

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ  
ZAHRADNICKÁ FAKULTA V LEDNICI



**VLIV APLIKACE ROSTLINNÝCH EXTRAKTŮ NA  
ZDRAVOTNÍ STAV PIWI ODRŮD**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracoval:  
Bc. Filip Radkovský

Vedoucí diplomové práce:  
doc. Ing. Pavel Pavloušek Ph.D.

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Bc. Filip Radkovský**  
Studijní program: Zahradnické inženýrství  
Obor: Řízení zahradnických technologií  
Název tématu: **Vliv aplikace rostlinných extraktů na zdravotní stav PIWI odrůd**  
Rozsah práce: 50 stran

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte a zpracujte literární údaje týkající se rostlinných elicitorů v ochraně révy vinné proti houbovým patogenům.
2. Založte nádobový pokus se studiem působení rostlinných extraktů na aktivaci obranných reakcí proti plísni révy (*Plasmopara viticola*).
3. Proveďte umělou inokulaci patogena a vyhodnoťte napadení.
4. Výsledky statisticky zpracujte.
5. Formulujte praktická doporučení.


Seznam odborné literatury:

1. *American Journal of Enology and Viticulture*. ISSN 0002-9254.
2. *Code of good organic viticulture and wine making*. Openheim: ECOVIN, 2009.
3. *Vitis – Viticulture and Enology Abstracts*. ISSN 0175-8292.
4. HOFMANN, U. – KÖPFER, P. *Biologischer Weinbau*. Stuttgart: Eugen Ulmer, 2014. 384 s. ISBN 978-3-8001-7977-0.
5. *Der Deutsche Weinbau*. ISSN 0944-3177.
6. PREUSCHEN, G. *Der ökologische Weinbau : Ein Leitfaden für Praktiker und Berater*. 6. vyd. Heidelberg: Verlag C.F.Müller, 1994. 272 s. Alternative Konzepte. ISBN 3-7880-7473-6.
7. MAIER, I. *Praxisbuch Bioweinbau : erfolgreich, zukunftsorientiert, qualitätssichernd*. Leopoldsdorf bei Wien: avBUCH, 2005. 128 s. ISBN 3-7040-2090-7.


Datum zadání diplomové práce: březen 2015

Termín odevzdání diplomové práce: duben 2016

L. S.

  
**Bc. Filip Radkovský**  
Autor práce

  
**doc. Ing. Pavel Pavloušek, Ph.D.**  
Vedoucí práce

  
**doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.**  
Vedoucí ústavu



  
**doc. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.**  
Děkan ZF MENDELU

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Vliv aplikace rostlinných extraktů na zdravotní stav PIWI odrůd“ vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity o tom, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu náklad spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne

.....  
Filip Radkovský

## **Poděkování**

Tímto děkuji doc. Ing. Pavlu Pavlouškovi Ph.D. za odborné vedení práce a cenné rady, dále panu Ing. Michalovi Kumštovi za jeho odborné rady a pomoc při laboratorních měřeních. V neposlední řadě děkuji rodině a přítelkyni za podporu.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>10</b>
3.1	Ochrana révy vinné v režimu ekologického vinohradnictví .....	10
3.2	PIWI odrůdy.....	11
3.2.1	Vlastnosti PIWI odrůd.....	13
3.2.2	Legislativa PIWI .....	14
3.2.3	PIWI odrůdy pěstované v ČR.....	15
3.3	Hlavní houbové choroby .....	15
3.3.1	Plíseň révová (Plasmopara viticola).....	15
3.3.2	Padlí révové (Erysiphe necator) .....	16
3.3.3	Plíseň šedá (Botrytis cinerea).....	17
3.4	Aktivní obranné mechanismy révy vinné .....	19
3.4.1	Hypersenzitivní reakce .....	19
3.4.2	Fytoalexiny .....	19
3.4.3	Stilbeny.....	20
3.4.4	Resveratrol .....	20
3.4.5	Piceid .....	22
3.4.6	PR-proteiny .....	22
3.4.7	Systémově získaná rezistence – SAR.....	23
3.5	Rostlinné extrakty .....	24
3.5.1	Rostliny používané pro výrobu rostlinných extraktů .....	25
3.6	Možnosti přípravy rostlinných extraktů .....	28
3.6.1	Extrakty .....	28
3.6.2	Kvasný výluh.....	29
3.6.3	Odvar z rostlin.....	29
3.6.4	Nálev z rostlin .....	30
<b>4</b>	<b>Materiál a metody.....</b>	<b>31</b>
4.1	Schéma pokusu.....	31
4.2	Charakteristika stanoviště .....	32
4.2.1	Klimatické podmínky stanoviště v roce 2015 .....	32
4.3	Používané odrůdy.....	33
4.3.1	Hibernal .....	33
4.3.2	Malverina .....	34
4.4	Použité prostředky.....	35
4.4.1	Kouzlo přírody Réva vinná – Agrobio Opava .....	35
4.4.2	Kouzlo přírody Protekt – Agrobio Opava .....	35
4.4.3	HF-Mycol .....	35
4.4.4	Alginure.....	36
4.5	Agrotechnické podmínky, ochrana .....	36
4.6	Sběr vzorků .....	37
4.7	Analytické hodnocení.....	38
4.7.1	Spektrofotometrické hodnocení .....	39
4.7.2	Metoda HPLC – stanovení stilbenů .....	41
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>43</b>
5.1	Souhrnná statistika a vyhodnocení.....	43
5.2	Celkové fenolické látky.....	44
5.3	Antiradikálová aktivita a redukční síla .....	45
5.4	Stanovení flavanolů.....	46

5.5	Charakteristika profilu stilbenů.....	47
5.6	Souhrn výsledků.....	51
<b>6</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Shrnutí.....</b>	<b>56</b>
8.1	Klíčová slova.....	56
<b>9</b>	<b>Summary.....</b>	<b>57</b>
9.1	Key words .....	57
<b>10</b>	<b>Seznam obrázků.....</b>	<b>58</b>
<b>11</b>	<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>58</b>
<b>12</b>	<b>Seznam grafů.....</b>	<b>58</b>
<b>13</b>	<b>Zdroje.....</b>	<b>59</b>

# 1 Úvod

Šlechtěné (kulturní) rostliny nemají schopnost vytvářet obranné látky v takové míře, jak je tomu u planých (nešlechtěných) rostlin. Tvorba těchto látek je podmíněna geneticky, avšak vlivem jednostranného šlechtění, zaměřeného na kvalitu a množství produkce, je téměř potlačena. Až v několika posledních desetiletích se snaží šlechtitelé rostlinám tvorbu těchto látek navrátit, a tím je učinit odolnějšími. Typickým druhem takového křížení jsou například PIWI odrůdy u révy vinné.

Botanické přípravky na ochranu rostlin se začaly používat zejména v době, kdy se zvětšovaly plochy, na kterých lidé pěstovali své kulturní rostliny. V důsledku rozšiřování polnohospodářství lidé nestačili redukovat patogeny mechanicky, začali proto využívat ve velké míře léčivé rostliny. Účinky léčivých rostlin jim byly do jisté míry známy, protože je používali pro léčení vlastních chorob. (PAVELA, 2006)

V dnešní době chemické koncerny vyrábí velké množství syntetických pesticidů, insekticidů, herbicidů a fungicidů, což má za následek ničení agroekosystémů, znečištění vody, snížení biodiverzity a v neposlední řadě negativní účinek na zdraví člověka, a to zejména z hlediska výskytu civilizačních chorob 21. století. V zásadě nic co by se dalo nazývat **udržitelným rozvojem**.

Z těchto důvodů sílí tlak na používání ekologicky přátelských přípravků. Mnohé studie ukazují bio přípravky, které jsou stejně účinné jako syntetické chemické přípravky. Vinaři, hospodařící v režimu bio, jsou zvýhodňováni dotacemi, což vede k nárůstu vinic obhospodařovaných v ekologickém režimu. Moderní ochrana révy vinné je založená zejména na prevenci, tedy na kvalitně provedených zelených pracích, signalizaci a prognóze, vyvážené výživě apod. Což vede k posilování vlastních obranných mechanismů révy vinné v boji proti houbovým patogenům. Celkově pak dochází ke zlepšení zdravotního stavu révy vinné.

*„Pro všechny škůdce, co ze země vzchází, země protijed vytváří“*



## **2 Cíl práce**

Hlavním cílem práce je zjistit, jaký vliv mají rostlinné extrakty na kvalitu PIWI odrůd, ve srovnání s běžně dostupnými ekologickými přípravky v režimu bio.

Dalším cílem je nashromáždit vědecké publikace týkající se odolnosti révy vinné proti houbovým chorobám a jejich rezistence. Popsat léčivé rostliny, které se používají pro výrobu rostlinných extraktů a ekologických preparátů pro ochranu révy vinné. Najít vhodnou literaturu o přípravě rostlinných extraktů a jejich účinných látkách.

Cílem práce je statistické vyhodnocení účinnosti jednotlivých přípravků na intenzitu napadení houbovými patogeny a jejich vliv na kvalitu hroznů testovaných odrůd a variant. Stěžejní cíl práce je účinek jednotlivých přípravků na hromadění množství polyfenolických látek v hroznech a stilbenech v listech.

Závěrem je shrnutí nashromážděných informací a doporučení pro vinohradnickou praxi.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Ochrana révy vinné v režimu ekologického vinohradnictví

*Vitis vinifera* spp. Je jednou z nejstarších kulturních rostlin, která má obrovský hospodářský význam. Zaujímá bezmála 7,4 milionu hektarů po celém světě (FAOSTAT, 2008). Nicméně podíl ekologicky pěstované révy vinné není nijak vysoký, ale neustále roste. Konvenční zemědělské systémy v menší či větší míře narušují biodiverzitu lokálních ekosystémů. Alternativou se stává ekologické vinohradnictví.

Organické vinohradnictví je bráno jako systém, ve kterém jsou uplatňovány postupy ekologického zemědělství s cílem dosáhnout co nejvyšší kvality za použití minimálních chemických prostředků. Ekologické vinohradnictví je specifický systém managementu produkce, s cílem zlepšit zdraví agroekosystémů, podporovat biodiverzitu a biologickou aktivitu půdního edafonu. Organicky pěstované hrozny jsou definovány směrnicemi EU 834/2007 a 889/2008 o ekologické produkci a označování ekologických produktů podle obecným směrnic EU pro výrobu vína 479/2008 definující sklepní technologie. (TRIOLI 2009)

Organické vinohradnictví respektuje přírodní systémy a cykly, zachovává a zlepšuje zdraví půdy, vody, rostlin a živočichů a rovnováhu mezi nimi. Přispívá k vysoké úrovni biologické rozmanitosti a odpovědným způsobem využívá energii a přírodní zdroje, jako je voda, půda, organická hmota a vzduch. (HLUCHÝ 2011) Ekologické vinohradnictví je zaměřené na používání přirozených procesů a recyklace jak v oblasti produkce potravin, tak v oblasti kontroly chorob, škůdců a plevelů. Na ekologickou vinici se díváme jako na integrovaný systém konverze sluneční energie, půdních živin a vody do hroznů, s tím, že konečný produkt reflektuje lokální podmínky – terroir. Všechny prvky ekologického vinohradnictví jsou převáděny s cílem maximalizace kvality a zdravotního stavu ekologicky vyprodukovaných hroznů. Ty jsou pak základním vstupem při výrobě biovína. (TRIOLI 2009)

Ekologický systém ochrany révy je v mnoha ohledech stejně účinný jako integrovaný systém produkce. Za pomoci využití matení obalečů pomocí feromonů, spouštění přirozené obranyschopnosti révy přírodními elicitory, využívání jednoduchých přípravků na bázi bylinných extraktů a olejů. Zároveň s těmito přípravky a postupy jsou využívány fungicidy na bázi mědi a síry, které jsou povoleny

v organickém vinohradnictví. Jejich použití je ovšem omezeno nařízením (HLUCHÝ 2011)

Základem kvalitní přímé ochrany je **prognóza a signalizace** plísně révy. Signalizace zahrnuje přesné určení termínu nejvhodnějšího pro ochranný zásah proti určitým škodlivým činitelům v daném vinohradu. Součástí signalizace je i doporučení dostupného druhu přípravku, dávky, koncentrace apod. Signalizace je nedílnou součástí prognózy. Stanovení prognózy a signalizace vychází z poznatků o bionomii škodlivého činitele, z využívání agronomických znalostí i poznatků jednotlivých vědních oborů, jako jsou meteorologie, klimatologie, statistika a půdoznalství. (JAROSLAV ROŽNOVSKÝ 1999). Pro přímou ochranu révy se používají tyto metody: metoda Slovenského hydrometeorologického ústavu Bratislava, metoda Ing. A. Mušky a program GalatiVitis. (NEČAS 2006) Program Galati vyhodnotí infekční tlak peronospor, padlí a plísně šedé, termín postřiku a výběr přípravků. To vše určí na základě informace o počasí (průměrné teploty a srážek) a také např. o ošetření z předchozího týdne a předpokládané fenofáze. Program zohledňuje citlivost odrůd, klima a citlivost polohy vinohradu. (VANEK 1996)

Alternativou systému Galati je německá verze s názvem Vitimeteo. Vitimeteo je prognostický systém pro ochranu révy vinné proti houbovým chorobám. Mapuje údaje o počasí z různě rozmístěných meteorologických stanic (Popice, Kobylí, Velké Bílovice, Hysly a Mikulov). Tyto údaje jsou přenášeny několikrát denně na server Vitimeteo, kde jsou ihned modelově zpracovány a umístěny na internet, kde si je může pěstitel kdykoliv otevřít a zjistit fázi infekčního tlaku.

Pro optimalizaci množství použité mědi při napadení révy houbovou chorobou je vhodný systém Coptimizer. Slouží jako pro podporu rozhodování, model je navržen tak, aby vedl vinohradníky k optimalizaci a sledování využívání fungicidů na bázi mědi, jelikož je stanovená maximální možná aplikace mědi na rok. Systém tedy počítá s limitem 3 kg mědi na hektar za rok. (Kuflik, Prodorutti et al. 2009)

### **3.2 PIWI odrůdy**

Už od pradávna se lidé potýkají při pěstování kulturních rostlin s různými patogeny, které dovedou svým působením zničit celou úrodu. Kulturní rostliny si bohužel nezachovaly schopnost vytvářet obranné látky proti celé řadě chorob a škůdců jako plané rostliny. V několika posledních desetiletích se šlechtitelé pokouší rostlinám

tuto ztracenou obrannou vlastnost vrátit. Vznikají tak nové hybridy – PIWI (pilzwiderstandsfähige Rebsorten)

V druhé polovině 19. století byla z amerického kontinentu zavlečena do Evropy mšička révokaz (*Dactulosphairavitifoliae* Fitch), plíseň révy (*plasmopara viticola*) a padlí révy (*Eryshipe necator*). Následkem toho byla zdecimována téměř veškerá plocha vinic v Evropě. K prvnímu napadení *Vitis vinifera* spp. na evropském kontinentu došlo v Bordeaux a rychle se rozšířilo do celé Evropy.

Šlechtitelé museli vymyslet „ideální révu“, která těmto patogenům odolá. V roce 1878 formuloval francouzský vědec Alexis MILLARDET základní myšlenku o šlechtění révy vinné. Cílem této myšlenky bylo spojení rezistentních vlastností amerických divokých druhů *Vitis* spp. s evropskou *Vitis vinifera* L. Odborníci však byli skeptičtí, protože americká *Vitis* spp. nebyla podle nich tak kvalitní jako ta evropská, protože nedosahovala požadované kvality vína. Z franko-amerických hybridů byly použity geny jako zdroje rezistence v neošlechtěných odrůdách. Do šlechtění se zapojil celosvětový genový fond. Rozmanitost genofondu umožňuje spojovat v jednom genotypu vlastnosti, které byly vytvořeny v průběhu evoluce v různých ekologicko-geografických skupinách. (MAGHRADZE, FAILLA ET. AL. 2009)

Prvních významnějších úspěchů dosáhl v roce 1934 šlechtitel B. Seyve – Villard. Villard křížil mezi sebou hybridy získané A. Seiblem, ve kterých byl velmi pestrý americký a evropský genom mnoha druhů *Vitis* spp. Takto získané hybridy byly nazývány francouzské přímoplodé hybridy druhé generace. Přímoplodé hybridy druhé generace se rozšířily ve Francii, zejména *Villard blanc* a *Villar noir*.

Hybridy se staly výchozím materiálem pro šlechtění moderních odolných odrůd, které nazýváme interspecifické (rezistentní, PIWI). Někdy je křížení složitější, ale hned několik z interspecifických odrůd vzniklo přímo křížením některého francouzského přímoplodého hybridu s *Vitis vinifera*. Takto získané hybridy splňují požadavky na vysokou kvalitu vína s odolností natolik, že bývají registrovány jako botanický druh *Vitis vinifera* spp., Důvodem je splnění nařízení Evropské komise č. 1493/1999, článek 19, paragraf 3, který umožňuje vyrábět jakostní vína pouze z odrůd, které náleží k botanickému druhu *Vitis vinifera*. U nás tak byl registrován například Hibernál (Seibel 7053 x Ryzlink rýnský klon 239 Gm - F2) a Sevar (Seyve Villard 12/58 F1 x Svatovavřínecké 116/55 F1), v Německu Regent (Diana (Sylvánské zelené x Müller-Thurgau) x Chambourcin). Pro šlechtění se dnes nejčastěji využívají odrůdy Villard

blanc, Seibel 13 666 (S 13 666), Villard noir a další. FPH jsou tedy dnes základním zdrojem odolnosti rezistentních odrůd.

Postupně vznikala nová skupina odrůd nazývaná jako interspecifické. Mezi nimi je velké množství odrůd, které dávají velmi kvalitní hrozny, ideální pro výrobu vysoce jakostních vín, ale také mnoho zajímavých stolních odrůd. Interspecifické odrůdy mají zvýšenou obranyschopnost proti houbovým patogenům, proto se používají většinou v ekologickém vinohradnictví, nebo v integrované produkci. Což vede ke snižování dalších vstupů při ochraně révy vinné proti houbovým patogenům.(KRAUS 2003). Největší rozmach ve šlechtění interspecifických odrůd (mezidruhových odrůd) byl zaznamenán v 90. letech 20. století, kdy bylo registrováno mnoho nových odrůd, a to zejména v Německu, Rakousku, Maďarsku, Jugoslávii a ČR. Křížení se stalo zajímavým hlavně pro okrajové a severněji položené vinohradnické oblasti.

### 3.2.1 Vlastnosti PIWI odrůd

Piwi odrůdy mají nižší ekonomické nároky na pěstování, vyžadují méně agrotechnických zásahů než původní evropské odrůdy révy vinné. Z hlediska vyšší odolnosti interspecifických odrůd proti houbovým chorobám je dosaženo nízké aplikace antifungicidních přípravků, což vede k šetrnějšímu způsobu pěstování, na který je v posledních letech kladen velký důraz. Rezistentní odrůdy jsou pěstovány v ekologických agroekosystémech, kde je zákonem daná maximální aplikace síry a mědi na určitý výměr hektaru. Křížením evropské *vitis spp.* s asijskou *vitis amurensis* je dosaženo vyšší mrazuvzdornosti. (Gastol 2015) Díky těmto mrazuvzdorným vlastnostem se tak hodí pro pěstování v chladnějších klimatických oblastech. (SLEGERS, 2015)

Velkou dobu panovala skepse z používání interezistentních odrůd z hlediska kvality vyráběného vína. PIWI odrůdy se považovaly za méně kvalitní oproti klasické *vitis vinifera spp.*, a to zejména z hlediska jejich aromatického profilu, který je důležitým aspektem při posuzování finálního produktu – vína. Aroma je výsledkem složitých chemických reakcí poskytující specifické senzorycké vlastnosti kultivarů. (EBELER, 2009)

Tuto teorii však vyvrací (GHASTE, 2015), který srovnává aromatický profil deseti kultivarů *vitis vinifera*, *vitis candia* a mezidruhových kříženců. Byl zjištěn poměrně stejný obsah aromatických látek ve *vitis vinifera spp.* s mezidruhovými kříženci. (NARDUZZI, 2015) uvádí, že americké druhy mají vyšší obsah stilbenů

a antokyanů, ale téměř netvoří aromatické látky jako *vitis vinifera*. Také byla zjištěna tvorba hydrolyzovaných taninů v epidermis divokých amerických druhů.

### 3.2.2 Legislativa PIWI

Interspecifická odrůda jako taková není dle vinohradnické a vinařské legislativy v Evropské unii tolerována. Pro výrobu jakostního vína je povolena pouze *vitis spp.*, druhy patřící do rodu *Vitis*. Podle nařízení Evropské komise č. 1493/1999, čl. 19, § 3, je povolena výroba vína pouze z odrůd, které náleží do rodu *Vitis vinifera*. Při registraci nových rezistentních houbových chorob byly porovnány morfologické a ampelografické znaky s *vitis vinifera*. Interspecifické odrůdy se od té doby mohou řadit do botanického druhu *Vitis vinifera spp.*

Odrůda	2013	2014	Meziroční přírůstek (%)
Hibernal	136,4256	162,0485	18,78
Solaris	26,886	33,1002	23,11
Johanniter	11,2788	15,5983	38,30
Malverina	9,0045	10,1976	13,25
Cabernet Cortis	7,0792	8,1839	15,60
Regent	6,5663	7,4179	12,97
Savilon	5,3343	5,4621	2,40
Laurot	4,4717	5,2222	16,78
Saphira	4,1814	4,5391	8,55
Bianca	3,6003	4,0232	11,75
Merzling	2,893	3,939	36,16
Sevar	2,6162	3,5611	36,12
Phoenix	1,7536	1,9398	10,62
Rinot	1,2524	1,4578	16,40
Helios	1,161	1,3932	20,00
Muscaris	1,0491	1,2911	23,07
Bronner	0,875	1,1156	27,50
Erilon	0,2	0,28	40,00
Nativa	0,1986	0,273	37,46
Kofranka	0,165	0,2322	40,73
Vesna	0,05	0,0889	77,80
Monarch	0,0348	0,0624	79,31
Cerason	0,0222	0,044	98,20
Baron	0,0074	0,0222	200,00
Celkem	223,5061	267,4701	<b>19,67</b>

Tab. 1 Meziroční výměra PIWI odrůd pěstovaných v ČR

### 3.2.3 PIWI odrůdy pěstované v ČR

PIWI odrůdy zaznamenávají v ČR meziroční nárůst cca o 20%. Vedle obecně vhodných podmínek, jako jsou vyšší dotace na plochu a bodové zvýhodnění ekologických vinařů při soutěži o čerpání podpor na modernizaci sklepních technologií, je rozhodujícím faktorem existence vysoce funkční technologie ochrany vinic a péče o půdu. (HLUCHÝ 2011). Piwi odrůdy jsou taktéž více ekonomické a nezatěžují tolik ekosystém jako běžné odrůdy révy vinné, proto se v ČR setkávají se stále větší oblibou u vinařů.

V této skupině je odrůdou s největší výměrou 162 ha Hibernál. Jeho plocha se zvětšila skoro o 19%. Na dalších místech jsou odrůdy Solaris 33 ha - 23%, Malverina, pěstovaná na 10 ha, což je o 13% více než v roce minulém. (viz Tab. 1) Z modrých interspecifických odrůd se nejvíce pěstuje Cabernet Cortis, a to na ploše 8 ha. (ÚKZUZ). Všechny tyto odrůdy jsou zapsané ve Státní odrůdové knize ČR.

## 3.3 Hlavní houbové choroby

### 3.3.1 Plíseň révová (*Plasmopara viticola*)

Původcem je houba *Plasmopara viticola*. Jedná se o obligátního parazita, jehož mycelium se vyvíjí mimobuněčně, haustorium proniká do buňky. Při nepohlavní fruktifikaci tvoří na sporangioforech sporangie. Ve sporangiu se vyvíjí zoospory s dvěma bičíky. (NEČAS 2006)



Obr. 1 Plíseň révová

Jedná se o nejnebezpečnějšího patogena pro všechny evropské vinohradnické oblasti. *Plasmopara viticola* napadá veškeré zelené části keře. Dle stádia napadení patogenem se projevují příznaky jako olejové skvrny na horní, později i na spodní straně listů. Při silném napadení listy hnědnou, sesychají a opadají. Napadená květenství jsou pokryta bílým povlakem mycelia a následně odumírají. Na bobulích se po napadení objevuje modrofialové zbarvení a zasychání bobulí, ty následně kožovatí. Největší infekční tlak je od počátku kvetení do nasazování bobulí. K největším ekonomickým škodám dochází po napadení mladých bobulí, nebo třapiny malých hroznů, má však nepatrný vliv na kvalitu vína. Plíseň révy přezimuje v opadaném listí v podobě oospor. Primární infekci způsobují zoospory, které

se dostávají na povrch listů s kapkami deště. K primárnímu napadení dochází po dovršení určité teplotní sumy, dostatečném provlhčení půdy a listů a vytrvalém dešti.

Za příznivých podmínek dojde ke sporulaci po 4 hod. Pro klíčení zoosporangií a infekci je nezbytné ovlhčení listů a vhodná teplota (optimum 22–25°C). Inkubační doba je nejkratší při teplotách 22–26°C (3,5–4 dny). Infekční perioda (sporulace, klíčení sporangií a infekce) může za vhodných podmínek proběhnout teoreticky za 6, prakticky za 8–10 hod. (FIBL 1999)

Pro minimalizaci napadení patogenem je vhodné zvolit méně citlivé odrůdy, nejlépe odrůdy se zvýšenou rezistencí proti houbovým chorobám – PIWI odrůdy, kvalitně provádět veškeré zelené práce, zachovat vzdušnost keře a podpořit půdní mikroorganismy. Pro přímou ochranu proti plísni révy je vhodné použít přípravky na bázi mědi v různých chemických vazbách (hydroxid, tribazický sulfát, oxychlorid, oxalát, oxid). Maximální použití mědi v ekologickém vinohradnictví je určeno dávkou 6 kg/ha mědi a rok. Přípravky na přímou ochranu proti plísni révy jsou Myco-Sin, Alginure, Laminarin, popřípadě vodné nebo kvasné výluhy léčivých rostlin, jako například kopřivy dvoudomé nebo přesličky rolní.

### 3.3.2 Padlí révové (*Erysiphe necator*)

Z celosvětového hlediska se jedná o nejrozšířenější houbovou chorobu révy vinné. Do Evropy se dostala ze severní Ameriky.

Patogenem je houba *Erysiphe necator*. Padlí révy napadá všechny zelené části keře, letorosty, listy, květenství a především nezralé hrozny. Napadené části porůstá bílé až bílošedé podhoubí, na němž se na konidioforech



Obr. 2 Padlí révové

diferencují konidie. V důsledku poškození a odumírání povrchových pletiv se postižené části zbarvují šedavě, dochází k redukci růstu a k deformacím. Na listech pozorujeme bělavé skvrny nebo plošné povlaky. Napadení na listech se objevuje na horní i spodní straně listové čepele. Na horní straně jsou skvrny světlejší a na spodní stříbrně lesklé. Napadená místa dostávají hnědou až černou barvu. Okraje listů se svinují směrem nahoru. Silně poškozené listy usychají a opadají. (CROPSCIENCE 2012)

Napadená květenství sprchávají, mladé bobule v důsledku nadměrných ztrát vody zasychají. U větších bobulí dochází v důsledku poškození povrchových buněk při



dalším růstu k praskání a dochází k semenným průtržím. Na letorostech vznikají různě utvářené skvrny, které při vyzrávání dřeva tmavnou, až černají. V posledních letech, která byla sušší, bývá padlí révy hospodářsky nejškodlivějším onemocněním révy. Při napadení hroznů dochází k podstatnému snížení množství i kvality sklizně (nižší cukernatost, méně aromatických látek). V mimořádně příznivých letech může dojít u disponovaných výsadeb náchylných odrůd k epidemickému šíření a až k totálnímu znehodnocení sklizně.

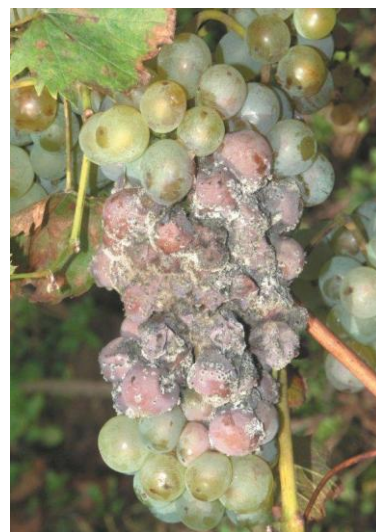
V našich pěstitelských podmínkách nejčastěji přezimuje jako propagule v zimních očkách. Přezimující stádium v zimních očkách je citlivé na teploty nižší než 15°C. (FiBL 1999)

Ke klíčení konidií dochází při teplotách mezi 7 – 31°C při vlhkosti vzduchu mezi 30-100%. K maximální sporulaci a růstu mycelia dochází při teplotě 24-26°C a 90% relativní vlhkosti. Vysoká produkce konidií z této primární infekce iniciuje sekundární šíření nemoci a tím opakování tohoto cyklu, který pokračuje v průběhu vegetačního období. K uvolnění askospor dochází už při srážkách nad 2,5 mm a teplotě 10°C. Vzniklé konidie podporují sekundární šíření nemoci. (CROPSCIENCE 2012)

### 3.3.3 Plíseň šedá (*Botrytis cinerea*)

Původcem plísně šedé je houba *Botrytis cinerea* (anamorfa) a *Botryotinia fuckenalia* (telemorfa). *Botrytis cinerea* je celosvětově rozšířená. Není zcela jasné, proč telemorfa tak rozšířená není. Dospělo se k závěru, že pohlavní rozmnožování může být důležitým zdrojem genetické variability. (CROPSCIENCE, 2012)

Plíseň šedá napadá všechny nadzemní části révového keře, mladé letorosty, listy, květenství, nezralé, dozrávající a zralé hrozny a réví. Škodlivě mohou být napadena květenství a mladé hrozny po odkvětu, stopky a třapiny hroznů v období zaměkání a především



Obr. 3 Plíseň šedá na hroznech

zrající a zralé hrozny. Na letorostech vznikají různě velké vodnaté skvrny, letorosty vadnou. Na listech pozorujeme koncentricky se rozšiřující a od středu zasychající skvrny. Napadená květenství a mladé hrozny nebo jejich části zasychají. Na stopkách a třapinách vznikají drobné hnědozelené až šedohnědé skvrny, které se rozrůstají a nekrotizují. Části pod postiženým místem zavadají a za vlhka, kdy dochází k rychlé

destrukci stopky nebo třapiny, padají. Je třeba dávat pozor na záměnu s abiotickým odumíráním třapiny hroznů, způsobeným nedostatkem vápníku a hořčíku (viz fyziologické poruchy). Na zrajících bobulích vznikají hnilobné skvrny, pokožka praská a odlupuje se. Za sucha napadené bobule mumifikují. Napadené části réví mají světlejší až bělavé zbarvení. Za příznivého počasí se na postižených částech vytvářejí typické šedé porosty konidioforů a konidií. Na letorostech a réví často pozorujeme nápadná černá, různě velká a utvářená sklerocia. (EKOVIŇ, 2011)

Houba přezimuje jako mycelium nebo sklerocia v napadených částech rostliny. Zdrojem infekce proto mohou být napadené letorosty, zbytky hroznů, úponky, zbytky třapin či listů. V aktuálním vegetačním období jsou to infikované listy, zbytky květů a zejména květní čepičky. Za příznivého počasí se tvoří větší množství konidioforů s konidiemi, které jsou pak následně přenášeny větrem nebo rozstříkovány kapkami na zelené rostlinné pletivo. Klíčení konidií probíhá za velmi vysoké vlhkosti a teploty kolem 20-24°C. Po proniknutí do pletiva hostitele dochází k vysokému růstu hyf, které se rozvětvují a vytváří šedé mycelium, na němž se vyvíjí konidiofory s konidiemi. (FiBL, 1999)

*Botrytis cinerea* může napadnout révu vinnou během kvetení. Konkrétně se spory ukládají mezi semeník a květní prstenec. Spory houby jsou zde inhibovány antifungálními sloučeninami, které brání houbě se rozmnožovat. Vlivem růstu a zaměkání bobulí obsah antifungální sloučeniny klesá, což se může projevit rozvojem plísně šedé. Tato forma je latentní. Latentní infekce nemusí vždy vést k rozvoji plísně. Velice záleží na teplotě a vlhkosti. *Botrytis cinerea* často infikuje révu vinnou malými rankami ve tkáni, včetně mikroskopických trhlin v epidermis bobule od hmyzu či jiných fyzických poškození. Klíčení spor je stimulováno cukry a aminokyselinami, které produkují dozrávající bobule. Enzymy produkované plísní šedou nekrotizují rostlinné tkáně ještě před kolonizací, po osídlení houba absorbuje živiny z mrtvé tkáně, zejména poškozené listy, části květu a zralé bobule. (Hill, Beresford et al. 2010)

## 3.4 Aktivní obranné mechanismy révy vinné

### 3.4.1 Hypersenzitivní reakce

Hypersenzitivní reakce na napadení révy vinné patogenem se projevuje po průniku patogenu do rostlinného pletiva, kdy velmi rychle dochází k ohraničené nekrotizaci pletiva. Napadená část listu nekrotizuje a ostatní část listu je funkční, to znamená, že list dále asimiluje. Doba a intenzita obranné reakce na napadení patogenem je odrůdově závislá.



Hypersenzitivní reakce se ve vztahu k plísni révy také projevuje u odrůd z moravského šlechtění, jako jsou Cerason, Savelon nebo Vesna. Je také možné konstatovat, že všechny PIWI odrůdy registrované v České republice vykazují dostatečnou rezistenci k plísni révy. Nekrózou je rostlina schopna zamezit šíření patogenu do zbylých částí keře.

Obr. 4 Hypersenzitivní reakce na listu

### 3.4.2 Fytoalexiny

Fytoalexiny jsou lipofilní látky o nízké molekulární hmotnosti. Nejsou přítomné ve zdravých buňkách, ale jsou rychle syntetizovány a akumulovány v místech stresu, jako součást obranných odpovědí rostlinných buněk. Tento stres může být jak abiotický (UV záření) tak biotický (rostlina napadená patogenem).

Elicitory jsou látky, které se uvolňují do buněk pletiva révy vinné vlivem napadení houbovými patogeny, indukují syntézu nízkomolekulárních látek. Tyto látky jsou aktivní již při velmi nízkých koncentracích. Elicitory indukují syntézu fytoalexinů – rostlinných antibiotik. Fytoalexiny jsou nízkomolekulární obranné antibakteriální a fungicidní látky.

Fytoalexiny jako sekundární metabolity zahrnují zejména stilbeny a polyfenolické látky. Fytoalexiny jsou toxické i pro rostlinné buňky. Po indukci jejich syntéza dosahuje vrcholu a pak je blokována. I tak je u některých genotypů příčinou hypersenzitivní reakce.

### 3.4.3 Stilbeny

Působí v rostlině jako fytoalexiny. Stilbeny mají antibakteriální, insekticidní a alelopatický účinek. Jsou syntetizovány ve chvíli, kdy je rostlina napadená patogenem nebo vlivem abiotického stresu.

Stilbeny mohou působit nejen jako **indukovaná** forma rostlinné obrany, ale také jako obrana **konstitutivní**. Například stilbeny z kůry *Yucca periculosa* přispívají k její odolnosti před útoky hmyzu. (TORRES, 2003) Antifugální povaha je zase činí konstitutivními obrannými látkami v prevenci hniloby dřeva. Rovněž mnoho druhů révy akumuluje stilbeny v neelicitovaných rostlinách, kde hrají roli v resistenci k houbovým chorobám. (BAVARESCO, 1998)

Derivátem stilbenu je resveratrol, účinný přírodní antioxidant. Syntéza stilbenů probíhá šikimátovou dráhou na fenylalanin – fenylypropanoidovou dráhou přes kyselinu skořicovou na stilben. Významná produkce stilbenových fytoalexinů nastává u vinné révy např. po napadení houbovými patogeny nebo působením abiotického stresu. Nejvíce se ve vinné révě vyskytuje resveratrol, ale objevuje se zde i piceid a viniferiny, přičemž jejich množství a zastoupení se liší v závislosti na odrůdě. V případě napadení houbovým patogenem závisí množství resveratrolu i na kmenu plísně, protože některé kmeny dokážou resveratrol v určitém množství degradovat. (Zheng and Wang 2001)

Stilbeny byly nalezeny například u čeledi *Dipterocarpaceae* (dvojkřídláčovitě), *Gnetaceae* (liánovcovité), *Pinaceae* (borovicovitě), *Fabaceae* (bobovitě), *Poaceae* (lipnicovitě), *Cyperaceae* (šáchorovitě) nebo *Vitaceae* (révovitě), konkrétně u *Vitis vinifera* (réva vinná) byly detekovány resveratrol a jeho deriváty (piceid, pterostilben a viniferiny) v listech či bobulích.

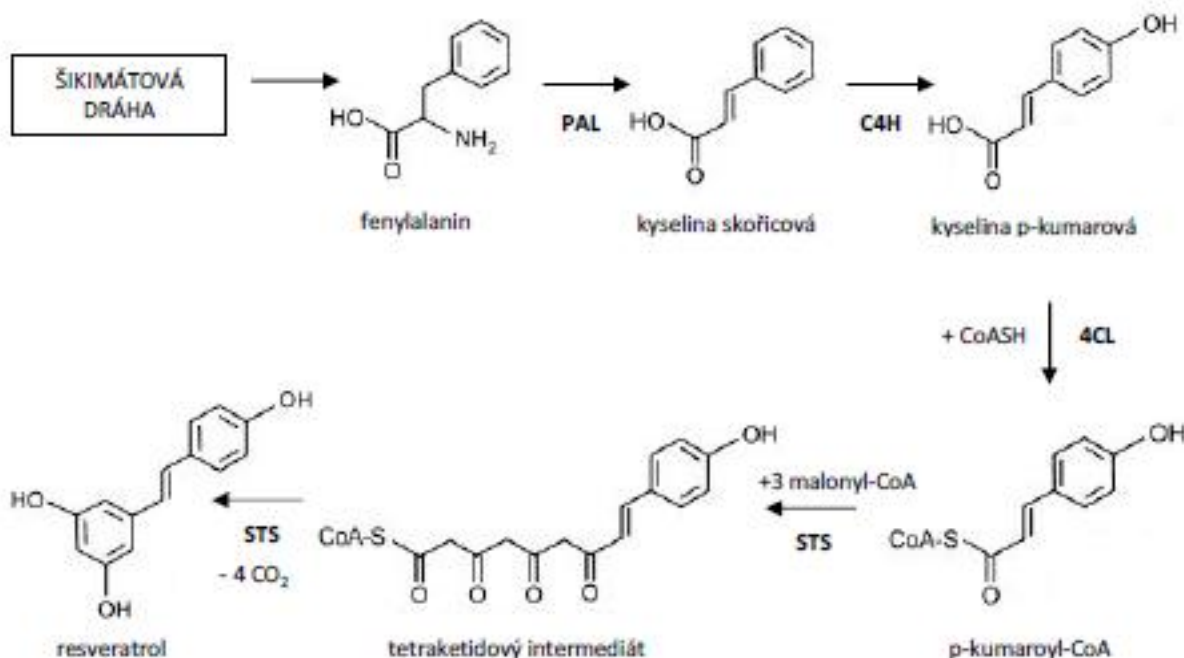
### 3.4.4 Resveratrol

Resveratrol se řadí mezi stilbeny, které obsahují minimálně dvě aromatická jádra tvořící spojený systém. Resveratrol má chemický vzorec (3,4',5- trihydroxystilben,  $C_{14}H_{12}O_3$ ) řadíme jej do skupiny látek označované jako polyfenoly.

Pro tuto skupinu látek je charakteristická přítomnost více OH skupin. Právě množství OH skupin propůjčuje polyfenolickým látkám jejich značný antioxidační význam. Resveratrol je syntetizován mnoha rostlinnými druhy jako odpověď na stres, např. napadení patogenem, vlivem těžkých kovů, UV zářením nebo při poranění. (STECHEER, 2001) Vytváří tzv. resveratrolovou bariéru, která ji chrání před oxidačními

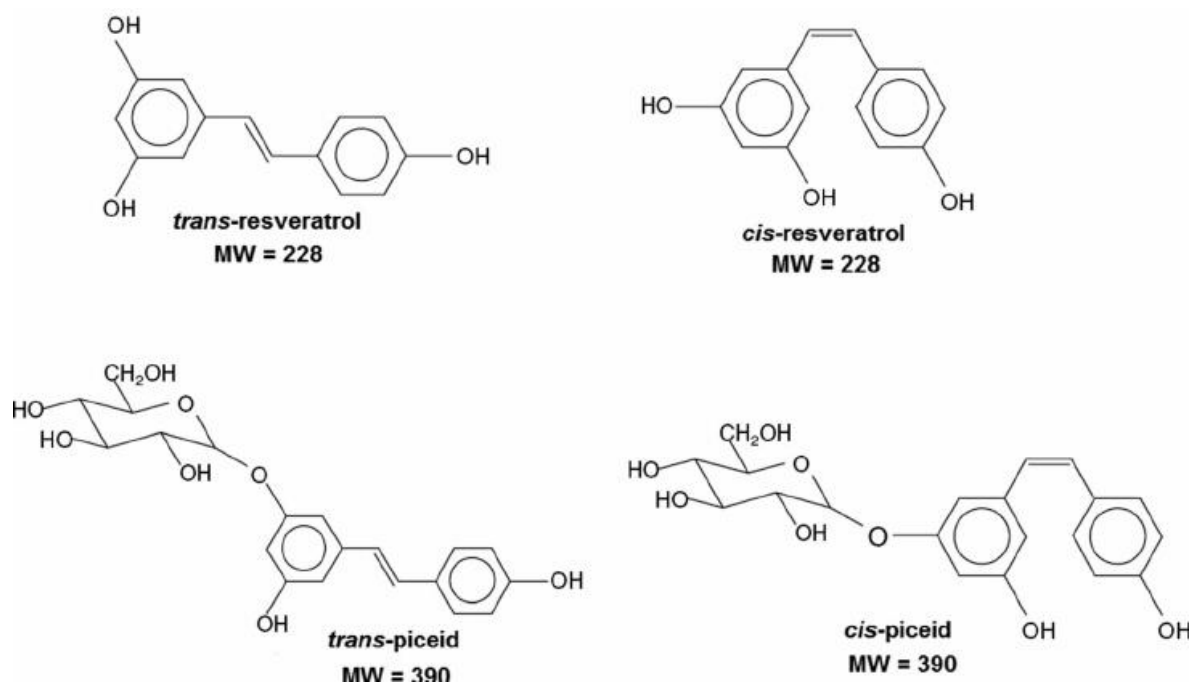
účinky metabolismu parazita. Největší koncentrace resveratrolu je patrná ne přímo v místě infekce, ale v jeho nejbližším okolí. (GEISLER 2011) Vyskytuje se často ve formě glykosidů (např. Picek). Vlivem oxidace resveratrolu vznikají viniferiny. Resveratrol má pro člověka, na rozdíl od patogenů, blahodárny vliv na kardiovaskulární systém a pozitivně působí při léčbě rakoviny.

Prekurzorem pro biosyntézu resveratrolu je fenylalanin. Z fenylalaninu vzniká za katalýzy fenylalanin-amoniaklyasou (PAL) na kyselinu skořicovou. Další reakce katalyzují enzymy cinnamát-4-hydroxylasa, 4-kumarát-CoA lipasa a stilben synthasa (STS), systematický název malonyl-CoA: 4-kumaroyl-CoA, malonyl transferasa (cyklizující). Při tomto posledním kroku se uvolňují čtyři molekuly oxidu uhličitého.



**Obr. 5 Biosyntéza resveratrolu**

Vlivem šikimátové dráhy vzniká z glykosidů fenylalanin, který je enzymem fenylalanin amoniaklyasa (PAL) přeměněn na kyselinu skořicovou, následuje oxidace cinnamát 4-hydroxylásou (C4H) na kyselinu p-kumarovou. Kyselina p-kumarová reaguje s CoASH a vzniká kumaron-CoA. Reakce je katalyzována 4-kumarát:CoA ligasou (4CL). Kondenzací se třemi molekulami malonyl-CoA a působením stilben synthasy (STS) vzniká nejdříve lineární tetraketidový meziprodukt, který je poté přeměněn na resveratrol za uvolnění čtyř molekul oxidu uhličitého.



Obr. 6 Chemická struktura resveratrolu a piceid isomerů

### 3.4.5 Piceid

Piceid (3,5,4'-trihydroxystilben-3-O-β-D-glukopyranosid) důležitým derivátem resveratrolu u révy vinné. Jeho výskyt byl doložen i u jiných druhů rostlin, například v listech eukalyptu. Piceid působí jako trvalá ochrana, to znamená, že je přítomen v hroznech, i když réva vinná není pod vlivem abiotického nebo biotického stresu.

Stejně jako u resveratrolu se předpokládá jeho vliv na zdraví člověka. (WAFFO, 1998)

### 3.4.6 PR-proteiny

PR-proteiny (angl. pathogenesis-related) jsou další, tentokrát zvláště významnou a univerzálně v rostlinách přítomnou, skupinou proteinů, které se účastní obranných reakcí rostliny. PR proteiny jsou produkovány během několika hodin jako odpověď rostlin na infekci, případně abiotický stres. Jedná se většinou o monomery s nízkou molekulovou hmotností. Jsou to proteiny indukované infekcí virů a viroidů, ale také bakteriálními a houbovými patogeny. Je to skupina většího počtu heterogenních proteinů, které byly studovány především u tabáku, ale také u dalších druhů (NADIA, 2001)

PR proteiny se dělí do několika skupin PR (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5), u nichž byla prokázána antifungální aktivita. Každá z těchto pěti skupin je dělena na

základě odlišného isoelektrického bodu na další dvě podtřídy. Kyselé antifungální proteiny se nacházejí v extracelulárním prostoru, zatímco bazické proteiny jsou přítomny v buněčných vakuolách.

PR-proteiny jsou ve velmi nízkých koncentracích přítomny i v neinfikovaných pletivech, ale po infekci se jejich hladina zvyšuje o 2 až 3 řády.

PR-proteiny nemusí být vždy indukovány jen patogeny. Například endogenně zvýšená aktivita auxinů v pletivech transformovaných bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* rovněž zvyšuje syntézu PR-proteinů. Předpokládá se, že etylén je obecným induktorem PR-proteinů. (NADIA, 2001)

Syntézu PR-proteinů zvyšují rovněž některé chemické látky, jako kyselina salicylová a acetosalicylová. Jiné látky a faktory syntézu PR-proteinů inhibují. Jsou to například arginin, lysin. PR-proteiny jsou lokalizovány především v mezibuněčných prostorech a vakuolách. Značné množství se jich hromadí v xylému. (NADIA, 2001)

#### **3.4.7 Systémově získaná rezistence – SAR**

Je vyjádřena v rostlině jako úplná rezistence v reakci napadení patogenem. Je to rezistence tkání rostliny vzdálených od místa pokusu k penetraci patogenu. Vyžaduje signální molekulu kyseliny salicylové a je spojena s akumulací k patogenezí vztažených proteinů. Může být spuštěna vystavením rostliny virulentním, avirulentním a nepatogenním mikrobům nebo uměle chemikáliemi, tak jako jsou kyselina salicylová, 2, 6-dichloro-isonicotinická kyselina nebo S-metyléster kyseliny 1, 2, 3- benzotiazolové, BTH (benzothiadiazol). Při systémové rezistenci dochází k aktivaci transkripce genů kódujících různé komponenty buněčné stěny rostlin (polysacharidy, lignin, suberin, saponin), které mohou být bariérou pro infekci patogenu. Tato rezistence je cílená k širokému spektru potenciálních patogenů a ne pouze k jednomu patogenu, který tuto reakci inicioval. Hlavní složkou SAR je akumulace PR proteinů. Vyžaduje signální molekuly kyseliny salicylové ve všech částech rostliny. Narušení schopnosti rostliny akumulovat kyselinu salicylovou končí většinou ve ztrátě projevu k patogenezí vztažených genů a oslabení reakce SAR, a to zejména, když jsou pro indukci použity patogeny. PR proteiny se akumulují v jednoděložných a krytosemenných rostlinách. (BROEKAERT, 1995)

Získaná systémová rezistence (SAR, angl. Systemic acquired resistance) zajišťuje širokou ochranu před viry, bakteriemi a houbovými patogeny. (Tandon, Jaiswal et al. 2015)

Bylo zjištěno, že při hypersensitivní reakci se v rostlině zvyšuje koncentrace kyseliny salicylové, a že také exogenně aplikovaná kyselina salicylová (SA, popř. její analogy) indukuje stejné geny SAR jako při biologické iniciaci SAR. Toto zjištění vedlo k domněnce, že salicylová kyselina je endogenním signálem pro systémovou rezistenci. Systémová rezistence je výsledkem aktivace genů souvisejících s patogenezi, *PR* (z angl. pathogenesis related) genů. Biosyntéza SA se děje přeměnou fenylalaninu na kyselinu trans-skořicovou prostřednictvím enzymu fenylalaninamonium lyázy (PAL). Ten je pak přeměňován na SA přes alternativní intermediáty kyselinu ortho-kumarovou nebo kyselinu benzoovou. Kyselina salicylová podporuje tvorbu superoxidových radikálů. SA spolupůsobí s dalšími signály, fungujícími na dlouhou vzdálenost jako je systemin, kyselina jasmonová, elektrické potenciály a etylén. Transgenní rostliny tabáku s tímto genem neakumulují kyselinu salicylovou po napadení patogenem a nemají SAR. Tyto výsledky naznačují, že kyselina salicylová má důležitou funkci při SAR. (WINK, 2011)

### **3.5 Rostlinné extrakty**

Biologické metody ochrany rostlin jsou založeny na antagonistických mezidruhových vztazích, které jsou ovlivněny celou řadou faktorů. Jednoduché extrakty z rostlin byly předchůdci první generace syntetických přípravků. Rostlinné extrakty mají dlouhou historii. Hojněji se začaly využívat ke konci 16. století a jejich produkce vrcholila v 19. století. Začátkem 20. století nastala velká éra chemizace, která rostlinné přípravky z evropského trhu zcela vytlačila. Ke konci 20. století, kdy byl kladen větší důraz na ekologii a trvale udržitelný rozvoj, narůstá zájem o rostlinné přípravky.

První generace rostlinných přípravků vznikala z rostlin, používaných původními obyvateli v Asii k ochraně produktů a úrody proti různým patogenům. V Evropě byly tyto praktiky zdokonaleny a původně jednoduché, podomácku vyrobené extrakty z rostlin dostaly posléze komerční podobu. Mezi první přírodní přípravky patří extrakty z rostlin tabáku, chryzantém a rostlinné oleje.

Význam antioxidantních složek rostlinných materiálů je důležitý z hlediska zdraví lidí, a to zejména ochranou před srdečními onemocněními a rakovinou. Je potřeba neustále zvyšovat zájem mezi vědci, výrobci potravin a spotřebiteli, prohlubovat tento trend i v budoucnosti, a to směřováním k produkci funkčních potravin se specifickými účinky na zdraví.



Byliny obsahují velké množství základních živin a mikroprvků jako například železo, zinek, hořčík, draslík dusík apod. Mimo jiné mají insekticidní, fungicidní a regenerační účinky. Obsahují různé přírodní silice, mastné kyseliny, nebo éterické oleje, které jsou velmi účinné proti škůdcům. Fungicidní účinek bylin je způsoben vysokým obsahem polyfenolických a flavonoidních látek, které zabírají zejména proti padlí révy *Erysiphe necator*. Byliny také obsahují přírodní chlorofyl důležitý pro regenerační účinek rostlin.

### 3.5.1 Rostliny používané pro výrobu rostlinných extraktů

- **Kopřiva dvoudomá** *Urtica dioica* L.

Vytrvalá, obvykle dvoudomá, až 2 m vysoká bylina. Lodyha přímá, 4hranná, obvykle nekořenující, chlupatá, jen zřídka téměř lysá. Listy vstřícné, řapíkaté, čepel delší než řapík, vejčité až kopinaté, na bázi srdčité, na okraji pilovité nebo zubaté, chlupaté, zpravidla s větším množstvím žahavých chlupů na žilkách. Květy jednopohlavní, nejčastěji v jednopohlavních květenstvích, jež vyrůstají v paždí listů, samčí květenství přímá a latovitá, samičí kratší, klasovitá nebo hroznovitá, za květu přímá, s žahavými trichomy, obě květenství delší než řapíky listů. Květy má nenápadné.

Roste ve vlhkých lesích, křovinách, na březích a v okolí lidských sídel. Na půdách dusíkatých s vyšším obsahem vláhy. V ČR je tato bylina hojně rozšířena, za jejím rozšířením je nadměrné hnojení polí.

Listy obsahují velké množství chlorofylu, minerálních látek, zejména hořčík a mnoho karotenoidů. Trichomy kopřivy dvojdomé obsahují aminy, které vyvolávají podráždění.

Z rostliny se používají nať a listy v čase kvetení, kdy je obsah účinných látek nevyšší. Používá se pro výrobu domácích, tak i komerčních přípravků proti *padlí révy*. Díky silicím účinkuje také proti mšicím a sviluškám. Komerční přípravek, který je vyroben zejména z kopřivy dvojdomé je KP RÉVA VINNÁ koncentrát. Koncentrace přípravku se doporučuje 2-3 ml na jeden litr vody. Aplikace přípravku se provádí v období března – června.

- **Přeslička rolní** *Equisetum arvense*

Přeslička je rozšířená především v chladném a mírném pásmu severní polokoule. U nás roste na vlhkých písčitých a hlinitých půdách, v lesích, na pastvinách, oraništích, náspech a na svazích jako plevel.

Přeslička je vytrvalá rostlina. Z dlouhého článkovitého oddenku vyrůstají v březnu a dubnu načervenalé nebo žlutavé, jednoduché článkované a rýhované lodyhy vysoké až 20 cm. Na článcích mají osmizubé pochvovité listy a na konci šišťice složené ze šestihranných štítků, pod nimiž



Obr. 7 Přeslička rolní

se nachází výtrusnice. Tyto jarní plodné lodyhy brzy povadnou a v létě vyrůstají z oddenku lodyhy letní, jalové, jež jsou zelené a tuhé, rýhované, duté, článkované a drsné, podélně brázdité až 40 cm vysoké. Na povrchu jsou mnohožebřé. Ve článcích jsou přeslenitě rozvětveny. U jednotlivých článků lodyhy je šestnáctizubá blanitá pochva s kopinatými nebo šídlovitými zuby. U větví jsou obvykle čtyřzubé.

Sbírá se letní zelená nať bez oddenku (Herba equiseti). Při sběru je nesmíme zaměnit za jiné druhy přesliček, např. lesní (*E. silvaticum*), mokřadní (*E. limosum*) nebo bahenní (*E. palustre*), které jsou jedovaté.

Přeslička rolní obsahuje mnoho důležitých látek jako je kyselina křemičitá, saponiny, equisetonin, kyselinu equisetovou (akonitovou), třísloviny, flobafen, hořčinu, pryskyřici, tuk, organické kyseliny a flavonové glykosidy. (Pietta, Mauri et al. 1991) Přeslička rolní obsahuje množství přírodního oxidu křemičitého, který velkou měrou ovlivňuje systémově získanou rezistenci (SAR). (Ruiz-Garcia, Romero-Cascales et al. 2012)

- **Fenykl obecný** *Foeniculum vulgare*

Vytrvalá, 50 až 150 cm vysoká bylina. Lodyha je větvená, oblá, hladká, s podélnými světlejšími proužky. Dolní listy jsou řapíkaté, 3 až 4x peřenosečné, s úkrojky čárkovitými až niťovitými, na vrcholu s chrupavčitou špičkou. Listová pochva je na okraji blanitá, na konci ouškatá. Okolíky jsou složeny nejčastěji z 6 až 8 okolíčků z různě dlouhými



Obr. 8 Fenykl obecný

stopkami, každý okolíček obsahuje 15 až 20 květů. Obal i obalíček chybí. Květy jsou oboupohlavné, žluté, korunní lístky do 2 mm velké, kališní cípy jsou zakrnělé. Plodem je dvounažka. Kvete od května do září. V tuto dobu se také sbírá, protože obsahuje nejvyšší obsah silic, pryskyřic, hořčin, saponinů, stigmasterolu, nenasycených mastných kyselin, flavonoidů (kvercetin, isokvercetin) rutinu a kumarínu.

Na trhu je znám fenyklový olej pod názvem HF-MYCOL, jedná se o směs rostlinných výtažků a rostlinných olejů fenyklu. Ty zvyšují vnitřní odolnost révy k padlí a plísní šedé prostřednictvím synergických efektů obsažených látek. Tyto látky slouží v původní rostlině jako protektanty a inhibitory růstu patogenů. Saponiny také způsobují inhibici klíčení spór a antibiotický efekt a působí jako smáčedlo pro ostatní látky použité při ošetření porostu. (BIOCONT LABORATORY)

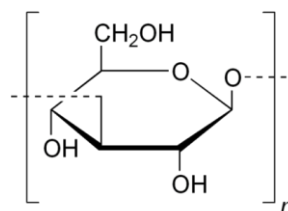
- **Hnědá mořská řasa *Laminaria digitata***

Mořské řasy jako součást mořského ekosystému patří pro lidstvo mezi nejvýznamnější poklady oceánu, protože jsou prokazatelně nejbohatším zdrojem organických minerálů na planetě. Hnojivo z mořských řas je ideálním doplňkem pro všechny plodiny. Výživa rostlin na bázi mořských řas poskytuje unikátní funkce a účinky v zemědělství. (AGROBIOSFER)



Obr. 9 Hnědá mořská řasa

Jsou hojně využívány v organickém zemědělství. Obsahují kyselinu alginovou. Kyselina alginová reaguje s kovovými prvky a vytváří příčné polymery, které pozitivním způsobem ovlivňují schopnost půdy vázat vodu a živiny, čímž zvyšují i biologickou aktivitu v substrátu. Dále obsahují Betain, důležitý pro tvorbu chlorofylu, auxiny nezbytné pro růst a vývoj rostlin a gibereliny, což vede ke zvýšení účinnosti imunitního systému. (Heidarieh, Shawrang et al. 2015)



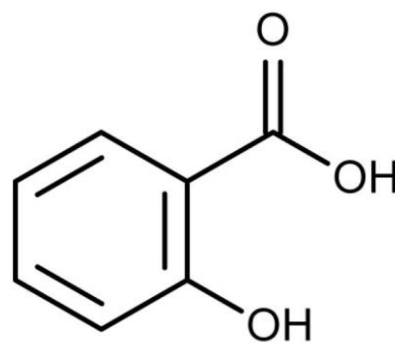
$\beta$ -1,3

Obr. 10  $\beta$ -1,3-glukan laminarin

$\beta$ -1,3-glukan laminarin odvozený z hnědé řasy *Laminaria digitata* je účinný spouštěč obranné reakce v buňkách révy vinné, schopný efektivně potlačit vývoj *B. cinerea* a *P. viticola* na infikovaných rostlinách. Obranné reakce vyvolané laminarinem zahrnují přísun vápníku, alkalizaci extracelulárního média a aktivaci dvou mitogenem aktivovaných proteinkináz v buňkách infikovaného keře. Při aplikaci laminarinu dochází k expresi 10 genů pro obranné účely s různou kinetikou a intenzitou, zvýšení činnosti chitinasy a p- 1,3-glukanázy. Taktéž dochází k tvorbě dvou fytoalexinů resveratrolu a  $\epsilon$ -viniferinu. (AZIZ, 2003)

- **Vrba salix spp.**

Opadavý keř nebo strom dosahující výšky až 12 m. Kmen v průměru až 50 cm, borka zpočátku hladká, světle šedá, později podélně brázditá a tmavě šedá. Listy střídavé, eliptické, celokrajné nebo slabě vroubkované, na rubu šedobílé, chlupaté, s vyniklou žilnatinou. Květy uspořádány v jehnědy, dvoudomé, rozkvétají před rašením listů v podobě známých "kočiček", před rozkvetem stříbřitě plstnaté, samčí vejcovité, žluté, samičí delší, zelenavé a po opylení se dále prodlužující. Vrba jíva se dožívá až 50 let a plodí ve věku 3 až 4 roky. Kvete v březnu až dubnu.



**Obr. 11 Kyselina salicylová**

Z kůry salix spp. lze získat kyselinu salicylovou. (Drzewiecka, Mleczek et al. 2014) Tato bezbarvá krystalická organická kyselina se široce využívá v organické syntéze a účinkuje jako rostlinný fytohormon. (da Rocha Neto, Luiz et al. 2016). Bylo zjištěno, že při hypersenzitivní reakci se v rostlině zvyšuje koncentrace kyseliny salicylové, a že exogenně aplikovaná kyselina salicylová (SA, popř. její analogy) indukuje stejné geny SAR jako při biologické iniciaci SAR (systémově řízené rezistence) (Jiang, Kurimoto et al. 2015)

### **3.6 Možnosti přípravy rostlinných extraktů**

#### **3.6.1 Extrakty**

Jedná se zřejmě o jeden z nejefektivnějších způsobů, jak získat z rostliny účinné látky. Pro získání extraktu se používají suché drogy, které se následně macerují v některém z rozpouštědel. Jako rozpouštědlo se může využít voda nebo organické

rozpouštědlo, jako je etanol, metanol, aceton, chloroform či benzen. Obsah a účinnost extrahovaných látek lze regulovat dle polaritý rozpouštědla a tak získat různé polární látky z rostlin. Této regulace se využívá zejména v komerční výrobě rostlinných extraktů, kdy je možné oddělit zahuštěný filtrát se známým množstvím účinných látek. Pro domácí výrobu rostlinných přípravků se nejčastěji používají smáčedla jako je líc a voda. (Schnee, Queiroz et al. 2013) uvádí pozitivní účinky alkoholu v boji proti houbovým chorobám u révy vinné.

Výroba extraktu začíná rozemletím účinné rostliny na malé kousky, které se následně vloží do nádoby v poměru 1:10 s rozpouštědlem. Směs se posléze nechá macerovat minimálně 6 hodin, (PAVELA 2011) doporučuje maceraci delší, a to 24-48 hodin. Následně se macerát filtruje přes filtrační papír či jemné plátno. Takto získaný extrakt je připraven k dalšímu použití.

### **3.6.2 Kvasný výluh**

K přípravě kvasných výluhů se hodí všechny druhy rostlin. Poměr pro přípravu s rozpouštědlem je 10:1, většinou 10 litrů vody na 1kg čerstvých rostlin. V případě použití suché drogy se používá 100 až 300 gramů suché drogy.

- **Prokvašený výluh**

Usušené nebo čerstvé byliny se vloží do širší nádoby, kde se následně co nejvíce udusají. Poté se rostliny zalijí vodou, nejlépe dešťovou, a po 24-48 hodinách začíná kvasný proces. Kvasící výluh je potřeba jednou za čas provzdušnit a zamíchat. Zákvas bývá hotový během 1-2 týdnů, kdy se na hladině již netvoří pěna. Po ukončení kvasu se výluh přefiltruje a skladuje se v temném a chladném prostředí.

Hotový výluh se následně ředí vodou v poměru 1:20, v některých případech se doporučují vyšší koncentrace 1:5 nebo i nižší 1:50.

### **3.6.3 Odvar z rostlin**

Na rozdíl od výroby extraktu odvar prochází varným procesem. Pro uvolnění co největšího počtu účinných látek (PAVELA 2011) doporučuje rostlinné pletivo narušit. Takto nachystané rostliny se macerují ve vodě po minimální dobu 24 hodin, následně se macerát vaří na mírném ohni. Po provaření se odvar přefiltruje přes plátno, a tak se oddělí od pevných zbytků rostliny. Macerát se uchovává na temném a suchém místě, doporučuje se ihned použít. Hotový odvar se ředí s vodou v poměru 1:10.

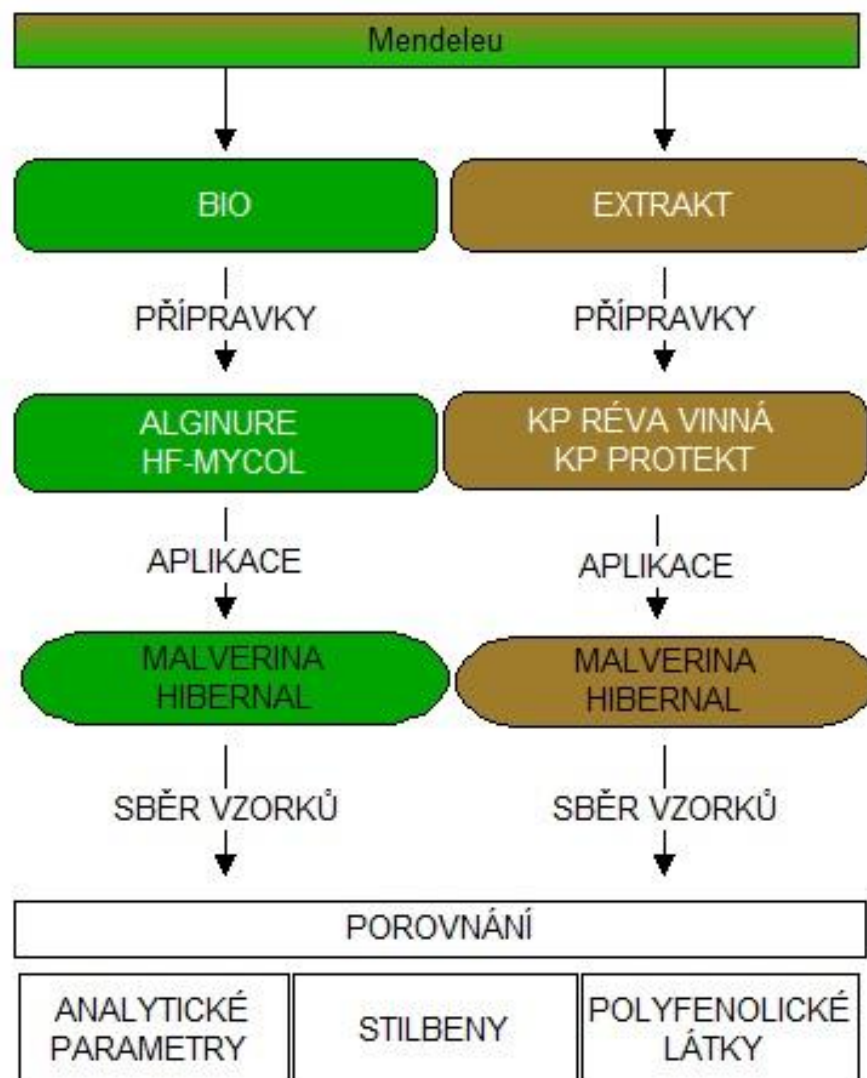
#### **3.6.4 Nálev z rostlin**

Jedná se o louhování čerstvých či sušených drog v horké vodě, která se nechá postupně chladnout, doporučuje se louhování po dobu minimálně 24 hodin v uzavřené nádobě. Následuje filtrace přes plátno, zbytky rostlin lze použít pro kompostování. Vhodné je nálev použít ihned, a to aby nedošlo k zahájení kvasného procesu. Hotový nálev se ředí v poměru 1:5.

## 4 Materiál a metody

Tato práce byla zaměřena na použití rostlinných extraktů k ochraně révy vinné v režimu ekologického vinohradnictví ve srovnání s přípravky používaných v ekologickém vinohradnictví, které se kombinují s přípravky na bázi mědi a síry. Cílem práce je zjistit, jak rostlinné extrakty nastartují tvorbu stilbenů, tedy indukovanou obrannou reakci révy vinné proti houbovým patogenům. Což by mohlo vést ke zvýšení používání vodných extraktů z bylin k ochraně révy vinné proti houbovým chorobám.

### 4.1 Schéma pokusu

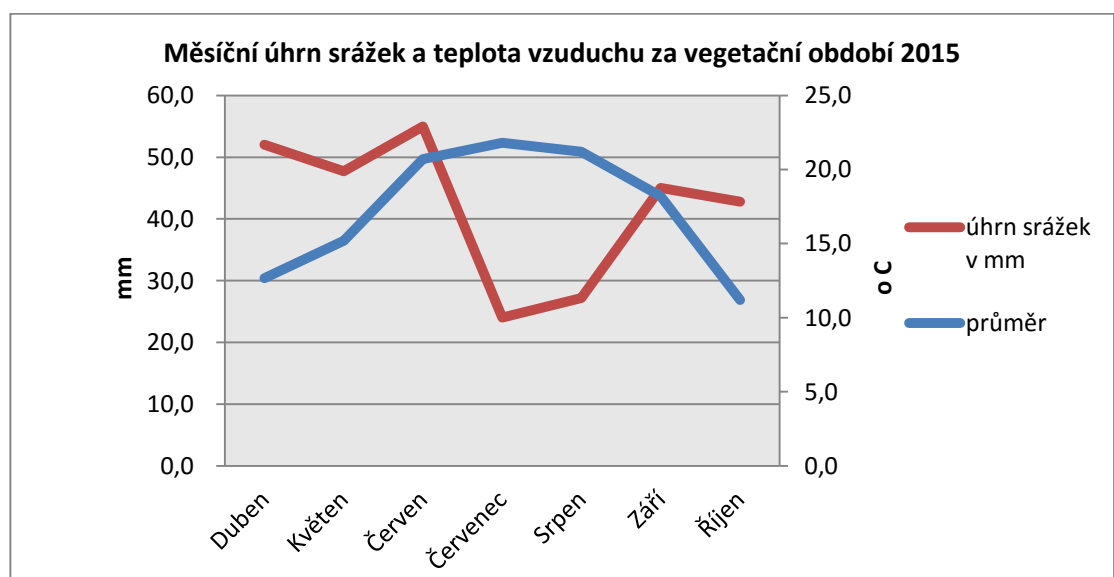


## 4.2 Charakteristika stanoviště

Vinohrad, na kterém byl založen pokus, se nachází na pozemku ZF MZLU v Brně. Nachází se v areálu Mendeleu s nadmořskou výškou 176 m. n. m. v Lednici na Moravě. Mendeleu je vědecko-výzkumné pracoviště ZF MZLU v Brně a patří k nejstarším geneticko-šlechtitelským pracovištím v ČR. Lednice na Moravě je charakterizována jako teplá a suchá oblast s mírnou zimou. Podle dlouhodobého průměru je průměrná teplota 9 °C a průměrný roční úhrn srážek je 516,6 mm. Vinohrad je díky mírnému sklonu na jihozápad dobře exponovaný ke slunci. Půdy jsou převážně hlinitopísčité s obsahem 20-24% jílových částic, což ji dělá propustnou a lehkou. V oblasti převažují severozápadní větry vanoucí dolnomoravským úvalem, avšak vinohrad je dobře chráněn přílehlou Bezručovou alejí ze západní strany. Vinohrad je vysazený ve sponu 1x2,5 m., vyvazovaný na jeden tažeň ve středním vedení. Vinařská oblast Morava, podoblast Mikulovská, vinařská obec Lednice.

### 4.2.1 Klimatické podmínky stanoviště v roce 2015

V rámci experimentu byl sledován průběh teplot a úhrn srážek ve vegetačním období od dubna do října. Ročník 2015 byl abnormální z hlediska minimálního počtu srážek a vysokých teplot. V polovině srpna byl již znát nedostatek srážek, který se projevoval u některých odrůd na růstu a vývoji hroznů. Po dlouhém suchu, přišly intenzivní srážky, které se negativně projevíly na bobulích. Ty pak vlivem velkého přívalu vody začali prskat.



Graf 1 Meteorologická data ze stanice Lednice za vegetační období 2015



### 4.3 Používané odrůdy

Pro pokus byly použity PIWI odrůdy Malverina a Hibernál. Přičemž řada 1-10 byla ošetřována v bio režimu (MALVERINA x HIBERNAL BIO) a řada 11-20 v režimu bio extrakt (MALVERINA X HIBERNAL EXTRAKT).

#### 4.3.1 Hibernál

Tato odrůda vznikla v Německém Geisenheimu křížením 'Seibel 7053' x 'Ryzlink rýnský' klon Gm 239, jako potomstvo druhé filiální generace z volného opylení. Osvědčila se i ve zkouškách v České republice a v roce 2004 byla zapsána do Státní odrůdové knihy. Odrůda se vyznačuje střední až vysokou odolností proti peronospoře a padlí. Je velice odolná proti houbovým chorobám. Velmi dobře odolává zimním mrazům a suchu. Hibernál má podobné pěstitelské vlastnosti a některé ampelografické znaky jako Ryzlink rýnský. Keře jsou vzdušné, nezahuštěné, mají silný přímý růst letorostů a



Obr. 12 Hibernál

nízkou tvorbu fazochů. Hrozny dozrávají koncem září až začátkem října. Ve srovnání s Ryzlinkem rýnským akumuluje více cukrů a má nižší obsah kyselin, přibližně o 3 g.l<sup>-1</sup>. Má o něco vyšší výnos, vyžaduje však teplé a slunečné polohy, na kterých mohou hrozny dobře vyžrát. Poskytuje extraktivní víno ryzlinkového charakteru s příjemnou vůní, vhodné do cuvée, ale také k výrobě přívlastkových vín.

Při zpracování je vhodnější přísná reduktivní technologie. Hibernál je vhodný pro produkci kvalitních přívlastkových vín. U Hibernálu se díky slizovitější dužnině doporučuje použití enzymatických přípravků, které mají pozitivní vliv na výlisnost a aroma. Vhodné je odkalení a aplikace aktivních suchých kvasinek různých kmenů, které pozitivně ovlivní charakter budoucího vína.

Kvašením za nízkých teplot lze výrazně podpořit ovocné a květinové aroma této odrůdy. Pokud dosahuje cukernatost hroznů více než 23° NM je vhodné pracovat s teplotami 18-22 °C a nenechat prokvasit víno zcela do sucha. Tímto získáme víno s výrazným tělem a zároveň velmi příjemným aroma doplněným zbytkovým cukrem. Víno z Hibernálu je vysoce extraktivní. Ve vůni jsou výrazné tóny ovoce – jablko,

hruška, meruňka, broskev, s jemnými květinovými tóny. Při vyšší vyzrálosti je kyselina příjemná, harmonická. Chuť vína je plná. Jako jedna z PIWI odrůd je také vhodná pro výrobu organických vín.

#### 4.3.2 Malverina

Malverina je původem česká bílá moštová odrůda vyšlechtěná v 80. letech 20. století ve vědecko-výzkumném sdružení REZISTANT. Pochází z křížení odrůdy Rakiš (Villard 12 375 x Veltlínské červené rané) a Merlan [( Merlot x Seibel 13 666) x (Frankovka x Svatovavřínecké)].

Na jejím vyšlechtění se podíleli M. Michlovský, F. Mádl, V. Kraus, L. Glos a V. Peřina. V ČR byla tato odrůda uznaná v roce 2001. V dnešní době se pěstuje na 6,92 ha vinic. Má velmi dobrou odolnost vůči *plasmopora viticola* a *botrytis cinerea*. Donory rezistence jsou Seibel 13 666 a Seyve Villard 12 375.



Obr. 13 Malverina

Je středně odolná vůči zimním teplotám. Je citlivá k jarním mrazům, protože pučí mezi prvními odrůdami, teda od konce dubna do poloviny května. Zaměkávání bobulí nastupuje v polovině srpna a dozrává během září. Je středně odolná vůči suchu. Růst odrůdy je středně bujný. Výnosnost odrůdy je vysoká, v průměru 10-15 tun na hektar při dosažené cukernatosti moštu 19-22° NM a obsahu kyselin mezi 8-11 g.l<sup>-1</sup>. Víno se velice podobá Ryzlinku rýnskému, je jemné harmonické, kořenité s příjemnými kyselinami. Malverina vyžaduje reduktivní technologie, které směřují k zvýraznění aromatického profilu vína a svěží kyselině v chuti. Mladá vína mají květinovou a ovocnou vůni s vyšším obsahem kyselin. Plnost vín je možné zvýšit krátkodobou macerací za nízkých teplot. Zráním v láhvi se víno harmonizuje. Je vhodná pro výrobu biovín.

## **4.4 Použité prostředky**

### **4.4.1 Kouzlo přírody Réva vinná – Agrobio Opava**

Jedná se o produkt z bylin. Réva vinná koncentrát je růstový aktivátor s výživou, jedná se o vodný bylinný směsný extrakt s převahou kopřivy a přesličky. Vhodný pro přírodní péči a ochranu révy vinné. Přípravek obsahuje malé množství živin (N, P, K, Mg, Ca) a stopových prvků (Fe, Zn, Cu, Mn), které jsou v přípravku obsaženy v přijatelné formě pro rostliny. Podporuje růst, výnos a vitalitu vinné révy a zároveň zvyšuje obranyschopnost a odolnost vůči stresu. Mění pH na listech, a tím znesnadňuje šíření škodlivých patogenů na listech. Na listech tvoří film, který omezuje vysoušení rostlin. Byliny obsažené v tomto přípravku jsou známé svými účinky proti houbovým chorobám (např. padlí révové) nebo proti mšicím a sviluškám. Tento prostředek byl použit na odrůdě Hibernál a Malverina ve variantě EXTRAKT.

### **4.4.2 Kouzlo přírody Protekt – Agrobio Opava**

Přírodní růstový aktivátor s výživou. Jedná se o směsný vodný extrakt s převahou šalvěže pro révu vinnou, chmel a okurky. Podporuje vitalitu keře a brání jej proti stresovým faktorům. Účinkuje proti houbovým chorobám, zejména proti *plasmopara viticola*, *unincola necator* nebo proti škůdcům jako jsou mšice, housenky apod. Tento prostředek byl použit na odrůdě Hibernál a Malverina, EXTRAKT postupu. Studie (DAGOSTIN, 2010) ukázala přípravek šalvěže jako velice účinný proti *plasmopara viticola*. Výrazně se nelišil od hydroxidu mědi, který je používán ve vinohradnictví.

### **4.4.3 HF-Mycol**

Tento přípravek je směs rostlinných výtažků a rostlinných olejů fenyklu. Ty zvyšují vnitřní odolnost rostlin k padlí a plísni šedé prostřednictvím synergických efektů obsažených látek. Tyto látky slouží v původní rostlině jako inhibitory růstu patogenů. Rostlinné chemické sloučeniny – saponiny, také způsobují inhibici klíčení spór a antibiotický efekt a působí jako smáčedlo pro ostatní látky použité při ošetření porostu. Tento prostředek byl použit na odrůdě Hibernál a Malverina, vedeném v bio postupu.

#### 4.4.4 Alginure

Jedná se o produkt obsahující výtažky z mořských řas (viz kapitola hnědé mořské řasy). Po aplikaci dochází v rostlinách k aktivaci řady obranných biochemických mechanismů, přičemž nejrychleji do dvou hodin je plně aktivována tvorba peroxidu vodíku. Poté je rostlina schopna tvořit kyselinu salicylovou, PR proteiny a nakonec během dvou dnů je plně aktivována i produkce fytoalexinů. Tímto způsobem je možno mnoho rostlin cestou indukované rezistence velmi účinně a hlavně včas připravit na napadení patogeny. Podle dávky působí Alginure buď preventivně, nebo při aplikaci zvýšené dávky i kurativně. Při preventivních aplikacích je vhodné kombinovat Alginure s nízkými dávkami kvalitních měďnatých fungicidů. Tento prostředek byl použit na odrůdě Hibernál a Malverina, vedeném v bio postupu.

#### 4.5 Agrotechnické podmínky, ochrana

Z agrotechnického hlediska byly vybrány dva postupy ekologického vinohradnictví. Přičemž u BIO postupu byly použity přípravky HF-MYCOL a ALGINURE. U BIO-EXTRAKT postupu byly použity přípravky KP RÉVA VINNÁ a KP PROTEKT. Vinohrad byl ozeleněný druhově bohatou směsí, a to ob jeden řádek. Neozeleněný řádek byl ošetřován mechanicky v obou režimech bez použití chemických látek. Byl kladen důraz na kvalitu zelených prací, které jsou v režimu ekologického vinohradnictví nepostradatelné. Termín jednotlivých aplikací přípravků na ochranu révy vinné, závisel na aktuálních klimatických podmínkách a možnosti infekčního tlaku.

			Datum aplikace				
Režim	Odrůdy	Přípravek	05.06.2015	15.06.2015	05.07.2015	31.07.2015	16.08.2015
BIO	HIBERNAL	Alginure	4 l/ha	4 l/ha	4 l/ha	4 l/ha	4 l/ha
	MALVERINA	HF-Mycol	3,5 l/ha	3,5 l/ha	3,5 l/ha	3,5 l/ha	3,5 l/ha
EXTRAKT	HIBERNAL	Réva vinná	3 l/ha	3 l/ha	3 l/ha	3 l/ha	3 l/ha
	MALVERINA	Protekt	3 l/ha	3 l/ha	3 l/ha	3 l/ha	3 l/ha

Tab. 2 Aplikace přípravků

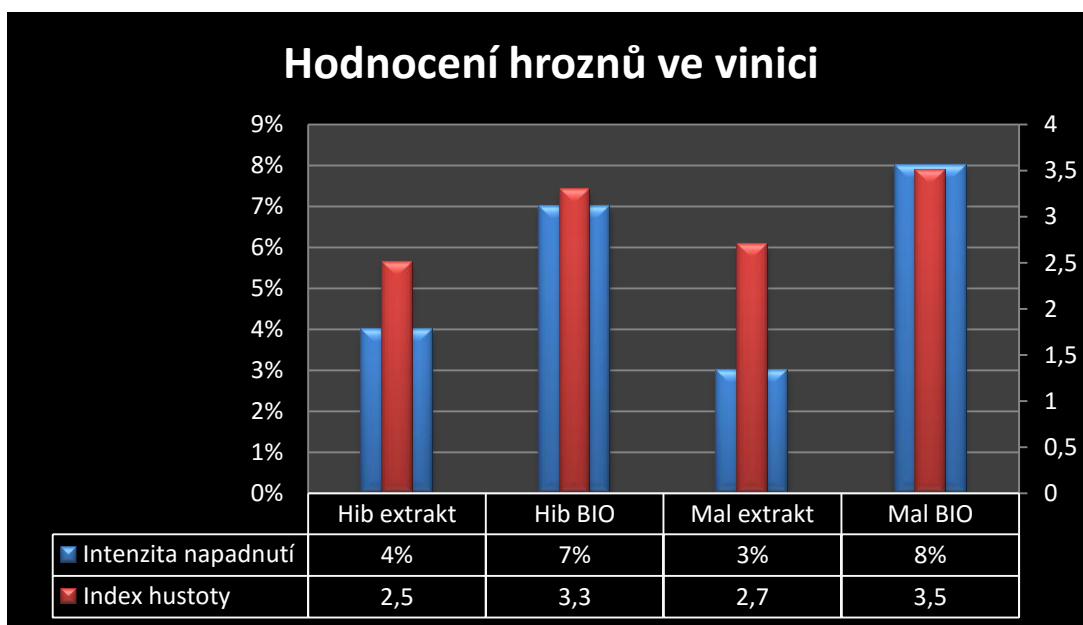
V režimu bio a bio-extrakt vinohradnictví byla první aplikace bio přípravků shodně 5. 6. 2015. Vždy se používala kombinace dvou přípravků, v BIO režimu to byl Alginure a HF-Mycol a v BIO-extrakt režimu RÉVA VINNÁ a PROTEKT. Kombinace těchto dvou přípravků měla aktivovat řadu obranných biochemických mechanismů. Tímto způsobem je možno připravit révu vinnou proti napadení patogeny při zvýšeném infekčním tlaku. Postřiky byly prováděny 2x4 trysky o tlaku 1,4 baru.

#### 4.6 Sběr vzorků

Z každé varianty tedy MALVERINA bio X MALVERINA extrakt a HIBERNAL bio x HIBERNAL extrakt se těsně před sběrem odebralo 3x100 ks bobulí pro základní analytický rozbor moštu. A 3x50 ks bobulí pro určení fenolických látek v hroznech. Bobule se sbíraly rovnoměrně, z osluněných i ze zastíněných částí keře.

23. 9. 2015 byly sbírány listy – z každé varianty 10 listů pro následné měření množství stilbenů v listech keře révy vinné. Listy se sbíraly rovnoměrně z celé délky celých řádků jednotlivých variant.

Při ručním sběru bylo z každé varianty odebráno 80 kg hroznů, z nichž bylo vyrobeno víno. Celkem se jednalo o 4 varianty: Hibernál BIO x Hibernál EXTRAKT a Malverina BIO x Hibernál EXTRAKT. V těchto vínech byly následně měřeny základní analytické parametry a fenolické látky.



**Graf 2** Hodnocení intenzity napadení a indexu hustoty

Nejvíce napadená se projevila varianta Malverina BIO, 8% intenzita napadení a 3,5 index hustoty. Nejzdravější byla varianta Malverina extrakt s intenzitou napadení 3% a indexem hustoty 2,7. Na zdravotní stav a intenzitu napadení révy vinné mají velký vliv hustota a provzdušněnost keře. Nízké napadení houbovými patogeny je dáno rezistencí použitých odrůd, včasné provedenými zelenými pracemi, průběhem klimatických podmínek (teploty a srážek) ročníku 2015 a aplikací prostředků na ochranu révy vinné.

#### **4.7 Analytické hodnocení**

- **Cukernatost refraktometricky**

Obsah cukru v moštu se měřil elektronickým refraktoměrem na základě měření lomu světla rozpuštěnou sušinou v moště vyjádřenou v hmotnostních procentech sacharózy. Refraktoměr udával hodnoty v °Brix. Následně se hodnoty dle tabulek přepočítaly na °NM. (BALÍK, 1998)

- **Stanovení PH**

Pro stanovení PH byla použita potenciometrická metoda s využitím skleněné elektrody. Podstatou tohoto měření je rozdíl mezi měrnou a referenční kalomelovou elektrodou. Skleněná elektroda je naplněná roztokem o známé a konstantní hodnotě pH, do něhož zasahuje vnitřní srovnávací elektroda. Při ponoření elektrody do měřeného roztoku vzniká mezi vnější a vnitřní stranou skleněné membrány potenciálový rozdíl, jehož velikost je úměrná rozdílu pH měřeného a vnitřního roztoku. (BALÍK 2004)

- **Stanovení celkového obsahu titrovatelných kyselin**

Obsah titrovatelných kyselin byl stanovený potenciometrickou titrací 0,1 M NaOH do pH 8,1 na automatickém titrátoru. K analýze bylo nedělenou pipetou odebráno 10 ml moštu do 50 ml kádinky, následně se ke vzorku přidalo 10 ml destilované vody. Titrace proběhla automaticky dávkováním 0,1 M NaOH do pH 8,1. Míchání bylo zajištěné elektromagnetickým míchadlem. Při pH 8,1 se titrace ukončila. (BALÍK, 2004)

- **Stanovení asimilovatelného dusíku formaldehydovou titrací**

Množství asimilovatelného dusíku (YAN) bylo stanovené formaldehydovou titrací, použitím automatického titrátoru. Hodnota pH byla zvýšená v rámci měření

titrovatelných kyselin na pH 8,1. Následně bylo přidáno 10 ml 36% vodného roztoku formaldehydu. Tato směs se automaticky titrovala roztokem 0,1 M NaOH. Naměřená hodnota se vynásobila faktorem použitého roztoku NaOH. Minimální hodnota pro dobré kvašení moštu se udává 150 mg/l. Hlavní složkou YAN jsou volné aminokyseliny, které představují hlavní zdroj výživy pro kvasinky. (Bely, Rinaldi et al. 2003)

- **Stanovení obsahu kyselin a sacharidů pomocí HPLC**

Ke stanovení přesných hodnot obsahu jednotlivých kyselin (kyselina vinná, jablečná, šikimová) a sacharidů (glukózy a fruktózy) byla po odstředění moštu použita metoda HPLC. Vysoce účinná kapalinová chromatografie, (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) vyniká vysokou účinností a opakovatelností. Tato metoda je vhodná pro dělení organických méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách.

Vzorky byly dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Ta unáší jednotlivé složky daného vzorku na kolonu, kde dochází k opakovaným ustálením rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů podle fyzikálně-chemických vlastností. Po přechodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru.

Měřenými veličinami jsou fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost. Výstupem z detektoru je grafický záznam závislosti odezvy detektoru na retenčním čase, tj. chromatogram, na kterém se hodnotí plocha nebo výška píku. Kvantitativní analýza se provádí na principu odečtení výsledku z kalibrační křivky (Kelebek, Selli et al. 2009)

#### **4.7.1 Spektrofotometrické hodnocení**

- **Úprava vzorků**

Vína byla před stanovením jednotlivých parametrů odstředěna (3000 x g; 6 min). Vína byla pro spektrofotometrická stanovení jednotlivých parametrů použita neředěná.

Jednotlivá spektrofotometrická stanovení byla provedena na automatickém biochemickém analyzátoru MIURA ONE (I.S.E. S.r.l.; Guidonia (RM) – Itálie). Jednotlivé metody byly uzpůsobeny použitému analyzátoru, kdy inkubace probíhá při 37°C a inkubační doby je třeba přizpůsobit pracovním cyklům přístroje.

- **Stanovení celkových polyfenolických látek**

celkový obsah fenolů ve víně byl stanoven modifikovanou Folin-Ciocalteu metodou. K 198  $\mu\text{l}$  vody bylo přidáno 12  $\mu\text{l}$  vzorku a 10  $\mu\text{l}$  Folin-Ciocalteu činidla. Po 36 sekundách bylo přidáno 30  $\mu\text{l}$  roztoku dekahydrátu uhličitanu sodného (20%). Absorbance při 700 nm byla měřena po 600 sekundách. Koncentrace celkových fenolů byla na základě kalibrační křivky za použití kyseliny gallové jako standardu (25-1000  $\text{mg.l}^{-1}$ ). Výsledky jsou vyjádřeny ve formě  $\text{mg.l}^{-1}$  ekvivalentů kyseliny gallové (GA). (WATERMAN, 1994)

- **Stanovení celkových flavanolů**

koncentrace celkových flavanolů byla stanovena pomocí metody založené na reakci s p-dimethylaminocinnamaldehydu (DMACA). Při této metodě na rozdíl od široce používané reakci s vanilinem nedochází k interferenci s anthokyaniny. Navíc poskytuje vyšší citlivost a selektivnost. K 240 $\mu\text{l}$  činidla (0,1% DMACA a 300 mM HCl v MeOH) bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  vzorku, doba reakce byla 600 sekund. Poté byla změřena absorbance při 620nm. Koncentrace celkových flavanolů byla stanovena na základě kalibrační křivky za použití epikatechinu jako standardu (10-200  $\text{mg.l}^{-1}$ ). Výsledky jsou vyjádřeny ve formě  $\text{mg.l}^{-1}$  ekvivalentů katechinu.(Li, 1996)

- **Stanovení redukční síly (Reducing Power;  $P_R$ )**

pro stanovení redukční schopnosti vína byla upravena metoda založená na redukcí železitých iontů (ferric reducing/antioxidant power; FRAP). K 198  $\mu\text{l}$  základního pufru obsahujícího 200mM octanu sodného upraveného kyselinou octovou na hodnotu pH 3,6 bylo přidáno 12 $\mu$  vzorku, 20 $\mu\text{l}$  roztoku 20mM  $\text{FeCl}_3$  a 20 $\mu\text{l}$  10mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazin) v 40mM HCl. Po 600 sekundách byla změřena absorbance při 620 nm. Redukční síla byla vypočítána z kalibrační křivky za použití kyseliny askorbové (AA; 0,1-3mM), nebo kyseliny gallové (GA;10-300 mg/l) jak standardu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě  $\text{mmol.l}^{-1}$  ekvivalentů kyseliny askorbové(mM AA), nebo ve formě  $\text{mg.l}^{-1}$  ekvivalentů kyseliny gallové (GA) . (PULIDO, 2000)

- **Stanovení antiradikálové aktivity (Antiradical Activity;  $A_{AR}$ )**

Metoda je založena na deaktivaci komerčně dostupného 2,2-difenyl- $\beta$ -pikrylhydrazylového radikálu (DPPH) projevujícího se úbytkem absorbance při 520 nm. K 268 $\mu\text{l}$  roztoku DPPH v methanolu (300  $\mu\text{M}$ ) bylo přidáno 12  $\mu\text{l}$  vzorku, absorbance



při 520nm byla změřena po 360 sekundách a odečtena od absorbance měřené v čase 0. Antiradikálová aktivita byla stanovena na základě kalibrační křivky, za použití Troloxu jako standardu (0,1-3mM), nebo kyseliny gallové (GA;10-300 mg/l) jak standardu. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě mmol.l<sup>-1</sup> ekvivalentů Troloxu, nebo ve formě mg.l<sup>-1</sup> ekvivalentů kyseliny gallové (GA). (ARNOUS, 2001)

#### 4.7.2 Metoda HPLC – stanovení stilbenů

- **Chemikálie**

Acetonitril (ACN) byl HPLC supergradient čistoty. trans-resveratrol, tans-piceid, pocházely od Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Malvidin -3,5-diglukosid pocházel od Indofine Chemical Company. Inc. (Hillsborough, NJ). Ostatní použité chemikálie byly p.a. kvality od lokálního dodavatelů (Lachema, Penta). Cis-resveratrol a cis-piceid byly připraveny fotoisomerací z příslušných trans isomerů (LAMUELA, 1995)

- **Úprava listů**

Do 50 ml uzavíratelné vialky bylo odváženo cca 25 g čerstvých listů a zalito čistým metanolem v poměru 1ml metanolu na 1g listů. Do vialky bylo přidáno 20μl koncentrovaného roztoku hydrogensířičitanu amonného (400 g/l SO<sub>2</sub>). Takto připravené vzorky byly extrahovány v temnu, za laboratorní teploty, do doby analýzy (cca 4 měsíce). Poté bylo odebráno 2 ml, zbytky pevných částí odstředěny (3000 x g; 6 min), čirý extrakt byl zředěn 1:10 100mM HClO<sub>4</sub> a přímo podroben HPLC analýze.



Obr. 14 Úprava listů

- **Měření**

Koncentrace jednotlivých fenolických látek byla stanovena dosud nepublikovanou metodou s přímým nástřikem vzorku. Odstředěný extrakt (3000 x g; 6 min) byl 10x zředěn 100 mM HClO<sub>4</sub> a přímo použit k HPLC analýze.

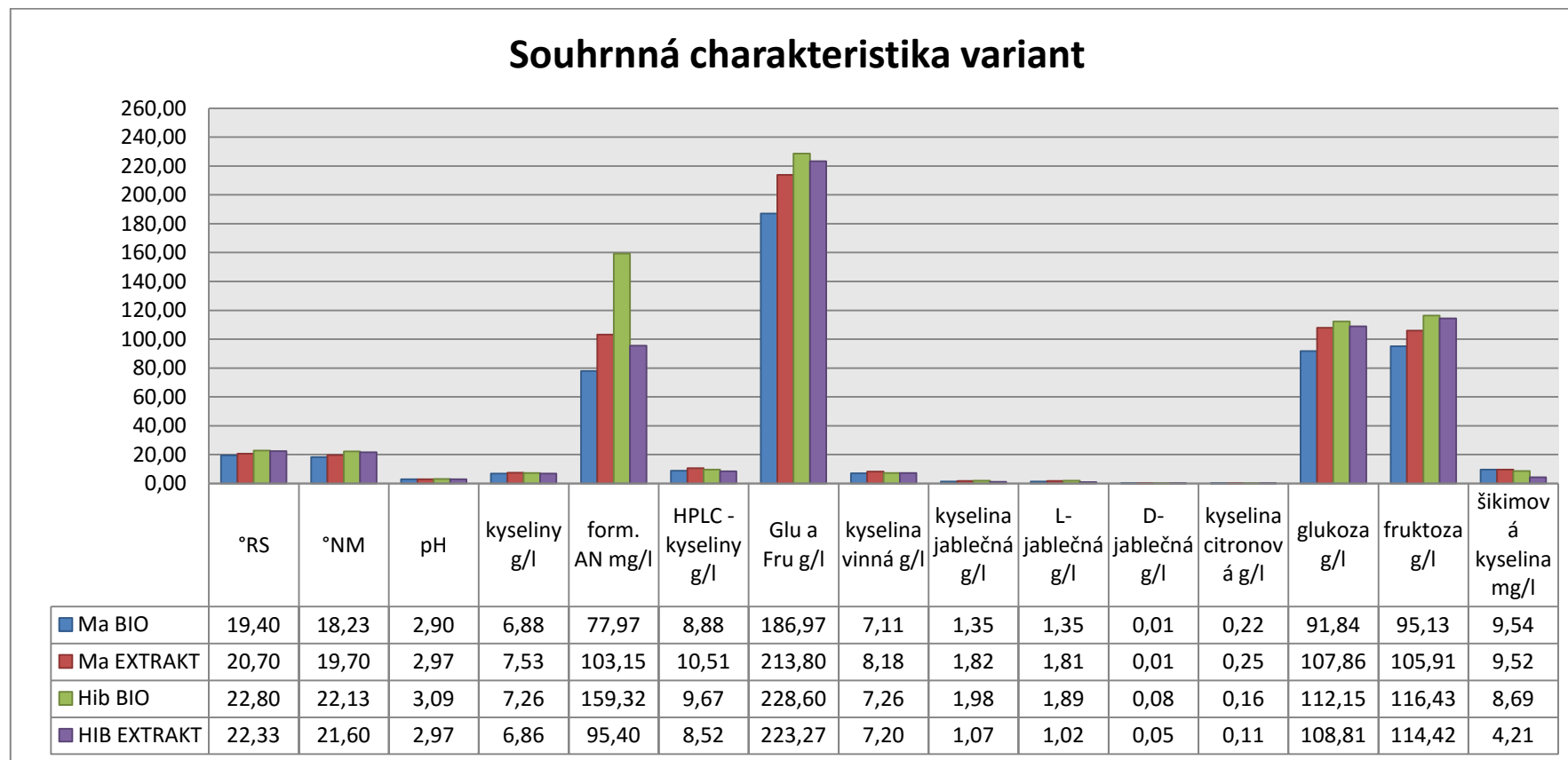
Měření probíhalo na binárním vysokotlakém systému Shimadzu LC-10A Systém controler: SCL-10Avp, 2 pumpy: LC-10ADvp. Kolonový termostat s manuálním nástřikovým ventilem Rheodyne: CTO-10ACvp. DAD detektor: SPD-M10Avp. Software: LCsolution.

Podmínky separace Kolona: Alltech Alltima HP C18 3μm; 3 x 150mm. Teplota separace byla 50°C a objem nástřiku vzorku: 20ul. Průtok mobilní fáze: 0.75 ml/min.

Mobilní fáze A: 15 mM HClO<sub>4</sub>. Celková doba mezi dvěma vzorky 35 minut. Data v rozmezí 200-520 nm byla zaznamenávána 31 minut. Stanovení jednotlivých složek (resveratrol a piceid) bylo prováděno na základě kalibračních křivek standardů. Kyselina p-kumarová na 310nm: a její deriváty; trans-piceid; trans-resveratrol. (LAMUELA, 1995)

## 5 Výsledky

### 5.1 Souhrnná statistika a vyhodnocení

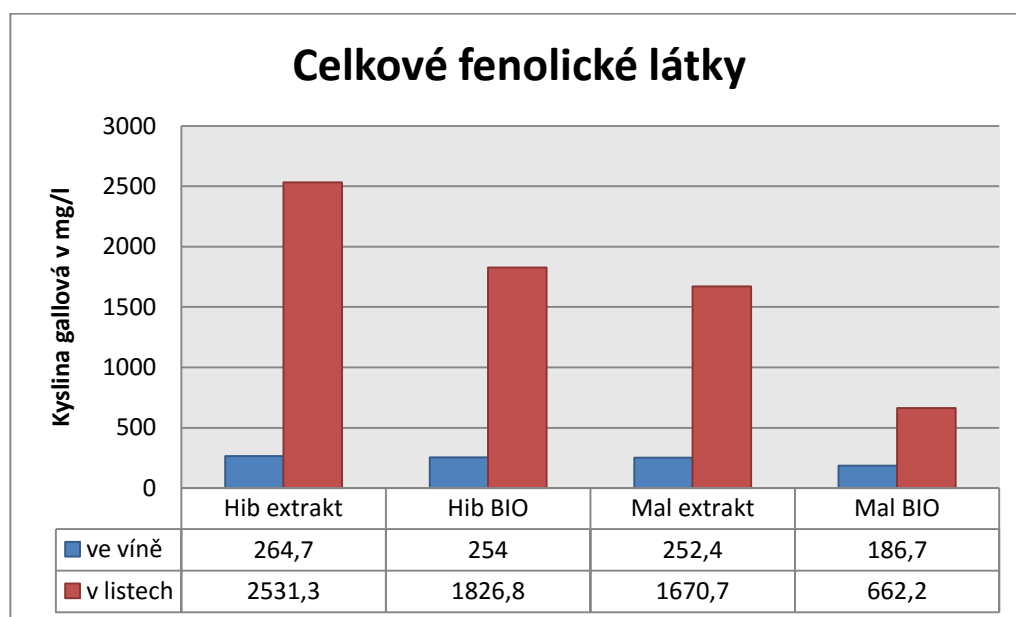


Graf 3 Souhrnná charakteristika pozorovaných variant v Mendeleu dle rozborů provedených 1. 10. 2015

Ze školních vinic v Mendeleu byly použity celkem 4 varianty dvou PIWI odrůd. Odrůdy Hibernál EXTRAKT a Malverina EXTRAKT v porovnání s Hibernál BIO a Malverina BIO. Odběr bobulí proběhl těsně před sběrem 29. 9. 2015. Rozbory ukázaly na poměrně vysokou cukernatost u odrůdy Hibernál 21,60 – 22,13° NM, která byla dána průběhem počasí v roce 2015. U odrůdy Malverina byla cukernatost o 3-4° NM nižší. Obsah kyselin a pH byl velice podobný. U všech testovaných vzorků se kyseliny pohybovaly kolem 7 g/l přičemž pH bylo od 2,90 až 3,09.

Obsah asimilovatelného dusíku byl nedoporučující u Hib. Extrakt, Ma. Bio a Ma extrakt v rozmezí 77,97 až 103,15 mg/l nejvyšší u Hib. Bio 159,3 mg/l, přičemž (BISSON, 2000) uvádí ideální množství asimilovatelného dusíku 250 až 300 mg/l. Obsah asimilovatelného dusíku byl nízký vlivem velkého sucha v roce 2015. Obsah kyselin s přihlédnutím na ročník 2015 byl neočekávaně v normě s hodnotami 6,86 až 7,53 g/l. Poměr kyseliny jablečné a vinné byl 2:8, což potvrzuje ročník s nadprůměrnými teplotami.

## 5.2 Celkové fenolické látky

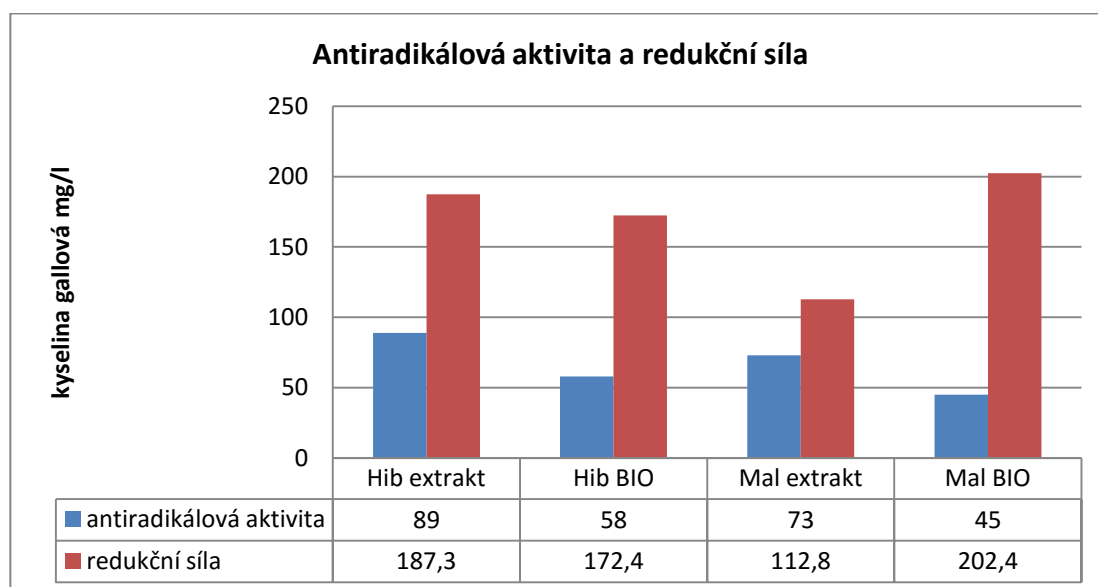


**Graf 4 Celkové fenolické látky ve víně a v listech**

Z grafu č. 2 lze vyčíst, že nejvyšší počet fenolických látek vyjádřených v kyselině gallové je v HIB. EXTRAKT, a to jak ve víně 264,7 mg/l tak v extraktu z listů 2531,3. Nejnižší počet fenolických látek byl naměřen na odrůdě Malverina v režimu BIO ve víně 186,7 mg/l a v listech 662,2 mg/l. V listech byly naměřeny několikrát vyšší

fenolické látky než ve víně. Je to vlivem oxidace fenolických látek při výrobě vína, která neprobíhala dostatečně reduktivně. Ve variantě HIB. Extrakt a MA. Extrakt byly naměřeny vyšší koncentrace kyseliny gallové než ve variantách HIB. BIO a MA. BIO. Což může být způsobeno použitím přípravků PROTEKT a KP RÉVA VINNÁ.

### 5.3 Antiradikálová aktivita a redukční síla

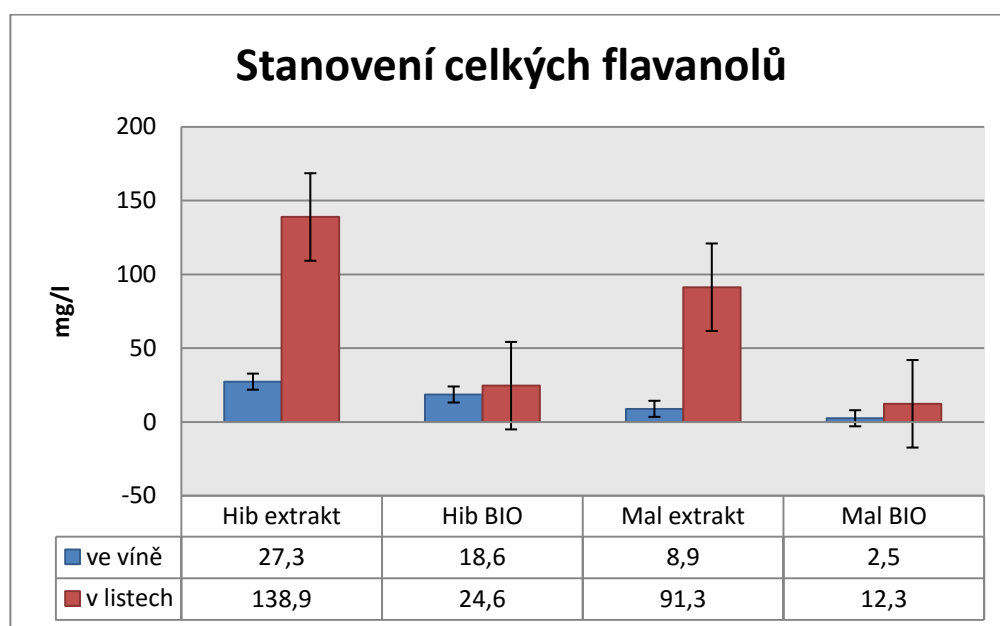


**Graf 5 Antiradikálová aktivita a redukční síla ve víně**

Antiradikálová aktivita udává schopnost vína deaktivovat DPPH radikál. Z grafu číslo 5 je patrná vyšší antiradikálová aktivita u variant ošetřovaných přípravky v režimu Extrakt. Hib extrakt vykazuje 89 mg/l kyseliny gallové a Mal extrakt 73 mg/l kyseliny gallové. Víno vyrobené v režimu Bio vykazuje menší antiradikálovou aktivitu, Hib Bio 58 mg/l a Mal Bio 45 mg/l kyseliny gallové.

Redukční síla (graf č. 5) je schopnost vína redukovat železité ionty. Jelikož hrozny nebyly téměř napadené houbovým patogenem, byla redukční síla ve víně vysoká. Nejvyšší redukční sílu vykazovala varianta Mal Bio 202,4 mg/l kyseliny gallové. Naopak nejmenší Mal extrakt 112,8 mg/l kyseliny gallové. V redukční síle se varianty nelišily, což se týká přípravků, kterými byla ošetřována réva ve vinici.

## 5.4 Stanovení flavanolů



Graf 6 Stanovení celkových flavanolů, vyjádřeno v Katechinech

Hib extrakt	Hodnoty	Hib bio	Hodnoty	Mal extrakt	Hodnoty	Mal bio	Hodnoty
Stř. hodnota	1059,33	Stř. hodnota	680,03	Stř. hodnota	692,43	Stř. hodnota	290,43
Chyba stř. hodnoty	529,97	Chyba stř. hodnoty	403,19	Chyba stř. hodnoty	347,79	Chyba stř. hodnoty	141,57
Medián	783,55	Medián	434,35	Medián	503,85	Medián	243,60
Směr. Odchylka	1059,95	Směr. odchylka	806,37	Směr. odchylka	695,58	Směr. odchylka	283,15
Rozptyl výběru	1123492,14	Rozptyl výběru	650237,68	Rozptyl výběru	483827,17	Rozptyl výběru	80173,08
Špičatost	1,13	Špičatost	1,92	Špičatost	1,65	Špičatost	-0,24
Šikmost	1,23	Šikmost	1,44	Šikmost	1,33	Šikmost	0,79
Minimum	138,90	Minimum	24,60	Minimum	91,30	Minimum	12,30
Maximum	2531,30	Maximum	1826,80	Maximum	1670,70	Maximum	662,20
Součet	4237,30	Součet	2720,10	Součet	2769,70	Součet	1161,70
Počet	4,00	Počet	4,00	Počet	4,00	Počet	4,00
Hladina spolehlivosti (95,0%)	1686,62	Hladina spolehlivosti (95,0%)	1283,12	Hladina spolehlivosti (95,0%)	1106,82	Hladina spolehlivosti (95,0%)	450,55

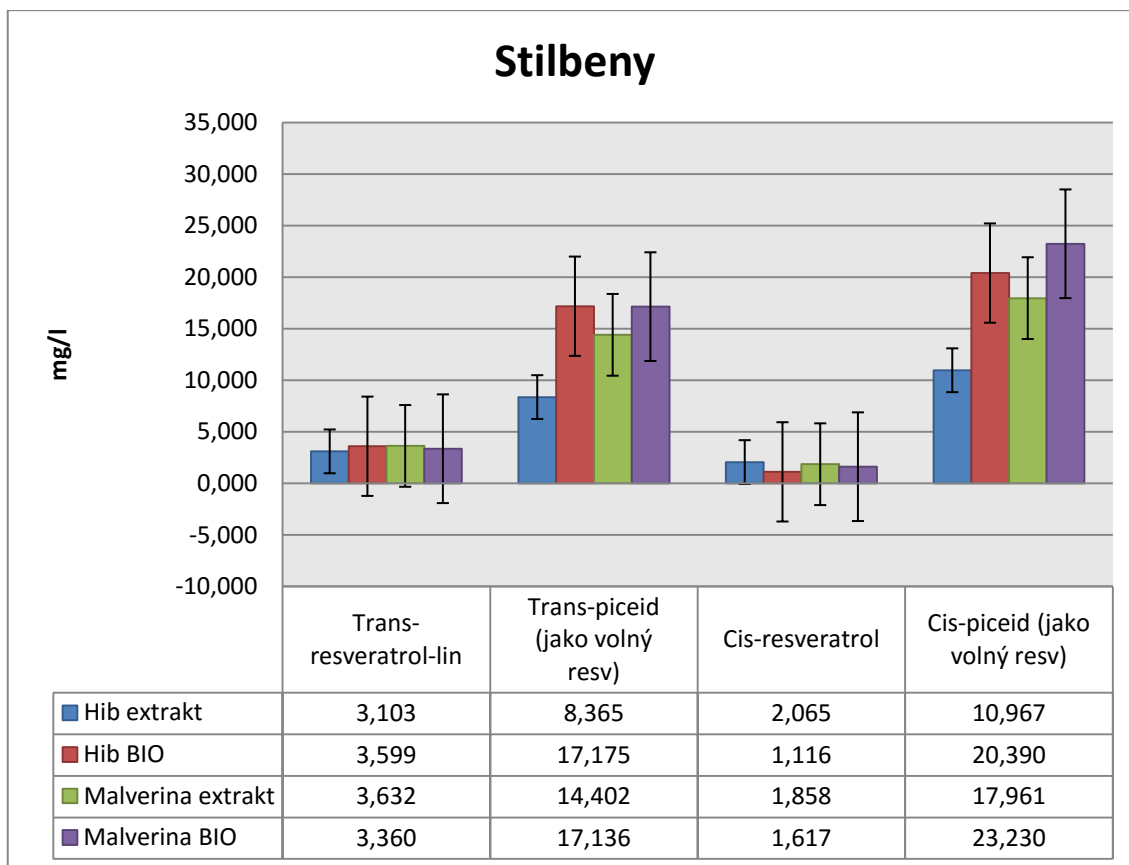
Tab. 3 Popisná statistika, Antiradikálové aktivity, Redukčního potenciálu, celkových fenolů a flavanolů v listech Údaje uvedené v mg/l kyseliny gallové

Graf č. 5 vyjadřuje hodnoty celkových flavanolů vyjádřených v množství mg/l katechinů. Hodnoty naměřené v listech se významně lišily od hodnot naměřených ve víně. Keře révy vinné ošetřované přípravky z extraktů vykazovaly vyšší počet katechinů než réva vinná ošetřovaná přípravky v režimu bio. Nejvyšší koncentrace katechinů byla naměřena ve variantě Hib extrakt 138,9 mg/l v listech a 27,3 mg/l katechinů ve víně. Odrůda Hibernál obecně vykazovala vyšší koncentrace katechinů než odrůda Malverina. V odrůdě Malverina režim bio byl neměřen nejmenší počet katechinů 12,3 mg/l v listech a 2,5 mg/l ve víně.

Popisná statistika Tab. č. 2 ukazuje na zvýšené hodnoty ve variantách extrakt, které byly ošetřovány přípravky KP réva vinná a KP protekt, Agrobio Opava s. r. o. U Hib extrakt byla naměřená průměrná hodnota z výsledků měření redukční aktivity, antiradikálové aktivity, celkových fenolů a flavanolů (vyjádřeno v katechinech) 1059,3 mg/l kyseliny gallové a Mal extrakt 692,43 mg/l kyseliny gallové. U variant vedených v režimu Bio byla střední hodnota u Hibernálu 680,03 mg/l kys. gall. Nejnižší střední hodnotu vykazovala Malverina 290,43 mg/l kys. gallové. Hladina spolehlivosti pro střední hodnotu je určena na 95%.

## **5.5 Charakteristika profilu stilbenů**

Stilbeny byly měřeny v listech všech variant. V grafu č. 7 se množství trans-resveratrolu nějak výrazně neliší. Hib. Extrakt vykazoval nejnižší hodnotu trans-resveratrolu 3,103 mg/l. Naopak nejvyšší hodnotu vykazovala varianta Mal. Extrakt 3,632 mg/l trans-resveratrolu. Trans-piceid uváděný jako volný resveratrol se výrazně lišil ve variantě Hib. Extrakt – 8,365 mg/l s ostatními variantami. U Hib. Extrakt byl naměřený nejnižší obsah Trans-piceidu. Nejvyšší obsah vykazovaly varianty Hib. Bio a 17,175 mg/l a Mal. Bio 17,136 mg/l.



**Graf 7 Stanovení stilbenů, Trans-resveratrol, Trans-piceid, Cis-resveratrol, Cis-piceid**

Cis-resveratrol se mezi jednotlivými zkoušenými vzorky v zásadě výrazně nelišil. Nejvyšší koncentrace byla naměřena u Hib. Extrakt 2,065 mg/l nejnižší u Hib Bio 1,116 mg/l. Cis-piceid uváděný jako volný resveratrol byl nejvyšší v režimu Bio u odrůdy Hibernál 20,390 mg/l a Malverina 23,230 mg/l. V režimu extrakt byly hodnoty nižší, Mal extrakt 17,961 mg/l a Hib. Extrakt 10,967 mg/l cis-piceidu. Stejný trend byl i u trans-piceidu. Hib. BIO a Mal BIO měli shodně lehce přes 17 mg/l trans-piceidu, ve variantě Extrakt bylo naměřeno u Hibernálu 8,365 mg/l a u odrůdy Malverina 14,402 mg/l trans-piceidu.

V režimu BIO bylo naměřeno celkově více trans-piceidu a cis-piceidu než u druhé varianty. Což koresponduje s intenzitou napadení, která se v režimu Bio pohybovala mezi 7-8% a iniciovala tak tvorbu stilbenů. V režimu Extrakt byla intenzita napadení od 3% do 4%, což odpovídá menšímu počtu naměřených stilbenů.



mg/l	Hib extrakt	Hib bio	Mal extrakt	Mal bio
Kyselina gallová	13,312	12,268	15,235	19,233
K. kaftarová; jako kávová	350,904	264,106	323,109	377,229
Kyselina koutarová	69,183	46,982	46,114	30,583
Kyselina fertarová	8,352	10,466	7,837	9,657
Catechin	33,893	32,944	73,000	53,472
Epicatechin	19,923	16,773	14,915	27,480
Quercetin-3- $\beta$ - D-Glukoside	541,912	924,229	1283,350	1055,629
Quercitrin	172,765	205,987	214,064	170,420
Quercetin	19,686	36,124	30,946	22,646
Kaemferol	2,616	4,908	4,915	3,648
Trans- resveratrol	3,103	3,599	3,632	3,360
Trans-piceid	8,365	17,175	14,402	17,136
Cis-resveratrol	2,065	1,116	1,858	1,617
Cis-piceid	10,967	20,390	17,961	23,230

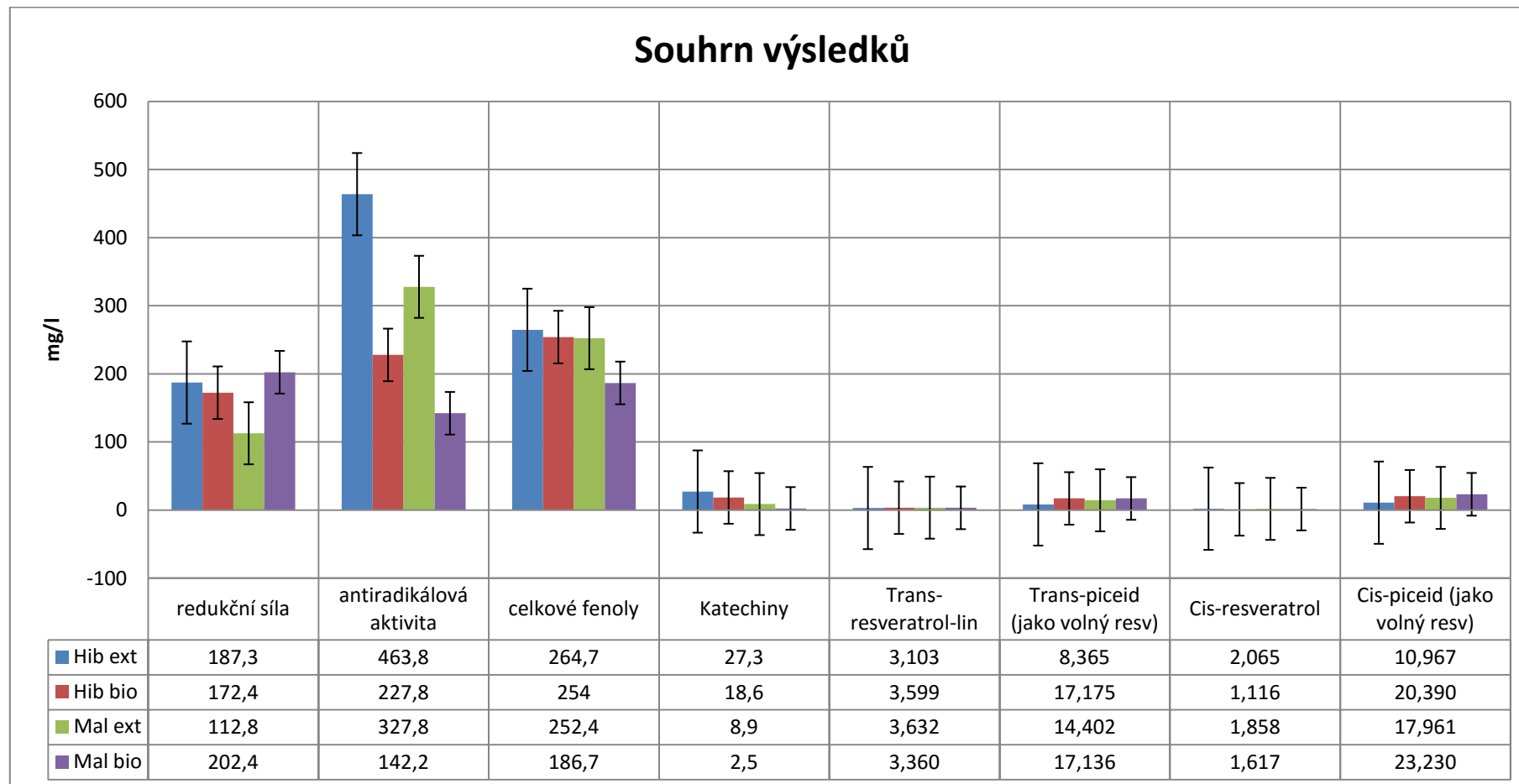
Tab. 4 Výsledky HPLC analýzy v listech

<i>Hib extrakt</i>		<i>Hib bio</i>		<i>Mal extrakt</i>		<i>Mal bio</i>	
Stř. hodnota	89,7889874	Stř. hodnota	114,076185	Stř. hodnota	146,524159	Stř. hodnota	129,667035
Chyba stř. hodnoty	43,2827407	Chyba stř. hodnoty	65,887141	Chyba stř. hodnoty	90,9697529	Chyba stř. hodnoty	76,1971976
Medián	16,4990299	Medián	18,7825126	Medián	16,5980023	Medián	22,9375358
Směr. odchylka	161,949187	Směr. odchylka	246,527108	Směr. odchylka	340,377648	Směr. odchylka	285,103807
Rozptyl výběru	26227,539	Rozptyl výběru	60775,6149	Rozptyl výběru	115856,943	Rozptyl výběru	81284,181
Špičatost	4,49812081	Špičatost	10,4853131	Špičatost	11,4241994	Špičatost	9,87829386
Šikmost	2,23792757	Šikmost	3,14866328	Šikmost	3,30353339	Šikmost	3,07337322
Minimum	2,06534599	Minimum	1,11616318	Minimum	1,85759329	Minimum	1,61727351
Maximum	541,911768	Maximum	924,22932	Maximum	1283,35021	Maximum	1055,62908
Součet	1257,04582	Součet	1597,0666	Součet	2051,33823	Součet	1815,33849
Počet	14	Počet	14	Počet	14	Počet	14
Hladina spolehlivosti (95,0%)	93,5066763	Hladina spolehlivosti (95,0%)	142,340514	Hladina spolehlivosti (95,0%)	196,528202	Hladina spolehlivosti (95,0%)	164,614037

**Tab. 5** Popisná statistika, naměřené hodnoty listy – HPLC (tab. 4)

Tab. 5 popisuje souhrnnou popisnou statistiku z naměřených hodnot (tab. 4) metodou HPLC v listech. Ze souhrnné statistiky všech měřených hodnot v listech vyplývá skutečnost, že nejvyšší listové aktivity dosahovala varianta Mal Extrakt, kde byla naměřena střední hodnota 146,524 a součet všech naměřených parametrů (tab. 2) činil 2051,33 mg/l. Mal Bio byla naměřená střední hodnota 129,667 a součet veškerých hodnot byl 1815,33 mg/l. Nejnížší hodnoty v listech vykazoval Hibernal Extrakt, který měl střední hodnoty 89,788 a součet všech hodnot byl 1257,04 mg/l.

## 5.6 Souhrn výsledků



Graf 8 Souhrn naměřených výsledků

## 6 Diskuse

Záměrem této diplomové práce bylo dokázat vliv aplikace rostlinných extraktů v ochraně révy vinné proti houbovým chorobám na kvalitu, zdraví hroznů a hodnocení napadení houbovými chorobami. Vyhodnocení proběhlo jednorázově, u každé varianty zvlášť. Vzorky použité v diplomové práci byly sbírány těsně před sběrem. Varianty byly vybrány ze starého genofondu Mendelea.

Ročník 2015 se zapsal do historie vinohradnictví na Moravě jako extrémně teplý a suchý (viz graf 1). Na mladších keřích révy vinné se meteorologický průběh projevoval negativně, keře byly pod velkým stresem a bylo nutné je zavlažovat. Starší keře si se suchem poradily lépe. Průběh počasí byl podobný roku 2003. Po celé vegetační období byl velmi malý infekční tlak, což bylo dané zejména nízkým úhrnem srážek (viz graf 1). Ke konci vegetačního období se objevovaly přívalové deště, při kterých vlivem přijímání vody docházelo k praskání bobulí.

Přípravky na bázi rostlinných extraktů nemají z komerčního hlediska velkou historii, ale využívají se již tisíce let. Mezi nejrozšířenější přípravky na českém trhu, které se využívají nejen ve vinohradnictví, lze zařadit HF-mycol, Alginure (viz kapitoly 4.4.3. a 4.4.4), VitiSan a Cocana. Všechny tyto přípravky obsahují látky na rostlinné bázi, tedy polyfenolické a fenolické látky, terpeny, aminokyseliny a vyšší mastné kyseliny.

Jedinými komerčními přípravky na bázi původních domácích rostlin jsou na trhu KP Protekt a KP Réva vinná (Kouzlo Přírody Protekt a Kouzlo přírody Réva vinná – AgroBio Opava s. r. o.). KP réva vinná je na bázi studeného vodního výluhu z kopřivy a přesličky (viz kapitola 3.5.1.). Obsahuje přidané množství živin (N, P, K, Mg, Ca) a stopových prvků (Fe, Zn, Cu, Mn). Působí přímo proti roztočům a houbovým patogenům. Podporuje také růst a vitalitu keře. Zvyšuje obranyschopnost révy vinné a snižuje tak stres. Na listech vytváří film a mění pH na zásadité (AgroBio Opava s. r. o. 2016). KP Protekt je studený vodný výluh z přesličky (viz. 3.5.1.). KP Protekt je vhodný proti houbovým chorobám a proti škůdcům (mšicím, housenkám, aj.)

Většina vinohradníků hospodaří v režimu integrované produkce, IP se stalo jakýmsi standardem. Cílem IP je dosažení optimálních výnosů vyšší kvality cestou, která nezatěžuje životní prostředí. Vlivem rozsáhlé dotační politiky přechází mnoho vinařství na ekologické vinohradnictví.

Z provedeného pokusu vyplývá, že sledované varianty v režimu Extrakt, na které byly aplikovány přípravky na bázi vodných výluhů z bylin, jsou stejně účinné jako běžně používané přípravky ve vinohradnické praxi v režimu Bio. Kvalita moštu (viz graf 3) se u jednotlivých variant významně nelišila. Pouze obsah asimilovatelného dusíku byl u všech variant nižší, což je dáno průběhem teplot a malého množství srážek, nikoliv použitými přípravky. Varianty v režimu extrakt vykazovaly větší antiradikálovou aktivitu (viz graf 4) než varianty ošetřované Alginurem a HF-Mycolem.

Z hodnocení intenzity napadení jednotlivých variant houbovými patogeny je patrná nízká intenzita infekčního tlaku (viz graf 2). Množství resveratrolu měly varianty BIO a EXTRAKT téměř stejné. Lišily se pouze v množství piceidu, kterého bývá v bílých odrudách větší množství (ROMERO, 1999). Varianty Hib. Extrakt a Mal. Extrakt měly nižší množství cis-piceidu 10,967 mg/l a 17,961 mg/l než, Hib. Bio a Mal Bio, které vykazovaly větší množství 20,390 mg/l a 23,230 mg/l cis-piceidu. Podobný trend byl i při stanovení trans-piceidu (viz. Graf č. 6). Vyšší množství naměřeného piceidu u variant v režimu Bio lze přikládat intenzitě napadení. Varianty Extrakt, které měly intenzitu napadení nižší, vykazovaly menší množství cis a trans-piceidu než varianty Bio.

Nelze říci, do jaké míry tuto skutečnost ovlivnily přípravky nebo klimatický průběh ročníku 2015, který byl teplý a suchý. Ochrana v režimu Bio (Alginure a HF-mycol) stejně jako v režimu Extrakt (KP réva vinná, KP Protekt) byly dostačující.

Pokud zvolíme jakékoli přípravky na ochranu révy vinné, vždy je potřeba kvalitní a včasné provedení zelených prací. Aby infekční tlak byl co nejmenší, je potřeba minimalizovat vhodná místa pro rozvoj patogenů, tedy udržovat keř vzdušný. Pro zdraví a vitalitu révy vinné je podstatný vyrovnaný příjem živin. Vyrovnaný příjem živit lze zajistit ozeleněním druhově bohatou směsí a jejím postupným zaoráváním do půdy.

Provedený pokus ukázal na možnosti použití běžně dostupných bylin v ochraně révy vinné. Ve srovnání s komerčními preparáty si výluhy z bylin vedly velice dobře (viz graf 4) a mohou být tak případnou alternativou ve vinohradnické praxi v ochraně révy vinné proti houbovým patogenům. Použitím těchto rostlinných prostředků můžeme výrazně snížit aplikaci různých systémových a kontaktních fungicidů na ochranu révy vinné, a tím snížit tlak na životní prostředí. Účinný systém ochrany révy vinné proti houbovým patogenům je založený na signalizaci a prognóze, kvalitních zelených

pracích, vyvážené výživě a včasné aplikaci přípravků jako je KP Réva vinná, KP Protekt, HF-Mycol, Alginure, Aqua vitrin K apod.

## **7 Závěr**

Rostlinné přípravky používané na ochranu révy vinné zde byly dříve, než většina přípravků, které se dnes běžně využívají ve vinohradnické praxi. Tato práce chce poukázat na množství aktivně účinných látek a sloučenin obsažených v běžně dostupných rostlinách kolem nás, a jejich antifungálních účincích.

Experiment s běžně dostupnými komerčními přípravky ve srovnání s rostlinnými výluhy dokázal jejich rovnocennou efektivitu v boji proti houbovým patogenům a celkového vlivu na zdravotní stav hroznů, případně vína. Přírodní přípravky mohou minimalizovat chemické vstupy do křehkého přírodního systému vinohradu a tím podpořit přirozenou obranyschopnost révy vinné. Po ekonomické stránce jsou komerčně vyráběné výluhy z rostlin stejně drahé jako přípravky na bázi mědi a síry používané v režimu integrované produkce, což je dáno relativně malou poptávkou po přípravcích z výluhů rostlin. V případě domácí výroby extraktů je cena nesrovnatelně nižší.

Práce poukazuje na možnosti snížení chemických vstupů při pěstování révy vinné.

## **8 Shrnutí**

Práce se zabývá možností ochrany révy vinné proti houbovým chorobám. Aplikaci alternativních prostředků v podobě vodních extraktů z běžně dostupných rostlin a jejich účinku na zdravotní stav PIWI odrůd.

V teoretické části diplomové práce jsou popsány nejvýznamnější houbové choroby révy vinné. Dále jsou popsány interspecifické odrůdy, které byly použity při experimentu. Literární část se věnuje přípravě rostlinných výluhů a extraktů z bylin a jejich účinných látkách v nich obsažených.

Experimentální část se věnuje vlivu rostlinných přípravků na zdravotní stav PIWI odrůd. Následnému statistickému a analytickému vyhodnocení sledovaných parametrů a porovnání všech testovaných variant.

### **8.1 Klíčová slova**

Réva vinná, PIWI odrůdy, rostlinné extrakty, ochrana, houbové choroby



## **9 Summary**

This thesis focuses on the protection of vine against fungal diseases. Application of alternative means in the form of aqueous extracts from ordinary available plant of their effect on health status Piwi varieties.

The theoretical part of this thesis describes the most important fungal diseases of grapes. Further they are described interspecific varieties, which were used for the experiment. Literary part is devoted to the preparation of herbal liquors and extracts of herbs and their active substances in a plant extracts.

The experimental part is devoted to the influence of herbal preparations on the health of Piwi varieties. Results were statistical and analytical evaluated. Monitored parameters were comparison with all tested variants.

### **9.1 Key words**

Vitis vinifera, PIWI varieties, plant extracts, protection, fungal diseases

## 10 Seznam obrázků

OBR. 1 PLÍSEŇ RÉVY	11
OBR. 2 PADLÍ RÉVY	12
OBR. 3 PLÍSEŇ ŠEDÁ	13
OBR. 4 HYPERSENZITIVNÍ REAKCE NA LISTU	15
OBR. 5 BIOSYNTÉZA RESVERATROLU	17
OBR. 6 CHEMICKÁ STRUKTURA RESVERATROLU A PICEID ISOMERŮ	18
OBR. 7 PŘESLIČKA ROLNÍ	26
OBR. 8 FENYKL OBECNÝ	26
OBR. 9 HNĚDÁ MOŘSKÁ ŘASA	27
OBR. 10 1,3-GLUKAN LAMINARIN	27
OBR. 11 KYSELINA SALICYLOVÁ	28
OBR. 12 HIBERNAL	33
OBR. 13 MALVERINA	34
OBR. 14 ÚPRAVA LISTŮ	41

## 11 Seznam tabulek

TAB. 1 MEZIROČNÍ VÝMĚRA PIWI ODRŮD PĚSTOVANÝCH V ČR	12
TAB. 2 APLIKACE PŘÍPRAVKŮ	36
TAB. 3 POPISNÁ STATISTIKA AA, RP, CF a F V LISTECH	46
TAB. 4 VÝSLEDKY HPLC ANALÝZY V LISTECH	49
TAB. 5 POPISNÁ STATISTIKA HPLC V LISTECH	50

## 12 Seznam grafů

GRAF 1 METEOROLOGICKÁ DATA 2015 ZE STANICE LEDNICE	32
GRAF 2 HODNOCENÍ INTENZITY NAPADENÍ A INDEXU HUSTOTY	37
GRAF 3 SOUHRNNÁ CHARAKTERISTIKA VARIANT	43
GRAF 4 CELKOVÉ FENOLICKÉ LÁTKY	44
GRAF 5 ANTIRADIKÁLOVÁ AKTIVITA A REDUKČNÍ SÍLA VE VÍNĚ	45
GRAF 6 STANOVENÍ FLAVANOLŮ, VYJÁDŘENO V KATECHINECH	46
GRAF 7 STILBENY	48
GRAF 8 SOUHRN VÝSLEDKŮ	51

## 13 Zdroje

Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Tesson, T., Bessis, R. (2000).

Stilbene Content of Mature *Vitis vinifera* Berries in Response to UV-C Elicitation.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (12), 6103–610

Arnous, A.; Makris, D.P.; Kefalas P. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5736-5742.

Aziz, Aziz et al. "Laminarin vyvolává obranné reakce vinné révy a vyvolává ochranu proti Botrytis cinerea a Plasmopara viticola." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16,12 (2003): 1118-1128.

BALÍK, Josef. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. ISBN 80-7157-317-5.

BALÍK, Josef. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. 2. vyd. / . Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 80-7157-809-6.

Bavaresco, L., et al. "Stilbene compounds: from the grapevine to wine." *Drugs under experimental and clinical research* 25.2-3 (1998): 57-63.

Bisson F. Linda, Christian E. Butzke *American Journal of Enology and Viticulture* January 2000 51: 168-177; published ahead of print January 01, 2000

Bely, M., et al. (2003). "Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**(6): 507-512.

Broekaert, Willem F., et al. "Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system." *Plant physiology* 108.4 (1995): 1353.

CROPSCIENCE, B. (2012). "ONLINE."

Dagostin, Silvia, et al. "Salvia officinalis extrakt může chránit vinnou révu proti Plasmopara viticola." *Nemoc Plant* 94,5 (2010): 575-580.

da Rocha Neto, A. C., et al. (2016). "Efficacy of salicylic acid to reduce *Penicillium expansum* inoculum and preserve apple fruits." *International journal of food microbiology* **221**: 54-60.

Drzewiecka, K., et al. (2014). "Copper phytoextraction with *Salix purpurea* x *viminalis* under various Ca/Mg ratios. Part 2. Effect on organic acid, phenolics and salicylic acid contents." *Acta Physiologiae Plantarum* **36**(4): 903-913.

Ebeler, S. E. and J. H. Thorngate (2009). "Wine Chemistry and Flavor: Looking into the Crystal Glass." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(18): 8098-8108.

EKOVÍN (2011). "Regulace chorob." *Svaz integrované a ekologické produkce hroznů a vína: EKOVÍN* [online].

FIBL (1999). "Krankheits- und Schädlingsregulierung im biologischen Rebbau."

Gastol, M. (2015). "Vineyard performance and fruit quality of some interspecific grapevine cultivars in cool climate conditions." *Folia Horticulturae* **27**(1): 21-31.

GEISLER, B. (2011). "Resveratrol: unleashing the benefits of red wine." *Healthy Living Publications* **Summertown, Tenn.**

GHASTE, M. (2015). "Chemical composition of volatile aroma metabolites and their glycosylated precursors that can uniquely differentiate individual grape cultivars." *FOOD CHEMISTRY* **188**: 309-319.

Heidarieh, M., et al. (2015). "Proximate analysis of different groups of irradiated alginic acid." *International Journal of Radiation Research* **13**(1): 91-94.

Hill, G. N., et al. (2010). "Tools for accurate assessment of botrytis bunch rot (*Botrytis cinerea*) on wine grapes." *New Zealand Plant Protection* **63**: 174-181.

HLUCHÝ, M. (2011). ZEMĚDĚLEC **23**.

Jiang, K., et al. (2015). "Development of Inhibitors of Salicylic Acid Signaling." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(32): 7124-7133.

Kelebek, H., et al. (2009). "HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan." Microchemical Journal **91**(2): 187-192.

KRAUS, V. (2003). "Pěstujeme révu vinnou." Praha: Grada **1. vyd**: 96.

Kuflik, T., et al. (2009). "Optimization of copper treatments in organic viticulture by using a web-based decision support system." Computers and Electronics in Agriculture **68**(1): 36-43.

Lamuela-Raventos, Rosa M., et al. "Direct HPLC analysis of cis-and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43.2 (1995): 281-283.

Li, Y.-G.; Tanner, G.; Larkin, P. The DMACA-HCl protocol and the threshold proanthocyanidin content for bloat safety in forage legumes. *J. Sci. Food Agric.* 1996, 70, 89-101

Maghradze, D., et al. (2009). Conservation and Sustainable Use of Grapevine Genetic Resources in the Caucasus and Northern Black Sea Region. Ix International Conference on Grape Genetics and Breeding. E. Peterlunger, G. DiGaspero and G. Cipriani. **827**: 155-158.

Nadia, et al. "Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *psidi*: Expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein." *European Journal of Plant Pathology* 107.2 (2001): 249-261.

Narduzzi, L., et al. (2015). "Comparing Wild American Grapes with *Vitis vinifera*: A Metabolomics Study of Grape Composition." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(30): 6823-6834.

NEČAS, T. (2006). "Interaktivní databáze chorob a škůdců ovocných plodin."

PAVELA (2011). "Botanické pesticidy." České Budějovice: Kurent Vyd. 1.

PAVELA, Roman. *Rostlinné insekticidy: hubíme hmyz bez chemie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. Česká zahrada. ISBN 80-247-1019-6.

Pietta, P., et al. (1991). "IDENTIFICATION OF FLAVONOIDS FROM GINKGO-BILOBA L, ANTHEMIS-NOBILIS L AND EQUISETUM-ARVENSE L BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID-CHROMATOGRAPHY WITH DIODE-ARRAY UV DETECTION." Journal of Chromatography **553**(1-2): 223-231.

Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 3396-3402.

Romero-Pérez, Ana I., et al. "Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47.4 (1999): 1533-1536.

Ruiz-Garcia, Y., et al. (2012). "Improving Grape Phenolic Content and Wine Chromatic Characteristics through the Use of Two Different Elicitors: Methyl Jasmonate versus Benzothiadiazole." Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**(5): 1283-1290.

Somers, T.C.; Evans, M.E. Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO<sub>2</sub>, "chemical age". *J. Sci. Food Agric.* 1977, 28, 279-287.

Schnee, S., et al. (2013). "Vitis vinifera Canes, a New Source of Antifungal Compounds against Plasmopara viticola, Erysiphe necator, and Botrytis cinerea." Journal of Agricultural and Food Chemistry **61**(23): 5459-5467.

SLEGGERS, A. (2015). "Volatile Compounds from Grape Skin, Juice and Wine from Five Interspecific Hybrid Grape Cultivars Grown in Quebec (Canada) for Wine Production." MOLECULES **20**(6): 10980-11016.

Stecher, Günther, et al. "Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC–ESI–MS–MS." *Fresenius' journal of analytical chemistry* 371.1 (2001): 73-80.

Tandon, G., et al. (2015). "Evidence of salicylic acid pathway with EDS1 and PAD4 proteins by molecular dynamics simulation for grape improvement." Journal of Biomolecular Structure & Dynamics **33**(10): 2180-2191.

TRIOLI, G., HOFMANN, U. (2009). "Kodex dobrého ekologického vinohradníctví a výroby vína." ORWINE.

Torres, Patricio, et al. "Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from Yucca periculosa." *Phytochemistry* 64.2 (2003): 463-473.

Waterman, P.G.; Mole, S. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*; Blackwell Scientific Publ.: Oxford, 1994; s. 83-91.

Waffo Teguo, Pierre, et al. "Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from Vitis vinifera cell cultures." *Journal of Natural Products* 61.5 (1998): 655-657.

Wink, M. (2011). Annual Plant Reviews, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, John Wiley & Sons.

Zoecklein, B.W.; Fugelsang, K.C.; Gump, B.H.; Nury, F.S. *Production Wine Analysis*; Van Nostrand Reinhold Publ.: New York, 1990; s. 129-168.

Zheng, W. and S. Y. Wang (2001). "Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49** (11): 5165-5170.