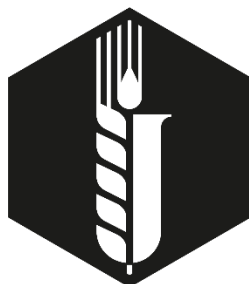


**Metodika testování rostlinných esenciálních olejů jako prostředku  
ochrany rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům**

**Ondřej Douša**

**Národní centrum zemědělského a potravinářského  
výzkumu v.v.i.**



Schválená metodika

Metodika testování rostlinných esenciálních olejů jako prostředku ochrany rostlin proti  
fytoparazitickým hád'átkům

Obsah

Cíl metodiky .....	3
Vlastní popis metodiky .....	3
Současné možnosti přímé ochrany rostlin proti volně žijícím fytoparazitickým hád'átkům.....	3
Metodika in vitro testování biologické aktivity esenciálních olejů .....	5
Ředění esenciálních olejů a testování jejich biologické účinnosti .....	6
Vyhodnocení výsledků in vitro testů .....	8
Příklad stanovení hodnot LC <sub>50</sub> a LC <sub>90</sub> pro hád'átka zhoubné a esenciální olej ze skořicovníku čínského.....	9
Poloprovozní experimenty .....	11
Testy fytotoxicity .....	14
Srovnání „novosti postupů“ .....	14
Popis uplatnění schválené metodiky .....	15
Ekonomické aspekty .....	15
Seznam použité související literatury.....	16
Seznam publikací, které předcházely metodice .....	17
Přílohy ke schválené metodice.....	17

## Cíl metodiky

Cílem této metodiky je poskytnout nové informace o možnostech testování vlivu aplikace rostlinných esenciálních olejů na mortalitu především volně žijících druhů fytoparazitických hád'átek. Metodika reaguje na aktuální situaci, kdy není k dispozici dostatek přímých metod ochrany rostlin proti škůdcům z této skupiny bezobratlých a dochází ke snižování počtu registrovaných účinných látek a popisuje způsoby in vitro i in vivo testování rostlinných esenciálních olejů jako alternativy aplikace konvenčních nematocidů či fyzikálních metod.

## Vlastní popis metodiky

### Současné možnosti přímé ochrany rostlin proti volně žijícím fytoparazitickým hád'átkům

Fytoparazitická hád'átka patří stále k obtížně zvladatelným škůdcům. Problémem může být jejich nenápadné působení zejména v úvodní fázi infekce, ale hlavně současný nedostatek registrovaných účinných látek pro přímou ochranu. To je značná komplikace i u druhů šířících se osivem a sadbou; přitom by bylo možné v tomto případě jejich výskyt redukovat přímou aplikací funkčních nematocidů na množitelský materiál, což není proveditelné u hospodářsky významných sedenterních druhů hád'átek z rodů *Globodera*, *Heterodera* a *Meloidogyne*.

Jedním z nejvýznamnějších volně žijících fytoparazitických hád'átek je v rámci mírného pásma hád'átka zhoubné (*Ditylenchus dipsaci*, Obr. 1). Při mezinárodním hodnocení významu fytoparazitických hád'átek se tento druh umístil na 5. místě (Jones et al., 2013). V případě tohoto hád'átka se jedná o stále se opakující problém, to je dáno mimo jiné právě nedostatkem účinných metod ochrany množitelského materiálu. V podmínkách ČR je hád'átka zhoubné nejzávažnějším škůdcem česneku a napadení rostlin tímto druhem může vést i k úplné ztrátě komerčního potenciálu této hospodářsky významné zeleniny. Oficiální metodika pro ochranu sadbového česneku využívá její ošetření teplou vodou (Gratwick a Southey, 1972). Tato metoda je sice funkční, těžko se ale aplikuje profesionálními pěstiteli, kteří potřebují ošetřit velké objemy sadby. Navíc je nutné dodržet přesně dobu ošetření a předepsanou teplotu vody, aby nebyla tímto zákrokem sadba poškozena. Účinnou metodou proti hád'átka zhoubnému v sadbovém česneku je fumigace plynným kyanovodíkem. V minulosti byl v platnosti i EPPO

Metodika testování rostlinných esenciálních olejů jako prostředku ochrany rostlin proti  
fytoparazitickým hád'átkům

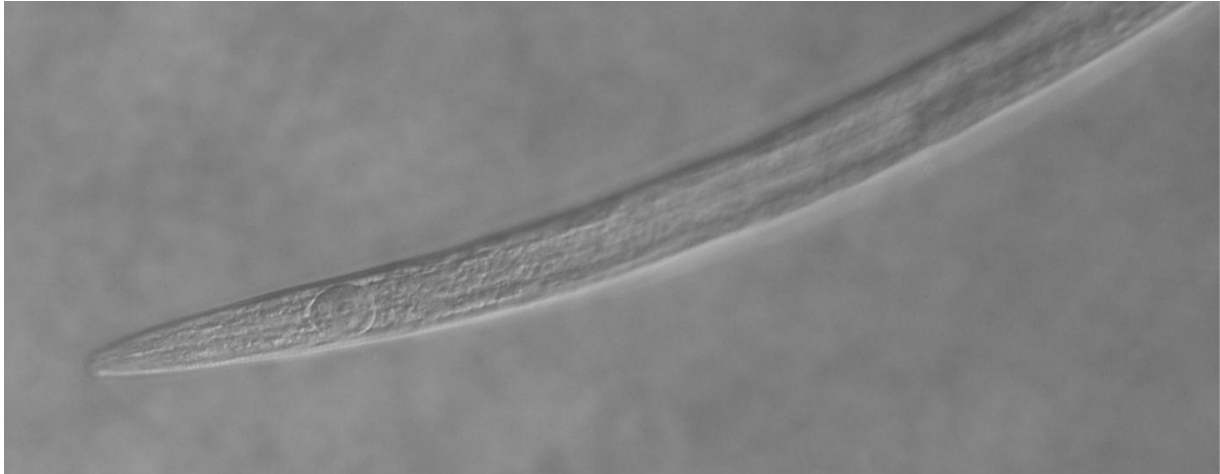
standard na tuto metodu ošetření (EPPO 1984) a její efektivita byla potvrzena i při aplikaci odlišné koncentrace kyanovodíku (Zouhar et al., 2016). Určitou nevýhodou použití kyanovodíku je nutnost ošetřovat sadbu česneku v dormantním stavu, aby nedošlo k jejímu poškození (Zouhar et al., 2016). Větší komplikací je skutečnost, že kyanovodík není pro ošetření sadbového materiálu v Evropské unii registrovaný, ošetření tedy vyžaduje získání zvláštního povolení příslušných orgánů státní správy. Zákrok navíc musí probíhat v certifikovaných prostorech a provádět ho může pouze příslušně vyškolený personál.

Obr. 1: hlava hád'átka *D. dipsaci*



Dalším rodem ekonomicky významných volně žijících fytoparazitických hád'átek je r. *Aphelenchoides*. V České republice byla potvrzena přítomnost druhů *Aphelenchoides fragariae* (Obr. 2) a *Aphelenchoides riztemabosi*, český název je hád'átko jahodníkové, resp. hád'átko kopretinové. Oba druhy jsou škůdci jahodníku a okrasných rostlin. Obdobně jako v případě hád'átka zhoubného bývá zdrojem infekce napadený sadbový materiál či osivo, i u těchto druhů je možné využít pro regulaci výskytu hád'átek v sadbě ošetření teplou vodou, což se provádí např. u sazenic jahodníku. Limitem metody je ale opět riziko poškození sadby, různé odrůdy jahodníku mají navíc rozdílnou teplotní toleranci (WWW1) a metodu je proto nutné optimalizovat vždy pro konkrétní materiál.

Obr. 2: hlava hád'átka *A. fragarie*



Z výše uvedených skutečností vyplývá potřeba výzkumu dalších metod přímé ochrany sadbového materiálu proti volně žijícím druhům hád'átek. V posledních desetiletích je trendem výzkum aplikace rostlinných esenciálních olejů, což je výsledek snahy o omezování použití klasických nematocidů. Existuje mnoho prací potvrzujících biologickou účinnost rostlinných esenciálních olejů na mortalitu fytoparazitických hád'átek. V případě druhu *D. dipsaci* byly prokázány např. účinky extraktů z rostlin druhů *Plantago major* a *Ruta graveolans* (Insunza a Valenzuela, 1995), esenciálních olejů z rostlin druhů *Eugenia caryophyllata*, *Origanum compactum*, *Origanum vulgare*, *Thymus matschiana* a *Thymus vulgaris* (Zouhar et al., 2009), *Boswellia sacra*, *Thymus vulgaris* a *Pinus mugo* (Douda et al., 2022) u *A. fragarie* byly testovány s pozitivním účinkem rovněž esenciální oleje z *Eugenia caryophyllata* a *Thymus vulgaris* (An et al., 2017). Praktická a komerční aplikace těchto výsledků je však stále limitovaná. Tento stav může být zapříčiněn např. drahou a komplikovanou registrací nových přípravků či nehomogenními výsledky dosaženými při testování esenciálních olejů ze stejných druhů rostlin, další výzkum v této oblasti je tedy stále nezbytný a měl by se soustředit zejména na esenciální oleje, které jsou snadno komerčně dostupné a již využívané v potravinářském průmyslu či kosmetice a jejichž cena dává předpoklad možného praktického použití.

### Metodika in vitro testování biologické aktivity esenciálních olejů

#### Příprava hád'átek pro experimenty

Hád'átka pro experimenty je možné extrahovat z čerstvého rostlinného materiálu, v případě druhu *D. dipsaci* a hád'átek r. *Aphelenchoides* připadá v úvahu i extrakce z napadeného suchého

## Metodika testování rostlinných esenciálních olejů jako prostředku ochrany rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům

pletiva. Pro extrakci je nejjednodušší využít modifikovanou Baermannovu nálevkovou metodu (Baermann 1917), pro extrakci např. z většího množství infikovaného osiva se dá využít i modifikace této metody využívající maceraci extrahovaného materiálu na plastových miskách (Obr. 3; Douda et al., 2024; Perry et al., 2020).

**Obr. 3: extrakce hád'átka zhoubného (*D. dipsaci*) z infikovaného osiva pažitky modifikovanou Baermannovou metodou**



Po extrakci je vždy nutné získaná hád'átka promýt pod tekoucí vodou, tímto způsobem se ze suspenze hád'átek odstraní se výluh pletiv, který může působit negativně na jejich pohyblivost. Promytí suspenze volně žijících hád'átek velikosti r. *Ditylenchus* a *Aphelenchoides* je možné provést na sítu o průměru ok 25  $\mu\text{m}$ . Před vlastním experimentem je vhodné hád'átka uchovávat při teplotě 5 °C. Za těchto podmínek je možné před pokusem skladovat hád'átka maximálně 7 dní a před testováním suspenzi znovu propláchnout čerstvou vodou, ponechat temperovat 1 hodinu při laboratorní teplotě a ověřit pohyblivost hád'átek pod stereomikroskopem.

### Ředění esenciálních olejů a testování jejich biologické účinnosti

Pro ředění esenciálních olejů na testované koncentrace je nutné použít detergent jako např. Tween 20 nebo Triton X-100. Při ředění je detergent aplikován ve stejném objemu jako esenciální olej a vzniklá směs je na finální koncentraci naředěna destilovanou vodou.

Metodika testování rostlinných esenciálních olejů jako prostředku ochrany rostlin proti  
fytoparazitickým hád'átkům

Příklad ředění roztoku esenciálního oleje o koncentraci 1000 ppm (0,1 %) a výsledném objemu 10 ml:

- napipetovat 10  $\mu$ l ředěného esenciálního oleje
- připipetovat 10  $\mu$ l Tweenu 20
- doplnit destilovanou vodou na 10 ml a důkladně promíchat

Pro vlastní experimenty je suspenze hád'átek pipetována do jamek v plastových destičkách (Obr. 4). Do každé jamky je vhodné pipetovat 50  $\mu$ l suspenze a ihned potom hád'átka spočítat. Suspenzi hád'átek je nutné naředit tak, aby 50  $\mu$ l obsahovalo cca 50 jedinců což je množství které se dá snadno počítat a zároveň je dostatečné pro stanovení účinků esenciálního oleje na mortalitu hád'átek. Kapka inokula o objemu 50  $\mu$ l rovněž po zakrytí destičky plastovým víkem vydrží dostatečně dlouho aby bylo možné počet hád'átek přesně stanovit.

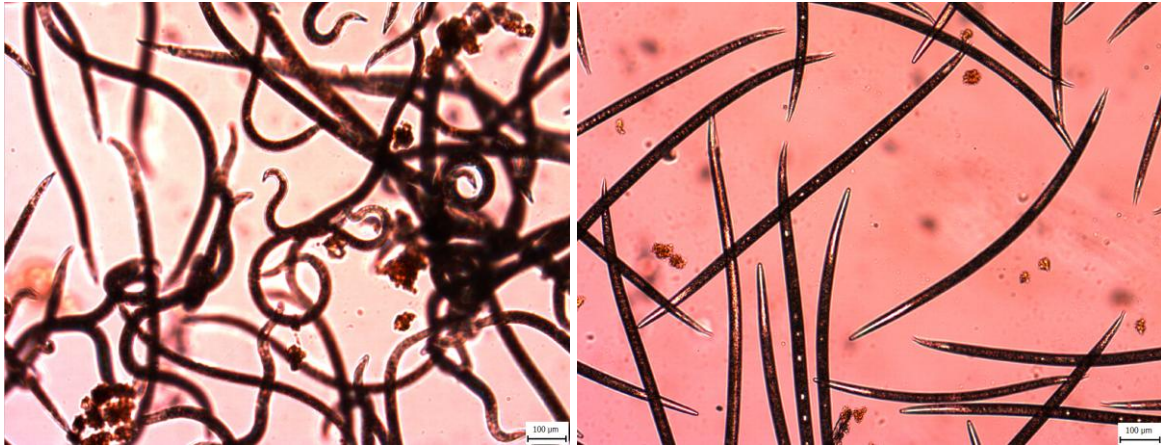
**Obr. 4: plastová destička s jamkami**



Po stanovení počtu hád'átek je do každé jamky pipetován testovaný esenciální olej naředěný na příslušnou koncentraci v objemu 1 ml. V neošetřené kontrolní variantě je k suspenzi hád'átek pipetována pouze voda a detergent. Pro statistické vyhodnocení je nutné každou experimentální variantu založit v minimálně šesti opakováních. Vyhodnocení experimentů je vhodné provést po 4 a 24 hodinách po aplikaci olejů, delší expozice nemá z praktických důvodů význam. Počet

mrtvých hád'átek (Obr. 5) se stanovuje vizuálně pod stereomikroskopem, při pochybnosti o stavu hád'átka je nutná stimulace daného jedince nematologickou jehlou.

Obr. 5: vlevo živí, vpravo mrtví jedinci hád'átka zhoubného



Stanovením počtu mrtvých jedinců získáme % mortality, v případě mortality kontroly nad 5 % je zapotřebí provést korekci mortality příslušné experimentální varianty dle Abbotta (Abbott, 1925) podle vzorce:

$$Pk = \frac{P - P_0}{1 - P_0} \cdot 100$$

kdy Pk je výsledná mortalita po korekci, P mortalita pozorovaná v ošetřené variantě a P<sub>0</sub> mortalita neošetřené kontrolní varianty.

#### Vyhodnocení výsledků in vitro testů

Statisticky významné rozdíly mezi ošetřenými variantami a kontrolou je možné stanovit pomocí analýzy rozptylu. Pro post hoc analýzu lze použít Tukeyho test. Pro hodnocení účinků testovaných esenciálních olejů je dále vhodné stanovit hodnoty LC<sub>50</sub> a LC<sub>90</sub>. Pro tento účel je možné využití metody probitové lineární regrese (Sakuma, 1998).

Příklad stanovení hodnot LC<sub>50</sub> a LC<sub>90</sub> pro hád'átka zhoubné a esenciální olej ze skořicovníku čínského

Při experimentu založeném, vedeném a vyhodnoceném výše uvedeným způsobem byly po 24 hodinách ošetřování suspenze esenciálním olejem z kůry skořicovníku cejlonského (*Cinnamomum zeylandicum*) stanoveny následující hodnoty mortality hád'átka zhoubného (*Ditylenchus dipsaci*):

	mortalita v %					
koncentrace es. oleje	1. opakování	2. opakování	3. opakování	4. opakování	5. opakování	6. opakování
1000 ppm	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
500 ppm	100,00	98,04	100,00	98,28	100,00	95,52
250 ppm	70,83	54,55	77,27	79,37	56,10	63,89
125 ppm	9,52	10,34	5,71	5,77	21,74	20,00
kontrola	6,06	6,12	4,55	3,57	3,39	8,77

Z tabulky je patrné, že mortalita v některých opakováních u kontrolní varianty přesáhla 5 %. Průměr mortality 6 opakování činil v kontrole 5,41 %, proto je nutné provést korekci mortality v pokusných variantách dle Abbotta. Transformované hodnoty jsou následující:

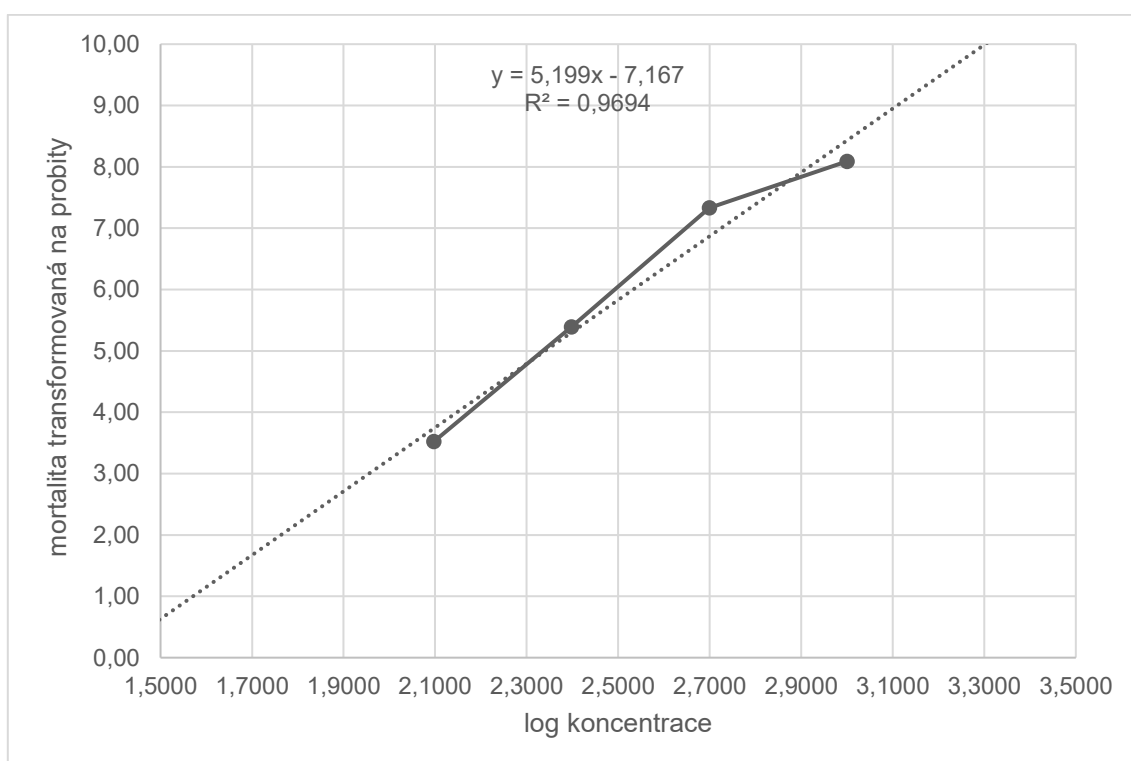
	mortalita v %						
koncentrace es. oleje	1. opakování	2. opakování	3. opakování	4. opakování	5. opakování	6. opakování	Průměr
1000 ppm	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
500 ppm	100,00	97,93	100,00	98,18	100,00	95,27	98,56
250 ppm	69,17	51,95	75,97	78,18	53,59	61,82	65,11
125 ppm	4,35	5,22	0,32	0,38	17,26	15,42	7,16
kontrola	6,06	6,12	4,55	3,57	3,39	8,77	5,41

Průměrné korigované hodnoty mortality jsou dále převedeny na probity, pro převod je možné využít transformační tabulku (Finney, 1952) či provést přepočít pomocí statistického softwaru nebo webové aplikace. Mortalita vyjádřená v probitech je pak přiřazena k hodnotám testovaných koncentrací esenciálního oleje převedených na dekadický logaritmus:

Metodika testování rostlinných esenciálních olejů jako prostředku ochrany rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům

log koncentrace	mortalita 24h probit
3,0000	8,09
2,6990	7,33
2,3979	5,39
2,0969	3,52

Následuje vyjádření vztahu koncentrace a mortality pomocí grafu a rovnice probitové lineární regrese (Sakuma, 1998), pro účely tohoto výpočtu je možné použít např. aplikaci Excel:



Z vypočteného koeficientu determinace ( $R^2 = 0,9694$ ) je patrné, že vypočtený model popisuje dobře vztah mezi proměnnými a hodnoty závisle proměnné (koncentrace  $LC_{50}$  a  $LC_{99}$ ) lze tedy vypočítat přesně. Výpočet hodnot  $LC_{50}$  a  $LC_{99}$  provedeme dosazením hodnot probitů pro mortalitu 50 % resp. 99 % do vypočteného modelu (probit 5, resp. 7,33) kdy za y dosadíme logaritmus hodnoty probitu cílené mortality a výpočtem x získáme logaritmus potřebné koncentrace:

Metodika testování rostlinných esenciálních olejů jako prostředku ochrany rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům

log ppm LC 50	log ppm LC 99
2,340257742	2,78842085

Posledním krokem výpočtu je odlogaritmování získaných koncentrací, čímž získáme požadované hodnoty LC<sub>50</sub> a LC<sub>99</sub> v ppm:

ppm LC 50	ppm LC 99
<b>211</b>	<b>612</b>

### Závěr

Na základě experimentálně získaných dat o mortalitě jedinců hád'átka zhoubného ošetřovaných esenciálním olejem z kůry skořicovníku ceylonského byly pro tento druh fytoparazitického hád'átka a esenciální olej stanoveny hodnoty LC<sub>50</sub> 211 ppm a LC<sub>99</sub> 612 ppm.

### Poloprovozní experimenty

Výsledky získané pomocí in vitro testů je nezbytné ověřit v poloprovozních podmínkách. To je např. u česneku jako v ČR nejvýznamnějšího hostitele hád'átka zhoubného možné provést mořením napadené sadby.

Experiment lze realizovat následujícím způsobem:

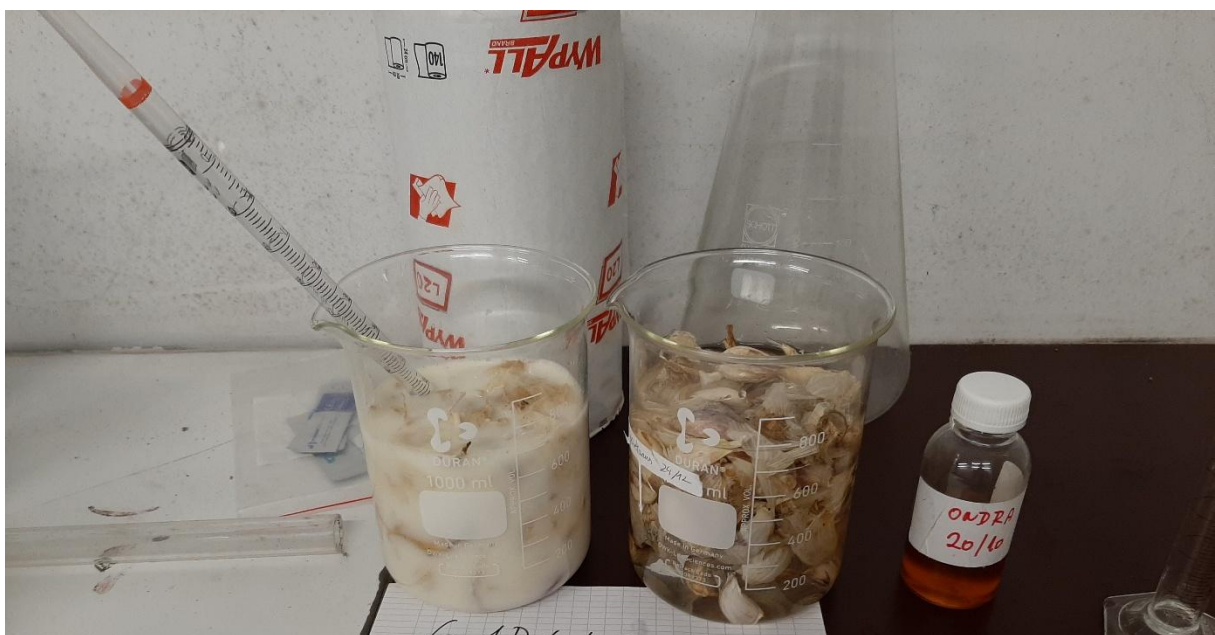
- promíchat a navážit 50 g rozdružených stroužků česneku libovolné odrůdy přirozeně zamořených hád'átkem zhoubným
- za pomoci detergentu a vody naředit rostlinný esenciální olej na testovanou koncentraci stanovenou v in vitro testech
- stroužky česneku umístit do plastové či skleněné nádoby a zalít naředěným esenciálním olejem tak aby byly všechny ponořeny (Obr. 6)
- doba moření závisí na výsledcích in vitro testů, maximálně by ale měla činit 24 hodin
- po ukončení moření stroužky česneku vyjmout a ponechat česnek zaschnout na filtračním papíru

Metodika testování rostlinných esenciálních olejů jako prostředku ochrany rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům

- česnek vysadit do pěstebního substrátu, pro tento účel se osvědčila směs 50 kg jemného bílého písku, 25 kg říčního písku s 15 l zeminy a přidavkem 360 g hnojiva Osmocote promíchaná v míchačce na beton (Obr. 7)
- česnek pěstovat 3 měsíce v květináčích v řízených podmínkách skleníku při teplotě 21 °C, potom rostliny jemně vyjmout ze substrátu, omýt a osušit (Obr. 8)
- česnek homogenizovat krájením na plátky o tloušťce cca 3 mm a podrobit extrakci pomocí modifikované Baermannovy nálevkové metody, extrakce by měla probíhat 24 hodin
- počet hád'átek stanovit vizuálně počítáním pod stereomikroskopem v suspenzi získané extrakcí (Obr. 9) a přepočítat množství jedinců na 1 g pletiva
- v případě silně zamořeného česneku lze provést orientační stanovení počtu hád'átek, tj. stanovit průměrný počet v menším objemu suspenze (např. 10 kapek po 50  $\mu$ l) a přepočítat na celkový objem suspenze
- provést porovnání s negativní kontrolní variantou ošetřovanou 24 hodin pouze vodou s detergentem a pěstovanou stejným způsobem jako česnek ošetřený esenciálním olejem

Účinnost moření lze vyjádřit jednoduše v % kdy počet hád'átek v kontrolní variantě považujeme za 100 %.

**Obr. 6: ošetřování česneku roztokem esenciálního oleje; vlevo pokusná varianta, vpravo negativní kontrola**



Metodika testování rostlinných esenciálních olejů jako prostředku ochrany rostlin proti  
fytoparazitickým hád'átkům

**Obr. 7: pěstební substrát pro poloprovozní testy**



**Obr. 8: experimentální rostliny česneku před extrakcí**



Obrázek 9: suspenze hád'átek patrná po extrakci jako bílý zákal na dně kádinek



### Testy fytotoxicity

Řada rostlinných esencí vykazuje fytotoxické účinky. Z tohoto důvodu je vhodné, aby na poloprovozní testy navázaly experimenty ověřující absenci negativních účinků aplikovaných esenciálních olejů na životaschopnost osiva a sadby. V případě česneku jsou testy obdobné testům poloprovozním, po ošetření lze stimulovat klíčení česneku ponořením sadby do vlažné vody (37 °C) po dobu jedné hodiny a potom stroužky vysadit do pěstební nádoby. Klíčivost je vhodné zaznamenávat v týdenním intervalu a provést srovnání s neošetřenou kontrolní variantou.

### Srovnání „novosti postupů“

Metodika popisuje postupy pro testování rostlinných esenciálních olejů jako prostředku ochrany rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům v in vitro podmínkách a poloprovozních testech. Informace uvedené v metodice jsou pro Českou republiku nové a nebyly dosud v češtině v této formě a rozsahu publikovány.

## Popis uplatnění schválené metodiky

Metodika je určena pro organizace podílející se na vývoji alternativních prostředků ochrany rostlin. Možnosti přímé ochrany zemědělských plodin i okrasných rostlin proti fytoparazitickým hád'átkům jsou velmi omezené, konvenční nematocidy se v ČR momentálně téměř nepoužívají. Z těchto důvodů je zapotřebí zkoumat nové možnosti ochrany a nadějně je zejména právě použití rostlinných esenciálních olejů, z nichž některé vykazují na hád'átka silnou účinnost.

Výsledek byl financován z projektu institucionální podpory MZe na rozvoj Národního centra zemědělského a potravinářského výzkumu, v.v.i., č. rozhodnutí RO0425.

## Ekonomické aspekty

Ekonomické dopady využití metodiky nelze přesně kvantifikovat, jelikož závisejí na frekvenci výskytu hád'átek v dané vegetační sezóně. Přítomnost volně žijících druhů je závislá na klimatických podmínkách, kdy zejména deštivé počasí v začátku vegetace infekci rostlin hád'átky podporuje. Lze však uvést příklad z produkce česneku jakožto v podmínkách ČR významné cibulové zeleniny; tato plodina se včetně malopěstitelů pěstuje v posledních letech na výměře cca 500 ha a hád'átko *Ditylenchus dipsaci* je jejím klíčovým škůdcem. Při průměrném hektarovém výnosu 5 t činí produkce v ČR cca 2 500 t/rok. Maloobchodní cena česneku činí cca 200 Kč/kg, tržby pěstitelů česneku tak představují cca 500 mil Kč/rok. Pokud kalkulujeme s 10 % ztrátami na výnosu způsobenými hád'átkou a jejich redukcí aplikací výsledků dosažených postupy popsány v této metodice o 10 % dojde k omezení ztrát tržeb pěstitelů česneku o 5 mil Kč/rok.

## Seznam použité související literatury

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- An, R., Karthik, N. K., Grewal, P. (2017). Evaluation of botanical and chemical products for the control of foliar nematodes *Aphelenchoides fragariae*. *Crop Protection*, 92, 107-113.
- Baermann, G. (1917). Eine einfache methode zur auffindung von *Ancylostomum* (Nematoden) larven in erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Ned. Indie*, 57, 131-137.
- EPPO (1984): Hydrogene Fumigation of Bulbs, Rhizomes and Tubers to Control *Tarsonemus* spp. and *Ditylenchus* spp. (French Method. European and Mediterranean Plant Protection Organization standard PM 3/10(1), 1 pp.
- Finney, D. (1952). Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve, Cambridge University Press, Cambridge.
- Gratwick M., Southey J.F. (1972) Hot-water treatment of plant material. *Bulletin, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food* 201, 46 pp.
- Insunza V.B., Valenzuela A.A. (1995): Control of *Ditylenchus dipsaci* on garlic (*Allium sativum*) with extracts of medicinal plants from Chile. *Nematropica*, 25: 35–41.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., Kikuchi A., Manzanilla-Lopez R., Palomares-Rius J.E., Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 14(9), 946-961.
- Perry, R. N., Hunt, D. J., Subbotin, S. A. (Eds.). (2020). *Techniques for work with plant and soil nematodes*. Cabi, 290 s.
- Sakuma, M. (1998). Probit analysis of preference data. *Applied entomology and zoology*, 33(3), 339-347.
- WWW1: [https://www.agromanual.cz/cz/atlas/skudci/skudce/hadatko-jahodnikove?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.agromanual.cz/cz/atlas/skudci/skudce/hadatko-jahodnikove?utm_source=chatgpt.com)
- Zouhar, M., Douda, O., Lhotský, D., Pavela, R. (2009). Effect of plant essential oils on mortality of the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*). *Plant Protection Science*, 45(2), 66-73.
- Zouhar, M., Douda, O., Dlouhý, M., Lišková, J., Maňasová, M., Stejskal, V. (2016). Using of hydrogen cyanide against *Ditylenchus dipsaci* nematode present on garlic.

## Seznam publikací, které předcházely metodice

- Douda O., Zouhar M., Lišková J., Vavříčková J., Dlouhý M. (2015). Aplikace plynného kyanovodíku pro ošetřování sadby, osiva a skladovaného rostlinného materiálu za účelem eradikace hád'átka *Ditylenchus dipsaci*. Certifikovaná metodika, 36 s., ISBN 978-80-7427-174-8.
- Douda O., Doudová E., Holý K. (2024). Hád'átka a hlístice v ochraně rostlin (Rostlinolékařská nematologie). Certifikovaná metodika, 65 s., ISBN – 978-80-7427-419-0.
- Zouhar, M., Douda, O., Lhotský, D., Pavela, R. (2009). Effect of plant essential oils on mortality of the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*). Plant Protection Science, 45(2), 66-73.
- Douda, O., Zouhar, M., Maňasová, M. (2022): Effect of plant essential oils on the mortality of *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) nematode under in vitro conditions. Plant, Soil and Environment. 68(9): 410–414.

## Přílohy ke schválené metodice

**uzavřená smlouva** s: Zelinářskou unií Čech a Moravy

**nezávislé oponentní posudky:**

1 posudek odborníka z daného oboru, zpracoval: Mgr. Vladimír Půža, Ph.D.

1 posudek ze státní správy zpracoval: Ing. Václav Čermák, Ph.D.