^{efgh}	11,21 ^{fghijkl}	6,00 ^p	2,5	3
rozmarýn	11,96 ^{efghij}	10,25 ^{ghijklmn}	8,65 ^{klmnop}	6,00 ^p	5	50
skořicovník 2	20,46 ^{ab}	17,54 ^{bc}	15,58 ^{cd}	9,54 ^{hijklmno}	< 0,5	5
šabrej	13,38 ^{def}	11,46 ^{fghijkl}	7,67 ^{mnpop}	6,96 ^{op}	5	5
tea tree	12,71 ^{defg}	11,29 ^{fghijkl}	8,54 ^{lmnop}	7,63 ^{nop}	3	5
tymián	12,33 ^{efghi}	11,25 ^{fghijkl}	10,21 ^{ghijklmn}	9,50 ^{hijklmno}	3	10
skořicovník ³⁾	20,96 ^a	17,00 ^c	16,50 ^c	9,29 ^{ijklmno}	< 0,5	2,5

MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace. Různé horní indexy (a–p) u průměrů inhibičních zón označují významné rozdíly ($p < 0,05$) podle Tukey HSD testu. ²⁾ Průměrné inhibiční zóny jsou uvedeny v mm, součástí je i rozměr disku 6 mm. ³⁾ Esenciální olej ze skořicovníku čínského sloužil jako pozitivní kontrola.

Při srovnání inhibičních zón při testování složek EO bylo zjištěno, že žádná složka EO nedosahovala účinnosti jako pozitivní kontrola cinnamaldehyd (Tab. 10). Největší IZ při koncentraci 100 µl/ml byly naměřeny u thymolu přírodního (obr. 34) a syntetického a dále pak carvacrolu, což je srovnatelné s IZ cinnamaldehydu při koncentraci 50 µl/ml.



Obr. 33: Stanovení minimální inhibiční koncentrace EO z rozmarýnu pro *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

EO – kontrola čistoty EO v dané koncentraci bez inokula s barvivem resazurin; IN – kontrola růstu bakterie s barvivem resazurin; MHB – kontrola čistoty Mueller Hinton Broth s barvivem resazurin, EO+IN+RS – vzorek EO a inokula s barvivem resazurin sodná sůl; EOpk – kontrola čistoty pozitivní kontroly EO ze skořicovníku čínského v dané koncentraci bez inokula s barvivem resazurin; EOpk+IN+RS – vzorek pozitivní kontroly EO ze skořicovníku čínského a inokula s barvivem resazurin sodná sůl. Fialová a růžová barva testovaného vzorku indikovala přítomnost živých bakterií, modrá barva indikovala přítomnost mrtvých bakterií. Poslední koncentrace s modrou barvou označovala MIC.

Inhibiční zóny ostatních složek EO při nejvyšší koncentraci odpovídaly IZ cinnamaldehydu při koncentraci 25 µl/ml. Byl testován také vliv ethanolu použitého pro naředění základního roztoku složek EO. Při koncentraci odpovídající vzorku 100 µl/ml byla naměřena průměrná IZ 7,2 mm a při dalších koncentracích byla tato hodnota rovna 6 mm.

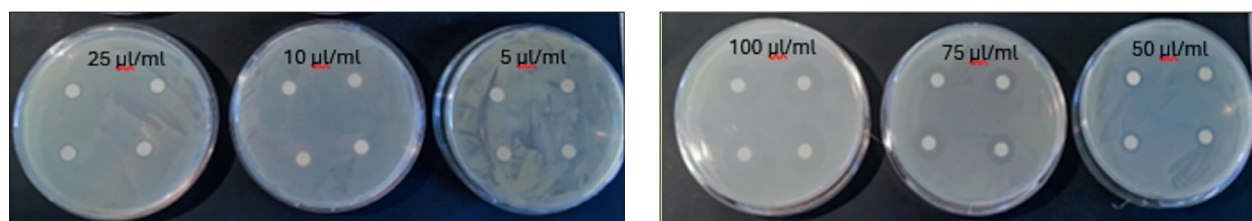
Při hodnocení účinnosti složek EO podle (Ponce *et al.*, 2003) byla bakterie *Pcc* extrémně citlivá na složky tymol přírodní a syntetický při koncentraci 100 µl/ml, nicméně na pozitivní kontrolu cinnamaldehydu až do koncentrace 50 µl/ml. Na ostatní složky EO, s výjimkou R-(+)-limonenu, byla bakterie citlivá do koncentrace 75 µl/ml.

V testech MIC a MBC opět žádná složka EO nedosáhla hodnot pozitivní kontroly. Nejnižší koncentrace MIC a MBC byla zjištěna u D-carvone, nejvyšší u R-(+)-limonenu (Tab. 10).

Tab. 10: Disková difuzní metoda, minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace složek EO pro *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

EO	Průměr inhibiční zóny (mm) ^{1,2)}				MIC (μl/ml)	MBC (μl/ml)
	Koncentrace (μl/ml)					
	100	75	50	25		
carvacrol	19,00 ^c	14,25 ^{de}	11,63 ^{efgh}	8,42 ^{ijklm}	5	10
D-carvone	13,00 ^{def}	12,21 ^{efg}	9,04 ^{hijkl}	8,00 ^{ijklm}	1,5	2,5
L-menthone	12,42 ^{defg}	11,71 ^{efg}	8,6 ^{ijklm}	6,00 ^m	2,5	10
R-(+)limonene	10,42 ^{fghij}	8,08 ^{ijklm}	6,67 ^{lm}	6,00 ^m	10	25
přírodní thymol	20,58 ^c	14,92 ^d	10,29 ^{ghijk}	7,75 ^{klm}	3	5
syntetický thymol	20,88 ^c	12,29 ^{defg}	10,79 ^{fghi}	6,21 ^m	2,5	3
cinnamaldehyde ³⁾	30,50 ^a	27,08 ^b	21,29 ^c	12,83 ^{defg}	< 0,5	1,5

MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace. ¹⁾Různé horní indexy (a–m) u průměrů inhibičních zón označují významné rozdíly ($p \leq 0,05$) podle Tukey HSD testu. ²⁾ Průměrné inhibiční zóny jsou uvedeny v mm, součástí je i rozměr disku 6 mm. ³⁾Cinnamaldehyde sloužil jako pozitivní kontrola.



Obr. 34: Inhibiční zóny vzniklé po aplikaci přírodního thymolu na plotny s *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Stanovení vlivu EO a složek EO na bakterii *Dickeya solani* v *in vitro* podmínkách

Esenciální olej ze skořicovníku ceylonského vykazoval největší inhibiční zóny (25,1 mm) v koncentraci 100 μl/ml, které byly srovnatelné s kontrolou EO ze skořicovníku čínského (skořicovník 2) v koncentraci 100 a 75 μl/ml (Tab. 11). Druhé největší IZ byly naměřeny u EO z tymiánu a dobromysle v koncentraci 100 μl/ml, což bylo srovnatelné s IZ EO ze skořicovníku 2 v koncentraci 75 μl/ml. Nejmenší IZ byla zjištěna u EO ze šabreje v koncentraci 25 μl/ml. Tato IZ byla obdobná s IZ u EO ze šabreje, kmínu a fenyklu v koncentraci 100 μl/ml. Testován byl také účinek ethanolu, který byl použit pro počáteční ředění EO. Při koncentraci odpovídající 100 μl/ml vzorku byla naměřena průměrná hodnota IZ 7 mm a při dalších koncentracích byla rovna 6 mm.

Vybraný kmen bakterie *Ds* byl extrémně citlivý na působení EO ze skořicovníku 2 a velmi citlivý na EO z dobromysle a tymiánu, naopak necitlivý k účinkům EO z fenyklu, kmínu a šabreje.

Z hlediska testování MIC a MBC bylo dosaženo nejnižších koncentrací u EO ze skořicovníku 2, naopak nejvyšší u EO z rozmarýnu (Tab. 11).

Tab. 11: Disková difuzní metoda, minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace EO pro *Dickeya solani*

EO	Průměr inhibiční zóny (mm) ^{1,2)}				MIC (μl/ml)	MBC (μl/ml)
	Koncentrace (μl/ml)					
	100	75	50	25		
dobromysl	16,5 ^{cd}	12,5 ^{ef}	10,7 ^{fgh}	7,6 ^{ijklm}	2,5	10
fenykl	7 ^{klm}	7 ^{klm}	7 ^{klm}	6,8 ^{klm}	10	25
hřebíčkovec	11,5 ^{fg}	11,1 ^{fgh}	9,4 ^{ghijk}	8,7 ^{hijklm}	2,5	5
kmín	7 ^{klm}	7 ^{klm}	7 ^{klm}	6,3 ^{lm}	3	10
máta	10,6 ^{fgh}	9,4 ^{ghijk}	8,9 ^{hijkl}	7,5 ^{ijklm}	3	25
rozmarýn	10 ^{fghi}	8,8 ^{hijklm}	7,5 ^{ijklm}	6,5 ^{lm}	10	75
skořicovník 2	25,1 ^{ab}	16,6 ^{cd}	14,8 ^{de}	9,5 ^{ghij}	< 0,5	1,5
šabrej	7 ^{klm}	6,3 ^{lm}	6,3 ^{lm}	6,25 ^m	1,5	10
tea tree	10,8 ^{fgh}	9,5 ^{ghij}	7,3 ^{klm}	7,3 ^{klm}	5	25
tymián	18,9 ^c	12,4 ^{ef}	10,5 ^{fgh}	9,5 ^{ghijk}	5	10
skořicovník ³⁾	27,5 ^a	24,2 ^b	11,8 ^{fg}	10,7 ^{fgh}	< 0,5	1,5

MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace. ¹⁾Různé horní indexy (a–m) u průměrů inhibičních zón označují významné rozdíly ($p \leq 0,05$) podle Tukey HSD testu. ²⁾ Průměrné inhibiční zóny jsou uvedeny v mm, součástí je i rozměr disku 6 mm. ³⁾ Esenciální olej ze skořicovníku čínského sloužil jako pozitivní kontrola.

Největší inhibiční zóny byly naměřeny při testování carvacrolu při koncentraci 100 μl/ml, nicméně při porovnání s kontrolou cinnamaldehydem v koncentraci 100, 75 i 50 μl/ml byly tyto IZ významně rozdílné (menší) (Tab. 12). Carvacrol v koncentraci 75 μl/ml měl IZ podobné jako thymol přírodní v koncentraci 100 μl/ml. Nejnižší hodnota IZ (6 mm) byla naměřena u thymolu přírodního, L-menthone při koncentraci 25 μl/ml a R-(+)limonene v koncentraci 50 a 25 μl/ml, přičemž tyto hodnoty byly srovnatelné i s R-(+)limonene a L-menthone v koncentraci 100 μl/ml.

Extrémně citlivý byl kmen 200 Ds ke carvacrolu, velmi citlivý na účinky thymolu přírodního a naopak necitlivý pro D-carvone, a to v nejvyšších testovaných koncentracích.

Při testování MIC a MBC byla pozorována nejnižší koncentrace u thymolu přírodního i syntetického, nicméně jejich MIC a MBC byly výrazně vyšší než u kontroly cinnamaldehydu. Nejvyšší koncentrace byla naměřena u L-menthonu a R-(+)-limonenu (Tab. 12).

Tab. 12: Disková difuzní metoda, minimální inhibiční koncentrace a minimální baktericidní koncentrace složek EO pro *Dickeya solani*

EO	Průměr inhibiční zóny (mm) ^{1,2)}				MIC (μl/ml)	MBC (μl/ml)
	Koncentrace (μl/ml)					
	100	75	50	25		
carvacrol	22,8 ^d	16,7 ^e	9,9 ^{hi}	7,8 ^{ijklm}	2,5	10
D-carvone	7,0 ^{klm}	7,0 ^{klm}	7,0 ^{klm}	6,6 ^{lm}	5	10
L-menthone	9,8 ^{hij}	9,4 ^{hijk}	7,9 ^{ijklm}	6,0 ^m	10	25
R-(+)-limonene	8,0 ^{ijklm}	7,4 ^{klm}	6,0 ^m	6,0 ^m	10	25
přírodní thymol	18,9 ^e	12,4 ^{fg}	10,5 ^{gh}	6,0 ^m	2,5	5
syntetický thymol	14,2 ^f	12,6 ^{fg}	10,7 ^{gh}	8,7 ^{hijkl}	2,5	5
cinnamaldehyde ³⁾	35,9 ^a	31,3 ^b	25,8 ^c	13,4 ^f	< 0,5	< 0,5

MIC – minimální inhibiční koncentrace; MBC – minimální baktericidní koncentrace. ¹⁾Různé horní indexy (a–m) u průměrů inhibičních zón označují významné rozdíly ($p \leq 0,05$) podle Tukey HSD testu. ²⁾ Průměrné inhibiční zóny jsou uvedeny v mm, součástí je i velikost disku 6 mm. ³⁾Cinnamaldehyde sloužil jako pozitivní kontrola.

2.3.2.2 Stanovení vlivu EO a složek EO na pektinolytické bakterie napadající hlízy bramboru v *in vivo* podmínkách

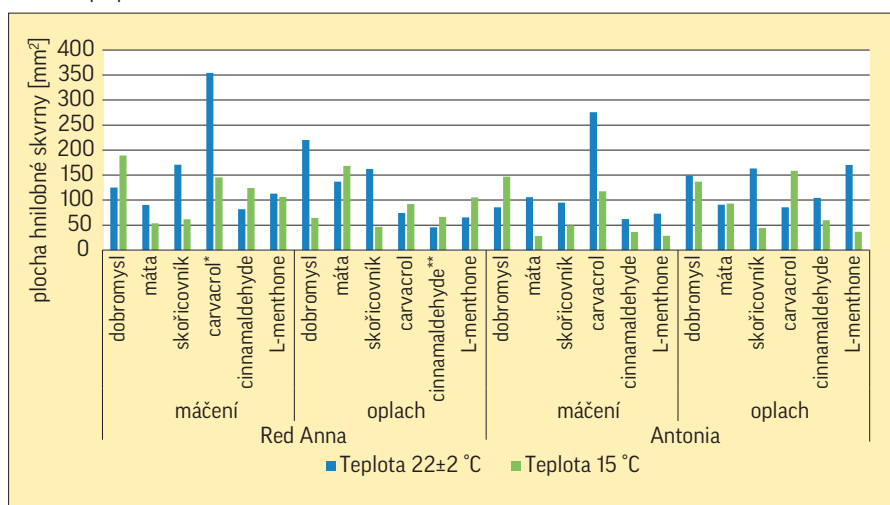
V *in vivo* podmínkách byly testovány tři EO – z dobromysle obecné, máty peprné a skořicovníku čínského a tři složky EO – carvacrol, cinnamaldehyde a L-menthone v ošetření mořením (máčení, oplach) a fumigací. U bakterie *Pcc* bylo hodnoceno preventivní i kurativní ošetření, u *Ds* pouze preventivní. Inokulované hlízy odrůd Red Anna a Antonia byly skladovány za teploty $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a 15°C .

Stanovení vlivu EO a složek EO na *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* v *in vivo* podmínkách Preventivní ošetření

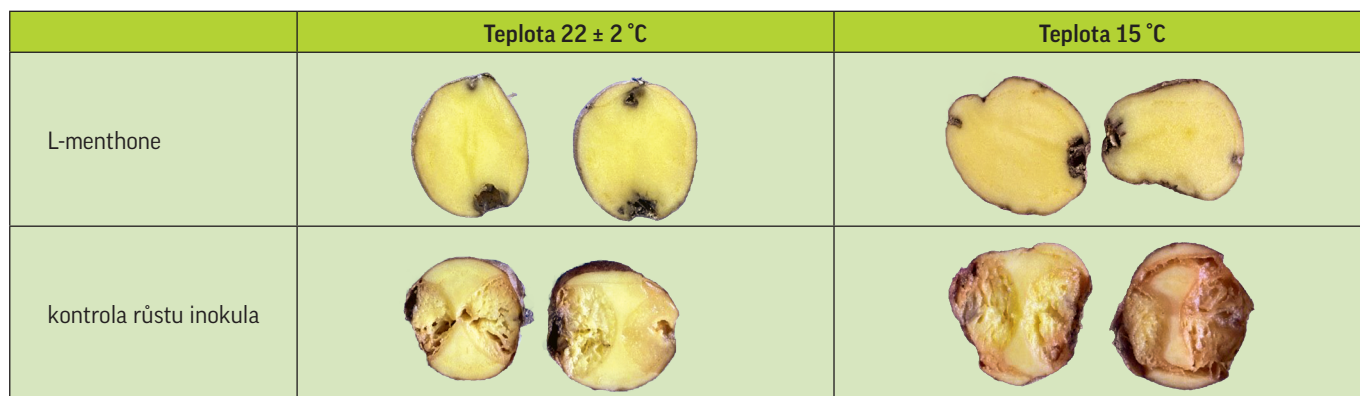
U preventivního způsobu ochrany byly zvoleny metody aplikace EO/složky EO máčením a oplachem. Data byla vyhodnocena zvláště vždy pro danou teplotu skladování. Při porovnání průměrů ploch hnilobné skvrny při hladině významnosti $p \leq 0,05$ bylo zjištěno, že po skladování za teploty $22 \pm 2^\circ\text{C}$ byly významné rozdíly pouze mezi hodnotou plochy hnilobné skvrny po oplachu v cinnamaldehydu s hodnotou carvacrolu aplikovaného máčením u odrůdy Red Anna (obr. 35). Mezi odrůdami ani mezi aplikacemi oplachem a máčením nebyly zjištěny žádné další významné rozdíly. Průměrná plocha hnilobné skvrny u pozitivní kontroly (inokula) dosahovala $1216,7\text{ mm}^2$ u odrůdy Red Anna a $1161,3\text{ mm}^2$ u odrůdy Antonia.

Při hodnocení dat získaných po skladování hlíz při 15°C nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi EO/složkami EO, odrůdami ani způsoby ošetření. Průměrná plocha hnilobné skvrny u pozitivní kontroly (inokula) dosahovala $657,9\text{ mm}^2$ u odrůdy Red Anna (obr. 36) a $854,6\text{ mm}^2$ u odrůdy Antonia.

Obr. 35: Plocha hnilobné skvrny způsobená *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* po preventivním ošetření hlíz bramboru EO či složkou EO



*, ** Vícefaktorovou analýzou variance a následně Tukey HSD testem byl zjištěn při hladině významnosti ($p \leq 0,05$) významný rozdíl mezi plochami hnilobné skvrny po oplachu hlíz cinnamaldehydem a máčením hlíz v carvacrolu u odrůdy Red Anna po skladování při teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Další významné rozdíly nebyly prokázány. Data byla hodnocena zvláště vždy za danou teplotu skladování.



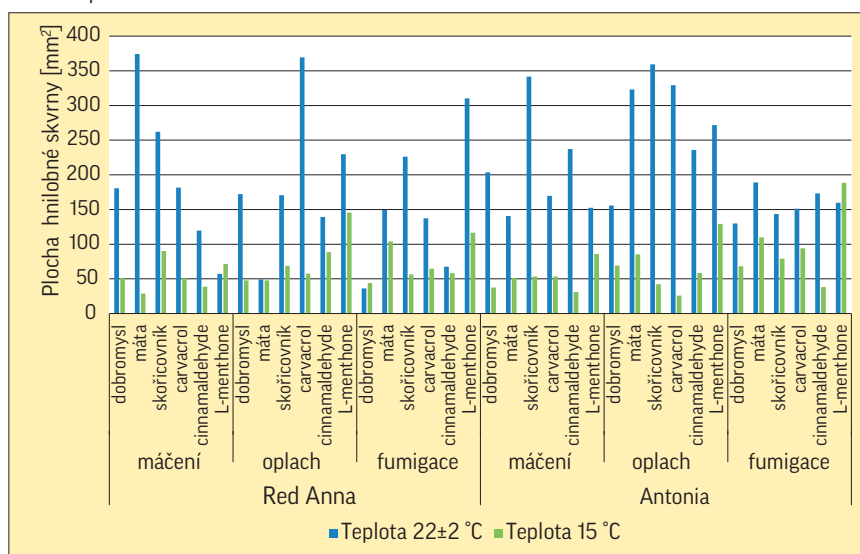
Obr. 36: Porovnání plochy hnilobné lézna hlízách bramboru odrůdy Red Anna po preventivním ošetření máčením v L-menthonu s kontrolou růstu inokula

Kurativní ošetření

U kurativního ošetření byly testovány tři způsoby aplikace EO/složky EO – oplachem, máčením a fumigací. Data byla vyhodnocena zvláště vždy pro danou teplotu skladování. Mezi průměry ploch hnilobných lézí po skladování hlíz za teploty 22 ± 2 °C i 15 °C nebyly nalezeny žádné významné rozdíly při $p \leq 0,05$, Tukey HSD testu (faktory: EO/složka EO, odrůda, ošetření) (obr. 37).

Vícefaktorovou analýzou variance a následně Tukey HSD testem nebyl zjištěn při hladině významnosti ($p \leq 0,05$) významný rozdíl mezi průměry ploch hnilobných skvrn po skladování při teplotě 22 ± 2 °C a 15 °C. Data byla hodnocena zvláště vždy za danou teplotu skladování.

Obr. 37: Plocha hnilobné skvrny způsobená *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* po kurativním ošetření hlíz bramboru EO či složkou EO



Účinnost preventivního a kurativního ošetření

Účinnost preventivního ošetření EO/složkami EO se pohybovala v rozmezí 71–97% při skladování za teploty 22 ± 2 °C i za teploty 15 °C (Tab. 13). Data byla vyhodnocena zvláště vždy pro danou teplotu skladování. Významné rozdíly byly zjištěny pouze mezi máčením hlíz odrůdy Red Anna v carvacrolu a oplachem v cinnamaldehydu při skladování za teploty 22 ± 2 °C.

Tab. 13: Účinnosti preventivního ošetření EO a složkami EO vzhledem ke kontrole inokula *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* mezi jednotlivými odrůdami hlíz bramboru

Ošetření	Odrůda	EO / složka EO	Teplota 22 ± 2 °C	Teplota 15 °C
			Účinnost (%)	
máčení	Red Anna	dobromysl	89,73 ^{ab}	71,28
		máta	92,59 ^{ab}	91,87
		skořicovník	85,98 ^{ab}	90,68
		carvacrol	70,87 ^a	77,90
		cinnamaldehyde	93,29 ^{ab}	81,17
		L-menthone	90,74 ^{ab}	83,89
	Antonia	dobromysl	92,61 ^{ab}	82,84
		máta	90,89 ^{ab}	96,72
		skořicovník	91,82 ^{ab}	94,21
		carvacrol	76,28 ^{ab}	86,24
		cinnamaldehyde	94,65 ^{ab}	95,75
		L-menthone	93,72 ^{ab}	96,64
oplach	Red Anna	dobromysl	81,92 ^{ab}	90,20
		máta	88,74 ^{ab}	76,34
		skořicovník	86,65 ^{ab}	92,93
		carvacrol	93,89 ^{ab}	85,97
		cinnamaldehyde	96,26 ^b	89,93
		L-menthone	94,63 ^{ab}	83,99
	Antonia	dobromysl	87,15 ^{ab}	83,99
		máta	92,19 ^{ab}	89,12
		skořicovník	85,93 ^{ab}	94,85
		carvacrol	92,65 ^{ab}	81,45
		cinnamaldehyde	91,00 ^{ab}	93,03
		L-menthone	85,33 ^{ab}	95,70

Data byla vyhodnocena vícefaktorovou analýzou variance. Různé horní indexy (a–b) u průměrné účinnosti při teplotě 22 ± 2 °C označují významné rozdíly ($p \leq 0,05$) podle Tukey HSD testu. Mezi hodnotami účinnosti při teplotě 15 °C nebyly zjištěny významné rozdíly. Data byla vyhodnocena zvláště vždy pro danou teplotu skladování.

Při kurativním způsobu aplikace nebyly nalezeny žádné významné rozdíly v účinnosti EO/složek EO (Tab. 14) při hladině významnosti $p \leq 0,05$ podle Tukey HSD testu (faktor: EO/složka EO, odrůda a ošetření). Účinnost se pohybovala v rozmezí 69,2–97,0% pro skladování při teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a 77,9–97,0% pro 15°C .

Tab. 14: Účinnosti kurativního ošetření EO a složkami EO vzhledem ke kontrole inokula *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* mezi jednotlivými odrůdami hlíz bramboru

Ošetření	Odrůda	EO / složka EO	Teplota	Teplota
			$22 \pm 2^\circ\text{C}$	15°C
			Účinnost (%)	
máčení	Red Anna	dobromysl	85,14	92,21
		máta	69,23	95,63
		skořicovník	78,47	86,32
		carvacrol	85,07	92,25
		cinnamaldehyde	90,17	94,11
		L-menthone	95,29	89,14
	Antonia	dobromysl	82,46	95,60
		máta	87,90	93,99
		skořicovník	70,59	93,76
		carvacrol	85,40	93,77
		cinnamaldehyde	79,56	96,36
		L-menthone	86,85	89,94

Ošetření	Odrůda	EO / složka EO	Teplota	Teplota
			$22 \pm 2^\circ\text{C}$	15°C
			Účinnost (%)	
oplach	Red Anna	dobromysl	85,85	92,71
		máta	95,96	92,75
		skořicovník	85,99	89,52
		carvacrol	69,65	91,25
		cinnamaldehyde	88,56	86,56
		L-menthone	81,11	77,92
	Antonia	dobromysl	86,57	91,92
		máta	72,17	90,03
		skořicovník	69,05	95,06
		carvacrol	71,63	96,99
		cinnamaldehyde	79,68	93,16
		L-menthone	76,60	84,91

Ošetření	Odrůda	Esenciální olej/složka esenciálního oleje	Teplota	Teplota
			$22 \pm 2^\circ\text{C}$	15°C
			Účinnost (%)	
fumigace	Red Anna	dobromysl	97,02	93,30
		máta	87,73	84,17
		skořicovník	81,41	91,46
		carvacrol	88,70	90,16
		cinnamaldehyde	94,46	91,17
		L-menthone	74,51	82,28
	Antonia	dobromysl	88,81	92,03
		máta	83,72	87,16
		skořicovník	87,63	90,73
		carvacrol	86,99	88,99
		cinnamaldehyde	85,10	95,56
		L-menthone	86,27	77,96

Data byla vyhodnocena vícefaktorovou analýzou variance a následně Tukey HSD testem při hladině významnosti ($p \leq 0,05$). Mezi hodnotami účinnosti nebyly zjištěny významné rozdíly. Data byla vyhodnocena zvlášť vždy pro danou teplotu skladování.

Celková účinnost esenciálních olejů a složek esenciálních olejů (Tab. 15) při preventivním ošetření a skladování za teploty $22 \pm 2^\circ\text{C}$, bez ohledu na způsob aplikace, se pohybovala v rozmezí 83,4–93,8%, přičemž mezi carvacrolem a cinnamaldehydem byl významný rozdíl. Za téže teploty skladování byla při kurativním ošetření účinnost EO/složek EO 78,9–87,6% a nebyly mezi nimi rozdíly. Při kombinaci preventivní ošetření \times skladování při 15°C byla účinnost 82,1–93,2% a mezi EO/složkami EO nebyly zjištěny rozdíly. Naopak u kurativního ošetření byly prokázány významné rozdíly (Tab. 15) mezi L-menthonem (83,7%) a ostatními EO/složkami EO (90,6–93,0%). Významný rozdíl byl také u kurativního ošetření při teplotě 15°C zjištěn mezi výparem (88,7%) a máčením (92,8%) (faktor: ošetření) podle Tukey HSD testu ($p \leq 0,05$).

Tab. 15: Celková účinnost EO a složek EO při preventivním a kurativním ošetření hlíz bramboru

EO / složka EO	Teplota	Teplota	Teplota	Teplota	
	$22 \pm 2^\circ\text{C}$	15°C	$22 \pm 2^\circ\text{C}$	15°C	
		Preventivní ošetření		Kurativní ošetření	
dobromysl	87,86 ^{ab}	82,07	87,64	92,96 ^b	
máta	91,10 ^{ab}	88,03	81,78	90,62 ^b	
skořicovník	87,59 ^{ab}	93,16	78,86	91,14 ^b	
carvacrol	83,42 ^a	82,89	81,24	92,24 ^b	
cinnamaldehyde	93,80 ^b	89,97	86,26	92,82 ^b	
L-menthone	91,10 ^{ab}	90,05	83,44	83,70 ^a	

Data byla vyhodnocena jednofaktorovou analýzou variance. Různé horní indexy (a–b) u průměrné účinnosti v preventivním ošetření při teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a (a–b) u kurativního ošetření po skladování v 15°C označují významné rozdíly ($p \leq 0,05$) podle Tukey HSD testu. Data byla vyhodnocena zvlášť vždy pro danou variantu ošetření a příslušnou teplotu skladování. Mezi dalšími hodnoceními nebyly zjištěny významné rozdíly.

Stanovení vlivu EO a složek EO na *Dickeya solani* v *in vivo* podmínkách

Preventivní ošetření

Nejmenší průměrná plocha hnilobné léze při skladování za teploty 22 ± 2 °C (obr. 38) byla zjištěna u odrůdy Antonia při ošetření máčením v EO ze skořicovníku ($38,7$ mm²). Největší průměrná plocha hnilobné léze byla naměřena u odrůdy Red Anna po máčení v L-menthonu ($700,8$ mm²). Mezi zmiňovanou nejmenší průměrnou plochou byly zjištěny významné rozdíly při hladině významnosti $p \leq 0,05$ podle Tukey HSD testu se všemi složkami EO v oplachu či máčení, kromě L-menthonu v oplachu. Průměrná plocha hnilobné skvrny u pozitivní kontroly (inokula) dosahovala $1060,3$ mm² u odrůdy Red Anna a $1180,8$ mm² u odrůdy Antonia.

Při inkubaci za teploty 15 °C (obr. 38) byla nejmenší průměrná plocha hnilobné léze prokázána u odrůdy Red Anna po oplachu EO z dobromysle ($56,5$ mm²) a naopak největší u odrůdy Antonia po máčení v carvacrolu ($329,0$ mm²). Při hladině významnosti $p \leq 0,05$ podle Tukey HSD testu byly mezi hodnotou $56,5$ mm² zjištěny významné rozdíly s plochami po ošetření složkami EO, mimo oplach cinnamaldehydem a také L-menthonem u odrůdy Red Anna. Průměrná plocha hnilobné skvrny u pozitivní kontroly (inokula) dosahovala $1475,8$ mm² u odrůdy Red Anna a $875,3$ mm² u odrůdy Antonia.

Ve většině případech byla průměrná hnilobná plocha větší při inkubaci za teploty 22 ± 2 °C než za teploty 15 °C.

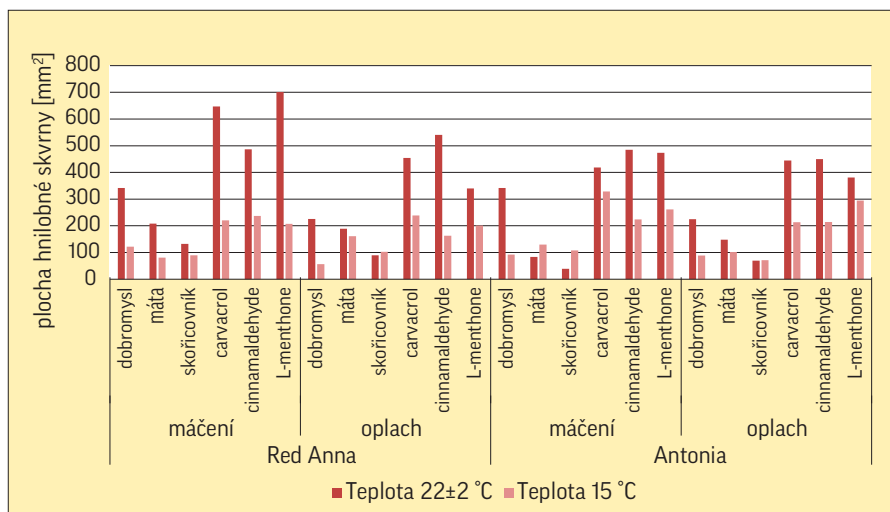
Kurativní ošetření – fumigace

Při skladování za teploty 22 ± 2 °C nebyly mezi EO/složkami EO nalezeny významné rozdíly při hladině významnosti $p \leq 0,05$ podle Tukey HSD testu. Nejmenší průměrná plocha hnilobné léze byla naměřena u EO ze skořicovníku ($146,3$ mm²) u odrůdy Red Anna a největší při ošetření L-menthonem ($494,8$ mm²) u téže odrůdy (obr. 39). Průměrná plocha hnilobné skvrny u pozitivní kontroly (inokula) dosahovala $1060,3$ mm² u odrůdy Red Anna a $1180,8$ mm² u odrůdy Antonia.

Při teplotě skladování 15 °C (obr. 39) byl zjištěn významný rozdíl podle Tukey HSD testu ($p \leq 0,05$) esenciálního oleje z máty u odrůdy Antonia ($401,5$ mm²) s EO z dobromysle ($1021,6$ mm²), skořicovníku ($1165,8$ mm²), carvacrolu (978 mm²), cinnamaldehydu ($1142,7$ mm²) a L-menthonu ($1021,7$ mm²) u odrůdy Red Anna. Průměrná plocha hnilobné skvrny u pozitivní kontroly (inokula) dosahovala $1475,8$ mm² u odrůdy Red Anna a $875,3$ mm² u odrůdy Antonia.

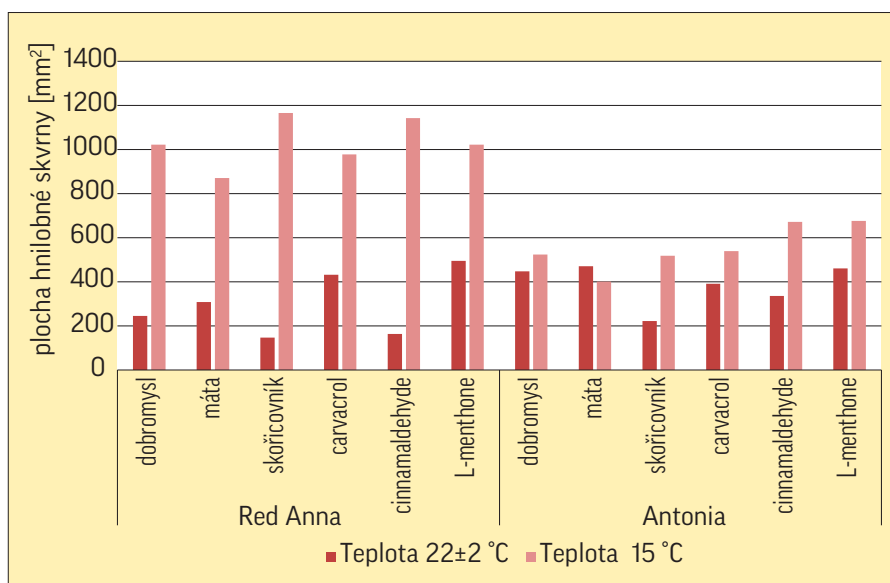
Hnilobná plocha za nižší teploty byla výrazně vyšší než při inkubaci za 22 ± 2 °C.

Obr. 38: Plocha hnilobné skvrny způsobená *Dickeya solani* po preventivním ošetření hlíz bramboru EO či složkou EO



Vícefaktorovou analýzou variance a následně Tukey HSD testem byly zjištěny při hladině významnosti ($p \leq 0,05$) významné rozdíly mezi EO/složkami EO – viz text. Data byla hodnocena zvláště vždy za danou teplotu skladování. Zdroj základních dat – Kočicová A., Jílková B.

Obr. 39: Plocha hnilobné skvrny způsobená *Dickeya solani* po fumigaci hlíz bramboru EO či složkou EO



Vícefaktorovou analýzou variance a následně Tukeyho HSD testem ($p \leq 0,05$) byly zjištěny významné rozdíly mezi EO/složkami EO pouze při teplotě skladování 15 °C – viz text. Data byla hodnocena zvláště vždy za danou teplotu skladování. Zdroj základních dat – Kočicová A., Jílková B.

Účinnost preventivního ošetření a fumigace

Účinnost testovaných EO/složek EO při inkubaci za teploty $22 \pm 2^\circ\text{C}$ se pohybovala v rozmezí 33,9–96,7% a mezi hodnotami byly zjištěny významné rozdíly (Tab. 16). Nejnižší účinnost byla po máčení v L-menthonu u odrůdy Red Anna. Tato účinnost byla srovnatelná s účinností po máčení v L-menthonu u odrůdy Antonia a také s účinností máčením a oplachem v carvacrolu a cinnamaldehydu. Nejvyšší účinnost byla dosažena při máčení v EO ze skořicovníku u odrůdy Antonia, významně se však nelišila od EO/složek EO do účinnosti 67,8 %.

Při skladování za teploty 15°C byla účinnost 62,4–96,2% (Tab. 16). Nejnižší účinnost mělo máčení v carvacrolu u odrůdy Antonia, nicméně podobná účinnost byla vyhodnocena až do hodnoty 75,6%. Naopak nejvyšší účinnost byla zjištěna u oplachu EO z dobromysle u odrůdy Red Anna, s touto hodnotou byly srovnatelné účinnosti až do hodnoty 83,8%.

Tab. 16: Účinnosti preventivního ošetření EO a složkami EO vzhledem ke kontrole inokula *Dickeya solani* mezi jednotlivými odrůdami hlíz bramboru

Ošetření	Odrůda	EO / složka EO	Teplota $22 \pm 2^\circ\text{C}$	Teplota 15°C
			Účinnost (%)	
máčení	Red Anna	dobromysl	67,77 ^{bcdefgh}	91,72 ^d
		máta	80,33 ^{defgh}	94,55 ^d
		skořicovník	87,52 ^{efgh}	93,90 ^d
		carvacrol	38,99 ^{ab}	85,08 ^{bcd}
		cinnamaldehyde	54,15 ^{abcd}	83,93 ^{bcd}
	Antonia	dobromysl	71,08 ^{cdefgh}	89,45 ^d
		máta	92,96 ^{fgh}	85,13 ^{bcd}
		skořicovník	96,73 ^h	87,68 ^{cd}
		carvacrol	64,57 ^{abcdefg}	62,41 ^a
		cinnamaldehyde	58,94 ^{abcde}	74,39 ^{ab}
L-menthone	59,90 ^{abcde}	70,14 ^a		
oplach	Red Anna	dobromysl	78,70 ^{cdefgh}	96,17 ^d
		máta	82,19 ^{defgh}	89,08 ^d
		skořicovník	91,51 ^{fgh}	93,02 ^d
		carvacrol	57,18 ^{abcde}	83,83 ^{bcd}
		cinnamaldehyde	49,00 ^{abc}	88,99 ^d
	Antonia	L-menthone	67,93 ^{bcdefgh}	86,35 ^{bcd}
		dobromysl	80,96 ^{defgh}	89,87 ^d
		máta	87,42 ^{efgh}	88,37 ^{cd}
		skořicovník	94,10 ^{gh}	91,81 ^d
		carvacrol	62,36 ^{abcdef}	75,63 ^{abc}
cinnamaldehyde	61,89 ^{abcdef}	75,55 ^{abc}		
L-menthone	67,76 ^{cdefghi}	66,30 ^a		

Data byla vyhodnocena vícefaktorovou analýzou variance. Různé horní indexy (a–h) u průměrné účinnosti při teplotě $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a (a–d) při teplotě 15°C označují významné rozdíly ($p \leq 0,05$) podle Tukey HSD testu. Data byla vyhodnocena zvlášť vždy pro danou teplotu skladování. Zdroj základních dat – Kočicová A., Jílková B.

Při fumigaci za teploty $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a 15°C nebyly prokázány žádné významné rozdíly mezi hodnotami účinnosti EO/složek EO (Tab. 17). Účinnost se pohybovala v rozsahu 53,3–86,2 % pro teplotu skladování $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a 21,0–54,1% pro teplotu 15°C .

Tab. 17: Účinnosti fumigace EO a složkami EO vzhledem ke kontrole inokula *Dickeya solani* mezi jednotlivými odrůdami hlíz bramboru

Odrůda	EO / složka EO	Teplota $22 \pm 2^\circ\text{C}$	Teplota 15°C
		Účinnost (%)	
Red Anna	dobromysl	76,92	30,77
	máta	70,90	41,01
	skořicovník	86,20	21,00
	carvacrol	59,30	33,73
	cinnamaldehyde	84,58	22,57
	L-menthone	53,33	30,77
Antonia	dobromysl	62,07	40,23
	máta	60,14	54,13
	skořicovník	81,23	40,77
	carvacrol	66,86	38,44
	cinnamaldehyde	71,60	23,21
	L-menthone	61,02	22,70

Data byla vyhodnocena vícefaktorovou analýzou variance a následně Tukey HSD testem. Při hladině významnosti $p \leq 0,05$ nebyly zjištěny žádné významné rozdíly. Data byla vyhodnocena zvlášť vždy pro danou teplotu skladování. Zdroj základních dat – Kočicová A., Jílková B.

Při celkovém zhodnocení účinnosti EO/složek EO byly při preventivním ošetření za teploty $22 \pm 2^\circ\text{C}$ neúčinnější EO ze skořicovníku a máty a za teploty 15°C EO z dobromysle, skořicovníku a máty (Tab. 18). Nejméně účinné byly všechny složky EO jak za teploty $22 \pm 2^\circ\text{C}$, tak za teploty 15°C .

Při testování fumigace (Tab. 18) za teploty skladování $22 \pm 2^\circ\text{C}$ byl neúčinnější EO ze skořicovníku a nejméně účinný L-menthone. Při teplotě 15°C nebyly mezi jednotlivými EO a složkami EO významné rozdíly.

Tab. 18: Celková účinnost EO a složek EO při preventivním ošetření hlíz bramboru a fumigaci

EO / složka EO	Preventivní ošetření		Fumigace	
	Teplota 22 ± 2 °C	Teplota 15 °C	Teplota 22 ± 2 °C	Teplota 15 °C
	Účinnost (%)		Účinnost (%)	
dobromysl	74,63 ^b	91,80 ^b	69,50 ^{ab}	35,50
máta	85,73 ^{bc}	89,28 ^b	65,52 ^{ab}	47,57
skořicovník	92,46 ^c	91,60 ^b	83,71 ^b	30,88
carvacrol	55,78 ^a	76,74 ^a	63,08 ^{ab}	36,08
cinnamaldehyde	56,00 ^a	80,72 ^a	78,09 ^{ab}	22,89
L-menthone	57,37 ^a	77,19 ^a	57,17 ^a	26,73

Data byla vyhodnocena jednofaktorovou analýzou variance. Různé horní indexy (a-c) u průměrné účinnosti preventivního ošetření při teplotě 22 ± 2 °C, (a-b) při teplotě 15 °C, (a-b) při fumigaci za teploty 22 ± 2 °C označují významné rozdíly ($p \leq 0,05$) podle Tukey HSD testu. Mezi hodnotami při fumigaci za teploty skladování 15 °C nebyly nalezeny průkazné rozdíly. Data byla vyhodnocena zvlášť vždy pro danou variantu ošetření a příslušnou teplotu skladování. Zdroj základních dat – Kočicová A., Jílková B.

2.3.3 ZKOUŠKA STOLNÍ HODNOTY HLÍZ PO OŠETŘENÍ SLOŽKAMI EO MOŘENÍM A FUMIGACÍ

Na závěr experimentů byla provedena zkouška stolní hodnoty hlíz pomocí degustace po ošetření složkami EO. Složky EO neměly výrazný vliv na kvalitu vařených hlíz (Tab. 19), nicméně při degustaci hlíz ošetřených složkami EO formou moření byla zjištěna zhoršená kvalita díky vůni a chuti po aplikovaných složkách EO. Chuť hlíz ošetřených složkami EO pomocí fumigace nebyla degradována díky vůni a pachuti. Složky EO jsou těkavé látky, a proto nezanechávají zbytky nebo jen velmi málo (Şanlı & Karadoğan, 2019).

Tab. 19: Vyhodnocení stolní hodnoty hlíz po ošetření EO mořením a fumigací

Varianta		Vůně	Chuť	Pevnost dužiny a vařivost
Fumigace	carvacrol	6	21	14
	cinnamaldehyde	7	22	13
	thymol	7	22	13
	kontrola	7	25	13
Moření	carvacrol	2 (vůně po EO)	17 (chuť po EO)	13
	cinnamaldehyde	2 (vůně po EO)	18 (chuť po EO)	13
	thymol	2 (vůně po EO)	18 (chuť po EO)	13
	kontrola	7	25	13

LEGENDA

Vůně

- 5-8.....příjemná, typická
1-4.....vyhovující (ojediněle nežádoucí pach)
0.....nevyhovující (nežádoucí pach)

Chuť

- 31-40.....výborná
21-30.....velmi dobrá
11-20.....dobrá
1-10.....méně dobrá
0.....nevyhovující

Pevnost dužiny a vařivost

- 13-16.....lojovité, tuhé, jemná struktura, nerozvářivé
9-12.....slabě moučnaté, polotuhé, polojemné, ojediněle slabě rozvářivé
5-8.....moučnaté, polohrubá struktura, slabě rozvářivé
1-4.....silně moučnaté, hrubá struktura, středně až silně rozvářivé
0.....řidké, silně vodnaté, mazlavé, silně rozvářivé

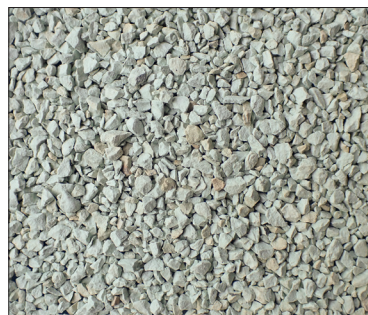
2.3.4 MOŽNOSTI ZVÝŠENÍ ÚČINNOSTI A STABILITY EO

Přestože EO vykazují vynikající antimikrobiální vlastnosti, praktická použitelnost většiny z nich je komplikovaná (Bilia *et al.*, 2014). Kromě charakteristického silného aroma a chuti, které mohou způsobit nežádoucí organoleptické změny při sensorickém hodnocení (Ghosh *et al.*, 2013; Weiss *et al.*, 2005), jsou EO vysoce nestálé (těkavé) a snadno degradují při vystavení světlu, vyšším teplotám, kyslíku a vlhkosti (Bilia *et al.*, 2014). Nízká rozpustnost ve vodě je jedním z největších omezení při použití EO (Ghosh *et al.*, 2013; Weiss *et al.*, 2005).

Zapouzdření (tzv. enkapsulace) EO a jejich složek uvnitř různých matic (jako jsou polymery) může tyto problémy překonat (Pasukamonset *et al.*, 2016; Giunti *et al.*, 2021). Zapouzdření EO usnadňuje řízené uvolňování EO a zlepšuje bioaktivitu a stabilitu EO. Pro vývoj stabilních emulzí se jeví jako vysoce slibné nano- a mikroformulace založené na enkapsulaci EO na matici (Campolo *et al.*, 2018; Giunti *et al.*, 2021). Zapouzdření je definováno jako proces, při kterém dochází k retenci EO uvnitř kapsle (Nedovic *et al.*, 2011). Zapouzdřený materiál (EO) se nazývá materiál jádra, vnitřní fáze nebo aktivní činidlo, zatímco látky enkapsulující jsou známy jako materiál stěny, nosič, vnější fáze nebo matrice (Pandit *et al.*, 2016; Zuidam & Shimoni, 2010). Kapsle

Ize rozdělit do tří skupin podle velikosti: makrokapsle, které jsou větší než 5000 µm, mikrokapsle o velikosti 0,2–5000 µm a nanokapsle, které jsou menší než 0,2 µm (Rebello, 2009). Technika zapouzdření minimalizuje interakce EO, který tvoří jádro, s prostředím, snižuje rychlost odpařování nebo přenosu EO do prostředí, zvyšuje snadnost manipulace se zapouzdřenou látkou (Gandra *et al.*, 2018), usnadňuje aplikaci EO jejich přeměnou kapaliny na pevnou fázi (Mishra, 2015), umožňuje řízené a cílené uvolňování účinných látek, zvyšuje antifungální, antioxidační účinnost a tepelnou stabilitu EO (Tiwari *et al.*, 2020) a snižuje pachy a nežádoucí chutě EO (Gandra *et al.*, 2018). Uvádí se, že techniky zapouzdření zvyšují antimikrobiální účinnost EO. Například zapouzdřený levandulový EO ve svém projevu trojnásobně zlepšil antimikrobiální potenciál (Yuan *et al.*, 2019). Zapouzdření lze dosáhnout pomocí mnoha technik (Kavousi *et al.*, 2018). Pro enkapsulaci lze použít několik metod: atomizaci, emulzi, extruzi, fluidní lože, koacervaci, bubnové sušení, molekulární inkluzi a lyofilizaci (Pinto *et al.*, 2018). Pro tvorbu kapslí je nutná přítomnost materiálu stěny (biopolymeru) (Gandra *et al.*, 2018). Doposud byla vyvinuta široká škála polymerních nosičů pro zapouzdření EO, které nabízejí řadu výhod, zejména řízené uvolňování EO a jejich složek během skladování nebo aplikace (Chiriac *et al.*, 2021). Biopolymery mohou být získané z různých zdrojů. Nejpoužívanější jsou ty na bázi polysacharidů (alginát sodný, agar, dextransy, chitosan, karagenan, škrob a celulóza), lipidů (fosfolipidy, triglyceridy a cholesterol) a proteinů (albumin, lektin, kasein, lutein, zein, želatina, kolagen, lepek a izolát sójového proteinu) (Gandra *et al.*, 2018; Puscaselu *et al.*, 2022; Khandelwal *et al.*, 2016; Patti & Acierno, 2022). Další možností je zapouzdření EO do mikroporézních struktur zeolitů (obr. 40), protože tyto materiály jsou levné a netoxické pro prostředí (Ferreira *et al.*, 2022). Pro snížení těkavosti EO lze rovněž využít formulace s oxidem hlinitým nebo začlenění/adsorpce do anorganických matic, včetně jílových minerálů (obr. 41, 42 a 43), jako je montmorillonit (hlavní složka bentonitových jílů) nebo kaolinit (Čížková *et al.*, 2000; De Oliveira *et al.*, 2022; Owolabi *et al.*, 2010).

EO a jejich složky jsou těkavé látky, a proto se aplikace doporučuje opakovat pravidelně nebo nepřetržitě (Şanlı & Karadoğan, 2019). Ve skladu brambor lze aplikovat EO elektrickými ULV zmlžovači (obr. 44) nebo odpařovacími aplikátory (Vacek & Plíštil, 2020).



Obr. 40: Zeolit (frakce 1–2,5 mm)



Obr. 41: Keramzit (frakce 4–8 mm)



Obr. 44: Elektrický ULV zmlžovač



Obr. 42: Bentonit (mletý)



Obr. 43: Bentonit (granulát)

2.3.5 ZÁVĚR

Pomocí *in vitro* a *in vivo* experimentů byl testován vliv složek esenciálních olejů na houby *H. solani*, *F. solani* var. *coeruleum* a *P. foveata* a esenciálních olejů a složek esenciálních olejů na bakterie *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. atrosepticum* a *D. solani*. Tyto patogeny patří mezi důležité původce především skládkových chorob hlíz bramboru.

Všechny hodnocené složky EO a EO měly v podmínkách *in vitro* průkazný vliv na inhibici růstu sledovaných hub a bakterií. Antimikrobiální aktivita jednotlivých složek EO a EO se však významně lišila. Nejvyšší vliv na inhibici růstu hub a bakterií prokázal thymol, carvacrol, cinnamaldehyde a skořicovníkový olej.

Účinnost složek vybraných složek EO a EO byla ověřena v experimentech *in vivo* jejich aplikací na hlízy formou moření a fumigace ve skladovacích podmínkách. Při moření hlíz byly složky EO navázány na biopolymer pro zvýšení jejich účinnosti a stability. Po ošetření hlíz testovanými složkami EO a EO mořením a fumigací bylo zjištěno statisticky vysoce průkazné snížení rozsahu infekce (intenzity napadení) houbami a bakteriemi. Složky EO aplikované mořením a fumigací měly významný vliv na snížení intenzity sporulace *H. solani* na hlízách, což je velmi důležité zjištění pro zamezení dalšího šíření patogenu během skladovacího

procesu. Patogen *H. solani* totiž může sporulovat a infikovat zdravé hlízy ve skladech brambor. Konidie z infikovaných hlíz mohou být rozptýlovány ventilačním systémem na zdravé hlízy a způsobit infekci. Vyšší vliv na intenzitu napadení a intenzitu sporulace *H. solani* mělo moření hlíz.

Vybrané složky EO neměly výrazný vliv na stolní hodnotu hlíz, nicméně při organoleptickém hodnocení hlíz ošetřených složkami EO formou moření byla zjištěna zhoršená kvalita díky vůni a chuti po aplikovaných složkách EO. Při aplikaci složek EO formou fumigace nebyla zaznamenána zhoršená kvalita hlíz díky vůni a chuti.

Na základě získaných výsledků lze doporučit proti houbám *H. solani*, *F. solani* var. *coeruleum* a *P. foveata* a bakteriím *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. atrosepticum* a *D. solani* preventivní ošetření mořením. Složky EO a EO mohou být ekologickou alternativou syntetických látek ke snižování napadení hlíz brambor houbovými a bakteriálními patogeny během skladování. Pro jejich účinnost v provozních podmínkách je velmi důležitá jejich vhodná forma aplikace, dávka a koncentrace.

3 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

V metodice je uvedena účinnost EO a jejich složek na důležité houbové a bakteriální patogeny hlíz brambor jako ekologická možnost jejich omezování během skladování. Informace o účinnosti EO na patogeny hlíz brambor jsou důležité pro vývoj nových biopesticidů. Konvenční syntetické látky mohou vést k vývoji rezistence a mohou způsobit potenciální ekotoxikologická rizika a být nebezpečné pro širokou škálu necílových organismů (Chang *et al.*, 2008). Problematická je ochrana hlíz brambor před pektinolytickými bakteriemi rodu *Pectobacterium* a *Dickeya*. K potlačování infekce bramboru bakteriemi v současné době neexistují kromě využití bakteriofágů a různých mikroorganismů (bioagens) účinné látky šetrné k životnímu prostředí. Jednou z možností je využití šlechtění odolných odrůd, což je ale poměrně složitý a velice dlouhodobý proces (8–10 let), kdy je ovšem riziko, že nová rezistentní odrůda ztratí další významné vlastnosti. Současné pěstované odrůdy bramboru nejsou odolné proti pektinolytickým bakteriím. Další řešení bakteriálních chorob u brambor nejsou v praxi známa. Na základě popsanych skutečností tak mohou infekce bramboru bakteriemi a houbami při skladování způsobit značné ekonomické ztráty, a proto je nezbytné hledat vhodné metody ochrany hlíz před patogeny. V současné době je celosvětovým trendem posun směrem k omezování používání syntetických pesticidů, a proto existuje silná a rostoucí tendence hledat bezpečnější a ekologičtější alternativy v boji proti patogenům rostlin (Zubrod *et al.*, 2019). Ve stále větším zájmu pěstitelů i spotřebitelů jsou ekologické systémy produkce brambor, které jsou šetrnější k životnímu prostředí a bezpečnější pro spotřebitele. EO a jejich složky mohou představovat ekologickou alternativu ke snižování napadení hlíz brambor houbovými a bakteriálními patogeny během skladování.

4 POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Certifikovaná metodika může být uplatnitelná v ekologickém zemědělství při skladování konzumních, případně sadbových brambor, ale i při praní konzumních hlíz ve slupce. Metodika bude využívána v poradenství, v dalším výzkumu a při vývoji biopesticidů, případně státní správě. Dále bude metodika sloužit studentům středních a vysokých škol při výuce předmětů zaměřených na mikrobiologii, fytopatologii a ekologické pěstování brambor. Certifikovaná metodika bude zveřejněna v elektronické podobě na webových stránkách portálu Agronavigátor (www.agronavigator.cz) a stránkách vydavatele Výzkumného ústavu bramborářského Havlíčkův Brod, s. r. o., (www.vubhb.cz). V tištěné formě bude šířena vydavatelem a Českým bramborářským svazem (www.cbshb.cz).

5 EKONOMICKÉ ASPEKTY

Houbové a bakteriální patogeny nepříznivě ovlivňují kvalitu skladovaných hlíz, což způsobuje ekonomické ztráty. *H. solani* způsobující stříbřitost slupky snižuje především tržní hodnotu hlíz, vzhledem k rostoucí poptávce po praných hlízách bramboru, čímž může negativně ovlivnit trh s konzumními a sadbovými bramborami. Patogen může mít významný vliv na vývoz, zejména sadbových hlíz, protože na certifikovaných sadbových hlízách je povolena pouze omezená infekce *H. solani*. Během skladování může docházet ke snižování hmotnosti hlíz, protože slupka napadených hlíz má vyšší propustnost pro vodu. Hranolky a chipsy vyrobené z napadených hlíz mají často nepřijatelné hnědé okraje. Druhy rodu *Fusarium* a *P. foveata* způsobující hniloby hlíz mohou být za určitých podmínek příčinou významných ekonomických ztrát při skladování hlíz. Druhy rodu *Fusarium* mohou potenciálně způsobit velké ztráty na výnosu odhadované v průměru od 6 do 25% s infekcí až během skladování 60% a mohou zhoršit zároveň i kvalitu hlíz. Při ztrátě 1% během skladování je to cca 10 kg/t. Při průměrné ceně konzumních nepraných brambor 6,50 Kč/kg se jedná o ztrátu 65 Kč/t. Při průměrné ceně sadbových brambor 8,30 Kč/kg se jedná o ztrátu 83 Kč/t. Při současné ploše konzumních brambor 14 517 ha (zemědělský sektor, tzn. bez domácností) a průměrné výtěžnosti hlíz 27 t/ha se jedná o ztrátu cca 32 mil. Kč. Při ploše sadbových brambor 2 770 tis. ha (zemědělský sektor, tzn. bez domácností) a průměrné výtěžnosti hlíz 20 t/ha se jedná o ztrátu cca 5 mil. Kč.

Rovněž bakterie způsobující bakteriální měkkou hnilobu hlíz bramboru mohou značně snížit výnos a kvalitu hlíz. Výrazné ztráty mohou vzniknout během skladování a při manipulaci s hlízami. Ztráty způsobené pektinolytickými bakteriemi rodu *Pecto-*

bacterium a *Dickeya* během skladování se odhadují na cca 5 % (cca 50 kg/t). Při průměrné ceně konzumních nepraných brambor 6,50 Kč/kg se jedná o ztrátu 325 Kč/t. Při průměrné ceně sadbových brambor 8,30 Kč/kg se jedná o ztrátu 415 Kč/t. Při současné ploše konzumních brambor 14 517 ha (zemědělský sektor, tzn. bez domácností) a průměrné výtěžnosti hlíz 27 t/ha se jedná o ztrátu cca 127 mil. Kč. Při ploše sadbových brambor 2 770 tis. ha (zemědělský sektor, tzn. bez domácností) a průměrné výtěžnosti hlíz 20 t/ha se jedná o ztrátu cca 23 mil. Kč.

6 SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Albuquerque, C. C. D., Camara, T. R., Mariano, R. D. L. R., Willadino, L., Marcelino Júnior, C., & Ulisses, C. (2006). Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(4), 527–535. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000500001>
- Allenspach, M., & Steuer, C. (2021). α -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry*, 190, 112857. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112857>
- Al-Mughrabi, K. I., Vikram, A., Peters, R. D., Howard, R. J., Grant, L., Barasubiye, T., Lynch, K., Poirier, R., Drake, K. A., Macdonald, I. K., Lisowski, S. L. I., & Jayasuriya, K. E. (2013). Efficacy of *Pseudomonas syringae* in the management of potato tuber diseases in storage. *Biological Control*, 64(3), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.011>
- Anandakumar, P., Kamaraj, S., & Vanitha, M. K. (2021). D-limonene: A multifunctional compound with potent therapeutic effects. *Journal of Food Biochemistry*, 45(1). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13566>
- Aprosoaie, A. C., Hăncianu, M., Costache, I., & Miron, A. (2014). Linalool: A review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour and Fragrance Journal*, 29(4), 193–219. <https://doi.org/10.1002/ffj.3197>
- Aydin, M. H. (2019). Evaluation of some *Trichoderma* species in biological control of potato dry rot caused by *Fusarium sambucinum* Fuckel isolates. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(1), Article 1. https://doi.org/10.15666/aeer/1701_533546
- Bahrami, R., Kocheili, F., & Ziaee, M. (2016). Fumigant toxicity and persistence of essential oils from asafetida, geranium, and walnut on adults of *Rhyzopertha dominica* (Col.: Bostrichidae). *Toxin Reviews*, 35(3–4), Article 3–4. <https://doi.org/10.1080/15569543.2016.1217542>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Baldim, I., Tonani, L., Von Zeska Kress, M. R., & Pereira Oliveira, W. (2019). *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-Candida agent. *Industrial Crops and Products*, 127, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.064>
- Bång, U. (1992). Influence of seed tuber infestation, chemical seed treatment, and pre-harvest climate on incidence of gangrene and dry rot of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Research*, 35(1), 3–15. <https://doi.org/10.1007/BF02357717>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi* (4th ed). APS Press.
- Bergman, M. E., Davis, B., & Phillips, M. A. (2019). Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Molecules*, 24(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/molecules24213961>
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>
- Bojanowski, A., Avis, T. J., Pelletier, S., & Tweddell, R. J. (2013). Management of potato dry rot. *Postharvest Biology and Technology*, 84, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.04.008>
- Bouyahya, A., Mechchate, H., Benali, T., Ghchime, R., Charfi, S., Balahbib, A., Burkov, P., Shariati, M. A., Lorenzo, J. M., & Omari, N. E. (2021). Health Benefits and Pharmacological Properties of Carvone. *Biomolecules*, 11(12), 1803. <https://doi.org/10.3390/biom11121803>
- CABI Plant. (2022). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (bacterial root rot of sweet potato). *PlantwisePlus Knowledge Bank, Species Pages*, 21913. <https://doi.org/10.1079/pwkb.species.21913>
- Campolo, O., Giunti, G., Russo, A., Palmeri, V., & Zappalà, L. (2018). Essential Oils in Stored Product Insect Pest Control. *Journal of Food Quality*, 2018, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2018/6906105>
- Caputo, L., Reguilon, M. D., Miñarro, J., De Feo, V., & Rodriguez-Arias, M. (2018). *Lavandula angustifolia* Essential Oil and Linalool Counteract Social Aversion Induced by Social Defeat. *Molecules*, 23(10), 2694. <https://doi.org/10.3390/molecules23102694>
- Coleman, W. K., Lonergan, G., & Silk, P. (2001). Potato Sprout Growth Suppression by Menthone and Neomenthol, Volatile Oil Components of *Minthostachys*, *Satureja*, *Bystrypogon*, and *Mentha* Species. *American Journal of Potato Research*, 78(5), Article 5. <https://doi.org/10.1007/BF02884343>
- Cullen, D. W., Lees, A. K., Toth, I. K., & Duncan, J. M. (2001). Conventional PCR and Real-time Quantitative PCR Detection of *Helminthosporium solani* in Soil and on Potato Tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 107(4), 387–398. <https://doi.org/10.1023/A:1011247826231>
- Cullen, D. W., Toth, I. K., Pitkin, Y., Boonham, N., Walsh, K., Barker, I., & Lees, A. K. (2005). Use of Quantitative Molecular Diagnostic Assays to Investigate Fusarium Dry Rot in Potato Stocks and Soil. *Phytopathology*, 95(12), 1462–1471. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1462>
- Czajkowski, R., De Boer, W. J., Van Der Zouwen, P. S., Kastelein, P., Jafra, S., De Haan, E. G., Van Den Bovenkamp, G. W., & Van Der Wolf, J. M. (2013). Virulence of *Dickeya solani* and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Pathology*, 62(3), 597–610. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02664.x>
- Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., van Veen, J. A., & van der Wolf, J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review: Control of *Dickeya* and *Pectobacterium* species in potato. *Plant Pathology*, 60(6), 999–1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>
- Čížková, H., Sevcik, R., & Vacek, J. (2000). Caraway essential oil as potential inhibitor of potato sprouting. *Rostlinna Vyroba*, 46(11), 501–507.
- ČSÚ. Vývoj ploch, hektarových výnosů a sklizni zemědělských plodin. Online. Dostupné z: https://vdb.czso.cz/vdbvo2/faces/cs/index.jsf?page=vystup-objekt&zT&f=TABULKA&skupid=386&katalog=30840&pvo=ZEM02G&pvo=ZEM02G&evo=v1442 !_ZEM02G-celek_1. [citováno 15. 3. 2024].
- Dahmani-Hamzaoui, N., & Baaliouamer, A. (2010). Chemical Composition of Algerian *Artemisia herba-alba* Essential Oils Isolated by Microwave and Hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Research*, 22(6), 514–517. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700386>
- De Oliveira, L. H., Trigueiro, P., Souza, J. S. N., De Carvalho, M. S., Osajima, J. A., Da Silva-Filho, E. C., & Fonseca, M. G. (2022). Montmorillonite with essential oils as antimicrobial agents, packaging repellents, and insecticides: An overview. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 209, 112186. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112186>
- De Vincenzi, M., Stamatii, A., De Vincenzi, A., & Silano, M. (2004). Constituents of aromatic plants: Carvacrol. *Fitoterapia*, 75(7–8), Article 7–8. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.05.002>
- Denner, F. D. N., Millard, C., Geldenhuys, A., & Wehner, F. C. (1997). Treatment of seed potatoes with prochloraz for simultaneous control of silver scurf and black dot on progeny tubers. *Potato Research*, 40(2), 221–227. <https://doi.org/10.1007/BF02358247>
- Desjardins, A. E. (2006). *Fusarium mycotoxins: Chemistry, genetics, and biology*. APS Press, American Phytopathological Society.
- Erasto, P., & Viljoen, A. M. (2008). Limonene - a Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance. *Natural Product Communications*, 3(7), 1934578X0800300. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300728>
- Errampalli, D., Saunders, J. M., & Holley, J. D. (2001). Emergence of silver scurf (*Helminthosporium solani*) as an economically important disease of potato: Review: silver scurf of potato. *Plant Pathology*, 50(2), 141–153. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00555.x>
- Escobar, A., Pérez, M., Romanelli, G., & Blustein, G. (2020). Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12), 9243–9269. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.11.009>
- Estrada Jr, R., Gudmestad, N. C., Rivera, V. V., & Secor, G. A. (2010). *Fusarium graminearum* as a dry rot pathogen of potato in the USA: Prevalence, comparison of host isolate aggressiveness and factors affecting aetiology. *Plant Pathology*, 59(6), 1114–1120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02343.x>
- Fahn, A. (1982). *Plant anatomy* (3rd rev. ed). Pergamon Press.

- Fan, Y., Zhang, W., Kang, Y., Shi, M., Yang, X., Yu, H., Zhang, R., Liu, Y., & Qin, S. (2021). Physiological and dynamic transcriptome analysis of two potato varieties reveal response of lignin and MAPK signal to dry rot caused by *Fusarium sulphureum*. *Scientia Horticulturae*, 289, 110470. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110470>
- Ferreira, A. P., Almeida-Aguiar, C., Costa, S. P. G., & Neves, I. C. (2022). Essential Oils Encapsulated in Zeolite Structures as Delivery Systems (EODS): An Overview. *Molecules*, 27(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/molecules27238525>
- Firman, D. M., & Allen, E. J. (1995a). Effects of seed size, planting density and planting pattern on the severity of silver scurf (*Helminthosporium solani*) and black scurf (*Rhizoctonia solani*) diseases of potatoes. *Annals of Applied Biology*, 127(1), 73–85. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1995.tb06652.x>
- Firman, D. M., & Allen, E. J. (1995b). Transmission of *Helminthosporium solani* from potato seed tubers and effects of soil conditions, seed inoculum and seed physiology on silver scurf disease. *The Journal of Agricultural Science*, 124(2), 219–234. <https://doi.org/10.1017/S0021859600072890>
- Frazier, M. J., Shetty, K. K., Kleinkopf, G. E., & Nolte, P. (1998). Management of silver scurf (*Helminthosporium solani*) with fungicide seed treatments and storage practices. *American Journal of Potato Research*, 75(3), 129–135. <https://doi.org/10.1007/BF02895847>
- Friedman, M. (2017). Chemistry, Antimicrobial Mechanisms, and Antibiotic Activities of Cinnamaldehyde against Pathogenic Bacteria in Animal Feeds and Human Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10406–10423. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04344>
- Gachango, E., Hanson, L. E., Rojas, A., Hao, J. J., & Kirk, W. W. (2012). *Fusarium* spp. Causing Dry Rot of Seed Potato Tubers in Michigan and Their Sensitivity to Fungicides. *Plant Disease*, 96(12), 1767–1774. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0932-RE>
- Gandra, A. E., Radünz, M., Helbig, E., Dellinghausen Borges, C., & Kuka Valente Gandra, T. (2018). A Mini-Review on Encapsulation of Essential Oils. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 7(1). <https://doi.org/10.15406/japlr.2018.07.00205>
- Ghosh, V., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.08.010>
- Giunti, G., Campolo, O., Laudani, F., Zappalà, L., & Palmeri, V. (2021). Bioactivity of essential oil-based nano-biopesticides toward *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Industrial Crops and Products*, 162, 113257. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113257>
- Gupta, A., Jeyakumar, E., & Lawrence, R. (2021). Journey of Limonene as an Antimicrobial Agent. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(3), 1094–1110. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.3.01>
- Gupta, I., Singh, R., Muthusamy, S., Sharma, M., Grewal, K., Singh, H. P., & Batish, D. R. (2023). Plant Essential Oils as Biopesticides: Applications, Mechanisms, Innovations, and Constraints. *Plants*, 12(16), 2916. <https://doi.org/10.3390/plants12162916>
- Guzman, J. (2014). Natural Cinnamic Acids, Synthetic Derivatives and Hybrids with Antimicrobial Activity. *Molecules*, 19(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/molecules191219292>
- Hajian-Maleki, H., Baghaee-Ravari, S., & Moghaddam, M. (2021). Herbal essential oils exert a preservative effect against the potato soft rot disease. *Scientia Horticulturae*, 285, 110192. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110192>
- Heiny, D. K., & McIntyre, G. A. (1983). *Helminthosporium solani* Dur. & Mont. Development on potato periderm. *American Potato Journal*, 60(10), 773–789. <https://doi.org/10.1007/BF02856896>
- Hide, G. A., & Adams, M. J. (1980). Relationships between disease levels on seed tubers, on crops during growth and in stored potatoes. 3. Silver scurf. *Potato Research*, 23(2), 229–240. <https://doi.org/10.1007/BF02356271>
- Holley, J. W., & Kawchuk, L. W. (1996). Distribution of thiabendazole and thiophanate-methyl resistant strains of *Helminthosporium solani* and *Fusarium sambucinum* in Alberta potato storages. 76, 21–22.
- Hossain, Md. M., Shibata, S., Aizawa, S.-I., & Tsuyumu, S. (2005). Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 66(4), 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2005.06.001>
- Hua-Li, X., Yang, B., Yuan-Yuan, Z., Calderón-Urrea, A., Hu-Jun, W., Lu-Mei, P., Yi, W., & Yong-Cai, L. (2017). Erratum to: Effects of elicitors on trichothecene accumulation and Tri genes expression in potato tubers inoculated with *Fusarium sulphureum*. *European Journal of Plant Pathology*, 149(1), 239–239. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1242-5>
- Hunger, R. M., & McIntyre, G. A. (1979). Occurrence, development, and losses associated with silver scurf and black dot on Colorado potatoes. *American Potato Journal*, 56(6), 289–306. <https://doi.org/10.1007/BF02855598>
- Chang, H., Cheng, Y., Wu, C., Chang, S., Chang, T., & Su, Y. (2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource Technology*, 99(14), 6266–6270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.005>
- Charkowski, A. O. (2006). The soft rot *Erwinia*. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-Associated Bacteria* (s. 423–505). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_13
- Chiriac, A. P., Rusu, A. G., Nita, L. E., Chiriac, V. M., Neamtu, I., & Sandu, A. (2021). Polymeric Carriers Designed for Encapsulation of Essential Oils with Biological Activity. *Pharmaceutics*, 13(5), 631. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050631>
- Jellis, G. J., & Taylor, G. S. (1974). *The relative importance of silver scurf and black dot: Two discguring diseases of potato tubers*. 14, 97–112.
- Jellis, G. J., & Taylor, G. S. (1977). The development of silver scurf (*Helminthosporium solani*) disease of potato. *Annals of Applied Biology*, 86(1), 19–28. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1977.tb01811.x>
- Kamatou, G. P. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, 96, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005>
- Kavousi, H. R., Fathi, M., & Goli, S. A. H. (2018). Novel cress seed mucilage and sodium caseinate microparticles for encapsulation of curcumin: An approach for controlled release. *Food and Bioprocess Technology*, 110, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.05.004>
- Khandelwal, N., Barbole, R. S., Banerjee, S. S., Chate, G. P., Biradar, A. V., Khandare, J. J., & Giri, A. P. (2016). Budding trends in integrated pest management using advanced micro- and nano-materials: Challenges and perspectives. *Journal of Environmental Management*, 184, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.071>
- Li, Y. C., Bi, Y., Ge, Y. H., Sun, X. J., & Wang, Y. (2009). Antifungal Activity of Sodium Silicate on *Fusarium sulphureum* and Its Effect on Dry Rot of Potato Tubers. *Journal of Food Science*, 74(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01154.x>
- Li, Y., Sun, X., Bi, Y., Ge, Y., & Wang, Y. (2009). Antifungal Activity of Chitosan on *Fusarium sulphureum* in Relation to Dry Rot of Potato Tuber. *Agricultural Sciences in China*, 8(5), 597–604. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60251-5](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60251-5)
- Liu, J., Sun, Z., Zou, Y., Li, W., He, F., Huang, X., Lin, C., Cai, Q., Wisniewski, M., & Wu, X. (2022). Pre- and postharvest measures used to control decay and mycotoxigenic fungi in potato (*Solanum tuberosum* L.) during storage. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(2), 415–428. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1818688>
- Ma, X., Schloop, A., Swingle, B., & Perry, K. L. (2018). *Pectobacterium* and *Dickeya* Responsible for Potato Blackleg Disease in New York State in 2016. *Plant Disease*, 102(9), 1834–1840. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1595-RE>
- Maćzka, W., Duda-Madej, A., Górny, A., Grabarczyk, M., & Wińska, K. (2021). Can Eucalyptol Replace Antibiotics? *Molecules*, 26(16), 4933. <https://doi.org/10.3390/molecules26164933>
- Maćzka, W., Duda-Madej, A., Grabarczyk, M., & Wińska, K. (2022). Natural Compounds in the Battle against Microorganisms—Linalool. *Molecules*, 27(20), 6928. <https://doi.org/10.3390/molecules27206928>
- Maćzka, W., Twardawska, M., Grabarczyk, M., & Wińska, K. (2023). Carvacrol—A Natural Phenolic Compound with Antimicrobial Properties. *Antibiotics*, 12(5), 824. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050824>
- Maes, Bouquillon, & Fauconnier. (2019). Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. *Molecules*, 24(14), 2539. <https://doi.org/10.3390/molecules24142539>
- Malekmohammad, K., Rafeian-Kopaei, M., Sardari, S., & Sewell, R. D. E. (2021). Toxicological effects of *Mentha x piperita* (peppermint): A review. *Toxin Reviews*, 40(4), 445–459. <https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1647545>
- Malko, A., Frantsuzov, P., Nikitin, M., Statsyuk, N., Dzhavakhiya, V., & Golikov, A. (2019). Potato Pathogens in Russia's Regions: An Instrumental Survey with the Use of Real-Time PCR/RT-PCR in Matrix Format. *Pathogens*, 8(1), 18. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010018>

- Mann, C. M., & Markham, J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 84(4), 538–544. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x>
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833–839. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.02.039>
- Matušinský, P., Maňasová, M., & Zouhar, M. (2020). *Fungicidní prostředek na ochranu rostlin na základě esenciálního oleje z Thymus vulgaris, způsob jeho výroby a použití* (Úřad průmyslového vlastnictví Patent No. 308 145).
- Mérida, C. L., & Loria, R. (1994). Survival of *Helminthosporium solani* in soil and in vitro colonization of senescent plant tissue. *American Potato Journal*, 71(9), 591–598. <https://doi.org/10.1007/BF02851524>
- Mishra, M. (2015). *Handbook of Encapsulation and Controlled*. CRC Press: Boca Raton.
- Morcía, C., Tumino, G., Ghizzoni, R., & Terzi, V. (2016). Carvone (*Mentha spicata* L.) Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (s. 309–316). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00035-3>
- Morkeliūnė, A., Rasiukevičiūtė, N., Šernaitė, L., & Valiūškaitė, A. (2021). The Use of Essential Oils from Thyme, Sage and Peppermint against *Colletotrichum acutatum*. *Plants*, 10(1), 114. <https://doi.org/10.3390/plants10010114>
- Mulder, A., Turkensteen, L. J., & Delleman, J. (Ed.). (2005). *Potato diseases: Diseases, pests and defects*. NIVAP.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806–1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>
- Osdaghi, E. (2022). *Dickeya zaeae* (bacterial stalk rot of maize) (s. 21944) [Dataset]. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.21944>
- Owolabi, M. S., Lajide, L., Oladimeji, M. O., & Setzer, W. N. (2010). The Effect of Essential Oil Formulations for Potato Sprout Suppression. *Natural Product Communications*, 5(4), 1934578X1000500. <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500431>
- Pandit, J., Aqil, Mohd., & Sultana, Y. (2016). Nanoencapsulation technology to control release and enhance bioactivity of essential oils. In *Encapsulations* (s. 597–640). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804307-3.00014-4>
- Patti, A., & Acierno, D. (2022). Towards the Sustainability of the Plastic Industry through Biopolymers: Properties and Potential Applications to the Textiles World. *Polymers*, 14(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/polym14040692>
- Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12), Article 12. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
- Perumal, A. B., Sellamuthu, P. S., Nambiar, R. B., & Sadiku, E. R. (2017). Effects of Essential Oil Vapour Treatment on the Postharvest Disease Control and Different Defence Responses in Two Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars. *Food and Bioprocess Technology*, 10(6), 1131–1141. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1891-6>
- Peters, J. C., Lees, A. K., Cullen, D. W., Sullivan, L., Stroud, G. P., & Cunnington, A. C. (2008). Characterization of *Fusarium* spp. Responsible for causing dry rot of potato in Great Britain. *Plant Pathology*, 57(2), 262–271. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01777.x>
- Peters, R. D., MacLeod, C., Seifert, K. A., Martin, R. A., Hale, L. R., Grau, C. R., & MacInnis, S. (2008). Pathogenicity to Potato Tubers of *Fusarium* spp. Isolated from Potato, Cereal and Forage Crops. *American Journal of Potato Research*, 85(5), Article 5. <https://doi.org/10.1007/s12230-008-9037-z>
- Pinto, M. R. M. R., Paula, D. D. A., Alves, A. I., Rodrigues, M. Z., Vieira, É. N. R., Fontes, E. A. F., & Ramos, A. M. (2018). Encapsulation of carotenoid extracts from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) by emulsification (O/W) and foam-mat drying. *Powder Technology*, 339, 939–946. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.08.076>
- Plodpai, P., Chuenchitt, S., Petcharat, V., Chakthong, S., & Voravuthikunchai, S. P. (2013). Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. *Crop Protection*, 43, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.09.004>
- Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 679–684. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4)
- Puscaselu, G. R., Lobiuc, A., Sirbu, I. O., & Covasa, M. (2022). The Use of Biopolymers as a Natural Matrix for Incorporation of Essential Oils of Medicinal Plants. *Gels*, 8(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/gels8110756>
- Ranganna, B., Kushalappa, A. C., & Raghavan, G. S. V. (1997). Ultraviolet irradiance to control dry rot and soft rot of potato in storage. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19(1), 30–35. <https://doi.org/10.1080/07060669709500568>
- Rasocha, V., Hausvater, Ervin., & Doležal, P. (2008). *Škodliví činitelé bramboru: Abionózy, choroby, škůdci = Harmful agents of potato: abionoses, diseases, pests*. Výzkumný ústav bramborářský.
- Ravichandran, C., Badgujar, P. C., Gundev, P., & Upadhyay, A. (2018). Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 668–680. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.052>
- Rebello, F. D. F. P. (2009). Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Revista Agrogeambiental*, 1(3). <https://doi.org/10.18406/2316-1817v1n32009223>
- Rodriguez, D. A., Secor, G. A., Gudmestad, N. C., & Franci, L. J. (1996). Sporulation of *Helminthosporium solani* and infection of potato tubers in seed and commercial storages. *Plant Disease*, 80, 1063–1070.
- Rodriguez, D. A., Secor, G. A., Gudmestad, N. C., & Grafton, K. (1995). Screening tuber-bearing *Solanum* species for resistance to *Helminthosporium solani*. *American Potato Journal*, 72(11), 669–679. <https://doi.org/10.1007/BF02849176>
- Saddler Gerry. (2016). *Dickeya: A Scottish, UK, and European Perspective* [Dataset]. <https://doi.org/10.1094/GROW-POT-05-16-064>
- Şanlı, A., & Karadoğan, T. (2019). Carvone Containing Essential Oils as Sprout Suppressants in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers at Different Storage Temperatures. *Potato Research*, 62(3), 345–360. <https://doi.org/10.1007/s11540-019-9415-6>
- Secor, G. A., & Gudmestad, N. C. (1999). Managing fungal diseases of potato. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21(3), 213–221. <https://doi.org/10.1080/07060669909501184>
- Sempere-Ferre, F., Asamar, J., Castell, V., Roselló, J., & Santamarina, M. P. (2021). Evaluating the Antifungal Potential of Botanical Compounds to Control *Botryotinia fuckeliana* and *Rhizoctonia solani*. *Molecules*, 26(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/molecules26092472>
- Sethuraman, K., Ramakrishnan, G., & Balasubramanian, A. (1997). *A leaf spot disease of Solanum elaeagnifolium caused by Helminthosporium solani*. 84, 561.
- Stawiak, M., Łojkowska, E., & Van Der Wolf, J. M. (2009). First report of bacterial soft rot on potato caused by *Dickeya* sp. (Syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Poland. *Plant Pathology*, 58(4), 794–794. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02028.x>
- Song, X., Bandara, M., Nash, B., Thomson, J., Pond, J., Wahab, J. and Tanino, K. T. (2009). *Use of Essential Oils in Sprout Suppression and Disease Control in Potato Storage*. *Special Issue 1*, 95–101.
- Stevenson, W. R. (Ed.). (2001). *Compendium of potato diseases* (2nd ed). American Phytopathological Society.
- Tiwari, S., Singh, B. K., & Dubey, N. K. (2020). Encapsulation of Essential Oils—A Booster to Enhance their Bio-efficacy as Botanical Preservatives. *Journal of scientific research*, 64(01), 175–178. <https://doi.org/10.37398/JSR.2020.640125>
- Vacek, J., & Plištil, Tomáš. (2020). *Skladování konzumních brambor: Certifikační metodika* (Vydání první). Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.
- Vatankhah, M., Saberi Riseh, R., Moradzadeh Eskandari, M., Sedaghati, E., Alaie, H., & Afzali, H. (2019). Biological Control of Fusarium Dry Rot of Potato Using Some Probiotic Bacteria. *mársjns*, 21(5), Article 5.
- Vidner, J., Dobiáš, K., Dědič, P., Bareš, I., & Sehnalová, J. (1987). Klasifikátor rodu *Solanum* L. *Genové zdroje*, 31.
- Vichová, J. (2020). *Choroby bramboru 3: Bakteriální choroby bramboru (II)*. *Agromanual*.
- Wale, S., Platt, B. H. W., & Cattlin, N. D. (2008). *Diseases, pests and disorders of potatoes: A colour handbook*. Manson publ.
- Wei, J., Bi, Y., Xue, H., Wang, Y., Zong, Y., & Prusky, D. (2020). Antifungal activity of cinnamaldehyde against *Fusarium sambucinum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 129(2), 256–265. <https://doi.org/10.1111/jam.14601>
- Weiss, J., Scherze, I., & Muschiolik, G. (2005). Polysaccharide gel with multiple emulsion. *Food Hydrocolloids*, 19(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.fooohyd.2004.10.023>
- Xing-dong, L., & Hua-li, X. (2014). Antifungal activity of the essential oil of *Zanthoxylum bungeanum* and its major constituent on *Fusarium sulphureum* and dry rot of potato tubers. *Phytoparasitica*, 42(4), 509–517. <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0388-3>
- Xue, H., Liu, Q., & Yang, Z. (2023). Pathogenicity, Mycotoxin Production, and Control of Potato Dry Rot Caused by *Fusarium* spp.: A Review. *Journal of Fungi*, 9(8), 843. <https://doi.org/10.3390/jof9080843>

- Yaganza, E. S., Tweddell, R. J., & Arul, J. (2014). Postharvest Application of Organic and Inorganic Salts To Control Potato (*Solanum tuberosum* L.) Storage Soft Rot: Plant Tissue-Salt Physicochemical Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(38), 9223–9231. <https://doi.org/10.1021/jf5017863>
- Yuan, C., Wang, Y., Liu, Y., & Cui, B. (2019). Physicochemical characterization and antibacterial activity assessment of lavender essential oil encapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Industrial Crops and Products*, 130, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.067>
- Zhang, X., Wu, C., Hua, H., Cai, Q., & Wu, X. (2023). Characterization of the First Alternavirus Identified in *Fusarium avenaceum*, the Causal Agent of Potato Dry Rot. *Viruses*, 15(1), 145. <https://doi.org/10.3390/v15010145>
- Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knäbel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J. J., Rohr, J., Schar Müller, A., Smalling, K., Stehle, S., Schulz, R., & Schäfer, R. B. (2019). Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environmental Science & Technology*, 53(7), 3347–3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In N. J. Zuidam & V. Nedovic (Ed.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (s. 3–29). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0_2

7 SEZNAM VYBRANÝCH PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Kmoch, M., Loubová, V., Veselská, M., Jílková, B., Vichová, J. (2024). Antifungal activity of essential oils on *Helminthosporium solani* causing potato silver scurf under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Agriculture* 14, 66. doi.org/10.3390/agriculture14010066.
- Jílková, B., Vichová, J., Jahn, M., Kmoch, M. (2024). Účinnost vybraných rostlinných silic na bakterii *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Agromanuál* 9–10, 24–25.
- Jílková, B., Vichová, J., Michutová, M., Pokorný, R., Kmoch, M. (2024). Testování účinnosti silic a jejich složek proti bakterii *Pectobacterium atrosepticum* na hlízách bramboru. *Úroda* 12 (LXXII), vědecká příloha, s. 121–126. ISSN 0139-6013.
- Jílková, B., Vichová, J., Neoralová, M., Sochorová, A., Kmoch, M. (2024). Využití mikroorganismů a rostlinných extraktů v ochraně proti bakterii *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Úroda* 12 (LXXII), vědecká příloha, s. 127–133. ISSN 0139-6013.
- Jílková, B., Vichová, J., Holková, L., Pluháčková, H., Michutová, M., & Kmoch, M. (2024). Laboratory efficacy of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* causing soft rot of potato tubers. *Potato Research*. <https://doi.org/10.1007/s11540-024-09743-y>.
- Vichová, J., Jílková, B., Michutová, M., Kmoch, M. (2024). *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of selected essential oil components against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* causing bacterial soft rot of potato tubers. *Heliyon* 10, 11. doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32081.
- Veselská, M. (2024). Vliv vybraných složek rostlinných silic na růst *Helminthosporium solani* Durier et Mont., 1849 způsobující stříbřitost slupky bramboru. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, 62 s.
- Kmoch, M., Loubová, V., Veselská, M., Jílková, B., Holková, L. (2023). Metodika diagnostiky *Helminthosporium solani* v hlízách bramboru pomocí real-time PCR. Certifikovaná metodika (osvědčení č. UKZUZ 217824/2023, ze dne 22. 12. 2023). První vydání. Havlíčkův Brod: Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 25 s. ISBN 978-80-88614-02-9.
- Holková, L., Jílková, B., Vichová, J., Bačová, N., Kmoch, M. (2023). Možnosti detekce a kvantifikace *Rhizoctonia solani* v půdě. *Úroda* 12 (71), vědecká příloha, s. 93–100. ISSN 0139-6013.
- Kmoch, M., Loubová, V., Jílková, B., Vichová, J. (2023). Účinnost esenciálních olejů na *Fusarium coeruleum* Lib. ex Succ., 1886, způsobující fusariovou hnilobu bramboru. *Úroda* 12 (71), vědecká příloha, s. 101–108. ISSN 0139-6013.
- Loubová, V., Kmoch, M. (2023). Antifungální aktivita vybraných esenciálních olejů na *Phoma foveata* způsobující fomovou hnilobu bramboru. *Úroda* 12 (71), vědecká příloha, s. 141–148. ISSN 0139-6013.
- Mokrý, K. (2023). Účinnost vybraných silic při ochraně bramboru vůči bakterii *Pectobacterium atrosepticum*. Diplomová práce, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, 95 s.
- Špaček, D. (2023). Využití silic při ochraně bramboru vůči bakterii *Dickeya dianthicola*. Diplomová práce, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, 80 s.
- Báčová, N. (2023). Detekce patogenů lilku bramboru přenosných sadbou. Bakalářská práce, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, 54 s.
- Valkovičová, N. (2023). Detekce patogenů lilku bramboru přezívajících v půdě. Bakalářská práce, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, 58 s.
- Holková, L., Jílková, B., Vichová, J., Kmoch, M. (2023). Metodika kvantifikace houbového patogenu *Rhizoctonia solani* v půdě metodou Real Time PCR. Certifikovaná metodika (osvědčení č. UKZUZ 017154/2024, ze dne 31. 1. 2024). První vydání. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 24 s. ISBN 978-80-7509-947-1.
- Vichová, J., Jílková, B., Pokorný, R., Holková, L., Kmoch, M. (2022). Laboratorní účinnost komponent silic na bakterie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* a *Dickeya solani*. *Úroda* 12, LXIX, vědecká příloha, s. 135–140. ISSN 0139-6013.
- Kmoch, M., Doležalová, M., Jílková, B., Vichová, J. (2022). Účinnost vybraných esenciálních olejů na *Helminthosporium solani* způsobující stříbřitost slupky bramboru. *Úroda* 12, LXIX, vědecká příloha, s. 141–148. ISSN 0139-6013.
- Jílková, B., Vichová, J., Kmoch, M. (2022). Účinnost vybraných komponent silic obsažených v rostlinách z čeledi Lamiaceae k patogenu *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. In: Březinová Belcredi, N., et al. (Eds.): XXII. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin 8.–9.9.2022: Sborník abstraktů. Brno: Agronomická fakulta, Mendelova univerzita, s. 22. ISBN 978-80-7509-848-1.
- Charvátová L. (2022). Využití silic při ochraně bramboru vůči bakterii *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Diplomová práce, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, 90 s.
- Jílková, B., Vichová, J., Pokorný, R. (2021). Účinnost vybraných silic druhů z čeledi Lamiaceae k patogenu *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Úroda*. 12, roč. LXIX, vědecká příloha, s. 245–250. ISSN 0139-6013.
- Kmoch, M., Nevolová, H., Jílková, B., Pokorný, R., Vacek, J. (2021). Vliv vybraných rostlinných silic na růst mycelia houby *Rhizoctonia solani* Kühn, 1858. *Úroda*. 12, roč. LXIX, vědecká příloha, s. 251–258. ISSN 0139-6013.



**VÝZKUMNÝ ÚSTAV
BRAMBORÁŘSKÝ
HAVLÍČKŮV BROD**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Řada **PRAKTICKÉ INFORMACE** - číslo **92**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA (osvědčení č. UKZUZ 207200/2024, ze dne 9. 12. 2024)

POTENCIÁL ESENCIÁLNÍCH OLEJŮ A JEJICH SLOŽEK V EKOLOGICKÉ OCHRANĚ HLÍZ BRAMBORU PROTI SKLÁDKOVÝM PATOGENŮM

Autoři: Ing. Martin KMOCH, Ph.D.
Mgr. Věra LOUBOVÁ
Mgr. Marie VESELSKÁ
Ing. Josef VACEK, Ph.D.
Ing. Barbora JÍLKOVÁ, Ph.D.
Ing. Jana VÍCHOVÁ, Ph.D.
Ing. Lukáš MUSIL

Vydal Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o.,
Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod, Česká republika

Vydání první, 2024

Náklad 100 ks

Text neprošel jazykovou úpravou.



Metodika byla vypracovaná v rámci podpory od Ministerstva zemědělství ČR – projektu NAZV č. QK21010083 s názvem *Ekologická ochrana konzumních brambor jako zdravé zeleniny proti vybraným půdou a sadbou přenášeným patogenům.*

ISBN 978-80-88614-07-4

© Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s. r. o., 2024

Publikace nesmí být přetiskována vcelku nebo po částech, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez výslovného souhlasu autorů.

www.vubhb.cz